

1222·2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**Il trascrittoma delle piastrine in pazienti affetti da
diabete mellito di tipo 2: confronto della terapia con
inibitori SGLT2, Metformina e GLP1-Recettore Agonisti**

Relatore: Chiar.mo Prof. Giulio Ceolotto

Correlatore: Dr.ssa Alessandra Giannella

Laureanda: Martina Signor

Anno Accademico 2021/2022

A me stessa,
Ai miei genitori.

INDICE

INTRODUZIONE.....	11
1. IL DIABETE	11
2. EPIDEMIOLOGIA DEL DIABETE MELLITO	11
3. CLASSIFICAZIONE DEL DIABETE	12
3.1 Diabete mellito di tipo 2	13
4. L'INSULINA	14
4.1 La biosintesi di insulina	14
4.2 La secrezione dell'insulina	14
4.3 La trasduzione del segnale insulinico	15
5. FISIOPATOLOGIA DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2	15
5.1 La disfunzione delle cellule β pancreatiche	15
5.2 Insulinoresistenza	16
6. DIAGNOSI DI DIABETE MELLITO DI TIPO 2	17
7. COMPLICAZIONE DEL DIABETE MELLITO	18
7.1 Complicanze microvascolari	18
7.2 Complicazioni macrovascolari	19
8. TRATTAMENTO DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2	24
8.1 Le sulfaniluree	24
8.2 Le biguanidi	25
8.3 I tiazolidindioni	26
8.4 Inibitori dell' α glucosidasi	27
8.5 Gli agonisti del peptide 1 simile al glucagone (GLP1-RA)	27
8.6 Gli inibitori della dipeptidil-peptidasi IV (DPP IV)	29
8.7 Gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT2)	29
9. IL TRASCRITTOMA DELLE PIASTRINE	33
OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	35
MATERIALI E METODI.....	37
1. CASISTICA DELLO STUDIO	37
1.1 Disegno dello studio	37
2. ISOLAMENTO E QUANTIFICA DELLE PIASTRINE	39
3. ESTRAZIONE DELL'RNA DALLE PIASTRINE	39
4. QUANTIFICAZIONE DELL'RNA ESTRATTO	40
5. PREPARAZIONE DELLE LIBRERIE	40
5.1 Purificazione e frammentazione dell'mRNA	41

5.2 Sintesi cDNA	41
5.3 Adenilazione dell'estremità 3'	42
5.4 Ligazione delle ancore.....	42
5.5 Clean up dei frammenti	42
5.6 Amplificazione delle librerie.....	43
5.7 Clean up delle librerie	43
6. QUANTIFICAZIONE DELLE LIBRERIE	43
7. CONTROLLO QUALITÀ LIBRERIE	43
8. DILUIZIONE DEL POOL PER IL SEQUenziAMENTO	45
9. SEQUenziAMENTO CON NEXTSeq 550	46
10. ANALISI BIOINFORMATICA.....	46
RISULTATI.....	49
1. PARAMETRI CLINICI DEI PAZIENTI	49
2. CONTROLLO QUALITÀ DELL'ESTRAZIONE DELLE PIASTRINE	50
3. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEGLI MRNA	51
4. ANALISI DIFFERENZIALE DEGLI MRNA.....	55
4.1 SGLT2 inibitori vs Metformina	56
4.2 GLP1-RA vs Metformina	58
4.3 GLP1-RA vs inibitori SGLT2	59
5. INFLUENZA DELLA TERAPIA ANTIAGGREGANTE	61
6. DOSAGGI PLASMATICI DI NAMPT, PAI-1, S100A9 E S100A12	61
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	63
BIBLIOGRAFIA:.....	67

ABSTRACT:

Introduzione: Il diabete di tipo 2 è una patologia molto diffusa in tutto il mondo e la principale causa di morte è rappresentata da complicanze cardiovascolari. Alcune classi di farmaci ipoglicemizzanti orali si sono dimostrati efficaci nel ridurre queste complicanze.

Gli inibitori SGLT2 sono farmaci utilizzati per il trattamento del diabete mellito di tipo 2. Il loro meccanismo d'azione si esplica a livello renale aumentando la glicosuria e riducendo in questo modo la glicemia. Questi farmaci negli ultimi anni sono diventati oggetto di studio poiché sono anche efficaci nella riduzione degli eventi cardiovascolari e dei danni renali. Gli inibitori SGLT2 sono in grado di ridurre l'aggregazione piastrinica con meccanismi ancora non ben noti.

I farmaci GLP1 recettori agonisti (GLP1-RA) sono farmaci che stimolano il rilascio di insulina con conseguente abbassamento della glicemia con un meccanismo glucosio-dipendente. È stato dimostrato che hanno un effetto antiaggregante sia *in vivo* che *in vitro* e una riduzione dell'espressione di P-selectina e complesso glicoproteico GPIIb/IIIa sulle piastrine.

La metformina, infine, è uno dei farmaci base per la terapia del diabete mellito di tipo 2. Appartiene alla famiglia delle biguanidi. Agisce modulando il metabolismo degli zuccheri senza agire sulle cellule β pancreatiche, garantendo così un buon controllo sia della glicemia basale che di quella post-prandiale.

Scopo: L'obiettivo di questo studio è quello di analizzare il profilo del trascrittoma delle piastrine di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 e di confrontare gli effetti del trattamento farmacologico in questi pazienti in terapia con metformina+ inibitori SGLT2, metformina+GLP1 recettore agonisti e con solo metformina.

Materiali e metodi: Sono stati reclutati 17 pazienti provenienti dall'Ambulatorio di Diabetologia dell'Unità Operativa di Malattie del Metabolismo e sono stati divisi in 3 gruppi: associazione metformina e SGLT2 inibitori, metformina e GLP1-RA e solo metformina. Le piastrine sono state isolate dal prelievo di sangue venoso. L'RNA è stato estratto e utilizzato per la preparazione delle librerie. Il sequenziamento Next Generation Sequencing è stato eseguito mediante la tecnologia NextSeq 550 (Illumina). Infine, sono stati misurati i livelli plasmatici di NAMPT (visfatina), PAI-1 (inibitore dell'attività del plasminogeno), S100A9 (calprotectina) e S100A12 (proteina legante calcio) nei tre gruppi di pazienti mediante metodo ELISA.

Risultati: Questa tecnologia ha consentito di identificare numerosi trascritti (mRNA) piastrinici che sono coinvolti in diversi processi cellulari come la coagulazione del sangue, il metabolismo cellulare, l'assemblaggio del citoscheletro, la risposta immunitaria. In particolare, l'analisi differenziale dei trascritti piastrinici tra i tre gruppi di pazienti ha evidenziato che gli inibitori SGLT2 riducono l'espressione di geni coinvolti nei processi infiammatori (S100A9 e S100A12) e in quelli immunitari (CXCR1 e CEBPD), mentre i farmaci GLP1-RA inducono una significativa riduzione del trascritto PAI1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1) modulando pertanto la fibrinolisi. Infine, i livelli plasmatici di NAMPT sono risultati ridotti nei pazienti in terapia con gli inibitori SGLT2 con effetto immunomodulante e PAI-1 è risultato ridotto nei pazienti in terapia con GLP1-RA con effetto inibitorio sulla fibrinolisi.

Conclusione: Questo studio ha messo in evidenza come il trattamento farmacologico a lungo termine possa modulare l'espressione dei trascritti (mRNA) piastrinici migliorando la risposta infiammatoria e il processo coagulativo nel paziente diabetico di tipo 2.

INTRODUZIONE

1. Il diabete

Il diabete mellito (DM) è definito come una patologia cronica o condizione metabolica caratterizzata da iperglicemia. L'iperglicemia può essere causata da difetti nella secrezione di insulina, difetti dell'azione dell'insulina o più spesso entrambi. [1] L'eziologia del diabete è molto varia ed è determinata sia da fattori genetici che ambientali.

La condizione iperglicemica può causare gravi danni a organi e apparati, peggiorando le condizioni di salute dell'individuo affetto, ed è determinata da un aumento del glucosio che rappresenta la forma principale di energia per tutte le cellule del nostro organismo. Il glucosio circola in forma libera e la sua concentrazione viene mantenuta tra 70 e 100 mg/dL mediante l'azione dell'insulina e del glucagone (azione iperglicemizzante).

Il glucosio presente proviene da tre fonti principali:

- Il tratto digestivo: deriva dai carboidrati ingeriti e poi convertiti dal fegato
- Il rilascio dalle riserve epatiche di glicogeno (glicogenolisi)
- Mediante nuova sintesi di glucosio da precursori (gluconeogenesi)

Il glucosio entra nelle cellule mediante i recettori del glucosio detti GLUT. Ne esistono varie isoforme: GLUT-1 è ubiquitario, GLUT-2 è presente prevalentemente nelle cellule pancreatiche, GLUT-3 soprattutto nelle cellule nervose, GLUT-4 nei tessuti insulino-sensibili, come fegato, tessuto scheletrico e infine GLUT-5 nell'intestino tenue.

L'insulina pertanto gioca un ruolo chiave nel metabolismo del glucosio epatico e nell'utilizzo del glucosio da parte dei muscoli e degli adipociti: ne consegue che livelli inadeguati di insulina tenderanno a causare un aumento della glicemia.

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) deve essere monitorato in quanto è uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. [2]

2. Epidemiologia del diabete mellito

La prevalenza del diabete nel mondo è aumentata notevolmente negli ultimi 20 anni arrivando a 537 milioni di casi nel 2021. Sulla base di queste tendenze l'IDF (*International Diabetes Federation*) stima che 643 milioni di persone avranno il diabete entro il 2030 e 783 milioni entro il 2045. Inoltre, il diabete è responsabile di 6,7 milioni di decessi nel 2021, 1 ogni 5 secondi. Sono in aumento le forme di diabete sia di tipo 1

che di tipo 2, ma la prevalenza del diabete di tipo 2 è in rapido aumento a causa dell'aumento dell'obesità, della riduzione dei livelli di attività man mano che i paesi diventano più industrializzati e anche dall'invecchiamento della popolazione mondiale. Si stima inoltre che a livello mondiale almeno il 50% delle persone con diabete potrebbe essere non diagnosticato. Esiste anche una differenza sullo sviluppo del diabete di tipo 1 e 2 a seconda della zona geografica. Per esempio, oggi la Scandinavia ha la più elevata incidenza di DM tipo 1 mentre l'incidenza più bassa di 20/30 volte la si trova sui Paesi che si affacciano sul Pacifico. L'Asia inoltre è un'area importante dell'epidemia globale di diabete mellito di tipo 2 in rapida evoluzione. [3] Per l'Italia il tasso è considerato intermedio. Per quanto riguarda il T2DM ha una variabilità intermedia nei paesi come USA e India. La sua prevalenza varia anche tra differenti gruppi etnici nell'ambito dello stesso Paese. Negli ultimi anni il diabete è stato classificato come la settima causa di morte negli USA, ma diversi studi affermano che in realtà ci sia una sottostima dei decessi correlati allo sviluppo di questa patologia. [4]



Figura 1. Epidemiologia diabete (IDF 2021)

3. Classificazione del diabete

La classificazione accettata dall'OMS nel 1980 prevedeva la suddivisione in cinque classi di diabete e due categorie a rischio. Due principali tipi fondamentali di diabete ovvero il diabete insulino-dipendente definito anche diabete infantile giovanile e il diabete non insulino-dipendente definito anche diabete dell'età adulta. Il criterio adottato per questa classificazione faceva perciò riferimento al trattamento terapeutico.

L'attuale classificazione dell'*American Diabetes Association* suddivide il diabete mellito in tipo 1 e in tipo 2. Il diabete mellito di tipo 1 è una malattia autoimmune che insorge

durante l'infanzia e l'adolescenza, ma non sono esclusi casi anche in età adulta. È causato da una distruzione selettiva delle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas e la conseguente carenza grave o assoluta di insulina, utile per soddisfare le richieste metaboliche del corpo umano.

Il diabete mellito di tipo 2 è causato dal deficit secretorio beta cellulare dell'insulina e dalla condizione di resistenza insulinica. Altre forme di diabete sono il diabete gestazionale e il diabete MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) causato da mutazioni genetiche dei geni responsabili del segnale insulinico. [5]

3.1 Diabete mellito di tipo 2

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) è caratterizzato dall'insulino-resistenza, l'alterata secrezione insulinica da parte delle cellule β pancreatiche e l'inadeguata risposta secretoria di insulina compensatoria.[6]

È la forma più frequente e rappresenta il 90% di tutti i casi di diabete ed è diffuso in tutto il mondo; il T2DM è fortemente correlato a una scorretta alimentazione, a uno scarso esercizio fisico, all'ipertensione, a una componente genetica e al sovrappeso. Soprattutto quest'ultimo gioca un ruolo fondamentale in quanto la maggior parte dei pazienti affetti da T2DM è obeso con l'accumulo del grasso viscerale prevalentemente a livello addominale e questo causa un aumento di peso che provoca un certo grado di insulino-resistenza. [7]

Generalmente il rischio di sviluppare questa forma di diabete aumenta con l'età e con lo stato di salute fisico. Pertanto, è importante modificare questi fattori di rischio per poter prevenire lo sviluppo del T2DM.

Come patologia presenta un decorso molto lento rispetto al T1DM dove l'insorgenza si sviluppa improvvisamente. Proprio per questo motivo è di difficile diagnosi all'inizio, in quanto la condizione iperglicemica aumenta gradualmente senza dare sintomi acuti. Infatti, nelle fasi precoci la tolleranza glucidica resta normale, nonostante la presenza dell'insulino resistenza, poiché le cellule β pancreatiche riescono a compensare aumentando la produzione di insulina. Questa condizione non può essere mantenuta a lungo, in quanto le cellule β piano piano vanno incontro a una disfunzione e si sviluppa di conseguenza l'iperinsulinemia.

4. L'Insulina

L'insulina come tale è un ormone polipeptidico sintetizzato e rilasciato dalle cellule β pancreatiche. Formato da due catene unite da ponti di solfuro.

Ha una emivita di 7/15 minuti dopodiché viene inattivata dal fegato.

4.1 La biosintesi di insulina

L'insulina viene sintetizzata come precursore polipeptidico costituito da una singola catena di 86 amminoacidi ovvero la preproinsulina. Successivamente un peptide di segnale amino-terminale determina un processo proteolitico che dà origine alla proinsulina.

Infine, la scissione interna di un frammento di 31 AA genera due catene A e B e il peptide C, le quali tra di loro sono tenute assieme mediante ponti disolfuro. Una volta ottenute queste molecole di insulina, esse vengono immagazzinate nelle cellule β e co-secrete nei granuli secretori. Il peptide C invece risulta essere un ottimo marker diagnostico della secrezione insulinica, poiché viene rimosso dal sangue molto lentamente.

L'insulina matura verrà poi messa in circolo dall'aumento dei livelli di glucosio nel sangue.[4]

4.2 La secrezione dell'insulina

Il ruolo chiave perché avvenga la secrezione insulinica dalla cellula β pancreatica è svolto dal glucosio, anche se gli amminoacidi, i chetoni, i diversi nutrienti, i peptidi gastrointestinali e i neurotrasmettitori possono influenzare la secrezione insulinica. Livelli di glucosio >70 mg/dl stimolano la secrezione insulinica, stimolando la traduzione delle proteine. Il glucosio presente viene trasportato a livello della cellula β pancreatica mediante un trasportatore che si attiva per diffusione facilitata, subisce una serie di trasformazioni fino a produrre ATP. L'ATP va a inibire il canale del potassio ATP-dipendente, che è un complesso costituito da due proteine separate, una delle quali è sito d'azione di alcuni farmaci ipoglicemizzanti. Inibendo questo canale si ha depolarizzazione di membrana con conseguente apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e la secrezione dei granuli contenenti insulina che viene rilasciata nel torrente circolatorio. Il profilo secretorio dell'insulina è a rilascio pulsatile, ciò significa che non viene prodotta in maniera costante, ma si verificano dei picchi circa ogni 10 minuti.

Rilasciata in circolo verrà poi degradata dal fegato circa al 50%, l'altro 50% invece entra nei tessuti bersaglio si lega ai propri recettori e ne stimola l'attività tirosin-chinasica determinando l'autofosforilazione del recettore.

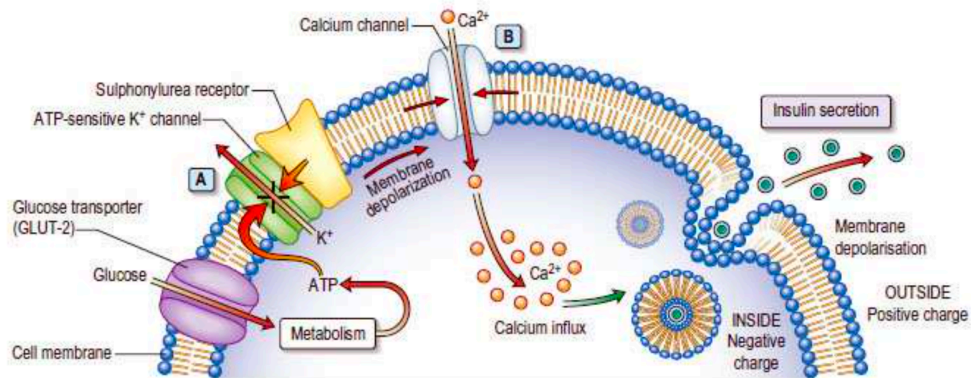


Figura 2: secrezione dell'insulina

4.3 La trasduzione del segnale insulinico

L'inizio della trasduzione del segnale insulinico avviene con il legame dell'insulina al proprio recettore presente sulla membrana plasmatica delle cellule dei tessuti bersaglio insulino-sensibili, come il tessuto adiposo e il tessuto muscolare scheletrico. Il recettore in questione è un recettore trans membrana, è formato da due subunità α extracellulari, alle quali si lega l'insulina, e le due subunità β endocellulari che hanno attività tirosin-chinasica. Il legame di una molecola di insulina alla subunità α extracellulare attiva il recettore ed attraverso un cambio conformazionale fa avvicinare il sito catalitico della subunità opposta β . Il legame dell'insulina con il proprio recettore porta all'autofosforilazione del recettore, determinando la formazione di un sito di legame per il substrato del recettore dell'insulina. I membri della famiglia dei recettori per l'insulina svolgono un ruolo importante nel metabolismo energetico, come per esempio IRS1 è implicato nell'uptake di glucosio mediato dal segnale insulinico, e la conseguente attivazione dei pathway anabolici del muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo, mentre IRS2 svolge le medesime funzioni nel fegato. [8]

5. Fisiopatologia del diabete mellito di tipo 2

5.1 La disfunzione delle cellule β pancreatiche

Nel T2DM la produzione di insulina è in assoluto normale o addirittura aumentata, ciò che cambia è la sua secrezione.

Può essere anche caratterizzato da un'eccessiva produzione epatica di glucosio e da un alterato metabolismo dei grassi.

