

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Ch.mo Prof. Paolo Simioni

U.O.C DI MALATTIE DEL METABOLISMO

Direttore: Ch.mo Prof. Angelo Avogaro

**RELAZIONI TRA CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI,
MARCATORI DI GLICAZIONE E FIBROSI EPATICA IN
PAZIENTI CON DIABETE TIPO 2**

Relatore: Ch.mo Prof. Gian Paolo Fadini
Correlatore: Dott.ssa Benedetta Maria Bonora

Laureanda: Erica Pilotti
Anno Accademico 2023/2024

INDICE

INDICE.....	3
RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. IL DIABETE.....	5
1.1. DEFINIZIONE.....	5
1.1.1. Classificazione e diagnosi.....	5
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	7
1.2.1. Prevalenza in Italia e in Veneto del diabete.....	8
1.3. PATOGENESI.....	9
1.3.1. DMT1.....	9
1.3.2. Prediabete.....	10
1.3.3. DMT2.....	11
1.4. COMPLICANZE MICRO, MACRO-VASCOLARI E AGES.....	12
1.4.1. Complicanze microvascolari.....	13
1.4.2. Complicanze macrovascolari.....	17
1.4.3. Advanced glycation end products.....	19
1.5. APPROCCIO ALLA TERAPIA FARMACOLOGICA E NON-FARMACOLOGICA.....	20
1.5.1. Terapia non farmacologica.....	20
1.5.2. Farmaci usati per il trattamento del DMT2.....	21
1.5.3. Monoterapia e terapia orale combinata.....	23
1.5.4. Terapia iniettiva.....	25
2. MASLD.....	27
2.1. DEFINIZIONE.....	27
2.2. FATTORI DI RISCHIO.....	29
2.3. EPIDEMIOLOGIA.....	31
2.4. EVOLUZIONE.....	31
2.5. DIAGNOSI.....	33
2.5.1. Non-invasive tests (NITs).....	33
2.5.2. Tecniche di imaging.....	35
2.5.3. Opzioni terapeutiche in pazienti affetti da DMT2 e MASLD.....	38
3. CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI.....	41
3.1. DEFINIZIONE.....	41
3.1.1. La nicchia endostale delle HSCs nel midollo osseo.....	43
3.1.2. La nicchia vascolare delle HSCs nel midollo osseo.....	43
3.1.3. La mobilizzazione.....	44
3.2. SIGNIFICATO CLINICO.....	45

3.3.	QUANTIFICAZIONE DELLE CSCs.....	48
3.4.	CSCs NEL DIABETE E DISFUNZIONE MIDOLLARE	49
3.4.1.	Microangiopatia midollare	49
3.4.2.	Neuropatia del midollo osseo	50
3.4.3.	Infiammazione del midollo osseo	51
3.4.4.	Possibili approcci terapeutici	51
4.	OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI.....	53
4.1.	VALUTARE L'ASSOCIAZIONE TRA IL NUMERO DI CSCs, MARCATORI DI GLICAZIONE E FIBROSI EPATICA NEL DMT2.....	53
5.	MATERIALI E METODI	55
5.1.	SELEZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI PAZIENTI.....	55
5.1.1.	Dati clinici.....	55
5.2.	MISURA DELLE CSCs	57
5.3.	FIBROSCAN	61
5.4.	SKIN AUTOFLUORESCENCE	62
5.5.	ANALISI STATISTICA	63
6.	RISULTATI.....	64
6.1.	CARATTERISTICHE CLINICHE DELLA POPOLAZIONE DELLO STUDIO.....	64
6.1.1.	Livelli delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule progenitrici endoteliali nel sangue periferico.....	68
6.2.	TEST T DI STUDENT E TEST DEL CHI-QUADRATO	69
6.3.	ANALISI DI REGRESSIONE LINEARE.....	71
6.3.1.	Regressione lineare univariata delle variabili associate alla stiffness.....	71
6.3.2.	Regressione lineare multivariata delle variabili associate alla stiffness.....	75
6.3.3.	Regressione lineare univariata delle variabili associate alla CAP	76
6.3.4.	Regressione lineare multivariata delle variabili correlate alla CAP	80
7.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	81
8.	BIBLIOGRAFIA	87

RIASSUNTO

Background Tra i pazienti affetti da diabete di tipo 2 (DMT2) la prevalenza di *metabolic dysfunction-associated steatotic liver diseases* (MASLD) è estremamente elevata e tale condizione può progredire diventando *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis* (MASH) e infine cirrosi. Inoltre, numerosi studi hanno osservato che essa risulta essere un ulteriore fattore di rischio cardiovascolare, indipendentemente dalla presenza o meno di altri fattori di rischio cardiovascolari. Le cellule staminali circolanti (CSCs) sono cellule staminali ematopoietiche che originano nel midollo osseo e vengono rilasciate ciclicamente nel sangue. Le *hematopoietic stem progenitor cells* (HSPCs) hanno funzioni di “pattugliamento” dei tessuti, contribuendo a combattere le infezioni e a promuovere la rigenerazione cellulare. Si ipotizza che possano essere reclutate nei tessuti o negli organi esposti a un costante danno al fine di favorire la riparazione tissutale. Una sottopopolazione di HSPCs, chiamata cellule progenitrici endoteliali (EPCs) si caratterizza per avere un tropismo vascolare e svolgere un ruolo importante nel mantenimento e nella riparazione dell’albero vascolare. Una riduzione delle HSPCs è stata riscontrata nei soggetti con comuni fattori di rischio cardiovascolari e nei pazienti diabetici. Tale riduzione può comportare una perdita progressiva della capacità individuale di rispondere ai danni tissutali. Gli advanced glycation end-products (AGEs), prodotti di reazioni non enzimatiche tra glucosio e proteine, acidi nucleici e lipidi, sono considerati uno dei principali fattori coinvolti nel danno multiorgano nei pazienti diabetici e sembrerebbero direttamente correlati a una maggiore incidenza di complicanze micro e macrovascolari; essi sono responsabili dell’invecchiamento precoce dei tessuti e degli organi.

Scopo della tesi. Valutare l'associazione potenziale tra il grado di fibrosi epatica e steatosi e i livelli di CSCs e i valori dei marcatori di glicazione, nei pazienti con DMT2.

Materiali e Metodi. Da dicembre 2023 a maggio 2024 sono stati reclutati consecutivamente pazienti afferenti al Servizio di Diabetologia dell’Azienda Ospedale-Università di Padova che venivano sottoposti all’esecuzione di un FibroScan, richiesto routinariamente come screening della MASLD e della possibile conseguente fibrosi epatica. Per tutti i pazienti sono state raccolte informazioni anagrafiche, demografiche, antropometriche, biochimiche, l’anamnesi patologica remota e l’anamnesi farmacologica. Per ogni paziente è stata effettuata anche una misurazione della skin autofluorescence

(SAF) mediante AGE Reader. La misura della SAF rappresenta una metodica nuova, non invasiva, rapida e affidabile per valutare il livello di AGEs nei tessuti. Successivamente ciascun paziente è stato sottoposto ad un prelievo ematico (una provetta da 6 ml) per la determinazione citofluorimetrica delle cellule staminali circolanti.

Risultati. Sono stati arruolati 48 soggetti (35 maschi, 13 femmine), il 41,7% dei pazienti era sovrappeso. È stata evidenziata una differenza statisticamente significativa tra pazienti con fibrosi e pazienti senza fibrosi per quanto riguarda i valori mediani delle EPCs CD133+KDR+ e delle HSPCs CD34+CD45neg. È stata individuata una correlazione positiva tra la rigidità epatica e le EPCs con i fenotipi CD34+CD133+KDR+ e CD133+KDR+. È stata osservata una correlazione positiva tra grado di steatosi e le HSPCs CD34+. Non è stata evidenziata nessun'associazione tra gli AGEs, misurati mediante l'AGEs Reader e la steatosi e la fibrosi epatica.

È stata rilevata una differenza statisticamente significativa, tra pazienti con fibrosi e pazienti senza fibrosi per quanto riguarda le medie delle variabili BMI, valori dei trigliceridi, CAP, HSI e infine ALT. È stata identificata una correlazione positiva tra la rigidità epatica e le variabili BMI, CAP, HSI e ALT. È stata riscontrata una correlazione positiva tra la steatosi epatica e le variabili colesterolo totale, colesterolo LDL, stiffness, HSI e BMI.

Conclusioni. Si deve sottolineare che i risultati di questo studio, confrontati con i dati della letteratura scientifica, non permettono di delineare un meccanismo chiaro attraverso il quale la fibrosi o la steatosi influenzino le cellule staminali circolanti e viceversa. Non è stata rilevata alcuna correlazione tra i livelli di AGEs tissutali e il danno epatico, inteso come fibrosi e steatosi. Questo potrebbe essere dovuto alla limitata dimensione del campione, alla presenza di possibili confondenti, outliers e alla mancanza di chiarezza riguardo alla fisiopatologia della MASLD/MASH. Riteniamo però che questa ricerca possa rappresentare la fase iniziale di uno studio più ampio che permetterà di chiarire le correlazioni tra gli indicatori da noi analizzati.

ABSTRACT

Background. Among patients with type 2 diabetes (T2DM), the prevalence of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is extremely high, and this condition can progress to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) and cirrhosis. Furthermore, numerous studies have observed that it is an additional cardiovascular risk factor, regardless of the presence or absence of other cardiovascular risk factors.

Circulating stem cells (CSCs) are hematopoietic stem cells that originate in the bone marrow and are cyclically released into the blood. Hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) have tissue “patrolling” functions, helping to fight infections and promote cell regeneration. It is hypothesized that they may be recruited to tissues or organs exposed to constant damage to promote tissue repair. A subpopulation of HSPCs, called endothelial progenitor cells (EPCs), is characterized by vascular tropism and plays an important role in the maintenance and repair of the vascular tree. A reduction in HSPCs has been found in subjects with common cardiovascular risk factors and in diabetic patients. This reduction can result in a progressive loss of the individual’s ability to respond to tissue damage.

Advanced Glycation End-products (AGEs), products of non-enzymatic reactions between glucose and proteins, nucleic acids, and lipids, are considered one of the main factors involved in multiorgan damage in diabetic patients and appear to be directly correlated with a higher incidence of micro and macrovascular complications; they are responsible for the premature aging of tissues and organs.

Aims. To assess the potential association between the degree of hepatic fibrosis and steatosis, and the levels of CSCs and markers of glycation in patients with DMT2.

Materials and methods. From December 2023 to May 2024, patients attending the Diabetes Service of the Padua Hospital-University were consecutively recruited and subjected to a FibroScan, routinely requested as a screening for MASLD and the possible consequent liver fibrosis. For all patients, demographic, anthropometric, and biochemical information, as well as medical history and pharmacological history, were collected. Each patient underwent a skin autofluorescence (SAF) measurement using an AGE Reader. The SAF measurement represents a new, non-invasive, rapid, and reliable method for assessing the level of AGEs in tissues. Subsequently, each patient underwent a blood draw (a 6 ml tube) for the cytometric determination of circulating stem cells.

