

PROGETTO DI RICERCA

Genetica, fisiopatologia ed evoluzione del diabete di tipo 2

PREMESSE

Si va consolidando all'interno della comunità scientifica il concetto che il diabete mellito di tipo 2 è un disordine progressivo, caratterizzato da fasi successive nelle quali si sommano alterazioni dei meccanismi che regolano l'omeostasi glucidica fino alla comparsa della franca iperglicemia. Sia le cause genetiche che gli esatti meccanismi fisiopatologici del diabete di tipo 2 rimangono ancora solo parzialmente compresi. Studi recenti hanno però indicato una serie di geni che potrebbero partecipare al complesso mosaico poligenico del diabete di tipo 2. Inoltre, è ormai accettato che sia l'insulino-resistenza che il deficit di secrezione insulinica siano necessari affinché la malattia si renda clinicamente manifesta. In uno specifico gruppo etnico quale quello degli Indiani Pima, è stato recentemente dimostrato che il principale determinante della progressione dallo stato di normo-tolleranza ai carboidrati, allo stato di intolleranza ai carboidrati e quindi allo stato di diabete franco è il deficit della funzione beta-cellulare, caratterizzato dalla progressiva riduzione della capacità di rispondere acutamente con una adeguata increzione insulinica allo stimolo glicemico.

L'intolleranza ai carboidrati (IGT) occupa, oggi, una posizione intermedia fra normalità e diabete di tipo 2. Questa fase intermedia è anche nota come "alterata regolazione glucidica" (Impaired Glucose Regulation, IGR) e comprende sia individui con alterata glicemia a digiuno (glicemia > 110 e < 126 mg/dl; Impaired Fasting Glucose, IFG) e normale tolleranza al carico orale di glucosio (glicemia a 120' < 140 mg/dl, Normal Glucose Tolerance, NGT), sia soggetti con normale glicemia a digiuno (< 110 mg/dl, Normal Fasting Glucose, NFG) ma con glicemia 120' dopo carico orale di glucosio > 140 e < 199 mg/dl (IGT), sia individui nei quali IFG e IGT coesistono.

Al di là delle preziosissime informazioni ottenute in gruppi etnici selezionati, non vi sono, nelle popolazioni caucasiche, studi di follow-up sufficientemente ampi che coinvolgano soggetti con IGR che permettano di stimare non solo il tasso medio di conversione in diabete franco ma, soprattutto, identificare, se possibile, *quali* soggetti diventeranno diabetici e quali meccanismi fisiopatologici rendano conto di questa conversione. Diversi dati su questo punto specifico sono invero disponibili per la sola condizione dell'IGT, per la quale, gran parte della letteratura è concorde nell'indicare una frequenza di conversione a diabete manifesto pari al 20-30%. L'identificazione di una nuova categoria quale quella dell' IGR prevista sia dai nuovi criteri diagnostici della American Diabetes Association che dalla Organizzazione Mondiale della Sanità "impone" di verificare il rischio intrinseco alla condizione di IGR così come di acquisire informazioni sulla reale velocità di conversione a diabete franco.



Si può tranquillamente affermare che, al momento attuale, mancano ancora degli affidabili markers biochimici e/o fisiopatologici di predizione dello sviluppo di diabete di tipo 2. Ancor più lontani siamo dalla identificazione del profilo genetico di quei soggetti che svilupperanno diabete di tipo 2. Infine, mancano ancora, nelle popolazioni caucasiche, dati che consentano di chiarire il ruolo relativo della funzione beta-cellulare e della sensibilità insulinica nel processo che porta dallo stato di normale omeostasi del glucosio, alla IGR ed infine al diabete franco.

