



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE,
CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: Metodologia Clinica, Scienze Endocrinologiche e
Diabetologiche

CICLO: XXV

DIAGNOSI DI DIABETE: È SUFFICIENTE L'HbA1c?

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Supervisore :Ch.ma Prof.ssa Annunziata Lapolla

Ch.mo Prof. Mario Plebani

Dottorando: Dr. Chiara Cosma

INDICE

Abstract	pag 7
Riassunto	pag 8
Capitolo 1 : Introduzione	pag.11
1.1 Cenni Storici della Patologia Diabetica.	pag.11
1.2. Emoglobina	pag. 26
1.3. Emoglobina Glicata	pag. 32
1.3.1. Goal Analitici dell' HbA _{1c}	pag. 37
1.4 Diabete	pag. 39
1.4.1. Patogenesi e Fisiopatologia del DM1	pag. 40
1.4.2. Patogenesi e Fisiopatologia del DM2	pag. 42
1.4.2.1. Disfunzione delle β cellule	pag. 42
1.4.2.2. Insulino-Resistenza	pag. 44
Capitolo 2: Scopo	pag. 47
Capitolo 3: Metodi	pag. 51
3.1. Dati Anamnestici	pag. 51
3.2 Emoglobina Glicata	pag. 52
3.3. Glicemia	pag. 53
3.3.1 Principio del Metodo	pag. 53
3.4 HDL	pag. 54
3.4.1 Principio del Metodo	pag. 55
3.5 LDL	pag. 56
3.5.1. Principio del Metodo	pag. 58
3.6 Colesterolo Totale	pag. 59
3.6.1. Principio del Metodo	pag. 60

3.7 Trigliceridi	pag.61
3.7.1.Principio del Metodo	pag.61
3.8 Creatinina	pag.62
3.8.1 Principio del Metodo	pag.62
3.9 Insulina	pag.63
3.9.1. Principio del Metodo	pag.64
Capitolo 4 : Risultati	pag.67
4.1. Descrizione generale della popolazione	pag.67
4.2: Classificazione della popolazione con l'utilizzo Dell' OGTT	pag.70
4.2.1.Popolazione con FPG \geq 7,00 mmol/L e/o 2hPG \geq 11,00 mmol/L	pag.71
4.2.2. Popolazione con IFG o IGT oppure IFG e IGT	pag.71
4.2.2.1 Popolazione con IFG	pag.72
4.2.2.2 Popolazione con IGT	pag.72
4.2.2.3 Popolazione con IFG e IGT	pag.73
4.2.3. Popolazione con FPG tra 3,7-5,6 mmol/L e/o 2hPG tra 2,00-7,8 mmol/L	pag.74
4.3 : Classificazione della popolazione in base ai valori di HbA _{1c}	pag .75
4.3.1. Popolazione con valori di HbA _{1c} \geq 48 mmol/mol	pag.75
4.3.2. Popolazione con valori di HbA _{1c} 39-47 mmol/mol	pag. 76
4.3.3. Popolazione con valori di HbA _{1c} \leq 38 mmol/mol	pag.76

4.4.: Profilo Biochimico	
della popolazione studiata	pag.77
4.4.1 Creatinina	pag.78
4.4.2. Profilo Lipidico	pag.79
4.4.3. Insulina e HOMA Index	pag.82
4.5 : Confronto tra i criteri biochimici per la diagnosi di diabete, condizione pre-diabetica e condizione normoglicemica	pag.84
Capitolo 5 :. Discussione	pag.87
Capitolo 6 : Conclusioni	pag.97
Capitolo 7: Bibliografia	pag.99

ABSTRACT

Background: Glycated haemoglobin (HbA1c) is considered the ‘gold standard’ for monitoring metabolic control in diabetes. New diagnostic criteria have been proposed by the American Diabetes Association (ADA) focusing on A1C for diagnosis of diabetes as well as for identification of the subjects at increased risk, being values $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol) diagnostic for diabetes and values between 5,7 - 6,4% , (39- 47 mmol/mol) suggestive of a pre-diabete condition. Measuring HbA1c has several advantages over glucose measurements, but its particular adoption should be considered only if the test is carried out under standardised conditions taking into account its limitations, the impact of measurement on the epidemiology of diabetes and other categories of glucose intolerance is widely discussed.

Research design and Methods: The study, started on April 2010, includes all subjects presenting to outpatients department with request of OGTT in which the diagnostic performance of new proposed criteria and standard 75-g oral glucose tolerance test (OGTT) has been compared. Until now 498 subjects (males n=194, females n= 304, mean age (51,17 \pm 15,49)years) have been enrolled. Plasma glucose, lipid profile and creatinine have been measured using Cobas 8000, (Roche Diagnostics); Hb A1C with HPLC procedure (Adams HA-8180 Arkray, Kyoto, Japan) and serum insulin with Immulite 2000 (Simens).

Results: OGTTs has identified pre-diabetic condition in 21.48% of subjects (n=107) while new diagnostic criteria in 40,16% (n=200), being serum insulin, mean 3,17 U/L and 4,764 U/L and HOMA index, mean 0.95 and 1.240 respectively. The diagnosis of diabetes occurred in 18,27% of subjects (n=91, mean serum insulin 5,9 U/L), vs 6.62% (n=33, mean

serum insulin 4,92 U/L) according to OGTT and new proposed criteria respectively. The HOMA index were respectively 1.76 and 1.53.

Conclusion: The data obtained in our study evidence that the proposed new diagnostic criteria are questionable because 11,65 % of diabetes's cases are misclassified.

RIASSUNTO

Introduzione: L'emoglobina glicata è considerata il "gold-standard" per il monitoraggio del paziente diabetico. American Diabetes Association (ADA) ha proposto dei nuovi criteri diagnostici per il diabete basati sull'utilizzo dell' HbA_{1c} , ponendo questi cut-off : HbA_{1c} ≥ 6,5% (48 mmol/mol) diagnosi di diabete, HbA_{1c} tra 5,7 - 6,4% , (39- 47 mmol/mol) condizione di pre-diabete mentre HbA_{1c} ≤ 5,6% (≤ 38 mmol/mol) condizione normale. La misura dell' HbA_{1c} presenta una serie di vantaggi rispetto alla misura del glucosio, ma la sua adozione come test per fare diagnosi dovrebbe essere considerata solo se tale test è standardizzato IFCC.

Scopo : Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare se HbA_{1c} poteva sostituire per la diagnosi di diabete la classica OGTT.

Materiali e Metodi: Questo studio è iniziato nell' Aprile 2010; Sono stati reclutati tutti i pazienti che provenivano presso gli Ambulatori di via San Massimo con richiesta di OGTT. A questi pazienti, sottoconsenso informato, è stata prelevata una provetta aggiuntiva per l'analisi dell' HbA_{1c}.

Sono state coinvolte 498 persone, 194 maschi e 304 femmine con un età media di 51,17 anni. A tutte queste persone oltre all' OGTT e HbA_{1c} sono stati misurati la creatinina (indice di funzionalità renale), profilo lipidico (

colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi) e insulina per il calcolo dell' HOMA Index (indice di insulino resistenza).

L' HbA1c è misurata da un HPLC (Adams HA-8180 Arkray, Kyoto, Japan) l'OGTT, creatinina, profile lipidico dallo Strumento Cobas 8000 (Roche Diagnostics) e l'insulina dallo strumento Immulite 2000 (Simens).

Risultati: l' OGTT ha identificato una condizione prediabetica nel 21,48% dei soggetti (N= 107) sebbene i nuovi criteri ADA l'abbiano identificata nel 40,16% (N=200), la media dell'insulina è 3,17 U/L e 4,764 U/L rispettivamente e la media dell' HOMA index di 0.95 e 1,240 rispettivamente.

La diagnosi di diabete, invece, è identificata nel 18,27% dei soggetti (N=91, la media dell'insulina è 5,9 U/L) vs 6,62% (N=33, media dell'insulina 4,92 U/L), accordando rispettivamente con i criteri OGTT vs ADA. The Homa index furono in media di 1,76 e 1,53 , rispettivamente.

Conclusioni: i nostri dati dimostrano che i nuovi criteri per la diagnosi di diabete risultano, al momento, questionabili in quanto, 11,65% dei soggetti della nostra coorte risultano essere misclassificati.

CAPITOLO 1

-INTRODUZIONE-

1.1 CENNI STORICI DELLA PATOLOGIA DIABETICA

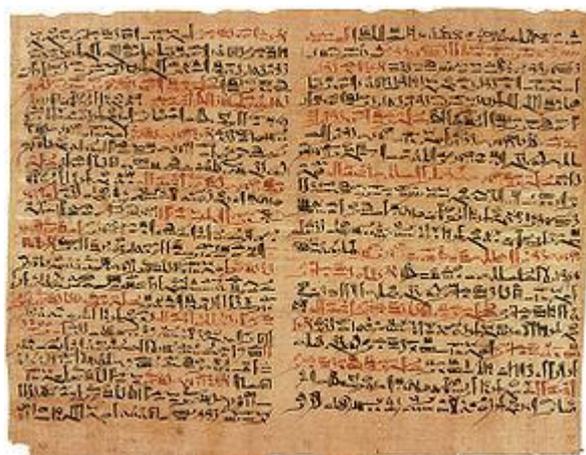


Figura 1.1.1: Papiro di Ebers 1550 a.C.

Il primo documento della storia della medicina, il papiro di Ebers (1550 a. C.) venne alla luce nel 1863 d. C., dalle tombe dei Thabes (in Egitto) per merito dell' egittologo Georg Ebers.

In questo papiro si accenna ai sintomi del diabete e si propongono varie cure a base di datteri, tritello di grano, gomma, miele, ginepro e lievito di birra e un trattamento consigliato della durata di quattro giorni a base di un decotto di ossa, frumento, grano, granaglie e bacche e terra (1,2,3).

Il diabete è una patologia già nota nell' antichità.

Sebbene il padre della medicina Ippocrate (460 a.C.) (2) non menzioni espressamente la patologia diabetica tuttavia nei suoi scritti ci sono descrizioni in linea con i sintomi di tale malattia, come eccessivo flusso urinario.

Areteo di Cappadocia (81-138 d. C.), seguace di Ippocrate, descrisse con accurata precisione i sintomi della malattia (2,4,5,6,7) e fu lui a coniare il termine DIABETE, che significa “passare attraverso” o “sifone” , descrivendola così :”il diabete è un’afflizione terribile, non molto frequente tra gli uomini, essendo una fusione verso il basso della carne e degli arti nelle urine”.

Galeno, medico romano (131-201 d. C), invece, ne parla come di un’ afflizione rara riferendosi solo a due casi da lui seguiti definendoli come “Diarrea Urinosa” e “ Dipsakos (malattia della sete)” (2,3,8).

Solo nella letteratura sanscrita (9), datata V e VI sec. d.C., con Susruta, Charaka e Vaghbata, compare l’associazione della poliuria con una sostanza dolce nelle urine. Venne descritta con queste parole l’urina di questi pazienti poliurici: “un’ urina dolce dal sapore del miele, appiccicosa al tatto e che attrae fortemente le formiche”.

Sempre nella letteratura indiana di questo periodo il diabete viene visto come una condizione congenita o come una condizione ad esordio tardivo e si trovano anche le prime relazioni tra diabete ed ereditarietà, diabete e obesità e vita sedentaria e dieta.

Durante il periodo compreso tra il IX e il XI sec. d. C., la medicina araba era al suo picco e tutte le opere di Buqrat e discepoli vennero tradotte e studiate. Due medici di spicco di quest’epoca contribuirono alla conoscenza del diabete: Shaihn-Ul-Rais Bu Ali Sina Ibne (960 – 1037 d.C.) e Musa Bin Maimoon (1135 d. C). Sina Ibne descrisse accuratamente le caratteristiche cliniche della malattia menzionando due complicanze specifiche ossia la cancrena e il crollo della funzione sessuale. Musa Bin Maimoon affermò di aver seguito oltre 20 persone affette dal

diabete che era provocato dalle acque dolci del fiume Nilo e dal calore che si diffonde oltre i reni (2,3).

Nessun progresso ulteriore venne fatto nella comprensione del diabete fino al XVI sec. d.C, fino a quando un medico svizzero Von Hohenheim (2) riferì che l'urina dei pazienti diabetici conteneva una sostanza anomala che rimaneva polvere bianca, dopo l'evaporazione, concludendo che tale sostanza era un sale e che il diabete era dunque dovuto alla deposizione di questo sale nei reni causando la sete e la poliuria.

La storia moderna del diabete, però, inizia con l'inglese Thomas Wills (10) (1621- 1675 d.C), con le “ Osservazione sul Diabete (1674 d.C.) e con gli esperimenti (1776 d.C) di Matthew Dobson (Yorkshire 1735-1784 d.C.) , che portarono a stabilire che per fare diagnosi di diabete ci deve essere la presenza di zucchero nelle urine e nel sangue del paziente.



Figura 1.1.2: Thomas Wills (1621-1675)

A seguito di questi numerosi esperimenti la malattia diabetica non venne più considerata come una malattia rara. Thomas Wills si riferì al diabete come “male dell’urina” prendendo atto come nei pazienti con il diabete: “l’urina è meravigliosamente dolce, come se fosse imbevuta di miele o zucchero”.

Egli, inoltre, affermò che il diabete era prima di tutto una malattia del sangue e non dei reni e che anche la dolcezza prima appariva nel sangue e poi nelle urine.

Sebastianus Pusinnius, nel 1653, medico patrizio lucchese inizia, con il suo “ De Diabete” la divulgazione, in forma erudita, sul diabete, consigliando al paziente diabetico come fattore importante l’autocontrollo alimentare.

Nella stessa epoca Thomas Sydenham , soprannominato l’ Ippocrate Inglese, (1624-1689 d.C.) ipotizzò che la malattia diabetica fosse una malattia sistemica derivante dal sangue (2,3,10,11,12,13,14)



Figura 1.1.3: Thomas Sydenham (1624-1689)

Un medico Svizzero, Johann Conrad Brunner (1653- 1727 d.C.), (2,3,10,11,12,13,14) arrivò molto vicino alla correlazione tra pancreas e diabete con la rimozione incompleta del pancreas di un cane e scrisse testualmente tali parole : *L’ animale è fatto di gran parte di acqua, dopo la*

rimozione di parte del pancreas, il cane aveva molta sete di acqua potabile in proporzione con il volume di urine.

Che il sapore mielato dell'urina diabetica non sia dovuto a un sale (come pensava Wills) ma a una sostanza zuccherina (“ *saccharine matter* “) è stabilito nel 1776, da Mathew Dobson (1736-1786) (15).

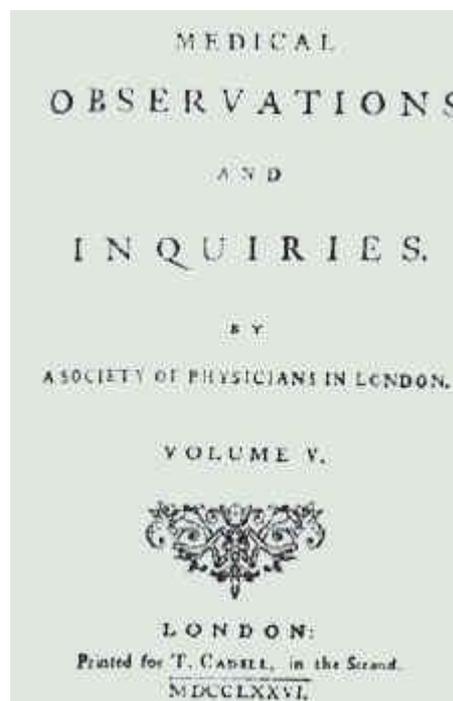


Figura 1.1.4: Il frontespizio degli Atti nei quali è contenuta la comunicazione di Mathew Dobson (1736-1786)

In quell'anno, Dobson, da Liverpool, fa comunicare dall'amico John Fothergill (1712-1780) alla Medical Society nella Mitre Tavern, in Fleet Street a Londra, le sue osservazioni su nove casi di diabete. In tutti, aveva ricavato per evaporazione e cristallizzazione da una libbra (360 g) di urina 1 oncia(36 g) di sostanza biancastra, il cui gusto era quello dello zucchero bruno descrivendo il tutto così: “è *granulato e si è rotto facilmente tra le*

dita, l'odore è dolce come la canna da zucchero, non poteva essere distinto dallo zucchero tranne che per il fatto che la sua dolcezza lascia un leggero senso di freschezza nel palato”.

Nel 1780, Francis Home (1719-1813), già medico militare nelle campagne di Fiandra, durante le quali aveva avuto modo di frequentare a Leiden le lezioni di Hermann Boerhaave (1668 – 1738) grande analizzatore di urine, è primo professore di materia medica all' Università di Edinburgh, tanto benemerita nella storia della diabetologia. Home conferma che lasciando in una stanza calda un recipiente di legno

con l'urina del diabetico Murray, questa diventa schiumosa e tende a formare – dopo 10 giorni – molte bolle d'aria ed è caratterizzata da un gusto acidulo.

In altri termini fermenta come fermenta lo zucchero dell'uva nella preparazione del vino. *E' una vinous fermentation* : il “ *ribbolir dei tini*” come definito da Giosuè Carducci. Di qui l'idea di misurare la quantità di zucchero presente nell'urina diabetica per mezzo di prove di fermentazione, con l'aggiunta di lievito.

Nascerà così il saccarometro, che dalla quantità di acido carbonico (CO₂), sviluppato dalla fermentazione dello zucchero, ne misurerà approssimativamente il contenuto urinario.

I saccarometri, dal modello di Einhorn (1862-1953) a quello di Lohnstein (1866-1918), resteranno in uso fino agli anni Quaranta del XX sec.

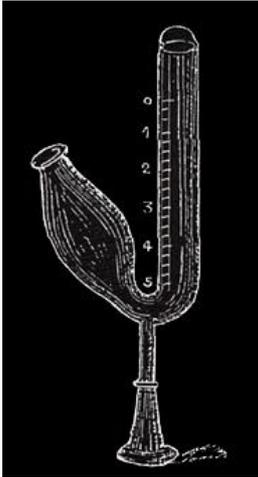


Figura 1.1.5:
Modello di Einhorn

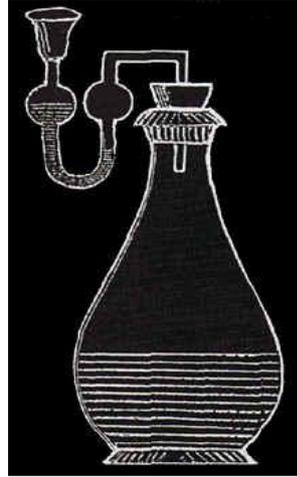


Figura 1.1.6:
Modello di Lohnstein

Mathew Dobson deve essere anche ricordato per aver notato il sapore dolce del siero nel sangue, più accentuato nei diabetici, non così forte come nell'urina. Egli non riuscì, però, ad isolare la sostanza zuccherina del sangue, come già aveva fatto dall'urina, ma giunse a sospettare che, nel diabetico, vi fosse un passaggio dello zucchero dal sangue all'urina.

Sempre a Edinburgo, William Cullen (1712 – 1790), famoso per la chiarezza metodica del suo insegnamento, qualifica genericamente insipide forme di poliuria non mellita.

Una distinzione ufficiale tra il diabete mellito e insipido non avverrà che nel 1792, ad opera di Johann Peter Frank (1745- 1821) , Professore a Pavia.



Figura 1.1.7. :La prima distinzione ufficiale tra diabete mellito e diabete insipido.

La procedura indicata da Dobson per il rilievo dello zucchero nell' urina, nonché la misura giornaliera della quantità dell'urina stessa, è applicata (collaborando con il paziente) dallo scozzese John Rollo (1749- 1809), (16,17) *chirurgo generale* della Royal Artillery a Woolwich. Nel 1797, pubblica : “ *Account on two cases of diabetes mellitus ...*” nel quale analizza minuziosamente il corso della patologia diabetica in due ufficiali , uno, il Captain Meredith, di 37 anni, l'altro, una persona più anziana. John Rollo quando afferma :”*la sua soddisfazione per avere quanto meno dato i mezzi per conoscere e trattare metodicamente il diabete mellito*” è consapevole di seguire un primitivo approccio psicopedagogico.

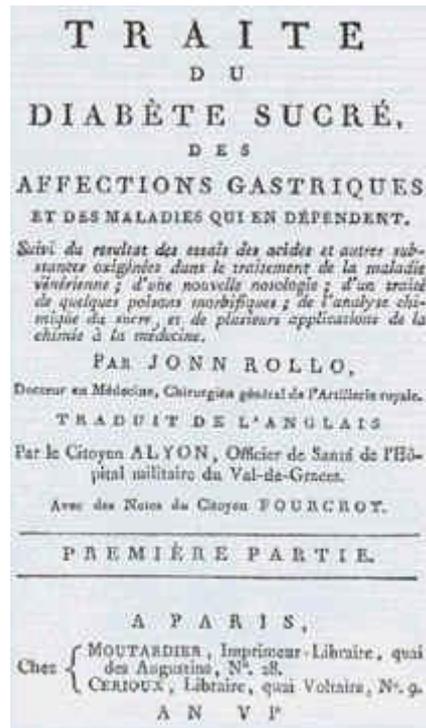


Figura 1.1.8.: L'edizione parigina della monografia di John Rollo

Tuttavia, però, Rollo è convinto che la materia zuccherina che si trova nell'urina si formi nello stomaco, per una sua alterazione secretiva scatenata dalle sostanze vegetali. Egli perciò infligge ai pazienti una ferrea dieta a base esclusiva di carni grasse (preferibilmente vecchie e con grassi rancidi), magari con l'aggiunta di emetici.

Rollo ebbe altri meriti oltre a quello di aver coniato il termine mellito tra i quali bisogna ricordare la descrizione di “cataratta a causa del diabete” e “l'odore di acetone nel respiro di alcuni pazienti diabetici”.

Nel 1815 un chimico francese, Michel Eugene Chevreul (1786-1889) (18), dimostrò che lo zucchero nell'urina dei diabetici è glucosio. Da questo momento è corretto descrivere la presenza degli zuccheri nell'urina mediante il termine *glicosuria*. Michel Eugene Chevreul va ricordato anche perché fu lui a scoprire nel 1832 la creatinina.

Mentre in Europa ci si prepara alla prima Guerra Mondiale, la scoperta fortunosa del diabete da pancreasectomia dà credito alle intuizioni del medico francese Etienne Lancereaux (1829 -1910) (19)che aveva trovato atrofia del pancreas in un suo caso di *diabète magre*.

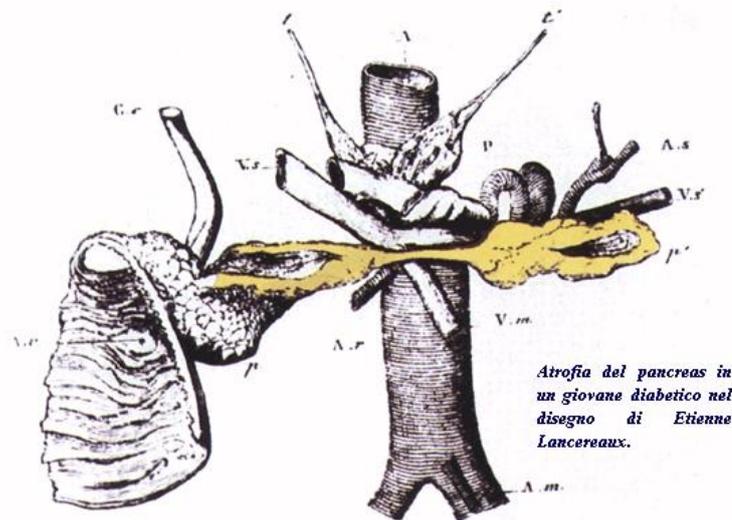


Figura 1.1.9.: Atrofia del pancreas di un giovane diabetico
Disegno di Etienne Lanceraux (1829-1910)

Ma, per oltre trent'anni, l'evento non troverà stranamente applicazioni pratiche per la cura del diabete. Deludono infatti le accanite indagini di numerosi ricercatori di tutto il mondo, spesso in irriducibile lotta tra di loro, che si susseguono a scadenza ravvicinata.