Results. Forty-eight subjects (35 males, 13 females) were enrolled, with 41.7% of the patients being overweight. A statistically significant difference was identified between patients with fibrosis and those without fibrosis concerning the median values of EPCs CD133+KDR+ and HSPCs CD34+CD45neg. A positive correlation was found between liver stiffness and EPCs with the CD34+CD133+KDR+ and CD133+KDR+ phenotypes. A positive correlation was observed between the degree of steatosis and HSPCs CD34+. A statistically significant difference was noted between patients with fibrosis and those without fibrosis regarding the means of the BMI, triglyceride levels, CAP, HSI, and ALT variables. A positive correlation was identified between liver stiffness and the variables BMI, CAP, HSI, and ALT. A positive correlation was found between hepatic steatosis and the variables total cholesterol, LDL cholesterol, stiffness, and HSI. No association was identified between AGEs, measured by the AGEs Reader, and hepatic steatosis or fibrosis.

Conclusions. It must be emphasized that the results of this study, compared with data from the scientific literature, do not allow for the delineation of a clear mechanism through which fibrosis or steatosis influence circulating stem cells, and vice versa. No correlation was found between tissue AGEs levels and liver damage, understood as fibrosis and steatosis. This could be due to the limited sample size, the presence of potential confounders, outliers, and the lack of clarity regarding the pathophysiology of MASLD/MASH. Nevertheless, we believe that this research may represent the initial phase of a larger study that will clarify the correlations among the indicators we analyzed.

1. IL DIABETE

1.1. Definizione

Il diabete è una sindrome clinica caratterizzata da alterazioni del metabolismo dei carboidrati, lipidi e proteine causata da una carenza assoluta o relativa di insulina la cui manifestazione più evidente è l'iperglicemia (1).

Il diabete comporta un aumento del rischio di danno a molteplici organi con conseguenti complicanze croniche. Oltre ai siti tipici in cui si verificano le complicanze tradizionali (retinopatia, nefropatia, neuropatia e malattie cardiovascolari), il diabete può compromettere la struttura e/o il funzionamento della maggior parte dei tessuti del corpo umano, compresi pelle, fegato, polmoni, ossa e intestino (1).

Il diabete di tipo 1 (DMT1), sebbene più raro di 10 volte rispetto al diabete di tipo 2 (DMT2), condivide lo stesso ampio spettro di danni multiorgano e, dal punto di vista della ricerca, rappresenta un punto di riferimento ideale per studiare gli effetti avversi dell'iperglicemia senza il condizionamento dei fattori di rischio concomitanti che accompagnano il DMT2 (obesità, ipertensione e dislipidemia) (2).

Il DMT2 all'età di 50 anni, a causa dell'ampio carico di complicanze, riduce l'aspettativa di vita di circa 6-7 anni sia negli uomini che nelle donne (1).

Sebbene le malattie cardiovascolari siano la principale causa di mortalità tra i pazienti affetti da diabete, questa condizione contribuisce anche ad aumentare il tasso di mortalità per una serie di altre patologie, tra cui il cancro, le malattie epatiche e quelle dell'apparato digerente non epatiche, le malattie renali, la polmonite e altre infezioni, la broncopneumopatia cronica ostruttiva, oltre a disturbi mentali e del sistema nervoso. Le cause esatte alla base di questo eccesso di morbilità e mortalità non sono ancora del tutto note. L'interpretazione più accreditata è che, oltre ad aumentare il danno cellulare e tissutale attraverso l'effetto tossico dell'iperglicemia e del contesto dismetabolico associato, il diabete compromette i processi fisiologici di riparazione tissutale (2).

1.1.1. Classificazione e diagnosi

Il diabete può essere classificato nelle seguenti categorie:

DMT1 è dovuto alla distruzione autoimmune delle cellule β pancreatiche, che di solito porta ad una carenza assoluta di insulina. Questa tipologia comprende anche il diabete

autoimmune dell'adulto (LADA, latent autoimmune diabetes in adults) che è una particolare forma di diabete autoimmune a lenta progressione che si manifesta nell'età adulta. Il diabete immunomediato è la forma più comune di diabete nell'infanzia e nell'adolescenza, tuttavia può manifestarsi a qualsiasi età, anche nell'ottava e nona decade di vita (3).

DMT2 è dovuto alla progressiva perdita di un'adeguata secrezione di insulina da parte delle cellule β , associata ad un quadro di insulino-resistenza (3).

In alcuni casi però, determinati pazienti non possono essere chiaramente classificati come affetti da DMT2 o DMT1 al momento della diagnosi. I paradigmi tradizionali secondo cui il DMT2 si manifesta solo negli adulti e il DMT1 solo nei bambini non sono più considerati accurati, poiché entrambe le malattie si manifestano in entrambi i gruppi di età. I bambini affetti da DMT1 spesso presentano sintomi caratteristici come poliuria/polidipsia e circa la metà presenta chetoacidosi diabetica (DKA). L'esordio del DMT1 negli adulti può essere più variabile rispetto a come si presenta durante l'infanzia. Gli adulti, infatti, possono non presentare i classici sintomi, citati precedentemente, e in alcuni casi sperimentano una remissione temporanea della necessità di insulina (3).

Le caratteristiche più utili per la discriminazione del DMT1 sono (3):

- età inferiore alla diagnosi (<35 anni)
- BMI basso (<25 kg/m²)
- perdita di peso non intenzionale
- DKA e glicemia >360 mg/dL (20 mmol/L) alla presentazione.

Occasionalmente, i pazienti con DMT2 possono presentare DKA alla diagnosi; ciò si riscontra in particolare nelle minoranze etniche.

Esistono altri specifici tipi di diabete dovuti ad altre cause, ad esempio le forme di diabete monogenico (come il diabete neonatale e il maturity-onset diabetes of the young (MODY)), le malattie del pancreas esocrino (come la fibrosi cistica e la pancreatite) ed il diabete indotto da farmaci o sostanze chimiche (come nel caso dell'uso di glucocorticoidi, nel trattamento dell'HIV/AIDS o dopo un trapianto d'organo) (3).

Diabete mellito gestazionale è una forma di diabete diagnosticato durante la gravidanza che non era manifesto prima della gestazione (3).

Criteria per la diagnosi di diabete (3)

- *Fasting plasma glucose* (FPG) ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L). Per digiuno si intende l'assenza di assunzione di calorie per almeno 8 ore.

- *Plasma glucose (PG)* a 2 ore \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L) durante oral glucose tolerance test (OGTT). Il test deve essere eseguito come descritto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), utilizzando un carico di glucosio contenente l'equivalente di 75 g di glucosio anidro disciolto in acqua.
- Emoglobina glicata (HbA1c) \geq 6,5% (48 mmol/mol). Il test deve essere eseguito in un laboratorio che utilizzi un metodo certificato dal *National glycohemoglobin standardization program* (NGSP).
- In un paziente con i classici sintomi di iperglicemia o crisi iperglicemica, un glucosio plasmatico casuale \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L)

Conferma della diagnosi

A meno che non vi sia una chiara diagnosi clinica (ad esempio, paziente in crisi iperglicemica con i classici sintomi dell'iperglicemia e un glucosio plasmatico casuale \geq 200 mg/dL), la diagnosi richiede la conferma di due test alterati in due momenti diversi (3).

1.2. Epidemiologia

Il diabete è una malattia grave che a lungo termine ha un forte impatto sulla vita e sul benessere degli individui, famiglie e società, in tutto il mondo.

È considerata tra le prime dieci cause di morte negli adulti e si stima che nel 2021 abbia causato 6.7 milioni di decessi a livello globale (1). Nel 2021, la spesa sanitaria globale per il diabete è stata stimata essere di quasi 1000 miliardi di dollari (1).

Nel 2009 si stimava che 285 milioni di persone fossero affette da diabete (DMT1 e DMT2), passando a 366 milioni nel 2011, 382 milioni nel 2013, 415 milioni nel 2015, 425 milioni nel 2017 (4) e 537 milioni nel 2021(1). Inoltre, è stato stimato che 541 milioni di persone, nel 2021, fosse in una condizione di pre-diabete (IGT) (1).

Per il DMT2, che rappresenta circa il 90% del totale dei casi, questo aumento può essere attribuito all'invecchiamento, al rapido aumento dell'urbanizzazione e alle condizioni ambientali obesogeniche. Un ulteriore contributo all'incremento della prevalenza è rappresentato dalla maggiore sopravvivenza delle persone affette da diabete grazie alla diagnosi precoce, alla migliore gestione della malattia e di conseguenza, alla riduzione della mortalità prematura. Infine, anche il numero crescente di giovani adulti affetti da DMT2, negli ultimi anni, determina un aumento della prevalenza complessiva.

Considerando l'elevato numero di persone affette da diabete e le previsioni di incremento dell'incidenza, è urgente sviluppare e implementare strategie coordinate e multisettoriali per far fronte a questa patologia cronica. Senza azioni concrete ed efficaci per affrontare questa "pandemia" si prevede che 643 milioni di persone (adulti tra i 20 e i 79 anni) avranno il diabete entro il 2030. Il numero salirà a una cifra sconcertante di 783 milioni entro il 2045 (1).

È stato dimostrato che il DMT2 può essere prevenuto o ritardato attraverso la modifica dello stile di vita o la somministrazione di alcuni agenti farmacologici. Sebbene l'efficacia della prevenzione nel DMT2 sia sostenuta da significativi dati scientifici, la messa in atto di politiche sanitarie nazionali, volte a individuare e trattare le persone ad alto rischio, rimane ancora una sfida per il *welfare* nazionale. I tentativi fatti finora sono rivolti ad un miglioramento dell'alimentazione e al potenziamento dell'attività fisica. Sovrappeso e inattività sono infatti i fattori di rischio modificabili più importanti per lo sviluppo di DMT2 (5).

1.2.1. Prevalenza in Italia e in Veneto del diabete

In Italia, l'Osservatorio ARNO effettua periodicamente uno studio approfondito sulla prevalenza della popolazione affetta da diabete in tutto il Paese. Nel 2016, la prevalenza del diabete è stata stimata essere del 6,34%.

In un'indagine condotta in Italia (6) è stata analizzata la prevalenza effettiva del diabete in Veneto nel 2018, considerando anche i casi di diabete non diagnosticato, tramite l'uso di un algoritmo che combinava dati amministrativi e dati provenienti dal sistema rHIE (regional health information exchange), che consente la condivisione informatizzata dei dati medici e clinico-laboratoristici dei cittadini a livello regionale.

La prevalenza del diabete noto calcolata è stata del 6,17%, in particolare nel sesso femminile la prevalenza è stata del 5,36%, mentre nel sesso maschile è stata del 7,01%. La prevalenza del diabete non ancora diagnosticato è stata stimata essere del 1,33%. Di conseguenza la prevalenza globale dei casi di diabete, noto e non ancora diagnosticato, è risultata essere del 7,50%, con un rapporto tra diabete noto e diabete non diagnosticato di circa 5 a 1.

