



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina – DIMED

U.O. di Malattie del Metabolismo

TESI DI LAUREA

**FGF 21 E COMPLICANZE CRONICHE DEL
DIABETE MELLITO TIPO 2**

Relatore: Prof.ssa Saula Vigili de Kreutzenberg

Correlatore: Dott. Mario Luca Morieri

Laureanda: Kanchan Francesca Rubini

Anno accademico 2021/2022



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina – DIMED

U.O. di Malattie del Metabolismo

TESI DI LAUREA

**FGF 21 E COMPLICANZE CRONICHE DEL
DIABETE MELLITO TIPO 2**

Relatore: Prof.ssa Saula Vigili de Kreutzenberg

Correlatore: Dott. Mario Luca Morieri

Laureanda: Kanchan Francesca Rubini

Anno accademico 2021/2022

INDICE

ABSTRACT.....	6
RIASSUNTO	8
INTRODUZIONE.....	11
Capitolo 1. La malattia cardiovascolare nei pazienti diabetici	13
1.1 Diabete mellito	13
1.2 Malattia cardiovascolare	17
1.3 Trattamento	21
Capitolo 2. scompenso cardiaco e Cardiomiopatia diabetica.....	24
2.1 Insufficienza cardiaca.....	24
2.2 Algoritmi predittivi di rischio cardiovascolare	27
2.3 Cardiomiopatia diabetica	29
Capitolo 3. FGF 21.....	31
3.1 Fegato e metabolismo	32
3.2 SNC.....	34
3.3 Cuore.....	35
OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	38
4.1 Obiettivo primario.....	38
4.2 Obiettivi secondari	38
MATERIALI E METODI.....	38
5.1 Comitato etico	38
5.2 Modello di studio	38
5.3 Popolazione in studio	38
5.4 Raccolta dati.....	39
5.5 Analisi statistica	46

RISULTATI	48
6.1 Informazioni di carattere generale	48
6.2 Fattori associati ad elevato rischio di scompenso cardiaco.....	48
6.3 FGF21 e rischio di scompenso cardiaco	54
6.4 FGF21 e altre complicanze micro e macrovascolari.....	57
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	60
Bibliografia	66

ABSTRACT

Background: Type 2 diabetes mellitus prevalence is globally increasing, and its micro and macro vascular complications are responsible for the higher morbidity and mortality as compared to the general population. Remarkably, the hospitalization for heart failure (HF) is progressively increasing over the last years, and half of this hospitalization occurs in patients with type 2 diabetes. Novel approaches are needed to address these challenges. Over the last decade, several experimental models have identified Fibroblast Growth Factors-21 (FGF-21) as a novel and promising therapeutic target with protective effect on micro and macro vascular complications.

Objectives: The main aim of the present study was to evaluate the presence of an association between circulating FGF21 values and chronic complications of type 2 diabetes mellitus (DM2), with a focus on heart failure, and to validate the Watch-DM score against subclinical signs of cardiomyopathy.

Methods: Data collection took place from September 2020 to January 2022. We included data from 145 patients diagnosed with type 2 diabetes mellitus, regularly followed at the Diabetes Service of the Hospital-University of Padua in the period from 2010 to 2021. We collected demographic and anamnestic information, anthropometric data, biohumoral parameters and the presence of macro- and micro-angiopathic complications. We assessed the clinical score of heart failure with Watch-DM (including age, BMI, systolic and diastolic blood pressure, serum creatinine, fasting plasma glucose, LDL cholesterol, QRS duration, history of myocardial infarction or revascularization). Subclinical signs of initial heart failure, were assessed with electrocardiographic and echocardiographic and biohumoral parameters (NT-proBNP). Risk scores for CAD and stroke were evaluated with UKPDS. FGF21 levels were then assayed on the blood samples with ELISA method.

Results: A total of 145 subjects with type 2 diabetes were enrolled, divided into Watch very low DM ≤ 7 (n=72) and Watch high or very high DM ≥ 11 (n=73).

There was an equal representation of sex (men= 53%), mean age was 60.3 ± 15 years and mean disease duration was 9 years. The majority of the population was in primary prevention (96%), none had overt clinically relevant HF, although 76.9% were at very high CV risk. The Watch-DM score was associated with several echocardiographic indices and pro-BNP values. In high-risk subjects, the prevalence of patients with NT-proBNP values > 125 ng/L (40.6% vs 0% $p < .0001$) was higher, while E/A values were lower (0.8 ± 0.2 vs 1.0 ± 0.2 $p < .0001$). FGF21 was positively associated with higher values of HbA1c ($p 0.003$), triglycerides ($p 0.038$) and transaminases (AST $p 0.019$ - ALT $p 0.049$), however after adjusting considering this correlation, there was no significant association between circulating FGF21 levels and the risk of heart failure ($p 0.94$). No association was observed with sign of macrovascular disease (OR per log-FGF21 unit: 1.07; 95 CI 0.75 - 1.51, $p=0.723$) although after adjustment for HbA1c and triglycerides there was a significant inverse association with risk of CAD at 5 yr estimated with UKPDS ($p 0.023$).

On the other hand, higher FGF-21 values were significantly associated with a lower occurrence of chronic kidney disease (OR per log-FGF21 unit: 0.57; 95% CI 0.36-0.90, $p=0.016$) and proliferative diabetic retinopathy (OR per log-FGF21 unit: 0.29; 95% CI 0.10 - 0.82, $p=0.020$).

Conclusions: In our study, we validated the effectiveness of the Watch DM risk score in identifying subjects with early echocardiographic and laboratory changes compatible with initial diabetic cardiomyopathy. This suggests that Watch-DM might be useful in clinical practice to identify those subjects needing a second level cardiovascular evaluation. Circulating FGF21 values are not clearly associated with signs of heart failure or macroangiopathy, supporting the possible presence of compensatory effect or FGF-21 resistance influencing the circulating levels of FGF-21. Rather we observed an inverse association with chronic kidney disease and proliferative diabetic retinopathy, requiring further investigation that might support the protective role of FGF-21 evidenced in animal models.

RIASSUNTO

Presupposti dello Studio: La prevalenza del diabete tipo 2 sta aumentando globalmente e le complicanze croniche macrovascolari e microvascolari del diabete sono responsabili di un aumento della disabilità e mortalità che risulta ancora oggi marcatamente aumentata rispetto alla popolazione generale. Negli ultimi anni si è osservato anche un progressivo aumento globale delle ospedalizzazioni per scompenso cardiaco, che per la metà avvengono in pazienti con diabete tipo 2. Risulta pertanto necessario sviluppare nuovi approcci diagnostici e terapeutici per contrastare le complicanze croniche del diabete, e negli ultimi anni numerosi modelli sperimentali hanno identificato i possibili ruoli protettivi micro e macrovascolari del Fibroblast Growth Factors-21 (FGF-21).

Scopo dello studio: L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare la presenza di un'associazione tra i valori circolanti di FGF21 e le complicanze croniche del diabete mellito tipo 2 (DMT2), con particolare attenzione all'insufficienza cardiaca. Inoltre si è valutata la validità del Watch-DM rispetto alla presenza di segni subclinici di iniziale cardiomiopatia.

Materiali e Metodi: La raccolta dei dati si è svolta da settembre 2020 a gennaio 2022. Sono stati inclusi i dati di 145 pazienti con diagnosi di diabete mellito tipo 2, regolarmente seguiti presso il Servizio di Diabetologia dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova nel periodo dal 2010 al 2021. Abbiamo raccolto informazioni demografiche ed anamnestiche, dati antropometrici, parametri bioumorali e la presenza di complicanze macro- e microangiopatiche. Si è valutato lo score clinico di scompenso cardiaco con Watch-DM (che include età, BMI, pressione arteriosa sistolica e diastolica, creatinina sierica, glucosio plasmatico a digiuno, colesterolo LDL, durata QRS, storia di infarto miocardico, storia di innesto di bypass coronarico). La presenza di cardiopatia o segni subclinici di iniziale scompenso cardiaco sono stati valutati con parametri elettrocardiografici ed ecocardiografici e bioumorali (NT-proBNP dosato con il metodo di immunometrica con rivelazione in chemiluminescenza). Sono inoltre stati calcolati gli score di rischio di CAD e stroke secondo UKPDS. Attraverso il metodo Elisa sono stati quindi dosati i livelli di FGF21 sui campioni ematici dei soggetti reclutati

Risultati: Sono stati arruolati 145 soggetti con diabete tipo 2, divisi in base a Watch DM molto basso ≤ 7 (n=72) e Watch DM alto o molto-alto ≥ 11 (n=73). L'età media era di 60 (± 15) anni, il 47% erano donne e la durata media di malattia era di 9 anni. La maggior parte della popolazione era in prevenzione CV primaria (96%), senza storia nota di scompenso cardiaco, anche se il 76,9% era a rischio CV molto alto. Lo score Watch-DM si associava significativamente con diversi indici di iniziale cardiopatia. Nei soggetti ad alto rischio, infatti la prevalenza dei pazienti con i valori di NT-proBNP > 125 ng/L (40.6% vs 0% p $<.0001$) era maggiore, mentre i valori di E/A erano minori (0.8 ± 0.2 vs 1.0 ± 0.2 p $<.0001$). FGF21 risulta associato positivamente a valori più elevati di HbA1c (p 0.003), trigliceridi (p 0,038) e transaminasi (AST p 0,019 - ALT p 0,049), tuttavia dopo aggiustamento per tale associazione, non si evidenzia nessuna associazione significativa tra i livelli circolanti di FGF21 e il rischio di scompenso cardiaco (p 0,94) o indici ecocardiografici. Non vi era inoltre alcuna associazione tra FGF21 e segni di macroangiopatia (OR per unità di log-FGF21: 1.07; 95 IC 0.75 – 1.51, p=0.723) sebbene dopo aggiustamento per HbA1c e trigliceridi ci fosse un'associazione significativa e inversa con rischio di CAD a 5 aa stimato con UKPDS (p 0,023). Valori più elevati di FGF-21 si associavano nominalmente ad una minor presenza di malattia renale cronica (OR per unità di log-FGF21: 0.57; 95% I.C. 0.36-0.90, p=0.016) e di retinopatia diabetica proliferante (OR per unità di log-FGF21: 0.29; 95 IC 0.10 - 0.82, p=0.020).

Conclusioni Nel nostro studio abbiamo validato l'efficacia dello score Watch DM nell'identificare soggetti con alterazioni precoci ecocardiografiche e laboratoristiche di iniziale cardiomiopatia diabetica. Ciò suggerisce la potenziale utilità clinica dello score nell'identificare i pazienti da indirizzare verso approfondimenti cardiovascolari di secondo livello. I valori circolanti di FGF21 non appaiono invece predittivi della presenza di segni di scompenso cardiaco o macroangiopatia. Ciò supporta l'esistenza di possibili meccanismi di compensazione o resistenza a FGF21, che ne influenzano i valori circolanti. Il riscontro di associazione inverse tra livelli di FGF21 e la prevalenza di patologia renale cronica e retinopatia diabetica proliferante richiede ulteriori approfondimenti che potrebbero confermare il ruolo protettivo del FGF21 evidenziato negli studi su modelli animali.

INTRODUZIONE

Nel corso del XX e XXI secolo si è visto un notevole incremento dell'incidenza delle malattie non trasmissibili (NCD), o malattie croniche, come obesità, diabete, steatosi epatica associata a patologia metabolica (MAFLD) e malattie cardiovascolari (CVD). Questo aumento è associato a cambiamenti nei modelli di abitudine alimentare e fisica, insieme alle condizioni genetiche.

L'impatto di queste malattie sulla popolazione risulta nel rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (1) in cui è stato evidenziato come oltre il 50% dei 57 milioni di decessi in tutto il mondo, nel 2016, si sia verificato per NCD: diabete (1,6 milioni di persone), cancro (9 milioni) e malattie cardiovascolari (17,9 milioni); ponendo una significativa sfida sanitaria globale (2). In considerazione della minaccia globale delle malattie non trasmissibili, l'OMS ha adottato obiettivi prioritari per ridurre la mortalità delle malattie non trasmissibili e la prevalenza dei fattori di rischio entro il 2025 (1).

La malattia cardiovascolare aterosclerotica rimane la principale causa di morte e disabilità tra i pazienti con diabete mellito, d'altronde circa due terzi dei decessi nelle persone con diabete mellito tipo 2 (DM2) sono dovuti a malattie cardiovascolari, di questi, circa il 40% è dovuto a cardiopatia ischemica, il 15% ad altre forme di cardiopatia, principalmente insufficienza cardiaca congestizia, e circa il 10% da ictus.(3).

L'insufficienza cardiaca (HF) è la seconda manifestazione più comune di malattia cardiovascolare, come dimostrato nel più grande studio di coorte su quasi 1,9 milioni di pazienti con diabete di tipo 2 seguiti per una mediana di 5,5 anni (4). Il Framingham Heart Study ha evidenziato come il rischio di insufficienza cardiaca aumenti di 2,4 volte negli uomini e di 5 volte nelle donne affette rispetto a quelle senza diabete (5).

In questa ottica sono state studiate alcune citochine che hanno dimostrato di essere significativamente correlate all'insorgenza e allo sviluppo di CVD, queste potrebbero diventare nuovi markers per la diagnosi precoce e bersagli per trattamento delle CVD (6). In particolare l'FGF 21 è stato identificato per la prima volta nel 2000 (7), e ha attirato l'attenzione globale grazie alla sua eccellente capacità di regolare il metabolismo glucidico e lipidico.

I primi studi su FGF21 si sono concentrati principalmente sull'espressione e sulla regolazione metabolica nel fegato, mentre la relazione tra FGF21 e il cuore è diventata l'argomento di ricerca più popolare negli ultimi dieci anni. Diversi studi successivi hanno riportato la relazione tra FGF21 e CVD, in particolare coronaropatia, (8) cardiomiopatia, (9) e scompenso cardiaco (10).

Data l'elevata incidenza e prevalenza del DM2, 16,5% fra le persone con più di 65 anni, in Italia, nonché l'aumento della sopravvivenza malattia dipendente (11), risulta fondamentale la diagnosi precoce delle complicanze al fine di ridurre non solo la mortalità ma anche la morbilità e la disabilità malattia correlata, allo scopo di migliorare la qualità di vita dei pazienti. Le complicanze del diabete si possono distinguere in complicanze macroangiopatiche e microangiopatiche.

Nel presente studio abbiamo indagato la presenza di correlazione tra i livelli circolanti di FGF 21 e le complicanze croniche del diabete con particolare attenzione all'insufficienza cardiaca, in un campione di pazienti diabetici di tipo 2, regolarmente afferenti al Servizio di Diabetologia dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova.

Capitolo 1. La malattia cardiovascolare nei pazienti diabetici

1.1 Diabete mellito

1.1.1 Definizione e fisiopatologia

Il diabete mellito comprende un gruppo eterogeno di disordini metabolici caratterizzati da un'alterazione cronica della tolleranza glucidica, l'iperglicemia dovuta a una combinazione di ridotta secrezione insulinica e di vari gradi di resistenza periferica all'insulina stessa. Viene classicamente distinto in diabete mellito di tipo 1, di tipo 2, diabete gestazionale e altre forme di diabete.

Secondo quanto riportato negli “*Standards of Medical Care in Diabetes*” dell’*American Diabetes Association* (ADA) del 2020 (12) la diagnosi di diabete mellito si basa su uno dei seguenti criteri:

- glicemia a digiuno o FPG (*fasting plasma glucose*), cioè in assenza di apporto calorico da almeno 8 ore, ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L);
- glicemia a 2 ore o 2-h PG (*2 hours plasma glucose*) ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) durante un test per la tolleranza glucidica orale o OGTT (*oral glucose tolerance test*), eseguito, secondo quanto indicato dall’OMS, mediante l’ingestione di 75 g di glucosio anidro disciolti in acqua;
- Emoglobina glicata (HbA1c) $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol). Il test dovrebbe essere effettuato in un laboratorio usando un metodo certificato dalla NGSP e conforme agli standard del *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT);
- Paziente con i classici sintomi di iperglicemia o crisi iperglicemica in cui si rileva una glicemia random ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

Salvo che in presenza di una chiara diagnosi clinica, per la conferma sono necessari due risultati anomali dei test menzionati, dallo stesso campione (13) o su campioni separati. Nel caso di campioni separati il secondo test deve essere effettuato ravvicinato al primo. L’International Diabetes Federation (IDF) raccomanda di misurare l’FPG e di eseguire l’OGTT sulla base di livelli casuali di glucosio plasmatico associati allo sviluppo di diabete (PG a 2 ore ≥ 200 mg/dL) o prediabete (PG a 2 ore 140-199 mg/dL è considerato a rischio di sviluppare il

diabete). Nello specifico gli individui con FPG tra 100-125 mg/dL hanno Impaired Fasting Glucose (IFG), ovvero un aumentato rischio di sviluppare DM2 (14).

Come supporto alla diagnosi di DM1, invece, si richiede il pannello di ricerca per autoanticorpi specifici, la cui positività ad almeno uno di essi è rilevabile nel 95% degli affetti. Questi anticorpi comprendono:

- Anticorpi citoplasmatici anti-insula pancreatica (ICA)
- Anticorpi anti-decarbossilasi dell'acido glutammico (GADA)
- Anticorpi-2 associati all'insulinoma-2 (IA-2A)
- Anticorpi anti-insulina (IAA)
- Anticorpi anti-trasportatore dello zinco 8 (ZnT8A)

Il diabete mellito di tipo 1 (DM1) si sviluppa generalmente nell'infanzia o nell'adolescenza ed è determinata dalla distruzione autoimmune delle cellule β insulari pancreatiche probabilmente scatenata da un'esposizione ambientale in persone geneticamente suscettibili. Tale distruzione progredisce in modo subclinico per mesi o anni finché la quantità di beta-cellule non diminuisce a tal punto che la concentrazione di insulina prodotta non è più adeguata a controllare la glicemia, determinando così l'insorgenza di diabete franco.

Il diabete mellito di tipo 2 (DM2) è, invece, un'endocrinopatia caratterizzata da insulino-resistenza e progressiva riduzione di secrezione insulinica da parte delle cellule β . In particolare l'insulino-resistenza nel fegato determina incapacità dell'inibizione della produzione epatica di glucosio, e la resistenza periferica ostacola l'assorbimento dello stesso a questo livello. Questa combinazione dà luogo a iperglicemia postprandiale e anche a digiuno. I pazienti oggetto del nostro studio presentano tutti una diagnosi di DM2.

Esiste inoltre un'altra condizione denominata Latent Autoimmune Diabetes of the Adults (LADA), introdotta da Zimmet (15) per descrivere quel sottogruppo di pazienti con esordio di malattia autoimmune in età adulta (età ≥ 35 anni). Il diabete autoimmune latente negli adulti (LADA) è una malattia eterogenea caratterizzata da un processo autoimmune meno intensivo e da un ampio fenotipo clinico rispetto al diabete mellito tipo 1 classico, condividendo le caratteristiche sia con il diabete mellito di tipo 2 (DM2) che con il DM1. Poiché i pazienti affetti da LADA sono inizialmente indipendenti dall'insulina e riconoscibili solo mediante test per gli autoanticorpi delle cellule insulari, potrebbe essere difficile una sua identificazione precoce in ambito clinico e rimane ancora un alto tasso di diagnosi

errate tra i pazienti con DM2. Idealmente, lo screening degli autoanticorpi a cellule insulari dovrebbe essere eseguito in tutti i soggetti con DM2 di nuova diagnosi (15,16).