Falliscono, intanto, i tentativi terapeutici con estratti pancreatici in giovani diabetici. Nel 1893, a Torino, Ferdinando Battistini (1867 – 1920) inietta a due giovani diabetici, durante alcuni giorni, per via sottocutanea e intramuscolare, 5-25 cc di un estratto (acquoso e glicemico), preparato con somma attenzione nel laboratorio della Clinica Medica, da pancreas bovino fresco. A parte alcuni ascessi nel luogo dell' iniezione, non si rilevano variazioni nel decorso clinico del diabete e i due pazienti dichiarano di *sentirsi meglio* e vogliono essere dimessi.



Figura 1.1.10.: Ferdinando Battistini (1867- 1920) all' Ospedale S. Giovanni di Torino tentò nel 1893 un trattamento con estratto pancreatico

Nel 1889 il russo Oskar Minkowski (1858-1931),(20,21,22) seguace di Brunner, non ottenne alcun risultato, con trapianti sottocutanei di tessuto pancreatico, utilizzando per i suoi esperimenti sempre il modello canino.



Figura 1.1.11.: Oskar Minkowski (1858-1931)

Tuttavia Minkowski, a differenza del suo predecessore, asportando il pancreas e venendo a conoscenza della sintomatologia presentata dall'animale dopo l'intervento, si precipita ad analizzare la sua urina. Scopre elevate quantità di glucosio in essa disciolta. A differenza di Brunner, Minkowski mette subito in relazione il pancreas con il diabete.

Ci si ricorda allora che nel 1869, a Berlino, Paul Langerhans (1847-1888)(23), allievo e amico del grande patologo Rudolf Virchow (1821-1902), che sospettava che il pancreas secernesse non solo verso l' esterno, ma anche all'interno, nel sangue.

Paul Langerhans scrisse con queste parole il concetto chiave della sua scoperta:

Ho già detto, nel descrivere la struttura varia che il pancreas mostra dopo la macerazione nel liquido di Müller, una cellula dalla forma non ancora descritta. Questa cellula è una piccola struttura poligonale irregolare. Il citoplasma è brillante e privo di granuli, il suo nucleo distinto, rotondo, e di dimensioni moderate. Il suo diametro è di circa 0,0096-0,012 mm mentre quello del suo nucleo 0,0075-0,008 mm. Queste cellule si trovano insieme, generalmente in numero considerevole, sparse nel parenchima della ghiandola. Se il pancreas, dopo essere stato tenuto nel liquido Müller per 2 o 3 giorni, viene esaminato con un microscopio bassa potenza, questi gruppi di cellule si vedono sparsi in tutta la ghiandola come vivaci macchie gialle. Ad alta potenza queste macchie sono interamente costituite dalle nostre cellule. Esse sono raccolte in masse rotonde, 0,12-0,24 mm di diametro, distribuiti a intervalli regolari nel parenchima, e possono essere facilmente viste in frammenti di ghiandola fresca o se trattate per un breve periodo con siero iodato.

Come tutte le cellule fresche, sono completamente rotonde, ma non differiscono in alcun modo dalle cellule sopra descritte, i loro contenuti sono particolarmente brillanti”.

Langerhans aveva per primo descritto con precisione nel pancreas, “*mucchietti rotondeggianti*”(“*Haufchen*”) di cellule (9 tipi) a struttura diversa da quella delle cellule acinose secrete del succo pancreatico digestivo. Questi mucchietti erano apparsi dispersi come isolotti o isole nel resto della ghiandola e non era loro stata riconosciuta, per il momento, una funzione particolare. Langerhan, frattanto, era morto di tisi polmonare a Funchal-Madeira, dopo un illusorio miglioramento che gli aveva permesso un’attività medico-pratica a Funchal.

Si giunse così a ipotizzare che le isole di Langerhans fossero sede di produzione di una secrezione interna nelle intuizioni di Charles Edouard Sequard (1813 – 1878) –con azione antidiabetica.

Dal 1906 al 1915 si rincorrono sull’ argomento pubblicazioni dell’italiano Antonio Diamare (1872-1966), il primo a ipotizzare una “*cachessia isole-prima*”, di Gustave Edouard Laguesse (1861- 1927) (24), *il padre delle isole*, il quale suggerì che questo insieme di cellule potevano rappresentare il tessuto endocrino del pancreas, di Raphael Lèptine (1840- 1919), propugnatore di un “*fermento glicolitico del sangue*” e fu il primo a pensare ad un trapianto di isole.

Si conferma che le cellule delle isole, intatte dopo legatura del condotto escretore del pancreas e conseguente atrofia della ghiandola, contengono una sostanza che si versa direttamente nel sangue e che Nicola Pende (1880-1970) disegna in forma di finissimi granuli.

Edward Albert Schafer (1850-1936) trova, perfino, nel 1915, un nome alla sostanza :”*insulina*” (già proposto nel 1909 dal belga Jean De Meyer (25) da *insula*=isola all’ormone ipoglicemizzante prodotta dal tessuto insulare, la cui esistenza era solo ipotetica) ed anche a un suo precursore, la *pro-insulina*, proprio nel senso attuale.

Sempre nel XIX sec. un francese farmacista, Apollinaire Bouchradat (1806 – 1886) (26) formula la sua teoria gastrointestinale secondo cui la comparsa del diabete è legata alla troppa rapida trasformazione degli amidi in zucchero nel tratto gastrointestinale; nel 1838 inizia con questo farmacista la terapia moderna contro il diabete, limitando l'assunzione di carboidrati dalla dieta, sostenendo digiuno ed esercizio fisico per sostenere la glicosuria.

Tra il 1850 e il 1950 si scoprono e si diffondono progressivamente metodiche utili alla misurazione della glicosuria; in questo periodo anche i più fanatici seguaci della dieta digiunistica di Apollinaire Bouchradat modulano la loro misera razione alimentare a seconda della presenza o meno di glicosuria nelle urine delle 24 ore. I reattivi più usati sono:

- Reattivo cupro-potassico di Trommer , Von Feeling (A e B), Benedict
- Reattivo al bismuto di Nylander (con tartrato e soda caustica).

L' Americano Eugene Lindsay Opie (1873- 1971)(27), nel 1901, alla Johns Hopkins University, dimostra come il diabete mellito fosse causato da una lesione del pancreas, lesione che provoca la distruzione o la lesione delle cellule dell'isola di Langerhans.

Da un'osservazione di Mosè Barron (1883) (28) cioè che gli isolotti di Langerhans secernano direttamente nella linfa e nei flussi sanguigni un ormone che ha un potere nel controllo del metabolismo carboidratico, origina il successo (21 Dicembre 1921) dell'americano Frederick Grant Banting (1891-1941) (29,30) e del canadese Charles Herbert Best (1899 - 1978).

Questi studiosi isolarono l'insulina e dimostrarono l'inversione dei cambiamenti metabolici del diabete dopo iniezione di un estratto potente dalle cellule pancreatiche.



Figura 1.1.12: Frederick Grant Banting (1891-1941) e Charles Herbert Best (1899-1978)

L'11 Gennaio 1922, il primo paziente, un ragazzo di 14 anni di nome Leonard Thompson (1908-1935), a Toronto, si sottopose alla prima iniezione di insulina la quale gli provocò a causa di impurità dovute all'estrazione una reazione allergica. James Collip raffinò il processo per ottenere un migliore estratto di manzo. La seconda iniezione alla quale si sottopose il giovane Leonard 12 giorni dopo la prima ebbe un grande successo.

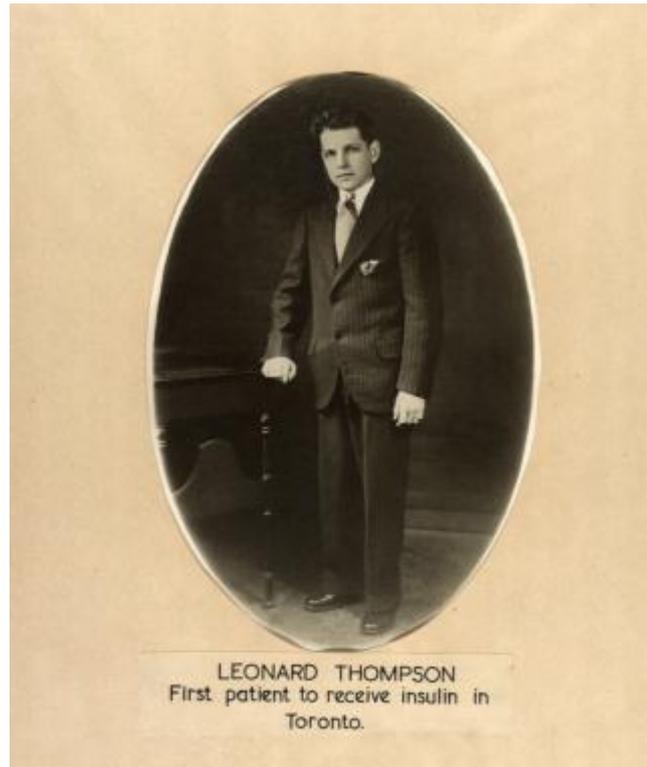


Figura 1.1.13: Leonard Thompson (1908-1935)

Thompson mostrò continui segni di miglioramento nella patologia diabetica ma una polmonite a 27 anni gli stroncò la vita.

1.2. EMOGLOBINA

La molecola dell'emoglobina venne scoperta da un biochimico britannico di origine viennese, Max Ferdinand Perutz (1914- 2002) .

Il padre dell'emoglobina era nato a Vienna nel 1914 da una famiglia di manifatturieri tessili e per anni lavorò presso il laboratorio di biologia molecolare di Cambridge. Nel 1962 riceve il premio Nobel per la Chimica per aver scoperto la struttura dell'emoglobina, la proteina fondamentale del sangue che assolve al compito di trasportare ossigeno nell'organismo. La sua ricerca scientifica, per capire la struttura di questa importante proteina, iniziò nel settembre del 1937 in seguito ad una conversazione che ebbe con il suo collega biochimico Felix Haurowitz a Praga.

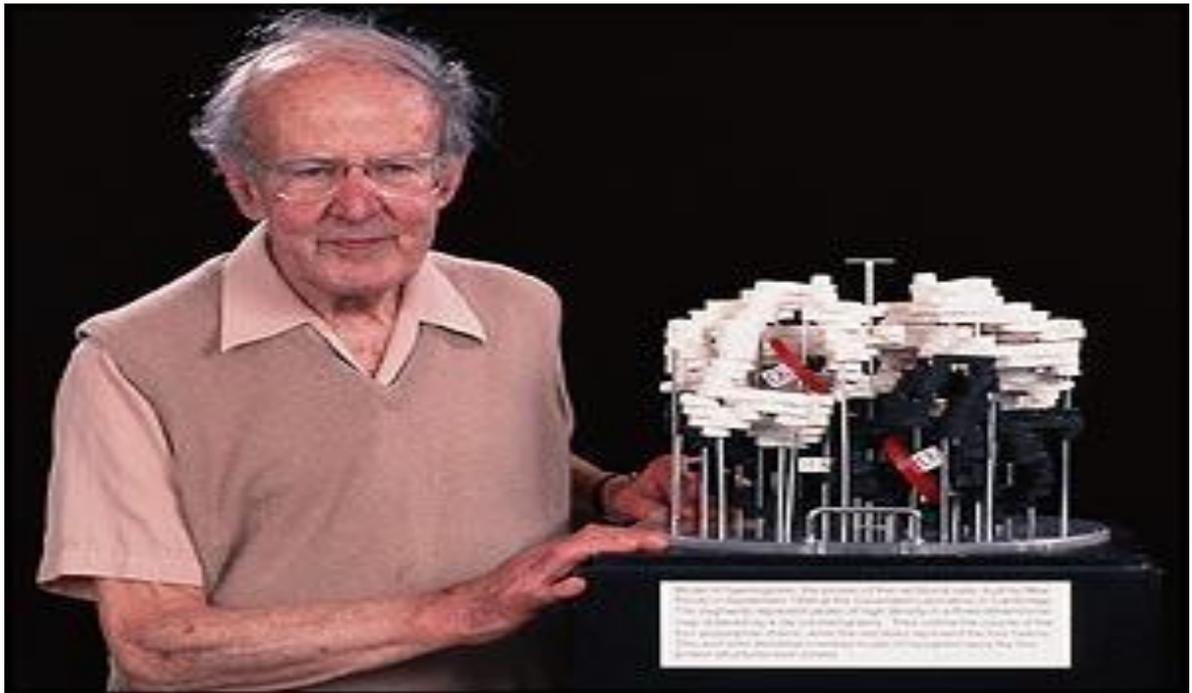


Figura 1.2.1: Max Ferdinand Perutz (1914- 2002) con la struttura dell'emoglobina

L'emoglobina è una oloproteina specializzata nel trasporto di ossigeno. Viene sintetizzata inizialmente a livello dei proeritroblasti policromatofili (precursori dei globuli rossi), rimanendo poi in alte concentrazioni all'interno dell'eritrocita maturo a cui conferisce il caratteristico colore rosso. E' una proteina globulare tetramerica solubile dal peso di circa 64000 dalton.

Le catene del tetramero fisiologicamente sono a due a due uguali : due appartenenti alla classe alfa e due alla classe beta. Del gruppo alfa fanno parte le catene α_1, α_2 , e ζ , mentre del gruppo β fanno parte le catene β , $\alpha\gamma, \gamma\gamma, \delta$ e ϵ .

Nell'uomo i geni delle catene α si trovano nel cromosoma 16 e sono intervallati da 2 pseudogeni mentre quelli del gruppo β sono sul cromosoma 11 con interposto un unico pseudogene.

Ogni catena contiene un gruppo prostetico chiamato eme formato da un anello porfirinico che lega al centro un atomo di ferro sotto forma di ione Fe^{2+} .

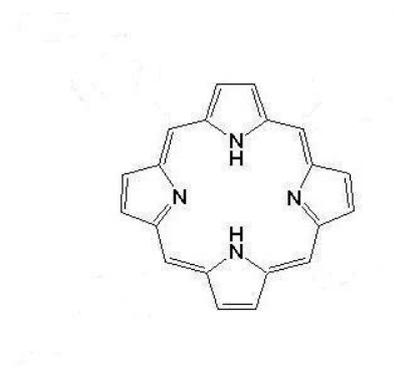


Figura 1.2.2.: Anello Porfirinico

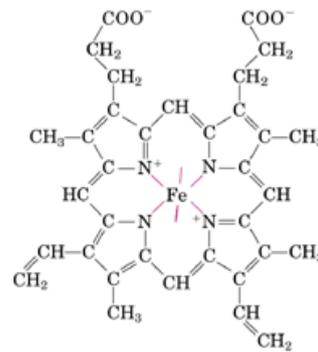


Figura 1.2.3.: gruppo Eme

E' proprio l'atomo di ferro al centro dell'anello porfirinico che lega la molecola di ossigeno in modo reversibile e la trasporta a tutte le cellule del nostro corpo attraverso il sangue.

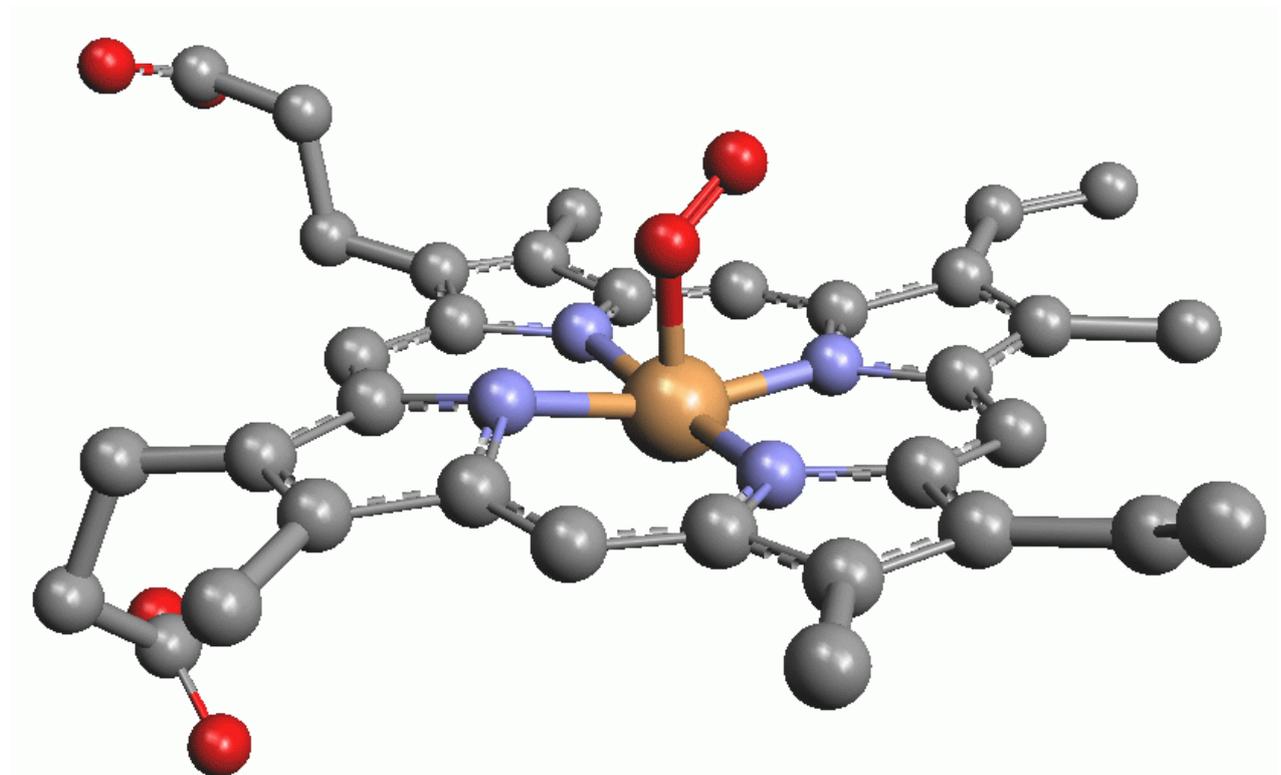


Figura 1.2.4: Gruppo eme con la molecola di O₂ legata

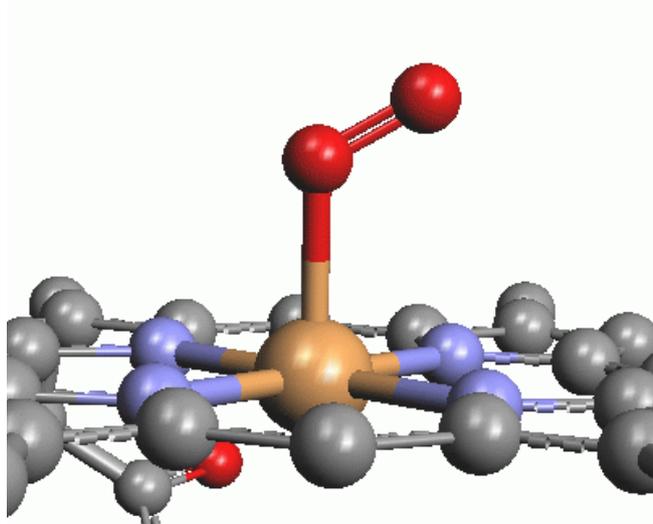


Figura 1.2.5.: Gruppo eme con la molecola di O₂ legata

L'emoglobina è costituita, da quattro catene (α_2 e β_2) e contiene quattro gruppi eme, come si vede nell'immagine (Fig. 1.2.6). La funzione dell'emoglobina è quella di legare O₂ nei polmoni e rilasciarlo nei tessuti.

Si tratta di una proteina allosterica che modifica l'affinità per O₂ facendo lavorare i suoi siti di legame in modo cooperativo.

A bassa concentrazione di ossigeno (nei tessuti, fascia blu) l'emoglobina è poco affine per O₂. A maggiore concentrazione di ossigeno (nei polmoni, fascia rosa) l'emoglobina ha una grande affinità per O₂ come si vede dal grafico seguente che ha un andamento sigmoidale e non iperbolico come la mioglobina.

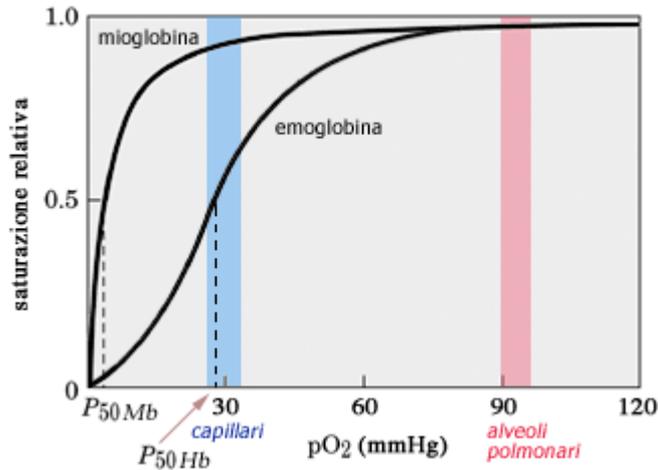


Figura 1.2.6.:
L'affinità differente per la molecola di O₂ per le proteine mioglobina ed emoglobina

L'emoglobina senza O₂ legato nei siti attivi è poco affine per l'O₂, ma la sua affinità cresce legando il primo e il secondo O₂. Per questo motivo è difficile la formazione del primo legame con l'ossigeno ma diventa via via sempre più semplice quella con le altre molecole. Quando il sangue è nei polmoni, dove l'ossigeno è abbondante, l'ossigeno si lega facilmente alla prima subunità e poi rapidamente riempie tutte le altre sub unità disponibili. Poi, quando, il sangue circola attraverso il corpo, il livello di O₂ scende mentre aumenta quello di biossido di carbonio. In questo ambiente l'emoglobina inizia a rilasciare l'ossigeno legato. Appena, però, rilasciata la prima molecola di O₂, la proteina inizia a cambiare conformazione e questo cambiamento induce gli altri 3 ossigeni, ancora legati, ad essere rilasciati in modo rapido.

Questo comportamento lo si spiega a livello strutturale.

L'atomo di Fe²⁺ nell'eme è trattenuto sotto il piano dell'anello porfirinico dal legame con l'istidina vicinale che si trova sul lato inferiore dell'eme. In queste condizioni come si vede nella figura sottostante 1.2.7 ferro è poco affine per O₂.

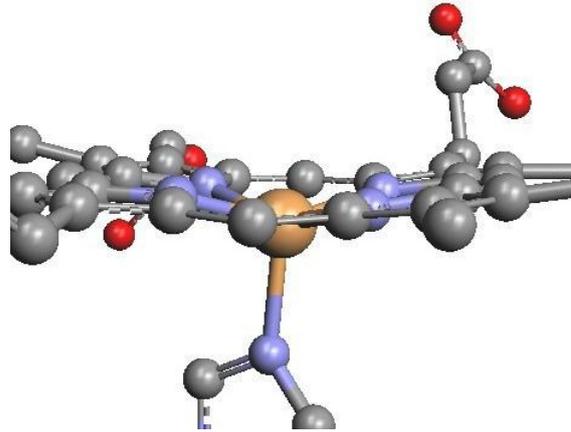


Figura 1.2.7.: L'atomo di Fe²⁺ nell'eme è trattenuto sotto il piano dell'anello dal legame con l'istidina vicinale che si trova sul lato inferiore dell'eme

Quando O₂ si lega all'atomo di ferro nel centro del gruppo eme, questo sposta il Ferro verso l'alto e con esso anche l'istidina che si trova sul lato inferiore dell'eme. Questo cambia la conformazione dell'intera alfa-elica nella quale si trova l'istidina. Il movimento si ripercuote su tutta la catena proteica e sulle altre catene, provocando un innalzamento dell' atomo di ferro anche nell'altra subunità che aumenta così l'affinità per O₂.