Nella fase iniziale della malattia la tolleranza glucidica resta pressoché normale, poiché le cellule pancreatiche compensano aumentando il rilascio di insulina, quando l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia compensatoria progrediscono, le isole pancreatiche non riescono più a sostenere il carico e perciò si sviluppa il diabete.[5]

La secrezione dell'insulina può essere dimostrata mediante il dosaggio del peptide C o la valutazione della concentrazione della cosiddetta insulina immunoreattiva nel sangue. Per quanto riguarda il T2DM i livelli di glucagone plasmatico possono essere elevati nonostante che la produzione di insulina endogena persista e che possa essere aumentata. I livelli glicemici risultano elevati tanto a digiuno quanto più ancora dopo i pasti. Quando i livelli glicemici superano la soglia renale al glucosio (180mg/dL) compare glicosuria. Se questa è di entità modesta non ha effetti significativi, ma se è di entità notevole provoca diuresi osmotica con perdita di acqua. Nei pazienti affetti da T2DM è possibile che vengano raggiunti livelli glicemici e aumenti dell'osmolalità plasmatica tali da determinare una grave sindrome neurologica denominata coma iperosmolare non chetotico.

5.2 Insulinoresistenza

L'insulinoresistenza è la condizione patologica più importante che caratterizza il T2DM. È la risultante di una combinazione di suscettibilità genetica e obesità. Si verifica quando le cellule dei tessuti che necessitano dell'insulina per l'*uptake* di glucosio, come il tessuto epatico, tessuto adiposo e quello muscolare scheletrico, non sono in grado di rispondere al segnale insulinico. Per comprendere meglio questo meccanismo si deve tenere in considerazione che il processo di trasduzione del segnale insulinico è molto vario. Il meccanismo molecolare che conduce all'insulinoresistenza non è ancora stato chiarito, ma la traslocazione alterata del trasportatore GLUT4 nella membrana plasmatica, importante per l'*uptake* di glucosio dei tessuti insulino-dipendenti, è il processo principale che definisce l'insulinoresistenza. [21]

Studi recenti hanno evidenziato il ruolo chiave del tessuto adiposo nello sviluppo dell'insulino-resistenza nel T2DM. Il tessuto adiposo ha il compito di immagazzinare i lipidi, riesce a favorire ciò andando ad aumentare la propria massa in funzione della quantità di nutrienti ingeriti. Quando però il limite viene superato i lipidi possono dare lipotossicità poiché possono accumularsi in tessuti diversi come ad esempio in quello del muscolo scheletrico, così da ridurre la produzione mitocondriale di ATP stimolata dall'insulina. Questo aumento della massa del tessuto adiposo provoca lo sviluppo dell'insulinoresistenza con meccanismo ipertrofico. Questo stato ipertrofico fa sì che la

produzione di acidi grassi liberi e di alcune adipochine diminuisca e causi insulinoresistenza nel muscolo scheletrico e nel fegato.

Per quanto riguarda il tessuto muscolare scheletrico è stato trovato un difetto nella cascata di segnalazione dell'insulina a livello di IRS-1 (recettore substrato dell'insulina), anche se però queste alterazioni sono secondarie all'iperinsulinemia e non sono quindi un difetto primario. [4]

L'insulinoresistenza è correlata anche ad un aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Ciò accade perché nello stato di insulinoresistenza si ha un bilancio energetico positivo che fa sì che vi sia un accumulo di coenzimi in forma ridotta (NADH e FADH₂). La condizione di insulinoresistenza è strettamente correlata con quella di iperinsulinemia, poiché nel T2DM le cellule dei tessuti insulino-dipendenti diventano resistenti al segnale insulinico, poiché i trasportatori GLUT4 non vengono traslocati sulla membrana e di conseguenza i livelli plasmatici di glucosio rimangono alti. Questo meccanismo viene compensato dalla continua produzione di insulina da parte delle cellule β pancreatiche causando così iperinsulinemia.

6.Diagnosi di diabete mellito di tipo 2

L'*American Diabetes Association* ha definito i criteri diagnostici per il diabete mellito ovvero: la FPG (alterata glicemia a digiuno), la risposta a un carico orale del glucosio e l'emoglobina glicata (HbA1c) superiori alla norma. [9]

Nella diagnosi di differenziazione tra T1DM e T2DM è importante determinare:

- la presenza di autoanticorpi circolanti
- la funzione beta cellulare mediante la misurazione del peptide C

I test diagnostici per determinare la condizione di T2DM sono i seguenti:

- Determinazione della glicemia basale a digiuno (FPG): questo test misura i livelli di glicemia a digiuno e viene effettuato almeno dopo 8 ore dall'inizio del digiuno. I valori normali sono inferiori a 100 mg/dL. Se i valori sono compresi tra 100 mg/dL e 125 mg/dL si ha diagnosi di prediabete. Infine, se i valori sono pari o superano 126 mg/dL si ha diagnosi di diabete.
- Test orale di tolleranza al glucosio (OGTT): è un test definito come curva glicemica che viene utilizzato per determinare il metabolismo glucidico del paziente. Consiste in un test nel quale viene determinato il valore di glicemia nel sangue, successivamente viene somministrato al paziente un carico di glucosio pari a 75 g di glucosio disciolti in 300 ml di acqua e due ore dopo viene

misurato nuovamente l'indice glicemico. Un valore <140 mg/dL non costituisce stato di diabete. Valori compresi tra 140 e 199 mg/dL definiscono uno stato prediabete e valori superiori a 200 mg/dL sono sinonimo di diabete.

- Test dell'emoglobina glicata (HbA1c): misura il valore di glucosio nel sangue nei 2/3 mesi precedenti. Questo test si effettua a digiuno al mattino tramite prelievo di sangue venoso. L'emoglobina glicata è una frazione di emoglobina che presenta glucosio legato alla valina N-terminale della catena β dell'emoglobina mediante legame non enzimatico di tipo glicosidico. La reazione di glicazione forma il composto metoamina stabile che persiste per il tempo di vita del globulo rosso, ovvero 120 giorni. È un test che presenta anch'esso dei limiti poiché i valori possono variare indipendentemente dalla glicemia. Livelli normali corrispondono ad un valore inferiore al 5,7%. La condizione di prediabete è definita tra 5,7%-6,4% e infine quella di diabete se il valore supera il 6,5% (48 mmol/mol).

7. Complicazione del diabete mellito

Le complicazioni del diabete mellito possono essere classificate in due macro-categorie: le complicanze microvascolari e le complicanze macrovascolari. [10]

Le prime sono: retinopatia diabetica, neuropatia diabetica e nefropatia diabetica. Le complicanze macrovascolari sono legate all'endotelio vascolare e alla funzionalità delle piastrine.

7.1 Complicanze microvascolari

Retinopatia diabetica: è la complicanza più comune del diabete mellito. [11] Si verifica con il tempo e provoca difetti parziali della visione, può condurre in una percentuale significativa dei casi a perdita completa della vista. Si ritiene che l'iperglicemia svolga un ruolo importante nella patogenesi del danno microvascolare retinico. Le prime risposte dei vasi sanguigni retinici all'iperglicemia sono la dilatazione dei vasi stessi con conseguente alterazione del flusso sanguigno. La perdita di periciti è un segno distintivo di retinopatia diabetica poiché i periciti sono responsabili del supporto strutturale dei capillari e la loro perdita porta a microaneurismi, primo segno clinico di retinopatia. [12]

Con il progredire della patologia in seguito a microaneurismi si possono verificare anche dei veri e propri microinfarti, resi evidenti dalla comparsa di essudati cotonosi. Così si

arriva alla condizione di retinopatia proliferativa che rappresenta lo stadio avanzato. [13]

Neuropatia diabetica: generalmente la neuropatia diabetica caratterizza maggiormente i soggetti affetti da T2DM, rispetto a quelli affetti da T1DM. Provoca una perdita della funzione sensoriale che inizia dagli arti inferiori ed è caratterizzata da dolore e sostanziale morbidità. Può derivare da un'ampia gamma di diversi disturbi neurologici che colpiscono il sistema nervoso centrale e periferico. [14] Almeno il 50% dei pazienti affetti da T2DM nel tempo sviluppa neuropatia. I meccanismi alla base di questa complicanza rimangono ancora sconosciuti, ma si pensa che la durata del diabete e i livelli di emoglobina glicata possano essere segnali predittori della neuropatia. Si associano poi ad altri fattori metabolici come l'ipertensione, l'insulino-resistenza, l'obesità addominale, bassi livelli di HDL.[15] Esistono diversi tipi di neuropatia, la forma più comune è la polineuropatia simmetrica distale. Si manifesta con una distribuzione "calza e guanto" per cui le mani e gli arti inferiori sono comunemente colpiti. [16] [17]

Nefropatia diabetica: è una delle cause principali di insufficienza renale allo stadio terminale in tutto il mondo. L'iperglicemia cronica e l'ipertensione sono i principali fattori di rischio per lo sviluppo di nefropatia. Nei pazienti diabetici lo screening della microalbuminuria, indice di danno renale, deve essere fatto ogni anno dalla data di diagnosi di T2DM. La patogenesi dello sviluppo e della progressione è complessa e multifattoriale con il coinvolgimento di molte vie e mediatori. [18] Le caratteristiche cliniche includono un progressivo aumento dell'escrezione urinaria di albumina e un calo della velocità di filtrazione glomerulare (GFR), che si verificano in associazione con un aumento della pressione sanguigna, portando infine all'insufficienza renale allo stadio terminale. [19] In particolare, è stato determinato che sia gli stimoli metabolici che quelli emodinamici portano all'attivazione delle principali vie di segnalazione intracellulare e dei fattori di trascrizione, innescando così la produzione e il rilascio di citochine, chemochine e fattori di crescita, che mediano o amplificano il danno renale.

Questo accumulo inoltre è potenziato in un ambiente con un'elevata concentrazione di glucosio. [20] [21]

7.2 Complicazioni macrovascolari

Le complicazioni macrovascolari per i pazienti diabetici coinvolgono i grandi vasi come le arterie e le vene. Tra le varie complicazioni ci sono l'arteriopatia, coronaropatia, infarto miocardico e scompenso cardiaco, ma all'origine di tutto si trova l'aterosclerosi.

Pertanto, i pazienti affetti da T2DM sono predisposti allo sviluppo dell'aterosclerosi attraverso l'alterazione della funzione di diversi tipi cellulari: le cellule endoteliali e le piastrine.

Cellule endoteliali: le cellule endoteliali sono le cellule che rivestono l'endotelio dei vasi sanguigni. Sono deputate a svolgere numerosi compiti tra i quali: la regolazione dell'adesione cellulare, il metabolismo dei tessuti, l'angiogenesi, le risposte infiammatorie, l'integrità dei vasi, l'emostasi, la permeabilità vascolare, la fibrinolisi e la formazione di trombi. La disfunzione endoteliale può essere definita come una ridotta produzione e/o disponibilità di ossido nitrico, una molecola coinvolta nell'omeostasi vascolare, vasodilatazione e inibizione piastrinica. [22] Il diabete modifica la funzione endoteliale, per questo possiamo definire la funzione endoteliale una complicazione microvascolare. Il diabete provoca un eccesso di FFA plasmatici (acidi grassi liberi) che, causano una disregolazione del calcio e la segnalazione dell'insulina, con conseguente riduzione della produzione di ossido nitrico, portano così a una maggior permeabilità endoteliale. Gli FFA contribuiscono anche a una disregolazione a livello del sistema renina-angiotensina (RAAS). Inoltre, gli FFA portano all'attivazione della via infiammatoria NF- κ B che porta ad un aumento della produzione di superossido nell'endotelio, che a sua volta aumenta la concentrazione di una serie di enzimi tra cui NADPH ossidasi, xantina ossidasi, ossido nitrico sintasi. Questi enzimi sono responsabili dell'inattivazione dell'ossido nitrico. Sommando quindi lo stress ossidativo e la condizione di iperglicemia osservata nel diabete, entrambi portano alla glicazione delle proteine plasmatiche e dei lipidi che genera prodotti finali di glicazione avanzata (AGE). Inoltre, anche la resistenza all'insulina riduce la produzione di ossido nitrico. Andando quindi a disregolare queste vie si contribuisce alle proprietà pro-infiammatorie e pro-trombotiche dell'endotelio nel diabete.[23]

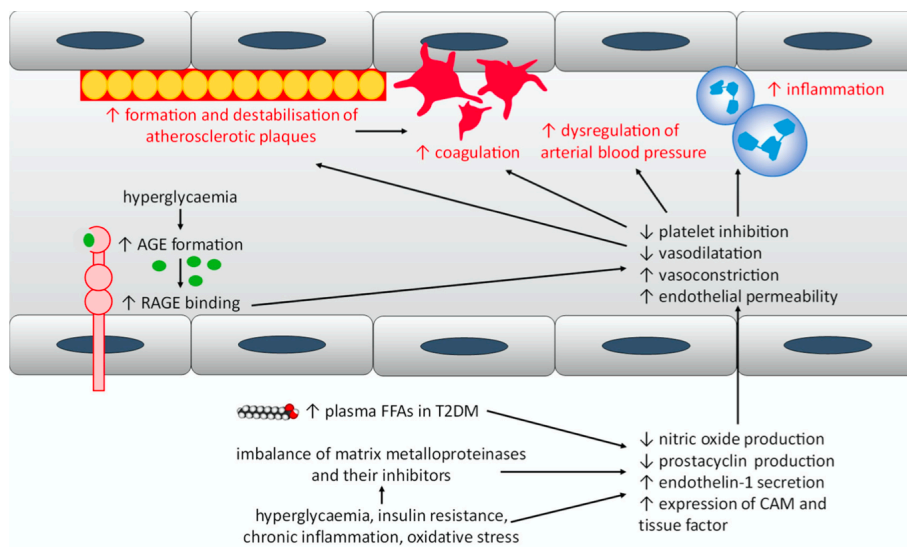


Figura 3: disfunzione delle cellule endoteliali

Le piastrine:

Struttura: le piastrine sono piccole cellule anucleate, numerate da 150 a $350 \times 10^9/L$ negli individui sani. Si formano a partire dal lignaggio ematopoietico tramite il megacariocita. La loro vita media è di 5/7 giorni. La produzione di piastrine dai megacariociti è un processo sistematico e regolato dal midollo osseo. [24] La funzionalità delle piastrine è quella di aderire alla parete di un vaso danneggiato e formare aggregati, dove successivamente interverranno i fattori della coagulazione e il vaso sanguigno verrà ripristinato. Le piastrine sono coinvolte in diversi processi fisiopatologici ad esempio nel meccanismo trombotico e nell'emostasi, ma anche nell'infiammazione, crescita e metastasi del tumore.

Hanno un diametro medio da $2 \mu m$ a $5 \mu m$. La morfologia delle piastrine può essere suddivisa in: zona periferica, zona sol-gel, zona degli organelli e sistemi di membrana.

Zona periferica: la membrana plasmatica piastrinica è liscia e presenta un glicocalice più spesso rispetto ad altre cellule del sangue. Il glicocalice è il sito di primo contatto con l'ambiente circostante. Al di sotto del quale si trova il doppio strato lipidico. In questo strato si trova il fattore tissutale (TF); una volta che le piastrine vengono attivate rilasciano questo fattore tissutale che è in grado di legarsi ai fattori della coagulazione.

Zona Sol-Gel: all'interno della membrana si trova questa zona che come dice il termine è una zona viscosa e trasparente, contiene microtubuli e microfilamenti organizzati, organelli secretori e alcune vescicole lisce e rivestite di clatrina. La presenza dei microfilamenti di actina è responsabile della formazione del citoscheletro del filamento citoplasmatico di actina.

Zona degli organelli: 3 sono i principali tipi di organelli secretori ovvero i granuli α , granuli densi e lisosomi. Una piastrina umana media contiene da 50 a 80 granuli α , che li rende gli organelli più frequenti. La zona al di sotto contiene il fattore di von Willebrand (VWF) in strutture tubolari, importante per il processo di aggregazione piastrinica. Nella zona degli organelli inoltre si trovano anche i mitocondri, che favoriscono il fabbisogno energetico delle piastrine e assicurano che un blocco della glicolisi anaerobica non comprometta la funzione piastrinica.

I granuli α che sono coinvolti in processi come l'adesione cellulare, coagulazione, infiammazione, crescita cellulare e difesa dell'ospite. Granuli densi che contengono alte concentrazioni di nucleotidi. [25]

Funzione piastrine: si ritiene che il ruolo principale delle piastrine in circolazione sia quello di mediare il processo di emostasi primaria e di ripristinare il flusso sanguigno all'interno del vaso.

Quando si verifica un danno vascolare la risposta delle piastrine avviene in più fasi. L'adesione delle piastrine alla matrice extracellulare subendoteliale è il primo passo nell'emostasi primaria attraverso l'interazione iniziale della matrice con recettori specifici sulla piastrina, compreso il legame del complesso GP1b/V/IX al fattore di Von Willebrand. Successivamente si ha un'adesione stabile che provoca la trasduzione del segnale all'interno delle piastrine e l'appiattimento delle piastrine rotonde. L'adesione stabile poi si traduce nella formazione iniziale di coaguli o trombi. Le piastrine attivate all'interno del trombo iniziano a inglobare nuove piastrine dal torrente circolatorio attraverso interazioni piastrine-piastrine mediate dal recettore dell'integrina $\alpha IIb\beta 3$. Le piastrine circolanti verranno attivate attraverso un feedback positivo avviato attraverso la formazione di segnali secondari tramite le ciclossigenasi. Il trombo piastrinico che si è venuto a creare sarà costituito da un "nucleo" di piastrine positive alla P-selectina strettamente impaccate, circondate da un "guscio" di piastrine debolmente impaccate che richiedono un feedback secondario attraverso vari recettori. [26]

Tra i vari agonisti solubili rilasciati si trovano l'ADP, il trombossano (TxA₂) e l'attivazione della trombina. Ciò aumenta la concentrazione di calcio citosolico e attiva vie di segnalazione specifiche. L'ADP agisce sulle piastrine P2Y₁ e P2Y₁₂, soprattutto quest'ultimo ha un ruolo centrale poiché sostiene l'attivazione piastrinica in risposta all'ADP. Il trombossano attiva ulteriori piastrine, creando così nuovi tappi. La trombina è il più potente agonista piastrinico poiché attiva le piastrine attraverso i recettori attivati dalla proteasi sulla superficie delle piastrine tramite GPCR ed è responsabile della conversione di fibrinogeno in fibrina. Tutte queste vie convergono sulla via finale

dell'attivazione piastrinica, ovvero l'attivazione del complesso glicoproteico GP IIb/IIIa che provoca la reticolazione del fibrinogeno portando all'aggregazione piastrinica. [27]

Aterosclerosi: le piastrine sono coinvolte anche nel processo aterotrombotico. L'aterotrombosi si forma in seguito alla rottura o all'erosione di una placca aterosclerotica. È una delle principali cause di sindrome coronarica acuta e morte cardiovascolare. Questa patologia è innescata da un endotelio disfunzionale o danneggiato che causa l'esposizione del tessuto della placca subendoteliale al flusso sanguigno. Ciò concorre all'occlusione dell'arteria aterosclerotica. [28]

Alla base del processo aterotrombotico c'è l'attivazione piastrinica che può essere indotta dall'azione cooperativa di molteplici fattori, come serotonina, epinefrina, trombina, ADP e TXA₂. Le risposte piastriniche alla trombina sono mediate da GPCR di superficie noti come PAR o recettori della trombina. Ne esistono 4 sottotipi che mostrano un'ampia distribuzione tissutale, per la risposta aterotrombotica ci si riferisce al PAR-1. È stato dimostrato che l'inibizione di PAR-1 utilizzando il suo antagonista promuove la riduzione della trombosi arteriosa riducendo l'aggregazione piastrinica, senza aumentare il rischio di sanguinamento. [29] [30]

Iperreattività nel diabetico: [31] il diabete mellito di tipo 2 è una malattia causata da un'iperglicemia cronica. Nel paziente diabetico si verifica un aumento di attivazione, adesione e aggregazione piastrinica. Questa iperreattività si traduce in diverse alterazioni metaboliche caratterizzanti il diabete. L'iperglicemia cronica determina la suscettibilità delle proteine di superficie delle piastrine alla glicazione, che aumentano l'adesione piastrinica alterando la fluidità della membrana. Inoltre, le piastrine hanno una maggiore espressione di molecole di adesione nel T2DM, questi pazienti hanno perciò un'aumentata espressione dei marcatori di attivazione piastrinica rispetto agli individui sani. L'insorgenza di iperglicemia acuta in soggetti sani può determinare un aumento dell'attivazione e della reattività piastrinica, evidenziata da livelli elevati di P-selectina e di marcatori solubili. Accanto a questo è stato riscontrato che l'espressione della P-selectina è associata al glucosio a digiuno e all'emoglobina glicata, ipotizzando che l'attività piastrinica possa essere ridotta avendo un miglior controllo glicemico.