La mancanza in letteratura di dati convincenti sui problemi su esposti è dovuta in parte alla intrinseca eterogeneità del diabete di tipo 2. A causa di questa eterogeneità il numero di soggetti che è necessario esaminare e seguire al fine di acquisire sufficiente potenza statistica è estremamente elevato. La stessa eterogeneità impone, ai fine dello studio dei tratti genetici sottesi al diabete di tipo 2, una precisa caratterizzazione del fenotipo, almeno in termini di insulino-resistenza e di secrezione insulinica. La descrizione di queste fini funzioni ha sinora richiesto metodologie relativamente complesse e costose sia in termini di impiego di tempo che di risorse umane ed economiche, al punto da renderle incompatibili con un follow-up su un numero elevato di soggetti. D'altro canto, solo queste tecniche sofisticate potrebbero permettere di chiarire il ruolo di insulino-secrezione ed insulino-resistenza nella fisiopatologia della storia naturale del diabete di tipo 2.

Il **Gruppo di Studio SID** sul Diabete di Tipo 2 ritiene che in Italia ci siano oggi le condizioni per organizzare, condurre e portare a termine uno studio sulla evoluzione, fisiopatologia e genetica della alterata regolazione glucidica come fase pre-diabetica secondo un protocollo che sia inizialmente di tipo osservazionale e di follow-up e, in seconda battuta, di intervento.

Questa convinzione si basa innanzitutto sulla considerazione che in Italia è presente una fitta rete di Centri di Diabetologia ad alta specializzazione, dotati di archivi computerizzati, con un bacino di utenza molto ampio e che sono in diretto contatto con e/o nei quali operano gruppi di ricerca di livello internazionale con particolare esperienza nel campo della insulino-resistenza, insulino-secrezione e fisiopatologia del diabete di tipo 2. Il Gruppo di Studio sul Diabete di Tipo 2 è anche convinto che possano essere impiegate misure sufficientemente precise e relativamente facili da acquisire affinché lo studio possa essere diffuso su tutto il territorio nazionale coinvolgendo così non solo le strutture prettamente di ricerca ma anche quelle con prevalente attività clinica.



OBIETTIVI

Determinazione, in una popolazione caucasica, dei meccanismi fisiopatologici responsabili dei disordini della regolazione del glucosio (IGR)

Identificazione di eventuali markers biochimici della evoluzione della IGR in diabete mellito di tipo 2.

Identificazione di eventuali markers fisiopatologici della evoluzione della IGR in diabete mellito di tipo 2.

Identificazione di eventuali markers genetici della evoluzione della IGR in diabete di tipo 2.

Determinazione della prevalenza dei markers di autoimmunità -cellulare e valutazione della loro capacità predittiva della evoluzione della IGR in diabete mellito di tipo 2.

POPOLAZIONE DELLO STUDIO, MODALITÀ E TEMPI DI RECLUTAMENTO

Saranno reclutati per lo studio soggetti che vengano riferiti ai Centri di Diabetologia per eseguire un OGTT, che abbiano età compresa tra i 30 ed i 65 anni, glicemia a digiuno inferiore a 126 mg/dl (7.0 mmol/L), esenti da malattie neoplastiche o mieloproliferative o da gravi patologie dei maggiori organi e/o apparati, che non siano in trattamento con farmaci che sicuramente deteriorano la tolleranza ai carboidrati (cortisonici e beta-bloccanti....), e che abbiano dato il loro consenso a partecipare allo studio. I soggetti devono essere arruolati consecutivamente (ovvero con criteri random preventivamente stabiliti, es. i primi 3 OGTT in appuntamento di ciascun Martedì e Venerdì che qualifichino per lo studio fino al raggiungimento dell'obiettivo di reclutamento) tra i pazienti in appuntamento per curva da carico di glucosio.

Ciascun Centro partecipante dovrà reclutare un minimo di 70 ed un massimo di 100 pazienti all'anno per due anni. Con la partecipazione di 15 Centri distribuiti sul territorio nazionale in grado di esaminare mediante OGTT almeno 70 pazienti nell'arco di un anno, il reclutamento è calcolabile in circa 1000 soggetti per anno, ovvero, in 2 anni, circa 2000 soggetti.