Con diabete mellito gestazionale (GDM) si intende lo sviluppo spontaneo di iperglicemia durante il 2° o 3° trimestre di gravidanza. L'età materna avanzata, la storia familiare, le cattive abitudini alimentari e l'obesità sono i principali fattori di rischio per lo sviluppo di questa malattia che colpisce circa il 14% delle gravidanze in tutto il mondo (17). Poiché la gravidanza richiede un incremento di energia, nelle fasi iniziali, c'è un aumento della sensibilità all'insulina, tuttavia, con il progredire della gravidanza, gli ormoni locali e placentari come estrogeni, progesterone, leptina, cortisolo, lattogeno placentare e ormone della crescita placentare, promuovono uno stato di insulino-resistenza (18). La diagnosi precoce di GDM risulta fondamentale in quanto se non adeguatamente trattato aumenta il rischio di parto pretermine, pre-eclampsia e macrosomia da aumento del trasporto placentare di glucosio, amminoacidi e acidi grassi, quindi da conseguente produzione di insulina e IGF-1 (19).

Infine, per completezza, si ricorda l'esistenza di altre categorie di DM quali: le sindromi diabetiche monogeniche (diabete neonatale e maturity-onset diabetes of the young - MODY), il diabete mellito secondario a patologie del pancreas esocrino (fibrosi cistica e pancreatite cronica) o ad altre endocrinopatie e all'utilizzo di farmaci (glucocorticoidi).

1.1.2 Epidemiologia del diabete mellito tipo 2

Nel mondo circa 537 milioni di adulti vivono con la diagnosi di diabete, di questi 6.7 milioni decedono ogni anno. Il DM2 rappresentando circa il 90% di tutte le diagnosi di diabete ha assunto le caratteristiche e le dimensioni di una vera propria emergenza sanitaria a causa della sua elevata prevalenza (20). Secondo l'ultimo Report dell'Istat del 2017 le persone che si dichiaravano diabetiche nel 2016 in Italia erano oltre 3 milioni 200 mila; ciò significa che il 5,3% dell'intera popolazione è affetto da tale patologia (16,5% fra le persone con più di 65 anni). La diffusione del diabete è raddoppiata in trent'anni (coinvolgeva il 2,9% della popolazione nel 1980); ciò si deve all'invecchiamento della popolazione,

all'anticipazione della diagnosi e all'aumento della sopravvivenza malattia dipendente (11).

1.1.3 Complicanze vascolari del diabete

Il diabete mellito di tipo 2 può dare luogo a complicanze vascolari a lungo termine si differenziano in complicanze microvascolari e macrovascolari.

Le complicanze microangiopatiche comprendono retinopatia, nefropatia e neuropatia. La microangiopatia può compromettere anche la capacità di cicatrizzazione cutanea, con tendenza alla formazione di ulcere profonde e infezioni cutanee anche in seguito a piccole lesioni. Il controllo intensivo della glicemia può prevenire o ritardare molte di queste complicanze, ma non invertirle una volta instaurate.

La retinopatia rappresenta la maggiore causa di cecità in soggetti in età lavorativa nei Paesi industrializzati, normalmente insorge generalmente dopo almeno dieci anni di malattia, principalmente nei pazienti con glicemia non controllata per lungo tempo. La retinopatia diabetica è suddivisibile in due fasi (o stadi):

1. una fase iniziale, chiamata retinopatia diabetica non proliferante caratterizzata dalla formazione, di aneurismi che possono rompersi e provocare emorragie a livello di capillari retinici;
2. una fase avanzata, o retinopatia diabetica proliferante: in questa fase oltre agli aneurismi e la conseguente emorragia vi sono occlusioni di diversi capillari che determinano fenomeni di ischemia retinica e rivascolarizzazione.

I pazienti con diabete presentano, inoltre, un aumentato rischio di sviluppare cataratta e glaucoma.

Con nefropatia si intende la perdita progressiva della funzione renale che determina un grado crescente di insufficienza renale, la progressione della quale può essere accelerata dall'ipertensione concomitante. Dal punto di vista microscopico la patologia è caratterizzata da ispessimento della membrana basale glomerulare, dall'espansione del mesangio e dalla sclerosi glomerulare. Dal punto di vista clinico è di solito asintomatica fin quando non si sviluppa con sindrome nefrosica o l'insufficienza renale che può richiedere terapia dialitica o trapianto renale. La diagnosi precoce si ottiene mediante la misurazione di albumina nelle

urine al momento della diagnosi e monitoraggio della stessa successivamente ogni anno in modo da riconoscere precocemente la nefropatia. Il monitoraggio può essere eseguito tramite la misurazione del rapporto albumina:creatinina su un campione estemporaneo di urina o di albuminuria totale su una raccolta di urine delle 24 h. Un rapporto > 30 mg/g, oppure un'escrezione d'albumina tra 30 e 300 mg/die, indica la presenza di microalbuminuria e di una nefropatia diabetica precoce. Un'eliminazione di albumina > 300 mg/die è chiamata macroalbuminuria, o proteinuria conclamata > 3 g/die, e implica una nefropatia diabetica più avanzata.

La neuropatia diabetica è una complicanza frequente che può interessare sia il sistema nervoso periferico, che il sistema nervoso autonomo. Con neuropatia periferica si intende una polineuropatia polidistrettuale, simmetrica, solitamente distale (raramente prossimale) e più frequentemente interessa gli arti inferiori, si manifesta con parestesie, disestesie o con perdita indolore della sensibilità tattile, vibratoria, propriocettiva o termica. I sintomi possono condurre a una ridotta percezione dei traumi del piede derivanti da scarpe strette o da un'errata distribuzione del peso corporeo; ciò può causare ulcerazioni e infezioni del piede o fratture, sublussazioni e dislocazioni o distruzione della normale architettura del piede (morbo di Charcot). La neuropatia autonoma può colpire l'apparato cardiovascolare con ipertensione ortostatica, tachicardia o fibrillazione atriale; l'apparato digerente con diarrea o stipsi, nausea e vomito; gli organi genito-urinari con impotenza, e disfunzioni vescicali (vescica neurogena). La malattia cardiovascolare, secondaria ad aterosclerosi accelerata del paziente con diabete (come coronaropatia e infarto miocardico, attacco ischemico transitorio e ictus, o arteriopatia periferica) o in combinazione ad alterazioni metaboliche come lo scompenso cardiaco, sono trattate nel prossimo paragrafo.

1.2 Malattia cardiovascolare

1.2.1 Fattori patogenetici della malattia cardiovascolare nel diabete

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nel nostro paese, essendo responsabili del 34,8% di tutti i decessi (31,7% nei maschi e 37,7% nelle femmine). In particolare, secondo i dati Istat 2018, la cardiopatia

ischemica è responsabile del 9,9% di tutte le morti (10,8% nei maschi e 9% nelle femmine), mentre le patologie cerebrovascolari dell'8,8% (7,3% nei maschi e 10,1% nelle femmine) (21).

La cardiopatia coronarica (CAD) deriva da una diminuzione della perfusione miocardica che causa angina ischemica e può portare a infarto miocardico (IM) e/o a insufficienza cardiaca, i fattori di rischio principali sono: disturbi lipidici, in particolare alta concentrazione sierica di colesterolo LDL, ipertensione, fumo di tabacco, obesità, diabete, genere maschile e inattività fisica. L'obesità è sia un fattore di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari, anche se strettamente connessa con molti altri fattori di rischio (22).

Numerosi elementi patogenetici cellulari e molecolari partecipano allo sviluppo della malattia cardiovascolare aterosclerotica nel diabete mellito. I principali fattori di rischio cardiovascolare osservati nel paziente diabetico sono: iperglicemia, insulino-resistenza e conseguente iperinsulinemia, dislipidemia, infiammazione subclinica cronica, aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), disfunzione endoteliale, ipercoagulabilità ematica e calcificazione vascolare (23). L'aumento significativo e costante dei tassi di CVD negli ultimi decenni può essere spiegato dall'industrializzazione con conseguente passaggio da lavori fisicamente impegnativi a lavori sedentari, insieme all'attuale consumismo e alla cultura guidata dalla tecnologia legata a orari di lavoro e spostamenti più lunghi e meno tempo libero per attività ricreative (24,25).

I pazienti affetti da DM2 hanno più frequentemente placche aterosclerotiche poli-distrettuali, di maggior volume e più calcifiche a livello prevalentemente del distretto periferico e delle coronarie con lume più piccolo rispetto alle persone non diabetiche (26).

Numerosi studi epidemiologici supportano l'associazione tra iperglicemia e rischio cardiovascolare aumentato (27), in particolare l'HbA1c anche nell'intervallo dal 5,5% al 6,5% pone un rischio considerevolmente elevato di morbilità e mortalità per CVD, mentre ogni aumento dell'1% di HbA1c pone un rischio relativo del 15-18% di malattie cardiovascolari rispettivamente nel DM1 e nel DM2 (28). Da un punto di vista fisiopatologico l'iperglicemia acuta peggiora la funzione endoteliale e riduce la biodisponibilità dell'ossido nitrico (NO) (29), aumentando al contempo l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali (30,31); ciò è mediato in parte dall'aumento dello stress ossidativo e dell'infiammazione. Anche le cellule

muscolari lisce vascolari (VSMC) contribuiscono ad aumentare il rischio CVD nel contesto dell'iperglicemia: subiscono un passaggio fenotipico da uno stato quiescente, contrattile a uno stato attivato, proliferativo, migratorio e dedifferenziato. L'iperglicemia transitoria, infine, porta a cambiamenti epigenetici con l'attivazione del fattore nucleare kappa-light-chain-enhancer della via delle cellule B attivate (NF- κ B) che persiste anche dopo il ritorno alla normo-glicemia (32), l'attivazione della via di NF- κ B è correlata a processi biologici come infiammazione, immunità, differenziazione, crescita cellulare, tumorigenesi e apoptosi (32).

Oltre all'iperglicemia anche l'insulino-resistenza predispone al rischio cardiovascolare, sia come fattore di rischio indipendente che in associazione a ipertensione arteriosa e dislipidemia; fattori di rischio classici che contribuiscono di per sé allo sviluppo, alla progressione e alle complicanze dell'aterosclerosi; nello specifico la dislipidemia è rilevabile in circa il 60% dei soggetti con DM2. (33,34).

In questi soggetti, le particelle di colesterolo LDL (low-density lipoprotein) sono più aterogene, anche in assenza di un aumento manifesto della loro concentrazione (35), la dislipidemia diabetica è anche caratterizzata da concentrazione di trigliceridi elevati, bassi livelli colesterolo HDL e concentrazioni più elevate di LDL (36). Sia la resistenza all'insulina vascolare sistemica che quella tessuto-specifica contribuiscono allo sviluppo dell'aterosclerosi e alla vulnerabilità della placca (37).

I meccanismi alla base della dislipidemia diabetica rimangono incompletamente compresi. I cambiamenti lipidici sono osservati nelle persone insulino-resistenti con normale tolleranza al glucosio e in quelle con sindrome metabolica anni prima della diagnosi clinica del diabete di tipo 2, suggerendo co-associazioni di disturbi indipendenti o un ruolo fisiopatologico per l'insulino-resistenza, piuttosto che l'iperglicemia, nello sviluppo della dislipidemia diabetica (38).

1.2.2 Cardiopatia ischemica

L'ischemia miocardica rappresenta una condizione di sofferenza per i cardiomiociti a causa della riduzione del flusso sanguigno coronarico rispetto alle loro richieste metaboliche e può manifestarsi attraverso diverse condizioni cliniche.

L'angina instabile è una manifestazione della sindrome coronarica acuta e deriva da un'ostruzione acuta di un'arteria che determina ischemia miocardica transitoria senza danno cellulare permanente. È caratterizzata dalla presenza di una placca instabile e ulcerata con apposizione di processi trombotici che implicano una stenosi coronarica dinamica. Circa il 10% dei pazienti con cardiopatia ischemica presenta angina instabile come prima manifestazione di malattia (39) e circa il 50% dei pazienti ricoverati per infarto riferiscono la presenza di episodi anginosi ascrivibili a un quadro di angina instabile nei giorni immediatamente precedenti l'evento (40).

L'infarto miocardico acuto (IMA) è un quadro clinico acuto caratterizzato da necrosi miocardica per ischemia prolungata dovuta a un'occlusione acuta di un'arteria coronaria, quindi l'insufficiente apporto di ossigeno rispetto alla richiesta dei miociti. Se l'ostruzione coronarica è totale determina un arresto totale del flusso sanguigno nel territorio irrorato dall'arteria interessata, provocando la necrosi del miocardio a tutto spessore che si manifesterà con il quadro di infarto transmurale o STEMI (ST elevation myocardial infarction). Se invece l'occlusione della coronaria è parziale o transitoria e tende a risolversi entro 3 ore, si verificherà un quadro di NSTEMI (Non-ST elevation myocardial infarction) o infarto subendocardico.

La sintomatologia è caratterizzata dal dolore forte di tipo costrittivo o urente, tipicamente retro-sternale che tende a irradiarsi verso la spalla e all'arto superiore sinistro, benché sia possibile anche l'irradiazione cervicale o alla scapola sinistra. Il dolore è spesso accompagnato da un corredo di sintomi più o meno tipici quali sudorazione, nausea, vomito, astenia ma anche, meno frequentemente, dispnea o dolore addominale.

La valutazione diagnostica inizia con ECG ripetuti e misurazioni seriate dei marcatori cardiaci per aiutare a distinguere tra angina instabile, infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST (l'elevazione del segmento ST ≥ 1 mm in 2 o più derivazioni contigue che sottendono l'area danneggiata), e infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST.

I marker cardiaci (marker sierici da danno alle cellule miocardiche) sono enzimi cardiaci (p. es., isoenzima MB della creatinichinasi [CK-MB]) e sostanze contenute nei miocardiociti (p. es., troponina I, troponina T, mioglobina) che sono rilasciate nel flusso sanguigno dopo la necrosi delle cellule miocardiche. I marker compaiono in tempi differenti dopo la necrosi e i livelli si riducono a velocità

diverse (41). Infine la coronarografia si associa sia alla diagnosi che al trattamento percutaneo (intervento coronarico percutaneo, ossia angioplastica, inserimento di stent).

1.2.3 Scompenso cardiaco

Il diabete, come si vedrà in modo più approfondito nel capitolo successivo, si associa ad aumentato rischio di insufficienza cardiaca, indipendentemente dall'ipertensione concomitante o dalla malattia coronarica, (5). L'insufficienza cardiaca (HF) può manifestarsi già negli stadi precoci di malattia diabetica o di prediabete e la sua gravità correla con l'entità dell'insulino-resistenza e dello scompenso glicemico.(42,43).

1.3 Trattamento

Il trattamento del diabete comporta, innanzitutto, cambiamenti nello stile di vita, compresi dieta ed esercizio fisico., quindi il trattamento farmacologico con lo scopo di ridurre la glicemia. Il monitoraggio regolare e il controllo stretto della glicemia sono essenziali per prevenire le complicanze a breve e lungo termine del diabete (dal treat-to-target al treat-to-benefit). Le linee guida italiane raccomandano un target di HbA1c tra 48 mmol/mol (6.5%) o più alti nei pazienti fragili e/o trattati con farmaci associati ad ipoglicemia. (44).

1.3.1 Terapia non farmacologica

Il trattamento inizia innanzitutto con la terapia nutrizionale bilanciata (dieta Mediterranea), ed esercizio fisico regolare (44).

La dieta nel paziente diabetico ha lo scopo di ridurre l'accumulo di tessuto adiposo viscerale (addominale) associato a insulino-resistenza; la riduzione del peso corporeo, infatti, si è dimostrata un potente mezzo per migliorare la sensibilità all'ormone (45).

Analogamente, l'attività fisica regolare è in grado di migliorare la sensibilità all'insulina. In questi soggetti qualunque grado di esercizio mostra beneficio per la salute e non si esprime nessuna preferenza tra la prescrizione di esercizio fisico aerobio minore o maggiore di 150 minuti settimanali. Qualora possibile si

suggerisce la prescrizione di esercizio fisico combinato (aerobio e di resistenza), rispetto al solo esercizio fisico aerobio.(44).

Prima di iniziare l'approccio terapeutico alla malattia risulta fondamentale la terapia educativa, è da preferirsi l'istruzione in gruppo, piuttosto che individuale, in quanto in questo modo si va migliorare l'aderenza e l'outcome a lungo termine (44).

1.3.2 Terapia farmacologica

Il farmaco di prima scelta, a lungo termine, nel paziente con DM2 senza pregressi eventi cardiovascolari è la metformina: SGLT-2i e i GLP-1 RA rappresentano i farmaci di seconda scelta, infine Pioglitazone, DPP-4i, acarbiosio ed insulina dovrebbero essere considerati come farmaci di terza scelta. (44). Infine le sulfaniluree sono attualmente raccomandate solo in quarta linea in quanto ritenute obsolete e con effetti collaterali molto importanti

Per il trattamento a lungo termine in pazienti con diabete di tipo 2 con pregressi eventi cardiovascolari e senza scompenso cardiaco si raccomanda l'uso di metformina e concomitante SGLT-2i e/o GLP-1 RA come farmaci di prima scelta, mentre pioglitazone, DPP-4i, acarbiosio ed insulina dovrebbero essere considerati farmaci di seconda scelta (44).

Gli SGLT-2i rappresentano i farmaci da favorire (in associazione o aggiunta a metformina) nei pazienti con DM2 e scompenso cardiaco o nefropatia. i GLP-1 RA sono invece generalmente più raccomandati nei pazienti con malattia aterosclerotica o ad elevato rischio CV. (44).

Nello specifico, le raccomandazioni per GLP-1 RA sono:

- Per i pazienti con DM2 e malattia cardiovascolare aterosclerotica accertata (come quelli con precedente infarto miocardico, ictus ischemico, angina instabile con alterazioni dell'ECG, ischemia miocardica su imaging o test da sforzo o rivascolarizzazione delle arterie coronarie, carotidi o periferiche) dove gli eventi cardiovascolari maggiori (MACE) sono la minaccia più grave;
- Per ridurre il rischio di MACE, gli agonisti del recettore GLP-1 possono anche essere considerati in pazienti con DM 2 senza diagnosi di CVD con indicatori di alto rischio, in particolare, pazienti di età pari o superiore a 55

anni con stenosi coronarica, carotidea o arteriosa degli arti >50%, ipertrofia ventricolare sinistra, eGFR, $60 \text{ mL min}^{-1} [1,73 \text{ m}]^{-2}$, o albuminuria (46).

Raccomandazioni per SGLT-2 inibitori

- In pazienti con o senza CVD aterosclerotica stabilita, ma con HFrEF (FE < 45%) o CKD (eGFR da 30 a $60 \text{ mL min}^{-1} [1,73 \text{ m}]^{-2}$ o uACR.30 mg / g, in particolare albumina/creatina ratio >300 mg /g), il livello di evidenza per il beneficio è maggiore per gli inibitori SGLT2.
- Gli inibitori SGLT2 sono raccomandati nei pazienti con DM2 e HF, in particolare quelli con HFrEF, per ridurre l'ospedalizzazione da HF (hHF), MACE e morte cardiovascolare
- Gli inibitori SGLT2 sono raccomandati per prevenire la progressione di CKD, HF, MACE e morte CV nei pazienti DM2 con CKD.
- I pazienti con ulcera diabetica o ad alto rischio di amputazione devono essere trattati solo con inibitori SGLT2 dopo un attento processo decisionale condiviso in merito rischi e benefici con un'educazione completa sulla cura dei piedi e sulla prevenzione dell'amputazione (46).

Capitolo 2. scompenso cardiaco e Cardiomiopatia diabetica

2.1 Insufficienza cardiaca

Nel 1954, Lundbaek fece l'osservazione iniziale che la disfunzione miocardica era comune nei pazienti anziani con diabete, e definì questo fenomeno "cardiopatía diabetica" (47,48).

Quasi due decenni dopo, Rubler riportò i risultati post-mortem di quattro pazienti con diabete e insufficienza cardiaca in assenza di una significativa aterosclerosi coronarica epicardica, cardiopatía valvolare, congenita o ipertensiva o alcolismo. In questi pazienti descrisse l'ipertrofia miocardica, fibrosi e ispessimento della parete microvascolare e propose una cardiomiopatia correlata al diabete causata da un metabolismo miocardico anormale o microangiopatía miocardica (49).