Le funzioni piastriniche sono controllate direttamente dall'insulina attraverso un recettore funzionale dell'insulina presente sulla superficie delle piastrine. Il legame dell'insulina al suo recettore localizzato sulle piastrine attiva il substrato 1 del recettore dell'insulina (IRS-1) tramite la fosforilazione della tirosina e media la sua associazione con la subunità Gi α . Ciò porta a una diminuzione dell'attività di Gi, con aumento dei

livelli di cAMP intra piastrinico, riducendo così la segnalazione di P2Y₁₂ e determinando una diminuzione dell'attività piastrinica.

Ciò che contribuisce all'iperattività piastrinica è anche lo stress ossidativo, che aumenta la concentrazione di calcio intra piastrinico mediante l'attivazione piastrinica e facilitando la risposta di aggregazione piastrinica.

Come anche altre condizioni metaboliche associate ad esempio obesità, dislipidemia e aumento dell'infiammazione sistemica possono contribuire ad aumentare l'iperattività piastrinica.

8.Trattamento del diabete mellito di tipo 2

Gli obiettivi della terapia per il controllo glicemico nel T2DM pongono l'attenzione sul miglioramento del controllo glicemico e non solo, poiché bisogna porre attenzione anche a condizioni quali obesità, ipertensione, dislipidemia e malattie del sistema cardiovascolare. Quest'ultimo è di primaria importanza poiché le malattie cardiovascolari sono la causa principale di morte in questi soggetti.

Gli approcci farmacologici al trattamento comprendono farmaci ipoglicemizzanti, l'insulina in certe situazioni e altri agenti che controllano e migliorano i livelli di glicemia. Nella maggior parte dei casi sono necessari trattamenti farmacologici multipli.

I farmaci ipoglicemizzanti sono distinti in 7 diverse categorie in base al loro meccanismo d'azione. Ci sono farmaci che riducono la produzione di glucosio, farmaci che aumentano la sensibilità all'insulina, farmaci che potenziano l'azione del GLP-1, o farmaci che promuovono l'escrezione urinaria di glucosio.

Le categorie di farmaci sono le seguenti:

- Sulfaniluree
- Biguanidi
- Tiazolidindioni
- Inibitori dell' α glucosidasi
- Agonisti del peptide 1 simile al glucagone (GLP-1RA)
- Inibitori della dipeptidil peptidasi IV (DPP-IV)
- Inibitori del trasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT2)

8.1 Le sulfaniluree

Le sulfaniluree sono state la prima categoria di farmaci ipoglicemizzanti orali ad essere stati autorizzati all'immissione in commercio.

Il loro meccanismo d'azione si basa sul legame al recettore SUR1 presente sul canale del potassio (K^+) a livello della cellula β pancreatica, inibendone l'attività. Questa inibizione causa depolarizzazione di membrana, che a sua volta favorisce l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, l'entrata conseguente di ioni calcio e l'uscita di vescicole contenenti l'insulina. L'ormone così secreto provoca un abbassamento della glicemia nel sangue. Le sulfaniluree sono farmaci appartenenti alla categoria dei secretagoghi insulinici. Se si considera l'ADME si nota che le sulfaniluree vengono assorbite lungo il tratto gastrointestinale, sono ampiamente legate alle proteine plasmatiche soprattutto all'albumina, sono metabolizzate a livello epatico e i metaboliti sono escreti per via urinaria. Pertanto, è importante valutare la loro somministrazione quando si a che fare con pazienti con insufficienza epatica e renale. Si suddividono in due categorie. Quelle di prima generazione comprendono farmaci quali: clorpropamide, tolazamide, tolbutamide hanno un'emivita lunga, si associano a una maggiore incidenza di ipoglicemia, oggi non vengono più utilizzate, ma sono state sostituite dalle sulfaniluree di seconda generazione. A questa categoria appartengono la gliburide, glipizide, gliclazide e glimepiride. Hanno un assorbimento rapido e una migliore copertura dell'incremento glicemico post-prandiale, un'emivita più breve che implica più di una somministrazione al giorno.

La somministrazione con questa tipologia di farmaci deve iniziare con dosi relativamente basse, per poi essere aumentate in 1/2 settimane a seconda dell'andamento della curva glicemica. Bisogna porre attenzione che l'uso a lungo termine è associato a una riduzione delle complicanze micro e macro-vascolari.

Uno degli effetti collaterali più comuni di questa famiglia è l'ipoglicemia. L'ipoglicemia è correlata a pasti ritardati, incremento dell'attività fisica, consumo di alcol o insufficienza renale.

Possono presentare interazioni non solo con l'alcol ma anche con diverse altre tipologie di farmaci come il warfarin, l'acido acetilsalicilico, gli inibitori α -glucosidasi e il fluconazolo.

8.2 Le biguanidi

Il meccanismo d'azione delle biguanidi non è ancora del tutto noto. Questi farmaci esplicano il loro effetto principale a livello del fegato dove stimolano la protein chinasi attivata da AMP (AMPK) riducendo la gluconeogenesi e la lipogenesi, portando alla stimolazione dell'ossidazione epatica degli acidi grassi e all'uptake di glucosio. L'unico farmaco appartenente alle biguanidi e tutt'oggi in commercio è la metformina. (AIC nel 1961)

La metformina è generalmente accettata come trattamento di prima scelta per il T2DM. È efficace sia in monoterapia, sia in combinazione con altri farmaci ipoglicemizzanti. È un farmaco che agisce senza l'intervento dell'insulina, non provoca aumento del peso corporeo, né ipoglicemia. Recenti evidenze suggeriscono che il meccanismo con cui la metformina riduce la produzione epatica di glucosio sia quello di antagonizzare la capacità del glucagone di generare cAMP negli epatociti.

Inoltre, l'uso a lungo termine della metformina è associato alla riduzione delle complicanze micro e macrovascolari. La tossicità principale della metformina è l'acidosi lattica, è molto rara e può essere prevenuta con un'attenta selezione dei pazienti.

Meccanismo d'azione:

Assorbimento: la concentrazione plasmatica viene raggiunta in 2,5 ore. Presenta una biodisponibilità orale del 50-60% nei soggetti sani e viene assorbita a livello del tratto gastrointestinale, nello specifico dall'intestino tenue. La frazione non assorbita viene escreta con le feci circa il 20-30%.

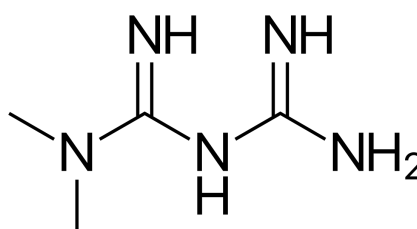


Figura 4: struttura chimica della metformina

L'assunzione di cibo mentre si assume metformina può rallentare leggermente il suo assorbimento.

Distribuzione: non si lega alle proteine plasmatiche. Presenta una rapida distribuzione ai tessuti con significativa distribuzione negli eritrociti.

Metabolismo: nell'uomo non sono presenti metaboliti.

Eliminazione: viene escreta a livello del tubulo renale, nello specifico nella filtrazione glomerulare e secrezione tubulare attiva. Il tempo di emivita di eliminazione corrisponde a circa 6,5 ore. Se viene somministrata a pazienti con funzionalità renale compromessa la clearance renale varia in proporzione a quella che è la concentrazione di creatinina.

8.3 I tiazolidindioni

I tiazolidindioni agiscono riducendo l'insulino-resistenza. Si legano al recettore gamma attivato dal proliferatore perossisomiale (PPAR- γ) componente della superfamiglia dei recettori nucleari per steroidi e ormoni tiroidei. Questi recettori si trovano nel tessuto muscolare, adiposo ed epatico. Hanno il compito di modulare l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico e glucidico, nella trasduzione del segnale mediante dall'insulina e nella differenziazione degli adipociti e di altri tessuti. L'azione su questi recettori media una diminuzione dei livelli di acidi grassi liberi e una diminuzione

dell'output di glucosio epatico. Questi farmaci, inoltre, hanno mostrato di diminuire i livelli dell'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), della proteina C reattiva (PCR) e dell'interleuchina 6 (IL-6). Aumentano l'azione dell'insulina nel fegato, nel tessuto adiposo e nel muscolo scheletrico, garantiscono un miglioramento del controllo glicemico in soggetti con diabete tipo 2 e causano una riduzione media dell'HbA1c dello 0,5-1,4%.

L'autorizzazione all'immissione in commercio risale al 1997, tutt'oggi rimangono solo 2 farmaci utilizzabili ovvero: pioglitazone e rosiglitazone. Sono controindicati in pazienti con malattie epatiche o scompenso cardiaco.

8.4 Inibitori dell' α glucosidasi

Gli inibitori dell' α glucosidasi chiamati anche gliptine sono farmaci che inibiscono competitivamente le α glucosidasi, enzimi deputati all'idrolisi del maltosio, a livello dell'orletto a spazzola della mucosa intestinale, così da ridurre le oscillazioni postprandiali della glicemia ritardando la digestione e l'assorbimento di amido e disaccaridi.

Questi farmaci aumentano anche il rilascio in circolo dell'ormone regolatorio della glicemia GLP-1, contribuendo all'abbassamento della glicemia. I farmaci che appartengono a questa categoria sono: l'acarbiosio, il miglitolo e il voglibosio.

Possono essere utilizzati in combinazione con altri antidiabetici orali e/o con insulina.

I principali effetti avversi degli inibitori dell' α glucosidasi includono flatulenza, diarrea e dolori addominali che sono provocati dalla comparsa di carboidrati non digeriti nel colon che vengono fermentati in acidi grassi a catena corta con liberazione di gas. Autorizzazione all'immissione in commercio nel 1995.

8.5 Gli agonisti del peptide 1 simile al glucagone (GLP1-RA)

Gli agonisti del peptide 1 simile al glucagone (GLP1-RA) sono farmaci incretino-mimetici, perché agiscono andando a simulare le incretine, piccoli ormoni prodotti a livello intestinale che vengono secrete dopo i pasti e controllano i livelli glicemici. Agiscono promuovendo l'attivazione del recettore di GLP1 che appartiene alla famiglia dei recettori del glucagone tra i GPCR (GPCR di classe B). I recettori del GLP1 sono espressi nelle cellule β pancreatiche, nelle cellule del SNC e periferico, nel cuore e nei vasi, nel rene, nel polmone e nella mucosa gastrointestinale. L'attivazione del recettore di GLP1 dà inizio anche alla trasmissione di segnali via PKC e PI3K, o alterando l'attività di numero canali ionici. Nelle cellule β il risultato è l'aumento della biosintesi e dell'esocitosi dell'insulina in modo glucosio-dipendente. L'effetto del GLP1 è glucosio

dipendente per cui il rilascio di insulina è maggiore quando i livelli di glucosio sono elevati, ma minore quando i livelli di glucosio sono normali. Proprio per questo motivo il GLP1 ha un rischio minore di causare ipoglicemia rispetto alle sulfaniluree. È degradato rapidamente attraverso la dipeptidil-peptidasi 4 (DPP4) ed è eliminato dal rene. Non promuovono un aumento di peso. La somministrazione endovenosa o sottocutanea di GLP1 può causare nausea e/o vomito, inoltre non dovrebbero essere somministrate a pazienti con insufficienza renale poiché la loro escrezione avviene a livello del rene.

Si suddividono in 2 categorie i farmaci a breve durata d'azione come exenatide e lixisenatide con meccanismo d'azione che si basa su una copertura principalmente postprandiale; quelli a lunga durata d'azione che sono liraglutide, albiglutide, dulaglutide con meccanismo d'azione di riduzione sia della glicemia postprandiale, sia quella a digiuno.

Autorizzazione all'immissione in commercio nel 2005.

⇒ **Effetti cardiovascolari**

Diversi studi clinici hanno confermato che i GLP1-RA promuovono una protezione a livello cardiovascolare, senza però definire le modalità con cui essa avvenga. [32] Alla base di questi effetti sono stati proposti complessi meccanismi che includono effetti antinfiammatori, attenuazione del danno ischemico cardiaco, modifica della sintesi e della secrezione lipidica e miglioramento della disfunzione endoteliale.[33]

Effetti antiaterosclerotici di questa classe di farmaci attraverso la riduzione dei livelli di metalloproteinasi-2 della matrice (MMP2) o l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari, i loro effetti antinfiammatori e i loro effetti sulla funzione endoteliale. Inoltre, i farmaci GLP1-RA hanno mostrato una significativa riduzione del 10% del rischio relativo di mortalità cardiovascolare, infarto miocardico non fatale e ictus non fatale. [34]

Lo studio clinico SUSTAIN-6 ha confermato che il trattamento con semaglutide riduce del 26% il rischio di morte per cause cardiovascolari, inoltre questi pazienti hanno anche un rischio inferiore di nefropatia. L'assunzione di semaglutide è associata infine a riduzioni significative e prolungate dei livelli di HbA1c. [35], [36]

Lo studio clinico LEADER è uno studio randomizzato dove si evidenzia come il trattamento con liraglutide diminuisca il rischio di morte cardiovascolare, infarto miocardico e ictus non fatale. [36]

Infine, anche lo studio REWIND che prende in considerazione la dulaglutide dimostra come il farmaco riduca del 12% il rischio cardiovascolare rispetto al placebo.

⇒ Effetti sulle piastrine:

Diversi studi inoltre hanno dimostrato che l'utilizzo dei GLP1-RA può inibire lo stato di attivazione delle piastrine in pazienti affetti da T2DM e inibire di conseguenza la trombosi, anche se il meccanismo molecolare con cui avviene non è ancora completamente compreso.[37], [38] Un ulteriore studio mette in luce come l'inibizione piastrinica da parte del GLP1-RA coinvolga la via di segnalazione recettore/cAMP/PKA con potenziali importanti implicazioni cliniche per il trattamento dello shock settico. [38]

8.6 Gli inibitori della dipeptidil-peptidasi IV (DPP IV)

La dipeptidil-peptidasi IV è un enzima responsabile della degradazione delle incretine, è una serino-proteasi largamente distribuita in tutto l'organismo, espressa come ectoenzima sulle cellule endoteliali, sulla superficie dei linfociti T, ma è anche presente in una forma circolante. Gli inibitori della DPP IV bloccano questo enzima e favoriscono così l'incremento della biosintesi dell'insulina. Inoltre, sembrano avere un effetto preferenziale sulla glicemia postprandiale. L'inibizione di DPP IV non sembra presentare effetti diretti sulla sensibilità all'insulina, sulla motilità gastrica o sul senso di sazietà. L'autorizzazione all'immissione in commercio avviene nel 2006.

A questa famiglia appartengono: sitagliptin, saxagliptin, linagliptin, alogliptin.

8.7 Gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT2)

Questi farmaci agiscono sul cotrasportatore sodio-glucosio 2 situato nella porzione prossimale del tubulo renale.

SGLT2 è un trasportatore a bassa affinità e alta capacità che trasporta il glucosio contro un gradiente di concentrazione dal lume del tubulo utilizzando l'energia generata dal flusso di Na^+ attraverso le cellule epiteliali.

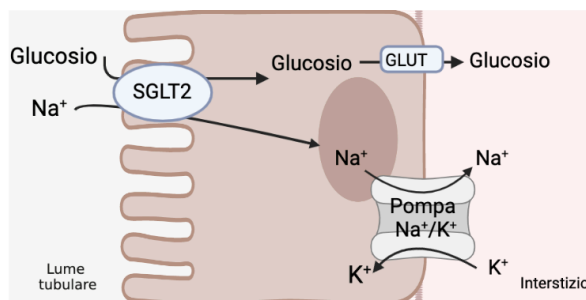


Figura 5: cotrasportatore SGLT2 a livello renale

Questo cotrasportatore è responsabile del 90% del riassorbimento di glucosio e la sua inibizione determina glicosuria e più bassi livelli di glucosio in pazienti con T2DM.

Questi farmaci vanno a inibire il riassorbimento di glucosio e abbassano la glicemia favorendo l'eliminazione di glucosio con le urine, da circa 180 mg/dL a 50 mg/dL.

Hanno una buona biodisponibilità dopo somministrazione orale (60-80%) che non è influenzata dall'assunzione di cibo e raggiunge valori massimi 1-2 ore dopo l'assunzione. Sono legati alle proteine circolanti per circa il 90% con una emivita di circa 12 ore, ciò li rende adatti per una singola somministrazione giornaliera. Sono metabolizzati per glucuronazione e i metaboliti inattivi eliminati per via renale.

Gli effetti collaterali sono prevedibili in base al loro meccanismo d'azione. La perdita eccessiva di glucosio può portare a un aumento della diuresi con conseguente ipotensione. È descritto un lieve aumento 1-2% delle infezioni delle basse vie urinarie e un aumento del 3-5% delle infezioni micotiche.

Non causano ipoglicemia.

L'autorizzazione all'immissione in commercio è stata rilasciata recentemente nel 2012 da parte dell'EMA e nel 2014 da parte del FDA.