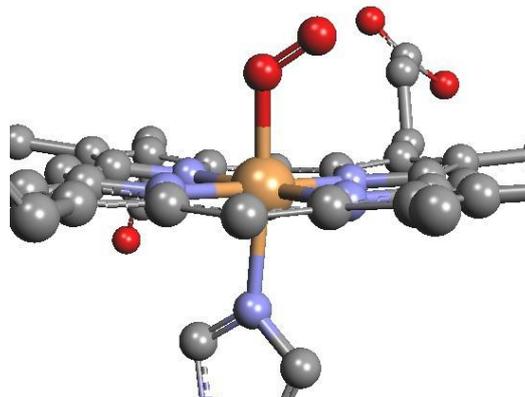


Figura 1.2.8.: Cambio di conformazione quando si lega O₂ all'atomo di Ferro

1.3 EMOGLOBINA GLICATA

I globuli rossi di un soggetto adulto in buono stato di salute contengono principalmente emoglobina A (HbA) ($\alpha_2\beta_2$), emoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$) e tracce di emoglobina fetale ($\alpha_2\gamma_2$).

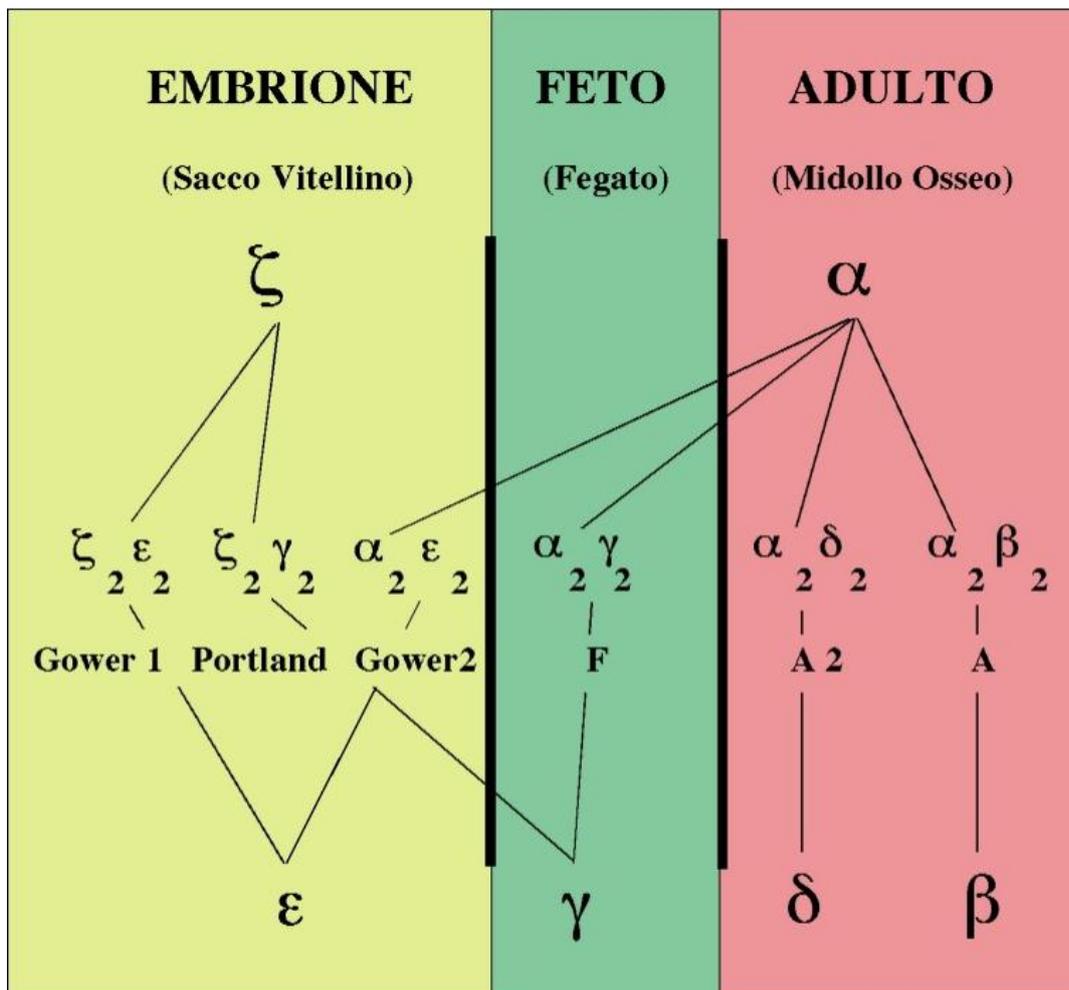


Figura 1.3.1 : Rappresentazione dei diversi tipi di Emoglobina nelle diverse fasi della vita dell'uomo

Separando le frazioni emoglobiniche con tecniche sufficientemente risolutive si possono evidenziare più frazioni perché le emoglobine possono subire modificazioni post-traduzionali, per esempio la glicazione.

L'emoglobina glicata è una forma di emoglobina prodotta in una reazione non enzimatica a seguito della esposizione della emoglobina normale ad alte concentrazioni di glucosio plasmatico.

I siti potenziali dell' HbA che possono essere modificati dal legame con il glucosio includono i 4 residui N-terminali delle catene α e β e tutti i gruppi ϵ -amminici liberi dei 44 residui lisinici presenti nel tetramero emoglobinico.

La prima segnalazione che riporta la presenza di frazioni emoglobiniche chiamate allora minori, separabili dall'emoglobina A, risale al 1955, in un articolo comparso nella rivista Science Vol 122, "New Hemoglobin in normal Adult Blood", scritto da H.G. Kunkel e G. Wallenius del Rockefeller Institute for Medical Research, New York, N.Y. (31).

In questo articolo si evidenzia come utilizzando una tecnica elettroforetica su amido vi siano emoglobine diverse da quella nota A che presentano proprietà elettroforetiche diverse come si nota nella figura 1.3.2..

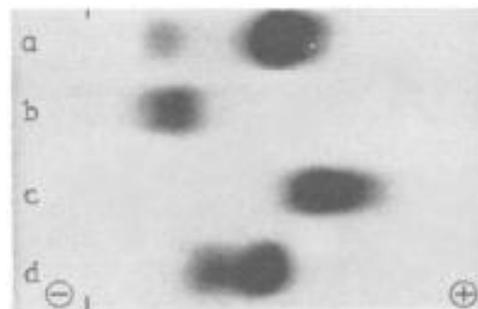


Figura 1.3.2: Tecnica elettroforetica su amido (1955) che evidenzia diversi tipi di emoglobina con proprietà elettroforetiche diverse.

Due anni, dopo, nel 1957, grazie all'utilizzo della tecnica cromatografica a scambio cationico con eluizione da colonna IRC-50, si conferma la presenza di 5 componenti, chiamate FAST Hemoglobin (HbA1) e in base all'ordine di eluizione da HbA1a a HbA1c [32].

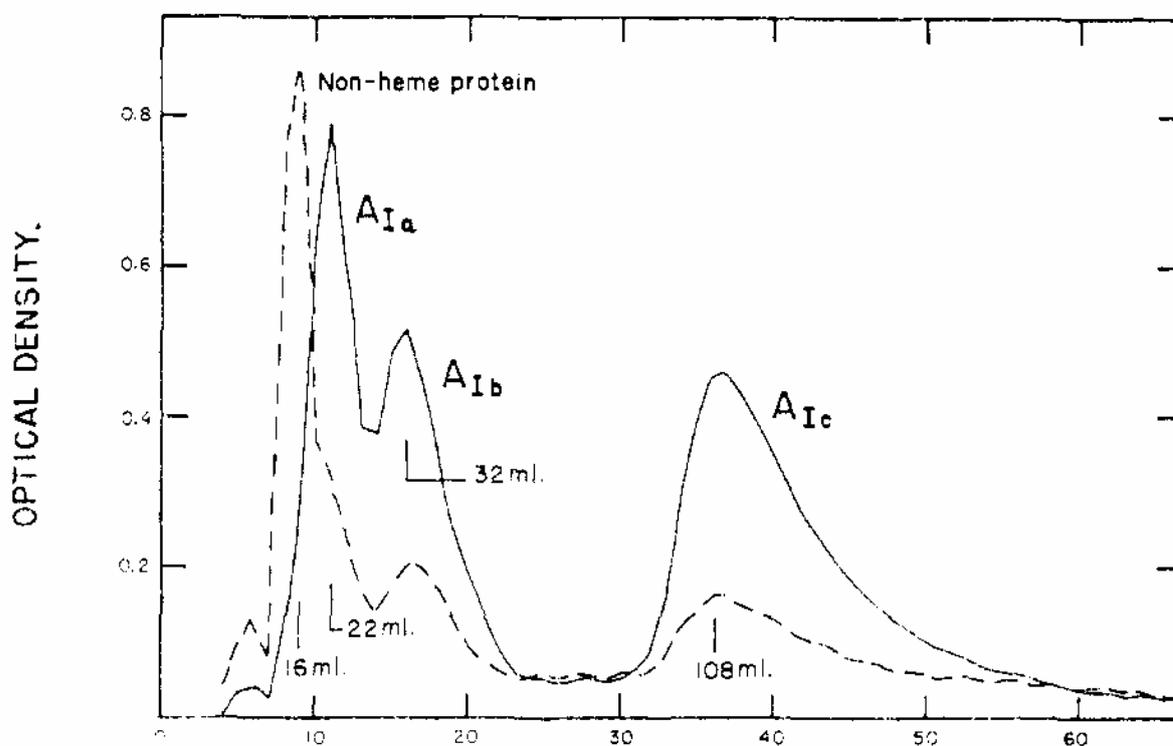


Figura 1.3.3. : tecnica cromatografica a scambio cationico con eluizione da colonna IRC-50 che evidenzia le emoglobine fast.

Solo nel 1966 è stata descritta, per la prima volta, la formazione dell' HbA1c a partire dall'emoglobina A [33]: questa frazione minore è il risultato di vari adotti ad HbA, che portano a cambiamenti chimico fisici della molecola a cui segue la separazione elettroforetica.

Venne caratterizzata come glicoproteina da due studiosi Bookchin R.M. e Gallop P.M. nel 1968 [34], ma il suo aumento nel diabete fu descritto per la prima volta nel 1968 e nel 1969 da un medico iraniano Samuel Rahbar (35,36) in questi due articoli: “ An Abnormal hemoglobin in red cells of diabetics” e in ” Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus.”.

Si deve a Bunn (37,38) e ai suoi collaboratori la descrizione della reazione che porta alla formazione dell'emoglobina glicata nel 1975. Negli anni '80 sempre questo gruppo di ricerca dimostrò che nell' HbA1c circa il 60% del glucosio è legato alla valina N-terminale delle catene b (da una a due molecole di glucosio per tetramero) e che altri residui di glucosio possono legarsi alle valine N-terminali delle catene α e alle lisine $\beta 17$ e $\beta 66$. (39,40).

Da un punto di vista chimico la reazione tra il glucosio ed i gruppi amminici liberi procede in due stadi:

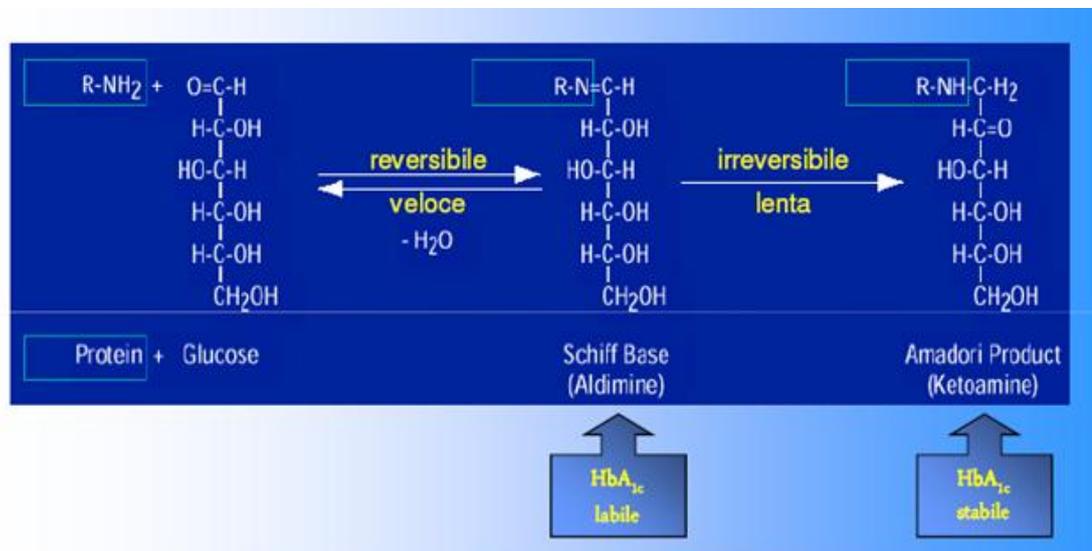


Figura 1.3.4.: Schema della reazione tra il glucosio ed i gruppi amminici liberi e la formazione del prodotto di Amadori

Nella prima fase si forma un complesso labile (base di Schiff) con un'emivita di circa 8 minuti; in seguito, questo complesso aldiminico si riarrangia in una forma stabile, chiamata chetamina, con una reazione lenta caratterizzata da un'emivita di 5 giorni (41).

Dal momento che i globuli rossi sono liberamente permeabili al glucosio, l'entità della formazione dell'HbA1c è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio alla quale i globuli rossi sono esposti durante il

loro permanere in circolo ed al tempo relativo all'esposizione, senza tuttavia raggiungere un tetto massimo o la soglia (38).

Nel normale arco di vita di 120 giorni dei globuli rossi, le molecole di glucosio reagiscono con l'emoglobina formando emoglobina glicosilata. In individui con scarso controllo diabetico, la quantità dell'emoglobina glicata che si forma è molto più elevata che nei soggetti sani o nei soggetti diabetici con un buon controllo glicemico. Un aumento dell'emoglobina glicosilata, quindi, riflette il livello medio di glucosio al quale l'emazia è sottoposta durante il suo ciclo vitale.

In seguito alla caratterizzazione dell' HbA1c diversi gruppi hanno dimostrato che il glucosio è in grado di reagire in maniera simile anche con numerose altre proteine , quali albumina [42], la proteina del cristallino[43], il collagene [44], la proteina della lamina basale del glomerulo renale [45], modificando significativamente diverse proprietà strutturali e funzionali.

Nel caso specifico dell'HbA1c l'affinità per l'ossigeno ne risulta significativamente aumentata, essenzialmente per una mancata disponibilità al legame con il 2,3-difosfoglicerato (46,47).

Negli anni ottanta si evidenzia l' importanza dell'emoglobina glicata quale test per il monitoraggio del paziente diabetico [48,49].

In quegli anni, tuttavia, il dosaggio dell' HbA1c viene eseguito con diversi tipi di metodi tra i quali cromatografia a scambio ionico, cromatografia d'affinità, elettroforesi, metodo colorimetrico e metodo immunoenzimatico. Negli anni novanta tale parametro diventa sempre più importante per il diabetologo ma il risultato ottenuto non risulta paragonabile da un laboratorio all' altro come pure da un paese ad un altro.

Tutto ciò era dovuto fondamentalmente all'uso di metodi che presentavano performance analitiche diverse e alla mancanza di standardizzazione a livello internazionale.

1.3.1 Goal Analitici per l' HbA1c

Fino al 2008 erano disponibili oltre 70 tipi diversi di metodiche commerciali per misurare l'HbA1c, principalmente basate su tre principi: la differenza di carica elettrica tra HbA1c ed HbA (minicolonnine, HPLC, isoelettrofocalizzazione ed elettroforesi), la natura di determinanti antigenici dei primi 8 residui amminoacidici della catena β (metodiche immunochimiche) e la presenza di glucosio legato covalentemente all'emoglobina (cromatografia di affinità).

La maggior parte delle metodiche basate sulle differenze di carica e quelle immunochimiche misurano la HbA1c, altre quantificano l'emoglobina glicata "totale", includendo quindi il glucosio legato alle lisine ed alle valine N-terminali delle catene α . Ciò spiega in parte perché nel corso degli anni, in mancanza di uno standard di riferimento internazionale, siano stati definiti intervalli di riferimento metodo-dipendenti e perché i dati ottenuti con metodi diversi siano a volte non confrontabili.

Generalmente, tuttavia, i risultati ottenuti con metodi basati su diversi principi analitici sono ben correlati e non ci sono evidenze che i dati ottenuti con un metodo siano, da un punto di vista clinico, migliori a quelli ottenuti con un altro.

I criteri per la definizione dei traguardi analitici in Medicina di Laboratorio sono stati definiti utilizzando l'approccio proposto da Fraser, basato sullo studio della variabilità biologica [50]. E' molto importante che tali traguardi

siano definiti in modo da stabilire limiti di accettabilità delle prestazioni per i produttori di diagnostici, criteri oggettivi per la valutazione di strumenti e di kit, sistemi di valutazione dei partecipanti nei programmi di VEQ ed, infine, per assicurare una qualità analitica adeguata alla cura dei pazienti.

Per quanto riguarda l'HbA1c non ci sono molti dati disponibili in letteratura relativamente alla variabilità biologica intra- ed interindividuale. Una stima secondo i lavori più attendibili [51,52] fornirebbe una variabilità biologica intraindividuale (“within-subject variability”, CV_w) =5,0% e una variabilità interindividuale (CV_G) tra il 4,3 ed il 5,9%. Utilizzando le formule correnti [50] per il calcolo dei traguardi di imprecisione, bias ed errore totale, si ottengono i valori riportati nella Tabella 1.3.2.1, calcolati a tre livelli di qualità come precedentemente raccomandato [53]. Tali limiti debbono essere considerati con cautela per l'incertezza associata alle stime della variabilità biologica usate nei calcoli. Una recente pubblicazione da parte dei rappresentanti delle Associazioni Australiane di Biochimica Clinica, Endocrinologia e Diabetologia ha raccomandato che i metodi per la determinazione dell'HbA1c abbiano una imprecisione nel lungo periodo corrispondente ad un CV <2% e debbano essere caratterizzati da un valore minimo di bias (il più possibile vicino a zero) e di interferenze analitiche da parte delle più comuni componenti emoglobiniche (emoglobina carbamidata, varianti emoglobiniche) che tipicamente possono interferire nella misura dell'HbA1c [54].

Traguardi analitici per l'imprecisione, il bias e l'errore totale per la determinazione dell'HbA_{1c}, espressi a tre differenti livelli di qualità

Traguardo	Livello di qualità		
	minimo %	desiderabile %	ottimale %
Imprecisione (CV)	3,8	2,5	1,2
Bias (scostamento sistematico)	2,4	1,6	0,8
Errore totale	8,6	5,7	2,9

Tabella 1.3.2.1.: Tabella che evidenzia i goal analitici per HbA_{1c}

1.4 DIABETE

Il diabete mellito è una sindrome eterogenea caratterizzata da iperglicemia cronica e da altre alterazioni del metabolismo glucidico, lipidico e proteico che possono condurre allo sviluppo di complicanze micro- e macroangiopatiche.

Secondo i dati Oms, sono più di 346 milioni le persone affette da diabete in tutto il mondo e questa cifra è destinata a raddoppiare entro il 2030, senza un intervento a livello globale. Inoltre, più dell'80% delle morti correlate a questa patologia avviene in paesi a basso e medio reddito.

In Italia, nel 2011, sono quasi 3 milioni le persone che dichiarano di essere affette da diabete, il 4,9% della popolazione. Lo riferisce l' Istat nel documento “ *Il Diabete in Italia. Anni 2000-2011*” pubblicato a ottobre 2012.

Dai dati presentati emerge che il diabete è maggiormente diffuso nelle classi più svantaggiate (dove i fattori di rischio, come l'obesità e l'inattività fisica, sono più comuni). Al Sud si registrano i valori più alti con 900 mila diabetici residenti, contro i 650 mila del Nord-ovest, i 600 mila del Centro e i 450 mila del Nord-est e i circa 350 mila residenti nelle Isole.

Inoltre, la prevalenza del diabete aumenta all'aumentare dell'età: tra gli ultra 75enni, almeno una persona su cinque ne è affetta. Sotto i 74 anni il diabete è più diffuso negli uomini.

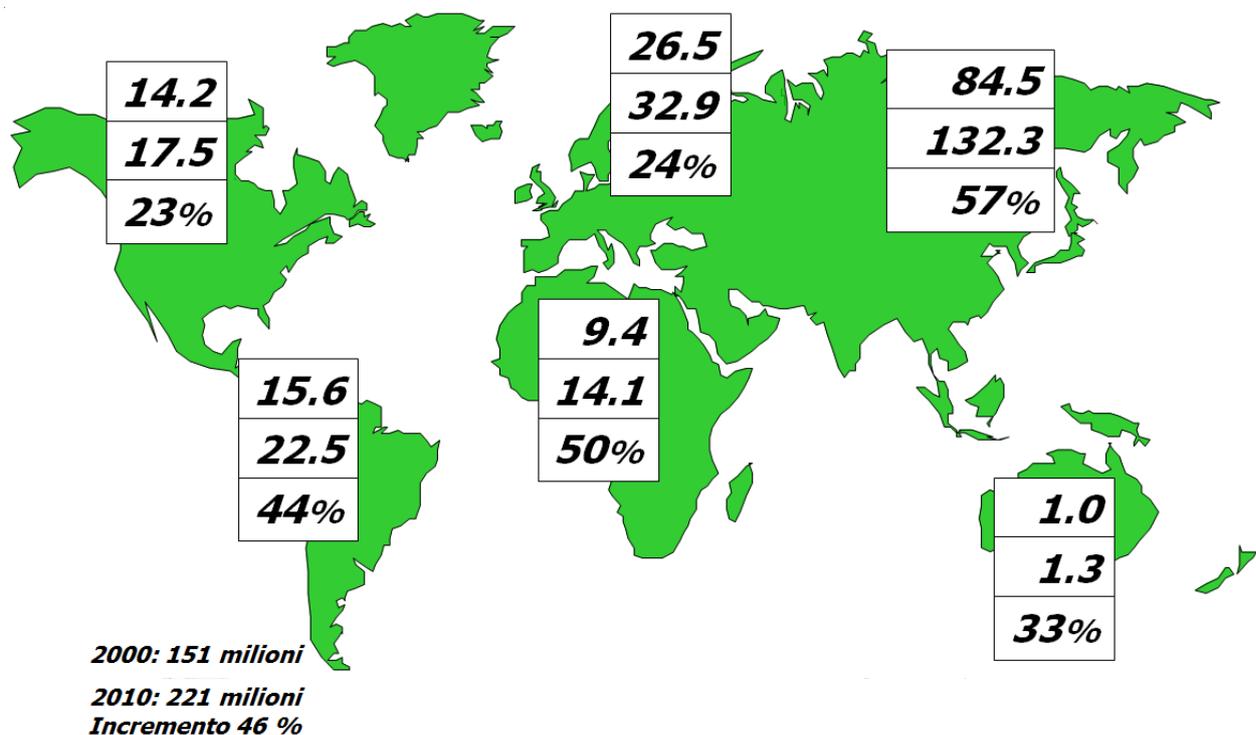


Figura 1.4.: Distribuzione geografica del diabete

1.4.1 Patogenesi e fisiopatologia del DM1

Il diabete mellito di tipo 1 (DMT1) è la conseguenza della distruzione autoimmune delle cellule β pancreatiche.