2.1.1. Definizione e fisiopatologia

Con insufficienza cardiaca si intende uno stato fisiopatologico nel quale la funzione di pompa del cuore non è in grado di soddisfare i bisogni metabolici dei tessuti e organi in condizioni di normali pressioni di riempimento. L'insufficienza cardiaca non è una singola diagnosi patologica, ma una sindrome clinica costituita da sintomi cardinali (ad es. affanno, gonfiore della caviglia e affaticamento) che possono essere accompagnati da segni quali elevata pressione venosa giugulare, crepitii polmonari ed edema periferico. È dovuto a un'anomalia strutturale e/o funzionale del cuore che si traduce in elevate pressioni intracardiache e/o insufficienza cardiaca a riposo e/o durante l'esercizio fisico (50).

Molteplici fattori, tra cui l'età, la cardiopatía ischemica e arteriopatía periferica, nonché i fattori di rischio specifici del diabete, come lo scarso controllo glicemico (HbA1c più elevato) e la resistenza all'insulina, sono associati all'insufficienza cardiaca nei pazienti con diabete (51).

La cardiomiopatia ischemica è una delle principali cause di insufficienza cardiaca nella popolazione diabetica, anche in assenza di malattia coronarica epicardica, in questo caso entrano in gioco la malattia microvascolare, caratterizzata

da ispessimento arterioso e fibrosi, nonché disfunzione endoteliale e vasomotoria. Un'altra condizione di comorbidità comune nel diabete e uno dei fattori di rischio più rilevanti e diffusi è l'ipertensione che causa ipertrofia ventricolare sinistra e contribuisce allo sviluppo di HF (52).

L'identificazione eziologica della disfunzione cardiaca sottostante è obbligatoria nella diagnosi di HF, in quanto la patologia causale indirizza il trattamento successivo. Indipendentemente dall'eziologia nei pazienti con sospetto HF è raccomandato in prima linea il dosaggio di BNP o NT-proBNP, con valori soglia di 125 ng/l e 35 ng/l rispettivamente (53). Questi cut-off garantiscono la migliore sensibilità (94–98%) (54), ciononostante hanno un alto valore predittivo negativo e basso valore predittivo positivo, quindi qualora i valori superino il cut-off è raccomandato fare ulteriori esami per la diagnosi. In particolare l'ecocardiografia permette da una parte la diagnosi dall'altra la valutazione della frazione d'eiezione essenziale per la classificazione dell'HF. L'European Society of Cardiology (ESC) classifica l'HF in tre gruppi (50):

- Scompenso cardiaco con frazione di eiezione ridotta (HF_rEF): EF \leq 40%, cioè quelli con una significativa riduzione della funzione sistolica LV.
- Scompenso cardiaco con frazione di eiezione mid-range (HF_{mr}EF): pazienti con un LVEF tra il 41% e il 49%, con la funzione sistolica lievemente ridotta.
- Scompenso cardiaco con frazione di eiezione preservata (HF_pEF): pazienti con sintomi e segni di HF, evidenza di anomalie cardiache strutturali e/o funzionali e/o peptidi natriuretici (NP) sollevati, e con un LVEF \geq 50 (50).

2.1.2. *Epidemiologia*

L'insufficienza cardiaca è una delle principali cause di ospedalizzazione negli Stati Uniti; questi pazienti sono, inoltre, ad alto rischio di riammissione e tali eventi cumulativi sono un forte predittore di mortalità. A soffrire di scompenso cardiaco in Italia sono circa 600.000 persone e si stima che la sua prevalenza raddoppi ogni decade di età (dopo i 65 anni arriva al 10% circa) (55).

Nei pazienti con HF si è riscontrata un'associazione significativa tra diabete e prognosi negativa, intesa come ospedalizzazione, morte per cause cardiovascolari e morte per tutte le cause, indipendentemente dall'eziologia dell'insufficienza cardiaca (ischemica o non) (56,57).

Negli ultimi anni l'età media dei pazienti è diminuita da 72,5 nel 2010 a 71,6 nel 2017, anche la proporzione delle donne affette è diminuita nel 2017, mentre sono aumentate le condizioni di comorbidità associate (58), con conseguente aumento del tasso di ospedalizzazione. Infatti nel 1995, l'incidenza di ospedalizzazione, aggiustata per l'età, per patologia cardiaca ischemica (IHD) nei pazienti con diabete era il doppio di quello dell'ospedalizzazione per HF: tra il 1995 e il 2015, invece, il tasso di ospedalizzazione per IHD è diminuito del 67,8%, mentre quello di ospedalizzazione per HF del 38,9% (59).

Un recente studio ospedaliero su 2802 pazienti ricoverati, tra il 1999 e il 2001, con insufficienza cardiaca in Ontario, Canada, ha riportato tassi di mortalità simili a 1 anno nei pazienti con frazione di eiezione conservata (>50%) del 22% e quelli con una frazione di eiezione ridotta (<40%) del 26% (60).

2.1.3. Trattamento

La terapia farmacologia è l'intervento più importante per i casi di scompenso a FE ridotta; deve essere attivata nel più breve tempo possibile e prolungata per più tempo possibile, solo quando questa non è più efficace si deve optare per un device impiantabile. Gli obiettivi principali della terapia sono tre (61):

- ridurre la mortalità;
- prevenire le ospedalizzazioni ricorrenti
- migliorare la funzionalità cardiaca e lo stato di salute.

Le raccomandazioni prevedono la somministrazione di farmaci come i beta-bloccanti, ACE-inibitori/sartani, antagonisti dei recettori mineralcorticoidi, questi riducono la pressione arteriosa e il carico di lavoro ventricolare; i beta bloccanti contribuiscono anche a regolare il ritmo cardiaco. Si raccomanda di utilizzare gli ARNI (Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor) in sostituzione agli ACE inibitori nei pazienti che rimangono sintomatici nonostante la terapia di prima linea. Inoltre va segnalato che, indipendentemente dalla presenza di diabete, è possibile associare alla terapia standard anche gli inibitori SGLT 2 – dapaglifozin, empaglifozin – per ridurre il rischio di morte cardiovascolare. Altri farmaci da considerare in caso di scompenso con FE<40% sono: i diuretici dell'ansa per alleviare i sintomi dello scompenso, migliorare la capacità di esercizio e ridurre il rischio di ospedalizzazione; e l'ivabradina in soggetti con frazione di eiezione

ventricolare sinistra (FEVS) ≤ 35 in ritmo sinusale e frequenza cardiaca a riposo ≥ 70 b.p.m. nonostante il trattamento con betabloccanti (61).

Occorre però segnalare che i trattamenti farmacologici sebbene migliorino la progressione della malattia cardiovascolare non riducono il tasso di morte improvvisa. Per ridurre il rischio di morte improvvisa le linee guida raccomandano l'impiego del defibrillatore impiantabile (ICD) in prevenzione primaria nei pazienti con scompenso cardiaco e frazione di eiezione ventricolare sinistra $\leq 35\%$ e in prevenzione secondaria nei pazienti con aritmia ventricolare, instabilità emodinamica con aspettativa di vita superiore a 1 anno e buon stato funzionale (61).

Mancano studi specifici su soggetti con FE compresa tra 41 e 49%. La raccomandazione più solida prevede la somministrazione di diuretici; sono invece indicati come classe di evidenza II i beta-bloccanti, ACE-inibitori/sartani/ARNI, antagonisti dei recettori mineralcorticoidi con lo scopo di ridurre il rischio di ospedalizzazione e di morte (61).

Il paziente con HF e frazione di eiezione preservato si presenta con caratteristiche molto diverse rispetto ai casi con frazione di eiezione ridotta o moderatamente ridotta. In genere si tratta di pazienti più anziani e più spesso donne e l'HF è spesso associato a fibrillazione atriale, diabete, malattie renali o a comorbilità non cardiovascolari. Le linee guida raccomandano quindi (classe I) di effettuare uno screening delle comorbilità e di intervenire innanzitutto con una terapia mirata sulle cause. Per quanto riguarda la terapia farmacologica dell'HF con FE conservata: nessuna terapia ha mostrato una riduzione significativa della mortalità e morbilità sebbene siano stati osservati benefici in alcuni fenotipi. È stata però riportata una riduzione delle ospedalizzazioni in questi pazienti con sartani (candesartan) e antagonisti dei recettori mineralcorticoidi (spironolattone). Inoltre è stato osservato un trend in questo senso anche con ARNI (sacubitril/valsartan). In termini generali sono raccomandati i diuretici per alleviare i segni e i sintomi (61).

2.2 Algoritmi predittivi di rischio cardiovascolare

Come si è visto finora, la malattia diabetica conferisce un rischio cardiovascolare più elevato indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio e risulta quindi fondamentale la stratificazione dei pazienti diabetici, al fine di impostare trattamenti di intensità proporzionale alla classe di rischio. Elemento

chiave delle linee guida è stata la classificazione del rischio in base alle comorbidità e alla durata della malattia: i pazienti diabetici possono poi essere distinti in soggetti a rischio moderato, alto o molto alto. Il rischio molto elevato corrisponde a un rischio di morte cardiovascolare a 10 anni $> 10\%$; un rischio elevato corrisponde a un rischio di morte cardiovascolare a 10 anni, compreso tra 5 e 10% (61).

Le categorie di rischio cardiovascolare nei pazienti diabetici secondo le linee guida Società Europea di Cardiologia (ESC) 2019 (62) sono:

- Rischio moderato: pazienti < 50 anni (DM2) o < 35 anni (DM1) con durata di malattia < 10 anni in assenza di fattori di rischio;
- Rischio elevato: pazienti con durata di malattia > 10 anni senza danno d'organo (proteinuria, $eGFR \leq 30$ mL/min/1,73 m², ipertrofia ventricolare sinistra, retinopatia) e un fattore di rischio.
- Rischio molto elevato: pazienti con DM e malattia cardiovascolare nota o con danno d'organo o con tre o più fattori di rischio (età, ipertensione, dislipidemia, fumo, obesità) o con DM1 > 20 anni.

Il WATCH-DM risk score è un algoritmo, messo a punto dai ricercatori del Brigham and Women's Hospital e UT Southwestern Medical Center, in grado di predire il rischio di sviluppo di HF nei successivi 5 anni, in pazienti con diabete tipo 2 (63). L'algoritmo utilizza come variabili: BMI, età, ipertensione, creatinina, colesterolo HDL, glicemia a digiuno, durata del QRS, pregresso infarto miocardico e pregresso stenting coronarico; non richiede, quindi, specifici biomarcatori cardiovascolari o imaging avanzato, ma utilizza dati clinici, laboratoristici e elettrocardiografici di facile reperibilità (64). Dopo l'inserimento dei relativi valori il calcolatore fornisce un punteggio che può essere tramutato in una percentuale di rischio di HF a 5 anni: pazienti con lo score più elevato manifestano un rischio di sviluppare HF di circa il 20% a 5 anni (63).

Risk Score	HF Risk Group	5-yr HF Risk
≤ 7 points	Very Low	1.1%
8-9 points	Low	3.6%
10 points	Average	4.7%
11-13 points	High	9.2%
≥ 14 points	Very High	17.4%

Figura 1 Rischio di manifestare insufficienza cardiaca secondo l'algoritmo WATCH-DM

L'UKPDS Risk Engine è un algoritmo pensato per il calcolo del rischio cardiovascolare in prevenzione primaria nel paziente diabetico tipo 2. Fu formulato a partire dai dati dei pazienti arruolati nell'UK Prospective Diabetes Study (65). Questo studio ha dimostrato l'efficacia nel controllo glicemico a lungo termine nei pazienti con DM2 ai fini della riduzione delle complicanze croniche del diabete (66) e ha mostrato l'utilità del controllo pressorio sempre ai fini della riduzione delle complicanze (67). Il rischio può essere calcolato in soggetti con diabete mellito tipo 2 con qualunque durata di malattia, fornendo i dati dei seguenti parametri di rischio: età, sesso, etnia, stato di fumatore pregresso o attuale, presenza o assenza di fibrillazione atriale, livelli di emoglobina glicata, pressione sistolica, colesterolo totale e colesterolo HDL (68). L'algoritmo fornisce una stima (intervallo di confidenza 95%) del rischio assoluto di cardiopatia ischemica fatale/non fatale e ictus fatale/non fatale a un intervallo di tempo stabilito, in pazienti con diabete tipo 2 senza malattia cardiaca nota (69), specifico per la prevenzione primaria nel DM2.

2.3 Cardiomiopatia diabetica

Nonostante gli sforzi per comprendere la cardiomiopatia diabetica, c'è una controversia in corso che circonda la sua fisiopatologia unica, e rimane una condizione vagamente definita e solo brevemente riconosciuta nelle linee guida della pratica clinica contemporanea (70). Sebbene il diabete sia ora accettato come causa indipendente di cardiomiopatia, la gravità delle anomalie miocardiche correlate al diabete può essere amplificata da condizioni di comorbidità che aumentano il rischio di ipertrofia ventricolare e/o suscettibilità all'ischemia miocardica, aumentando in definitiva il rischio di insufficienza cardiaca.

Clinicamente, i pazienti con cardiomiopatia diabetica e disfunzione diastolica presentano inizialmente un fenotipo restrittivo, quindi insufficienza cardiaca con frazione di eiezione conservata (HFpEF) (71,72). Successivamente, la cardiomiopatia diabetica può anche presentarsi con disfunzione sistolica e un fenotipo dilatativo, ovvero con insufficienza cardiaca con frazione di eiezione ridotta (HFrEF). Inoltre, la disfunzione sistolica ventricolare sinistra può essere indotta con l'esercizio anche in pazienti asintomatici e frazione di eiezione normale a riposo, forse rappresentando una riserva cardiaca ridotta e una fase precoce e preclinica della disfunzione sistolica (73).

Recentemente, Seferovic e Paulus hanno proposto un nuovo paradigma secondo cui le manifestazioni restrittive e dilatative della cardiomiopatia diabetica sono due fenotipi clinici distinti piuttosto che stadi successivi (74), il coinvolgimento selettivo delle cellule endoteliali rispetto ai miociti nei disturbi metabolici e cellulari correlati al diabete, possono spiegare l'evoluzione indipendente di due forme distinte di cardiomiopatia diabetica (74), infatti, la progressione verso un fenotipo “dilatato” è rara; quando si verifica, è spesso correlato all'infarto miocardico o all'età avanzata, ma non al diabete (75).

Capitolo 3. FGF 21

Il FGF 21 è una proteina della famiglia dei Fibroblast Growth Factors (FGF) e in particolare un membro della sottofamiglia endocrina che comprende FGF23 e FGF15/19, il cui segnale viene trasmesso tramite un recettore eterodimerico espresso sulla superficie cellulare composto da uno dei tre recettori di FGF (FGFR1c, FGFR2c or FGFR3c) in complesso con β -Klotho, una proteina transmembrana riccamente espresso nei tessuti metabolici (76).

La famiglia degli FGF regola una pletora di processi di sviluppo, tra cui il pattern cerebrale, la morfogenesi e lo sviluppo degli arti, inoltre la sottofamiglia FGF19 ha azione endocrina nell'omeostasi degli acidi biliari, del glucosio e del fosfato (77).

L'FGF21 è stato, sin dall'inizio, scoperto come un nuovo regolatore metabolico con nuove funzioni diverse da quella dalle FGF canoniche; quest'ultime legano infatti l'eparina e promuovono direttamente la proliferazione e la crescita cellulare indipendentemente da un co-recettore. I primi studi hanno dimostrato come FGF21 sia un sensore di stress nel fegato e, possibilmente, in molti altri tessuti endocrini e metabolici (77), in particolare FGFR1c è espresso ubiquitariamente, mentre l'espressione di β -klotho è limitata ai tessuti metabolici conferendo specificità per FGF21; il β -klotho è espresso nel fegato, tessuto adiposo bianco (WAT) e bruno (BAT), pancreas (78) e in regioni distinte del cervello, tra cui l'area postrema, il nucleus tractus solitarii, il nucleo soprachiasmatico (76) e il nucleo paraventricolare (PVN) (79). Se le funzioni epatiche ed endocrine di FGF21 sono state da subito studiate, solo recentemente si sta ponendo maggior interesse sulla sua secrezione cardiaca; nonostante questa sia inferiore alla secrezione epatica, FGF21 viene stimolata in risposta a diversi stress cardiaci (77).

Tuttavia, la maggior parte dei rapporti a sostegno dell'associazione tra FGF21 e cardiomiopatia diabetica e insufficienza cardiaca sono stati ottenuti da studi su modelli animali, mentre gli studi clinici in soggetti umani sono ancora limitati.

3.1 Fegato e metabolismo

FGF21 è un epatochina che agisce come un segnale legato al digiuno, modula il partizionamento delle risorse e del metabolismo e reprime la crescita (80).

Durante gli stati di digiuno il fegato mantiene la disponibilità di energia per i tessuti periferici attraverso una maggiore produzione di glucosio a partire dal glicogeno epatico. Con il progredire del digiuno, l'utilizzo del substrato si sposta dai carboidrati ai corpi chetonici. Per raggiungere questo obiettivo, il WAT subisce la lipolisi con rilascio di glicerolo e acidi grassi liberi in circolo, questi parteciperanno alle reazioni, rispettivamente, di gluconeogenesi e chetogenesi nel fegato attraverso l'attivazione del Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) (81).

PPAR- α è un fattore di trascrizione attivato in condizioni di privazione di energia e regola il metabolismo lipidico nel fegato, è necessario per il processo di chetogenesi, una risposta adattativa chiave al digiuno prolungato (82). L'attivazione di PPAR α promuove l'assorbimento, l'utilizzo e il catabolismo dei lipidi mediante la sovra-regolazione dei geni coinvolti nel loro trasporto e la β -ossidazione degli acidi grassi perossisomiali e mitocondriali (83). Diversi studi hanno dimostrato che l'induzione mediata da PPAR α di FGF21 è importante per la risposta al digiuno adattivo (84,85). Coerentemente con i dati sui roditori, i livelli circolanti di FGF21 sono indotti anche nell'uomo durante il digiuno prolungato (86,87).

Negli studi su modelli animali la sovraespressione di FGF21 è stata sufficiente per aumentare la gluconeogenesi epatica, la β -ossidazione e la chetogenesi, mentre la perdita di funzione di FGF21 ha impedito la gluconeogenesi epatica in risposta al digiuno, la β -ossidazione e la chetogenesi. Un'importante osservazione fatta durante questi studi è stata che FGF21 non agisce direttamente sul fegato per mediare questi effetti sul metabolismo epatico: la somministrazione di FGF21 a livello degli epatociti primari o l'infusione in un fegato perfuso isolato non ha indotto l'espressione genica gluconeogenica epatica osservata nei topi wild-type trattati con FGF21 (88). Secondo gli esperti, FGF21 provoca i suoi effetti sulla gluconeogenesi epatica agendo a livello ipotalamico in seguito all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene per rilasciare corticosterone (79).

Durante il digiuno, elevati livelli di acidi grassi in circolazione inducono una fisiologica resistenza periferica all'insulina per risparmiare l'utilizzo del glucosio. Tuttavia, quando i nutrienti diventano disponibili dopo un digiuno prolungato, FGF21 funziona anche come un interruttore metabolico per facilitare la transizione allo stato di ri-alimentazione migliorando l'assorbimento di glucosio (89). Nell'uomo, i livelli sierici di FGF21 sono, infatti, indotti sia da aumenti dei livelli di glucosio che di insulina. L'FGF21 funziona, quindi, come mediatore critico dell'omeostasi dei nutrienti durante gli stati di digiuno e ri-alimentazione (90).