1.3. Patogenesi

Il DMT1 e il DMT2 sono malattie eterogenee in cui la presentazione clinica e la progressione della malattia possono variare notevolmente da individuo ad individuo. La fisiopatologia dello sviluppo del DMT1 risulta essere molto più chiara rispetto a quella che caratterizza il DMT2 (3). È ormai stato associato, da diversi studi prospettici, che la presenza persistente di due o più autoanticorpi anti-insula pancreatica predice quasi con certezza lo sviluppo clinico del DMT1 (6). La velocità di progressione dipende dall'età della prima rilevazione degli autoanticorpi, dal numero di autoanticorpi, dalla specificità degli autoanticorpi e dal loro titolo. I livelli di glucosio nel sangue e del HbA1c aumentano con anni di anticipo rispetto alla comparsa delle manifestazioni cliniche del diabete, rendendo possibile la diagnosi ben prima dell'insorgenza della DKA (3). Nel LADA invece, si ha una lenta distruzione autoimmune delle β -cellule. Esso si verifica negli adulti e può portare ad un periodo, anche di lunga durata, in cui la capacità di secrezione di insulina è parziale (3). Le vie che portano alla distruzione e alla disfunzione delle cellule β sono meno definite nel DMT2. La carenza di secrezione insulinica delle cellule β , spesso accompagnata dall'insulino-resistenza, sembra essere il denominatore comune. Il DMT2 è associato a difetti di secrezione insulinica legati alla genetica, all'infiammazione e allo stress metabolico (3).

1.3.1. DMT1

Immunomediato

Questa forma, precedentemente chiamata "diabete insulino-dipendente" o "diabete giovanile", rappresenta il 5-10% delle forme di diabete ed è legata alla distruzione autoimmune cellulo-mediata delle cellule β pancreatiche.

Questa tipologia di diabete presenta una forte associazione con certi aplotipi di human leukocyte antigen (HLA), come DQB1 e DRB1. Pertanto, lo screening genetico è stato utilizzato in alcuni studi di ricerca per identificare popolazioni ad alto rischio. I diversi aplotipi di HLA possono essere predisponenti o protettivi nei confronti di questa malattia.

I marcatori autoimmuni includono:

- Anti-insula pancreatici (ICA).
- Anti-insulina, si usano molto poco (IAA).
- Anti-decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD).

- Anti-tirosin kinasi e tirosin fosfatasi (IA2 e IA2 β).
- Anti-trasportatore dello zinco 8 (ZNT8).

Le persone affette da DMT1 sono predisposte a sviluppare anche altri disturbi autoimmuni (3).

Idiopatico

Alcune forme di DMT1 non hanno un'etiologia nota. Questi pazienti presentano insulinopenia permanente e sono soggetti a DKA, ma non hanno alcuna evidenza di autoimmunità β cellulare. Tuttavia, solo una minoranza dei pazienti con DMT1 rientra in questa categoria. I soggetti con DMT1 autoanticorpo-negativo di origine africana o asiatica possono soffrire di DKA episodica e presentare vari gradi di carenza insulinica tra un episodio e l'altro. Questa forma di diabete è fortemente ereditaria e non è associata all'HLA. La necessità assoluta di una terapia insulinica sostitutiva nei pazienti affetti può essere intermittente (3).

Raccomandazioni

Lo screening per il DMT1 pre-sintomatico mediante test che rilevano gli autoanticorpi:

- ICA
- IAA
- GAD
- IA2- IA2 β
- ZNT8

È attualmente raccomandato nell'ambito di studio di ricerca o può essere considerato nei confronti di familiari di primo grado di un paziente affetto da DMT1. La presenza e persistenza di autoanticorpi multipli contro le isole pancreatiche è un fattore di rischio per lo sviluppo clinico del diabete (3).

1.3.2. Prediabete

"Prediabete" è il termine utilizzato per i soggetti i cui livelli di glucosio non soddisfano i criteri per la diagnosi di diabete, ma che presentano un metabolismo dei carboidrati alterato. Le persone con prediabete sono definite dalla presenza di *impaired fasting glucose* (IFG) e/o *impaired glucose tolerance* (IGT) e/o HbA1c 5,7-6,4% (39-47 mmol/mol).

Il prediabete non deve essere considerato un'entità clinica a sé stante, ma piuttosto un fattore di rischio per la progressione verso il diabete e lo sviluppo di malattie cardiovascolari (CVD). Il prediabete è spesso associato all'obesità (soprattutto quella addominale o viscerale), alla dislipidemia con trigliceridi elevati e/o colesterolo HDL basso e all'ipertensione (3).

1.3.3. DMT2

Il DMT2, definito "diabete non insulino-dipendente" o "diabete dell'adulto", rappresenta il 90-95% di tutti i casi di diabete. Questa forma include individui che presentano una carenza relativa, anziché assoluta, di insulina e una resistenza periferica a essa. Almeno inizialmente, e spesso per tutta la vita, questi individui possono non necessitare di un trattamento insulinico per sopravvivere (1). L'eziologia del DMT2 è complessa. Sebbene le cause specifiche non siano note, in quanto non si verifica la distruzione autoimmune delle cellule β e i pazienti non presentano nessuna altra condizione nota che possa causare il diabete, la maggior parte degli affetti da DMT2 risulta essere sovrappeso o obeso. I pazienti, che non presentano obesità o sovrappeso secondo i criteri tradizionali, hanno spesso un'aumentata percentuale di grasso corporeo distribuito prevalentemente nella regione addominale. L'eccesso di tessuto adiposo, infatti, causa di per sé un certo grado di resistenza all'insulina. I soggetti con DMT2 possono avere livelli di insulina normali o elevati, ma la mancata normalizzazione della glicemia riflette un difetto relativo nella secrezione insulinica. In questi pazienti, quindi, la secrezione dell'insulina è difettosa e non è sufficiente a compensare l'insulino-resistenza periferica (3). L'insulino-resistenza può migliorare con la riduzione del peso, l'esercizio fisico e/o il trattamento farmacologico dell'iperglicemia, ma raramente viene riportata alla normalità (3). La DKA, manifestazione di una pronunciata carenza insulinica che comporta una risposta compensatoria da parte dell'organismo, che passa a un metabolismo lipidico per la produzione di energia e quindi produzione di corpi chetonici da parte del fegato, si verifica raramente in modo spontaneo nel DMT2 e, quando si manifesta, è in concomitanza con un'altra condizione patologica, come un'infezione, un infarto acuto del miocardio o l'uso di alcuni farmaci (ad esempio corticosteroidi, antipsicotici atipici, diuretici tiazidici e inibitori SGLT2 (7)) (3). Il DMT2 spesso non viene diagnosticato per molti anni perché l'iperglicemia si sviluppa gradualmente e, nelle fasi iniziali, non è abbastanza grave da far notare al paziente i classici sintomi del diabete, come la disidratazione o la perdita di peso involontaria.

Purtroppo, i pazienti con diabete non diagnosticato sono a maggior rischio di sviluppare complicanze macrovascolari e microvascolari, perché non ricevono il trattamento adeguato (3). Il rischio di sviluppare il DMT2 aumenta con l'età, l'obesità e la mancanza di attività fisica (1); si verifica più frequentemente nelle donne con precedente diabete mellito gestazionale (GDM) o sindrome dell'ovaio policistico. È inoltre più comune nelle persone con ipertensione o dislipidemia e in alcuni sottogruppi razziali/etnici (afroamericani, nativi americani, ispanici/latini e asiatici). È spesso associato a una forte predisposizione genetica o a un'anamnesi familiare positiva in parenti di primo grado (3).

Steatosi epatica e ruolo patogenetico nello sviluppo di DMT2

La steatosi epatica si sviluppa a causa dell'accumulo di ceramidi e diacilgliceroli (DAG) all'interno degli epatociti, i quali possono inibire la segnalazione intracellulare mediata dall'insulina, promuovendo così l'insorgenza dell'insulino-resistenza epatica (8). Studi condotti sia sull'uomo che sui roditori hanno dimostrato che un aumento dei livelli intracellulari di DAG negli epatociti è in grado di attivare la proteina chinasi C, epsilon (PKC ϵ). La PKC ϵ riduce la fosforilazione dei residui tirosinici sul recettore dell'insulina-2 (IRS-2), impedendo così il segnale insulinico intracellulare (con conseguente riduzione della sintesi epatica del glicogeno e minore soppressione della gluconeogenesi epatica) (9). Tali meccanismi contribuiscono ad aggravare l'insulino-resistenza, che è alla base dello sviluppo del DMT2, e peggiorare il controllo glicemico nei pazienti affetti da DMT2 e MASLD. Infatti, i pazienti con DMT2 e MASLD generalmente richiedono terapie antidiabetiche più intensive per ottenere un adeguato controllo glicemico rispetto a quelli con solo DMT2(8).

1.4. Complicanze micro, macro-vascolari e AGEs

Proteggere il nostro organismo dall'iperglicemia è fondamentale. Gli effetti diretti e indiretti che l'iperglicemia ha sull'albero vascolare umano e su altri tipi cellulari sono infatti la principale fonte di morbilità e mortalità nel DMT1 e DMT2. Le complicanze causate dall'iperglicemia possono essere distinte in due grandi categorie: macrovascolari (coronaropatia, arteriopatia periferica e ictus) e microvascolari (nefropatia, neuropatia e retinopatia) (8). La condizione di iperglicemia cronica, riscontrata nei diabetici, causa un esteso rimodellamento microvascolare in numerosi organi portando allo sviluppo delle complicanze microvascolari più comuni come la retinopatia, la neuropatia, la nefropatia e

la cardiomiopatia diabetica. Tuttavia, anche altri tessuti e organi presentano alterazioni microvascolari, per esempio la pelle, il fegato, i polmoni, la placenta, i corpi cavernosi e il midollo osseo (9).

1.4.1. Complicanze microvascolari

Retinopatia diabetica

La retinopatia diabetica risulta essere una complicanza microvascolare molto comune nei pazienti diabetici. Lo sviluppo della retinopatia diabetica dipende sia dalla durata che dalla gravità dell'iperglicemia (8). Nel *UK prospective diabetes study* (UKPDS), Il rischio di sviluppare la retinopatia diabetica, nei pazienti con DMT2, è risultato essere correlato sia all'entità e alla durata dell'iperglicemia, che alla presenza di ipertensione (10).