Numerose evidenze sperimentali e cliniche confermano l'ipotesi che l'eliminazione selettiva delle cellule β pancreatiche sia un processo

immuno-mediato. Un processo infiammatorio infiltrativo, noto come insulite, è stato documentato in molti, anche se non in tutti, gli organi di pazienti diabetici deceduti in coincidenza con l'esordio clinico della malattia [55]. Il rischio di sviluppare la malattia è significativamente aumentato in presenza di specifici aplotipi HLA ("Human Leukocyte Antigen"), quali -DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 (DR3-DQ2) e DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 (DR4-DQ8) [56,57] ed in presenza di specifiche varianti alleliche o aplotipiche di altri geni che modulano la funzione del sistema immunitario(58,59). La malattia può essere trasferita da individui affetti a soggetti non affetti in conseguenza di un trapianto di midollo osseo [60,61]. Il DMT1 è più frequente in soggetti affetti da altre malattie autoimmuni, quali tiroidite di Hashimoto, morbo di Graves-Basedow, gastrite atrofica o morbo di Addison, rispetto alla popolazione generale.

Modelli sperimentali animali sviluppano una forma di malattia diabetica spontanea a patogenesi autoimmunitaria.

Tuttavia, la prova definitiva della natura autoimmune del DMT1 è stata fornita dalla dimostrazione dell'esistenza nel siero di pazienti affetti di autoanticorpi antiinsula pancreatica ["islet cell antibodies" (ICA)], evidenziati tramite immunofluorescenza indiretta su sezioni criostatiche di pancreas umano [62,63].

L'identificazione degli ICA sollevò nuovi quesiti, soprattutto legati al ruolo patogenetico degli autoanticorpi nello sviluppo di DMT1. Infatti, gli ICA sono diretti contro antigeni intracellulari (citoplasmatici) e questo è apparentemente in contrasto con un loro possibile ruolo patogenetico, poiché si ritiene che gli anticorpi non possano attraversare la barriera costituita dalla membrana cellulare. Una considerevole serie di evidenze sperimentali sembra infatti supportare l'ipotesi che gli autoanticorpi presenti in pazienti con DMT1 non abbiano un ruolo patogenetico.

La loro produzione potrebbe essere la conseguenza della distruzione cellulo-mediata delle cellule β e della successiva processazione di numerosi auto antigeni con autoreattività T-cellulare, attivazione di linfociti B e conseguente produzione di autoanticorpi. Secondo questa ipotesi, oggi largamente accettata, lo sviluppo di autoanticorpi sembrerebbe essere un fenomeno che accompagna il processo autoimmunitario, ma con limitata importanza patogenetica. Tuttavia, la dimostrazione della presenza di autoanticorpi circolanti riveste un importante ruolo clinico e diagnostico, come marcatore del processo autoimmunitario anti-insulare.

1.4.2 Patogenesi e fisiopatologia del DM2

Le cause specifiche dello sviluppo di questa malattia non sono del tutto note. Il diabete è considerato una malattia multifattoriale ed eterogenea, alla cui insorgenza concorrono, in varia combinazione, un difetto delle β -cellule (che comporta un'alterata secrezione di insulina) ed una alterata risposta all'azione di insulina (insulino resistenza).

L'insulino-resistenza riconosce una base genetica [64] ma è influenzata anche da fattori acquisiti o ambientali: eccesso ponderale a localizzazione prevalentemente centrale e soprattutto, dieta iperlipidica , scarsa attività fisica, fumo di sigaretta [65] , assunzione di alcuni farmaci (glucocorticoidi, diuretici tiazidici, betabloccanti) [66].

1.4.2.1. *La disfunzione delle β -cellule*

Nel DM2 fattori genetici e acquisiti non del tutto noti concorrono a determinare il difetto di funzione e di massa delle β -cellula, attraverso meccanismi in buona parte ancora da chiarire . Numerosi geni che codificano per vari fattori di trascrizione, per proteine coinvolte nel

metabolismo del glucosio, e per molecole implicate nel segnale insulinico sono stati associati ad alterazioni β -cellulari [67].

Tra i vari fattori acquisiti maggiormente studiati si annoverano la glucotossicità, cioè i danni prodotti dalle elevate concentrazioni di glucosio, e la lipotossicità [68], cioè i danni prodotti dalle elevate concentrazioni di acidi grassi. Entrambe queste condizioni dismetaboliche tipiche del DM2 inducono alterazioni della secrezione insulinica, aumento dell'apoptosi e modifiche dei profili di trascrizione genica delle β -cellule, e probabilmente interferiscono con i processi rigenerativi.

Nel DM2, le concentrazioni sieriche di insulina possono essere aumentate, normali o ridotte, ma sono insufficienti a garantire una normale regolazione glicemica. Il difetto funzionale più precoce è la progressiva riduzione, fino alla scomparsa, della prima fase della secrezione insulinica da parte della β -cellula in risposta al pasto. A questo difetto si aggiunge, nel tempo, un deficit anche a carico della seconda fase di secrezione dell'insulina [69].

Un ulteriore aspetto relativo al deficit funzionale della β -cellula nel DM2 è l'aumentato rapporto proinsulina/insulina. Probabilmente perché sollecitata in maniera anomala, la β -cellula nel DM2 non riesce a processare adeguatamente la proinsulina, che viene rilasciata in quantità significativamente più elevata rispetto ai soggetti con normale metabolismo glucidico.

Il DM2 inoltre si accompagna ad una riduzione della massa β -cellulare che dipende da una riduzione del numero totale di isole pancreatiche e da una diminuzione delle β -cellule all'interno delle isole [70].

La causa che determina la riduzione della massa β -cellulare sembrano essere un'aumentata apoptosi non compensata da un adeguato tasso di formazione di nuove

β -cellule attraverso i processi rigenerativi (replicazione e neogenesi). Va infine tenuto presente che anche la quantità dei granuli di insulina è

significativamente ridotta nelle β -cellule diabetiche rispetto a quelle di controllo, il che contribuisce al deficit quantitativo complessivo di secrezione insulinica .

In conclusione, le alterazioni delle β -cellule nel DM2 sono di tipi qualitativo e quantitativo. Tali alterazioni sono caratterizzate dall'incapacità di rispondere in maniera congrua ai secretagoghi fisiologici (in particolare al glucosio), dalla perdita della normale dinamica del rilascio insulinico, dall'aumento del rapporto proinsulina/insulina e dalla riduzione della massa beta-cellulare.

1.4.2.2 Insulino-resistenza

Si definisce insulino-resistenza (o ridotta sensibilità insulinica) la condizione clinica o sperimentale in cui l'insulina esercita un effetto biologico inferiore a quello atteso [71]. I meccanismi alla base dell'insulino-resistenza sono eterogenei, coinvolgendo fattori ormonali, genetici (difetti del recettore insulinico o del sistema di trasduzione del segnale), oppure farmacologici (es. terapia con glucocorticoidi).

All'insulino resistenza è stato attribuito un ruolo fondamentale nella patogenesi del DM2, anche se non si può assegnare a questo fattore una specificità e unicità assoluta nella patogenesi della malattia.

La misura degli indici di insulino-resistenza è di particolare rilevanza in fisiopatologia clinica, ma non è di semplice esecuzione. La tecnica di riferimento (*gold standard*) è il clamp euglicemico iperinsulinemico. Questa metodica richiede la misura della velocità di infusione di glucosio necessaria per mantenere l'euglicemia in un soggetto che riceve una infusione endovenosa continua di insulina a velocità costante e che realizza una condizione di iperinsulinemia in stato stazionario. Maggiore è la quantità di glucosio necessaria per mantenere l'euglicemia, maggiore è la sensibilità insulinica. Il clamp eseguito in condizione di iperinsulinemia è

utile per misurare la sensibilità insulinica, mentre il clamp eseguito in condizione di iperglicemia è utile per misurare la funzione β -cellulare. Il glucose clamp ha lo svantaggio di essere laborioso e di richiedere una considerevole esperienza.

Una metodica più semplice e facilmente applicabile è l'indice HOMA (Homeostasis Model Assesment) [72]. L'HOMA è un modello matematico attraverso il quale la sensibilità insulinica può essere stimata se si conoscono, nello stesso momento, le concentrazioni plasmatiche di glucosio e insulina a digiuno. Si tratta di un test semplice che risulta appropriato per grandi studi epidemiologici e fornisce una stima dell'insulino-resistenza basale, al contrario delle altre tecniche (come il clamp euglicemico) che misurano l'insulino-resistenza stimolata. Un metodo più recente che è il QUICKI (Indice Quantitativo del Controllo di Sensibilità dell'Insulina $QUICKI = 1/([\log FPG] + [\log INS])$) che fornisce una misura dell'insulino-resistenza altamente correlata con il clamp in soggetti affetti da DM2, così come in soggetti sani o obesi.

I metodi indiretti, derivati dall' OGTT (Test di Tolleranza Orale al Glucosio), sono applicabili su larga scala, di esecuzione relativamente facile ed hanno costi inferiori rispetto ai clamp.

Inoltre, rispetto ad HOMA, i test che si basano sull' OGTT sono dinamici perché forniscono informazioni sulla sensibilità insulinica in risposta al carico di glucosio (una variante utilizza il più fisiologico pasto misto).

La scelta del test per la misurazione della resistenza insulinica dovrebbe comunque tenere presente la finalità della misurazione stessa.

Dal punto di vista clinico, esistono alcuni indicatori surrogati di insulino-resistenza, che possono essere determinati in maniera molto agevole. Per esempio è stato dimostrato in molte occasioni che la circonferenza della vita correla in maniera stretta con l'insulino-resistenza misurata con

HOMA o mediante tecniche di clamp . Un altro indicatore clinico del grado di insulino-resistenza è rappresentato dal numero di componenti della sindrome metabolica presenti contemporaneamente nello stesso soggetto .

CAPITOLO 2

- SCOPO -

La misura dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) è molto utilizzata in pazienti con diabete mellito, soprattutto al fine di monitorare il controllo glicometabolico a medio-lungo periodo (73). Tale prassi è il risultato di diversi studi clinici randomizzati, i più famosi dei quali sono il DCCT e l'UKPDS (74), i quali hanno provato che vi è una stretta correlazione tra il grado di controllo glicemico, valutato in base ad una serie di misure dell'HbA_{1c}, ed il rischio di sviluppo e di progressione delle complicanze croniche del diabete.

Gli attuali target terapeutici raccomandati dall'American Diabetes Association (ADA) indicano come il goal primario della terapia deve portare ad un valore di HbA_{1c} non superiore al 7% (53 mmol/mol) e la necessità di rivalutare il trattamento terapeutico dei pazienti che presentino valori di HbA_{1c} costantemente superiori all'8% deve essere prontamente rivalutato.

Questi livelli decisionali valgono solo per i metodi che sono certificati National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). Sempre dallo studio DCCT è emerso che una riduzione dell'HbA_{1c} del 10% (86 mmol/mol) (per esempio da 12,0% [108 mmol/mol] a 10,8% [95 mmol/mol] o da 8,0% [64 mmol/mol] a 7,2% [55 mmol/mol]) era associata ad una riduzione del 45% del rischio di sviluppare la retinopatia diabetica [73]. Successive valutazioni hanno confermato il ruolo cardine dell'HbA_{1c} quale predittore di rischio di complicanze nei soggetti diabetici [75].

La frequenza di determinazione dell' HbA_{1c} è ancora oggetto di discussione. Da un punto di vista teorico, avendo i globuli rossi una vita di

circa 4 mesi, la frequenza dovrebbe essere di tre volte all'anno. Le raccomandazioni ADA consigliano una frequenza di 2 volte all'anno in pazienti in controllo metabolico stabile, che abbiano raggiunto i target terapeutici, e più determinazioni per i pazienti in scarso controllo.

E' utile segnalare che anche a distanza di un mese è possibile osservare diminuzioni significative dell' HbA1c (tra 0,5 e 0,7%) in pazienti ospedalizzati e messi in stretto regime ipoglicemizzante. Una nota informativa dice, a questo proposito, che la glicemia del mese precedente il prelievo pesa per circa il 50% sul risultato dell'HbA1c, mentre un restante 25% riflette la glicemia dei 2 mesi precedenti ed il rimanente 25% riflette quella di 3-4 mesi prima [76]. Anche la frequenza delle determinazioni dell'HbA1c è uno degli indicatori della qualità dei servizi offerti ai pazienti con diabete, nel 93% dei quali almeno una determinazione dell'HbA1c deve essere eseguita nell'anno precedente [77]. Purtroppo recenti evidenze dimostrano che sovente l'esame viene eseguito con una frequenza non appropriata (nel 26% dei casi l'esame viene ripetuto entro 3 mesi, cioè entro un intervallo di tempo troppo breve) [78].

Dati recenti indicherebbero che, anche in soggetti senza diabete, aumenti anche lievi dell' HbA1c si associano ad un rischio crescente di patologie cardiovascolari[79,80,81]. In particolare, in soggetti non diabetici con glicemia fisiologica un aumento del 1% nei livelli dell'HbA1c sarebbe associato ad un aumento del 28% del rischio di morte per cause cardiovascolari, indipendentemente dall'età, dalla pressione arteriosa, dalla colesterolemia, dall'indice di massa corporea e dal fumo di sigaretta.

La diagnosi di diabete prevede la valutazione di almeno due glicemie a digiuno (IFG) o la esecuzione di una curva da carico orale di glucosio(OGTT).

Nel Giugno 2009 è stato da pubblicato il rapporto di un Comitato di Esperti nominati dall'American Diabetes Association, dall'European Association for the Study of Diabetes e dall'International Diabetes Federation per rivalutare gli attuali criteri diagnostici per il diabete. Tale comitato ha ritenuto opportuno suggerire che per la diagnosi di diabete sia più affidabile usare l'HbA1c in sostituzione della glicemia (82). Ciò a condizione che il dosaggio di tale parametro sia eseguito con un metodo allineato con lo standard DCCT/UKPDS e che non sussistano condizioni che rendano problematica l'interpretazione del valore di HbA1c misurato (82). Tali condizioni includono il diabete tipo 1 in rapida evoluzione, la gravidanza, emoglobinopatie, malaria, anemia cronica, anemia emolitica, recente emorragia, recente trasfusione, splenectomia, uremia, marcata iperbilirubinemia, marcata ipertrigliceridemia, marcata leucocitosi, alcolismo, ecc.. L'HbA1c sembra essere un parametro più affidabile e raccomandabile rispetto alla glicemia per i seguenti motivi: a) ha una migliore standardizzazione del dosaggio (se allineato con DCCT/UKPDS); b) è espressione della glicemia media di un lungo periodo e non di un singolo momento; c) ha una minore variabilità biologica; d) ha una minore instabilità pre-analitica; e) non ha nessuna necessità di un prelievo dopo 8 ore di digiuno o di un prelievo dopo carico orale di glucosio; f) non soffre di alcuna influenza da parte di patologie acute (es. stress da prelievo); g) è lo stesso parametro usato per il monitoraggio clinico del diabete. Il rapporto enfatizza il concetto che il dosaggio della glicemia è molto meno accurato e preciso di quanto molti ritengano e che più del 12% dei soggetti in cui viene misurata la glicemia potrebbero essere misclassificati, anche per instabilità pre-analitica.

Successivamente nel gennaio 2010 l'American Diabetes Association (ADA) ha fatto proprie tali raccomandazioni ed ha proposto i seguenti criteri: $HbA1C \geq 6.5\%$ (≥ 48 mmol/mol) per la diagnosi di diabete e un

range tra 5.7%-6.4% (39 – 46 mmol/mol) per l'alto rischio di comparsa della malattia (83).

Scopo del presente progetto di ricerca è verificare se l'HbA1c presenta caratteristiche di sensibilità adeguate per l'identificazione di pazienti a rischio di sviluppo di diabete in confronto alla tradizionale e ampiamente diffusa curva da carico di glucosio (OGTT). Siccome i pazienti reclutati per questo studio sono pazienti ambulatoriali, per meglio caratterizzarli si sono anche svolti esami biochimici quali: creatinina (indice di funzionalità renale), un profilo lipidico (colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi) e insulina per il calcolo dell' HOMA index.

CAPITOLO 3

-Metodi-

3.1 DATI ANAMNESTICI

Per ottenere dei semplici dati anamnestici, tutti i partecipanti a questo studio hanno compilato il seguente questionario:

Sesso : - Maschio
- Femmina
Età: ...

Nazionalità e/o Etnicità:

Fumo : -Si
-No
-Ex

Sport: - Si *
- No

*** indicare quante volte alla settimana e l'attività fisica che si svolge**

Ipertensione -Si
- No

Dislipidemia - Si
- No

Malattie cardiovascolari - Si
- No

Familiarità con il diabete -Si
- No

Assume attualmente farmaci - Si *
- No

Patologie nel passato:

*** Quali:**

3.2 EMOGLOBINA GLICATA (HbA1c)

Il dosaggio dell'HbA1C viene eseguito con lo strumento Adams HA-8160 (Arkray KDK, Kyoto, Japan – Menarini) utilizzato presso il Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università degli studi Padova. Lo strumento si basa sulla tecnologia High Performance Cromatography Liquid (HPLC) a scambio cationico con rivelazione colorimetrica (misura a lunghezza d'onda di 415 nm, con bianco a 500 nm) ed in totale automazione. I risultati vengono espressi in mmol/mol ed il dosaggio è standardizzato IFCC.



Figura 3.2.1 HA-8160 : High Performance Cromatography Liquid per il dosaggio dell'HbA1c

La matrice utilizzata è sangue intero e l'anticoagulante utilizzato è K2-EDTA. La stabilità del campione di sangue intero è di almeno 5 giorni a 4 °C e di almeno 6 mesi a -80 °C, anche se recenti segnalazioni indicano, a questa temperatura, una stabilità fino a 10 anni . Nel caso del congelamento a -80 °C possono essere congelate direttamente le provette primarie purchè di materiale resistente al congelamento e con volume di sangue non elevato

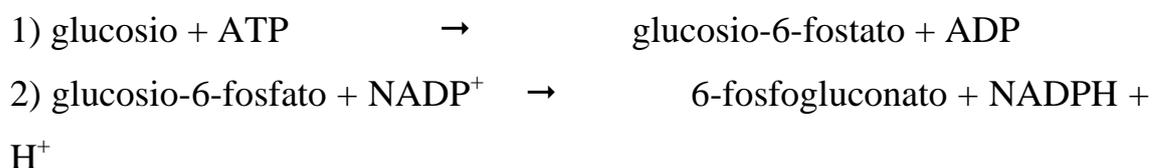
(circa 2 mL). Si raccomanda un congelamento rapido ed uno scongelamento lento a temperatura ambiente (circa 1 ora) con successivo delicato rimescolamento. Una volta scongelati i campioni debbono essere analizzati entro breve tempo.

3.3 GLICEMIA

I carboidrati forniscono l'organismo di glucosio. Il glucosio, il monosaccaride più importante nel sangue con concentrazione postprandiale di 5 mmol/L, viene impiegato come substrato fornitore di energia, indispensabile per le funzioni cellulari. Il processo di degradazione del glucosio avviene mediante la via della glicolisi. Le misurazioni del glucosio vengono utilizzate per la diagnosi ed il monitoraggio dei disturbi nel metabolismo dei carboidrati, quali appunto diabete mellito, ipoglicemia neonatale, ipoglicemia idiopatica e tumori pancreatici con presenza di isolotti cellulari. Il metodo per la valutazione delle glicemia in questo studio è il metodo esochinasi, basato sugli studi di Schmidt Peterson e Young.

3.3.1 Principio del Metodo

Il dosaggio della glicemia viene eseguito con lo strumento Cobas 8000, della ditta ROCHE Diagnostics. Tale dosaggio si avvale di un metodo enzimatico basato sull'impiego di due reazioni accoppiate: nella prima il glucosio, per azione della esochinasi e in presenza di ATP, si trasforma in glucosio-6-fosfato e questo viene ossidato a 6-fosfogluconato ad opera della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6P-DH), con contemporanea riduzione del NADP mentre gli altri carboidrati non vengono ossidati.



La velocità della formazione di NADPH durante la reazione, direttamente proporzionale alla concentrazione, viene misurata fotometricamente a 365 o 340 o 334 nm .

Il limite di sensibilità inferiore del test è 0,11 mmol/L (2.0 mg/dL) ed indica la minima concentrazione misurabile dell'analita che può essere distinta dallo zero. Viene calcolato come il valore che si trova 3 deviazioni standard al di sopra dello standard più basso.

Il metodo è lineare fino a 41.60 mmol/L , con la diluizione automatica fino a 82 mmol/L.

3.4 HDL (High Density Lipoproteins)

Le HDL (High Density Lipoproteins) sono lipoproteine ad alta densità addette al trasporto inverso del colesterolo dalle cellule periferiche al fegato, dove esso viene trasformato in acidi biliari, i quali, a loro volta, vengono espulsi nell'intestino attraverso le vie biliari. Il monitoraggio del colesterolo HDL nel siero è importante dal punto di vista clinico, poiché tra la concentrazione di colesterolo HDL ed il rischio di malattie aterosclerotiche sussiste una correlazione inversa. Concentrazioni elevate di colesterolo HDL hanno un effetto protettivo contro le cardiopatie coronariche, mentre la diminuzione della concentrazione di colesterolo HDL, soprattutto in associazione ad un aumento dei trigliceridi, comporta un aumento del rischio di malattie cardiovascolari. Sono disponibili vari metodi per la determinazione del colesterolo HDL, quali l'ultracentrifugazione, l'elettroforesi, l'HPLC, i metodi a precipitazione ed i metodi diretti; quest'ultimi vengono impiegati nella routine. Sono stati proposti diversi metodi di determinazione diretta del colesterolo HDL nel siero, quali l'impiego di particelle reattive magnetiche come le

combinazioni polianioni/metallo, o l'impiego di polietilenglicole (PEG) con anticorpi anti-apoproteina B e anti-apoproteina CIII.

Il presente metodo automatizzato per la determinazione diretta del colesterolo HDL nel siero e nel plasma utilizza enzimi modificati con PEG e solfato di destrano. La colesterolo esterasi e la colesterolo ossidasi modificate dal PEG risultano possedere attività catalitiche selettive rispetto alle frazioni lipoproteiche, con una reattività crescente nella seguente sequenza:

$LDL < VLDL \approx \text{chilomicroni} < HDL$.

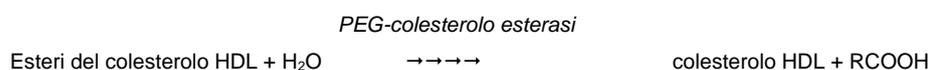
La determinazione diretta del colesterolo HDL con il metodo utilizzato in questo studio è conforme agli obiettivi di prestazione, stabiliti nel 1998 dal National Institute of Health (NIH) e dal National Cholesterol Education Program (NCEP),. I risultati di questo metodo sono in buona correlazione con quelli ottenuti con i metodi di precipitazione e di ultracentrifugazione

3.4.1 Principio del Metodo

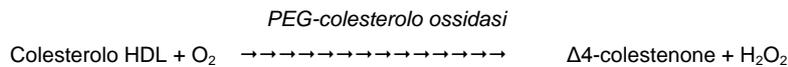
Le HDL sono state determinate con il test enzimatico colorimetrico omogeneo su Cobas 8000 (Roche).

In presenza di ioni di magnesio e di solfato di destrano vengono formati complessi idrosolubili con LDL, VLDL e chilomicroni, resistenti agli enzimi modificati con PEG.

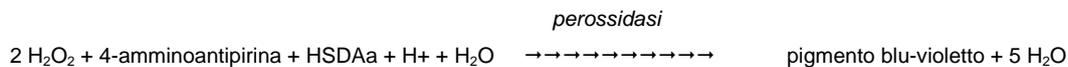
La concentrazione di colesterolo HDL viene determinata enzimaticamente con la colesterolo esterasi e la colesterolo ossidasi associate a PEG negli aminogruppi (ca. 40%). Gli esteri del colesterolo vengono separati quantitativamente mediante l'azione della colesterolo esterasi in colesterolo libero e acidi grassi.