Ad oggi, sono tre gli inibitori di SGLT2 disponibili per uso clinico: dapagliflozina, empagliflozina e canagliflozina.

♦ **Dapagliflozina:** [39]

Farmaco

appartenente alla
categoria degli
inibitori SGLT2. È un

inibitore selettivo e
reversibile. Agisce

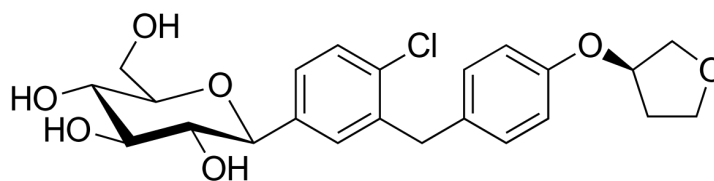


Figura 6: struttura chimica dapagliflozin

a livello renale riducendo la glicemia e aumentando la glicosuria, con un meccanismo insulino-indipendente.

I benefici cardiaci e renali mediante l'utilizzo di questo farmaco sono stati dimostrati negli studi DAPA-HF e DAPA-CKD. [40][41]

Dapagliflozin riduce l'emoglobina glicata dello 0,5-0,8% usato da solo o in combinazione con altri farmaci antidiabetici orali o insulina. Può modificare il peso corporeo di 2-4 kg. Migliora la glicemia a digiuno, sia la glicemia post-prandiale e riduce il riassorbimento renale di glucosio che porta all'escrezione urinaria di glucosio. L'effettiva quantità di glucosio rimossa attraverso questo meccanismo dipende dalla concentrazione ematica di glucosio e dal GFR.

Inoltre, dapagliflozin è più selettivo di 1400 volte per SGLT2 rispetto a SGLT1 espresso a livello intestinale.

Dosaggio indicato di 10 mg, ridotto a 5 mg per pazienti che hanno un danno epatico.

◆ Empagliflozin: [42]

È un inibitore reversibile, molto potente, competitivo e selettivo del co-trasportatore sodio-glucosio di tipo 2.

Riduce dello 0,5-0,7% il valore di emoglobina glicata (HbA1C) quando usato da solo o in combinazione con altri farmaci antidiabetici orali o insulina.

Provoca un abbassamento del peso corporeo di 2-3 kg.

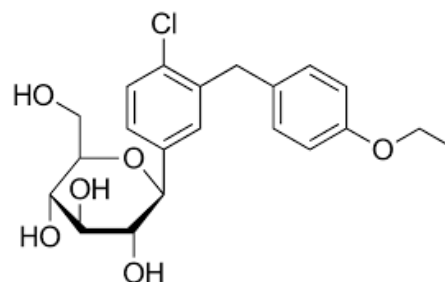


Figura 7: struttura chimica empagliflozin

Empagliflozin è più selettivo di 5000 volte per SGLT2 rispetto a SGLT1.

La quantità di glucosio rimossa dal rene tramite il meccanismo glicosurico è dipendente dalla concentrazione di glucosio nel sangue e dalla GFR.

Dosaggio indicato di 10 mg al giorno, possono essere utilizzati anche 25 mg al giorno.

◆ Canagliflozin:[43]

Il canagliflozin è un inibitore attivo per via orale del co-trasportatore renale SGLT2 riduce la soglia per la glicosuria da 180 mg/dl a 70-90 mg/dl. È in grado di abbassare il livello di emoglobina glicata dello 0,6-1% quando utilizzato da solo o in combinazione con altri farmaci antidiabetici orali o insulina.

Dosaggio indicato è pari a 100mg al giorno, anche se la dose può essere aumentata

fino a 300 mg al giorno in pazienti con una funzione renale normale.

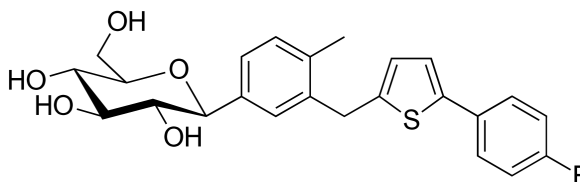


Figura 8: struttura chimica canagliflozin

⇒ Effetti cardiovascolari degli inibitori SGLT2

Gli inibitori SGLT2 si sono mostrati protettivi per il rischio sostanziale di malattie cardiovascolari e renali. Nello studio EMPA-REG OUTCOME si mette in luce come empagliflozin riduce il rischio di eventi avversi cardiovascolari nei pazienti affetti da T2DM, inoltre c'è anche stata una progressione più lenta della malattia renale. La malattia renale si sviluppa circa nel 35% dei pazienti affetti da T2DM ed è associata a un aumento della mortalità. [44] In aggiunta c'è stato lo studio EMPEROR-Reduced che ha dimostrato che l'empagliflozin riduce il rischio per morte cardiovascolare e

ospedalizzazione per insufficienza cardiaca in pazienti con nota frazione di eiezione ridotta.

Il canagliflozin ha mostrato anch'esso effetti protettivi. Lo studio CANVAS afferma che i pazienti che assumevano canagliflozin avevano un rischio inferiore di eventi cardiovascolari ma, un rischio maggiore di amputazione a livello dell'alluce o del metatarso. [45] Infine, il dapagliflozin si è dimostrato efficiente per quanto riguarda il numero di ospedalizzazioni per insufficienza cardiaca. Lo studio DECLARE-TIMI 58 è stato un ampio studio che ha valutato gli esiti cardiovascolari e ha prevenuto gli eventi cardiovascolari, in particolare il ricovero per insufficienza cardiaca in un'ampia gamma di pazienti, indipendentemente dalla presenza di una storia di malattia aterosclerotica o insufficienza cardiaca.[46] [47]

Questi risultati confermano la funzionalità cardioprotettiva della famiglia degli inibitori SGLT2, tuttavia non si sono ancora ben compresi quali siano i meccanismi fisiopatologici alla base. [48] I meccanismi tutt'ora validi si possono esplicitare nei seguenti punti:

Aumento dei livelli di eritropoietina: l'utilizzo degli inibitori SGLT2 provoca un aumento dell'ematocrito, che promuove l'eritropoiesi attraverso una maggior secrezione di eritropoietina (EPO) nel rene. L'aumento di eritropoietina e l'aumento di conseguenza della massa cellulare dei globuli rossi avviene poiché a livello renale viene ridotta la produzione di ATP. Il rene va in ipossia e per sopperire a questa mancanza di ossigeno viene stimolato il midollo alla produzione renale di eritropoietina.

Perdita di peso corporeo: l'assunzione degli inibitori SGLT2 ha promosso un miglioramento del peso corporeo, poiché provocano una maggior mobilitazione dei lipidi. Uno studio clinico ha confermato che pazienti diabetici in trattamento con gli inibitori SGLT2 hanno avuto una perdita di peso corporeo di circa 2,7 kg.

Produzione dei corpi chetonici: le persone affette da diabete hanno una ridotta captazione del glucosio, che pertanto non può essere utilizzato come fonte primaria di energia. L'assunzione degli inibitori SGLT2 diminuisce ulteriormente la quantità di glucosio nel sangue, il cuore pertanto si trova costretto a usufruire di una nuova fonte di energia proveniente dalla presenza dei corpi chetonici, che migliorano l'efficienza cardiaca e favoriscono la riduzione dell'ossigeno.

Induzione autofagia e produzione di adipochine: la terapia con gli inibitori SGLT2 è risultata efficiente perché questi farmaci hanno sovraregolato l'espressione di AMPK, SIRT1 e HIF1 α promuovendo anche l'eliminazione di mitocondri disfunzionali, le cellule reattive dell'ossigeno (ROS). Si è visto anche che i pazienti con insufficienza cardiaca hanno un aumento della leptina sierica e gli inibitori si sono mostrati efficienti nel

ridurre i livelli plasmatici della leptina, favorendo l'aumento dell'adiponectina deputata a una maggior protezione cardiovascolare.

Omeostasi ionica cardiaca: gli inibitori SGLT2 non intervengono solo a livello renale, ma si è trovata un'affinità con il recettore NHE1 a livello cardiaco. Le persone affette da T2DM hanno una sovraregolazione dello scambiatore sodio idrogeno (Na^+/H^+) con aumento del sodio intracitosolico, ciò fa sì che ci sia un afflusso di calcio con aumento di calcio intracellulare e di conseguenza minore deposizione di quest'ultimo nel reticolo sarcoplasmatico dei cardiomiociti. Con la terapia SGLT2 si ha un'inversione del sovraccarico di calcio che è indipendente dallo stato del diabete.

⇒ Effetti sulle piastrine:

Le piastrine sono l'elemento chiave con cui inizia il processo aterosclerotico. La riduzione della glicemia mediante il trattamento con inibitori SGLT2 ha normalizzato i livelli di piastrine reticolate. Spigoni *et al.* hanno mostrato che sia empagliflozin che dapagliflozin riducono l'infiammazione e lo stress ossidativo e potrebbero ridurre l'attivazione piastrinica stimolata dall'ADP.[49] Lo studio ha dimostrato che entrambi i farmaci hanno determinato una riduzione dell'attivazione delle piastrine, riducendo l'espressione sulla loro superficie di P-selectina e del complesso glicoproteico GPIIb/IIIa. [50]

9. Il trascrittoma delle piastrine

L'analisi del trascrittoma permette di conoscere tutti i trascritti presenti all'interno di un determinato tipo di cellule, quindi non solo gli mRNA ma anche gli RNA non codificanti, microRNA e RNA circolari. Benché le piastrine siano prive di DNA e nucleo, non sono prive di un trascrittoma completo. Infatti, è stato descritto che i trascritti nelle piastrine possono essere tradotti in proteine, influenzando così la risposta piastrinica. L'RNA presente nelle piastrine circolanti origina dai loro progenitori midollari; la maggior parte degli mRNA traducono per proteine coinvolte nelle modifiche del citoscheletro, nelle vie di segnalazione delle chemochine, nell'adesione cellulare, nell'aggregazione piastrinica. [51], [52]

Le piastrine sono implicate in diversi processi fisiopatologici, diversi studi confermano che il trascrittoma piastrinico è piuttosto stabile, poiché non risente dell'influenza di parametri clinici come l'età, il sesso, mentre può essere modificato in presenza di stati patologici come l'infarto del miocardio. Con la tecnologia Next Generation Sequencing si è potuto studiare in maniera approfondita il trascrittoma rilevando sia trascritti rari, non codificanti e splicing alternativi.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è quello di analizzare il profilo del trascrittoma delle piastrine di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 e di confrontare gli effetti del trattamento farmacologico in questi pazienti in terapia con metformina+ inibitori SGLT2, metformina+ GLP1 recettore agonisti e con solo metformina.

MATERIALI E METODI

1. Casistica dello studio

Sono stati reclutati 17 pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 provenienti dall'Ambulatorio di Diabetologia dell'Unità Operativa di Malattie del Metabolismo del Dipartimento di Medicina dell'Università di Padova.

I criteri di inclusione sono stati:

- diagnosi di diabete di tipo 2 secondo le linee guida delle Società Internazionali;
- età compresa tra i 18-82 anni;
- entrambi i sessi;
- terapia con solo metformina, oppure metformina+ GLP1-RA oppure metformina con inibitori SGLT2;
- assenza di complicanze croniche avanzate o altre patologie rilevanti;

I criteri di esclusione sono stati:

- diagnosi di diabete di tipo 1;
- diagnosi di diabete autoimmune di tipo 2;
- diagnosi di diabete di tipo 2 indotto da farmaci;
- presenza di complicanze croniche avanzate o altre patologie rilevanti;
- terapia con insulina o altri farmaci ipoglicemizzanti;

1.1 Disegno dello studio

I prelievi da sangue venoso dei 17 pazienti in studio sono stati raccolti tra giugno 2021 e luglio 2022 e sono stati così suddivisi:

- 6 in trattamento con inibitori SGLT2 + metformina: dosaggi utilizzati empagliflozin 5mg, 10mg, 12,5 mg
- 6 in trattamento con GLP1-RA + metformina: dosaggi utilizzati sono dulaglutide 0,75 mg, 1,5 mg/ semaglutide 1 mg
- 5 in trattamento con metformina: dosaggi di metformina utilizzati 500mg, 750mg e 1000mg

I prelievi sono stati effettuati a digiuno per calcolare i livelli di glucosio, emoglobina glicata e profilo lipidico, attraverso metodi enzimatici standard, ematocrito.

Da questi prelievi poi verrà condotta in seguito l'estrazione piastrinica e il successivo studio del trascrittoma piastrinico.

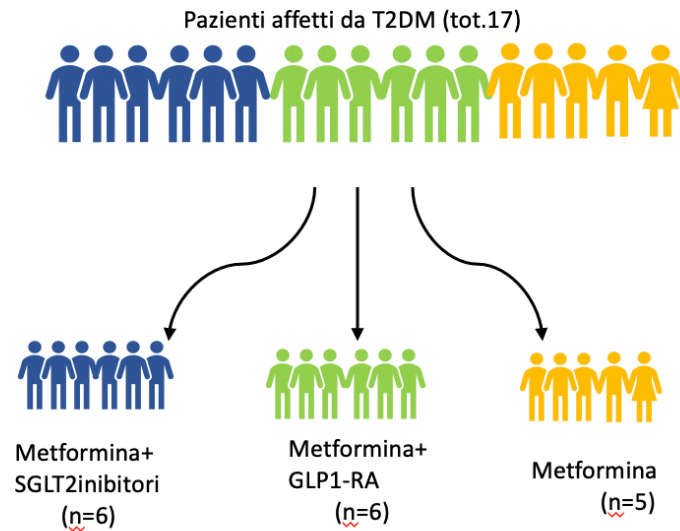


Figura 9: casistica dello studio

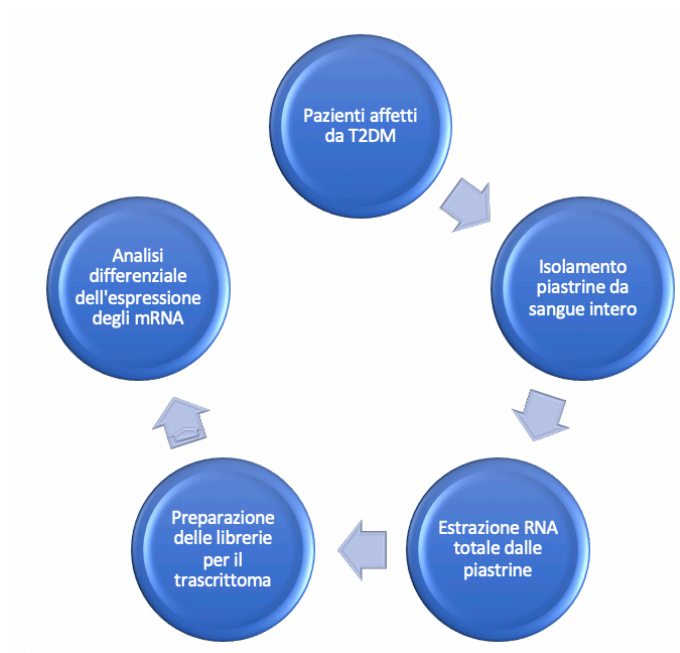


Figura 10: disegno dello studio

2. Isolamento e quantifica delle piastrine

I prelievi sono stati raccolti in due provette Vacutainer da 6 mL contenenti l'anticoagulante EDTA, il quale inibisce l'attivazione e l'aggregazione piastrinica attraverso la chelazione del calcio. I prelievi sono stati posti in centrifuga così da separare la frazione plasmatica (PRP) dal resto del sangue.

Successivamente si preleva solo il PRP, facendo attenzione a non toccare il *buffy coat* per evitare contaminazioni di leucociti. Il PRP viene posizionato in una eppendorf e viene centrifugato per ottenere il pellet di piastrine.

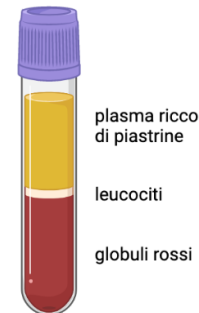


Figura 11: vacutainer 6mL

A questo punto viene rimosso il surnatante e si risospendono le piastrine in PBS (tampone fosfato salino) per effettuare un lavaggio. Infine, dopo la centrifuga, si rimuove il surnatante, si risospende il pellet in 700 μ L di QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) e si conserva il campione a -80°C , finché non viene utilizzato per gli step successivi.

Per verificare che il metodo utilizzato per isolare le piastrine sia adeguato si è utilizzato l'analizzatore ematologico CELL-DYN Emerald (Abbott).

Per l'analisi si è presa un'aliquota di piastrine risospese in PBS. Lo strumento è dotato di un capillare che preleva circa 10 μ L di campione e classifica i tipi cellulari presenti in esso per quantità e dimensioni. Lo strumento effettua le misure relative a leucociti, eritrociti e piastrine seguendo il principio impedenziometrico Coulter.

3. Estrazione dell'RNA dalle piastrine

Per estrarre l'RNA è stato utilizzato il protocollo del kit miRNeasy Micro (Qiagen), un kit appositamente progettato per la purificazione dell'RNA totale. [53]

Il campione viene scongelato e incubato a temperatura ambiente (RT). Viene aggiunto del cloroformio e viene posto in incubazione a RT. Successivamente il campione è stato posto in centrifuga a 4°C per 15 minuti ed è stato separato in tre fasi: la fase superiore acquosa contiene l'RNA, l'interfase e la fase organica contengono DNA e proteine. È stata estratta solo la fase superiore, facendo attenzione a non trasportare materiale dalle altre due fasi. È stato poi aggiunto dell'etanolo assoluto e la miscela è stata trasferita in una colonnina *RNeasy MinElute*, posizionata su una provetta che viene centrifugata e alla fine si elimina l'eluato. Si aggiunge poi un buffer RWT fornito dal kit,

si effettua una centrifuga e si elimina l'eluato. Durante questa fase l'RNA si lega alla membrana presente sul fondo della colonnina e gli altri contaminanti vengono eliminati passando nella provetta sottostante. A questo punto si effettua una digestione tramite DNasi, specifica per campioni che contengono meno di 1 µg di RNA e si mettono i campioni in incubazione. Infine, si aggiungono il buffer RWT, Buffer RPE e l'etanolo 80%, con centrifuga e successiva eliminazione dell'eluato dopo ogni aggiunta. L'eluazione finale viene effettuata con *RNasi free water* e in questo caso viene tenuto l'eluato. L'RNA così ottenuto va conservato a -80°C.

4. Quantificazione dell'RNA estratto

Per quantificare l'RNA estratto è stato utilizzato lo strumento Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) che permette di misurare la concentrazione di una determinata sostanza tramite l'utilizzo di coloranti fluorescenti che legano in modo specifico la molecola di interesse. I coloranti utilizzati emettono fluorescenza nel momento in cui si legano ai loro target e l'intensità del segnale fluorescente è direttamente proporzionale alla concentrazione del target nella soluzione. Il legame con il DNA avviene per intercalazione tra le basi azotate. Una conformazione più rigida a tali molecole che diventano molto fluorescenti.