La maggior parte degli affetti da DMT1 sviluppano segni clinici di retinopatia già prima di 20 anni dalla diagnosi. La retinopatia può iniziare a formarsi anni prima dell'effettiva diagnosi di DMT2; ciò è dovuto ad una difficoltà nell'individuare precocemente i soggetti con DMT2 (1). Esistono diversi meccanismi patologici attraverso cui il diabete determina la retinopatia; tra questi è importante citare l'azione dell'aldeide reductasi, enzima iniziale della via dei polioli intracellulari responsabile della conversione del glucosio in sorbitolo. In condizioni fisiologiche la via dei polioli funziona solo in minima parte, poiché la costante di Michaelis-Menten (K_m) dell'aldeide reductasi (ALR2) nei confronti del glucosio è elevata; esso viene quindi preferenzialmente indirizzato verso via glicolitica. In condizioni patologiche d'iperglicemia però la via glicolitica è satura e l'eccessivo glucosio può quindi "entrare" nella via dei polioli. Questa situazione porta a sbilanci metabolici che si traducono in danni tissutali in vari distretti come cristallino, retina, glomeruli renali e nervi periferici, tutti bersagli tipici delle complicanze del diabete. Lo stress osmotico dovuto al progressivo accumulo di sorbitolo è stato proposto come meccanismo alla base dello sviluppo delle complicanze microvascolari nel diabete. In modelli animali, l'eccesso di sorbitolo è stato collegato alla formazione di microaneurismi, ispessimento delle membrane basali e alla perdita di periciti (11). Inoltre, elevate concentrazioni di glucosio possono promuovere la formazione non enzimatica di "prodotti" glicosilati (*advanced glycosylated end products*, AGEs). Un'ulteriore causa di danno è legata allo stress ossidativo. Livelli elevati di glucosio possono stimolare la produzione di radicali liberi e ridurre l'attività degli enzimi cellulari anti-ossidanti come superossido dismutasi (SOD) o glutatione perossidasi (12). Anche i fattori di crescita svolgono un ruolo importante nello

sviluppo della retinopatia diabetica; tra questi è importante citare il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) la cui produzione è aumentata nella retinopatia diabetica in risposta all'ipossia, l'ormone della crescita (GH) e il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) (8).

È possibile dividere questa complicanza in una forma proliferativa e non proliferativa.

La retinopatia non proliferante è caratterizzata da piccole emorragie negli strati medi della retina che clinicamente appaiono come "puntini". Gli essudati duri sono causati da deposizione di lipidi che si verifica tipicamente ai margini delle emorragie. I microaneurismi sono piccole ectasie vascolari che risultano spesso essere il primo segno di retinopatia. L'edema retinico può derivare da perdite microvascolari ed è indicativo di una compromissione della barriera emato-retinica (13).

La retinopatia proliferativa è caratterizzata dalla formazione di nuovi vasi sanguigni sulla superficie retinica che possono rompersi causando un'emorragia vitreale. I noduli cotonosi sono aree microinfartuali dello strato delle fibre nervose retiniche che determinano opacizzazione retinica; sono biancastri, a margini sfrangiati, e possono essere un segno di imminente retinopatia proliferativa. I sintomi associati a queste alterazioni sono: offuscamento della vista, corpi mobili (macchie nere), lampi luminosi nel campo visivo (fotopsie), improvvisa e indolore perdita grave della vista. Se la proliferazione continua, infatti, si può sviluppare cecità a causa dell'emorragia vitreale o del distacco della retina per trazione (13).

Nefropatia diabetica

La malattia renale cronica (CKD) rappresenta una delle principali complicanze del DMT1 e DMT2, colpendo circa un terzo dei pazienti diabetici. La nefropatia diabetica è divenuta la causa primaria di malattia renale allo stadio terminale (ESRD, *end-stage renal disease*) in tutto il mondo (14). Già nelle fasi iniziali, la CKD è associata a un aumento del rischio di morte per malattie cardiovascolari. Infatti, i soggetti affetti da DMT2 e da insufficienza renale da lieve a moderata presentano maggiori probabilità di decesso per CVD rispetto alla progressione verso l'ESRD (15). La CKD è definita come un'alterazione della struttura o della funzione del rene e si caratterizza per la presenza di proteinuria, una riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR), o entrambe, che persiste per oltre 3 mesi (16). L'albuminuria è da tempo riconosciuta come il segno distintivo della nefropatia diabetica, che precede il declino della GFR. Pertanto, ha assunto un ruolo centrale nello screening, nella diagnosi e nella gestione della CKD nei pazienti affetti da diabete.

Tuttavia, sempre più dati dimostrano che la riduzione di GFR può verificarsi anche in soggetti normoalbuminurici, con DMT1 ma soprattutto DMT2. Di conseguenza sia l'albuminuria che la riduzione della GFR sono considerate manifestazioni della nefropatia diabetica (14). Le alterazioni anatomico-patologiche renali includono un aumento dello spessore della membrana basale glomerulare, glomerulosclerosi nodulare (corpi di Kimmelsteil-Wilson), formazione di microaneurismi, fibrosi/necrosi tubulare, e necrosi papillare renale. Non è ancora chiaro se il meccanismo fisiopatologico di base coinvolga tutti o solo alcuni degli aspetti visti nella retinopatia diabetica (via dei polioli, ROS, AGEs) (8). Nello studio VNDS (Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study) (15) è stata valutata la presenza di complicanze croniche in soggetti con DMT2 di nuova diagnosi. Quello che è stato visto è che la CKD (definito da una eGFR <60 mL/min/1.73 m²) è stata riscontrata in circa il 9% dei pazienti e albuminuria in circa il 13% (soprattutto microalbuminuria). In uno studio multicentrico italiano di coorte prospettico chiamato RIACE (Renal Insufficiency And Cardiovascular Events) (18), soggetti affetti da DMT2 sono stati seguiti per 4 anni; quello che si è riscontrato è che la prevalenza di normoalbuminuria è stata del 73,1%, quella di microalbuminuria del 22,2% e quella di macroalbuminuria del 4,7%. Sulla base dei valori di albuminuria e dell'eGFR, il 62,5% dei soggetti non presentava CKD, mentre il 37,5% ne era affetto. La maggior parte dei pazienti con riduzione dell'eGFR (56,6%) era normoalbuminurica, mentre il 30,8% era microalbuminurico e solo il 12,8% macroalbuminurico (18). I risultati hanno evidenziato che l'insufficienza renale non albuminurica è il fenotipo clinico predominante nei pazienti diabetici con eGFR ridotto ed è poco correlata ad uno scarso controllo glicemico e alla presenza di retinopatia diabetica. Inoltre, questa forma di CKD non albuminurica presenta un rischio di malattia cardiovascolare intermedio rispetto alla forma con solo albuminuria e alla forma con albuminuria ed eGFR ridotto. Essa è maggiormente associata ad eventi ischemici coronarici rispetto alla forma albuminurica, mentre si verifica l'opposto per gli eventi cerebrovascolari e periferici. Come per le altre complicanze microvascolari del diabete c'è una forte associazione tra il controllo della glicemia e il rischio di sviluppare la nefropatia diabetica. I pazienti devono essere trattati farmacologicamente cercando di raggiungere un valore di emoglobina glicata nel range della normalità, tenendo conto che un trattamento ipoglicemizzante troppo aggressivo può aumentare il rischio di sviluppare ipoglicemie. Tuttavia, tale trattamento è importante sia nella prevenzione che nel controllo della nefropatia diabetica (8).

Oltre che ad un approccio “aggressivo” nei confronti della riduzione della glicemia, i pazienti con nefropatia diabetica traggono beneficio dall'utilizzo di farmaci antipertensivi, in particolare quelli che agiscono sul sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS). Diversi studi hanno dimostrato che gli ACE inibitori o ARB hanno effetti reno-protettivi indipendentemente dal loro effetto antipertensivo. Probabilmente ciò è dovuto, in parte, alla loro capacità di ridurre la pressione intraglomerulare (8).

Tuttavia, l'uso clinico degli inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone è spesso limitato in caso di un rapido declino della filtrazione glomerulare (eGFR), soprattutto nei pazienti con CKD avanzata. Fortunatamente, nuovi farmaci stanno emergendo con numerosi effetti benefici a livello renale. Tra questi, sono particolarmente significativi gli inibitori del co-trasportatore di sodio-glucosio (SGLT2), che hanno dimostrato non solo di ridurre il rischio di eventi cardiovascolari, ma anche di rallentare la progressione della malattia renale cronica e di migliorare l'outcome clinico nei pazienti con DMT2 (16).

Infine, in studi a breve termine che coinvolgevano pazienti affetti da DMT2 e CKD, il Finerenone, un antagonista non steroideo, selettivo del recettore dei mineralcorticoidi, è stato in grado di ridurre l'albuminuria, rallentare la progressione della CKD e ridurre gli eventi cardiovascolari rispetto al placebo. Tuttavia, i suoi effetti a lungo termine sul piano renale e cardiovascolare rimangono ancora sconosciuti. Numerose ricerche hanno evidenziato un ruolo determinante dell'iperattivazione del recettore dei mineralcorticoidi nelle malattie cardio-renali. Tale iperattivazione favorisce l'infiammazione e la fibrosi, contribuendo alla progressiva disfunzione renale e cardiovascolare (22).

Neuropatia diabetica

La neuropatia diabetica è una condizione caratterizzata dalla presenza di sintomi e/o segni di disfunzione dei nervi periferici, in persone affette da diabete, dopo l'esclusione di altre possibili cause (17). Come per le altre complicanze microvascolari il rischio di sviluppare la neuropatia diabetica è proporzionale all'entità e alla durata dell'iperglicemia. Alcuni individui possiedono caratteristiche genetiche che influenzano la predisposizione allo sviluppo di tali complicanze.

La natura precisa del danno ai nervi periferici causato dall'iperglicemia non è ancora completamente nota, ma probabilmente è legata ai meccanismi di accumulo dei polioli, lesioni da AGEs e stress ossidativo (8). La neuropatia periferica nel diabete può manifestarsi in forme diverse, tra cui neuropatie sensoriali/motorie, focali/multifocali e neuropatie autonome. La polineuropatia cronica sensorimotoria distale simmetrica è la

forma più comune di neuropatia nel paziente diabetico. In genere, i pazienti avvertono bruciore, formicolio (parestesie), dolore "elettrico" (allodinia) e a volte possono avvertire un semplice intorpidimento (anestesia). Nei pazienti che provano dolore, questo dolore può peggiorare durante la notte. In alcuni individui si può evidenziare una riduzione, fino alla scomparsa, del riflesso del tendine d'Achille (8). Alterazioni riscontrate in più esami deputati a determinare la capacità sensitive periferiche presentano una elevata sensibilità nel rilevare la presenza effettiva di neuropatia (8). La neuropatia sensoriale pura è relativamente rara e associata a periodi di scarso controllo glicemico; è caratterizzata da sintomi sensitivi isolati, senza che ci siano segni di neuropatia motoria. I sintomi sono tipicamente più evidenti di notte. Le mononeuropatie hanno generalmente una insorgenza improvvisa e possono coinvolgere qualsiasi nervo, ma più comunemente il nervo mediano, ulnare e radiale. Sono state descritte, in letteratura, anche neuropatie craniche ma sono tendenzialmente rare. L'amiotrofia diabetica può essere una manifestazione della mononeuropatia diabetica ed è caratterizzata da forte dolore, debolezza e atrofia muscolare, di solito dei muscoli della coscia (8). La disfunzione autonoma può manifestarsi con gastroparesi, costipazione, diarrea, anidrosi, disfunzione della vescica, disfunzione erettile, intolleranza all'esercizio fisico, tachicardia a riposo. La disfunzione autonoma cardiovascolare è associata ad un aumento del rischio di ischemia silente e morte cardiaca improvvisa (8). Non esiste un trattamento specifico per la neuropatia diabetica, anche se sono disponibili molti farmaci per il trattamento dei sintomi. L'obiettivo primario della terapia è il controllo dei sintomi e il rallentamento della progressione di malattia attraverso un migliore controllo glicemico (8).