In presenza di ossigeno, il colesterolo viene ossidato dalla colesterolo ossidasi a Δ^4 -colestonone e perossido d'idrogeno.



In presenza di perossidasi, il perossido di idrogeno formatosi reagisce con la 4-amminoantipirina e con l'HSDA (Sodio N-(2-idrossi-3-solfopropil)-3,5-dimetossianilina), dando origine ad un colorante blu-violetto, la cui intensità di colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo e viene misurata fotometricamente.



Il limite di sensibilità inferiore del test è 0,08 mmol/L (3mg/dL) ed indica la minima concentrazione misurabile dell'analita che può essere distinta dallo zero.

Viene calcolato come il valore che si trova 3 deviazioni standard al di sopra dello standard più basso.

3.5 LDL (Low Density Lipoprotein)

Le lipoproteine a bassa densità (Low Density Lipoprotein: LDL) hanno un ruolo chiave per l'insorgenza ed il decorso dell'aterosclerosi, specialmente della sclerosi coronarica.

Le LDL derivano, mediante l'azione di diversi enzimi lipolitici, dalle VLDL (Very Low Density Lipoprotein) ricche di trigliceridi, e sono sintetizzate dal fegato.

Elevate concentrazioni di LDL nel sangue e un prolungamento della loro permanenza comportano la distruzione della funzionalità endoteliale e un aumentato assorbimento del colesterolo LDL dal sistema di monociti/macrofagi nonché dalle cellule dei muscoli lisci nelle pareti dei

vasi. Il colesterolo depositato nelle placche aterosclerotiche proviene prevalentemente dalle LDL.

Tra tutti i singoli parametri, la misurazione del colesterolo LDL, a livello clinico, ha la maggior importanza per la predizione dell'aterosclerosi coronarica. Uno degli obiettivi terapeutici è infatti la diminuzione del colesterolo LDL, la cui efficacia terapeutica comporta un miglioramento della funzionalità endoteliale, ostacolando l'insorgenza dell'aterosclerosi, come pure una diminuita progressione dell'impedimento della rottura della placca. Per la determinazione del colesterolo LDL sono disponibili vari metodi, quali l'ultracentrifugazione come metodo di riferimento, l'elettroforesi lipoproteica ed i metodi a precipitazione. Nei metodi a precipitazione, si fa precipitare, ad esempio, il colesterolo LDL contenente apolipoproteine B, impiegando polivinilsolfato, solfato di destrano o anioni policiclici. Di solito, si calcola la concentrazione di colesterolo LDL dalla differenza tra il colesterolo totale e quello rimanente nel surnatante (colesterolo VLDL e HDL) dopo la precipitazione con polivinilsolfato e con solfato di destrano. Le Lipid Research Clinics raccomandano una combinazione dell'ultracentrifugazione e dei metodi a precipitazione impiegando polianioni in presenza di cationi bivalenti. I metodi a precipitazione richiedono però molto tempo, non sono automatizzabili e sono soggetti ad interferenze da sieri iperlipidemici, soprattutto in caso di alte concentrazioni di acidi grassi liberi.

Un metodo più recente è basato sulla determinazione del colesterolo LDL dopo immunoassorbimento e centrifugazione del campione.

E' molto diffuso il calcolo della concentrazione di LDL secondo la formula di Friedwald. Questa formula si basa su 2 determinazioni del colesterolo, su una determinazione dei trigliceridi nonché su una precipitazione della particelle di HDL, e parte dal presupposto di un rapporto fisso tra il colesterolo VLDL ed i trigliceridi nei campioni di sangue prelevati a

digiuno. Anche in presenza di piccole quantità di chilomicroni o di lipoproteine patologiche, da questa formula risultano valori di colesterolo LDL artificialmente bassi. Per questo motivo vi è una grande necessità di un metodo semplice e affidabile per la determinazione del colesterolo LDL senza la necessità di fasi preparatorie o di calcoli.

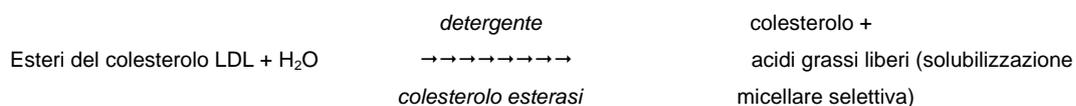
Il metodo automatizzato utilizzato nello studio per la determinazione diretta del colesterolo LDL presenta i vantaggi della solubilizzazione micellare selettiva del colesterolo LDL mediante un detergente non ionico e l'interazione di un composto di zucchero e di lipoproteine VLDL e chilomicroni.

Questa determinazione diretta è conforme agli obiettivi dell'NCEP (National Cholesterol Education Program), stabiliti nel 1995, del <4% di CV totale, di una deviazione standard del $\leq 4\%$ contro il metodo di riferimento, e del $\leq 12\%$ di errore analitico totale.

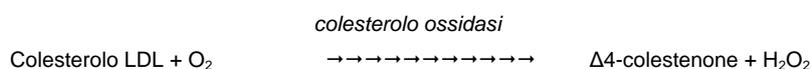
3.5.1 Principio del Metodo

Test enzimatico colorimetrico in fase omogenea. Il test viene eseguito su Cobas 8000 (Roche, Diagnostics, Milano. Italia).

Gli esteri del colesterolo vengono separati quantitativamente mediante l'azione della colesterolo esterasi in colesterolo libero e acidi grassi.

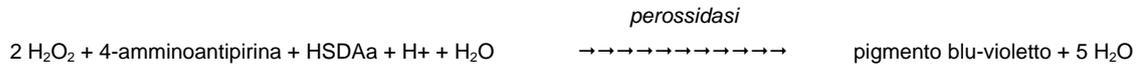


In presenza di ossigeno, il colesterolo viene ossidato dalla colesterolo ossidasi a $\Delta 4$ -colestonone e perossido d'idrogeno.



In presenza di per ossidasi, il perossido di idrogeno formatosi reagisce con la 4-amminoantipirina e con l'HSDA (Sodio N-(2-idrossi-3-solfopropil)-

3,5-dimetossianilina), dando origine ad un composto colorato blu-violetto, la cui intensità di colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo e viene misurata fotometricamente (lunghezza d'onda a 585nm).



Il limite di sensibilità inferiore del test è 0,10 mmol/L (3,86 mg/dL) ed indica la minima concentrazione misurabile dell'analita che può essere distinta dallo zero. Viene calcolato come il valore che si trova 3 deviazioni standard al di sopra dello standard più basso.

3.6 COLESTEROLO

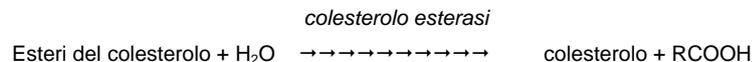
Il colesterolo è uno steroide, sintetizzato in molti tipi di tessuto, ma principalmente nel fegato e nella parete intestinale, esso origina per circa tre quarti per sintesi endogena e per un quarto dall'assunzione alimentare. Le determinazioni del colesterolo sono impiegate nello screening del rischio aterosclerotico e nella diagnosi e nel trattamento di dislipidemie. Il primo metodo per la determinazione del colesterolo fu descritto da Liebermann nel 1885 ed in seguito da Burchard nel 1889. Nella reazione di Liebermann–Burchard, il colesterolo, in presenza di acido acetico, di anidride acetica e di acido solforico concentrato, forma un composto colorato verde-blu a base dei carboidrati insaturi polimerici. Il metodo Abell–Kendall, benché specifico per il colesterolo, utilizza reattivi corrosivi e risulta tuttora tecnicamente complesso. Nel 1974, Roeschlau ed Allain descrissero il primo metodo completamente enzimatico. Questo metodo è basato sulla determinazione del Δ^4 -colestene in seguito alla scissione enzimatica del colesterolo estere da parte della colesterolo esterasi, alla trasformazione del colesterolo mediante la colesterolo ossidasi

e alla conseguente misurazione, mediante la reazione di Trinder, del perossido di idrogeno formatosi. L'ottimizzazione della scissione dell'estere (>99,5%) permette la standardizzazione utilizzando standard primari e secondari e un confronto diretto con i metodi di riferimento dei CDC e del NIST. La determinazione del colesterolo di Roche è conforme agli obiettivi fissati dal National Institutes of Health (NIH) nel 1992, riguardo ad un prestazione \leq al 3% sia per la precisione che per la deviazione standard

3.6.1 Principio del Metodo

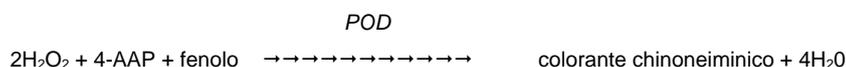
Metodo enzimatico colorimetrico eseguito su Cobas 8000 (Roche).

Gli esteri del colesterolo vengono dissociati per azione della colesterolo esterasi, formando colesterolo libero e acidi grassi.



Successivamente la colesterolo ossidasi catalizza l'ossidazione del colesterolo, formando colest-4en-3-one e perossido di idrogeno.

In presenza di perossidasi, il perossido di idrogeno formatosi partecipa alla reazione ossidativa del fenolo e del 4-aminofenazone, con la produzione di un colorante chinoneiminico rosso.



L'intensità di colore del colorante formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo. Viene determinata misurando l'aumento dell'assorbanza a 505 nm

Il limite di sensibilità inferiore del test è 0,10 mmol/L (3,86 mg/dL) ed indica la minima concentrazione misurabile dell'analita che può essere

distinta dallo zero. Viene calcolato come il valore che si trova 3 deviazioni standard al di sopra dello standard più basso.

3.7 TRIGLICERIDI

I trigliceridi sono esteri dell'alcol trivalente glicerolo recanti 3 acidi grassi a catena lunga.

Vengono in parte sintetizzati nel fegato e in parte assorbiti con il cibo.

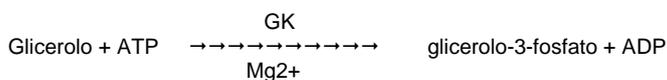
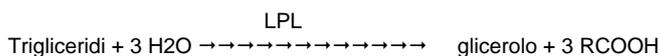
La determinazione dei trigliceridi viene impiegata per la diagnosi e il trattamento dei pazienti con diabete, disfunzioni del metabolismo lipidico e malattie endocrine.

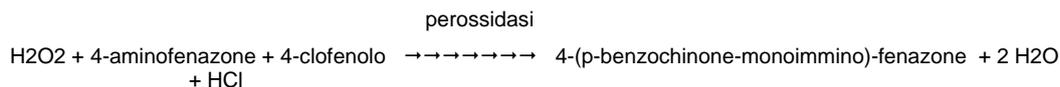
3.7.1 Principio del Metodo

Test enzimatico colorimetrico eseguito su Cobas 8000 (Roche).

Questo metodo è basato sugli studi di Wahlefeld ed utilizza una proteolipasi da microrganismi per la rapida e completa idrolisi dei trigliceridi a glicerolo, con la conseguente ossidazione di diidrossiacetone fosfato e a perossido diidrogeno, che insieme al 4-aminofenazone e al 4-clorofenolo provoca una reazione catalizzata dalla perossidasi con formazione di composto colorato rosso (reazione a punto finale di Trinder).

L'intensità del colore formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione di trigliceridi e può essere misurata fotometricamente a 505 nm.





Limite inferiore del test 0.1 mmol/L (8.85mg/dL).

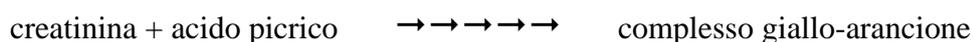
3.8 CREATININA

Il dosaggio della creatinina nel siero e nel plasma è il test più comunemente utilizzato per la valutazione della funzionalità renale. La creatinina è un prodotto di degradazione del creatinfosfato nei muscoli e viene generalmente prodotta dall'organismo a velocità abbastanza costante (a seconda della massa muscolare). Viene filtrata liberamente attraverso la membrana glomerulare, e, in condizioni normali, non viene riassorbita in misura apprezzabile dai tubuli. In più, una quantità piccola ma significativa viene attivamente secreta. Poiché si osserva un aumento della creatinina nel sangue solo in caso di un forte danno ai nefroni, il test non deve essere impiegato per rilevare una malattia renale in fase precoce.

3.8.1 Principio del Metodo

La creatinina viene misurata con lo strumento Cobas 8000 (Roche Diagnostics), utilizzando il metodo Jaffè (cinetico e colorimetrico).

La reazione è la seguente (a pH alcalino):



In soluzione alcalina, la creatinina, con il picrato, forma un complesso di colora giallo – arancione, la cui velocità di formazione del colorante è proporzionale alla concentrazione di creatinina nel campione. L'intensità del colore formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione di

trigliceridi e può essere misurata fotometricamente a 505 nm. La determinazione “ cinetica con bianco campione” riduce al minimo le interferenze dovute alla bilirubina. Per compensare la reazione non specifica provocata da cromogeni sierici/plasmatici (pseudo-creatinine), incluse proteine e chetoni, i risultati per il siero o plasma vengono corretti per $- 26 \mu\text{mol/L}$ (o $0,3 \text{ mg/dL}$). Il metodo risulta comunque accurato poiché il calibratore è tracciabile al metodo di riferimento IDSM. Il limite di sensibilità inferiore che rappresenta la minima concentrazione misurabile dell’analita che può essere distinta dallo zero e che viene calcolato come il valore che si trova 3 deviazioni standard al di sopra dello standard più basso è $18 \mu\text{mol/L}$ (o 0.2 mg/dL).



Figura 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8 : Cobas 8000 dove vengono eseguiti i test per la creatinina. HDL, LDL, Colesterolo totale e trigliceridi.

3.9 INSULINA

L’insulina umana è un ormone polipeptidico originato dalle cellule beta del pancreas che regola la conservazione e la produzione dei carboidrati. La sua secrezione è normalmente stimolata da aumenti nella quantità di glucosio in circolo, che porta a livelli d’insulina più elevati e ad un’assimilazione più rapida del glucosio da parte dei tessuti a cui fa seguito una diminuzione del livello di glucosio circolante.

In alcune condizioni, principalmente l'insulinoma ed il diabete, questo rapporto risulta alterato. L'insulina tende a circolare a livelli impropriamente elevati in pazienti con tumori pancreatici che secernono insulina; per questo motivo questi tumori possono essere causa di ipoglicemia.

I livelli d'insulina non rientrano nella sottoclassificazione del diabete preparata del National Diabetes Data Group. Nonostante ciò, quando queste informazioni vengono ottenute durante un test di tolleranza del glucosio, sembrano avere un valore prognostico nel precorrere i vantaggi di una terapia con insulina e nelle probabilità di progressione verso la dipendenza da insulina e verso le complicazioni (come la retinopatia) che sono caratteristiche del diabete.

3.9.1 Principio del Metodo

L'insulina viene dosata con metodiche EIA, dosaggi chemiluminescenti sequenziali immunometrici in fase solida marcati con enzimi.

L'insulina viene eseguita su Immulite 2000 (Siemens Healthcare, United Kingdom).

Il limite di sensibilità inferiore del test è 2 μ IU/mL .

REAZIONE DI CHEMILUNESCENZA

Durante la reazione immunologica iniziale tra gli anticorpi presenti nel reagente e l'analita del campione, il componente del reagente legato con la fosfatasi alcalina (conosciuto come coniugato) è legato alla biglia nel tubo di reazione. La quantità di fosfatasi alcalina legata è direttamente proporzionale (per una reazione a sandwich), o inversamente proporzionale (per un saggio competitivo) alla concentrazione dell' analita nel campione del paziente. Dopo il lavaggio del tubo di reazione viene aggiunto il substrato luminogenico. Dopo cinque minuti, il tubo di reazione viene posto davanti ad un tubo fotomoltiplicatore (PMT), dove la luce generata

dalla reazione luminosa viene misurata. La reazione amplificata dall'enzima nel sistema produce un'emissione prolungata della luce rendendo il tubo luminoso, come indicato nelle figure sottostanti.

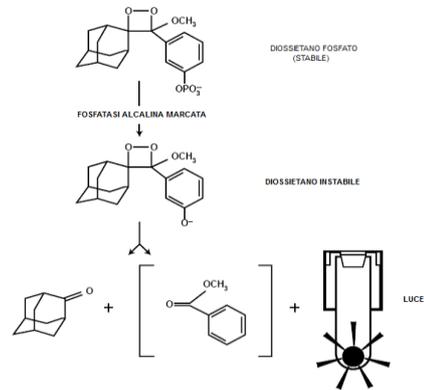
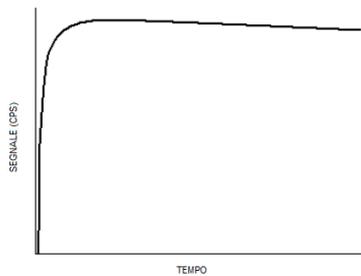


Figura 3.9.1.1 . Luminescenza amplificata dall'enzima **Figura 3.9.1.2.** Reazione



Figura 3.9.1.3.: Strumento Immulite 2000

I risultati sono espressi come medie utilizzando la T di student ($p < 0,05$). Il programma usato è stato Analyse – it.

CAPITOLO 4

- RISULTATI -

4.1 DESCRIZIONE GENERALE DELLA POPOLAZIONE

I pazienti reclutati per questo studio sono 498, 194 maschi e 304 femmine di età media, rispettivamente, di 54,43 e 47,92 anni.

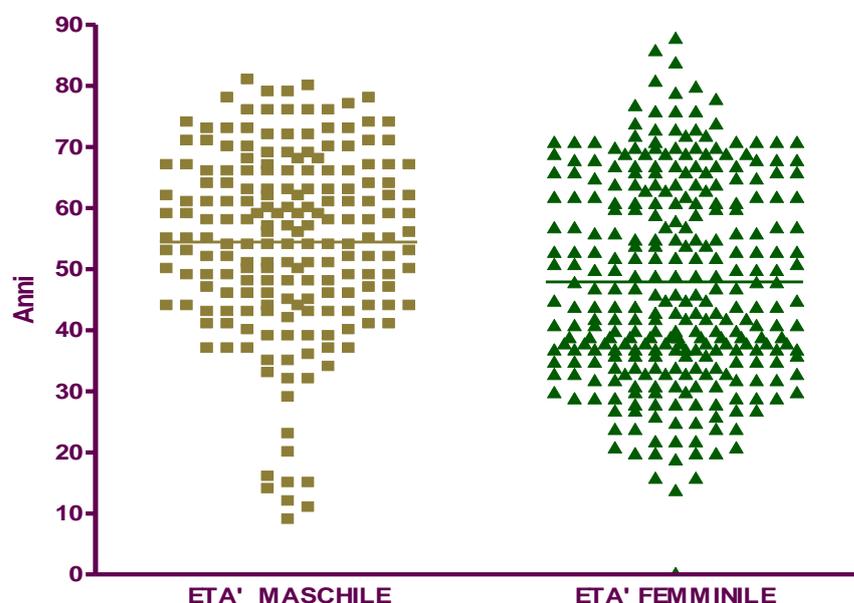


Figura 4.1.1: Rappresentazione grafica dell'età media delle popolazione femminile e della popolazione maschile

	POPOLAZIONE MASCHILE	POPOLAZIONE FEMMINILE
MEDIA ETA' ± DS ESPRESSA IN ANNI	54.43 ±14.73	47.92 ± 16.25
MEDIANA	55	45
RANGE DI ETA' ESPRESSO IN ANNI	9-81	4 mesi -88
T-student Popolazione maschile Vs Popolazione femminile	p < 0.0001	

Tabella 4.1.1.: Media, Mediana e Range di età della popolazione maschile e femminile

Grazie al questionario utilizzato per caratterizzare la popolazione in studio si sono potute rilevare sia l'etnia ed altre semplici abitudini di vita quali, per esempio, il fumo come pure lo svolgimento di attività sportiva ma anche dei possibili fattori di rischio (ipertensione, dislipidemia, malattie cardiovascolari e familiarità con la patologia diabetica).

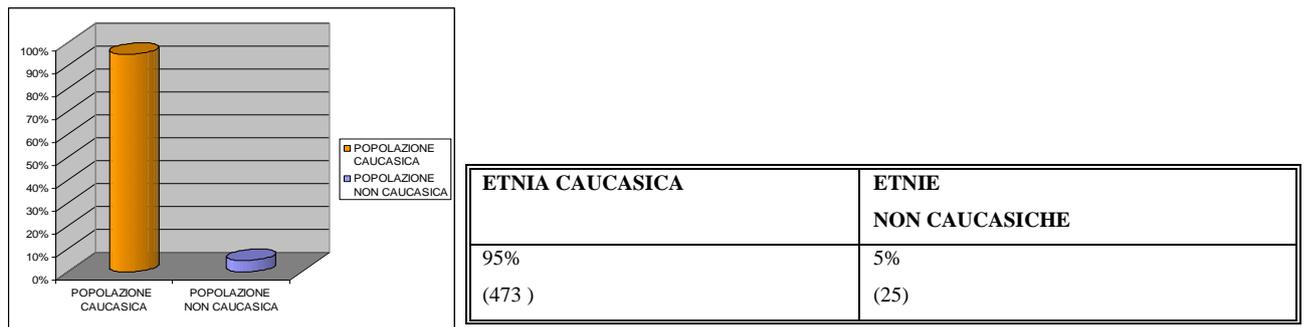


Figura 4.1.2 e Tabella 4.1.2: Percentuale dell'etnia caucasica nella popolazione studiata

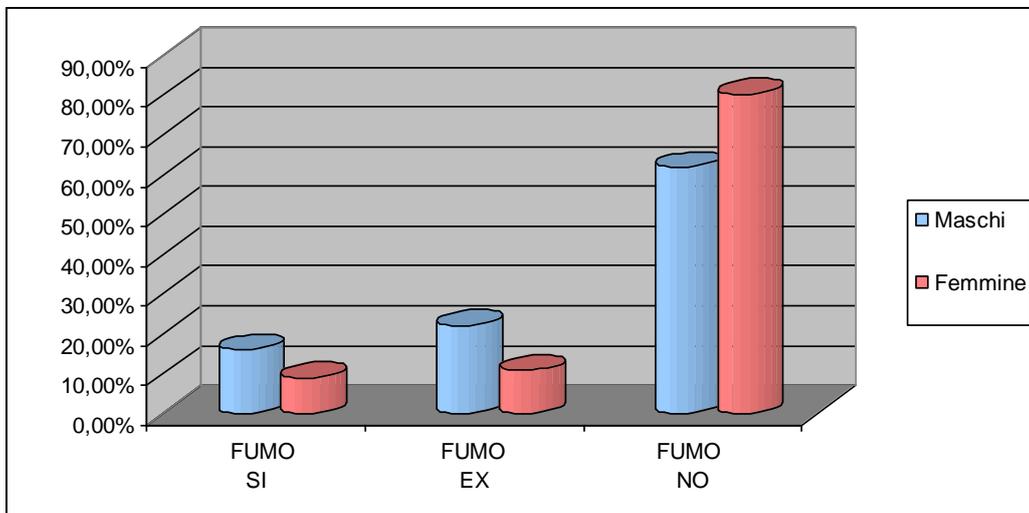
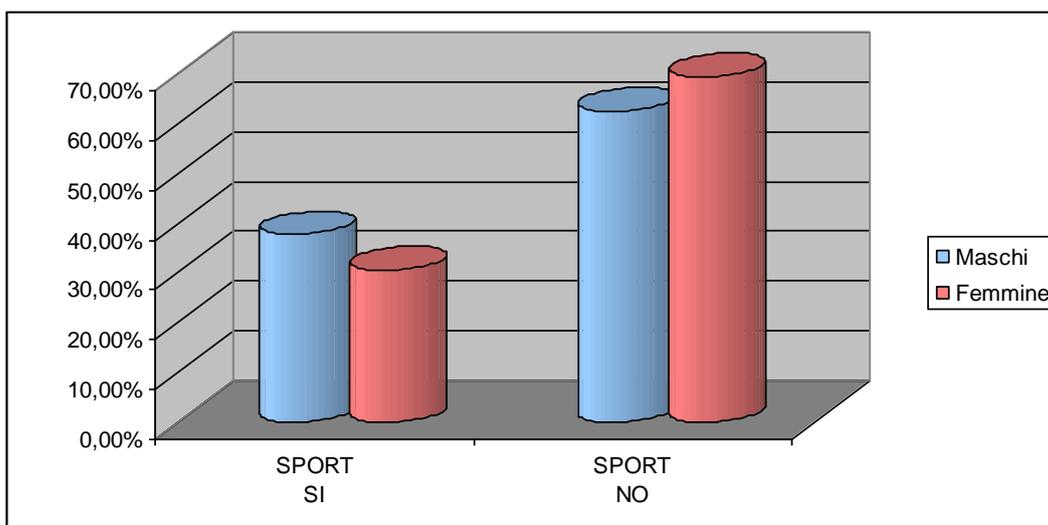


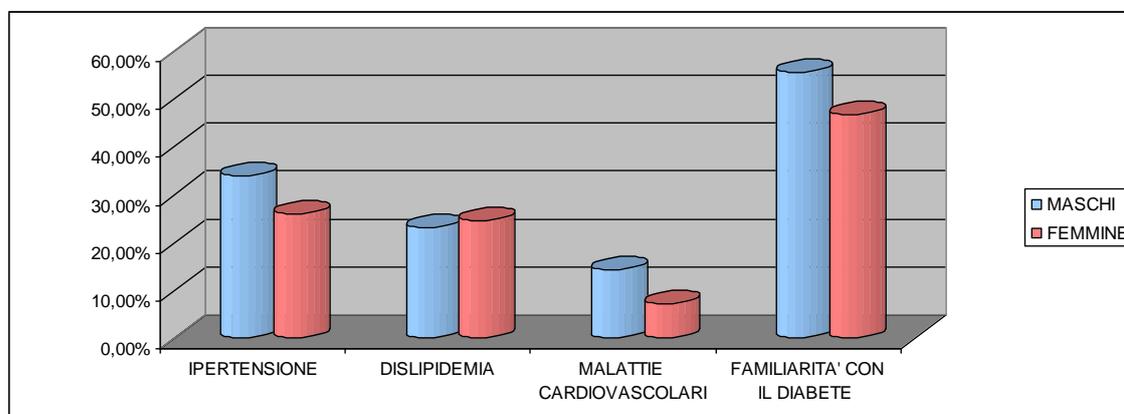
Figura 4.1.3 e Tabella 4.1.3: Percentuale di individui fumatori, ex fumatori e non fumatori nella popolazione reclutata.