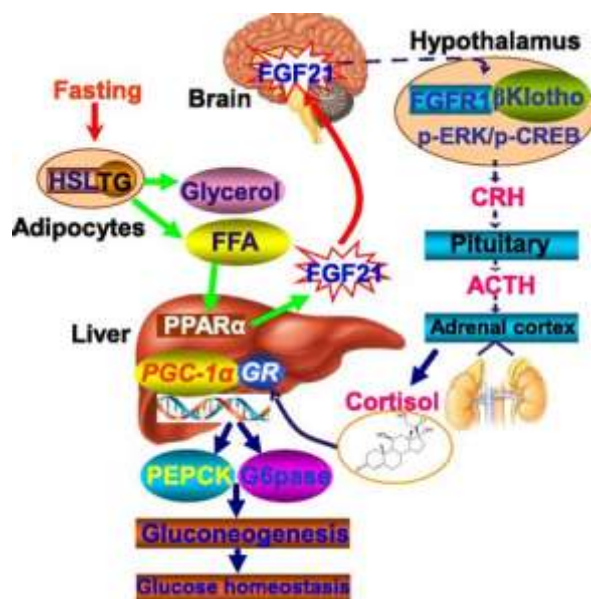


Figura 2 FGF21 mantiene l'omeostasi del glucosio durante il digiuno prolungato (tratta da: Diabetes 2014;63(12))

FGF21 è marcatamente indotto da diete chetogeniche nei roditori, tuttavia, non è chiaro se vi sia alcuna rilevanza traslazionale di FGF21 per gli effetti benefici delle diete chetogeniche negli esseri umani, perché nelle persone i livelli circolanti di FGF21 non aumentano in risposta a una dieta chetogenica (91,92).

Anche le diete a basso contenuto proteico (92,93) e il farmaco asparaginasi che impoverisce gli aminoacidi (94) inducono i livelli sierici di FGF21, al fine di mantenere l'equilibrio dei macronutrienti, gli animali modificano il loro apporto calorico per raggiungere una quantità sufficiente di proteine nel corpo in un processo chiamato leva proteica (95).

Oltre alla regolazione del metabolismo dei macronutrienti e del dispendio energetico fisiologico, FGF21 sembra funzionare nel prevenire lo sviluppo di steatosi pancreatica, steato-pancreatite, steatosi epatica e steato-epatite, prevenendo

così lo sviluppo di patologie avanzate come l'adenocarcinoma duttale pancreatico o il carcinoma epatocellulare (80).

3.1.1 Genetica

La regolazione dell'assunzione di cibo è complessa e integra sia segnali periferici che centrali (96). Mentre i meccanismi che controllano l'apporto calorico totale sono stati ampiamente esplorati, poco si sa per quanto riguarda la regolazione dell'assunzione di macronutrienti. D'altronde ci sono prove che il consumo di macronutrienti principali ha una componente genetica (97), varianti genetiche comuni sono state studiate in associazione all'assunzione di carboidrati, grassi e proteine. Due studi indipendenti hanno rivelato che i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel locus FGF21 sono associati a cambiamenti nell'assunzione di macronutrienti (98,99). In particolare, questi studi hanno riportato che le varianti rs838133 e rs838145 erano associate a un maggiore apporto di carboidrati (98,99). Un terzo rapporto ha anche identificato SNP al locus FGF21 associandolo a una preferenza per i dolci (100).

Sebbene le varianti di FGF21 siano associate a cambiamenti nell'assunzione di macronutrienti, non sono state associate all'obesità o al diabete di tipo 2. Tuttavia, mentre i cambiamenti nell'apporto calorico possono influenzare il peso corporeo e l'omeostasi metabolica, i cambiamenti nell'assunzione di macronutrienti da soli possono influenzare la segnalazione dell'insulina, la salute cardiometabolica e la longevità (101).

3.2 SNC

Oltre ai suoi effetti noti sul metabolismo periferico, FGF21 aumenta i livelli sistemici di glucocorticoidi, sopprime l'attività fisica e altera il comportamento circadiano, tutte caratteristiche della risposta adattativa al digiuno. Questi effetti sono mediati attraverso l'espressione β -klotho nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo e nel complesso vagale dorsale del romboencefalo. Si può infatti notare come i topi privi del gene che codifica β -Klotho (Klb) in queste regioni siano refrattari a questi effetti, così come quelli sul metabolismo, l'insulina e la crescita (76).

3.3 Cuore

Studi meccanicistici hanno riportato che FGF21 migliora l'attività antiossidante e sopprime lo stress ossidativo e lo stress del reticolo endoplasmatico (102), così, FGF21 riduce ulteriormente il danno alle cellule endoteliali e l'apoptosi, inibendo così lo sviluppo dell'aterosclerosi. L'azione di FGF21 ha aumentato i livelli di superossido dismutasi (SOD) e glutazione e ha diminuito i livelli di malondialdeide nei ratti aterosclerotici (103,104).

Anche quando il danno endovascolare si è già perpetuato (es. dopo IMA), la produzione e il rilascio di FGF21 nei cardiomiociti, in un ciclo cardiaco AMPK-FGF21 feed-forward (105) promuove l'angiogenesi endoteliale agendo direttamente sulle cellule progenitrici endoteliali (EPC) e regola l'equilibrio dinamico metabolico miocardico e la funzione mitocondriale (106). Ciò è possibile grazie all'attivazione della via di segnale AMPK/SIRT1/peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) (107); d'altronde la downregulation dell'espressione di SIRT1 porta a stress ossidativo, infiammazione, formazione di foam cells, regolazione dell'autofagia e produzione di ossido nitrico, promuovendo così l'invecchiamento vascolare e l'aterosclerosi (108).

Inoltre SIRT1 svolge un ruolo cardioprotettivo sulla lesione da ischemia/riperfusion (I/R), promuovendo il flusso autofagico, riducendo i ROS e la perossidazione lipidica proteggendo le membrane cellulari dallo stress ossidativo causato dall'I/R (109).

PGC-1 α interagisce, invece, con il fattore nucleare (NF- κ B) con attività anti-infiammatoria che si esplica soprattutto a livello macrofagico, FGF 21 influenza così un altro fattore di rischio indipendente della malattia coronarica (110); a dimostrazione di ciò si nota come il numero di queste cellule nelle placche aterosclerotiche sia significativamente diminuito dopo il trattamento con FGF21 (104). L'FGF21 riduce significativamente anche l'espressione dei fattori infiammatori circolatori tra cui interleuchina (IL)-1 β , IL-6 e il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α nel tessuto epatico e nelle cellule endoteliali dell'arco aortico (104,111).

Inoltre, l'iniezione intramuscolare di FGF21 esogena nei topi ha aumentato il livello di adiponectina plasmatica, un'adipochina cardioprotettiva, con simultanea

inibizione dell'apoptosi nei cardiomiociti e il miglioramento della formazione capillare nella zona marginale dell'infarto (112) (112).

3.3.1 *FGF21 e cardiomiopatia diabetica*

Uno studio cinese ha mostrato come i livelli circolanti di FGF21 erano significativamente più bassi nei topi modello per cardiomiopatia diabetica (DCM) (113), mentre i topi FGF21-knockout (FGF21-KO) erano più sensibili alle lesioni miocardiche indotte da DM come fibrosi cardiaca, l'accumulo di collagene e lipidi e disfunzione sistolica e diastolica. Sia l'integrazione esogena che endogena di FGF21 potrebbe invertire questi cambiamenti e prevenire la progressione del DCM (114,115). Questi risultati suggeriscono che FGF21 può avere un effetto protettivo contro la cardiomiopatia diabetica, tuttavia, la maggior parte degli studi in tal senso sono stati condotti su animali.

FGF21 migliora l'outcome cardiaco agendo sulle vie che regolano lo stress ossidativo e infiammazione, la lipotossicità, quindi il trasporto e l'ossidazione degli acidi grassi ed infine l'autofagia. L'effetto protettivo di FGF21 nei confronti del danno cardiaco indotto da DM è almeno in parte mediato dall'attivazione della via di segnalazione AMPK / PON1 (paraoxonasi 1) che inibisce lo stress ossidativo e riduce l'infiammazione locale, la fibrosi e l'apoptosi cardiomiocitaria, prevenendo così il verificarsi di DCM (115).

L'effetto di FGF21 sul DCM è principalmente attribuito alla lipotossicità piuttosto che alla tossicità del glucosio anche attraverso l'attivazione di PGC-1 α che funge da regolatore chiave del bilancio energetico trascrizionale e svolge un ruolo importante nella regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi (88).

3.3.2 *FGF21 e scompenso cardiaco*

Alcuni studi suggeriscono, sulla base di modelli sperimentali, che ci potrebbe essere un effetto cardio-protettivo di FGF21 che si attua attraverso i suoi meccanismi anti-ossidanti ed anti-infiammatori attraverso la via di segnale mediata da SIRT1 e dalle sue molecole a valle, PGC-1 α e FGF21 (116).

Anche i farmaci già in commercio come gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio 2 (SGLT2) attivano la via di segnalazione SIRT1/PGC-1 α / FGF21, riducono lo stress ossidativo e promuovono l'autofagia nei cardiomiociti, riducendo

così il rischio di gravi eventi legati allo scompenso cardiaco (116). Inoltre, PGC-1 α interagisce con NF- κ B nei cardiomiociti sia degli esseri umani che dei topi, indicando che la regolazione dell'infiammazione attraverso l'attivazione di FGF21 e il potenziamento del sistema antiossidante cardiaco possono svolgere un ruolo chiave nella prevenzione dell'HF (117).

L'ipertensione è anch'essa un importante fattore di rischio per l'HF e la carenza di FGF21 porta a un significativo deterioramento dell'ipertensione e ad un aumento del danno vascolare. Il suo meccanismo sottostante può essere attribuibile l'attivazione dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 che porta alla formazione dell'angiotensina-(1-7). Inoltre, il recettore A2 dell'adenosina, un recettore accoppiato alla proteina Gs nel tessuto adiposo bruno, media il rilascio di FGF21 con conseguente effetto protettivo sul rimodellamento cardiaco indotto dall'ipertensione (118,119).

OBIETTIVO DELLO STUDIO

4.1 Obiettivo primario

L'obiettivo primario di questo studio è stato quello di valutare l'associazione dei livelli circolanti di FGF21 con il rischio di scompenso cardiaco e con la presenza di alterazioni ecocardiografiche precoci in una popolazione di soggetti con diabete tipo 2.

4.2 Obiettivi secondari

Come obiettivi secondari, il presente studio ha valutato:

- L'associazione tra lo score di rischio per scompenso cardiaco Watch-DM con indici clinici e strumentali precoci di cardiopatia.
- L'associazione tra livelli circolanti di FGF21 con i principali indici clinico-laboratoristici e le complicanze micro- e macro-vascolari nei pazienti con diabete tipo 2.

MATERIALI E METODI

5.1 Comitato etico

Il protocollo di studio è stato notificato al Comitato Etico per la Sperimentazione dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

5.2 Modello di studio

Il modello è quello di uno studio osservazionale retrospettivo trasversale.

5.3 Popolazione in studio

Sono stati arruolati pazienti periodicamente seguiti presso il Servizio di Diabetologia dell'Azienda Ospedaliera - Università di Padova, con diagnosi di diabete mellito di tipo 2 secondo la definizione dell'*American Diabetes Association*

(ADA) (120) condivisa dagli Standard Italiani per la Cura del Diabete-2018, e che erano seguito all'interno di un percorso di valutazione cardiovascolare approfondito.

Criteri di inclusione sono stati:

- Età ≥ 18 anni
- Diagnosi di DM2
- Accesso al Servizio nel periodo marzo 2010- dicembre 2021
- Disponibilità delle variabili per poter calcolare lo score di rischio per scompenso cardiaco secondo il Watch-DM (121), ossia le seguenti variabili:
 - Età, BMI (peso e altezza), pressione arteriosa sistolica e diastolica.
 - Storia di precedente infarto miocardico e/o bypass aorto coronarico.
 - Glicemia a digiuno, concentrazione plasmatica di creatinina e HDL.
 - ECG con informazioni su durata QRS

Sulla base del profilo di rischio valutato con Watch-DM sono stati inclusi solo i soggetti con rischio molto basso (score ≤ 7) o rischio alto-molto alto (punteggio ≥ 11)

Criteri di esclusione sono stati:

- Gravidanza
- Patologie acute/infettive in atto o presenza di scompenso cardiaco conclamato (NYHA ≥ 2).

5.4 Raccolta dati

L'acquisizione dei dati comprende il periodo di accesso dei pazienti al Servizio compreso tra marzo 2010 e dicembre 2021. L'acquisizione delle informazioni necessarie allo studio è stata realizzata ricavando i dati relativi ai parametri biumorali, la valutazione della terapia e delle complicanze dalla cartella clinica informatizzata e cartacea dei pazienti. La raccolta dei dati è stata eseguita da settembre 2020 a gennaio 2022.

5.4.1 Informazioni di carattere generale e parametri antropometrici

Di ogni paziente sono state raccolte informazioni di carattere generale inerenti al diabete mellito e i parametri necessari per calcolare il rischio cardiovascolare tramite l'algoritmo Watch-DM. In dettaglio:

- Sesso (M o F)
- Età anagrafica (anni)
- Nazionalità
- Età all'esordio di diabete (anni)
- Durata di diabete (anni)
- BMI (indice di massa corporea, kg/m²)
- Circonferenza vita (cm)
- Pressione arteriosa sistolica (PAS, mmHg)
- Pressione arteriosa diastolica (PAD, mmHg)
- Frequenza cardiaca (FC, bpm)

In considerazione dell'importanza dello stile di vita nella gestione del paziente diabetico, sono state indagate le seguenti abitudini:

- Tabagismo (fumatore, non fumatore, ex fumatore)
- Esercizio fisico regolare ($\geq 3,5$ ore/settimana)

5.4.2 Esami bioumorali

Sono state raccolte informazioni circa l'esito delle analisi del sangue, comprensive di:

- Profilo lipidico, ovvero colesterolo totale determinato secondo il metodo enzimatico colorimetrico (122); frazione HDL del colesterolo, dosato tramite metodo della precipitazione di VLDL+LDL (123); trigliceridi determinati secondo metodo enzimatico colorimetrico (124); frazione LDL del colesterolo calcolata con la formula di Friedewald (125).
- emoglobina glicata (HbA1c) in accordo con il metodo usato nel Diabetes Control and Complications (DCCT) e valore di glicemia a digiuno.
- NT- PRO BNP, ovvero frammento ammino (N) terminale del pro-BNP (Brain Natriuretic Peptide, Peptide natriuretico cerebrale), metodica immunometrica con rivelazione in chemiluminescenza (LOCI).

- Funzionalità renale tramite la misurazione della creatinina con il calcolo dell'eGFR secondo il metodo CKD-EPI
- Funzionalità epatica valutando il dosaggio delle aminotransferasi l'alanino amino transferasi (ALT, GPT o SGPT) e l'aspartato transaminasi (AST o SGOT) e gamma glutamil transpeptidasi (GGT o gamma-gt).
- FGF21 misurato secondo il metodo immunoenzimatico di ELISA

5.4.3 Valutazione di microangiopatia

Le informazioni circa le complicanze microvascolari sono state ottenute raccogliendo i referti più recenti dalla cartella clinica informatizzata.

Per la definizione di nefropatia diabetica sono stati valutati gli indici di funzionalità renale: albuminuria dosata nelle urine del mattino con metodo di immunoturbidimetria ed espressa come rapporto tra le concentrazioni urinarie di albumina e creatinina-ACR (mg/g di creatinina); creatinina sierica determinata con il metodo della spettrometria di massa in diluizione isotopica; eGFR calcolato con formula CKD-EPI (mL/min/1,73m²); acido urico (mg/dL) ottenuto con tecnica uricasi e perossidasi.

La valutazione della gravità e del grado di retinopatia associata a diabete viene eseguita sulla base dell'esame del fundus, per l'eventuale definizione di retinopatia e/o maculopatia diabetica.

La neuropatia diabetica autonoma (DAN), in particolare la neuropatia cardiovascolare autonoma (CAN) veniva diagnosticata utilizzando la batteria di 5 test non invasivi proposti da Ewing (126), ovvero: risposta alla manovra di Valsalva; variabilità della frequenza cardiaca al *deep breathing*; risposta della frequenza cardiaca all'ortostatismo (*lying to standing test*); risposta della pressione arteriosa sistolica all'ortostatismo; risposta della pressione arteriosa diastolica all'*handgrip* sostenuto. La diagnosi di CAN veniva confermata se almeno 2 test cardiovascolari risultavano patologici.

5.4.4 Valutazione della malattia cardiovascolare

Per lo studio della macroangiopatia sono state impiegate le informazioni provenienti dalle seguenti indagini strumentali eseguite sui pazienti:

- Elettrocardiogramma a 12 derivazioni a riposo (*resting 12-lead ECG*). Sono state considerate la presenza di ipertrofia ventricolare sinistra (IVS), le alterazioni del tratto S-T, la presenza di onda Q, la durata del QRS.
- Ecocardiografia transtoracica con sonda *Phased Array* per valutare la frazione di eiezione (EF%), la presenza di ipertrofia ventricolare sinistra (IVS) e di disfunzione diastolica. L'IVS è stata valutata tramite la misurazione dello spessore del setto interventricolare e della parete posteriore. La disfunzione diastolica è stata valutata mediante il calcolo del rapporto E/A, E/E'.
- Ateromazia TSA: presenza all'ecocolordoppler dei tronchi sovraortici (TSA) di placche aterosclerotiche carotidee che determinassero una stenosi del lume vasale >20%.

Per delineare le caratteristiche di CVD dei pazienti sono state ricercate informazioni su:

- Segni di coronaropatia
- Storia di infarto miocardico acuto, pregressi interventi di rivascolarizzazione coronarica con bypass aorto-coronarico.
- Storia di pregresso ictus o attacco ischemico transitorio (TIA).
- Storia di arteriopatia periferica distale (PAD), sulla base della sintomatologia clinica e della misurazione dell'indice di pressione caviglia/braccio (ABI, *ankle/brachial index*). Sulla base dell'ABI, è stato possibile definire l'entità dell'insufficienza vascolare periferica (0,91-1,30 = normale; 0,70-0,90 = lieve; 0,40-0,69 = moderata; <0,40 = severa) (127). In alternativa si è considerato il referto di indagini diagnostiche per immagini (Ecografia color Doppler) che permette lo studio morfologico e funzionale dell'albero vascolare (128).
- Diagnosi di scompenso cardiaco nei 18 mesi precedenti alla visita e classe NYHA (New York Heart Association).

5.4.5 Terapia

Per quanto riguarda la terapia antidiabetica, in ogni paziente sono stati registrati i farmaci per categoria: terapia insulinica (U/die), Biguanidi, Inibitori

dell'alfa-glucosidasi, glitazoni, sulfaniluree, glinidi, analoghi del GLP-1 (*glucagon like peptide 1*), inibitori del DPP-4 (dipeptidil-peptidasi IV), inibitori del SGLT-2 (trasportatori sodio-glucosio tipo 2).

È stata valutata anche l'anamnesi farmacologica di altre terapie con effetti sul profilo di rischio cardiovascolare (antiaggreganti, ipolipemizzanti e antiipertensivi): aspirina (ASA) o altro antiaggregante, anticoagulante dicumarolico o NAO, statina e/o ezetimibe, fibrati, ACEi o ARBs, β -bloccanti, α -litici, diuretici, Ca^{2+} -antagonisti.

5.4.6 WATCH-DM

Per il calcolo del Watch DM risk score è stato usato l'algoritmo, messo a punto dai ricercatori del Brigham and Women's Hospital e UT Southwestern Medical Center (121). Il punteggio di rischio Watch-DM include 10 variabili cliniche, di laboratorio ed ECG [età, BMI, pressione sistolica (BP), BP diastolica, creatinina sierica, glucosio plasmatico a digiuno, colesterolo lipoproteico ad alta densità, durata QRS, storia di infarto miocardico, storia di innesto di bypass coronarico].