Vengono poi allestiti dei due campioni standard contenenti concentrazioni note di RNA, che servono per sviluppare una curva di calibrazione. Lo strumento una volta rilevato il segnale fluorescente restituisce un valore di concentrazione di RNA di ogni campione che viene espressa in ng/µL.

5. Preparazione delle librerie

Per la preparazione delle librerie è stato seguito il protocollo del kit *Illumina Stranded mRNA Prep Ligation (Illumina)*. [54]

I passaggi principali del protocollo sono riassunti in figura 12.

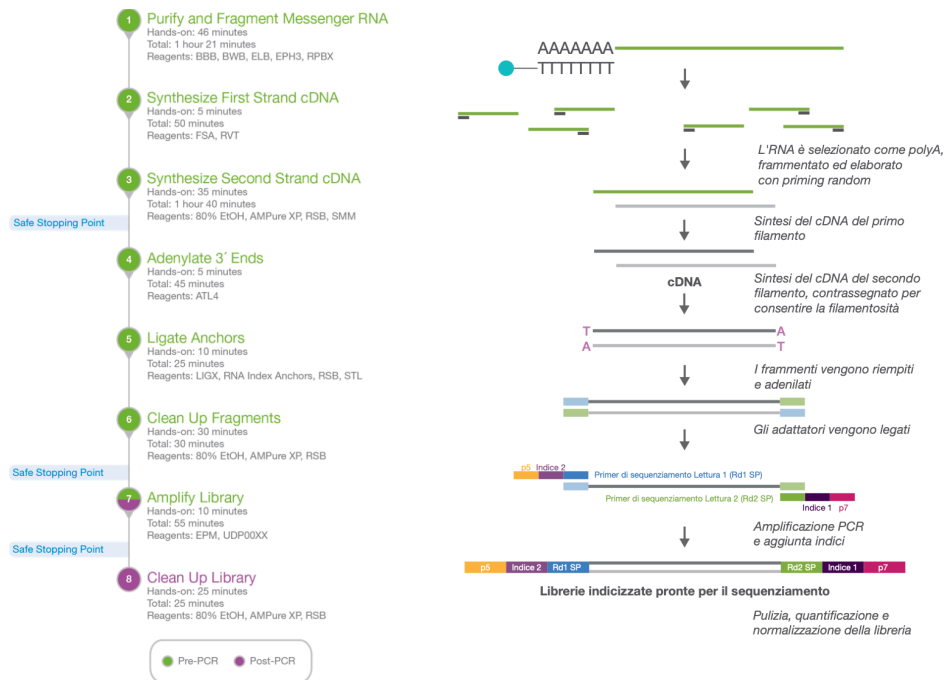


Figura 12: preparazione delle librerie

5.1 Purificazione e frammentazione dell'mRNA

In questo step si utilizzano biglie magnetiche oligo(dT) per catturare l'mRNA che presenta code di poliA. L'RNA di partenza viene successivamente frammentato ed elaborato con *priming random* per la sintesi di cDNA.

La piastra è stata quindi posta nel termociclatore per far avvenire la reazione di legame tra le biglie e l'mRNA, è stata poi posizionata su un supporto magnetico, il quale sequestra le biglie legate all'mRNA. È stato eliminato tutto il surnatante, non legato alle biglie, e infine viene nuovamente eseguita l'operazione di cattura delle biglie con rimozione del surnatante. Una volta ottenuta la purificazione si prosegue con la frammentazione dell'mRNA attraverso l'aggiunta della Fragmentation Master Mix, spipettando accuratamente per rendere omogenea la soluzione. La soluzione è stata incubata a e poi centrifugata per essere infine posta nel termociclatore con uno specifico programma. Al termine della reazione l'mRNA è stato frammentato e non risulta più legato alle biglie; quindi, con il supporto magnetico, le biglie sono state sequestrate ed il surnatante è stato trasferito in una nuova piastra per le fasi successive.

5.2 Sintesi cDNA

In questo step l'RNA frammentato viene retrotrascritto per produrre il primo filamento di cDNA a doppio filamento. Per la sintesi del primo filamento è stata utilizzata la First

Strand Synthesis Master Mix, preparata con FSA (First Strand Synthesis Act D mix) e l'enzima trascrittasi inversa. FSA contiene Actionomicina D, che consente la sintesi RNA-dipendente e previene la sintesi spuria dipendente dal DNA. I campioni sono stati posti poi nel termociclatore per far avvenire la sintesi del primo filamento. Nello step successivo viene sintetizzato il secondo filamento di cDNA a doppio filamento con estremità tronche. Anche in questo caso vengono aggiunti diversi reagenti e la soluzione viene posta in termociclatore. Successivamente si è effettuata la purificazione dei frammenti tramite l'uso di biglie magnetiche (precedentemente vortexate) leganti il DNA. Dopo aver effettuato un'incubazione a RT, tramite supporto magnetico si sequestrano le biglie per rimuovere il surnatante. Le biglie vengono accuratamente lavate con etanolo 80%. Il passaggio viene ripetuto una seconda volta, e bisogna avere cura di aver rimosso completamente tutto l'etanolo presente nei pozzetti. Infine, vengono fatte asciugare e poi risospendere e sempre tramite magnete, una volta allontanate le biglie, viene raccolto il surnatante, utile per i prossimi step.

5.3 Adenilazione dell'estremità 3'

Questo passaggio permette di aggiungere una deossiadenosina alle estremità 3' tronche dei frammenti di cDNA. Questo impedisce che i frammenti si leghino tra loro e permette inoltre agli adattatori di legarsi ai frammenti poiché degli adattatori è presente un nucleotide complementare di deossitimidina. Il reagente utilizzato in questo step è: ATL4 (A-Tailing Mix) e la reazione viene effettuata tramite termociclatore.

Gli adattatori sono sequenze nucleotidiche che comprendono le ancore, gli indici e i primer per il sequenziamento NGS.

5.4 Ligazione delle ancore

In questo step vengono legate le ancore *pre-index* alle estremità dei frammenti di cDNA a doppio filamento per prepararli al *dual indexing*. Le ancore sono oligonucleotidi utili per il sequenziatore NextSeq in quanto sono complementari alle sequenze presenti sulla flowcell.

5.5 Clean up dei frammenti

In questo step vengono utilizzate le biglie magnetiche per purificare i frammenti a cui sono state legate le ancore.

Si aggiungono al campione le biglie magnetiche. Dopo aver effettuato un'incubazione a RT, tramite supporto magnetico vengono sequestrate le biglie per rimuovere il surnatante. Le biglie vengono lavate con etanolo 80% preparato al momento. Si ripete

questo passaggio una seconda volta e si rimuovono tutti i residui di etanolo presente nei pozzetti. Le biglie vengono fatte asciugare, evitando che non si seccino eccessivamente. Vengono poi risospese e incubate. Successivamente tramite magnete e cattura delle biglie il surnatante viene trasferito in una nuova piastra.

5.6 Amplificazione delle librerie

In questo step i frammenti di cDNA legati alle ancore vengono amplificati utilizzando una reazione di PCR. Inoltre, vengono legati gli index e le sequenze primer, che consentono alla DNA polimerasi di procedere con la sintesi di nucleotidi e di generare i *cluster* sulla *flowcell* durante il sequenziamento NGS. La risultante della reazione è una libreria *dual-indexed*.

Gli indici legati sono sequenze oligonucleotidiche uniche che vengono assegnati in modo univoco a ogni campione. A ogni campione vengono assegnate due sequenze distinte: l'indice 1(i7) e l'indice 2(i5), che si legheranno a ciascuna estremità dei frammenti di cDNA. Ad ogni pozzetto della piastra si è quindi aggiunto l'indice UDPOXXX scelto per quel determinato campione e la piastra è poi stata posta nel termociclatore per effettuare la reazione di PCR.

Il prodotto finale è una libreria a doppia indicizzazione (*dual-indexed*), cioè frammenti di cDNA con adattatori legati a ciascuna estremità.

5.7 Clean up delle librerie

In questo passaggio vengono utilizzate le biglie magnetiche per purificare le librerie *dual-indexed*. Il procedimento utilizzato è analogo a quello delle fasi precedenti. Ora le librerie sono pronte per il sequenziamento.

6.Quantificazione delle librerie

Le concentrazioni delle librerie sono state quantificate tramite Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) con la stessa procedura usata per la quantifica dei campioni di RNA, ma utilizzando il kit specifico per il DNA.

Il kit utilizzato per la quantificazione delle librerie è il Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

7.Controllo qualità librerie

Il controllo qualità delle librerie è stato effettuato mediante il LabChip GX.

Questo controllo viene effettuato per determinare la lunghezza media dei frammenti delle librerie. Di media la lunghezza ideale per un buon sequenziamento è di 300-400 paia di basi. Questo strumento utilizza un sistema di elettroforesi capillare per determinare la lunghezza dei frammenti di DNA nei campioni, i quali vengono precedentemente marcati con fluoroforo.



Figura 13: LabChip GX

Prima di caricare lo strumento è necessario aspirare il contenuto dei pozzetti attivi del chip (1, 3, 4, 7, 8, 10) ed effettuare due lavaggi in tali pozzetti con acqua milliQ. Una volta aspirata l'acqua dai pozzetti, si aggiunge la Gel-Dye Solution nei pozzetti 3, 7 e 8 e nel pozzetto 10, utilizzando la tecnica di pipettamento inverso. Nel pozzetto 4 viene aggiunto il *marker*. Una volta posizionati il chip e la piastra contenente i campioni diluiti nello strumento ed inserito il *ladder tube* e il *buffer tube* nei rispettivi alloggiamenti, si può procedere con l'analisi.

Lo strumento, quindi, legge l'intensità della fluorescenza lungo il capillare e alla fine genera un elettroferogramma. Inoltre, viene anche prodotta una rappresentazione digitale della corsa elettroforetica. Un esempio dei risultati è visibile in figura 14.

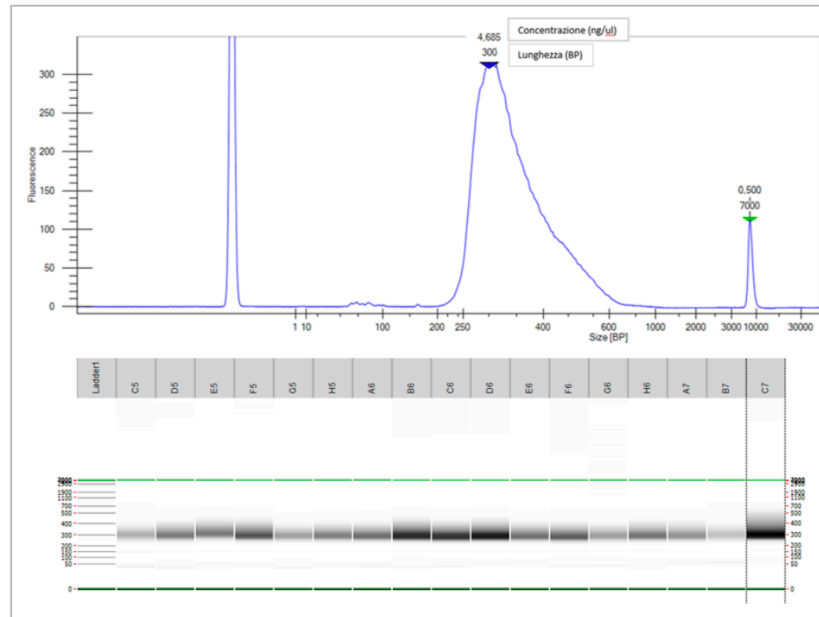


Figura 14: in alto: elettroferogramma mostra l'intensità della fluorescenza emessa dai frammenti marcati in relazione alla loro lunghezza. in basso: gel della corsa elettroforetica nei 17 campioni

8. Diluizione del pool per il sequenziamento

Utilizzando la lunghezza media dei frammenti, ottenuta dopo l'analisi tramite LabChip, e le concentrazioni lette al Qubit, si è calcolata la concentrazione molare di ogni libreria attraverso la formula:

$$\frac{\text{concentrazione in ng/ml}}{\frac{660g}{mol} \times \text{average library size}} \times 10^6 = \text{molarità (nM)}$$

Le librerie sono state quindi diluite e portate tutte alla stessa concentrazione di 10 nM e successivamente sono state unite in un'unica provetta.

Per eseguire il sequenziamento su NextSeq™ 550 (Illumina) il pool di librerie è stato denaturato e diluito ad una concentrazione finale di 1,2pM. Il pool infine è stato combinato con una libreria PhiX denaturata e diluita a 1,8pM. La libreria PhiX è una libreria utilizzata come controllo durante il sequenziamento, derivata dal genoma di un batteriofago, è concentrata (10 nM in 10 μL) con una dimensione media di 500 bp ed è caratterizzata da una composizione bilanciata di basi circa 45% GC e circa 55% AT. Questa libreria PhiX fornisce un controllo di qualità per la generazione dei cluster, il sequenziamento e l'allineamento. Vengono combinati i due pool ovvero, la libreria denaturata 1,2 pM viene combinata con il 2% di libreria PhiX 1,8 pM per poi essere caricata nel sequenziatore NextSeq™ 550 (Illumina).[55]

9. Sequenziamento con NextSeq 550

Il sequenziamento dell'RNA con un sequenziatore di nuova generazione (NGS) rappresenta un metodo efficace per la scoperta, l'identificazione del profilo e la quantificazione dei trascritti dell'RNA. Il sequenziatore NextSeq 550 (Illumina) si basa sulla tecnologia del sequenziamento per sintesi (SBS), che consiste nel rilevare le singole basi man mano che vengono incorporate in un filamento di DNA in crescita. La corsa di sequenziamento del pool di librerie denaturate viene eseguita mediante l'utilizzo di una High-Output *flowcell* (75x2 cicli) e di una cartuccia. La cartuccia contiene tutti i reagenti necessari per la generazione dei cluster e il sequenziamento. Il pool delle librerie denaturate viene caricato nell'apposito alloggiamento sulla cartuccia. Una volta avviata la corsa nel sequenziatore NextSeq™ 550 il cDNA, frammentato e legato agli adattatori su entrambi i lati, si ibridizza alla *flowcell*, che rappresenta il supporto solido su cui si ha la generazione dei *cluster* e dove avviene la reazione di sequenziamento. Una volta terminata la generazione dei *cluster* (frammenti uguali riuniti in una piccola area) avviene la vera e propria reazione di sequenziamento. La DNA polimerasi sintetizza il filamento complementare a quello del campione utilizzando dei nucleotidi marcati. Ciascuna delle quattro basi usate è legata ad un diverso colorante fluorescente, che nel momento in cui il nucleotide viene incorporato genera un segnale, riconoscibile dal software che restituisce la sequenza delle basi incorporate. Questa tecnica di NGS permette di analizzare milioni di brevi frammenti di DNA durante una singola corsa. Insieme a ciascun frammento vengono anche sequenziati gli indici univoci (i5 ed i7) legati ai frammenti durante la preparazione delle librerie, che permettono di ricondurre ogni trascritto al campione iniziale di appartenenza. [56]

10. Analisi bioinformatica

Nella fase terminale del sequenziamento vengono generati dei file in formato FASTQ. Ogni file FASTQ è composto da quattro righe:

- Un identificatore della sequenza che fornisce informazioni sulla corsa di sequenziamento e sul cluster
- I nucleotidi che compongono la sequenza
- Un separatore, indicato con un (+)
- Comprende una serie di caratteri che forniscono informazioni sulla qualità della corsa (Q score).

Sono poi stati elaborati utilizzando il software bioinformatico CLC Genomics Workbench v.22 (Qiagen).

Prima di tutto l'algoritmo bioinformatico ha rimosso le sequenze degli adattatori che erano state legate ai frammenti di cDNA nella preparazione delle librerie. Questo processo viene chiamato *trimming*.

Successivamente le sequenze sono state allineate al genoma umano di riferimento Ensembl-v99-hg38 per la ricostruzione e l'identificazione di tutti i trascritti.

È stata fatta una normalizzazione delle conte dei trascritti per permettere il confronto tra i campioni. Infine, l'analisi dei trascritti statisticamente espressi in modo differenziale nei due gruppi è stata eseguita utilizzando *Empirical Analysis of Differential Gene Expression* (EDGE) e sono stati considerati significativi i trascritti differenzialmente espressi con p value <0,05.

11. Test ELISA

I dosaggi plasmatici della SERPINE1, NAMPT, S100A9 e S100A12 sono stati misurati mediante metodo ELISA acronimo dell'espressione inglese *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* che è un test immunoenzimatico utilizzato per la rilevazione e il dosaggio di proteine, di antigeni o anticorpi nel campione. Questo test si basa sulla formazione di legami tra antigene e anticorpo.

Per la SERPINE1 chiamata anche PAI-1 (inibitore dell'attività del plasminogeno) è stato utilizzato il kit R&D System (USA) ed è stato effettuato un test ELISA a sandwich.

Si utilizza una piastra con dei pozzetti nei quali viene posizionato l'anticorpo monoclonale specifico per i campioni. La piastra viene poi incubata per 2 ore a RT. In seguito, sono stati effettuati quattro lavaggi con un *Wash Buffer* fornito dal kit per rimuovere l'eccesso, nei pozzetti è stato inserito il plasma dei campioni per verificare la presenza o meno dell'antigene. Dopo l'incubazione di un'ora a RT sono stati effettuati nuovamente dei lavaggi con il *Wash Buffer* per rimuovere l'eccesso, per poi aggiungere un anticorpo secondario legato a uno specifico enzima per la serpine1, che fissa in modo specifico il sistema anticorpo monoclonale-antigene e posto in incubazione a RT per 1 ora. Viene effettuato un ultimo lavaggio e infine viene aggiunta una soluzione substrato in ogni pozzetto, che svilupperà una colorazione proporzionale alla quantità di serpine1 legata nella fase iniziale, il colore deve essere blu. Infine, è stata aggiunta la *Stop Solution* in ogni pozzetto e si ottiene una colorazione che vira da blu a giallo. [57]

Per il NAMPT chiamata anche Visfatina è stato utilizzato il kit della Thermo Fisher il principio è sempre lo stesso visto per il PAI-1, con anticorpi specifici per la visfatina. [58]

Anche per il dosaggio di S100A9 e S100A12 è stato utilizzato il kit della Thermo Fisher e il procedimento è affine a quello del dosaggio del PAI-1.