	FUMO SI	FUMO EX	FUMO NO
POPOLAZIONE MASCHILE 194 PAZIENTI	15,97% (31)	22,16% (43)	61,85% (120)
POPOLAZIONE FEMMINILE 304 PAZIENTI	8,88% (27)	10,85% (33)	80,26% (244)



	SPORT SI	SPORT NO
POPOLAZIONE	37,62% (73)	62,37 % (121)
194 PAZIENTI		
POPOLAZIONE	30,59% (93)	69,40% (211)
304 PAZIENTI		

Figura 4.1.4 e Tabella 4.1.4: Percentuale della popolazione studiata che pratica sport



	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
POPOLAZIONE MASCHILE	34,02% (66)	23,19 (45)	14,43% (28)	55,67% (108)
194 PAZIENTI				
POPOLAZIONE FEMMINILE	25,98% (79)	24,67% (75)	7,23% (22)	46,71% (142)
304 PAZIENTI				

Figura 4.1.5 e Tabella 4.1.5: Percentuale della popolazione studiata che ha dichiarato essere soggetta a fattori di rischio quali ipertensione, dislipidemia, malattie cardiovascolari e di familiarità con il diabete.

4.2 CLASSIFICAZIONE DELLA POPOLAZIONE CON L'UTILIZZO DELL' OGTT

Secondo i criteri basati sulla curva da carico orale di glucosio una glicemia a digiuno $\geq 7,00$ mmol/L e/o una glicemia a 120 minuti (dopo carico di gr 75 di glucosio) (2hPG) $\geq 11,00$ mmol/L pone diagnosi di diabete mentre una glicemia a digiuno compresa tra 5,6 mmol/L e 6,9 mmol/L definisce una condizione di alterata glicemia a digiuno (IFG) e 2hPG se compresa tra 7,9 mmol/L e 10,9 mmol/L definisce una alterata intolleranza al glucosio (IGT).

La condizione di normalità è identificata da valori di glicemia a digiuno compresi nell'intervallo 3,7 mmol/L – 5,6 mmol/L e 2hPG 2,00mmol/L – 7,8 mmol/L.

Utilizzando questi criteri sono stati classificati nel nostro studio diabetiche 91 persone su 498 (18,27 %), mentre 107 (21,48%) presentavano una condizione o di IFG o IGT oppure entrambe; una condizione di normale tolleranza ai carboidrati si è riscontrata per 300 persone (60,24%).

4.2.1 POPOLAZIONE CON FPG $\geq 7,00$ mmol/L e/o 2hPG $\geq 11,00$ mmol/L

La popolazione classificata come diabetica secondo i criteri dell' OGTT è rappresentata da 91 soggetti su 498 (18,27%) (45 femmine e 46 maschi, età media 59,31 e di 61,34 anni, rispettivamente).

	<i>Media \pm DSt</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
Glicemia (mmol/L) a digiuno	6,608 \pm 1,4	6,5	4 – 17,90
Glicemia (mmol/L)2hPG	11,84 \pm 2,378	11,80	4,5 – 17,80
HbA1c mmol/mol	44,61 \pm 9,043	43,00	33 – 115

Tabella 4.2.1.1: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di Glicemia basale, glicemia posto carico e HbA1c.

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
91 SOGGETTI	50,54% (46)	36,26% (33)	17,58% (16)	56,04% (51)

Tabella 4.2.1.2: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione con curva da carico patologica

4.2.2 POPOLAZIONE CON IFG O IGT OPPURE IFG E IGT

107 soggetti su 498 (21,48%) persone hanno evidenziato un'alterata glicemia a digiuno presentare una ridotta tolleranza al glucosio o entrambe le condizioni.

4.2.2.1 IFG – Alterata glicemia a digiuno

56 su 498 pazienti studiati (22 femmine e 34 maschi, un età media 58,66 e 56,32 anni rispettivamente) hanno dimostrato un'alterata glicemia a digiuno.

	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
Glicemia (mmol/L) a digiuno	6,5± 0,2303	6,4	6,1-6,9
Glicemia (mmol/L)2hPG	6,141 ± 1,053	6,1	3,6- 7,8
HbA1c mmol/mol	40,29 ± 4,142	40,00	32 – 53

Tabella 4.2.2.1.1: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di Glicemia basale, glicemia posto carico e HbA1c

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
56 SOGGETTI	41,07% (23)	30,35% (17)	17,85% (10)	48,21% (27)

Tabella 4.2.2.1.2: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione IFG

4.2.2.2. IGT – Ridotta tolleranza al glucosio

38 su 498 pazienti (22 femmine e 16 maschi, età media 49,68 e 59,88 anni rispettivamente) manifestano una ridotta tolleranza al glucosio.

	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
Glicemia (mmol/L) a digiuno	5,279± 0,3807	5,2	4,3-6,0
Glicemia (mmol/L)2hPG	8,889 ± 0,7529	8,85	7,9 – 10,6
HbA1c mmol/mol	38,26 ± 4,366	39,00	28 – 49

Tabella 4.2.2.2.1: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di Glicemia basale, glicemia posto carico e HbA1c

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
38 SOGGETTI	44,73% (17)	21,05% (8)	18,42% (7)	52,63% (20)

Tabella 4.2.2.2.2: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione IGT

4.2.2.3 IFG e IGT – Alterata glicemia a digiuno e ridotta tolleranza al glucosio

13 su 498 pazienti (5 femmine e 8 maschi, età media 68,20 e 62,38 anni,rispettivamente) hanno manifestato contemporaneamente entrambe le condizioni (IFG e IGT).

	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
Glicemia (mmol/L) a digiuno	6,392 ± 0,2842	6,3	6,1 – 6,9
Glicemia (mmol/L)2hPG	8,88 ± 0,5083	8,7	8,0 – 9,7
HbA1c mmol/mol	42,77 ± 4,419	42,00	37,00 – 50,00

Tabella 4.2.2.3.1: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di Glicemia basale, glicemia posto carico e HbA1c

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
13 SOGGETTI	38,46% (5)	23,07% (3)	15,38% (2)	46,15% (6)

Tabella 4.2.2.3.2: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione che presenta sia IFG che IGT

4.2.3. POPOLAZIONE CON FPG TRA 3,7-5,6 mmol/L

e/o 2hPG TRA 2,00 -7,8 mmol/L

300 su 498 persone (210 femmine e 90 maschi, età media 42,99 e 48,64 anni,rispettivamente) hanno evidenziato valori di glicemia a digiuno compresi nell'intervallo 3,7 – 5,6 mmol/L e 2hPG 2,00 – 7,8 mmol/L .

	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
Glicemia (mmol/L) a digiuno	5,149 ± 0,5029	5,1	3,8 – 6,0
Glicemia (mmol/L) 2hPG	5,449 ± 1,201	5,4	2,4 – 7,8
HbA1c mmol/mol	36,02 ± 3,775	36,00	24,00 – 49,00

Tabella 4.2.3.1.: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di Glicemia basale, glicemia posto carico e HbA1c

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
300 SOGGETTI	18,33% (55)	19,66% (59)	5,33% (16)	46,00% (138)

Tabella 4.2.3.2.: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione che presenta una normale curva glicemica

4.3 CLASSIFICAZIONE DELLA POPOLAZIONE

IN BASE AI VALORI DI HbA_{1c}

(CRITERI PROPOSTI DALL' AMERICAN DIABETES ASSOCIATIONS)

L'American Diabetes Associations (ADA) ha suggerito i seguenti criteri: HbA_{1c} \geq 48 mmol/mol per la diagnosi di diabete e un intervallo tra 39 - 46 mmol/mol per la diagnosi di elevato rischio di comparsa della malattia (prediabete).

Basandoci su questi criteri sono state classificate come diabetiche 33 soggetti su 498 (6,62 %), mentre 200 soggetti (40,16%) manifestano una condizione "pre-diabetica" e 265 persone (53,21%) rientrano nei limiti di normalità.

4.3.1 POPOLAZIONE CON VALORI DI HbA_{1c} \geq 48 mmol/mol

33 su 498 pazienti (19 femmine e 14 maschi, età media rispettivamente di 62,21 e 56,37 anni, rispettivamente) presentano valori di HbA_{1c} \geq 48 mmol/mol e quindi possono essere classificati come diabetici.

	<i>Media \pm DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
<i>HbA_{1c} mmol/mol</i>	52,94 \pm 11,73	50,00	48,00 – 115,00
<i>Glicemia (mmol/L) a digiuno</i>	6,997 \pm 2,095	6,7	5,0 – 17,90
<i>Glicemia (mmol/L) 2hPG</i>	11,40 \pm 3,327	12,00	4,5 – 16,70

Tabella 4.3.1.1.: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di HbA_{1c}, Glicemia basale, glicemia posto carico.

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
33 SOGGETTI	42,42% (14)	45,45% (15)	24,24% (8)	69,69% (23)

Tabella 4.3.1.2.: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione che presenta una HbA_{1c} ≥ 48 mmol/mol

4.3.2 POPOLAZIONE CON VALORI DI HbA_{1c} TRA 39 – 47 mmol/mol (CONDIZIONE PRE-DIABETICA)

200 soggetti su 498 (108 femmine e 92 maschi, età media 56,67 e 59,89 anni rispettivamente) sono classificate come prediabetiche.

	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
HbA_{1c} mmol/mol	41,37 ± 2,175	41,00	39,00 – 47,00
Glicemia (mmol/L) a digiuno	5,964 ± 0,7105	5,95	4,1 – 7,7
Glicemia (mmol/L) 2hPG	8,062 ± 2,892	7,3	3,4 – 17,80

Tabella 4.3.2.1.: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di HbA_{1c}, Glicemia basale, glicemia posto carico.

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
200 SOGGETTI	46,00% (92)	28,50% (57)	14,50% (29)	40,5% (81)

Tabella 4.3.2 .2.: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione che presenta una 39 ≤ HbA_{1c} ≤ 47 mmol/mol

4.3.3. POPOLAZIONE CON VALORI DI HbA_{1c} ≤ 38 mmol/mol

265 persone (177 di sesso femminile e 88 di sesso maschile, età media di 41,03 e 48,25 anni rispettivamente) sono risultate avere livelli normali di HbA_{1c} (≤ 38 mmol/mol).

	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
HbA1c mmol/mol	34,51 ± 2,703	35,00	24,00 – 38,00
Glicemia (mmol/L) a digiuno	5,179 ± 0,5958	5,00	3,8 – 6,8
Glicemia (mmol/L)2hPG	5,766 ± 1,801	5,50	2,4– 12,30

Tabella 4.3.3.1.: Medie, Mediane e intervallo delle concentrazioni di HbA1c, Glicemia basale, glicemia posto carico

	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	MALATTIE CARDIOVASCOLARI	FAMILIARITA' CON IL DIABETE
265 SOGGETTI	14,71% (39)	16,98% (45)	3,92% (10)	19,62% (52)

Tabella 4.3.3.2.: L'incidenza dei fattori di rischio nella popolazione che presenta HbA1c ≤ 38 mmol/mol

4.4 PROFILO BIOCHIMICO DELLA POPOLAZIONE STUDIATA

In tutta la popolazione reclutata è stato eseguito un pannello di analisi biochimiche per cercare di caratterizzare la condizione generale della popolazione ma anche per verificare quali fossero le caratteristiche metaboliche e di funzionalità renale nei due gruppi classificati in base all' OGTT o all' HbA1c.

Per tale motivo, quindi, sono stati misurati la creatinina (indice di funzionalità renale) e un pannello lipidico comprendente colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi. In tutti i soggetti studiati è stata inoltre valutata anche la concentrazione dell' insulina necessaria per il calcolo del HOMA INDEX parametro utilizzato per rilevare un eventuale insulino resistenza.

4.4.1 CREATININA

CREATININA mmol/L	Media ± DS	Mediana	Intervallo	
Diagnosi di Diabete con OGTT	84,64 ± 84,00	44,00	–	
<i>FPG ≥7,00 mmol/L e/o 2-hPG ≥11.1 mmol/L</i>	18,21	179,00		
Diagnosi di Diabete con HbA1c	90,00 ± 87,00	58,00	–	
<i>HbA1c ≥ 48 mmol/mol</i>	25,50	179,00		
IFG e IGT	85,20 ± 85,00	19,00	–	
<i>5,5 ≤ IFG <7,0 mmol/L e/o 7,8 ≤ IGT <11,0 mmol/L</i>	16,93	171,00		
Condizione pre-diabetica con HbA1c	82,46 ± 81,00	44,00	–	
<i>39 ≤ HbA1c <48 mmol/mol</i>	14,67	126,00		
OGTT negativa	81,30 ± 78,00	44,00	–	
<i>3,9 ≤ FPG <5,5 mmol/L e/o 2hPG <7,8 mmol/L</i>	18,00	126,00		
HbA1c negativa	82,06 ± 80,00	19,00	–	
<i>HbA1c ≤ 38 mmol/mol</i>	18,79	240,00		

Tabella 4.4.1.1.: Medie, Mediane e Intervallo di concentrazioni della creatinina nei pazienti classificati in base ai criteri descritti.

I valori medi della creatinemia non sono significativamente differenti in tutte le classi dei soggetti in studio ($p > 0,05$).

4.4.2. PROFILO LIPIDICO

Il profilo lipidico comprende le analisi del colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi

<i>Colesterolo totale mmol/L</i>	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> <i>FPG ≥7.00 mmol/L e/o 2-hPG ≥11.1 mmol/L</i>	5,401 ± 1,128	5,405	2,38 – 9,00
<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> <i>HbA1c ≥ 48 mmol/mol</i>	5,255 ± 1,347	5,15	2,38 – 900
<i>IFG e IGT</i> <i>5,5 ≤ IFG <7,0 mmol/L e/o 7,8 ≥ IGT <11,0 mmol/L</i>	5,051 ± 0,8719	5,00	2,39 – 7,23
<i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i> <i>39 ≤ HbA1c <48 mmol/mol</i>	5,164 ± 0,9510	5,23	2,39 – 8,75
<i>OGTT negativa</i> <i>3,9 ≥ FPG <5,5 mmol/L e/o 2hPG <7,8 mmol/L</i>	5,167 ± 0,9075	5,21	2,35 – 8,24
<i>HbA1c negativa</i> <i>HbA1c ≤ 38 mmol/mol</i>	5,19 ± 0,8895	5,21	2,35 – 8,24

Tabella 4.4.2.1.: Medie, Mediane e Intervallo di concentrazioni di colesterolo nei pazienti classificati in base ai criteri descritti.

<i>HDL mmol/L</i>	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> <i>FPG ≥7.00 mmol/L e/o 2-hPG ≥11.1 mmol/L</i>	1,493 ± 0,6323	1,33	0,48 – 3,78
<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> <i>HbA1c ≥ 48 mmol/mol</i>	1,483 ± 0,6426	1,44	0,48 – 3,74
<i>IFG e IGT</i> <i>5,5 ≤ IFG <7,0 mmol/L e/o 7,8 ≥ IGT <11,0 mmol/L</i>	1.412 ± 0,4483	1,33	0,48 – 3,12
<i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i> <i>39 ≤ HbA1c <48 mmol/mol</i>	1,406 ± 0,4866	1,33	0,48 – 3,78
<i>OGTT negativa</i> <i>3,9 ≥ FPG <5,5 mmol/L e/o 2hPG <7,8 mmol/L</i>	1,466 ± 0,4268	1,410	0,50 – 3,75
<i>HbA1c negativa</i> <i>HbA1c ≤ 38 mmol/mol</i>	1,496 ± 0,4382	1,46	0,50 – 3,12

Tabella 4.4.2.2.: Medie, Mediane e Intervallo di concentrazioni di HDL nei pazienti classificati in base ai criteri descritti

LDL mmol/L	Media ± DS	Mediana	Intervallo
Diagnosi di Diabete con OGTT <i>FPG ≥7.00 mmol/L e/o 2-hPG ≥11.1 mmol/L</i>	3,168 ± 1,017	3,120	1,15 – 5,86
Diagnosi di Diabete con HbA1c <i>HbA1c ≥ 48 mmol/mol</i>	2,919 ± 1,172	2,74	1,00 – 5,37
IFG e IGT <i>5,5 ≥ IFG <7,0 mmol/L e/o 7,8 ≥ IGT <11,0 mmol/L</i>	2,971 ± 0,8056	± 2,91	1,00 – 4,78
Condizione pre-diabetica con HbA1c <i>39 ≤ HbA1c <48 mmol/mol</i>	3,064 ± 0,8592	± 3,11	1,050 – 5,86
OGTT negativa <i>3,9 ≥ FPG <5,5 mmol/L e/o 2hPG <7,8 mmol/L</i>	3,073 ± 0,8514	± 3,1	0,72 – 5,63
HbA1c negativa <i>HbA1c ≤ 38 mmol/mol</i>	3,089 ± 0,8461	± 3,1	0,72 – 5,63

Tabella 4.4.2.3: Medie, Mediane e Intervallo di concentrazioni di LDL nei pazienti classificati in base ai criteri descritti.

Trigliceridi mmol/L	Media ± DS	Mediana	Intervallo
Diagnosi di Diabete con OGTT <i>FPG ≥7.00 mmol/L e/o 2-hPG ≥11.1 mmol/L</i>	1,403 ± 0,8347	± 1,120	0,57 – 6,090
Diagnosi di Diabete con HbA1c <i>HbA1c ≥ 48 mmol/mol</i>	1,389 ± 0,9995	± 1,10	0,57 – 6,090
IFG e IGT <i>5,5 ≥ IFG <7,0 mmol/L e/o 7,8 ≥ IGT <11,0 mmol/L</i>	1,203 ± 0,6062	± 1,010	0,29 – 4,46
Condizione pre-diabetica con HbA1c <i>39 ≤ HbA1c <48 mmol/mol</i>	1,231 ± 0,6124	± 1,020	0,29 – 4,46
OGTT negativa <i>3,9 ≥ FPG <5,5 mmol/L e/o 2hPG <7,8 mmol/L</i>	1,124 ± 0,4922	± 0,98	0,19 – 3,64
HbA1c negativa <i>HbA1c ≤ 38 mmol/mol</i>	1,137 ± 0,5101	± 0,99	0,19 – 3,64

Tabella 4.4.2.4: Medie, Mediane e Intervallo di concentrazioni di trigliceridi nei pazienti classificati in base ai criteri descritti

Anche per i valori di colesterolo totale, HDL e LDL non esiste nessuna differenza significativa tra medie ($p > 0,05$) dei soggetti in studio.

Relativamente ai trigliceridi, invece, si osserva una diminuzione progressiva delle concentrazioni in relazione ad una condizione diabetica, ad una condizione prediabetica e ad una condizione di normalità. Questo loro andamento è statisticamente significativo sia utilizzando l'OGTT sia con HbA1c, quale parametro diagnostico di diabete, anche se risulta essere più sensibile l'OGTT .

Trigliceridi mmol/L	T-Student $p < 0,05$	Trigliceridi mmol/L	T-Student $p < 0,05$
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> Vs <i>IFG e IGT</i>	0,0434	<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> Vs <i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i>	0,9297
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> Vs <i>OGTT negativa</i> <i>IFG e IGT</i>	0,0008	<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> vs <i>HbA1c negativa</i>	0,0110
<i>IFG e IGT</i> Vs <i>OGTT negativa</i>	0,0219	<i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i> Vs <i>HbA1c negativa</i>	0,0343

Tabella 4.4.2.5: Differenze significative tra le concentrazioni di trigliceridi in relazione al criterio di classificazione.

4.4.3 INSULINA e HOMA INDEX

<i>Insulina U/L</i>	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana</i>	<i>Intervallo</i>
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> <i>FPG ≥7.00 mmol/L e/o 2-hPG ≥11.1 mmol/L</i>	5.903 ± 0.660	4.39	2.00 - 61.10
<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> <i>HbA1c ≥ 48 mmol/mol</i>	4.925 ± 2.593	4.120	2.00 - 11.40
<i>IFG e IGT</i> <i>5,5≥ IFG <7,0 mmol/L e/o 7,8≥ IGT <11,0 mmol/L</i>	3.718 ± 2.499	3.00	2.00 - 17.30
<i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i> <i>39≤ HbA1c <48 mmol/mol</i>	4.674 ± 5.041	3.35	2.00 - 5.295
<i>OGTT negativa</i> <i>3,9≥FPG <5,5 mmol/L e/o 2hPG <7,8 mmol/L</i>	3.952 ± 3.652	2.9	2.00 - 50.10
<i>HbA1c negativa</i> <i>HbA1c≤38 mmol/mol</i>	3.862 ± 3.684	2.9	2.00 - 50.10

Tabella 4.4.3.1: Medie, Mediane e Intervallo di concentrazioni di insulina nei pazienti classificati in base ai criteri descritti.