L'algoritmo assegna per ogni variabile dei punti che sommati danno come risultato uno score da 0 a 34: BMI (0-5), età (0-6), ipertensione (SBP 0-3, DBP 0-2), creatinina (0-5), colesterolo HDL (0-2), glicemia a digiuno (0-3), durata del QRS >120ms (0/3), pregresso infarto miocardico (0/3) e pregresso stenting coronarico (0/2). La variabile QRS >120 ms è stata valutata in base all'osservazione diretta dell'ECG o valutata in base alla descrizione del referto ECG (sono stati quindi considerati come QRS<120ms coloro che in cartella presentavano la descrizione dell'elettrocardiogramma come normale).

Weight [body mass index], **A**ge, hyper**T**ension [systolic blood pressure and diastolic blood pressure], **C**reatinine, **HDL-C**, **D**iabetes [fasting plasma glucose] and QRS **D**uration, **MI** and CABG

Age (yrs)	BMI (kg/m ²)	SBP (mmHg)	FPG (mg/dL)
< 50	< 25	< 100	< 125
50 - 54	25 - 34	100 - 139	125 - 199
55 - 59	35 - 39	140 - 159	200 - 299
60 - 64	≥ 40	≥ 160	≥ 300
65 - 69			
70 - 74			
≥ 75			

Serum Cr (mg/dL)	DBP (mmHg)	HDL-C (mg/dL)
< 1.0	< 60	< 30
1.0 - 1.49	60 - 80	30 - 59
≥ 1.50	≥ 80	≥ 60

QRS (ms)	Prior MI	Prior CABG
≥ 120	Yes	Yes
< 120		

Risk Score	HF Risk Group	5-yr HF Risk
≤ 7 points	Very Low	1.1%
8-9 points	Low	3.6%
10 points	Average	4.7%
11-13 points	High	9.2%
≥ 14 points	Very High	17.4%

Forecasting 5-Year Incident Heart Failure Risk in Patients with T2DM

Figura 3 Segar MW, Vaduganathan M, et al " Machine Learning to Predict the Risk of Incident Heart Failure Hospitalization Among Patients With Diabetes: The WATCH-DM Risk Score" Diabetes Care

Il Watch DM risk score può essere calcolato anche tramite il calcolatore online (121), disponibile sulla piattaforma del Brigham and Women's Hospital e UT Southwestern Medical Center inserendo i dati bioumorali e anamnestici di ciascun paziente richiesti dal calcolatore: BMI, età, ipertensione, creatinina, colesterolo HDL, glicemia a digiuno, durata del QRS, pregresso infarto del miocardio e pregresso *stenting* coronarico. Il calcolatore fornisce il Watch DM risk score e il rischio di % HF a 5 anni (figura 4).



Determine Probability

Age (years)
60

BMI (kg/m²)
35

SBP (mmHg)
130

DBP (mmHg)
80

Creatinine (mg/dL)
0,8

HDL-C (mg/dL)
60

FPG (mg/dL)
100

QRS \geq 120ms
Yes No

Previous MI
Yes No

Previous CABG
Yes No

Figura 4 . Immagine del software utilizzato per il calcolo del WATC-DM risk score

5.4.7 UKPDS risk engine

Per il calcolo del rischio cardiovascolare è stato usato il UKPDS risk engine. È stato utilizzato il software fornito gratuitamente dalla Oxford University Innovation Ltd 2001 (134), inserendo i dati bioumorali e anamnestici di ciascun paziente richiesti dal calcolatore (età, sesso, etnia, stato di fumatore pregresso o attuale, presenza o assenza di fibrillazione atriale, livelli di emoglobina glicata, pressione sistolica, colesterolo totale e colesterolo HDL).

5.4.8 Rischio cardiovascolare secondo le linee guida ESC 2019

Per ciascun soggetto sono state calcolate le tre categorie di rischio cardiovascolare specifici per pazienti diabetici (rischio moderato, alto o molto alto) sulla base delle caratteristiche cliniche indicate dalle linee guida ESC (62), ovvero: durata di malattia, presenza di danno d'organo (proteinuria, $eGFR \leq 30 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, ipertrofia ventricolare sinistra, retinopatia) malattia cardiovascolare nota, età, ipertensione, dislipidemia, fumo, obesità. Il rischio molto elevato corrisponde a un rischio di morte cardiovascolare a 10 anni $> 10\%$; un rischio elevato corrisponde a un rischio di morte cardiovascolare a 10 anni, compreso tra 5 e 10%.

- Rischio molto alto: uno dei seguenti:
 - Presenza di malattia cardio-vascolare conclamata
 - Presenza di altri danni d'organo (proteinuria, $GFR < 30 \text{ mL/min/1,73m}^2$, ipertrofia del ventricolo sinistro, retinopatia)
 - Tre o più fattori di rischio maggiori (età, ipertensione, dislipidemia, fumo, obesità)
- Rischio alto: diabete da almeno 10 anni, senza danni agli organi bersaglio più qualsiasi altro fattore di rischio;
- Rischio moderato: pazienti con diabete mellito tipo 2 < 50 anni o con diabete da meno di 10 anni senza altri fattori di rischio.

5.5 Analisi statistica

Le variabili di tipo quantitativo sono espresse come media e deviazione standard, invece, per le variabili di tipo categorico è riportata la frequenza in termini assoluti o la percentuale. Sono state utilizzate statistiche descrittive e di frequenza sul campione generale e sui due gruppi. Per il confronto delle medie tra 2 gruppi è stato applicato il test t per campioni indipendente; per il confronto delle variabili categoriche è stato usato il test statistico chi-quadrato. Le variabili non normalmente distribuite (valutate graficamente e con test di normalità come Kolmogorov-Smirnov) sono state log-trasformate prima di essere inserite nei rispettivi modelli. È stata inoltre utilizzata la regressione lineare, con eventuali aggiustamenti per possibili covariate come descritto nel testo, per valutare l'associazione con variabili lineari. La relazione tra variabili di interesse, esempio

FGF21, con la presenza di punteggio elevato di HF è stata poi valutata con regressione logistica, e l'associazione riportata come Odds Ratio con 95% C.I. e/o come c-statistic (corrispondente all'area sotto la curva). Quando opportuno è stata condotta analisi di regressione logistica multivariata con aggiustamenti come descritti nel testo. Per tutte le analisi la significatività è stata definita da un valore $p < 0,05$. È stato utilizzato il programma SAS version 9.4 sia per le analisi statistiche e rappresentazioni grafiche, insieme al programma Microsoft Excel.

RISULTATI

6.1 Informazioni di carattere generale

Tra i pazienti potenzialmente elegibili per lo studio sono stati valutati complessivamente 145 soggetti affetti da DM2 che avevano punteggio di rischio Watch-DM minore-uguale a 7 (a basso rischio di HF) o maggiore-uguale a 11 (ad alto rischio di HF) e per cui erano disponibili campioni di siero su cui fosse possibile dosare i livelli di FGF-21. Come mostrato in tabella I, vi erano 77 uomini (53,1%) e 68 donne (46,9%), la maggior parte di origine caucasica (n=128; 88%), con durata media di malattia pari a 9 anni (SD 9.0), con discreto controllo metabolico (HbA1c 7.2 ± 1.3). La terapia più utilizzata era metformina (69%), seguita da insulina (21%), inibitori DPP4 (18%), sulfaniluree (10%), e GLP1RA (7%), solo il 3% era in trattamento con glitazioni e nessuno con inibitori SGTL2. Solo 18 pazienti (12,4%) erano esclusivamente in dietoterapia, mentre 78 pazienti erano in monoterapia (53,8%, comprensivi di 16 pazienti che erano solo terapia insulinica), 36 (24,8%) pazienti erano in duplice terapia, e 12 (8,3%) in triplice terapia. I pazienti erano prevalentemente in prevenzione cardiovascolare primaria (139 su 145; 96%), tuttavia con circa il 50% della popolazione che aveva almeno una complicanza microvascolare (nefropatia diabetica 34,5%, retinopatia 26,2%, neuropatia 12,5%), e complessivamente il 76,9% aveva rischio cardiovascolare ESC molto alto, il 20,1% rischio alto e solo il 2,8% a rischio moderato.

6.2 Fattori associati ad elevato rischio di scompenso cardiaco

In base al disegno dello studio, la popolazione è stata divisa in due gruppi secondo il rischio di scompenso cardiaco calcolato con lo score Watch DM in molto basso (≤ 7), e alto o molto-alto (≥ 11). In particolare, 72 soggetti (49,7%) presentano uno score di rischio alto/molto-alto (punteggio mediano 13, IQR 12-15), mentre 73 (50,3%) pazienti presentano uno score di rischio molto basso (punteggio mediano 4, IQR 4-5).

Oltre al punteggio numerico intero (calcolabile come descritto in figura 3) lo score Watch-DM è anche in grado di fornire una stima della percentuale di rischio di scompenso cardiaco in 5 aa (derivato da una equazione in cui ogni fattore viene pesato diversamente in base al suo impatto sul rischio di scompenso cardiaco e derivato da un algoritmo calcolato con approccio Machine Learning (121). I due gruppi, alto/molto-alto e basso, così composti risultavano quindi avere un rischio di scompenso cardiaco a 5 anni pari rispettivamente a 6% (3-11) e 1% (IQR 0-2).

Come atteso, i parametri inclusi nel calcolo del rischio, come l'età, il BMI, la pressione arteriosa, il controllo glicemico, la funzione renale, la presenza di cardiopatia o macroangiopatia erano significativamente associati al rischio di scompenso cardiaco (tabella I). I pazienti a rischio elevato di scompenso cardiaco avevano anche una maggior prevalenza di dislipidemia e ipertensione, e in linea con questo dato la presenza di terapie antipertensive e ipolipemizzanti era maggiore in questo gruppo, con il riscontro (probabilmente legato al maggior uso di terapia con statina) di valori più bassi di colesterolo LDL nel gruppo con score Watch-DM ≥ 11 . Tra le complicanze microangiopatiche, oltre al dato della nefropatia diabetica, i pazienti con elevato rischio di scompenso erano anche caratterizzati da presenza di retinopatia diabetica di background o proliferante. Nonostante le differenze sopraelencate non venivano tuttavia riscontrate differenze significative nell'uso delle terapie antidiabetiche, se non un trend per un maggior utilizzo di GLP1-RAs nei pazienti a rischio elevato di scompenso.

Tabella I Principali parametri associati ad elevato rischio di HF, complicanze e terapia dei pazienti

Parametro		Tutti N=145	WatchDM ≤ 7 N=73	WatchDM ≥ 11 N=72	p
Donne (%)	100%	68 (46.9%)	34 (46.6%)	34 (47.2%)	0.94
Età (anni)	100%	60.3 \pm 15.3	47.0 \pm 7.2	73.9 \pm 7.2	<.0001
Durata diabete (anni)	100%	9.0 \pm 9.0	5.3 \pm 6.4	12.7 \pm 9.9	0.0035
<i>Parametri biumorali</i>					
HbA1c %	100%	7.2 \pm 1.3	6.8 \pm 1.2	7.6 \pm 1.4	<.0001
Glicemia (mg/dl)	100%	153.9 \pm 50.4	132.1 \pm 33.5	175.9 \pm 55.2	<.0001
Col Totale, mg/dl	100%	178.7 \pm 38.6	183.0 \pm 30.4	174.3 \pm 45.3	0.18
Col HDL, mg/dl	100%	47.7 \pm 13.4	49.0 \pm 12.6	46.4 \pm 14.2	0.24
Trigliceridi, mg/dl	99%	148 \pm 145	126.6 \pm 71.2	168.6 \pm 190.3	0.08
Col-LDL formula, mg/dl	99%	102.5 \pm 32.7	108.8 \pm 27.1	96.1 \pm 36.8	0.0196
Ac. Urico, mg/dl	78%	5.6 \pm 1.8	5.3 \pm 1.2	5.9 \pm 2.1	0.08

Creatinina, mg/dl	100%	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.4	<.0001
eGFR ml/min/1,73 m ²	100%	87.6 ± 24.5	102.3 ± 15.9	72.7 ± 22.6	<.0001
ACR, mg/24h	99%	13 (7-42)	10 (6-18)	21 (7-70)	0.0304
AST, U/L	92%	24.1 ± 12.1	23.0 ± 9.5	25.2 ± 14.1	0.27
ALT, U/L	94%	26.6 ± 14.6	28.0 ± 13.9	25.2 ± 15.2	0.27
GGT, U/L	71%	30.7 ± 26.3	26.3 ± 16.6	35.4 ± 33.2	0.08
<i>Fattori di rischio cardiovascolari</i>					
Fumo (%)	100%	23 (15.9%)	18 (24.7%)	5 (6.9%)	0.0035
Attività fisica (%)	74%	57 (53.3%)	37 (55.2%)	20 (50.0%)	0.60
Obesità (%)	100%	48 (33.1%)	18 (24.7%)	30 (41.7%)	0.0295
BMI kg/m ²	100%	29.0 ± 6.0	27.3 ± 4.2	30.8 ± 7.0	0.0005
Waist cm	91%	102.3 ± 14.3	97.2 ± 10.6	107.5 ± 15.7	<.0001
Ipertensione (%)	99%	104 (72.2%)	33 (45.8%)	71 (98.6%)	<.0001
PAS, mmHg	100%	137.7 ± 22.2	125.8 ± 14.4	149.7 ± 22.3	<.0001
PAD, mmHg	100%	79.2 ± 10.6	80.6 ± 9.7	77.9 ± 11.3	0.12
Dislipidemia (%)	99%	120 (83.3%)	51 (70.8%)	69 (95.8%)	<.0001
Steatosi (%)	51%	56 (75.7%)	32 (74.4%)	24 (77.4%)	0.77
<i>Complicanze croniche</i>					
Macroangiopatia (%)	100%	61 (42.1%)	20 (27.4%)	41 (56.9%)	0.0003
CVD/PAD (%)	100%	13 (9.0%)	2 (2.7%)	11 (15.3%)	0.008
TIA stroke (%)	100%	2 (1.4%)	1 (1.4%)	1 (1.4%)	0.99
CAD (%)	100%	6 (4.1%)	0 (0.0%)	6 (8.3%)	0.01
Ateromasi TSA (%)	99%	58 (40.3%)	19 (26.4%)	39 (54.2%)	0.0007
Stenosi >50% (%)	100%	3 (2.1%)	0 (0.0%)	3 (4.2%)	0.07
PAD (%)	99%	7 (4.9%)	1 (1.4%)	6 (8.3%)	0.053
FA/flutter (%)	100%	5 (3.4%)	1 (1.4%)	4 (5.6%)	0.17
Microangiopatia (%)	100%	71 (49.0%)	25 (34.2%)	46 (63.9%)	0.0004
DKD (%)	100%	50 (34.5%)	13 (17.8%)	37 (51.4%)	<.0001
CKD (%)	100%	22 (15.2%)	0 (0.0%)	22 (30.6%)	<.0001
Albuminuria (%)	100%	43 (29.7%)	13 (17.8%)	30 (41.7%)	0.0017
Micro (%)		31 (21.4%)	9 (12.3%)	22 (30.6%)	0.0074
Macro (%)		12 (8.3%)	4 (5.5%)	8 (11.1%)	0.22
RD (%)	100%	38 (26.2%)	12 (16.4%)	26 (36.1%)	0.0071
Maculopatia (%)	97%	10 (7.1%)	2 (2.9%)	8 (11.4%)	0.049
RD proliferante (%)	100%	4 (2.8%)	1 (1.4%)	3 (4.2%)	0.30
Neuropatia Auto. (%)	99%	18 (12.5%)	10 (13.9%)	8 (11.1%)	0.61
<i>Terapia antidiabetica</i>					
Insulina (%)	100%	31 (21.4%)	11 (15.1%)	20 (27.8%)	0.61
Biguanide (%)	99%	100 (69.4%)	53 (73.6%)	47 (65.3%)	0.54
Glitazoni (%)	99%	4 (2.8%)	1 (1.4%)	3 (4.2%)	0.28
Sulfa/Glin (%)	99%	15 (10.4%)	4 (5.6%)	11 (15.3%)	0.31
GLP1RA (%)	99%	10 (6.9%)	3 (4.2%)	7 (9.7%)	0.0562
DPP4i (%)	99%	26 (18.1%)	8 (11.1%)	18 (25.0%)	0.19
SGLT2i (%)	99%	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	n.a.
<i>Terapia cardiovascolare</i>					
APA (%)	99%	44 (30.6%)	5 (6.9%)	39 (54.2%)	0.19

TAO (%)	99%	4 (2.8%)	0 (0.0%)	4 (5.6%)	0.0303
Statine/Ezetimibe (%)	100%	88 (60.7%)	27 (37.0%)	61 (84.7%)	<.0001
Fibrati/omega3 (%)	99%	9 (6.3%)	2 (2.8%)	7 (9.7%)	0.0411
ACEi/ARBS (%)	99%	74 (51.4%)	24 (33.3%)	50 (69.4%)	<.0001
Beta-Bloccanti (%)	99%	31 (21.5%)	5 (6.9%)	26 (36.1%)	0.39
Alfa litici (%)	99%	5 (3.5%)	0 (0.0%)	5 (6.9%)	<.0001
Diuretici (%)	99%	45 (31.3%)	8 (11.1%)	37 (51.4%)	<.0001
Calcio antagonisti (%)	99%	31 (21.5%)	4 (5.6%)	27 (37.5%)	0.0229
<i>Rischio CVD (UKPDS score)</i>					
CAD (a 5 aa)	99%	6 (3-13)	3 (2-4)	13 (8-18)	<.0001
Stroke (a 5 aa)	99%	2 (1-8)	1 (1-1)	8 (4-15)	<.0001
<i>Categoria Rischio CV secondo ESC</i>					
Molto Alto (%)	99%	110 (76.9%)	38 (53.5%)	72 (100.0%)	0.0013
Alto (%)	99%	29 (20.1%)	29 (40.3%)	0 (0.0%)	0.0219
Moderato (%)	99%	4 (2.8%)	4 (5.6%)	0 (0.0%)	<.0001

PAS=pressione arteriosa sistolica; PAD=pressione arteriosa diastolica; HbA1c=emoglobina glicata; Col. LDL=low-density lipoprotein; Col. HDL= high-density lipoprotein; eGFR= velocità di filtrazione glomerulare stimata con la formula CKD-EPI; ACR= rapporto albumina/creatinina; AST= aspartato transaminasi; ALT= Alanina Amino Transferasi; GGT= Gamma Glutamil Transferasi; CVD=patologia cardiovascolare (cardiovascular disease); PAD= Arteriopatia periferica; TIA= Attacco ischemico transitorio; CAD= Cardiopatia coronarica; TSA= Ecocolordoppler tronchi sovraortici; FA= Fibrillazione atriale; DAN= neuropatia diabetica autonoma; DKD= diabetic kidney disease (nefropatia diabetica); CKD= malattia renale cronica; RD= retinopatia diabetica; GLP1-RA= GLP1 agonisti recettoriali; DPP4i= inibitori della dipeptidilpeptidasi-4; SGLT2i= inibitori di sgl2 (cotrasportatore di sodio-glucosio di tipo 2); APA= antiaggregante piastrinico – aspirina; TAO= terapia anticoagulante orale; ACEi= inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE); ARBs= Antagonista del recettore per l'angiotensina II

6.2.1 Validazione dello score Watch-DM in relazione agli indici elettrocardiografici, ecocardiografici e valori di BNP

Al fine di validare lo score Watch-DM rispetto a segni strumentali e laboratoristici preclinici precoci di scompenso cardiaco è stata valutata la relazione tra la presenza di rischio aumentato di scompenso cardiaco stimato dal Watch-DM con diversi indici elettrocardiografici, ecocardiografici e bioumorali (i.e. valori di BNP), che erano disponibili in un sottogruppo di pazienti inclusi nello studio.