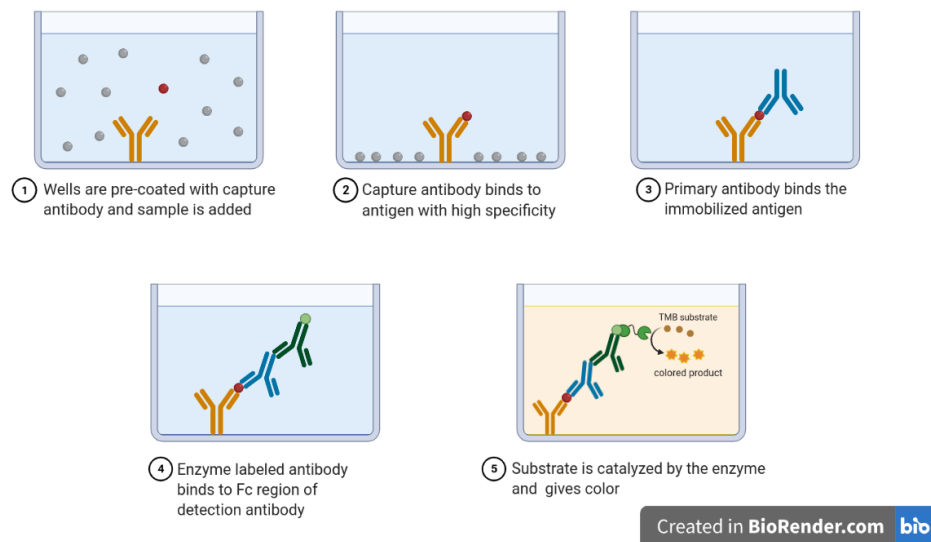


Figura 14: rappresentazione test ELISA

RISULTATI

1. Parametri clinici dei pazienti

Sono stati arruolati in totale 17 pazienti affetti da T2DM. Sono stati analizzati i parametri antropometrici prima e post terapia con i farmaci ipoglicemizzanti. I risultati sono visibili in tabella 1, nella quale si può definire che sono significativi i valori di BMI (indice di massa corporea), la creatinina, le piastrine, il colesterolo totale, colesterolo HDL e i trigliceridi.

Questi parametri dopo trattamento anti-iperglicemico sono significativamente diminuiti.

Parametri	T2DM prima del trattamento antidiabetico	T2DM dopo il trattamento antidiabetico	P value
Sesso F/M	7/10	7/10	/
BMI (kg/m ²)	30,0±3,8	28,1±3,6	<0,001*
Glicemia a digiuno (mg/dL)	154±26	133±23	0,193
HbA1c (mmol/mol)	58,3±8,7	54,5±10,8	0,080
Creatinina (mg/dL)	0,89±0,19	0,95±0,35	0,002*
Piastrine (mille/mm ³)	207,6±52,2	217,9±56,6	<0,001*
Colesterolo totale (mg/dL)	181±40	153±46	0,034*
Colesterolo HDL (mg/dL)	44±8	48±9	0,016*
Colesterolo LDL (mg/dL)	108±35	83±42	0,053
Trigliceridi (mg/dL)	139±65	118±34	0,002*

Tabella 1: media e deviazione standard dei parametri antropometrici prima del trattamento antidiabetico farmacologico e dopo il trattamento farmacologico.

Hb1Ac: emoglobina glicata-BMI: indice di massa corporea

È stato effettuato un ulteriore confronto tra le tre terapie antidiabetiche oggetto di studio. I risultati sono riportati in tabella 2.

I 3 gruppi non differiscono significativamente per nessun parametro.

Parametri	T2DM con metformina al momento del prelievo (n=5)	T2DM con SGLT2i e metformina al momento del prelievo (n=6)	T2DM con GLP1-RA e metformina al momento del prelievo (n=6)	P value Dopo trattamento
Sesso F/M	2/3	1/5	4/2	/
Età (anni)	77±3	66±5	67±9	/
BMI (kg/m ²)	26,9±4,9	27,1±2,9	30,6±2,4	0,150
Glicemia a digiuno (mg/dL)	145±34	136±14	126±19	0,432
HbA1c (mmol/mol)	58,0±12,9	51,4±11,9	56,5±9,7	0,641
Creatinina (mg/dL)	1,10±0,51	0,93±0,13	0,83±0,26	0,436
Piastrine (mille/mm ³)	231,2±51	237,2±74,6	215,7±64,2	0,841
Colesterolo totale (mg/dL)	151±26	125±24	182±61	0,112
Colesterolo HDL (mg/dL)	47±3	46±3	48±16	0,930
Colesterolo LDL (mg/dL)	83±26	55±17	109±51	0,067
Trigliceridi (mg/dL)	104±24	120±29	127±45	0,606

Tabella 2: media e deviazione standard dei parametri antropometrici al momento del prelievo per le tre terapie antidiabetiche in studio. Metformina: soggetti in trattamento con sola metformina. SGLT2i: soggetti in trattamento con metformina e inibitori SGLT2. GLP1-RA: soggetti in trattamento con metformina e GLP1 recettore agonisti. HbA1c: emoglobina glicata-BMI: indice di massa corporea

2. Controllo qualità dell'estrazione delle piastrine

Le piastrine isolate dall'estrazione sono state poi quantificate tramite l'analizzatore ematologico Emerald CELL-DYN. La figura 15 rappresenta la distribuzione media del numero di piastrine, eritrociti e leucociti ottenuti dai campioni di sangue nei 17 pazienti affetti da T2DM. In questo grafico si può vedere che la contaminazione da parte di altri tipi cellulari è stata minima in confronto alle piastrine quantificate, ciò non influirà con le analisi successive.

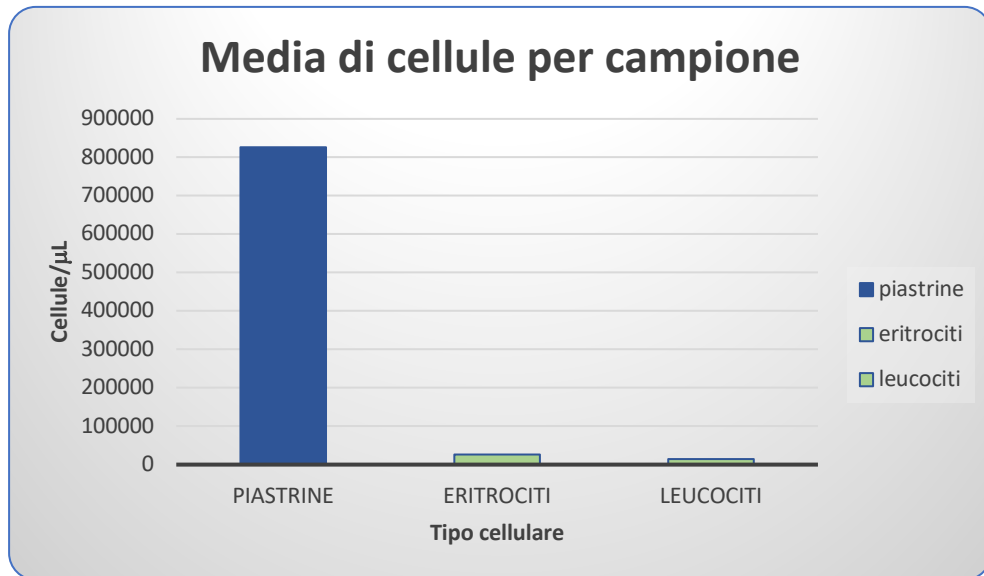


Figura 15: grafico della distribuzione media del numero di cellule per campioni

3. Analisi dell'espressione degli mRNA

Il primo passaggio è stato rimuovere gli adattatori per poi allineare le *reads* ottenute al genoma umano di riferimento. L'allineamento delle sequenze indica la presenza di diversi tipi di trascritti identificati come mRNA, rRNA, tRNA e non coding RNA. Per questo studio sono stati valutati solo gli RNA codificanti per proteine. Nella tabella 3 sono elencati i 10 trascritti più espressi nelle piastrine dei pazienti in studio, i risultati sono concordi a quelli riportati in letteratura sul trascrittoma piastrinico.

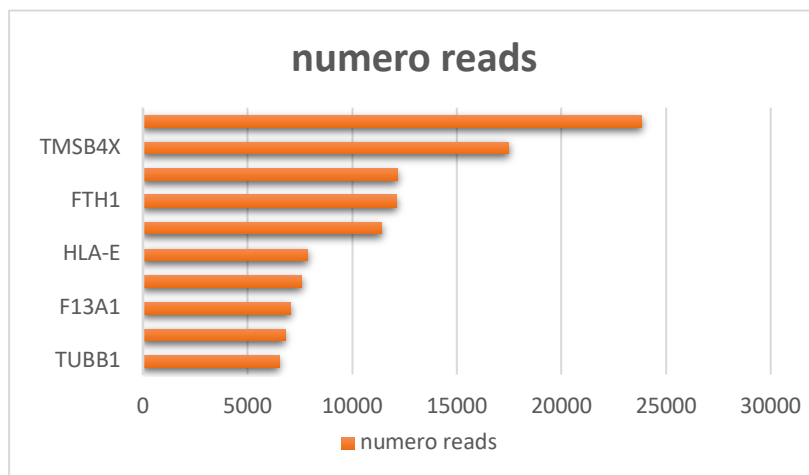


Tabella 3: numero delle conte dei primi 10 trascritti

Nella tabella 4 sono rappresentati i 50 trascritti maggiormente espressi. Sono presenti mRNA che codificano per proteine implicate in diversi processi metabolici. Per esempio, codificano per il citoscheletro o rimodellamento dello stesso (17%), mRNA

coinvolti nella trasduzione di segnali intra ed extra-cellulari (15%), nell'aggregazione piastrinica (10%) e un 10% nei processi infiammatori e immunitari. (Figura 16)

TRASCRITTO	MEDIA CONTE	NOME PROTEINA
MT-ND1	110101,32	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 1
MT-ND2	79528,90	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 2
MT-ND4	77031,14	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 4
MT-CO1	56229,51	Citocromo C mitocondriale ossidasi I
MT-CO3	42023,02	Citocromo C mitocondriale ossidasi III
MT-ND5	41565,52	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 5
MT-ATP6	40055,85	Subunità di membrana ATP sintasi mitocondriale 6
MT-CO2	36563,29	Citocromo C mitocondriale ossidasi II
MT-CYB	34060,32	Citocromo B mitocondriale
B2M	23830,81	Beta-2-microglobulina
TMSB4X	17467,99	Timosina Beta 4 legata all'X
NRGN	12164,58	Neurogranina
FTH1	12134,81	Catena pesante della ferritina 1
MT-ND3	11405,67	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 3
HLA-E	7857,83	Complesso maggiore di istocompatibilità-I, E
SPARC	7584,45	Proteine secrete acide e ricche di cisteina
F13A1	7053,35	Fattore di coagulazione XIII catena A
MT-ND4L	6787,67	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 4L
TUBB1	6517,12	Tubulina Beta 1, Classe VI
TLN1	6202,26	Talina 1
CAVIN2	6071,25	Proteina associata alle caveole 2
MT-ND6	5715,86	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 6
FLNA	5681,32	Filamina A
TAGLN2	5607,72	Transgelina 2
MT-ATP8	5503,18	Subunità di membrana ATP sintasi mitocondriale 8
MAP3K7CL	5039,17	MAP3K7 C-Terminale Like
GNAS	4667,53	Locus complesso GNAS
ACTB	4611,87	Actina Beta
CLU	4513,45	Clusterina
PPBP	4376,50	Proteina di base pro-piastrinica
MYH9	3704,18	Catena pesante della miosina 9
RGS18	3529,40	Regolatore della segnalazione della proteina G18
PTGS1	3485,32	Prostaglandina-endoperossido sintasi 1
ITGA2B	3171,39	Subunità dell'integrina Alpha 2b
H2AC6	2997,18	Istone raggruppato H2A 6
PF4	2853,23	Fattore piastrinico 4
OAZ1	2814,15	Antizima dell'ornitina decarbossilasi 1
ITGB3	2747,74	Subunità di integrina Beta 3
CCL5	2719,20	Chemochine (CC Motif) Ligando 5
ITM2B	2699,55	Proteina integrale di membrana 2B
FTL	2647,59	Catena leggera della ferritina
PRKAR2B	2598,71	Subunità regolatoria tipo II dipendente dalla chinasi Beta
PGRMC1	2446,52	Componente del recettore del progesterone 1
SH3BGRL3	2359,72	Proteine ricche di glutammato legante il dominio SH3 Like 3
ITGB1	2248,07	Subunità di integrina Beta 1
GRAP2	2019,57	Proteine dell'adattatore relative a GRB2 2
VCL	2015,32	Vinculin
MMD	2001,96	Fattore di differenziazione da monociti a macrofagi
CALM3	1934,78	Calmodulina 3
H3-3A	1929,74	Istone H3.3 A

Tabella 4: 50 trascritti maggiormente espressi

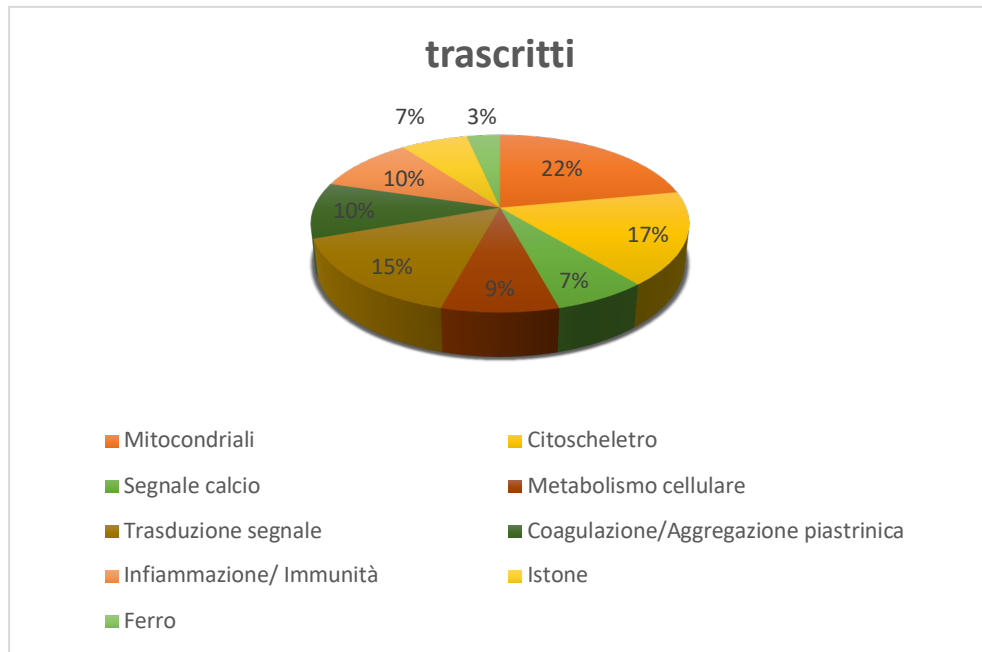


Figura 16: funzioni cellulari in cui sono coinvolti i maggiori trascritti

Una volta classificati i trascritti sulla base delle loro funzioni è stata eseguita un'analisi bioinformatica chiamata *Principal Component Analysis* (PCA). Il grafico della PCA rappresenta una tecnica per semplificare i dati tenendo in considerazione tutti i trascritti del sequenziamento, fornendo un'indicazione delle relazioni tra i diversi gruppi per cercare di ridurre il numero di variabili casuali al minimo.

Questa analisi è stata condotta confrontando il gruppo in terapia con la metformina con gli altri due gruppi di trattamento: associazione con GLP1 recettore agonisti (figura 17) associazione metformina e SGLT2 inibitori (figura 18). Entrambe le figure mostrano dei grafici con una buona clusterizzazione nei livelli di espressione degli mRNA.

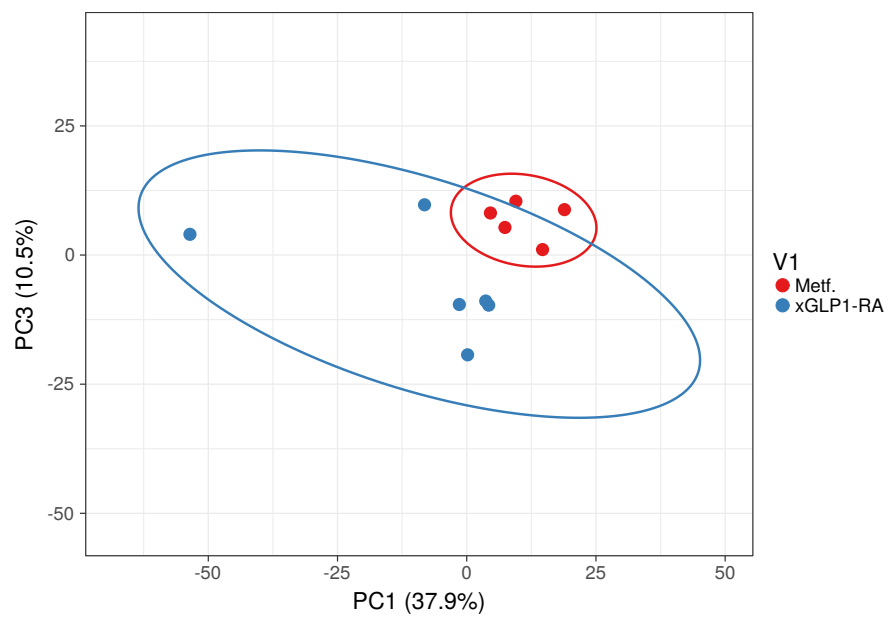


Figura 17: clusterizzazione mediante analisi PCA. In rosso è segnato il gruppo in trattamento con metformina, in blu in terapia con SGLT2 inibitori e metformina.

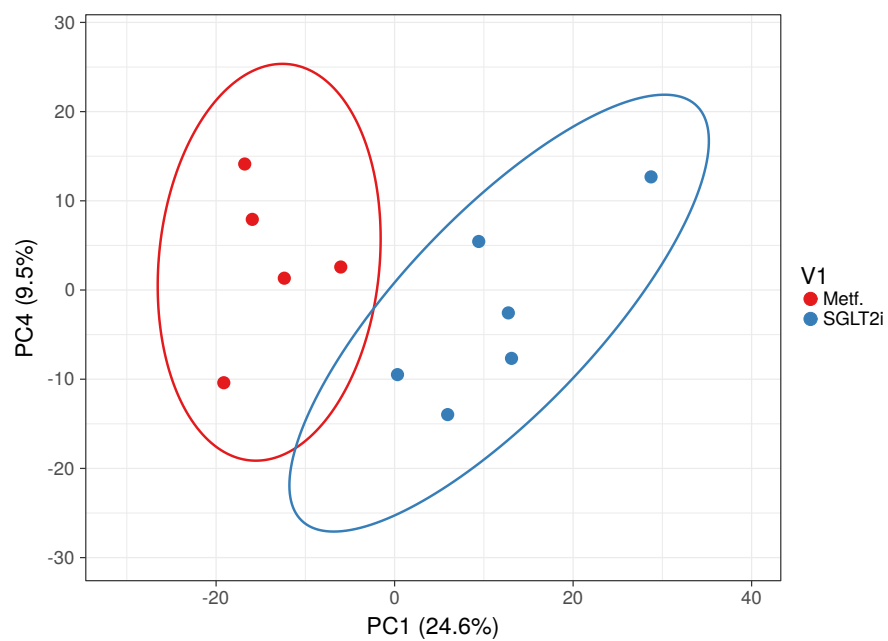


Figura 18: clusterizzazione mediante analisi PCA. In rosso è segnato il gruppo in trattamento con metformina, in blu il gruppo in terapia con GLP1-RA e metformina.