1.4.2. Complicanze macrovascolari

Il meccanismo fisiopatologico centrale delle complicanze macrovascolari è il processo di aterosclerosi, che porta al restringimento delle pareti arteriose di grosso e medio calibro dei distretti vascolari di tutto il corpo. Si ritiene che l'aterosclerosi sia il risultato di una infiammazione cronica e continue lesioni alla parete arteriosa del sistema vascolare periferico o coronarico. In risposta alle lesioni endoteliali e all'infiammazione, i lipidi ossidati delle LDL si accumulano nella parete endoteliale. I monociti si infiltrano nella parete arteriosa e si differenziano in macrofagi, in grado di fagocitare e accumulare i lipidi ossidati, divenendo cellule schiumose. Una volta formate, le cellule schiumose stimolano la proliferazione dei macrofagi e richiamano i linfociti T. I linfociti T, a loro volta, inducono la

proliferazione della muscolatura liscia nelle pareti arteriose e l'accumulo di collagene. Il risultato di questo processo è la formazione di una lesione aterosclerotica ricca di lipidi con un tappo fibroso sovrastante la lesione endoteliale. La rottura di questo tappo fibroso può causare un infarto vascolare acuto (18). Nei soggetti diabetici l'aterosclerosi si sviluppa più precocemente e più rapidamente; presenta inoltre una maggiore estensione, coinvolgendo i vasi più periferici sia a livello della circolazione coronarica che periferica. Le placche aterosclerotiche sono inoltre maggiormente instabili e pertanto maggiormente predisposte alle complicanze acute, quali l'ulcerazione e la formazione del trombo, che portano in ultimo all'occlusione del vaso, con conseguente danno e morte tissutale.

Numerosi studi hanno dimostrato una maggior adesione piastrinica e ipercoagulabilità nei soggetti con DMT2. Ciò è dovuto ad una compromissione della generazione di ossido nitrico, ad un aumento della formazione di radicali liberi e ad un'alterata regolazione del calcio che nelle piastrine promuove l'aggregazione. Livelli elevati dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) possono compromettere la fibrinolisi nei pazienti con diabete. La combinazione di un aumento della coagulabilità e un'alterata fibrinolisi aumenta ulteriormente il rischio di occlusione vascolare ed eventi cardiovascolari (8). Sebbene i precisi meccanismi attraverso i quali il diabete aumenta la probabilità di formazione di placche aterosclerotiche non sono del tutto compresi, la connessione tra le due è profonda. Le malattie cardiovascolari sono infatti la prima causa di morte nelle persone con DMT1 e DMT2 (19). Il DMT2 si manifesta tipicamente in associazione con la sindrome metabolica, caratterizzata dalla presenza contestuale di obesità addominale, ipertensione, dislipidemia; questi ulteriori fattori possono agire promuovendo lo sviluppo di CVD. È importante sottolineare che pur presentandosi spesso in un contesto di co-presenza di molteplici fattori di rischio cardiovascolari, il diabete agisce come fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di malattia ischemica cardiaca, infarto e morte (8). Soggetti con DMT2 hanno un rischio aumentato del 150-400% di sviluppare ictus. Inoltre, il rischio di demenza cerebro-vascolare, di recidivare in seguito ad un precedente ictus e di mortalità legato all'evento ischemico cerebrale è elevato nei pazienti con diabete (8)

La riduzione della pressione arteriosa nei pazienti affetti da DMT2 è stata correlata a una diminuzione degli eventi cardiovascolari e della loro mortalità associata (20). Gli ACE-inibitori o i bloccanti del recettore dell'angiotensina II (ARB) sono stati evidenziati come più efficaci nel ridurre gli eventi cardiovascolari e lo sviluppo di complicanze rispetto ad altri farmaci antipertensivi (20). Numerosi studi hanno anche dimostrato una diminuzione del rischio di malattia macrovascolare nei pazienti diabetici trattati con farmaci che riducono i

livelli di colesterolo LDL, specialmente le statine. Tali farmaci sono efficaci sia nella prevenzione primaria che secondaria delle malattie cardiovascolari (21). In aggiunta alla terapia con statine, anche i fibrati hanno effetti benefici. Essi aumentano i livelli di HDL, abbassano le concentrazioni dei trigliceridi e hanno dimostrato ridurre il rischio di infarto miocardico nei pazienti con diabete (8). Entrambi gli studi CANVAS (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study) ed EMPA-REG OUTCOME (Empagliflozin, Outcome Cardiovascolare e Mortalità nel Diabete di Tipo 2) hanno dimostrato l'efficacia degli inibitori del SGLT-2 nella riduzione del rischio cardiovascolare. Inoltre, sebbene non tutti i membri della classe dei GLP-1 RA abbiano mostrato un beneficio sugli eventi cardiovascolari avversi maggiori (MACE), uno studio di rilevanza, conosciuto come LEADER (Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results)), ha evidenziato benefici cardiovascolari significativi nei pazienti trattati con liraglutide rispetto a quelli trattati con placebo (22).

1.4.3. Advanced glycation end products

Gli AGEs sono considerati uno dei principali fattori coinvolti nel danno multiorgano nei pazienti diabetici; essi sono responsabili dell'invecchiamento precoce dei tessuti e degli organi. Gli AGEs sono prodotti di reazioni non enzimatiche, tra glucosio e le proteine, gli acidi nucleici e i lipidi, presenti nei tessuti. I legami che gli AGEs formano con le molecole durano nel tempo e inducono modifiche sia nella struttura che nella funzione del tessuto/organo (per esempio aumentando la rigidità dei vasi). L'interazione tra l'AGEs e il loro recettore (RAGE) attiva una cascata di segnalazione intracellulare che promuove lo stress ossidativo e stimola il rilascio di citochine proinfiammatorie e prosclerotiche (12,23). L'iperglicemia di lunga durata aumenta il tasso di accumulo di AGEs nell'organismo; si accumulano soprattutto nelle proteine con un'emivita maggiore, come il collagene, la pelle, la cartilagine e il cristallino. Il maggior accumulo di AGEs non è solo dovuto ad una condizione di iperglicemia protratta nel tempo, ma anche ad un maggior stato infiammatorio e stress ossidativo. Inoltre, anche quando si è ristabilito il controllo glicemico, l'alterazione di queste proteine non ritorna alla situazione iniziale, come accade invece per l'emoglobina glicata (12,23). Sebbene l'esposizione a livelli elevati di glucosio sia il principale motore della glicazione, diversi fattori contribuiscono alla variabilità interindividuale di questo processo come la permeabilità dei globuli rossi, lo stress ossidativo, la velocità di glicazione, il turnover proteico e fattori genetici o epigenetici

ancora poco chiari. È noto, inoltre, che le concentrazioni di AGEs aumentano con l'età e che la *skin autofluorescence* (SAF), metodo utilizzato per la misurazione non invasiva degli AGEs tissutali, è direttamente correlata all'età cronologica. Infatti, l'invecchiamento non solo favorisce l'accumulo di AGEs nei tessuti, ma ne rallenta anche la rimozione (24). Diversi studi hanno evidenziato che nei pazienti affetti da diabete mellito, i livelli tissutali elevati di AGEs, valutati tramite biopsie cutanee, sono correlati in modo significativo ad una maggior incidenza di complicanze micro/macrovascolari. La quantità tissutale di AGEs può essere quindi un parametro importante da monitorare per valutare il rischio di complicanze nelle persone con diabete (25).

1.5. Approccio alla terapia farmacologica e non-farmacologica

L' *American Diabetes Association* (ADA) raccomanda un approccio olistico, centrato sulla persona che tenga conto della cronicità della malattia. La terapia farmacologica risulta essere essenziale nel trattamento del paziente diabetico; è tuttavia fondamentale evidenziare come uno stile di vita salutare abbia un impatto preponderante nell'efficacia del trattamento stesso (26). Il DMT2 è spesso associato a obesità, ipertensione e dislipidemia, tutti potenti fattori di rischio per malattie cardiovascolari. Per questo motivo, il DMT2 richiede un approccio multifattoriale, che comprenda *lifestyle modification* (LSM), la terapia antipertensiva e l'abbassamento dei livelli lipidici. L'obiettivo del trattamento è quello di controllare i livelli di glucosio nel sangue per massimizzare la qualità della vita, prevenire le emergenze diabetiche (come la chetoacidosi e il coma iperosmolare non chetoacidotico), ridurre il rischio di complicanze microvascolari e macrovascolari. Questi obiettivi devono venir raggiunti contestualmente minimizzando gli effetti avversi dei trattamenti, come l'ipoglicemia, l'aumento di peso e rischio di eventi cardiovascolari (27).

1.5.1. Terapia non farmacologica

È stato dimostrato che le modifiche dello stile di vita hanno un significativo impatto sul controllo glicemico e sui fattori di rischio cardiovascolari. In particolare, una riduzione del BMI >5% rispetto al valore iniziale per un periodo protratto nel tempo e una educazione all'autogestione del diabete (processo che permette ai pazienti di raggiungere le conoscenze, le abilità pratiche e le capacità comportamentali da applicare nel trattamento

quotidiano della malattia) sono in grado di apportare enormi benefici (28). La perdita di peso, in pazienti sovrappeso/obesi, può essere ottenuta aumentando l'attività fisica quotidiana e introducendo una dieta ipocalorica. È importante mettere in evidenza che queste modifiche dello stile di vita, per essere efficaci, devono essere mantenute nel tempo e quindi calibrate sull'esigenze e le possibilità individuali. I modelli di alimentazione sani sono: la dieta mediterranea, nordica e vegetariana. In generale questi modelli sono caratterizzati dall'utilizzo di cereali integrali, verdure, legumi, semi, noci, frutta e cibi poco processati con un indice glicemico basso. Sono da preferire grassi mono e polinsaturi di origine vegetale, piuttosto che grassi saturi o trans. Ciò può essere ottenuto utilizzando oli vegetali non tropicali non idrogenati (ad esempio, olio di oliva, olio di colza/canola, olio di soia, olio di girasole, olio di lino) e attraverso il consumo di semi, noci, pesce e avocado, limitando invece i grassi provenienti da carni, carni lavorate, burro e olio di palma. L'assunzione totale di grassi saturi dovrebbe essere inferiore al 10% dell'energia totale. Non si raccomandano diete ad alto contenuto proteico (>20% di energia totale) per periodi prolungati; mentre, un apporto inferiore al 10% di energia totale rischia di provocare una carenza proteica. Inoltre, è importante non assumere bevande zuccherate e ridurre drasticamente l'assunzione di alcolici (29).