Come mostrato in tabella II, lo score risultava associato a un QRS di durata patologica (>120 ms), che era un dato atteso in quanto la durata >120 ms è uno dei parametri considerato nello score stesso. Lo score di rischio aumentato si associava

inoltre ad una significativa maggior prevalenza di ipertrofia ventricolare sinistra (valutata sia all'ECG che all'ecocardiografia), di maggior spessore del setto interventricolare e della parete posteriore. Quest'ultima risultava maggiore di 10 mm (generalmente considerato come limite superiore di normalità) nel 42,6% dei soggetti a basso rischio vs 79,3% ad alto rischio in quelli di scoppio. Si evidenziava inoltre la presenza di un valore di E/A significativamente minore nei soggetti ad alto rischio di scoppio (come mostrato in figura 5), dato che confermava la validità dello score nell'identificare soggetti a più alto rischio di alterato rilasciamento diastolico del ventricolo sinistro. Vi era invece solo un trend non significativo per valori maggiori di E/E¹ nei soggetti con score più elevato.

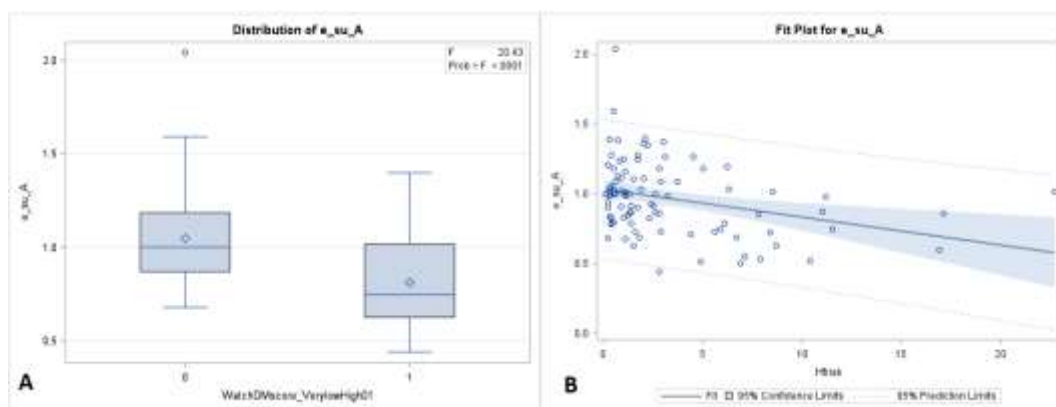


Figura 5 A e B relazione Watch-DM con E/A (pannello A relazione in base a categoria di rischio basso/alto di scoppio cardiaco, pannello B relazione con rischio di scoppio cardiaco a 5 anni espresso come variabile continua).

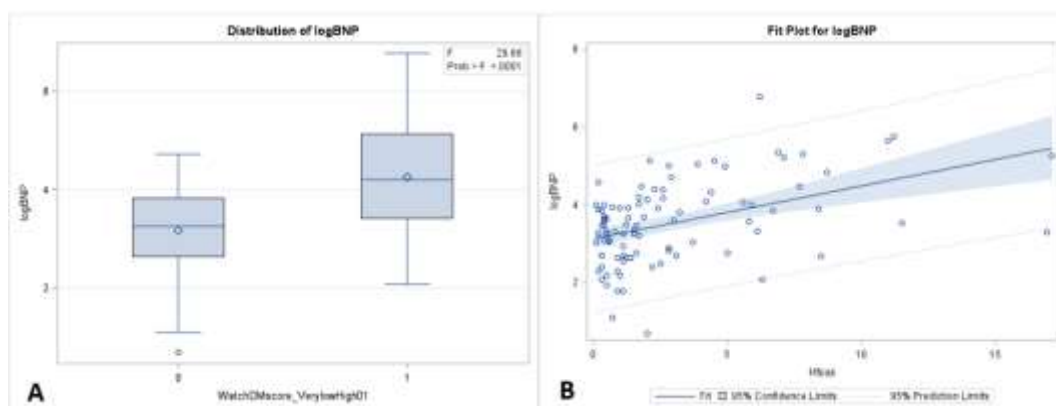


Figura 6 A e B relazione watch-DM con NT-proBNP (pannello A relazione in base a categoria di rischio basso/alto di scoppio cardiaco, pannello B relazione con rischio di scoppio cardiaco a 5 anni espresso come variabile continua).

Infine, (come mostrato anche in figura 6) la presenza di score Watch-DM elevato si associava in maniera altamente significativa con la concentrazione sierica NT-proBNP (ng/L), valutata in 96 soggetti (66% della popolazione totale). Tale associazione si confermava anche utilizzando lo score di rischio di scompenso come variabile continua (figura 6A, $R^2=0.20$, $p<0.0001$). Da sottolineare come il valore dicotomico di NT-proBNP >125 pg/mL (generalmente considerato come cut-off di rischio aumentato di scompenso) erano presenti esclusivamente nei soggetti con score Watch-DM > 11 .

Tabella I Indici biomorali, elettrocardiografici ed ecocardiografici di disfunzione cardiaca

Parametro	Disp.	Tutti	Watch-DM ≤ 7	WatchDM ≥ 11	p
<i>Parametri elettrocardiografici ed ecocardiografici</i>					
QRSd (ms) (%)	68%	91.2 \pm 18.3	88.8 \pm 10.8	94.9 \pm 25.9	0.17
QRS > 120 ms (%)	100%	5 (3.4%)	0 (0.0%)	5 (6.9%)	$<.0001$
IVS ecg/eco (%)	100%	33 (22.8%)	8 (11.0%)	25 (34.7%)	0.0044
SIV, mm	57%	11.2 \pm 2.2	10.6 \pm 1.4	12.6 \pm 2.9	0.0019
PP, mm	57%	10.6 \pm 1.5	10.3 \pm 1.3	11.3 \pm 1.6	0.0017
PP > 10 mm (%)	57%	46 (55.4%)	23 (42.6%)	23 (79.3%)	0.0099
Area Atrio sn, cm ²	66%	38.4 \pm 10.0	38.3 \pm 8.5	38.7 \pm 12.4	0.87
Frazione Eiezione	88%	61.1 \pm 4.7	61.1 \pm 4.1	61.1 \pm 5.3	0.99
E, m/s	65%	64.1 \pm 15.6	65.0 \pm 12.5	62.5 \pm 20.4	0.53
A, m/s	65%	69.2 \pm 16.6	63.7 \pm 12.8	80.4 \pm 18.1	$<.0001$
E/A	64%	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	$<.0001$
E/A <1	64%	48 (51.6%)	25 (40.3%)	23 (74.2%)	0.0021
E/E'	14%	7.1 \pm 2.9	6.6 \pm 3.1	8.5 \pm 1.9	0.18
<i>Parametri biomorali</i>					
NT-proBNP, pg/mL	66%	33 (16-60)	26 (14-46)	68 (31-170)	0.0029
NT-proBNP > 125 pg/mL (%)	66%	13 (13.5%)	0 (0.0%)	13 (40.6%)	$<.0001$

IVS=ipertrofia ventricolare sinistra; SIV= spessore del setto interventricolare; PP= spessore della parete posteriore;; E= onda di flusso protodiastolico mitralico A= onda di flusso telediastolico mitralico secondaria alla contrazione atriale; E'= onda protodiastolica di rilassamento miocardico al Doppler Tessutale; NT-proBNP= Frammento ammino (N) terminale del pro-BNP (Brain Natriuretic Peptide, Peptide natriuretico cerebrale).

6.3 FGF21 e rischio di scompenso cardiaco

Dopo aver descritto le principali variabili associate a rischio maggiore di scompenso cardiaco e validato lo score Watch-DM rispetto a indici sub-clinici di scompenso cardiaco, il nostro obiettivo era quello di valutare l'associazione dei livelli circolanti di FGF-21 con questi parametri.

6.3.1 Distribuzione FGF-21 e associazione con principali caratteristiche clinico-laboratoristiche e farmacologiche.

La figura 5 A, mostra i valori di distribuzione di FGF21 (mediana = 241 pg/ml (con range interquartile 155-391), che dopo trasformazione logaritmica apparivano con distribuzione normale (figure 5B).

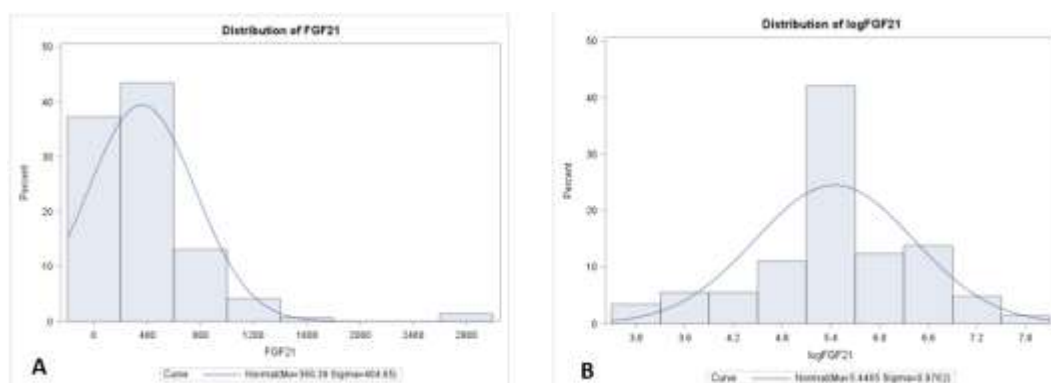


Figura 7 Distribuzione dei valori di FGF 21 (A) e log-FGF21 (B)

Abbiamo inizialmente valutato l'associazione di FGF-21 con le principali variabili clinico-laboratoristiche descritte nella tabella III sottostante. Da sottolineare come i valori di FGF21 fossero associati positivamente a valori più alti di HbA1c, glicemia e trigliceridemia. Era inoltre presente un'associazione lineare positiva con incremento delle transaminasi. Tra le terapie diabetologiche in atto, solo l'utilizzo di metformina si associava a valori più elevati di FGF-21, un'associazione tuttavia che si attenuava marcatamente e perdeva di significatività dopo aggiustamento per valori di HbA1c. Al contempo, la terapia con fibrati o omega-3 si associava con valori elevati di FGF-21, associazione che anche in questo caso si veniva a perdere dopo aggiustamento per valori di trigliceridemia.

Tabella II Parametri associati a FGF21 nell'analisi di regressione lineare

Parametro	Estimate (S.E) su logFGF21	p
Donne (%)	0.16 (0.16)	0.32
Età (anni)	0.000 (0.01)	0.97
Durata diabete (anni)	-0.01 (0.01)	0.10
Fumo (%)	-0.06 (0.22)	0.80
Attività fisica (%)	-0.41 (0.18)	0.023
Obesità (%)	-0.05 (0.17)	0.75
BMI kg/m ²	0.02 (0.01)	0.15
PAS, mmHg	0.00 (0.00)	0.72
PAD, mmHg	0.01 (0.01)	0.15
HbA1c %	0.18 (0.06)	0.003
Glicemia (mg/dl)	0.004 (0.00)	0.015
Col Totale, mg/dl	0.003 (0.00)	0.19
Col HDL, mg/dl	-0.01 (0.01)	0.25
Log trigliceridi, mg/dl	0.32 (0.15)	0.038
Col-LDL formula, mg/dl	0.003 (0.00)	0.26
Ac. Urico, mg/dl	0.00 (0.05)	0.93
Creatinina, mg/dl	-0.41 (0.27)	0.14
ACR, mg/24h	0.000 (0.00)	0.38
AST, U/L	0.016 (0.01)	0.019
ALT, U/L	0.011 (0.01)	0.049
GGT, U/L	0.008 (0.00)	0.017
<i>Terapie farmacologiche</i>		
Insulina (%)	-0.28 (0.20)	0.15
Biguanide (%)	0.43 (0.17)	0.015
Glitazoni (%)	0.68 (0.49)	0.17
Sulfa/Glin (%)	0.34 (0.27)	0.21
GLP1RA (%)	-0.26 (0.32)	0.43
DPP4i (%)	0.14 (0.21)	0.50
SGLT2i (%)	0.00 (.)	.
APA (%)	0.08 (0.18)	0.641
TAO (%)	-0.06 (0.49)	0.90
Statine/Ezetimibe (%)	0.32 (0.16)	0.056
Fibrati/omega3 (%)	0.78 (0.33)	0.020
ACEi/ARBS (%)	0.25 (0.16)	0.13
Beta-Bloccanti (%)	-0.10 (0.20)	0.60
Alfa litici (%)	-0.45 (0.45)	0.31
Diuretici (%)	-0.02 (0.18)	0.93
Calcio antagonisti (%)	-0.26 (0.20)	0.19

PAS=pressione arteriosa sistolica; PAD=pressione arteriosa diastolica; HbA1c=emoglobina glicata; Col. LDL=low-density lipoprotein; Col. HDL= high-density lipoprotein ACR= rapporto albumina/creatinina; AST= aspartato transaminasi; ALT= Alanina Amino Transferasi; GGT= Gamma Glutamyl Transferasi; GLP1-RA= GLP1 agonisti recettoriali; DPP4i= inibitori della dipeptilpeptidasi-4; SGLT2i= inibitori di sgl2 (cotrasportatore di sodio-glucosio di tipo 2); APA= antiaggregante piastrinico – aspirina; TAO= terapia anticoagulante orale; ACEi= inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE); ARBs= Antagonista del recettore per l'angiotensina II;

6.3.2 Associazione tra FGF-21 e rischio di scompenso cardiaco.

Come mostrato nella figura 8, non abbiamo riscontrato alcuna associazione significativa tra i valori di FGF21 e presenza di aumentato rischio di scompenso cardiaco definito dal Watch-DM ≥ 11 (Odds ratio per unità di log-FGF21: 1.19; 95 IC 0.85-1.66, $p=0.3$; OR 1.01, 95 IC 0.70-1.46 dopo aggiustamento per HbA1c). Risultava invece una debole ma significativa associazione con lo score di rischio Watch-DM espresso come variabile continua in % di rischio a 5 aa ($R^2=0.08$, $p=0.007$), tuttavia questa associazione perdeva di significatività e intensità dopo aggiustamento per HbA1c ($p=0.15$).

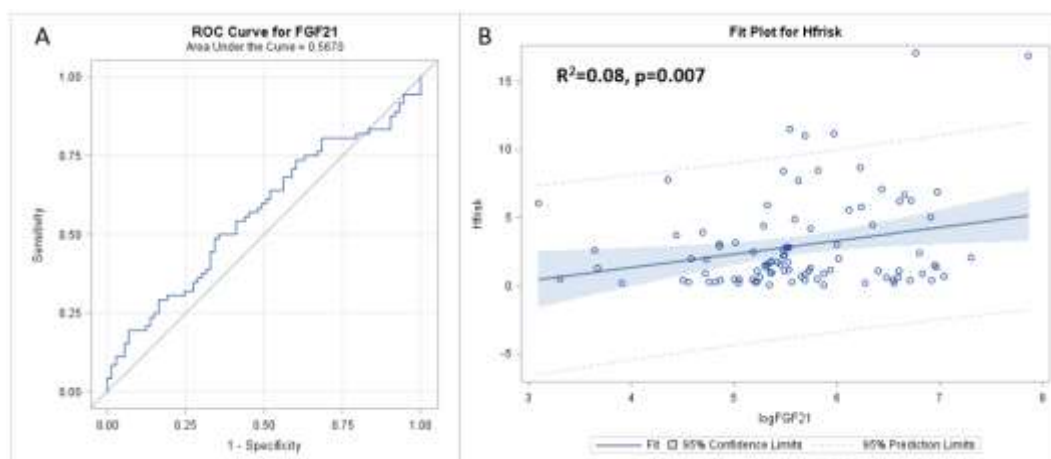


Figura 8 : Associazione tra FGF-21 e rischio di scompenso cardiaco

Abbiamo quindi valutato la relazione tra i valori di FGF21 (aggiustati per HbA1c) e gli indici subclinici ecocardiografici ed elettrocardiografici senza riscontrare alcuna associazione significativa come mostrato nella tabella IV sottostante.

Tabella III relazione tra FGF21 e i principali parametri cardiaci (modello aggiustato per HbA1c).

Parametro	Estimate (SE) o Odds Ratio (95 IC)	p
QRSd (ms) (%)	-2.72 (2.39)	0.26
QRS > 120ms (%)	0.97 (0.39 - 2.38)	0.94
IVS ecg/eco (%)	0.67 (0.36 - 1.23)	0.20
SIV, mm	0.22 (0.26)	0.40
PP, mm	0.35 (0.19)	0.06
PP> 10mm (%)	1.39 (0.86 - 2.25)	0.18
Area Atrio sn, cm ²	-0.08 (1.24)	0.95

Frazione Eiezione	0.12 (0.51)	0.82
E, m/s	2.50 (1.97)	0.21
A, m/s	2.66 (2.07)	0.20
E/A	0.00 (0.03)	0.90
E/A <1	0.98 (0.60 - 1.60)	0.94
E/E'	-0.20 (0.47)	0.68
NT-proBNP, pg/mL	20.47 (12.97)	0.12
NT-proBNP > 125 pg/mL (%)	1.13 (0.73 - 1.76)	0.57

IVS=ipertrofia ventricolare sinistra; SIV= spessore del setto interventricolare; PP= spessore della parete posteriore; E= onda di flusso protodiastolico mitralico A= onda di flusso telediastolico mitralico secondaria alla contrazione atriale; E'= onda protodiastolica di rilassamento miocardico al Doppler Tessutale; NT-proBNP= Frammento ammino (N) terminale del pro-BNP (Brain Natriuretic Peptide, Peptide natriuretico cerebrale).

6.4 FGF21 e altre complicanze micro e macrovascolari

Abbiamo quindi valutato la relazione tra FGF-21 e le altre complicanze micro e macro-vascolari.

Come riassunto in tabella V non si evidenziava alcuna relazione significativa tra FGF21 ed eventi cardiovascolari maggiori o con indici subclinici di macroangiopatia, tuttavia si riscontrava un'associazione significativa e inversa con lo score di rischio CAD calcolato con UKPDS (per ogni incremento di un log-FGF21 vi era una riduzione di circa 2 punti percentuali di rischio a 5 aa). Tale associazione restava significativa anche dopo aggiustamento per trigliceridemia ed è rappresentata in figura 9. Un trend simile, ma non significativo, si riscontrava anche per il rischio di ictus a 5 aa.

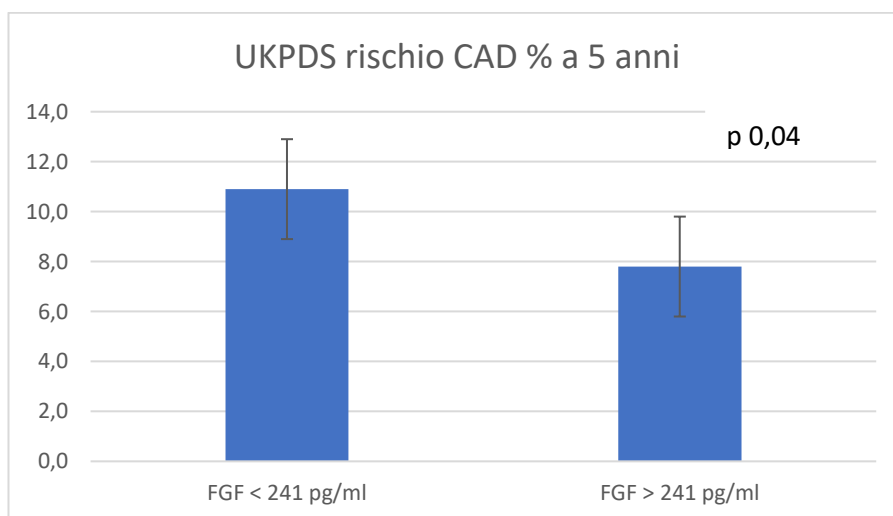


Figura 9 relazione tra FGF21 e rischio di CAD a 5 anni calcolato con UKPDS (modello aggiustato per trigliceridemia)

Inoltre come mostrato in tabella V e figura 10, valori più elevati di FGF-21 si associavano in maniera nominalmente significativa con una minor presenza di malattia renale cronica (Odds Ratio per unità di log-FGF21: 0.57; 95% I.C. 0.36-0.90, p=0.016) tale associazione non si confermava per la presenza di albuminuria e pertanto appare in relazione esclusivamente alla riduzione del filtrato glomerulare (in linea con questo dato, nella tabella III si osservava un trend non significativo per una relazione inversa tra FGF21 e creatininemia). Inoltre i valori più elevati di FGF-21 risultavano associati a minor prevalenza di retinopatia diabetica proliferante (Odds ratio per unità di log-FGF21: 0.29; 95 IC 0.10 - 0.82, p=0.020).