4. Analisi differenziale degli mRNA

L'analisi differenziale è stata eseguita con il software *CLC Genomics*, in modo tale da ottenere il valore di Fold Change e il p-value ($p < 0,05$). Si sono considerati solamente i trascritti che presentavano una media di conte > 2 in almeno uno dei tre gruppi, andando a eliminare quelli con un numero di conte molto basso.

Con questo primo filtro sono risultati 14740 trascritti totali tra i tre gruppi. Si è eseguita un'analisi statistica e sono stati considerati i trascritti con un p value $< 0,05$. L'analisi della diversa espressione degli mRNA viene visualizzata mediante il grafico Volcano Plot che mostra gli mRNA up-regolati (verde) e quelli down-regolati (rosso) rispetto al gruppo in terapia con sola metformina.

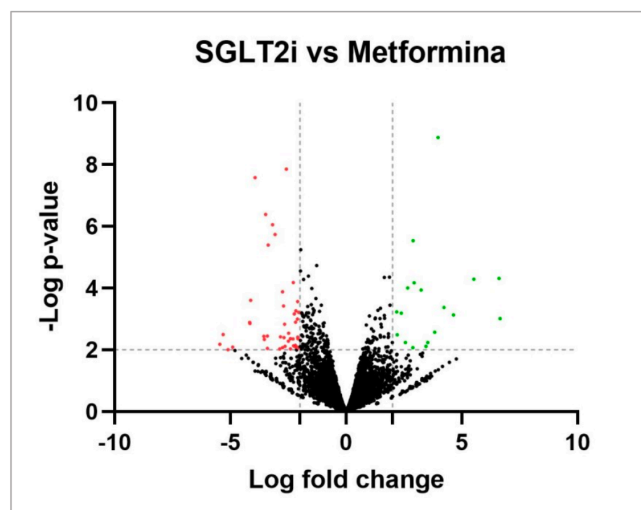


Figura 19: Volcano Plot che mostra i trascritti up-regolati e down-regolati nel gruppo in trattamento con gli inibitori SGLT2 rispetto al gruppo in terapia con metformina.

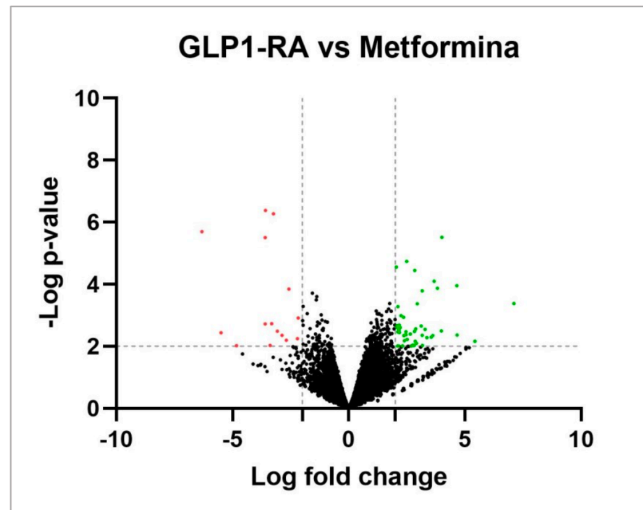


Figura 20: Volcano Plot che mostra i trascritti up e down regolati nel gruppo in trattamento con i GLP1-RA rispetto al gruppo in terapia con metformina.

4.1 SGLT2 inibitori vs Metformina

	Nome	Fold Change	p-value
Up-regolati	SLC4A1	3,140	4,35 E-05
	CCS	2,376	0,00098
Down-regolati	CEBPD	-1,710	0,037
	NAMPT	-1,862	0,0057
	ACSL1	-1,925	0,0013
	S100A9	-2,199	0,0023
	BASP1	-2,218	0,0006
	S100A12	-2,565	0,0014
	CXCR1	-2,651	0,00061
	EGR1	-3,316	0,0024
	MMP25	-3,891	5,71 E-06

Tabella 5: mRNA up e down regolati nel gruppo in terapia con inibitori SGLT2 rispetto al gruppo in trattamento con metformina.

Rispetto al gruppo in terapia con solo metformina, nel gruppo in trattamento con inibitori SGLT2 e metformina risultano significativamente up-regolati 2 trascritti e down-regolati 9 trascritti. (tab.5)

I due mRNA up-regolati sono CCS e SLC4A1:

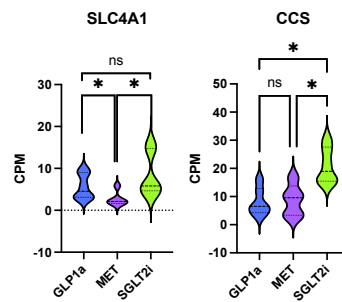


Figura 21: grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi up-regolati.

Le funzioni delle proteine derivate da questi trascritti sono:

- ⇒ **CCS** è una proteina chaperone che fornisce rame alla superossido dismutasi Cu/Zn e può attivare l'enzima. Svolge un ruolo nell'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).
- ⇒ **SLC4A1** è una proteina che appartiene alla famiglia dei solute carrier. Funge da trasportatore che media lo scambio anionico attraverso la membrana cellulare. È una proteina strutturale che mantiene la flessibilità e stabilità della membrana cellulare.

I 9 trascritti down-regolati nei pazienti in terapia con inibitori SGLT2 sono visibili nella figura 22:

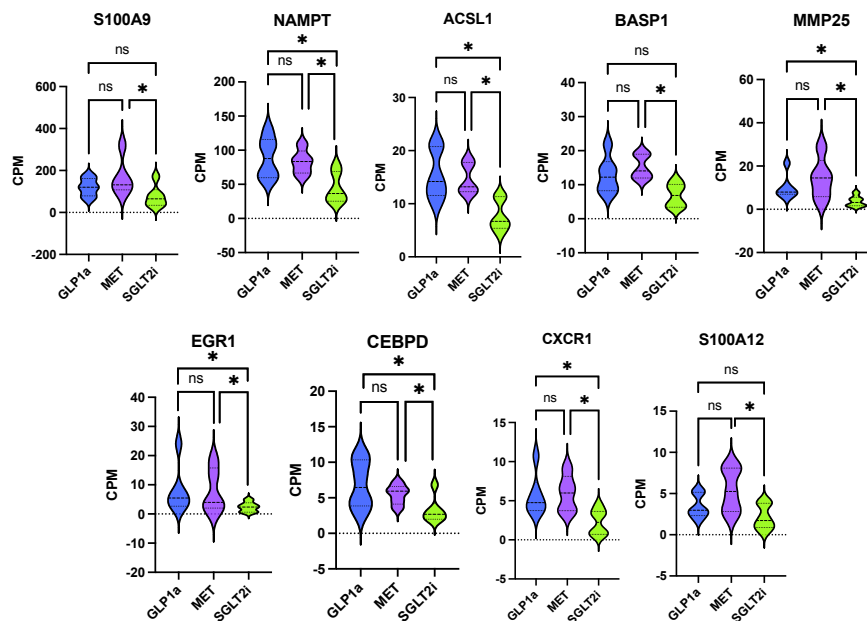


Figura 22: grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi down-regolati.

Le funzioni delle proteine da loro codificate:

- **S100A9** è una proteina legante il calcio membro della famiglia delle S100. È conosciuta con il nome di Calprotectina o MRP-14. Le proteine S100 sono

coinvolte nella regolazione di numerosi processi cellulari; in particolare S100A9 svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi infiammatori e della risposta immunitaria.

- **NAMPT** (nicotinamide fosforibosiltransferasi) detta anche Visfatina. È una proteina coinvolta in molti importanti processi biologici. Presenta una forma secreta che si comporta come citochina con proprietà immunomodulanti ma anche come adipochina con proprietà antidiabetiche.
- **ACSL1** (Acil-CoA sintetasi a catena lunga) è una ligasi del coenzima A degli acidi grassi a catena lunga e svolge un ruolo nella biosintesi dei lipidi e nella degradazione degli acidi grassi.
- **BASP1** è una proteina legata alla membrana con diversi siti di fosforilazione. È presente in vari tessuti a livello delle terminazioni nervose.
- **MMP25** è una metalloproteinasi di matrice appartenente alla famiglia delle MMP di membrana ed è ancorata alla membrana plasmatica. Questi enzimi sono coinvolti nella separazione dei componenti della matrice extracellulare nei processi fisiologici.
- **EGR1** (Early Growth Response 1) è una proteina che funge da regolatore trascrizionale. Ha un ruolo chiave nella regolazione della sopravvivenza cellulare, morte cellulare e media le risposte all'ischemia e all'ipossia.
- **CEBPD** è un fattore di trascrizione importante nella regolazione dei geni coinvolti nelle risposte immunitarie e infiammatorie.
- **CXCR1** (recettore per chemochine con motivo CXC-1) è un recettore per l'interleuchina 8 coinvolta in processi immunitari, accoppiato a una proteina G
- **S100A12** detta anche EN-RAGE (proteina extracellulare legante RAGE) è un membro della famiglia di proteine S100 leganti calcio. Sono localizzate nel citoplasma o nel nucleo, hanno attività pro-infiammatoria con produzione di citochine e chemochine.

4.2 GLP1-RA vs Metformina

	Nome	Fold Change	p-value
Up-regolati	SLC4A1	2,084353	0,00915
Down-regolati	PLCH1	-2,0862	0,017736
	SERPINE1	-1,83738	0,020148

Tabella 6: mRNA up e down regolati nel gruppo in terapia con GLP1-RA rispetto al gruppo in trattamento con metformina.

Un solo trascritto risulta sovra regolato nel gruppo in trattamento con l'associazione di metformina e GLP1-RA rispetto al gruppo in terapia con metformina, mentre due mRNA risultano down-regolati. (tab.6)

Le funzioni delle proteine derivanti da questi trascritti down-regolati sono:

- **PLCH1** è la fosfolipasi C, appartiene alla superfamiglia degli enzimi fosfolipasi C che sono coinvolti come mediatori nella produzione delle molecole del secondo messaggero diacilglicerolo e inositolo 1,4,5 trifosfato
- **SERPINE1** chiamato anche PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1), il suo ruolo è fondamentale per la down regolazione della fibrinolisi. È un inibitore sia tissutale che di tipo urochinasi.



Figura 23: grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi, a destra quelli down-regolati e a sinistra quello up-regolato.

4.3 GLP1-RA vs inibitori SGLT2

	Nome	Fold Change	p-value
Up-regolati	MYADM	2,455	0,0152
	MMP25	2,510	0,0087
	ACSL1	2,121	0,0087
	CXCR1	2,126	0,0087
	EGR1	2,309	0,026
	NAMPT	2,397	0,0411
	CEBPD	2,401	0,0411
Down-regolati	SLC9A1	-2,026	0,0344
	PTPRF	-2,054	0,0152
	CALU	-2,443	0,0411
	CCS	-2,913	0,0087

Tabella 7: mRNA up e down regolati nel gruppo in terapia con GLP1-RA rispetto al gruppo in trattamento con inibitori SGLT2.

Il gruppo in terapia con l'associazione di GLP1-RA e metformina è stato confrontato rispetto al gruppo in trattamento con l'associazione di inibitori SGLT2 e metformina. Sono risultati up-regolati 7 trascritti e down-regolati 4 trascritti.

I trascritti up-regolati MMP25, NAMPT, CEBPD, CXCR1, EGR1, ACSL1 sono in comune con quelli che risultavano down regolati per gli inibitori SGLT2 a confronto con la metformina. L'unico non preso in considerazione è:

- **MYADM** è un marcatore di differenziazione associato alla mieloide, è coinvolto in diversi processi come la regolazione negativa dell'adesione cellula-cellula.

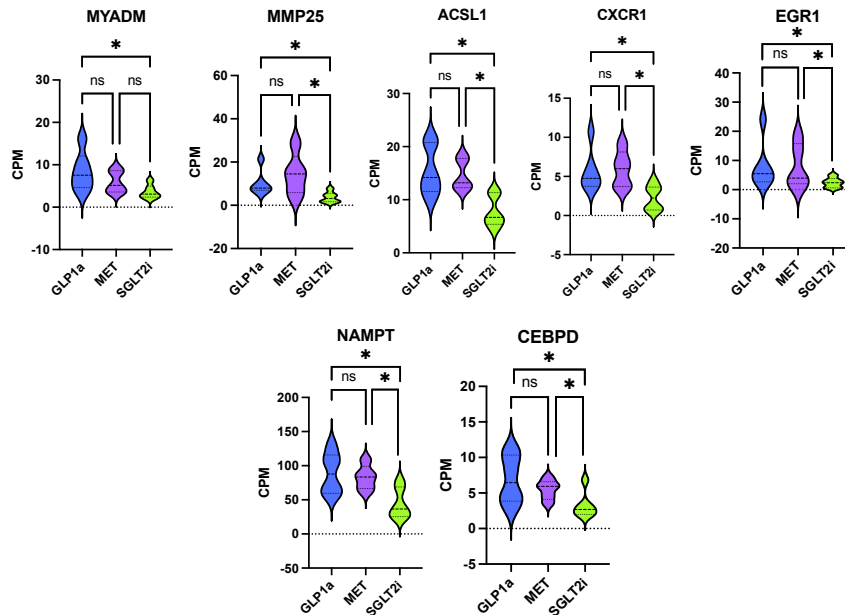


Figura 24: grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi up-regolati.

Mentre i geni down regolati sono i seguenti:

- **SLC9A1** è un gene che codifica per uno scambiatore Na^+/H^+ . Questo trasportatore ha un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi del pH, della migrazione cellulare e del volume cellulare.
- **PTPRF** è un membro della famiglia della proteina tirosina fosfatasi, segnalano molecole che regolano la crescita cellulare, la differenziazione, trasformazione oncogenica.
- **CALU** codifica per una proteina legante il calcio presente nel reticolo endoplasmatico coinvolto nella regolazione della carbossilazione dipendente dalla vitamina K
- **CCS** è una proteina chaperone che fornisce rame alla superossido dismutasi Cu/Zn e può attivare l'enzima. Svolge un ruolo nella disintossicazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

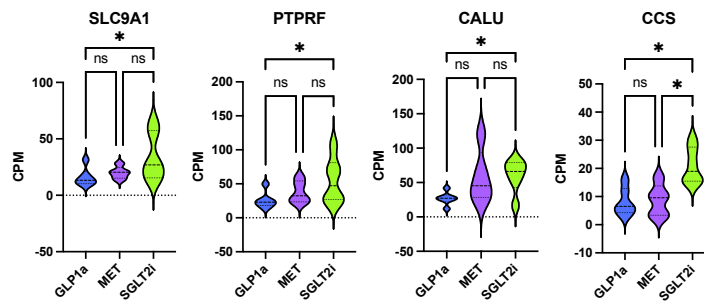


Figura 25: grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi up-regolati.

5. Influenza della terapia antiaggregante

I 9 pazienti su 17 assumevano terapia antiaggregante piastrinica, con farmaci quali l'acido acetilsalicilico che è un inibitore della COX-1, il clopidogrel che è un inibitore di P2Y12 e con il dabigatran (inibitore della trombina). I 17 trascritti sono stati suddivisi in due gruppi diversi: quelli che erano sottoposti a terapia antiaggregante e quelli che non l'assumevano. L'espressione degli mRNA non è risultata significativa tra i due gruppi e così si può definire che la terapia antiaggregante non ha effetti sui trascritti dello studio.

6. Dosaggi Plasmatici di NAMPT, PAI-1, S100A9 e S100A12

I livelli plasmatici di NAMPT, PAI-1, S100A9, S100A12 sono stati eseguiti mediante ELISA.

I dosaggi plasmatici sono rappresentati in figura 26:

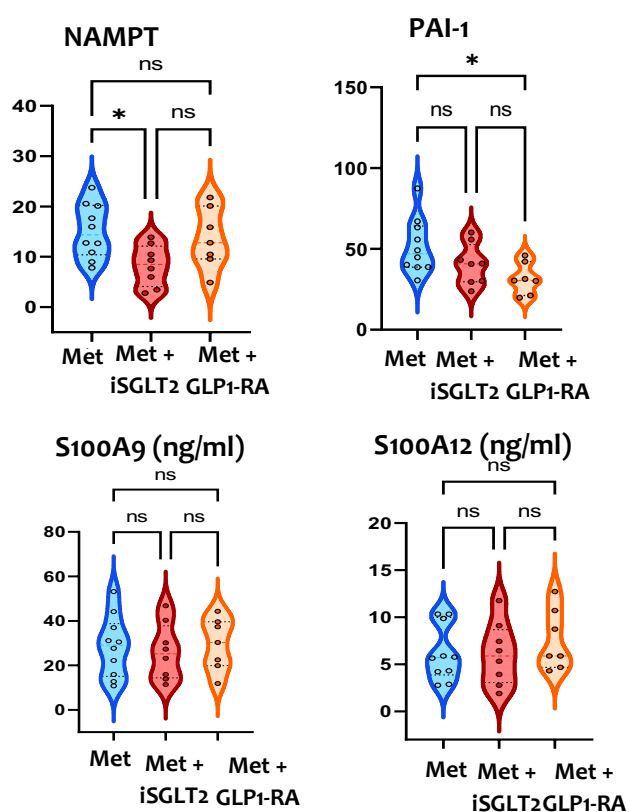


Figura 26: grafici a violino dei trascritti significativi nel dosaggio immunoenzimatico ELISA

La figura 26 mostra che i livelli di NAMPT sono significativamente ridotti nei pazienti in trattamento farmacologico con gli inibitori SGLT2 rispetto a quelli in trattamento con solo metformina.

I livelli plasmatici di PAI-1 sono invece significativamente ridotti nei pazienti trattati con GLP1-RA rispetto a quelli trattati con solo metformina.

Infine, non sono stati trovati differenze significative nei livelli plasmatici di S100A9 e S100A12 nei tre gruppi di trattamento.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio si è analizzato il profilo del trascrittoma piastrinico in pazienti affetti da T2DM, nello specifico si sono messe a confronto le diverse terapie antidiabetiche che coinvolgono 3 categorie di farmaci: la metformina che rappresenta tutt'oggi il gold standard per il trattamento del T2DM, gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT2) e infine i glucagon like peptide-1 recettore agonisti (GLP1-RA).