1.5.2. Farmaci usati per il trattamento del DMT2

- Metformina: è un farmaco estremamente efficace nel ridurre i valori di HbA1c. Nello studio UKPDS, il trattamento con metformina si è dimostrato efficace nel ridurre il rischio di infarto del miocardio del 39% ($p=0.01$) e di complicanze macrovascolari (infarto, morte improvvisa, angina, ictus, malattia vascolare periferica) del 30% ($p=0.02$) rispetto al trattamento convenzionale (dieta) (30). L'FDA ha approvato l'uso della metformina in pazienti con $eGFR \geq 30$ mL/min/1,73 m². Gli effetti avversi principali sono a carico del tratto gastro-intestinale. La via di somministrazione è orale (26,31).
- Sulfoniluree di seconda generazione: riducono efficacemente l'HbA1c. Non sono stati riscontrati effetti benefici a livello del sistema cardiovascolare e renale. Come effetti avversi possono causare aumento di peso e ipoglicemie. La via di somministrazione è orale (26,31).
- Inibitori dell'alfa-glucosidasi: possono migliorare il controllo glicemico riducendo le escursioni glicemiche postprandiali (26,31).

- Tiazolidinedioni: riducono efficacemente l'HbA1c. Come effetti collaterali i pazienti possono sviluppare un aumento di peso, ritenzione idrica (edema) e fratture ossee (31). Pioglitazone e rosiglitazone possono aumentare il rischio di insufficienza cardiaca congestizia (31). Nello studio PROactive di outcome cardiovascolare, condotto in soggetti con DMT2 di età inferiore a 75 anni e preesistente malattia macrovascolare, il trattamento con pioglitazone era associato ad una significativa riduzione (-16%; $p=0.027$) dell'endpoint composito secondario, costituito da mortalità per tutte le cause, infarto miocardico non fatale e ictus in un follow-up medio di 34,5 mesi (32). Inoltre, questa classe di farmaci sembra essere efficace nei confronti della MASH. La via di somministrazione è orale (26,31).
- Inibitori della dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4): hanno un effetto intermedio nel ridurre l'HbA1c. Non sono stati riscontrati effetti benefici sul profilo cardiovascolare e renale. È importante interrompere l'uso di questi farmaci nel caso di pancreatite. La via di somministrazione è orale (26,31).
- Inibitori di SGLT-2: sono abbastanza efficaci nel ridurre l'HbA1c, hanno effetti benefici nei confronti del sistema cardiovascolare, renale, nella riduzione del peso e della pressione arteriosa (26,31). Nello studio EMPA-REG (33), empagliflozin si è dimostrato superiore al placebo nel ridurre l'incidenza dell'outcome primario composito (MACE: mortalità cardiovascolare, infarto miocardico non fatale e ictus non fatale) (-14%, $p=0.04$), oltre che superiore al placebo nell'outcome morte per tutte le cause (-32%, $p<0.001$) e ospedalizzazione per scompenso cardiaco (-35%, $p=0.002$). Nello studio CANVAS (34), che ha coinvolto 10142 pazienti con DMT2 ed elevato rischio cardiovascolare, canagliflozin si è dimostrato superiore al placebo nel ridurre l'incidenza di un endpoint composito comprendente morte cardiovascolare, infarto miocardico non fatale, ictus non fatale del 14% ($p=0.02$). Inoltre, il trattamento con canagliflozin è risultato associato ad un rischio ridotto di ospedalizzazione per scompenso cardiaco del 33% (95% IC, 0.52–0.87). Sono associati ad un aumento del rischio di sviluppare DKA (7) e infezioni del tratto genito-urinario. La via di somministrazione è orale (26, 31).
- Analoghi del peptide -1 glucagone-simile (GLP-1RA): sono estremamente efficaci nel ridurre l'HbA1c e provocano un'importante perdita di peso. Gli studi condotti con i GLP-1RA sui pazienti diabetici hanno mostrato risultati eterogenei per quanto riguarda la riduzione del rischio cardiovascolare. Gli effetti collaterali sono principalmente a carico del tratto gastro-intestinale e generalmente sono

temporanei. È importante sospenderli nel caso in cui il paziente sviluppi una pancreatite, colecistite o colelitiasi. La via di somministrazione può essere sia orale che iniettiva (26,31).

- Tirzepatide (Dual GIP/GLP1 receptor agonist): è estremamente efficace nel ridurre HbA1c e il peso corporeo. Gli effetti benefici sul sistema cardiovascolare e renale sono ancora da determinare. Gli effetti collaterali sono principalmente a carico del TGI e generalmente sono temporanei. È importante sospendere l'utilizzo del farmaco nel caso in cui il paziente sviluppi una pancreatite, colecistite o colelitiasi. La via di somministrazione è per via iniettiva (26,31).
- L'insulina umana (NPH) e analoghi: l'insulina migliora efficacemente la glicemia nelle persone con un controllo inadeguato dell'HbA1c in seguito a trattamenti farmacologici per via orale. L'utilizzo è però associato ad un aumento di peso e a un maggior rischio di eventi ipoglicemici. L'aggiunta di metformina all'insulina può ridurre i livelli di HbA1c rispetto alla sola insulina, con un minore effetto sull'aumento di peso (26,31).

1.5.3. Monoterapia e terapia orale combinata

La farmacoterapia dovrebbe essere iniziata nel momento in cui viene fatta diagnosi DMT2, a meno che non vi siano controindicazioni. I farmaci considerati avere un'altissima efficacia nel ridurre la concentrazione di glucosio ematico sono: i GLP-1 RA (dulaglutide e semaglutide), dual-agonist GIP e GLP-1 RA (tirzepatide), insulina, terapia orale combinata, e terapia iniettabile combinata. Negli individui in cui l'HbA1c ha un valore $\geq 1.5\%$ il target glicemico è necessario utilizzare un agente ipoglicemizzante più potente per raggiungere il livello target (26).

La metformina è un farmaco efficace, sicuro, e poco costoso che riduce il rischio di eventi cardiovascolari e di morte. È disponibile in forma a rilascio immediato con somministrazione biquotidiana o una forma a rilascio prolungato con somministrazione una volta al giorno. La metformina è spesso utilizzata come terapia di prima linea, riduce efficacemente l'HbA1c, il peso e offre una protezione moderata contro le morbidità e la mortalità per cause cardiovascolari. I principali effetti collaterali della metformina sono disturbi a livello gastrointestinale. Il farmaco viene eliminato per via renale e i livelli circolanti molto elevati (ad esempio, a seguito di sovradosaggio o insufficienza renale acuta) sono stati associati all'acidosi lattica. Tuttavia, l'insorgenza di questa complicanza è

ormai nota essere rara e la metformina può essere utilizzata con sicurezza anche in soggetti con ridotto filtrato glomerulare (eGFR); l'FDA ha approvato l'uso della metformina in pazienti con eGFR ≥ 30 mL/min/1,73 m². Uno studio randomizzato ha confermato che l'uso di metformina può essere associata ad una carenza di vitamina B12 e al peggioramento dei sintomi associati alla neuropatia, ciò suggerisce l'esecuzione di test periodici di dosaggio della vitamina B12 in pazienti che ne fanno uso (26).

Poiché il DMT2 è una malattia progressiva, in molti individui il raggiungimento e il mantenimento degli obiettivi glicemici spesso richiede una terapia combinata; a questo proposito le raccomandazioni medico-scientifiche prevedono l'aggiunta graduale di farmaci alla metformina per un miglior controllo glicemico rispetto ai livelli target. Tuttavia, esistono recenti dati scientifici a sostegno di una terapia combinata iniziale atta a favorire un più rapido raggiungimento degli obiettivi glicemici, associati ad un periodo più lungo di stabilizzazione (26). Lo studio VERIFY (*vildagliptin efficacy in combination with metformin for early treatment of type 2 diabetes*) (35) ha dimostrato che la terapia combinata iniziale ha un'efficacia superiore alla terapia sequenziale. Nello studio, infatti, i partecipanti che hanno ricevuto la combinazione iniziale di metformina e dell'inibitore del DPP-4, vildagliptin, hanno avuto un declino più lento del controllo glicemico rispetto a quelli a cui veniva somministrata solo la metformina e successivamente il vildagliptin, aggiunto in sequenza al protocollo terapeutico. Questi risultati suggeriscono che un trattamento precoce più intensivo dovrebbe essere preso in considerazione.

La scelta del farmaco da aggiungere alla terapia iniziale si basa sulle caratteristiche cliniche dell'individuo e sulle sue preferenze. Tra le caratteristiche cliniche importanti vi sono la presenza di accertata *atherosclerotic cardiovascular disease* (ASCVD) o di indicatori di alto rischio di ASCVD, *heart failure* (HF), CKD, obesità, MASLD, MASH. Inoltre, è importante tener conto dei possibili effetti avversi ai farmaci, la tollerabilità ad essi e il costo. Per le persone con DMT2 e ASCVD o indicatori di alto rischio di ASCVD, HF o CKD, un inibitore di SGLT2 o GLP-1 RA con dimostrato beneficio cardiovascolare e renale è raccomandato come parte del regime di riduzione della glicemia, indipendentemente dal valore dell'HbA1c e dall'uso di metformina. Dati emergenti suggeriscono che la terapia di combinazione, con un inibitore SGLT2 e un GLP-1 RA, è portatrice di significativi benefici complementari a livello del sistema cardiovascolare e renale (26). Nel paziente diabetico sovrappeso/obeso il regime di trattamento dovrebbe prevedere una riduzione del peso corporeo attraverso farmaci con una provata efficacia in tale senso, come un GLP-1 RA o tirzepatide (26).

In tutti i casi, i regimi di trattamento devono essere continuamente rivisti per verificarne l'efficacia e i possibili effetti collaterali.

1.5.4. Terapia iniettiva

Nelle persone con diabete di lunga durata, l'aggiunta di insulina basale ai regimi di agenti orali è un approccio consolidato ed efficace.

In recenti studi comparativi, che hanno confrontato l'aggiunta di un GLP-1 RA iniettabile rispetto a quello dell'insulina, in casi che necessitavano di un'ulteriore riduzione della glicemia, l'efficacia del GLP-1 RA iniettabile è risultata simile o superiore a quella dell'insulina basale. Inoltre, i GLP-1 RA inoltre non hanno come effetto collaterale l'ipoglicemia ed hanno effetti benefici sul peso corporeo (26). Nei casi in cui sia necessario l'utilizzo di farmaci iniettivi per ridurre ulteriormente la glicemia è importante quindi prescrivere in primis i GLP-1RA o GIP/GLP-1RA, se comunque il target glicemico non viene raggiunto, si aggiunge alla terapia l'insulina basale. Se anche in questo caso l'HbA1c rimane sopra il valore desiderato, si associa ulteriormente l'insulina ai pasti (26).