Tabella IV relazione tra FGF21 e complicanze croniche micro e macrovascolari (modello aggiustato per HbA1c).

Complicanze croniche micro e macrovascolari	OR (95% IC) or Estimate (SE)	P
Macroangiopatia (%)	1.07 (0.75 - 1.51)	0.723
CVD/PAD (%)	0.90 (0.48 - 1.68)	0.738
CAD (%)	1.11 (0.78 - 1.59)	0.564
Ateromasia TSA (%)	1.08 (0.39 - 2.94)	0.886
PAD (%)	0.93 (0.42 - 2.05)	0.858
FA/flutter (%)	1.01 (0.37 - 2.75)	0.983
<i>Score rischio CV (%)</i>		
UKPDS risk score CAD (a 5 aa)	-1.93 (0.84)	0.023
UKPDS risk score Stroke (a 5 aa)	-2.36 (1.35)	0.082
Microangiopatia (%)	0.84 (0.58 - 1.21)	0.342
DKD (%)	0.87 (0.60 - 1.25)	0.451
CKD (%)	0.57 (0.36 - 0.90)	0.016
Albuminuria (%)	1.04 (0.71 - 1.52)	0.837
RD (%)	1.10 (0.73 - 1.66)	0.635
Maculopatia (%)	0.87 (0.46 - 1.66)	0.674
RD proliferante (%)	0.29 (0.10 - 0.82)	0.020
Neuropatia Auto. (%)	1.11 (0.66 - 1.87)	0.702

CVD=patologia cardiovascolare (cardiovascular disease); PAD= Arteriopatia periferica; TIA= Attacco ischemico transitorio; CAD= Cardiopatia coronarica; FA= Fibrillazione atriale; DKD= diabetic kidney disease (nefropatia diabetica); CKD= malattia renale cronica; RD= retinopatia diabetica.

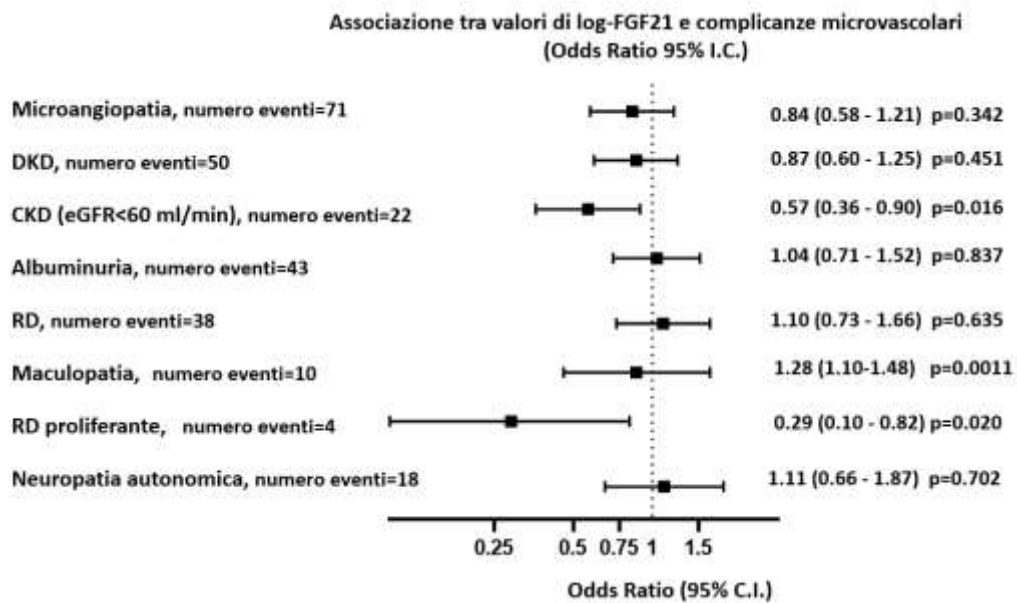


Figura 10 Associazione tra valori di log-FGF21 e complicanze microvascolari

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo studio retrospettivo condotto su una popolazione di soggetti con diabete tipo 2 in cui sono stati calcolati lo score per scompenso cardiaco Watch-DM, misurati i valori di FGF21 e analizzata la presenza di segni subclinici di scompenso cardiaco o cardiopatia con valutazione ecografica e laboratoristica, ha permesso di identificare principalmente tre risultati: 1. Lo score Watch-DM risulta associato a diversi indici ecocardiografici e laboratoristici precoci di iniziale cardiopatia e scompenso cardiaco. 2. I valori di FGF21 circolanti non sembrano associati allo score di rischio Watch-DM e neppure agli indici ecocardiografici o laboratoristici di scompenso cardiaco. 3. Tra le diverse complicanze croniche legate al diabete i valori di FGF21 appaiono più bassi nei soggetti con retinopatia diabetica proliferante e malattia renale cronica (III stadio secondo CKD-EPI) e inversamente associati a rischio CAD calcolato con UKPDS.

Tra i principali punti di forza di questo studio vi è sicuramente la disponibilità in quasi 100 pazienti di indici ecocardiografici che ha permesso di validare il Watch DM come strumento utile per identificare i soggetti con segni subclinici di scompenso cardiaco.

Il Watch-DM risk score fu introdotto per la prima volta nel 2019, identificato nello studio ACCORD in una popolazione in prevenzione CV secondaria (circa 30%) o ad altissimo rischio CV (129). Solo recentemente (mentre questa tesi era in preparazione) sono stati pubblicati 2 studi di validazione dello stesso (129,130). Il primo, condotto nelle popolazioni di trial clinici TECOS e look AHEAD (in popolazione con diabete di tipo 2 e nessuna storia di ospedalizzazione per scompenso cardiaco), e il secondo negli studi osservazionali ARIC, CHS, FHS, e MESA (in una popolazione con diabete e prediabete priva di storia di HF al basale) hanno confermato la capacità dello score di discriminare il rischio di HF tra le popolazioni con risk score intermedio (sebbene nei soggetti ad alto/altissimo rischio vi era una sottostima nella previsione degli eventi) (129,130).

Il nostro studio, vista l'associazione con gli indici ecocardiografici, non disponibili negli altri lavori sul Watch-DM, ne estende ulteriormente la validazione

in una popolazione in prevenzione cardiovascolare primaria confermata anche nella relazione con NT-proBNP.

Le linee guida ESC (131) dedicate all'HF sottolineano l'utilità del dosaggio di NT-proBNP per la diagnosi di malattia. Tuttavia nella pratica clinica non in tutti i pazienti, soprattutto in assenza di diagnosi nota di scompenso, proBNP viene dosato. Nel nostro studio, il rischio maggiore di HF (Watch-DM \geq 11) è risultato strettamente associato a NT-proBNP (ng/L) sia come valore assoluto che come variabile dicotomica con NT-proBNP >125 ng/L. C'è da sottolineare come nessuno dei pazienti a rischio basso (Watch-DM <7) superava il cut-off di 125 ng/L. Se confermato si potrebbe quindi ipotizzare sulla base dei nostri risultati che il dosaggio del proBNP potrebbe essere maggiormente indicato nei soggetti a rischio almeno moderato. L'utilità del dosaggio del pro-BNP in aggiunta a quello dello score di Watch-DM nel migliorare la predizione di rischio per ospedalizzazione per scompenso cardiaco è anche stato recentemente confermato in un recente studio, che inoltre suggerisce come l'aggiunta del BNP migliori la performance del Watch-DM in modo più spiccato in quelli a rischio intermedio (129).

Il nostro studio si è poi focalizzato sulla relazione tra FGF-21 e rischio di scompenso cardiaco. FGF-21 è una citochina a prevalente produzione epatica con un ruolo consolidato nella regolazione dell'omeostasi energetica ed in particolare nella regolazione del metabolismo nelle condizioni di digiuno (regolata in parte dal fattore di trascrizione PPAR-alpha e da SIRT1 - sirtuin-1, che regola anche PGC-1 α - proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha). L'asse PPAR α /SIRT1/PGC-1 α e FGF21 sono sensori di digiuno (o "nutrient deprivation sensors") con dimostrati effetti cardioprotettivi in numerosi modelli animali e che sembrano risultare dagli effetti anti-ossidanti e di promozione dell'autofagia (116,132). Inoltre, diversi lavori suggeriscono che l'effetto protettivo degli inibitori di SGLT2 sullo scompenso cardiaco sia mediato tramite i suoi effetti su questo asse compreso FGF21 (116). Tuttavia, nonostante queste premesse, il nostro studio non ha evidenziato alcuna associazione significativa tra FGF21 e scompenso cardiaco o gli indici ad esso associati, con addirittura un trend non significativo verso un rischio aumentato spiegato tuttavia dalla relazione di FGF21 con valori peggiori di compenso glicemico. Bisogna sottolineare come gli studi osservazionali di associazione tra FGF21 e malattia cardiovascolare e/o scompenso abbiano fornito

dati contrastanti. A dispetto dei dati sperimentali, che supportano gli effetti cardioprotettivi di FGF21 (133, 137) (diversi studi hanno invece riscontrato un'associazione positiva tra elevate concentrazioni di FGF21 e maggior rischio di danno miocardico. Un piccolo studio ha per esempio riscontrato un'associazione diretta tra dei livelli circolanti elevati di FGF21 e la disfunzione diastolica (10), ma anche in questo caso dopo aggiustamenti per altri fattori confondenti l'associazione perdeva di significatività. Altri studi hanno poi riportato una relazione a forma di U tra valori di FGF21 e mortalità nei pazienti con sindrome coronarica acuta (134). I dati negativi del nostro studio (tra i cui limiti vi è anche la dimensione del campione) si aggiungono pertanto alle altre evidenze che suggeriscono come la relazione tra i valori di FGF21 e il rischio cardiovascolare e di scompenso cardiaco è complessa. Uno dei fattori che va anche considerato in questo contesto è il ruolo della resistenza dei recettori periferici all'FGF21 stesso (135) particolarmente evidente nei soggetti obesi. C'è infatti da sottolineare come nel nostro studio, dopo aver aggiustato l'analisi per HbA1c e trigliceridemia (che avevano una correlazione positiva con FGF21), i valori di FGF21 stessi si associavano inversamente allo score UKPDS per CAD. Infine l'aumento di FGF21 in seguito al danno miocardico potrebbe essere compensativo, a favore di questa tesi in studi su modelli animali, i livelli di FGF21 nel siero e nel tessuto miocardico aumentano rapidamente 1 ora dopo la legatura dell'arteria coronarica e rimangono elevati dopo 24 ore e 1 settimana (105). Inoltre, il deficit di FGF21 specifico del fegato determina un ulteriore deterioramento della disfunzione cardiaca (136). Dopo il trattamento con Ad-FGF21 per 2 settimane, le funzioni sistolica e diastolica ventricolare sinistra nonché la frazione d'eiezione di questi topi sono migliorate in modo significativo (133), mentre la dimensione della cicatrice è diminuita dopo 1 e 4 settimane di trattamento. L'aumento dei livelli di FGF21 dopo l'infarto miocardico, dunque, può essere un meccanismo cardioprotettivo spontaneo in vivo (137). Coerentemente con i risultati sugli animali, i livelli circolanti di FGF21 sono aumentati anche nei pazienti con infarto miocardico acuto (IMA) (105), questi raggiungono la massima concentrazione entro 24 ore dall'esordio e rimangono elevati per 7 giorni. Inoltre, il livello di FGF21 al settimo giorno correla con l'incidenza di re-infarto e morte entro 1 mese (138).

A supporto della difficoltà dell'interpretazione dei dati osservazionali–trasversali sottolineiamo il dato delle transaminasi, che si associavano positivamente a FGF21, mentre diversi studi, anche sull'uomo, con analoghi a lunga durata di FGF21 hanno evidenziato un miglioramento della patologia epatica (steatosi, fibrosi) (139). In particolare uno sull'uomo, in fase IIa, ha valutato l'efficacia di pegbelfermin su pazienti con fibrosi di grado 1-3 confermato alla biopsia e un contenuto di grasso epatico di almeno il 10% determinato dalle sequenze di risonanza magnetica ponderate in densità protonica. Un totale di 75 pazienti randomizzati in tre gruppi: placebo, o somministrazione sottocutanea di pegbelfermin 10 mg al giorno o 20 mg alla settimana per 16 settimane. Entrambi i gruppi trattati con pegbelfermin hanno mostrato riduzioni statisticamente significative della frazione grassa epatica (di almeno il 30% in >50% dei pazienti) e della rigidità epatica, oltre a marcate riduzioni dei marcatori plasmatici di fibrosi (PRO- C3) e di danno epatico (ALT e AST) e un evidente innalzamento dell'adiponectina rispetto ai controlli con placebo, suggerendo che questo analogo di hFGF21 a lunga durata d'azione potrebbe rappresentare un potenziale trattamento per la NASH e le relative comorbidità. Ulteriori studi clinici con campioni di grandi dimensioni e durata più lunga sono necessari per verificare se le diminuzioni mediate da FGF21 nei lipidi plasmatici ed epatici sono sufficienti a ridurre eventi cardiovascolari ed esiti clinici della NASH. Infine, i livelli sierici estremamente variabili di FGF21 negli esseri umani suggeriscono che la reattività individuale a FGF21 può essere altamente eterogenea, ulteriore identificazione dei fattori genetici e metabolici che conferiscono a FGF21 la reattività contribuirà a spianare la strada all'implementazione di farmacoterapie personalizzate (140).

L'associazione tra i livelli di FGF21 e la patologia renale cronica nell'uomo è un terreno ancora inesplorato, nel nostro studio la concentrazione FGF21 è risultato inversamente correlata alla patologia renale cronica. Tale dato va preso con le dovute cautele, tuttavia alcuni modelli animali evidenziano 1. un miglioramento significativo delle anomalie glomerulari funzionali e morfologiche indotte da lesioni diabetiche croniche in seguito al trattamento con rhFGF21 (141) e 2. come terapia con PEG-rhFGF21, in modelli murini di obesità indotta da dieta ricca di grassi (DIO), riducesse significativamente la creatinina sierica e rapporto albumina urinaria/creatinina (142).

Per quanto la cautela nell'interpretazione dei nostri risultati sia necessaria vista la numerosità e i pochi eventi registrati, abbiamo evidenziato un'associazione inversa e significativa tra valori di FGF21 e presenza di retinopatia diabetica proliferante. Questo potenziale effetto protettivo è supportato da diversi modelli animali, in cui la somministrazione di FGF21 (nativo o analogo a lunga durata), infatti ha attenuato la neovascolarizzazione retinica indotta da ipossia nonché la neovascolarizzazione coroidale indotta da laser (143).

Questo studio va considerato nel contesto di alcuni limiti. I principali sono rappresentati dalla natura trasversale e osservazionale dello studio che non permette di trarre conclusioni in termini di causalità e la dimensione del campione. Nonostante ciò, l'elevata significatività tra lo score Watch-DM e gli indici ecocardiografici subclinici di cardiopatia depone a favore della solidità di tale dato, che andrà comunque poi validato in una popolazione esterna in studi futuri (così come l'associazione con i valori di proBNP).

In termini di possibili ricadute pratiche, la validazione del WatchDM score rispetto agli indici ecocardiografici ed elettrocardiografici e la concentrazione sierica NT-proBNP potrebbe rappresentare un buon punto per l'individuazione dei soggetti a rischio di sviluppare scompenso cardiaco prima dell'acutizzazione e dell'ospedalizzazione, tanto più che le variabili necessarie per il calcolo del rischio sono facilmente reperibili e non necessitano di indagini invasive e di secondo livello. Ciononostante sono necessari ulteriori studi che permettano di confermare tale dato e in popolazioni più ampie. Al contrario, il dosaggio del FGF-21 non sembra al momento di utilità clinica e ulteriori studi su popolazioni più ampie e soprattutto altri trial clinici (oltre a quelli in corso) sono necessari, da una parte per confermare il possibile effetto protettivo/compensatorio della molecola, e dall'altra per meglio definire il concetto di resistenza recettoriale a FGF21.

In conclusione, questo studio ha messo in evidenza che: 1. Il watchDM risk score rappresenta un buon supporto nella pratica clinica nell'identificare i soggetti a più alto rischio di cardiopatia subclinica con presenza di disfunzione diastolica del ventricolo sinistro; 2. I valori di FGF21 circolanti non si associano a rischio di scompenso cardiaco stimato con Watch-DM o a indici subclinici di scompenso; 3 i

valori di FGF-21 si associano a minore presenza di retinopatia proliferante e insufficienza renale cronica, supportando gli effetti nefro e retino-protettivi evidenziati nei modelli animali, e sottolineando la necessità di approfondire questa associazione con ulteriori studi negli uomini.

Bibliografia

1. World Health Organization [Internet]. [cited 2022 Apr 10]. Available from: www.who.int/news-room/fact-sheets/
2. World Health Organization Global Health Estimates 2016, Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2016. [Internet]. [cited 2022 Apr 7]. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GHE2016_Deaths_WBInc_2000_2016.xls.
3. Tancredi M, Rosengren A, Svensson AM, Kosiborod M, Pivodic A, Gudbjörnsdóttir S, et al. Excess Mortality among Persons with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015 Oct 29;373(18):1720–32.
4. Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, Denaxas S, Pujades-Rodriguez M, Gale CP, et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1·9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Feb;3(2):105–13.
5. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979 May 11;241(19):2035–8.
6. Williams JW, Huang LH, Randolph GJ. Cytokine Circuits in Cardiovascular Disease. *Immunity*. 2019;50(4):941–54.
7. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jun 21;1492(1):203–6.
8. Shen Y, Ma X, Zhou J, Pan X, Hao Y, Zhou M, et al. Additive relationship between serum fibroblast growth factor 21 level and coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Aug 28;12:124.
9. Zhang X, Yang L, Xu X, Tang F, Yi P, Qiu B, et al. A review of fibroblast growth factor 21 in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*. 2019;24(6):1005–17.
10. Chou RH, Huang PH, Hsu CY, Chang CC, Leu HB, Huang CC, et al. Circulating Fibroblast Growth Factor 21 is Associated with Diastolic Dysfunction in Heart Failure Patients with Preserved Ejection Fraction. *Sci Rep*. 2016;6:33953.
11. Istat. Report: il diabete 2 in Italia [Internet]. [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://www.istat.it/it/archivio/202600>
12. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S14–31.