<i>Insulina U/L</i>	<i>T-Student</i> <i>p< 0,05</i>	<i>Insulina U/L</i>	<i>T-Student</i> <i>p< 0,05</i>
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> <i>Vs</i> <i>IFG e IGT</i>	0.0017	<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> <i>Vs</i> <i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i>	0.2737
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> <i>Vs</i> <i>OGTT negativa</i>	0.0007	<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> <i>vs</i> <i>HbA1c negativa</i>	0.0027
<i>IFG e IGT</i> <i>Vs</i> <i>OGTT negativa</i>	0.1782	<i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i> <i>Vs</i> <i>HbA1c negativa</i>	0.0042

Tabella 4.4.3.2.: Differenze significative tra le concentrazioni di insulina in relazione al criterio di classificazione.

HOMA INDEX	Media ± dev.st	Mediana	Intervallo
Diagnosi di Diabete con OGTT <i>FPG ≥7.00 mmol/L e/o 2-hPG ≥11.1 mmol/L</i>	1.716 ± 1.659	1.32	0.48 – 14.39
Diagnosi di Diabete con HbA1c <i>HbA1c ≥ 48 mmol/mol</i>	1.530 ± 0.8998	1.227	0.5556 – 3.491
IFG e IGT <i>5,5 ≥ IFG <7,0 mmol/L e/o 7,8 ≥ IGT <11,0 mmol/L</i>	0.9988 ± 0.7538		0.4089 – 4.69
Condizione pre-diabetica con HbA1c <i>39 ≤ HbA1c <48 mmol/mol</i>	1.240 ± 1.261	0.9027	0.4089 – 14.39
OGTT negativa <i>3,9 ≥ FPG <5,5 mmol/L e/o 2hPG <7,8 mmol/L</i>	0.4045 ± 0.36		0.2578 – 2.493
HbA1c negativa <i>HbA1c ≤ 38 mmol/mol</i>	0.4018 ± 0.36		0.2578 – 2.493

Tabella 4.4.3.3: Medie, Mediane e Intervallo del HOMA INDEX nei pazienti classificati in base ai criteri descritti.

HOMA INDEX	T-Student p < 0,05	HOMA INDEX	T-Student p < 0,05
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> Vs <i>IFG e IGT</i>	< 0.0001	<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> Vs <i>Condizione pre-diabetica con HbA1c</i>	0.0650
<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> Vs <i>OGTT negativa</i>	< 0.0001	<i>Diagnosi di Diabete con HbA1c</i> vs <i>HbA1c negativa</i>	< 0.0001
<i>IFG e IGT</i> Vs <i>OGTT negativa</i>	< 0.0001	Condizione pre-diabetica con HbA1c Vs HbA1c negativa	< 0.0001

Tabella 4.4.3.4.: Differenze significative tra le concentrazioni del HOMA INDEX in relazione al criterio di classificazione.

4.5 CONFRONTO TRA I CRITERI BIOCHIMICI PER LA DIAGNOSI DI DIABETE, CONDIZIONE PRE-DIABETICA E CONDIZIONE DI NORMOGLICEMIA

Come evidente dalla tabella l'utilizzo dei valori di glicemia dell' OGTT permette di classificare un numero maggiore di soggetti diabetici rispetto all'utilizzo dei valori di HbA1c.

	<i>Diagnosi di Diabete</i> HbA1c \geq 48 mmol/mol	<i>Diagnosi di Diabete con OGTT</i> FPG \geq 7.00 mmol/L e/o 2-hPG \geq 11.1 mmol/L
Pazienti	33/498	91/498
	6,62%	18,27%

Tabella 4.5.1: OGTT vs HbA1c per la diagnosi di diabete

Per quanto riguarda la condizione di pre-diabete rilevata dalla presenza di IFG, IGT o di entrambe le situazioni oppure da valori di HbA1c compresi tra 39 - 48 mmol/mol, emerge che il test dell'HbA1c identifica una percentuale maggiore di persone rispetto all' OGTT per la condizione di alto rischio di sviluppare il diabete, essendo le percentuali di 40.16% vs 21.48% , rispettivamente

	<i>Condizione pre-diabetica</i> $39 \leq$ HbA1c < 48 mmol/mol	<i>Condizione pre-diabete</i> $5,5 \geq$ IFG $< 7,0$ mmol/L e/o $7,8 \geq$ IGT $< 11,0$ mmol/L
Pazienti	200/498	107/498
	40,16 %	21,48%

Tabella 4.5.2: OGTT vs HbA1c per identificare una condizione di pre-diabete

Nella popolazione studiata i pazienti con risultati negativi sono rispettivamente il 60,24% in caso di utilizzo dei valori di glicemia dell' OGTT e il 53,21% nel caso di utilizzo dell'HbA1c.

	<i>HbA1c negativa</i> <i>HbA1c ≤ 38</i> <i>mmol/mol</i>	<i>OGTT negativa</i> <i>3,9 ≥ FPG < 5,5 mmol/L</i> <i>e/o</i> <i>2hPG < 7,8 mmol/L</i>
Pazienti	265/498	300/498
	53,21%	60,24 %

Tabella 4.5.3: Pazienti normali in base ai criteri OGTT e ai criteri HbA1c

Per riassumere i risultati ottenuti si può utilizzare la percentuale di concordanza.

Considerando l' OGTT quale criterio di classificazione della popolazione si evidenzia quanto segue:

- 1) Nei 91 pazienti con OGTT diagnostico di diabete 24 (26,37 %) presentavano valori di HbA1c diagnostici di diabete, 59 (64,83 %) valori di HbA1c diagnostici di prediabete e 8 (8,79%) valori di HbA1c normali.
- 2) Dei 107 pazienti che presentavano una condizione di IFG o IGT oppure entrambe con OGTT 8 (7,47%) presentano valori di HbA1c diagnostici di diabete, 63 (58,87%) avevano valori di HbA1c diagnostici di pre-diabete e 36 (33,64%) presentano valori di HbA1c normali.
- 3) Dei 300 pazienti che presentavano una curva orale di glucosio nella norma, 1 (0,33%) presentava un valore di HbA1c diagnostico di diabete, 78 (26%) presentano valori di HbA1c diagnostici di pre-diabete e 221 (73,66) valori normali.

Poi, suddividendo la popolazione, utilizzando il parametro HbA1c:

- 1) Dei 33 pazienti che presentavano valori di HbA1c diagnostici di diabete, 23 (69,69%) presentavano un' OGTT diagnostico di diabete, 9 (27,27%) mostravano un' OGTT diagnostico di IFG e/o IGT, 1 (3,03%) mostrava una curva da carico orale di glucosio normale.
- 2) Dei 200 pazienti che presentavano valori di HbA1c diagnostici di pre-diabete 60 (30%) avevano un' OGTT diagnostico di diabete, 60 (30%) presentavano un' OGTT diagnostico di IFG e/o IGT, 80 (40%) avevano una curva da carico orale di glucosio normale.
- 3) Dei 265 pazienti con valori HbA1c normali, ma 8 (3,18%) di loro, però, presentavano un ' OGTT diagnostico di diabete, 38 (14,33%) avevano un'OGTT diagnostico di IFG e/o IGT e 219 (82,64%) una curva da carico orale di glucosio normale.

CAPITOLO 5

-DISCUSSIONE-

In questo studio osservazionale sono stati valutati 498 soggetti, 194 uomini e 304 donne, con un'età compresa tra 4 mesi e i 88 anni, pervenuti presso l'ambulatorio di via San Massimo con richiesta di curva da carico (gr 75) di Glucosio a 2 tempi (0' e 120').

Il 95% dei soggetti in studio è di etnia caucasica e quindi i risultati di tale studio possono essere riferibili solo ai soggetti di razza caucasica. Infatti è stato riportato che i valori di HbA1c sono più alti nella la popolazione Africana-Americana, negli Ispanici e Asiatici rispetto alla popolazione di razza caucasica anche dopo aver corretto i dati per età, sesso, BMI, durata del diabete, uso di farmaci, media delle glicemie a digiuno, media delle glicemie postprandiali, insulino resistenza e disfunizione β cellulare .

Dal questionario utilizzato per ottenere i dati anamnestici dei pazienti emerge che nessuno presentava quelle condizioni note dalla letteratura che possano influenzare in modo significativo le concentrazioni di HbA1C.

Il nostro studio non ha quindi considerato soggetti con iperbilirubinemia, con varianti emoglobiniche, che assumevano farmaci che possono alterare l'eritropoiesi, né affetti da malattie quali HIV e anemia emolitica che interferiscono appunto con il dosaggio dell' HbA1C.

E' interessante notare come la popolazione di questo studio è caratterizzata dalla presenza di fattori di rischio per il diabete, a riprova dell'appropriatezza da parte del medico di medicina generale nella richiesta della curva da carico orale di glucosio.

In particolare l'attività fisica (almeno 1 volta alla settimana) la svolge solo il 33.33 % (N= 166) dei soggetti in studio. Inoltre per quanto riguarda le

patologie che predispongono al diabete, bisogna segnalare che il 24 % (N= 120) dei pazienti riferisce problemi di dislipidemia, il 29% (N= 145) di ipertensione e il 10% (N = 50) di malattie cardiovascolari.

Per quanto riguarda i fattori di rischio, in particolare riguardo all'ipertensione, essa è risultata più frequente nei pazienti diabetici (classificandoli in base all' OGTT) rispetto ai pazienti con IFG, IGT ed ai controlli non diabetici (50.54% vs 41.07% vs 44.73 % a 38.46% vs 18.36%)

Invece, utilizzando per la diagnosi di diabete l'HbA1C non vi è una sostanziale differenza tra la condizione di diabete e prediabete , infatti le percentuali sono rispettivamente del 42.42% e del 46.00%.

In questo lavoro i risultati dell' HbA1c sono espressi in mmol/mol come è previsto dalle ultime linee guida; tuttavia esprimiamo la concentrazione dell'HbA1c in % quando la riferiamo alla letteratura precedente alle linee guida.

Tali risultati sembrano evidenziare che i criteri basati sull' OGTT possano identificare un maggior numero di soggetti diabetici e ipertesi rispetto a quelli basati sull' HbA1C.

Dall'altra parte, se consideriamo, la dislipidemia l'utilizzo dell' HbA1c quale parametro per la diagnosi di diabete permette di identificare un maggior numero di pazienti diabetici e dislipemici rispetto all'utilizzo dell' OGTT (45,45%, vs 36,26%). Tale comportamento si evidenzia anche quando si considera la diagnosi di diabete nei soggetti che riferiscono malattia cardiovascolare.

Analizzando i parametri ematochimici valutati nella popolazione in studio si evidenzia che tutti i soggetti mostrano valori normali di creatinemia senza differenza significativa tra i tre gruppi.

Stesso riscontro si evidenzia nell'analisi dei livelli di colesterolo totale, HDL e LDL.

I livelli di trigliceridi sono invece più elevati nei soggetti diagnosticati come diabetici.

Nell'analisi dei risultati relativi al confronto fra utilizzo di OGTT e di HbA1c nella diagnosi di diabete si evidenzia come nella popolazione in studio, caucasica, con fattori di rischio per diabete e senza alterazioni che possano inficiare l'attendibilità del dosaggio dell'HbA1C, l'utilizzo dell'OGTT identifica un numero maggiore di casi rispetto all'utilizzo dell'HbA1C (18.27% (N=91) vs 6.62% (N=33)).

Inoltre in questa corte di popolazione italiana caucasica, la concordanza tra il diabete diagnosticato da FPG e/o 2hPG e da HbA1c è relativamente bassa. Nel presente lavoro, infatti, 73.62% degli individui classificati come diabetici da una FPG e/o 2hPG potrebbero essere considerati non diabetici secondo i criteri HbA1c.

Mentre, il 30,30% dei pazienti classificati diabetici con HbA1c risulterebbero non diabetici secondo i criteri di FPG e/o 2hPG.

In questo contesto dobbiamo segnalare che gli studi pubblicati recentemente sono discordanti.

Analizzando la recente letteratura si nota come Ng et. altri hanno analizzato i dati sia di OGTT che di HbA1c di 272 pazienti per un periodo di 2 anni: l'80.1% di loro aveva 2hPG superiore a 11.00 mmol/L e i valori di HbA1c \geq 6,0% , il che significa che il 19,9% dei pazienti positivi all' OGTT aveva valori di HbA1c che non erano diagnostici per il diabete in base alle nuove linee guida [84]. In questo lavoro, però, non si menziona il metodo utilizzato per il dosaggio dell' HbA1c.

In una popolazione olandese, Riet et altri, nello studio “ New Hoorn Study” hanno analizzato 2753 partecipanti e hanno dimostrato che l'utilizzo di HbA1c \geq 6,0% come criterio diagnostico di diabete non identifica quasi la metà delle persone con livelli di glucosio diagnostici di diabete. Come cut-off per lo screening di diabete è stato utilizzato un valore dell' HbA1c di

5,8% (sensibilità del 72%, specificità 91%), analizzato con un metodo DCCT: questo valore dovrebbe rilevare il 72% dei pazienti con diabete e il 30% di casi ad alto rischio di sviluppare il diabete [85].

Quando i pazienti dello studio Rancho Bernardo,(suddivisi per età e sesso) furono analizzati, la sensibilità e la specificità dell' HbA1c con cut-off di 6,5% furono del 44% e 79% rispettivamente. Ponendo il 6,5% come cut-off , l'85% dei soggetti con $HbA1c \geq 6,5\%$ non erano classificati come diabetici in accordo con i criteri ADA e un terzo dei soggetti con diabete, secondo i criteri ADA, non erano classificati diabetici per i loro livelli di HbA1c, dando luogo a una significativa proporzione di misclassificazione [86].

Questi risultati sono simili a quelli della relazione NHANES, includendo lo screening dal 1999 al 2004 [87]. Tuttavia, una pubblicazione più recente sulla popolazione NHANES, dal 1999 al 2006, riporta risultati migliori [88].

In effetti, la prevalenza di diabete non diagnosticato in questa popolazione è stata del 2,3% con HbA1c e del 3,6% con glicemia a digiuno:così HbA1c concorda con la classificazione della glicemia a digiuno nel 97,7% dei casi. Discrepanze nella diagnosi di diabete, usando HbA1c o la glicemia plasmatici a digiuno, sono dovute a differenti aspetti del metabolismo del glucosio, ad esempio, rispetto ai soggetti che presentano un $HbA1c < 6,5\%$ e una glicemia a digiuno $\geq 7,0$ mmol / L, quelli con $HbA1c > 6,5\%$ e la glicemia a digiuno $\leq 7,0$ mmol / L sono più giovani e più frequentemente neri non ispanici. Questo può anche spiegare le differenze nei risultati riportati nello studio precedente [84]. Buoni risultati sono stati pubblicati anche da Lu et al. [89], che hanno riportato una buona sensibilità nelle due popolazioni australiane che essi hanno valutato.

Emergono, poi, risultati interessanti dagli studi che analizzano l'impatto della razza sulla classificazione del diabete utilizzando HbA1c e la

glicemia (a digiuno e dopo 2 ore dal carico orale di glucosio). Per la popolazione Asiatica-Indiana, l'HbA1c con un cut-off compreso tra 6,1% (sensibilità 88%, specificità 87,9%) e 6,4% (sensibilità 93,3%, specificità 92.3%) risulta ideale per identificare nuovi pazienti diabetici. [90].

In una popolazione cinese (2332 soggetti, di età compresa tra i 35 – 74 anni) con il cut-off di per diagnosi di diabete di 6,5% per HbA1c,, è emerso che vi era una sensibilità, inferiore del 30% sia negli gli uomini che nelle donne, più bassa rispetto a quella del glucosio plasmatico. .In effetti, il cut-off ottimale per rilevare il diabete era un valore di HbA1c pari a 5,6%, significativamente inferiore rispetto a quello proposto dalle nuove raccomandazioni dell'ADA [91]. In questo contesto, un'analisi approfondita dell'indagine NHANES dagli anni 1988-2006 ha mostrato che un aumento della prevalenza del diabete diagnosticato dal 1988, mentre la percentuale di diabete non diagnosticato è diminuita, come pure anche la prevalenza di soggetti ad alto rischio di sviluppare il diabete. Tuttavia, seppur queste ultime due situazioni rimangono comuni negli Stati Uniti, soprattutto in gruppi di anziani minoranze etniche.. Quindi il fatto che HbA1c rileva una prevalenza molto più bassa di diabete ai livelli di glucosio plasmatico deve essere sottolineata [92]. Un metodo HPLC è stato usato per misurare HbA1c nei suddetti studi.

Un'analisi su sei studi condotti dal 1999-2009 in Danimarca, Regno Unito, 'Australia, Groenlandia, Kenya e India, ha riportato una probabilità compresa tra 17-78% che i livelli di HbA1c $\geq 6,5\%$ siano presenti tra i casi di diabete diagnosticati in base all' OGTT, e quattro di questi sei studi hanno evidenziato una più bassa prevalenza di diabete quando come criterio diagnostico è stata utilizzata l' HbA1c. Sebbene le differenze metodologiche possano aver influenzato i risultati, il grande impatto della razza sulle differenti procedure di screening deve essere chiarito [93].

L'analisi del gruppo Leicester Ethnic Atherosclerosis and Diabetes Risk (LEADER) ha mostrato che l'uso di HbA1c come test diagnostico aumenta notevolmente il numero di soggetti diabetici, in particolare nelle popolazioni del sud dell'Asia. D'altra parte, circa un terzo, però, delle persone precedentemente identificate diabetiche mediante OGTT non erano diabetiche con HbA1c [94].

A causa del gran numero di persone con diabete non diagnosticato, sono state raccomandate, da diverse organizzazioni, procedure di screening al fine di ridurre l'impatto della malattia; una recente analisi costo-efficacia ha dimostrato che è conveniente fare uno screening in età compresa tra i 30 e i 45 anni, e ripetendo il test ogni 2-5 anni [95]. Non vi è alcun accordo in merito alla procedura di screening migliore, e comunque, uno screening comune, secondo le raccomandazioni ADA, è giudicato inefficiente, in quanto presenta una bassa specificità nella diagnosi di diabete [96,97]. L'uso di punteggi di rischio sulla base delle caratteristiche fenotipiche per identificare le persone a rischio di diabete nella popolazione caucasica non può essere estesa ad altri gruppi etnici (98).

Uno studio, che ha valutato la validità predittiva di HbA1c, ha rilevato che tale test, proposto come criterio diagnostico, non è abbastanza sensibile e risulta essere razza-dipendente [99]; le stratificazioni sulla base del rischio migliorano l'efficacia dello screening per il diabete, ma l'algoritmo clinico per la valutazione del rischio deve essere convalidato, così come il rapporto costo-efficacia di tale approccio [100].

A tale riguardo, un recente studio di Olson et al. [101] (basato su tre serie di dati, in soggetti di razza bianca-non ispanica e nera-non ispanica, i quali erano non conosciuti per avere il diabete, e sottoposti al dosaggio del HbA1c e OGTT) ha evidenziato chiaramente che le raccomandazioni di screening, sia quelle proposte dal Comitato Internazionale di Esperti [82] che quelle basate sui criteri ADA [102], presentano delle limitazioni;

infatti una elevata specificità ma bassa sensibilità sono un riscontro comune, insieme ad una imprecisione intrinseca anche quando cut-off diversi sono stati utilizzati, oltre che discrepanze evidenti se applicate a diversi gruppi razziali. I nostri dati sono in accordo con quelli di dello studio Rancho.

Per quanto riguarda la condizione di prediabete dai nostri dati emerge che l'utilizzo dell' HbA1c permette di identificare un numero maggiore di soggetti affetti da prediabete rispetto all' OGTT (40,16% vs il 21,48%).

Il Comitato Internazionale di Esperti ha utilizzato la retinopatia come outcome per la definizione del livello di HbA1c da considerare come diagnostici per il diabete, basandosi su studi epidemiologici su Indiani Pima, egiziani e sulle popolazioni NHANES. In questi studi è stato dimostrato che la prevalenza di retinopatia aumentava notevolmente con valori di HbA1c passando dal 6% al 7% [103]. Inoltre, la recente analisi elaborata dallo studio DETECT-2 ha dimostrato, utilizzando l'analisi della curva ROC, che il cut-off ottimale per rilevare la retinopatia era un HbA1c di 6,5% [82]. La relazione tra HbA1c e macroangiopatia, una complicanza molto nota e preoccupante del diabete, risulta ancora poco chiara. Mentre alcuni studi hanno non trovato nessuna relazione tra queste due variabili, altri studi, invece, hanno evidenziato la capacità di predire la malattia cardiovascolare solo per valori $\geq 6,5\%$, e solo nelle donne [104,105]; alcuni studi prospettici, poi, hanno descritto un rapporto positivo e continuo tra i livelli di HbA1c e malattie cardiovascolari [106]; A tale riguardo, un recente studio di Selvin et al. (basato su un follow-up tra 6 - e 16 anni di soggetti non diabetici), ha dimostrato che HbA1c è associato alla diagnosi di diabete nello stesso modo della glicemia a digiuno, e ancor più , però, fortemente associata con il rischio di malattie cardiovascolari e morte per qualsiasi altra causa [107]. Va sottolineato, tuttavia, che HbA1c è stata misurata in campioni di sangue intero che era stato congelato per più di 10

anni e con un saggio DCCT standardizzato, sebbene la tracciabilità al metodo DCCT standardizzato sia applicata solo ai campioni di sangue fresco [108].

Altri studi, quindi, risultano necessari per confermare questo rapporto; inoltre, come dimostrato anche da una recente analisi post hoc dello studio ACCORD [109], in questa complicanza diabetica, oltre alla glicemia, sono coinvolti altri fattori di rischio.

Il comitato internazionale di esperti, prendendo atto di come il rischio continuo dello sviluppo del diabete è stato dimostrato sia considerando le misurazioni del glucosio che i livelli di HbA1c, identifica le persone con livelli di HbA1c tra 6,0% e 6,4% come ad alto rischio di sviluppare la malattia e raccomanda che queste persone debbano ricevere chiari interventi efficaci di prevenzione, ma non sono disponibili informazioni sulle caratteristiche metaboliche di questa classe ad alto rischio.

Uno studio, condotto da Lorenzo et al [110], che coinvolge 855 soggetti partecipanti allo Studio Insulin Resistance Atherosclerosis, ha dimostrato che HbA1c è meno sensibile della glicemia a digiuno e/o dell'OGTT nel rilevare soggetti ad alto rischio di sviluppare diabete, e che ha una più bassa correlazione con insulino-resistenza e la secrezione dell'insulina rispetto alla glicemia a digiuno o al prelievo dopo 2 ore dal carico orale di glucosio..

Deve essere confermata la possibilità che la coerenza tra glicemia plasmatica e HbA1c sia allo stesso livello di concordanza tra la glicemia a digiuno e quella a 2 ore dopo il carico orale di glucosio, come dimostrato dallo studio DECODE.

Inoltre, è stata aggiunta una classe a basso rischio di sviluppare la malattia, rappresentata persone che hanno un valore al di sotto del valore soglia di 6,0%.

Ma, qual'è il pericolo reale dello sviluppo della patologia, nel futuro, in queste due nuove popolazioni a rischio di sviluppare il diabete?

Recenti studi hanno riportato un rischio maggiore di sviluppare il diabete a livelli glicemici inferiori a quelli considerati normali [111,112]. Una recente revisione di sette lavori della letteratura, che avevano esaminato l'incidenza del diabete in un intervallo di livelli di HbA1c compresi tra 5% e 6,5%, ha mostrato che i livelli di HbA1c tra 6,0% e 6,5% sono associati ad un 25-50% di sviluppo di diabete in 5 anni, mentre i livelli tra 5,5% e 6,0% sono associati ad una incidenza del 9-25%, e livelli tra 5,0% e 5,5% ad un'incidenza inferiore al 9% [113]. La revisione non ha confrontato le potenziali differenze nell'incidenza di diabete associate con test diagnostici differenti (es. HbA1c, glicemia a digiuno, OGTT), così studi ulteriori saranno necessari per stabilire se HbA1c sia più adatto per prevedere il diabete rispetto agli altri test attualmente utilizzati.