Insulina basale e basal-bolus

L'insulina ha il vantaggio di essere efficace dove altri agenti farmacologici non lo sono e dovrebbe essere considerata come parte di qualsiasi regime combinato quando l'iperglicemia è grave, soprattutto se è presente uno stato catabolico o chetosi. Risolta la tossicità da glucosio, si può semplificare il regime o addirittura passare ad agenti non insulinici (26). L'insulina basale da sola è il trattamento insulinico iniziale più conveniente. Le dosi iniziali possono essere stimate in base al peso corporeo (0,1-0,2 unità/kg/die) e al grado di iperglicemia, con una titolazione personalizzata nell'arco di giorni o settimane. L'azione principale dell'insulina è quella di frenare la produzione epatica di glucosio e di limitare l'iperglicemia durante la notte e tra i pasti. Il controllo dei livelli della glicemia a digiuno può essere ottenuto con l'insulina umana NPH o analoghi dell'insulina a lunga durata d'azione. L'intensificazione del trattamento insulinico può essere effettuata aggiungendo dosi di insulina prandiale all'insulina basale (26).

Terapia iniettiva combinata

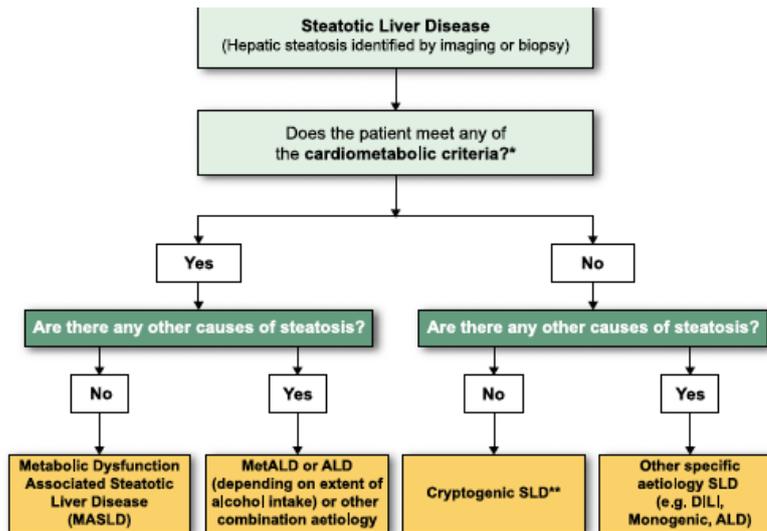
Per migliorare il controllo della glicemia post-prandiale, ridurre al minimo il rischio di ipoglicemie e di aumento di peso associati alla terapia insulinica, si può decidere di

utilizzare un GLP-1 RA o tirzepatide in aggiunta all'insulina basale, prima di passare alla terapia basal-bolus. Quando si inizia una terapia combinata iniettabile, la terapia con meformina deve essere mantenuta, mentre le sulfoniluree e gli inibitori della DPP-4 vengono sospesi. Nei soggetti con un controllo non ottimale della glicemia, soprattutto se necessitano di dosi elevate di insulina, l'uso aggiuntivo di un di un tiazolidinedione o di un inibitore del SGLT2 può contribuire a migliorare il controllo della glicemia e a ridurre la quantità di insulina necessaria. Quando le persone con DMT2 invecchiano è importante semplificare i complessi regimi insulinici a causa del declino delle capacità di autogestione (26).

2. MASLD

2.1. Definizione

La diagnosi di MASLD (*metabolic dysfunction-associated liver disease*), precedentemente nota come NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*), è stata per anni una diagnosi di esclusione: una malattia cronica del fegato caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso epatico senza un'altra causa evidente, come il consumo eccessivo di alcol (> 210/140 g di etanolo/settimana rispettivamente per uomini e donne), farmaci (ad esempio corticosteroidi, tamoxifene), nutrizione parenterale totale, malattie virali e genetiche, ecc. (36). Recentemente, tuttavia, gli esperti hanno optato per una nomenclatura più accurata basata sulla positività di alcuni criteri diagnostici. In presenza di steatosi epatica, il riscontro di qualsiasi fattore di rischio cardiometabolico è in grado di conferire la diagnosi di MASLD se non ci sono altre possibili cause di steatosi epatica. Se vengono identificati ulteriori fattori che potrebbero causare steatosi, allora l'eziologia potrebbe essere combinata. Nel caso dell'alcol si parla di *metabolic and alcohol related/associated liver disease* (MetALD). In assenza di fattori di rischio cardiometabolici evidenti, devono essere escluse altre eziologie e, se nessuna viene identificata, la steatosi epatica viene definita criptogenica (37).



*Cardiometabolic criteria

Adult Criteria	Paediatric Criteria
<p>At least 1 out of 5:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> BMI ≥ 25 kg/m² [23 Asia] OR WC > 94 cm (M) 80 cm (F) OR ethnicity adjusted equivalent <input type="checkbox"/> Fasting serum glucose $\geq 5,6$ mmol/L [100 mg/dL] OR 2-hour post-load glucose levels $\geq 7,8$ mmol/L [≥ 140 mg/dL] OR HbA1c $\geq 5,7\%$ [39 mmol/L] OR type 2 diabetes OR treatment for type 2 diabetes <input type="checkbox"/> Blood pressure $\geq 130/85$ mmHg OR specific antihypertensive drug treatment <input type="checkbox"/> Plasma triglycerides $\geq 1,70$ mmol/L [150 mg/dL] OR lipid lowering treatment <input type="checkbox"/> Plasma HDL-cholesterol $\leq 1,0$ mmol/L [40 mg/dL] (M) and $\leq 1,3$ mmol/L [50 mg/dL] (F) OR lipid lowering treatment 	<p>At least 1 out of 5:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> BMI $\geq 85^{\text{th}}$ percentile for age/sex [BMI z score $\geq +1$] OR WC $> 95^{\text{th}}$ percentile OR ethnicity adjusted equivalent <input type="checkbox"/> Fasting serum glucose $\geq 5,6$ mmol/L [≥ 100 mg/dL] OR serum glucose $\geq 11,1$ mmol/L [≥ 200 mg/dL] OR 2-hour post-load glucose levels $\geq 7,8$ mmol [140 mg/dL] OR HbA1c $\geq 5,7\%$ [39 mmol/L] OR already diagnosed/treated type 2 diabetes OR treatment for type 2 diabetes <input type="checkbox"/> Blood pressure age $< 13y$, BP $\geq 95^{\text{th}}$ percentile OR $\geq 130/80$ mmHg (whichever is lower); age $\geq 13y$, 130/85 mmHg OR specific antihypertensive drug treatment <input type="checkbox"/> Plasma triglycerides age $< 10y$, $\geq 1,15$ mmol/L [≥ 100 mg/dL]; age $\geq 10y$, $\geq 1,70$ mmol/L [≥ 150 mg/dL] OR lipid lowering treatment <input type="checkbox"/> Plasma HDL-cholesterol $\leq 1,0$ mmol/L [≤ 40 mg/dL] OR lipid lowering treatment

Figura 1: Criteri diagnostici per la MASLD (Figura tratta da Rinella et al. 2023)

Quindi per definizione la MASLD coesiste contestualmente in un quadro di disturbi metabolici quali insulino-resistenza, DMT2 e sovrappeso o obesità (36). La MASLD è un indicatore di insulino-resistenza e si caratterizza per un accumulo di grasso ectopico principalmente nel fegato, ma anche a livello viscerale, in regioni intramuscolari, perivascolari e pericardica. Ciò spiegherebbe l'aumentato rischio cardiovascolare associato (38). Pertanto, essa può essere considerata come la manifestazione epatica della sindrome metabolica. Inoltre, è un importante fattore di rischio per il DMT2 ed è comunemente riscontrata come comorbidità nei pazienti con DMT2 (39).

2.2. Fattori di rischio

Il fegato costituisce un organo chiave del metabolismo sistemico e glucidico e contribuisce in modo sostanziale allo sviluppo dell'insulino-resistenza e del DMT2. I meccanismi alla base di questi processi non sono del tutto noti, ma coinvolgono l'accumulo di grasso epatico, alterazioni del metabolismo energetico e segnali infiammatori derivanti da vari tipi cellulari, comprese quelle del sistema ematopoietico. A livello fisiopatologico, il DMT2 e la MASLD hanno in comune l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia portale/sistemica compensatoria. In aggiunta a ciò, la presenza dell'una non solo aumenta il rischio di sviluppare l'altra patologia, ma ne influenza inoltre il decorso (40). In un contesto di insulino-resistenza epatica e di dieta squilibrata, entrambe favorevoli allo sviluppo di steatosi epatica, aumenta anche l'incidenza di DMT2. Il DMT2 può esacerbare la MASLD promuovendo la progressione verso la *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis* (MASH) e la fibrosi, mentre la MASLD provoca un peggioramento del decorso naturale delle complicanze diabetiche (sia micro che macrovascolari) (36). L'insulino-resistenza negli adipociti determina la lipolisi con eccessivo rilascio di acidi grassi liberi (FFA, *free fatty acids*) e glicerolo nel sangue. Ciò, attraverso un alterato assorbimento dei lipidi da parte di tessuti come fegato, muscolo e pancreas, causa lipotossicità e compromette la secrezione di insulina. I FFA attivano, nelle cellule stellate epatiche, una risposta fibrogenica che promuove la progressione verso la MASH e la cirrosi. Inoltre, l'iperinsulinemia cronica derivante dall'insulino-resistenza sistemica, favorisce da un lato l'accumulo di grasso epatico, determinante l'insulino-resistenza epatica, e dall'altro l'esportazione di lipoproteine ricche di trigliceridi, che sono alla base della dislipidemia aterogena (caratterizzata dalla combinazione di bassi livelli di HDL e ipertrigliceridemia, responsabili nell'aumentato rischio cardiovascolare riscontrabile sia nell'obesità che nel DMT2). Le lipotossine, le citochine, le epatochine, le adipochine e la disfunzione mitocondriale svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi sia della MASLD che del DMT2. Il tessuto adiposo e il tessuto epatico, alterati, rilasciano rispettivamente adipochine ed epatochine che attivano vie pro-infiammatorie nel fegato, nel muscolo e nel pancreas (38). In un ampio studio multicentrico italiano (41), è stato riscontrato che quasi tre pazienti ambulatoriali su quattro con DMT2 presentavano elevati valori di *hepatic steatosis index* (HSI), suggerendo la presenza di steatosi epatica e quindi di essere affetti da MASLD. Quello che si è osservato è che l'HSI era direttamente correlato ad una maggiore prevalenza di CKD e macroangiopatia (definita come precedente CVD, aterosclerosi

cerebrale, coronarica e periferica); Identificando così i soggetti con DMT2 con un “carico di complicanze” più elevato. Questo risultato supporta il concetto per il quale i pazienti con steatosi epatica sono a più alto rischio di insorgenza precoce del diabete e dello sviluppo delle sue complicanze. Numerosi studi hanno investigato la relazione tra MASLD e fattori di rischio metabolici. Tra i molteplici fattori analizzati, l'insulino-resistenza (misurata mediante HOMA-IR) è stata individuata come il più forte predittore di MASLD, seguita dai livelli di proteina C-reattiva (42).