13. Selvin E, Wang D, Matsushita K, Grams ME, Coresh J. Prognostic Implications of Single-Sample Confirmatory Testing for Undiagnosed Diabetes: A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2018;169(3):156–64.
14. International Diabetes Federation (IDF) [Internet]. [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://www.idf.org/e-library/guidelines.html>
15. Zimmet PZ. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults: Genes, autoimmunity, and demography. Vol. 18, *Diabetes Care.* 1995. .
16. Mishra R, Hodge KM, Cousminer DL, Leslie RD, Grant SFA. A Global Perspective of Latent Autoimmune Diabetes in Adults. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(9):638–50.
17. IDF Diabetes Atlas [Internet]. [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://www.diabetesatlas.org/en/>
18. di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 19(4):259–70.
19. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 26;19(11).
20. International Diabetes Federation. IDF DIABETES ATLAS [Internet]. 10th edition. 2021 [Internet]. [cited 2022 Apr 10]. Available from: www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html.
21. Istat Report: Malattie Cardiovascolari in Italia [Internet]. [cited 2022 Apr 24]. Available from: <https://www.istat.it/it/archivio/214230>
22. Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr.* 2015 Feb;67(1).
23. Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus - Mechanisms, Management, and Clinical Considerations. *Circulation.* 2016 Jun 14;133(24):2459–502.
24. US Preventive Services Task Force, Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, et al. Risk Assessment for Cardiovascular Disease With Nontraditional Risk Factors: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA.* 2018;320(3):272–80.
25. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2018;137(12):e67–492.
26. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Kalidindi S, Wolski K, Moon KW, Sipahi I, et al. Effect of diabetes on progression of coronary atherosclerosis and arterial

- remodeling: a pooled analysis of 5 intravascular ultrasound trials. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Jul 22;52(4):255–62.
27. Mapanga RF, Essop MF. Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):H153-73.
 28. Syed IAA, Khan WA. Glycated haemoglobin--a marker and predictor of cardiovascular disease. *J Pak Med Assoc*. 2011 Jul;61(7):690–5.
 29. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998 May 5;97(17):1695–701.
 30. Perkins JM, Joy NG, Tate DB, Davis SN. Acute effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on vascular inflammatory biomarkers and endothelial function in overweight and obese humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Jul 15;309(2):E168-76.
 31. Smolock AR, Mishra G, Eguchi K, Eguchi S, Scalia R. Protein kinase C upregulates intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte-endothelium interactions in hyperglycemia via activation of endothelial expressed calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Feb;31(2):289–96.
 32. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008 Sep 29;205(10):2409–17.
 33. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998 May 12;97(18):1837–47.
 34. Hill MA, Yang Y, Zhang L, Sun Z, Jia G, Parrish AR, et al. Insulin resistance, cardiovascular stiffening and cardiovascular disease. *Metabolism*. 2021;119:154766.
 35. Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. Vol. 109, *Circulation*. 2004.
 36. Parhofer KG. Interaction between Glucose and Lipid Metabolism: More than Diabetic Dyslipidemia. *Diabetes Metab J*. 2015 Oct;39(5):353–62.
 37. Wang CCL, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):2735–40.
 38. Lorenzo C, Hartnett S, Hanley AJ, Rewers MJ, Wagenknecht LE, Karter AJ, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance have distinct lipoprotein and apolipoprotein changes: the insulin resistance atherosclerosis study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):1622–30.

39. Crea F, Galvani M, Canonico A, Cirrincione V, di Pasquale G, Mauri F, et al. [Guideline for the diagnosis and treatment of unstable angina. Update 2000]. *Ital Heart J Suppl.* 2000 Dec;1(12):1597–631.
40. Kannel WB, Feinleib M. Natural history of angina pectoris in the Framingham study. Prognosis and survival. *Am J Cardiol.* 1972 Feb;29(2):154–63.
41. MSD manual. Disturbi dell'apparato cardiovascolare [Internet]. [cited 2022 Apr 8]. Available from: <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-dell-apparato-cardiovascolare/coronaropatia/infarto-acuto-del-miocardio>
42. Guglin M, Villafranca A, Morrison A. Cardiogenic diabetes. *Heart Fail Rev.* 2014 Sep;19(5):595–602.
43. Guglin M, Lynch K, Krischer J. Heart failure as a risk factor for diabetes mellitus. *Cardiology.* 2014;129(2):84–92.
44. Linea Guida della Società Italiana di Diabetologia (SID) e dell'Associazione dei Medici Diabetologi (AMD) [Internet]. [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://www.siditalia.it/news/3194-28-07-2021-pubblicate-le-linea-guida-sid-amd-la-terapia-del-diabete-mellito-di-tipo-2>
45. Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes.* 1999 Apr;48(4):839–47.
46. Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, Rossing P, Mingrone G, Mathieu C, et al. 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 2020 Feb 1;43(2):487–93.
47. Lundbaek K. Is there a diabetic cardiopathy? Stuttgart: Schattauer; 1969. Pathogenetische Faktoren des Myokardinfarkts.
48. LUNDBAEK K. Diabetic angiopathy: a specific vascular disease. *Lancet.* 1954 Feb 20;266(6808):377–9.
49. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972 Nov 8;30(6):595–602.
50. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2021;42(36):3599–726.
51. Carr AA, Kowey PR, Devereux RB, Brenner BM, Dahlöf B, Ibsen H, et al. Hospitalizations for new heart failure among subjects with diabetes mellitus in the RENAAL and LIFE studies. *Am J Cardiol.* 2005 Dec 1;96(11):1530–6.

52. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ*. 2000 Aug 12;321(7258):412–9.
53. Valensi P, Meune C. Congestive heart failure caused by silent ischemia and silent myocardial infarction : Diagnostic challenge in type 2 diabetes. *Herz*. 2019 May;44(3):210–7.
54. McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, Luchner A, Hildebrant P, Dargie HJ. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies. *Eur J Heart Fail*. 2004 Mar 15;6(3):269–73.
55. Portale salute - malattie cardiovascolari [Internet]. [cited 2022 Apr 10]. Available from: https://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp?id=43&area=Malattie_cardiovascolari
56. Targher G, Dauriz M, Laroche C, Temporelli PL, Hassanein M, Seferovic PM, et al. In-hospital and 1-year mortality associated with diabetes in patients with acute heart failure: results from the ESC-HFA Heart Failure Long-Term Registry. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(1):54–65.
57. Dauriz M, Targher G, Laroche C, Temporelli PL, Ferrari R, Anker S, et al. Association Between Diabetes and 1-Year Adverse Clinical Outcomes in a Multinational Cohort of Ambulatory Patients With Chronic Heart Failure: Results From the ESC-HFA Heart Failure Long-Term Registry. *Diabetes Care*. 2017;40(5):671–8.
58. Agarwal MA, Fonarow GC, Ziaieian B. National Trends in Heart Failure Hospitalizations and Readmissions From 2010 to 2017. *JAMA Cardiol*. 2021;6(8):952–6.
59. Honigberg MC, Patel RB, Pandey A, Fonarow GC, Butler J, McGuire DK, et al. Trends in Hospitalizations for Heart Failure and Ischemic Heart Disease Among US Adults With Diabetes. *JAMA Cardiol*. 2021;6(3):354–7.
60. Bhatia RS, Tu J v, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med*. 2006 Jul 20;355(3):260–9.
61. Authors/Task Force Members:, McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2022;24(1):4–131.

62. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *European Heart Journal*. 2020;41(2).
63. Brigham Health on a mission [Internet]. [cited 2022 Apr 17]. Available from: www.brighamhealthonamission.org/2019/11/04/watch-dm-risk-score-predicts-heart-failure-risk-in-diabetes-patients/
64. Segar MW, Vaduganathan M, Patel K v, McGuire DK, Butler J, Fonarow GC, et al. Machine Learning to Predict the Risk of Incident Heart Failure Hospitalization Among Patients With Diabetes: The WATCH-DM Risk Score. *Diabetes Care*. 2019;42(12):2298–306.
65. Turner RC, Holman RR. The UK Prospective Diabetes Study. UK Prospective Diabetes Study Group. *Ann Med*. 1996 Oct;28(5):439–44.
66. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):837–53.
67. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998 Sep 12;317(7160):703–13.
68. Diabetes Trial Units- University of Oxford [Internet]. [cited 2022 Apr 17]. Available from: www.dtu.ox.ac.uk/UKPDS/index.php
69. Stevens RJ, Kothari V, Adler AI, Stratton IM, United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in Type II diabetes (UKPDS 56). *Clin Sci (Lond)*. 2001 Dec;101(6):671–9.
70. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013 Oct 15;128(16):1810–52.
71. Garg N, Senthilkumar A, Nusair MB, Goyal N, Garg RK, Alpert MA. Heart failure with a normal left ventricular ejection fraction: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *Am J Med Sci*. 2013 Aug;346(2):129–36.
72. Lindman BR, Dávila-Román VG, Mann DL, McNulty S, Semigran MJ, Lewis GD, et al. Cardiovascular phenotype in HFpEF patients with or without diabetes: a RELAX trial ancillary study. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Aug 12;64(6):541–9.

73. Mustonen JN, Uusitupa MI, Laakso M, Vanninen E, Länsimies E, Kuikka JT, et al. Left ventricular systolic function in middle-aged patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 1994 Jun 15;73(16):1202–8.
74. Seferović PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J.* 2015 Jul 14;36(27):1718–27, 1727a–1727c.
75. Lam CSP, Roger VL, Rodeheffer RJ, Bursi F, Borlaug BA, Ommen SR, et al. Cardiac structure and ventricular-vascular function in persons with heart failure and preserved ejection fraction from Olmsted County, Minnesota. *Circulation.* 2007 Apr 17;115(15):1982–90.
76. Bookout AL, de Groot MHM, Owen BM, Lee S, Gautron L, Lawrence HL, et al. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med.* 2013 Sep;19(9):1147–52.
77. Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:223–41.
78. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, et al. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol.* 2010 Oct;24(10):2050–64.
79. Liang Q, Zhong L, Zhang J, Wang Y, Bornstein SR, Triggle CR, et al. FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes.* 2014 Dec;63(12):4064–75.
80. Lu W, Li X, Luo Y. FGF21 in obesity and cancer: New insights. *Cancer Lett.* 2021;499:5–13.
81. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999 Jun;103(11):1489–98.
82. Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 13;17(12).
83. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab.* 2014 Jul;3(4):354–71.
84. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 2007 Jun;5(6):426–37.
85. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* 2007 Jun;5(6):415–25.
86. Fazeli PK, Lun M, Kim SM, Bredella MA, Wright S, Zhang Y, et al. FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans. *J Clin Invest.* 2015 Nov 3;125(12):4601–11.

87. Gälman C, Lundåsen T, Kharitononkov A, Bina HA, Eriksson M, Hafström I, et al. The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPAR α activation in man. *Cell Metab.* 2008 Aug;8(2):169–74.
88. Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, et al. FGF21 induces PGC-1 α and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 30;106(26):10853–8.
89. Markan KR, Naber MC, Ameka MK, Anderegg MD, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, et al. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes.* 2014 Dec;63(12):4057–63.
90. Samms RJ, Lewis JE, Norton L, Stephens FB, Gaffney CJ, Butterfield T, et al. FGF21 Is an Insulin-Dependent Postprandial Hormone in Adult Humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(10):3806–13.
91. Christodoulides C, Dyson P, Sprecher D, Tsintzas K, Karpe F. Circulating fibroblast growth factor 21 is induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonists but not ketosis in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Sep;94(9):3594–601.
92. Laeger T, Henagan TM, Albarado DC, Redman LM, Bray GA, Noland RC, et al. FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J Clin Invest.* 2014 Sep;124(9):3913–22.
93. Maida A, Zota A, Sjöberg KA, Schumacher J, Sijmonsma TP, Pfenninger A, et al. A liver stress-endocrine nexus promotes metabolic integrity during dietary protein dilution. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3263–78.
94. Wilson GJ, Lennox BA, She P, Mirek ET, al Baghdadi RJT, Fusakio ME, et al. GCN2 is required to increase fibroblast growth factor 21 and maintain hepatic triglyceride homeostasis during asparaginase treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 Feb 15;308(4):E283-93.
95. Simpson SJ, Raubenheimer D. Obesity: the protein leverage hypothesis. *Obes Rev.* 2005 May;6(2):133–42.
96. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006 Sep 21;443(7109):289–95.
97. Rankinen T, Bouchard C. Genetics of Food Intake and Eating Behavior Phenotypes in Humans. *Annual Review of Nutrition.* 2006 Aug 1;26(1):413–34.
98. Chu AY, Workalemahu T, Paynter NP, Rose LM, Giulianini F, Tanaka T, et al. Novel locus including FGF21 is associated with dietary macronutrient intake. *Hum Mol Genet.* 2013 May 1;22(9):1895–902.

99. Tanaka T, Ngwa JS, van Rooij FJA, Zillikens MC, Wojczynski MK, Frazier-Wood AC, et al. Genome-wide meta-analysis of observational studies shows common genetic variants associated with macronutrient intake. *Am J Clin Nutr.* 2013 Jun;97(6):1395–402.
100. Søberg S, Sandholt CH, Jespersen NZ, Toft U, Madsen AL, von Holstein-Rathlou S, et al. FGF21 Is a Sugar-Induced Hormone Associated with Sweet Intake and Preference in Humans. *Cell Metab.* 2017 May 2;25(5):1045-1053.e6.
101. Solon-Biet SM, McMahon AC, Ballard JWO, Ruohonen K, Wu LE, Cogger VC, et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metab.* 2014 Mar 4;19(3):418–30.
102. Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, Garrabou G, Casademont J, Giralt M, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovascular Research.* 2015 Apr 1;106(1):19–31.
103. Yu Y, He J, Li S, Song L, Guo X, Yao W, et al. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits macrophage-mediated inflammation by activating Nrf2 and suppressing the NF- κ B signaling pathway. *International Immunopharmacology.* 2016 Sep;38:144–52.
104. Zhang Y, Liu Z, Zhou M, Liu C. Therapeutic effects of fibroblast growth factor-21 against atherosclerosis via the NF- κ B pathway. *Molecular Medicine Reports.* 2017 Nov 16;
105. Sunaga H, Koitabashi N, Iso T, Matsui H, Obokata M, Kawakami R, et al. Activation of cardiac AMPK-FGF21 feed-forward loop in acute myocardial infarction: Role of adrenergic overdrive and lipolysis byproducts. *Scientific Reports.* 2019 Dec 14;9(1):11841.
106. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *The EMBO Journal.* 2007 Apr 4;26(7):1913–23.
107. Chau MDL, Gao J, Yang Q, Wu Z, Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK–SIRT1–PGC-1 α pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010 Jul 13;107(28):12553–8.
108. Kitada M, Ogura Y, Koya D. The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis. *Aging.* 2016 Oct 15;8(10):2290–307.
109. Cong WT, Ling J, Tian HS, Ling R, Wang Y, Huang BB, et al. Proteomic study on the protective mechanism of fibroblast growth factor 21 to ischemia–reperfusion injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2013 Nov;91(11):973–84.

110. Wang N, Li J yan, Li S, Guo X chen, Wu T, Wang W fei, et al. Fibroblast growth factor 21 regulates foam cells formation and inflammatory response in Ox-LDL-induced THP-1 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Dec;108:1825–34.
111. Liu C, Schönke M, Zhou E, Li Z, Kooijman S, Boon MR, et al. Pharmacological treatment with FGF21 strongly improves plasma cholesterol metabolism to reduce atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2022 Jan 29;118(2):489–502.
112. Hu S, Cao S, Tong Z, Liu J. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy. *Am J Transl Res*. 2018;10(11):3677–88.
113. Chen C, Meng Z, Zheng Y, Hu B, Shen E. Fibroblast growth factor 21 inhibition aggravates cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy by improving lipid accumulation. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017 Oct 25;
114. Zhang C, Huang Z, Gu J, Yan X, Lu X, Zhou S, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway. *Diabetologia*. 2015 Aug 4;58(8):1937–48.
115. Wu F, Wang B, Zhang S, Shi L, Wang Y, Xiong R, et al. FGF21 ameliorates diabetic cardiomyopathy by activating the AMPK-paraoxonase 1 signaling axis in mice. *Clinical Science*. 2017 Aug 1;131(15):1877–93.
116. Packer M. Cardioprotective Effects of Sirtuin-1 and Its Downstream Effectors. *Circulation: Heart Failure*. 2020 Sep;13(9).
117. Álvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, et al. The p65 subunit of NF- κ B binds to PGC-1 α , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovascular Research*. 2010 Aug 1;87(3):449–58.
118. Ruan CC, Kong LR, Chen XH, Ma Y, Pan XX, Zhang ZB, et al. A2A Receptor Activation Attenuates Hypertensive Cardiac Remodeling via Promoting Brown Adipose Tissue-Derived FGF21. *Cell Metabolism*. 2018 Sep;28(3):476-489.e5.
119. Villarroya J, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Giralt M, Villarroya F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *Journal of Endocrinology*. 2019 Nov;243(2):R19–27.
120. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43.
121. WATCH-DM Risk Score Predicts Heart Failure Risk in Diabetes Patients [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from: <https://cvriskcores.shinyapps.io/watchdm/>

122. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974 Apr;20(4):470–5.
123. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res*. 1970 Nov;11(6):583–95.
124. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*. 1982 Oct;28(10):2077–80.
125. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499–502.
126. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care*. 1985;8(5).
127. NICE. Cardiovascular disease: risk assessment and reduction, including lipid modification. National Institute for Health Care Excellence. 2016;CG181(July).
128. Collins R, Burch J, Cranny G, Aguiar-Ibáñez R, Craig D, Wright K, et al. Duplex ultrasonography, magnetic resonance angiography, and computed tomography angiography for diagnosis and assessment of symptomatic, lower limb peripheral arterial disease: Systematic review. *British Medical Journal*. 2007;334(7606).
129. Segar MW, Patel K v., Hellkamp AS, Vaduganathan M, Lokhnygina Y, Green JB, et al. Validation of the WATCH-DM and TRS-HF_{DM} Risk Scores to Predict the Risk of Incident Hospitalization for Heart Failure Among Adults With Type 2 Diabetes: A Multicohort Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2022 Jun 7;11(11).
130. Segar MW, Khan MS, Patel K v., Vaduganathan M, Kannan V, Willett D, et al. Incorporation of natriuretic peptides with clinical risk scores to predict heart failure among individuals with dysglycaemia. *European Journal of Heart Failure*. 2022 Jan 23;24(1):169–80.
131. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Vol. 37, *European Heart Journal*. 2016.
132. Planavila A, Redondo I, Hondares E, Vinciguerra M, Munts C, Iglesias R, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2019.
133. Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Ito M, Matsuo K, et al. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Mar 27;459(1):124–30.

134. Li Q, Zhang Y, Ding D, Yang Y, Chen Q, Su D, et al. Association Between Serum Fibroblast Growth Factor 21 and Mortality Among Patients With Coronary Artery Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016 Dec;101(12):4886–94.
135. Markan KR. Defining “FGF21 Resistance” during obesity: Controversy, criteria and unresolved questions. *F1000Res*. 2018 Mar 7;7:289.
136. Tang TT, Li YY, Li JJ, Wang K, Han Y, Dong WY, et al. Liver-heart crosstalk controls IL-22 activity in cardiac protection after myocardial infarction. *Theranostics*. 2018;8(16):4552–62.
137. Li J, Xu C, Liu Y, Li Y, Du S, Zhang R, et al. Fibroblast growth factor 21 inhibited ischemic arrhythmias via targeting miR-143/EGR1 axis. *Basic Research in Cardiology*. 2020 Mar 4;115(2):9.
138. Zhang W, Chu S, Ding W, Wang F. Serum Level of Fibroblast Growth Factor 21 Is Independently Associated with Acute Myocardial Infarction. *PLOS ONE*. 2015 Jun 19;10(6):e0129791.
139. Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Harrison SA, Abdelmalek MF, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet*. 2019;392(10165):2705–17.
140. Geng L, Lam KSL, Xu A. The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020 Nov 6;16(11):654–67.
141. Grant L, Lees EK, Forney LA, Mody N, Gettys T, Brown PAJ, et al. Methionine restriction improves renal insulin signalling in aged kidneys. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2016 Jul;157:35–43.
142. Zhao L, Wang H, Xie J, Chen Z, Li X, Niu J. Potent long-acting rhFGF21 analog for treatment of diabetic nephropathy in db/db and DIO mice. *BMC Biotechnology*. 2017 Dec 4;17(1):58.
143. Fu Z, Gong Y, Liegl R, Wang Z, Liu CH, Meng SS, et al. FGF21 Administration Suppresses Retinal and Choroidal Neovascularization in Mice. *Cell Reports*. 2017 Feb;18(7):1606–13.