Per ciascun paziente reclutato saranno rilevati:

Dati anagrafici

Abitudini voluttuarie (fumo, alcool)

Albero genealogico con indicazione della familiarità per diabete mellito, IGT, obesità, ipertensione arteriosa, dislipidemia, malattia cardiovascolare

Eventuali trattamenti farmacologici in atto

Dati Antropometrici (Peso, Altezza, Circonferenza Vita, Circonferenza Fianchi, Massa Adiposa tramite impedenziometria e/o DEXA ove possibile e comunque calcolo mediante formula di Hume)

Pressione Arteriosa in posizione seduta

ECG



In ciascun paziente saranno prelevati campioni di sangue per le seguenti determinazioni:

Estrazione del DNA leucocitario

Determinazione di Anticorpi Anti-Insulina, ICA ed Anti-GAD

HbA1c, Trigliceridi, Colesterolo Totale, Colesterolo HDL e LDL

Almeno 4 aliquote di siero (1 cc ciascuna) e 5 aliquote di plasma (1 cc ciascuna) saranno conservate a -70° centigradi per eventuali successive determinazioni.

A ciascun paziente sarà somministrato un OGTT con 75 g di glucosio, al mattino dopo digiuno notturno, con prelievi di sangue ai tempi -10', 0', 15', 30', 60', 90' e 120' e determinazione, su ciascun campione, di glicemia e C-peptide. Le concentrazioni plasmatiche di insulina verranno determinate sui campioni prelevati ai tempi -10' e 0' per i successivi calcoli della insulino-sensibilità (v. infra).

Le suddette misure e tests verranno ripetuti ad intervalli di due anni per un periodo di follow-up di 6 anni in tutti i soggetti nei quali non sia stata, nel frattempo, posta diagnosi di diabete secondo i criteri WHO (*WHO/NCD/NCS/99.2*).

MATERIALI E METODI

Estrazione del DNA leucocitario: nei Centri collegati a strutture in grado di eseguirla, l'estrazione verrà svolta in sede mediante cromatografia su colonna dopo isolamento della frazione leucocitaria. Successivamente sarà inviata al Centro di coordinamento incaricato di tenere la banca del DNA, una aliquota di almeno 150 ng di DNA per ciascun paziente. Gli altri centri invieranno la frazione cellulare ottenuta da 15 cc. di sangue al Centro di coordinamento, incaricato di tenere la banca del DNA.

Determinazione degli Anticorpi IA2, ICA e Anti-GAD: queste determinazioni verranno centralizzate ed eseguite con Kits commerciali nel Centro di coordinamento per le valutazioni autoimmunitarie

Glicemia, HbA1c, Trigliceridi, Colesterolo Tot, Colesterolo HDL: saranno determinati presso i laboratori di patologia clinica dei singoli Centri partecipanti con tecniche standard.

Dosaggio di Insulina e C-Peptide: queste determinazioni verranno centralizzate ed eseguite con Kits commerciali nella Divisione di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile di Verona (Centro 2 di Verona).

Misurazione della secrezione insulinica: I dati di glicemia e di C-peptide verranno convogliati alla Divisione di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Università di Verona (Centro 1 di Verona), ove avverrà l'analisi computerizzata degli OGTT. La secrezione β -cellulare verrà stimata applicando un modello minimo di secrezione insulinica indotta dal glucosio alle curve di glucosio e C-peptide degli OGTT di ciascun soggetto.

Misurazione della sensibilità all'insulina: La sensibilità all'insulina verrà stimata in tutti i soggetti calcolando l'HOMA-IR, che presenta un buon grado di correlazione con la tecnica del clamp euglicemico iperinsulinemico. Tale indice è stato di recente validato per studi di questa natura dal gruppo di Verona (*Bonora E et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. Studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes Care 23: 57-63, 2000*).



ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA

Dato il campione di popolazione sul quale verrà effettuato lo studio, è ragionevole predire che il campione sarà “arricchito” in soggetti con IGR e che saranno inoltre presenti nel campione reclutato soggetti con OGTT diagnostico per diabete mellito.

Dai dati epidemiologici attualmente disponibili, è ragionevole ritenere che arruolando 2000 pazienti in 2 anni dalla popolazione indicata, il campione conterrà circa 900 soggetti inizialmente con normale regolazione del glucosio, circa 700 soggetti con IGR e circa 400 soggetti con diabete mellito. In un follow up di 6 anni il tasso cumulativo di conversione in diabete dei soggetti con IGR dovrebbe essere intorno al 20-25%, per cui alla fine del follow-up almeno 150 pazienti dovrebbero essere diventati diabetici.

Sia dai pazienti inizialmente diabetici, sia dai pazienti divenuti diabetici durante il follow-up verranno enucleati i pazienti con diabete autoimmune mediante screening anticorpale ed i soggetti affetti da diabete MODY attraverso screening genetico. I dati di questi sottogruppi verranno analizzati a parte.

In una prima fase verranno quindi valutate insulino-sensibilità ed insulino-secrezione in campioni numerosi di pazienti con normale tolleranza ai carboidrati, intolleranza ai carboidrati e diabete mellito all'esordio. Verranno poi osservate le modificazioni di queste variabili in relazione al cambiamento di “stato” della regolazione del glucosio (da normale ad alterata e da alterata a diabetica nonché, eventualmente, nel passaggio inverso da alterata a normale) ed in relazioni a cambiamenti antropometrici o biochimici che dovessero intercorrere.

Saranno inoltre rilevate le prevalenze di diversi polimorfismi per geni candidati per diabetogenicità. In particolare, e fermo restando che la rapidissima evoluzione delle conoscenze in questo campo porterà sicuramente a un aggiornamento in itinere della lista dei geni da esplorare, si esamineranno i loci NIDDM1 e NIDDM2, i geni della glucochinasi, dell'HNF-1 α , dell'HNF-4 α , dell'HNF-1 β , dell'IPF, del PED/PEA, dell'IRS-1, dell'IRS-2, della PC-1, e del recettore β_3 -adrenergico. Sarà osservata sia la associazione di questi loci con l'appartenenza alle diverse “classi” di regolazione del glucosio sia il loro eventuale potere predittivo di “passaggio” da una classe all'altra nel corso del follow-up.

Sul siero ed il plasma conservati sarà inoltre possibile, a posteriori, andare alla ricerca di markers biochimici e/o ormonali (es.: TNF- α e suoi recettori solubili, Leptina) di cui si possa valutare la associazione con le variazioni della tolleranza glicidica, della insulino-resistenza e della insulino-secrezione nel corso del follow-up.



IMPORTANZA E RISULTATI ATTESI

Il completamento del progetto descritto costituirebbe il primo studio su vasta scala della fisiopatologia della alterata regolazione del glucosio (IGR). I suoi risultati permetteranno di raggiungere importanti chiarimenti sulla fisiopatologia del diabete mellito di tipo 2 in una popolazione caucasica. Anche se non è possibile affermare oggi con certezza la portata che lo studio avrà riguardo al chiarimento della genetica del diabete di tipo 2, è certo che sarà possibile stabilire se i polimorfismi dei geni che si sarà scelto di esaminare abbiano una rilevanza significativa nel determinismo del fenotipo diabete mellito di tipo 2. Infine, l'individuazione di markers della progressione dell'alterata regolazione del glucosio (IGR) in malattia diabetica costituirà il presupposto fondamentale per il disegno e la implementazione di studi di intervento per la prevenzione del diabete di tipo 2.

FINANZIAMENTO DELLO STUDIO

Il progetto ha ottenuto l'approvazione ed il finanziamento della Fondazione Ricerca - Società Italiana di Diabetologia. Lo sponsor unico del progetto è la Eli Lilly Italia.