Il T2DM è una patologia multifattoriale ed è associato allo sviluppo di molteplici complicanze soprattutto a livello cardiovascolare. La condizione iperglicemica promuove il processo aterosclerotico coinvolgendo i meccanismi della coagulazione del sangue. Si verifica anche un aumento della condizione pro-trombotica. In quest'ottica un ruolo fondamentale lo ricoprono le piastrine, in quanto nel soggetto affetto da T2DM si trovano iperreattive e di conseguenza a favore dell'aggregazione piastrinica. Alcuni studi evidenziano come la condizione iperglicemica che si verifica nel T2DM sia correlata all'aumento del fattore tissutale, motore primario della coagulazione del sangue. [59]

Pertanto, ci siamo indirizzati verso lo studio delle piastrine come cellule primarie responsabili della coagulazione del sangue con un ruolo principale nello sviluppo dell'aterotrombosi nei pazienti affetti da T2DM. In letteratura gli studi sono ancora scarsi, infatti tutt'oggi non esistono studi che abbiano preso in considerazione il trascrittoma piastrinico in relazione alla terapia antidiabetica. Con queste premesse abbiamo improntato questo studio utilizzando la tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) che permette di identificare mRNA (RNA messenger), RNA ribosomiali, tRNA (RNA transfer) e non coding RNA. Con questa tecnologia abbiamo valutato l'espressione degli mRNA nei tre gruppi di trattamento: metformina, inibitori SGLT2 e GLP1 recettore agonisti. Dall'analisi differenziale sono emersi diversi trascritti che codificano per proteine significative che sono coinvolte in processi piastrinici fondamentali per il nostro organismo come ad esempio nel rimodellamento del citoscheletro, nei processi immunitari e infiammatori e nella regolazione del calcio intracellulare. In particolare, mettendo a confronto la terapia con gli inibitori SGLT2 rispetto alla sola metformina sono risultati down regolati i seguenti trascritti: S100A9, S100A12, NAMPT.

La proteina codificata dal trascritto S100A9 è la Calprotectina. È una proteina localizzata nel citoplasma di diverse cellule e ha un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi infiammatori (proinfiammatoria) e anche protrombotica, nonché nella genesi dell'aterosclerosi del paziente diabetico. Le proteine S100 sono identificate come

ligandi RAGE (recettori per i prodotti finali della glicazione avanzata) e sono coinvolte negli stadi iniziali dell'aterosclerosi. Diversi studi dimostrano che nei pazienti iperglicemici c'è un aumento di S100A9-RAGE e che la presenza di S100A9 è elevata nelle piastrine di pazienti con infarto miocardico. [60] [61]

Un altro trascritto appartenente alla famiglia delle S100 che risulta down regolato è S100A12, chiamata anche EN-RAGE (proteina extracellulare legante RAGE). Anche questo trascritto è implicato nei processi proinfiammatori e protrombotici ed è maggiormente espresso nei pazienti affetti da T2DM. [62]

Pertanto, riducendo l'espressione di questa famiglia di proteine S100 con l'utilizzo degli inibitori SGLT2 si verifica una protezione per quanto riguarda lo sviluppo degli eventi aterosclerotici.

Un altro trascritto che risulta down regolato nel trattamento con gli inibitori SGLT2 è il NAMPT o Visfatina. La forma secreta di NAMPT si comporta sia da citochina con proprietà immunomodulanti che da adipochina. Diversi studi hanno dimostrato che la presenza della visfatina è più elevata in pazienti affetti da T2DM rispetto ai soggetti non diabetici. A livello vascolare la visfatina contribuisce all'infiammazione a livello della placca aterosclerotica attivando la segnalazione pro-infiammatoria nelle cellule muscolari lisce, ed è stato dimostrato che i livelli sierici di NAMPT sono associati allo sviluppo dell'aterosclerosi carotidea in pazienti affetti da T2DM. Ciò concorre all'aumento dell'infiammazione arteriosa e alla disfunzione endoteliale soprattutto nelle prime fasi dell'obesità. È una proteina presente anche negli epatociti e in altri tipi cellulari, infatti è emerso che i livelli plasmatici di visfatina vengono ridotti nei pazienti diabetici con il trattamento farmacologico con gli inibitori SGLT2. [63] [64]

Il trascritto PAI-1 (inibitore dell'attività del plasminogeno) è risultato invece ridotto dal confronto tra il gruppo in trattamento con i GLP1-RA e quello con la sola metformina. È il principale inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno e dell'urochinasi. Un'elevata concentrazione di PAI-1 è stata riscontrata nelle piastrine, con conseguente aumento della sua espressione e il rischio di formare trombi nel paziente con T2DM. [65] Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che nei pazienti affetti da T2DM i livelli di questa proteina sono elevati e hanno evidenziato un'associazione tra PAI-1 e le complicanze microvascolari tipiche del diabete quali la retinopatia e la nefropatia. Pertanto, la riduzione della sua espressione aumenta l'attività fibrinolitica con conseguente minor rischio di formazione di trombi. Anche il PAI-1, come la visfatina è una proteina ubiquitaria e la sua espressione è elevata nelle piastrine, nei megacariociti, monociti, cellule endoteliali. A conferma di questo ruolo, i livelli

plasmatici di PAI-1 sono diminuiti nei pazienti affetti da T2DM dopo trattamento con i GLP1-RA.

Infine, confrontando il gruppo in trattamento con GLP1-RA con gli inibitori SGLT2, è emerso significativo il ruolo del trascritto SLC9A1 che risulta ridotto nei pazienti in trattamento con i GLP1-RA. SLC9A1 codifica per un trasportatore di membrana NHE1 (Na^+/H^+ exchanger-1), espresso sia nel rene, sia nell'intestino e anche nelle piastrine. [66] Nelle piastrine ha un ruolo di controllo del pH intracellulare, nonché della partecipazione alla segnalazione cellulare. I fattori di attivazione delle piastrine quali trombina, trombossano, endotelina stimolano l'attività di NHE1 con conseguente attivazione piastrinica. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che è anche bersaglio dei farmaci inibitori SGLT2 a livello dei cardiomiociti, andando a inibire il recettore e promuovendo effetti vasodilatatori. [67]

Questo studio mostra notevoli e interessanti risultati, tuttavia ci sono delle limitazioni legate soprattutto al numero esiguo dei pazienti presi in considerazione. Inoltre, un'altra limitazione può essere dettata dal fatto che oggi resta ancora da definire quale sia il significato fisiopatologico del trascrittoma piastrinico e soprattutto manca anche il possibile effetto di altre terapie sul trascrittoma piastrinico.

In conclusione, si può evidenziare che questo studio ha messo a confronto tre terapie antidiabetiche del tutto differenti tra di loro e ha potuto definire come un trattamento a lungo termine per il T2DM possa interferire con l'espressione degli mRNA piastrinici. Con questo voglio mettere in luce che i risultati da noi ottenuti possono definire e dare una maggiore consapevolezza di come effettivamente i GLP1-RA e gli inibitori SGLT2 abbiano effetti cardioprotettivi in senso anti-aterosclerotico nei soggetti trattati.

BIBLIOGRAFIA:

- [1] *CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS 2019 Classification of diabetes mellitus*. 2019. [Online]. Available: <http://apps.who.int/bookorders>.
- [2] F. E. G. L. H. R. H. W. H. J. H. F. K. C. R. I. S. G. S. D. T. M. W. R. DeFronzo RA, « Type 2 diabetes mellitus. ».
- [3] L. S. H. FB. Zheng Y, «Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. ».
- [4] C. Rugarli e Q. E. Masson, «Medicina interna sistematica».
- [5] A. S. Eitors *et al.*, «MEDICINA I INTERNA II manuale Milano » New York • Chicago * San Francisco • Lisbon • London * Madrid • Mexico City • New Delhi • San Juan • Seoul ■ Singapore * Sydney • Toronto».
- [6] U. Galicia-Garcia *et al.*, «Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n. 17. MDPI AG, pagg. 1–34, set. 01, 2020.
- [7] «2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022», *Diabetes Care*, vol. 45, pagg. S17–S38, gen. 2022.
- [8] D. M. & N. C. B. Muoio, «Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. », vol. 9, 2008.
- [9] «2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022», *Diabetes Care*, vol. 45, pagg. S17–S38, gen. 2022.
- [10] W. Crasto, V. Patel, M. J. Davies, e K. Khunti, «Prevention of Microvascular Complications of Diabetes», *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 50, n. 3. W.B. Saunders, pagg. 431–455, set. 01, 2021.

- [11] M. W. Ulbig e A. N. Kollias, «Diabetische Retinopathie: Frühzeitige Diagnostik und Effiziente Therapie», *Dtsch Arztebl*, vol. 107, n. 5, pagg. 75–84, feb. 2010.
- [12] W. Wang e A. C. Y. Lo, «Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n. 6. MDPI AG, giu. 20, 2018.
- [13] M. J. Fowler, «Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes», 2008. [Online]. Available: <http://clinical.diabetesjournals.org>
- [14] D. C. Rosenberger, V. Blechschmidt, H. Timmerman, A. Wolff, e R. D. Treede, «Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy», *Journal of Neural Transmission*, vol. 127, n. 4. Springer, pagg. 589–624, apr. 01, 2020.
- [15] «Diabetic neuropathy», *Nat Rev Dis Primers*, vol. 5, n. 1, pag. 42, giu. 2019.
- [16] E. L. Feldman *et al.*, «Diabetic neuropathy», *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 5, n. 1. Nature Publishing Group, dic. 01, 2019.
- [17] B. C. Callaghan, H. T. Cheng, C. L. Stables, A. L. Smith, e E. L. Feldman, «Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments», *The Lancet Neurology*, vol. 11, n. 6. pagg. 521–534, giu. 2012.
- [18] C. Qi, X. Mao, Z. Zhang, e H. Wu, «Classification and differential diagnosis of diabetic nephropathy», *Journal of Diabetes Research*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017.
- [19] T. W. C. Tervaert *et al.*, «Pathologic classification of diabetic nephropathy», *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, n. 4. pagg. 556–563, apr. 2010.
- [20] S. Giunti, D. Barit, e M. E. Cooper, «Mechanisms of diabetic nephropathy: Role of hypertension», *Hypertension*, vol. 48, n. 4. pagg. 519–526, ott. 2006.

- [21] N. Samsu, «Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment», *BioMed Research International*, vol. 2021. Hindawi Limited, 2021.
- [22] R. Kaur, M. Kaur, e J. Singh, «Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: Molecular insights and therapeutic strategies», *Cardiovascular Diabetology*, vol. 17, n. 1. BioMed Central Ltd., ago. 31, 2018.
- [23] A. I. S. Sobczak e A. J. Stewart, «Coagulatory defects in type-1 and type-2 diabetes», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n. 24. MDPI AG, dic. 02, 2019.
- [24] M. Holinstat, «Normal platelet function», *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 36, n. 2. Springer New York LLC, pagg. 195–198, giu. 01, 2017.
- [25] T. Gremmel, A. L. Frelinger, e A. D. Michelson, «Platelet physiology», *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 42, n. 3. Thieme Medical Publishers, Inc., pagg. 191–204, apr. 01, 2016.
- [26] E. M. Golebiewska e A. W. Poole, «Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond», *Blood Rev*, vol. 29, n. 3, pagg. 153–162, mag. 2015,
- [27] S. H. Yun, E. H. Sim, R. Y. Goh, J. I. Park, e J. Y. Han, «Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers», *BioMed Research International*, vol. 2016. Hindawi Publishing Corporation, 2016.
- [28] T. G. Mastenbroek, J. P. van Geffen, J. W. M. Heemskerk, e J. M. E. M. Cosemans, «Acute and persistent platelet and coagulant activities in atherothrombosis», *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 13, n. S1. Blackwell Publishing Ltd, pagg. S272–S280, giu. 01, 2015.

- [29] D. J. Angiolillo, D. Capodanno, e S. Goto, «Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis», *European Heart Journal*, vol. 31, n. 1. gen. 2010.
- [30] Y. Asada, A. Yamashita, Y. Sato, e K. Hatakeyama, «Pathophysiology of atherothrombosis: Mechanisms of thrombus formation on disrupted atherosclerotic plaques», *Pathology International*, vol. 70, n. 6. Blackwell Publishing, pagg. 309–322, giu. 01, 2020.
- [31] R. Kaur, M. Kaur, e J. Singh, «Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: Molecular insights and therapeutic strategies», *Cardiovascular Diabetology*, vol. 17, n. 1. BioMed Central Ltd., ago. 31, 2018.
- [32] E. Andrikou, C. Tsioufis, I. Andrikou, I. Leontsinis, D. Tousoulis, e N. Papanas, «GLP-1 receptor agonists and cardiovascular outcome trials: An update», *Hellenic Journal of Cardiology*, vol. 60, n. 6. Hellenic Cardiological Society, pagg. 347–351, nov. 01, 2019.
- [33] S. Verma *et al.*, «Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists liraglutide and semaglutide on cardiovascular and renal outcomes across body mass index categories in type 2 diabetes: Results of the LEADER and SUSTAIN 6 trials», *Diabetes Obes Metab*, vol. 22, n. 12, pagg. 2487–2492, dic. 2020.
- [34] M. A. Bethel *et al.*, «Cardiovascular outcomes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis», *Lancet Diabetes Endocrinol*, vol. 6, n. 2, pagg. 105–113, feb. 2018.
- [35] S. P. Marso *et al.*, «Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes», *New England Journal of Medicine*, vol. 375, n. 19, pagg. 1834–1844, nov. 2016.
- [36] «Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes», *Drug and Therapeutics Bulletin*, vol. 54, n. 9. BMJ Publishing Group, pag. 101, 2016.

- [37] Y. Zhang, R. Chen, Y. Jia, M. Chen, e Z. Shuai, «Effects of exenatide on coagulation and platelet aggregation in patients with type 2 diabetes», *Drug Des Devel Ther*, vol. 15, pagg. 3027–3040, 2021.
- [38] S. Steven *et al.*, «Themed Section: Redox Biology and Oxidative Stress in Health and Disease», *Br J Pharmacol*, vol. 174, pag. 1620, 2017.
- [39] CHMP, «AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO: RIASSUNTO DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO -DAPAGLIFLOZIN».
- [40] J. J. V. McMurray *et al.*, «Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction», *New England Journal of Medicine*, vol. 381, n. 21, pagg. 1995–2008, nov. 2019.
- [41] H. J. L. Heerspink *et al.*, «Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease», *New England Journal of Medicine*, vol. 383, n. 15, pagg. 1436–1446, ott. 2020.
- [42] «AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO: RIASSUNTO DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO EMPAGLIFLOZIN».
- [43] CHMP, «AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO: RIASSUNTO DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO CANAGLIFLOZIN».
- [44] C. Wanner *et al.*, «Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes», *New England Journal of Medicine*, vol. 375, n. 4, pagg. 323–334, lug. 2016.
- [45] B. Neal *et al.*, «Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes», *New England Journal of Medicine*, vol. 377, n. 7, pagg. 644–657, ago. 2017.
- [46] S. D. Wiviott *et al.*, «Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes», *New England Journal of Medicine*, vol. 380, n. 4, pagg. 347–357, gen. 2019.
- [47] J. J. V. McMurray *et al.*, «Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction», *New England Journal of Medicine*, vol. 381, n. 21, pagg. 1995–2008, nov. 2019.

- [48] S. S. Joshi, T. Singh, D. E. Newby, e J. Singh, «Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor therapy: Mechanisms of action in heart failure», *Heart*, vol. 107, n. 13. BMJ Publishing Group, pagg. 1032–1038, lug. 01, 2021.
- [49] Z. Liu *et al.*, «Impact of sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors on atherosclerosis: From pharmacology to pre-clinical and clinical therapeutics», *Theranostics*, vol. 11, n. 9. Ivyspring International Publisher, pagg. 4502–4515, mar. 04, 2021.
- [50] V. Spigoni *et al.*, «Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors antagonize lipotoxicity in human myeloid angiogenic cells and ADP-dependent activation in human platelets: Potential relevance to prevention of cardiovascular events», *Cardiovasc Diabetol*, vol. 19, n. 1, apr. 2020.
- [51] K. de Wispelaere e K. Freson, «The Analysis of the Human Megakaryocyte and Platelet Coding Transcriptome in Healthy and Diseased Subjects», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n. 14. MDPI, lug. 01, 2022.
- [52] A. Supernat *et al.*, «Transcriptomic landscape of blood platelets in healthy donors», *Sci Rep*, vol. 11, n. 1, dic. 2021.
- [53] «Sample to Insight__ RNeasy® Micro Handbook», 2021.
- [54] «Illumina Stranded mRNA Prep Ligation Reference Guide», 2020.
[Online]. Available: www.illumina.com/company/legal.html.
- [55] «nextseq-denature-dilute-libraries-guide-15048776-09».
- [56] K. O. Mutz, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, J. G. Walter, e F. Stahl, «Transcriptome analysis using next-generation sequencing», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 24, n. 1. pagg. 22–30, feb. 2013. doi: 10.1016/j.copbio.2012.09.004.
- [57] «Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine ELISA». [Online]. Available: www.RnDSystems.com
- [58] «Human Visfatin ELISA Kit».

- [59] R. A. M. M. H. C. C. P. B. G. Vaidyula VR, «Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD40 ligand. Diabetes. 2006;55(1):202-208».
- [60] R. Kawakami *et al.*, «S100A9-RAGE axis accelerates formation of macrophage-mediated extracellular vesicle microcalcification in diabetes mellitus», *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 40, n. 8, pagg. 1838–1853, ago. 2020.
- [61] Y. Wang *et al.*, «Platelet-derived S100 family member myeloid related protein-14 regulates thrombosis», *Journal of Clinical Investigation*, vol. 124, n. 5, pagg. 2160–2171, 2014.
- [62] S. Kondo, K. Mochizuki, N. Hariya, M. Saito, S. Doguchi, e T. Osonoi, «S100 Genes are Highly Expressed in Peripheral Leukocytes of Type 2 Diabetes Mellitus Patients Treated with Dietary Therapy», *Drugs in R and D*, vol. 21, n. 1, pagg. 91–101, mar. 2021.
- [63] S. Radzicka, M. Pietryga, R. Iciek, e J. Brazert, «The role of visfatin in the pathogenesis of gestational diabetes (GDM)», *Ginekol Pol*, vol. 89, n. 9, pagg. 518–521, 2018.
- [64] A. Dakroub *et al.*, «Visfatin: A Possible Role in Cardiovascular-Metabolic Disorders», *Cells*, vol. 9, n. 11. NLM (Medline), nov. 09, 2020.
- [65] R. Altalhi, N. Pechlivani, e R. A. Ajjan, «Pai-1 in diabetes: Pathophysiology and role as a therapeutic target», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n. 6. MDPI AG, pagg. 1–15, mar. 02, 2021.
- [66] D. Roskopf, «Sodium-Hydrogen Exchange and Platelet Function Sodium-Hydrogen Exchange and Platelet Function Roskopf».
- [67] S. Wichaiyo e N. Saengklub, «Alterations of sodium-hydrogen exchanger 1 function in response to SGLT2 inhibitors: what is the evidence?», *Heart Failure Reviews*, vol. 27, n. 6. Springer, pagg. 1973–1990, nov. 01, 2022.