Considerando i valori medi dell'insulinemia in rapporto ai diversi criteri diagnostici utilizzati, l'utilizzo dell' HbA1c permette di identificare un numero maggiore di soggetti con livelli di insulinemia elevato. Infatti valori medi dell'insulinemia risultano significativamente più elevati nei primi (HbA1c) rispetto ai secondi (IGT e IFG). 3.178 U/L vs 4.674 U/L. Tali risultati sono confermati dall'analisi dell'HOMA index che risulta essere significativamente più elevato nei soggetti diagnosticati prediabetici con HbA1C rispetto ad OGTT (1.240 vs 0.9988).

I nostri risultati mostrano quindi che l'utilizzo dell'HbA1C identifica soggetti prediabetici caratterizzati da una evidente insulino resistenza.

CAPITOLO 6

-CONCLUSIONI

Dai nostri risultati è quindi emerso che l'OGTT ha un maggior potere discriminante nella diagnosi di diabete; infatti l'HbA1c misclassifica l'11% circa dei soggetti valutati.

L'HbA1c risulta invece più sensibile nel diagnosticare una condizione prediabetica e quindi una popolazione più insulino resistente rispetto a quella classificata affetta da IGT e IFG con l' OGTT.

Prendendo comunque in considerazione i nostri risultati e quanto emerge dai dati di letteratura, allo stato attuale, la mancanza di un'analisi costo-benefici,, la limitata disponibilità del dosaggio nei paesi meno sviluppati, gli studi epidemiologici che mostrano un numero minore di persone che vengono con diagnosticate diabetiche con l'utilizzo di questo parametro, e la variabilità razziale, rendono difficile usare HbA1c per la diagnosi di diabete in tutto il mondo. Inoltre, la procedura di standardizzazione del dosaggio HbA1c che è ben codificata in alcuni paesi, non lo è in altri , dove in controlli di qualità esterni non sono obbligatori.

Perciò si ritiene di scoraggiare l'uso di HbA1c per la diagnosi di diabete, a meno non vengano escluse le co-morbidità che possono inficiare il valore dell'HbA1c , e che il metodo sia standardizzato IFCC e/o allineato NGSP . Il test HbA1c non deve essere utilizzato per la diagnosi del diabete in gravidanza (114)

Tuttavia l'uso di HbA1c per escludere il diabete in soggetti a rischio di sviluppare la malattia potrebbe ridurre significativamente il numero di altri tests (ad esempio, OGTT) con il risultato di una migliore sensibilità e specificità diagnostica (purché il dosaggio sia standardizzato). Vale anche la pena notare che HbA1c può essere maggiore in persone "normali" (FPG

<126 mg / dl e 2 h OGTT <140 mg / dl), o con un profilo alterato di glucosio (115), suggerendo che potrebbe essere un marcatore precedente di disglicemia (glicemia a digiuno o OGTT).

Infine è utile sottolineare che . sarebbe opportuno utilizzare un solo test per la diagnosi di diabete in tutto il mondo, perché questo consentirebbe un miglior confronto dei dati epidemiologici; ciò però non è al momento fattibile alla luce di quanto su detto. Comunque si raccomanda che nei pazienti sottoposti a diagnosi di diabete venga utilizzato un unico test (per es. FPG),il cui valore va riconfermato in modo da evitare le difficoltà di interpretare i risultati di test diversi, che al momento attuale hanno dimostrato differenti sensibilità e per HbA1c, una standardizzazione analitica condivisa a livello mondiale.

CAPITOLO 7

Bibliografia

- 1) Ebbel, B. The papyrus Ebers: Copenhagen and Oxford. Oxford University Press; 1937: 115.
- 2) Pickup, J. and William, G. : Textbook of Diabetes. 2nd ed., Vol-1 London : Blackwell science; 1997 : 3 – 10.
- 3) Sanders, L.J. From Thebes to Toronto and the 21st century: An incredible journey. Diabeters Spectrum 2002; 15: 56-60.
- 4) Leopald, E.J. Aretaeus the cappadocian. Ann.med. Hist. 1930; 2: 424 – 455
- 5) Henschen, F. On the term Diabetes in the wotk of Aretaeus and galen. Med. Hist. 1969; 13 : 190 – 192.
- 6) Atretaeus : On Diabetes, The extant work, Edited and translated by F. Adams, London Sydenham society; 1856: 338 – 339.

- 7) Aretaeus C: On causes and symptoms of chronic diseases, Translated by Adams CF; London (UK), London Sydenham society; 1856 : 138.
- 8) Galen, Om sjukdomarnas lokalisation, translated by A. Renander, Stockholm; 1960: N.A.
- 9) Hamid Ali, Mohd. Anwar, Tanzeel Ahmad, Nagma Chand : Diabetes Mellitus from Antiquity to present Scenario and Contribution of Greco-Arab Physicians. JISHIM 2006, 5 : 46-50.
- 10) Wills T. Pharmaceutice rationals : or, an exercitation of the operations of medicines bodies, in his practice of physick, London, During, 1684; sect 3: chapt. 3.
- 11) Farmer L. Notes on the history of diabetes Mellitus. Bulletin of New York Academy of Medicine. 1952; 28 : 408- 416.
- 12) Mann RJ. Historical vignette : Honey urine to pancreatic Diabetes 600BC-1922AD. Mayo clinic proceedings. 1971; 46: 56-58.
- 13) Paton A. The English Diabetes (1674-1877). St. Thomas hosp. Gaz. 1954; 52: 189- 191.

- 14) Macleod JJR and Banting FG. The antidiabetic functions of pancreas and successful isolation of the antidiabetic hormone-insulin; St. louis: CV Mosby Company; 1923: 7.
- 15) Dobson M. Experiments and observations on the urine on Diabetes. Med. Obs.inq. 1776; 5:298-316.
- 16) Rollo J. Causes of the Diabetes Mellitus. 2nd edi. London : C. Dilly; 1798
- 17) Rollo J. An Account of the two cases of Diabetes Mellitus, with remarks as they arose during the progress of the cure. London : C. Dilly; 1797.
- 18) Chevreul ME. Note sur le sucre de diabetes. Ann.Chim. 1815; 95: 319-320
- 19) Lancereaux E. Notes et reflexions a propos de deux cas de diabete sucre avec alteration du pancreas. Bull. Acad. Med. Paris. 1877; 6: 1215 – 1240.
- 20) Von Mering J. and O. Minkowski. Diabetes mellitus nach pankreasextirpations. Arch. Path. Pharmak. 1889-1890; 26 : 371 – 387.
- 21) Minkowski O. Die Lehre vom pancreas – Diabetes in ihrer geschichtlichen Entwicklung. Munch. Med. Wschr. 1929; 76: 311 – 315.

- 22) Editorial : Oscar Minkowski (1858 – 1931):designer of experimental diabetes. JAMA. 1967; 199 : 754-755
- 23) Langerhans P. Beitrag zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse : Inaugural dissertation. Berlin : Gustave Lange; 1869.
- 24) Laguesse GE. Sur la formation des îlots de Langerhans dans le pancréas. C.R. Soc. Biol ; Paris. 1893; 45 : 819 – 820.
- 25) Meyer JD. Sur la signification physiologique de la sécrétion interne du pancréas. Zbl physiol. 1904; 18 : 826.
- 26) Padfield CI. A review of the history of the treatment of Diabetes Mellitus and the search for oral hypoglycaemic agents. Guy. Hosp. Rep. 1964; 113 : 45 – 54.
- 27) Opie EL. The relation of Diabetes Mellitus to lesions of the pancreas : hyaline degenerations of the island of Langerhans. 1901; 5 : 527 – 540.
- 28) Barron M. The relation of the islets of Langerhans to Diabetes with special reference to cases of pancreatic lithiasis. Sur. Gynec. Obstet. 1920; 31 : 337 – 448.
- 29) Banting FG. And Best CH. The internal secretion of the pancreas. J. Lab. Clin. Med. 1922; 7 : 251 – 266.
- 30) Banting FG: The history of insulin. Edinburg med. J. 1929; 36 :1-18.

- 31) H.G. Kunkel e G. Wallenius New Hemoglobin in normal Adult Blood,
Science , 1955: Vol 122 : 288.
- 32) Allen DW, Schroeder WA, Balog J. Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human haemoglobin : a study of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. J. Ann. Chem. Soc. 1958; 80 : 1628 – 34
- 33) Holmquist WR, Schroeder WA. The in vitro biosynthesis of hemoglobin A_{1c}. Biochemistry 1966; 5 : 2489 – 503.
- 34) Bookchin RM, Gallop PM. Structure of of hemoglobin A_{1c} . : nature of the N-terminal β chain blocking group. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968; 32 : 86 – 93.
- 35) Rahbar S. Ab abnormal haemoglobin in red cells of diabetes. Clin. Chin. Acta 1968; 22 : 296 – 298
- 36) Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual haemoglobin in patients with diabetes mellitus. Biochim Biophys Res Commun 1969; 36: 838 – 843.
- 37) Bunn HF, Haney DN, Gabbay KH, Gallop PM. Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in Hemoglobin A_{1c} . Biochem Biophys Res Commun 1975 ; 64 :103-109.

- 38) Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM. The Biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation of haemoglobin in vivo. *J. Clin. Invest.* 1976; 57 : 1652 – 1659.
- 39) Bunn HF, Shapiro R, McManus M , et al. Structural heterogeneity of human haemoglobin A due nonenzymatic glycosylation. *J. Biol. Chem* 1979; 254 : 3892 – 8
- 40) Shapiro R, McMannus MJ, Zolut C, et al. Sites of nonenzymatic glycosylation og human haemoglobin. *J Biol Chem* 1980; 255 : 3120 – 7.
- 41) Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM. The glycosylation of haemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978; 200 : 3120 – 7.
- 42) Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 1984; 259 : 3812 – 17
- 43) Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA, et al. Role of Igycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes* 1991; 40 : 101 – 5.
- 44) Charonis AS, Tsilibary EC, Structural and functional changes of laminin and type IV collagen after nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1992; 41 : 49 – 54.

- 45) Krishnamurti U, Rondeau E, Sraer JD, et al. Alterations in human glomerular epithelial cells interacting with nonenzymatically glycosylated matrix. *J Biol Chem* 1997; 272: 27966-70
- 46) McDonal MJ, Bleichman M, Bunn HF, et al. Functional properties og glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 702 – 7.
- 47) Samaja M, Melotti D, Carenin A, et al. Glycosylated hemoglobins and the oxygen affinity of whole blood. *Diabetologia* 1982; 23: 399-402.
- 48) Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL; Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1976; 295: 417 -20.
- 49) Gabbay KH, Hasty F, Breslow JL, Ellisin RC, Bunn HF, Gallop PM, Glycosylated haemoglobins and long term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocr Metab* 1977; 44: 859-64.
- 50) Fraser CG, Hytoft Peterson P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* 1999; 45 : 321-3
- 51) Ricòs C, Alvarez V, Cava F, et al. Current database on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Inves* 1999; 59: 491-500

- 52) Rohlfig C, Wiedmeyer HM, Little R, et al. Biological variation of glucomemoglobin. *Clin Chem* 2002; 48:1116 – 8.
- 53) Mosca A, Lapolla A, Franzini C. La determinazione dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) nel sangue: raccomandazioni. *Biochim Clin* 2000; 24: 183-8.
- 54) Goodall I, Colman PG, Schneider HG, et al. Desirable performance standards for “HbA_{1c}”. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1083-97.
- 55) Gepts W. Pathological anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1965; 14: 619-33.
- 56) Platz P, Jakobsen BK, Morling M, et al. HLA-D and DR-antigens in genetic analysis of insulin – dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1982; 21: 108-15
- 57) Todd JA, Bell JI, McDevitt HO: HLA DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329: 599-604.
- 58) Gambelunghe G, Ghaderi M, Cosentino A, et al. Association of MHC class I chain –related A (MIC-A) gene polymorphism with type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43: 507 – 14.
- 59) Gambelunghe G, Ghaderi M, Tortoioli C, et al. Two distinct MICA gene markers discriminate major autoimmune diabetes types. *J clin Endocrinol Metab* 2001; 86 : 3754-60.

- 60) Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K et al. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA- identical siblings by bone marrow transplantation . Lancet 1993; 341 : 1243-4
- 61) Vialettes B, Maranichi D. Transfer of insulin – dependent diabetes between HLA- identical siblings by bone marrow transplantation. Lancet 1993; 342: 174.
- 62) Bottazzo GF, Florin- Christensen A, Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. Lancet 1974; (7892): 1279- 83.
- 63) MacCuish AC, Barnes EW, Irvine WJ, et al. Antibodies to pancreatic islet-cells in insulin-dependent diabetes with coexistent autoimmune disease. Lancet 1974; 2(7896): 1529-31.
- 64) Stephen lillioja, Andrew A Young, Carol L. Culter , et al. Skeletal Muscle Capillary Density and Fiber Type are possible determinations of in vivo insulin Resistance in Man. The Journal of Clinical Investigation , Inc, 1987; 80: 415 – 424
- 65) Willi C., Bodenmann P., Ghali WA, Faris PD, Cornuz J: Active Smoking and Risk of type 2 Diabetes. A Systematic review and meta-analysis. JAMA; 2007; 298- 22: 2654-2664.
- 66) Pagano G, Cavallo-Perin P. Cassader M, Bruno A, Ozzello A, Fasciola P. An in Vivo and in Vitro Study of Mechanism os Presnisone-induced Insulin resistance in Healthy Subjects. J. Clin. Invest. 1983; 72: 1814-1820.

- 67) Sladek R, Rocheleau G, Rung Johan , et. Al. A genome –wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 2007; 445: 881-885.
- 68) Unger RH: lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes*, 1995; 44: 863-870.
- 69) Luppi R, Dotta F, Marselli L, et. Al prolonged Exposure to free fatty Acid has Cytostatic and Pro- Apoptotic Effects on Human Pancreatic Islet. *Diabetes*, 2002; 51: 1437:1442.
- 70) Marchetti P, Dotta F, lauro D, Purrello F An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regulatory Peptides* ,2008; 146: 4-11.
- 71) McAuley KA, Williams Sm, Mann JI, et. Al. Diagnosis Insulin Resistance in the General Population. *Diabetes Care*,2001; 24: 460-464.
- 72) Chen H, Sullivan G and Quon MJ Assessing the Predictive Accuracy of Quichy as a Surrogate Index for Insulin Sensitivity Using a Calibration Model. *Diabetes Care*, 2005; 54: 1914: 1925.
- 73) DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977–86.

- 74) 74) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837–53.
- 75) Krishnamurti U, Steffes MW. Glycohemoglobin: a primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2001; 47: 1157-65
- 76) Tahara Y, Shima K, The response of Ghb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. *Diabetes Care* 1993; 16: 1313-4.
- 77) National Committee for Quality Assurance
<http://web.ncqa.org/tabid/130/Default.aspx>.
- 78) Salvagno GL, Lippi G, Targher G, et. Al. Monitorino glicemico control : is the evidence for appropriate use of routine measurement of glycated hemoglobin? *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1065-67
- 79) Park S, Barrett-Connor E, Wingard DL, et. Al. Ghb is better predictor of cardiovascular disease than fasting or postchallenge plasma glucose in women without diabetes. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1996; 19: 450-6
- 80) Khaw KT, Wareham N, Luben R, et. Al. Glycosylated haemoglobin, diabetes and mortality in men Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). *Br Med J* 2001; 322: 15-8

- 81) Khaw KT, Wareham N, Bingham S, et. Al. Association of hemoglobin A_{1c} with cardiovascular disease and mortality in adults: The European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk. *Ann. Inter Med* 2004; 141 : 413- 20.
- 82) International Expert Committee. International Export Committee on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 1327-1334.
- 83) Diagnosis and classification of Diabetes mellitus: *Diabetes Care* 2010; 33:S62-S69.
- 84) Ng JM, Dawson AJ, Cox H, Atkin SL, Kilpatric ES. New recommendations in diagnosis of diabetes mellitus from the Department of Health: comparing the old and new. *Diabetic Medicine* “Accepted article”; doi: 10.1111/j.1464
- 85) Van’r Riet E, Alsema M, Rijkelijkhizen JM, Kostense PJ, Nijpels G, Dekker JM. Relationship between A1c and glucose levels in the general Dutch population. *Diabetes Care* 2010;33:61-6.
- 86) Kramer CK, Araneta MRG, Barrett-Connor E. A1c and diabetes diagnosis: the Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 2010;33:101-3.
- 87) Buell C, Kerman D, Davidson MB. Utility of A1c for diabetes screening in the 1999-2004 NHANES population. *Diabetes Care* 2007;30:2233-5.

- 88) Carson AP, Reynolds K, Fonseca VA, Munter P. Comparison of A1c and fasting glucose criteria to diagnose diabetes among U.S. adults. *Diabetes Care* 2010;33:95-7.
- 89) Lu ZH, Walker KZ, O'Dea K, Sikaris KA, Shaw JE. A1C for screening and diagnosis of type 2 diabetes in routine clinical practice. *Diabetes Care* 2010;33:817-9.
- 90) Mohan V, Vijayachandrika V, Gokulakrishnan K, Anjana RM, Ganesan A, Weber MB, et al. HbA1c cut points to define various glucose intolerance groups in Asian Indians. *Diabetes Care* 2010;33:515-9.
- 91) Zhou X, Pang Z, Gao W, Wang S, Zhang L, Ning F, et al. Performance of HbA1c and fasting capillary blood glucose test for screening newly diagnosed and pre-diabetes defined by OGTT in Quigdao, China. *Diabetes Care* 2010;33:545-50.
- 92) Cowie C, Rust K, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS, et al. Prevalence of diabetes and risk for diabetes using hemoglobin A1c criteria in the U.S. population in 1998-2006. *Diabetes Care* 2010;33:562-8.
- 93) Christensen DL, Witte DR, Kaduka L, Jorgensen ME, Borch-Johnsen K, Mohan V, et al. Moving to an HbA1c based diagnosis of diabetes has a different impact on prevalence in different ethnic groups. *Diabetes Care* 2010;33:580-2.

- 94) Mostafa SA, Webb D, Gray LJ, Srinivasan BT, Jarvist J et al. The potential impact of using glycated haemoglobin as the preferred diagnostic tool for detecting type2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2010;27:762-9.
- 95) Kahn R, Alperin P, Eddy D, Borch-Johnsen K, Feigelman J, Gregg E et al. Age at initiation and frequency of screening to detect type 2 diabetes: a cost-effectiveness analysis. *Lancet* 2010;375:1365-74.
- 96) Rolka DB, Narayan KMV, Thompson TJ, Goldman D, Lindenmayer J, Alich K et al. Performance of recommended screening tests for undiagnosed diabetes and dysglycemia. *Diabetes Care* 2001;24:1899-903.
- 97) Tabaei B, Burke R, Constance A, Hare J, May-Aldrich G, Parker SA et al. Community-based screening for diabetes in Michigan. *Diabetes Care* 2003;26:668-70.
- 98) Glümer C, Vistisen D, Borch-Johnsen K, Colagiuri S on Behalf of the DETECT-2 Collaboration. Risk scores for type 2 diabetes can be applied in some population but not all. *Diabetes Care* 2006;29:410-4.
- 99) .99) Olson DE, Rhee MK, Herrick K, Ziemer DC, Twombly JG, Phillips LS. Screening for diabetes and prediabetes with proposed A1c-based diagnostic criteria. *Diabetes Care* 2010; publish ahead of print

- 100) Ginde AA, Cagliero E, Nathan DM, Camargo CA. Value of risk stratification to increase the predictive validity of HbA1c in screening for undiagnosed diabetes in the US population. *J Gen Intern Med* 2008;23:1346-7.
- 101) Olson DE, Rhee MK, Herrick K, Ziemer DC, Twombly JG, Phillips LS. Screening for diabetes and pre-diabetes with proposed A1c-based diagnostic criteria. *Diabetes care* 2010;33:2184-9.
- 102) American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2010. *Diabetes Care* 2010; 33(suppl 1):62-69.
- 103) The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183-1197.
- 104) Chonchol M, Katz R, Fried LF, Sarnak MJ, Siscovic DS, Newman AB et al. Glycosylated hemoglobin and the risk of death and cardiovascular mortality in the elderly. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:15-21.
- 105) Cederberg H, Saukkonen T, Laakso M, Jokelainen J, Härkönen P, Timonen M et al. Postchallenge glucose, HbA1c, and fasting glucose as predictors of type 2 diabetes and cardiovascular disease: a 10-year prospective cohort study. *Diabetes Care* 2010. Publish ahead of print.

- 106) Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti GMM. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabetic Medicine* 2002; 19:708-723
- 107) Selvin E, Steffes M, Zhu H, Matsushita K, Wagenknecht L, Pankow J et al. Glycated hemoglobin, diabetes and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *New Engl J Med* 2010; 362: 800-11.
- 108) National Glycohemoglobin Standardization Program. List of NGPS certified method (updated, March 2010) at <http://www/ngsp.org/prog/index.html>.
- 109) Riddle MC, Ambrosius WT, Brillon DJ, Buse JB, Byington RP, Cohen RM et al for the Action to Control in Diabetes (ACCORD) Investigators. Epidemiologic relationships between A1C and all-cause mortality during a median 3.4-year follow-up of glycemic treatment in the ACCORD trial. *Diabetes Care* 2010;33: 983-90.
- 110) Lorenzo C, Wagenknecht LE, Hanley AJG, Rewers MJ, Karter AJ, Haffner SM. Hemoglobin A1c between 5.7 and 6.4% as a marker for identifying pre-diabetes, insulin sensitivity and secretion, and cardiovascular risk factors: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care* 2010. Publish ahead of print.
- 111) Tirosh A, Shai I, Tekes-manova D, Israeli E, Pereg D, Shochat T, et al. Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. *N Engl J Med* 2005;335:1454-62.

- 112) Nichols G, Hillier TA, Brown JB. Normal fasting plasma glucose and risk of type 2 diabetes diagnosis. *Am J Med* 2008;121:519-24.
- 113) Zhang X, Gregg EW, Williamson DF, Barker LE, Thomas W, Bullard K McK et al. A1c level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2010;33:1665-73.
- 114) Mosca A, Paleari R, Dalfrà M, Di Cianni G, Cuccuru I, Pellegrini G, Malloggi L, Bonomo M, Granata S, Ceriotti F, Castiglioni MT, Songini M, Tocco G, Masin M, Plebani M, Lapolla A. References Intervals for Hemoglobin A1c in Pregnant Women: Data from an Italian Multicenter Study. *Clin Chem* 2006; 52: 1138-43.
- 115) Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine R for the A1cDerivedAverage Glucose (ADAG) Study Group. Translating the A1c assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008; 31:1473-8.

Ringraziamenti

Un grazie di cuore a

Alla mia mamma per avermi insegnato la sua forza e la sua libertà; per avermi mostrato un modo di vivere la vita che mi ha resa felice.

Al mio turbolento papà che mi sostiene e mi rende la vita non monotona.

A mio marito, Giuseppe, per la sua infinita pazienza e per aver capito quanto sia importante per me il mio lavoro.

A mia cugina Anna, più di una sorella, per i suoi consigli a 360°.

Al Prof. Mario Plebani e alla Prof.ssa Annunziata Lapolla per aver creduto in me.

Al Dott. Diego Faggian che per primo ha riposto la sua fiducia nella mia persona;

Alla Dott.ssa Martina Zaninotto per avermi consigliato di continuo in questi 3 anni;

Ad Adriano, Gemma, Severina e Sandra per sopportarmi in continuazione.

Alla dott.ssa Monica Maria Mion (3M) per l'amicizia dimostratami.

A tutti gli infermieri/e e tecnici di laboratorio che hanno collaborato alla realizzazione di questo lavoro.