Nel KSHS (*Kangbuk Samsung health study*) (43), in 9.162 partecipanti, non affetti da diabete, è stata analizzata la relazione tra il rapporto di apolipoproteina A1/B e la MASLD. Gli individui nel quartile più basso del valore del rapporto ApoA1/B hanno mostrato un rischio 3,5 volte superiore di sviluppare la MASLD rispetto al gruppo del quartile più alto (43). Ulteriori studi, in cui è stata analizzata la relazione che c'è tra i livelli sierici di adipochine e il futuro sviluppo di MASLD, hanno evidenziato che alti livelli basali di fattore di TNF α e *adipocyte-specific fatty acid-binding protein* (FABP) aumentano il rischio di sviluppo di MASLD nei quattro anni successivi (44,45). Per quanto riguarda le abitudini di vita e il rischio di MASLD, tra i 120.000 partecipanti del KSHS (46), coloro che svolgevano attività fisica più di cinque volte alla settimana mostravano un rischio di sviluppo di steatosi inferiore del 14% rispetto a coloro che non svolgevano alcuna attività fisica. Gli individui che aumentavano la quantità di esercizio fisico nel corso dei 5 anni successivi mostravano un'aumentata probabilità di scomparsa del grasso epatico, superiore del 13% rispetto a quelli che non aumentavano o addirittura diminuivano le ore di esercizio fisico settimanali. In uno studio successivo (47), è emerso che i valori normali degli enzimi epatici offrono un valore diagnostico e prognostico limitato nella valutazione della MASLD, poiché oltre l'86% dei pazienti analizzati con MASLD presentava enzimi epatici nella norma. Inoltre, la gravità dell'istologia della MASLD era correlata a un maggiore spessore dell'intima carotidea e a una maggiore disfunzione endoteliale.

La MASLD è sempre più riconosciuta non solo come un marcatore di rischio per le CVD, ma anche come un fattore che può avere un ruolo attivo nella loro patogenesi. In conclusione, la MASLD è associata a un'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da DMT2. In particolare, questa associazione sembra essere indipendente da un ampio spettro di fattori di rischio. Ciò supporta l'ipotesi che il riscontro della MASLD nei pazienti affetti da DMT2 possa essere d'aiuto nella previsione del rischio cardiovascolare del paziente e quindi avere importanti implicazioni terapeutiche (48)

2.3. Epidemiologia

La prevalenza mondiale della MASLD è stimata essere di 1 miliardo di persone, essa è la causa più diffusa di malattia epatica cronica negli Stati Uniti, colpendo da 80 a 100 milioni di individui, di cui il 25% affetti anche da MASH (39).

Nei Paesi occidentali, la MASLD colpisce circa un quarto della popolazione. La sua prevalenza è in aumento, al punto da poterla paragonare ad una vera e propria epidemia, al pari di quanto è accaduto per il diabete e l'obesità. Tuttavia, esistono variazioni sulla stima della prevalenza della MASLD sia per differenze biologiche-etniche tra le varie popolazioni, sia a causa delle differenze nei test diagnostici utilizzati. Nel *Dallas Heart Study* (49), costituito da 2.287 partecipanti (un campione multietnico basato sulla popolazione), in cui il contenuto di trigliceridi epatici veniva misurato mediante la risonanza magnetica nucleare protonica, è stata riscontrata una variazione significativa nella prevalenza della steatosi epatica in base al sesso (42% e 24% negli uomini e nelle donne caucasiche, rispettivamente) e all'etnia (45%, 33% e 24% negli ispanici, nei bianchi e nei neri, rispettivamente).

La MASLD è fonte di complicanze epatiche come la MASH, cirrosi e HCC (*hepatocellular carcinoma*). La MASH è diventata la principale causa di trapianto di fegato negli Stati Uniti, ciò è dovuto alla sua crescente prevalenza, all'esistenza di terapie altamente efficaci nell'eradicazione dell'epatite C e la presenza della vaccinazione contro HBV. Essa è anche associata ad un'elevata morbilità e mortalità extra-epatica, soprattutto per cause cardiovascolari. Infatti, la maggior parte dei decessi tra i pazienti affetti da MASLD è attribuibile a malattie cardiovascolari (36). Nei prossimi 20 anni, è stato stimato che la MASH associata al DMT2 sarà responsabile di 65.000 trapianti, 1,37 milioni di morti per cause cardiovascolari e 812.000 morti per cause epatiche (50).

In uno studio prospettico (51) è stata valutata, tramite risonanza magnetica, la prevalenza di MASLD, MASH e cirrosi, in 530 pazienti affetti da DMT2, che è risultata rispettivamente del 69,6%, 13,6% e 6,8%. Tra i pazienti con coesistenti DMT2 e obesità invece la prevalenza di MASLD, MASH e cirrosi è stata rispettivamente del 77,8%, 15,9% e 9,0%.

2.4. Evoluzione

La MASLD può progredire dalla semplice steatosi alla MASH, alla fibrosi avanzata, alla cirrosi e infine al carcinoma epatocellulare.

Non è ancora noto perché la maggior parte dei pazienti con MASLD (circa il 90%) rimanga allo stadio di semplice steatosi, mentre altri progrediscono verso una malattia più grave, sviluppando un'inflammatione epatica con danno epatocitario che può progredire verso fibrosi e cirrosi, o addirittura HCC (36). Pertanto, è estremamente importante determinare precocemente lo stadio della malattia. La cirrosi è caratterizzata da una diffusa rigenerazione nodulare circondata da densi setti fibrotici con conseguente alterazione parenchimale e pronunciata distorsione dell'architettura vascolare epatica. Questa distorsione provoca un aumento della resistenza al flusso sanguigno portale, portando così all'ipertensione portale e alla disfunzione epatica. La cirrosi è notoriamente asintomatica fino a quando non si verifica uno scompenso clinico con ad esempio ascite, sepsi, emorragia dalle varici, encefalopatia o ittero. Quando attraverso la diagnostica per immagini si evidenzia un fegato irregolare e nodulare associato ad un'alterata funzione sintetica epatica è possibile fare diagnosi di cirrosi (36,52)

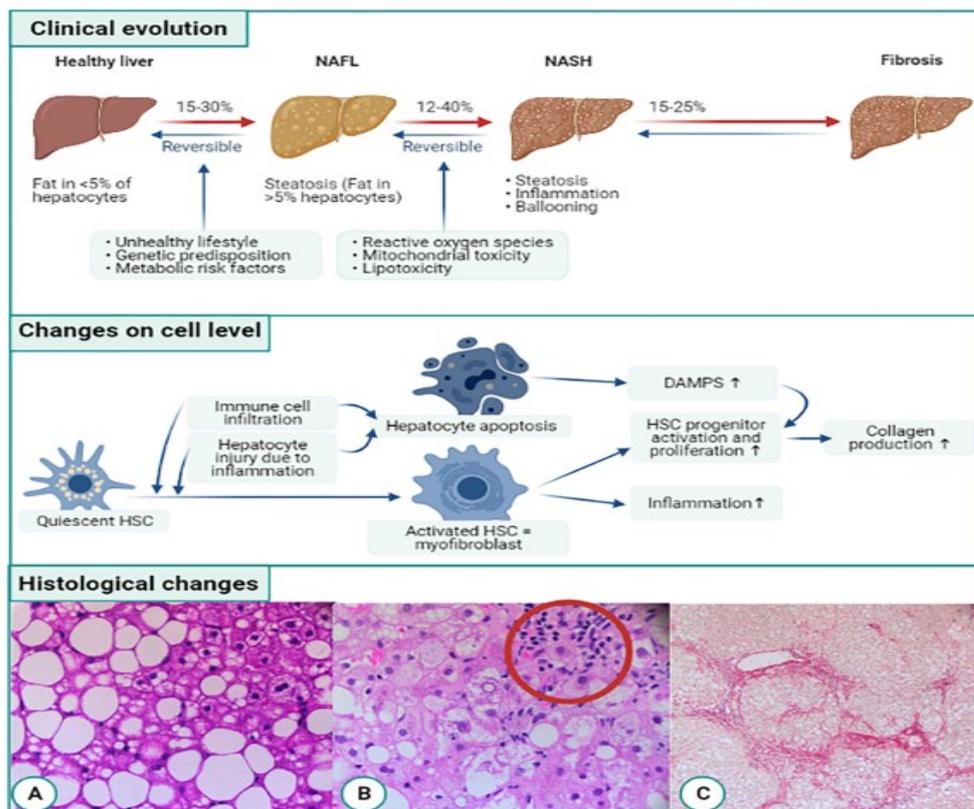


Figura 2: Evoluzione clinica e istologica della MASLD (Figura tratta da Heyens et al. 2021)

2.5. Diagnosi

A causa della mancanza di linee guida per lo screening della MASLD/MASH, che è asintomatica nelle sue fasi iniziali, non è raro che ai pazienti affetti da DMT2 venga diagnosticata tardivamente la MASH, la cirrosi o addirittura un HCC. La steatosi è stata storicamente definita come una quantità anormale di tessuto adiposo epatico, superiore al 5% del peso totale del fegato; oppure, all'istologia epatica, come un numero di epatociti epatociti steatotici superiori al 5%. Ciò significa che per fare una diagnosi è necessario effettuare una biopsia e una valutazione istologica. Tuttavia, nella pratica clinica la presenza di steatosi epatica può essere rilevata con ragionevole accuratezza mediante degli score/indici e/o esami di imaging. La MASH è definita dalla coesistenza di tre componenti all'esame istologico: la steatosi, l'infiammazione dei lobuli epatici e il ballooning degli epatociti, quest'ultimo è la manifestazione tipica di danno epatocitario. Ciò significa che la diagnosi di MASH richiede una biopsia epatica. La stadiazione della fibrosi epatica si basa principalmente sull'istologia. Tuttavia, esistono punteggi clinico-biologici o tecniche di imaging che permettono di escludere la fibrosi avanzata utilizzando cut-off appropriati e corretti per età (36,52).

2.5.1. Non-invasive tests (NITs)

Sono state sviluppate diverse formule che utilizzano biomarcatori ematici per l'identificazione di pazienti ad alto rischio di MASLD e MASH/fibrosi in stadio avanzato (\geq F2). In ambito clinico, l'uso di NITs permette di individuare i pazienti con steatosi e MASH/fibrosi avanzata e fornire informazioni prognostiche. Sebbene i NITs siano clinicamente utili, le previsioni, basate sui biomarcatori ematici, possono essere influenzate da condizioni epatiche ed extraepatiche. Tra i test clinico-biologici non invasivi utilizzati per l'identificazione di pazienti ad alto rischio di steatosi è importante citare il FLI (fatty liver index) e l'HSI (hepatic steatosis index). Essi consentono di diagnosticare la steatosi con buona accuratezza, ma non sono in grado di fornire una valutazione quantitativa del grasso epatico. L'HSI è stato proposto come semplice strumento per lo screening della MASLD nella popolazione generale. Questo indice è calcolato in base al sesso, al BMI, livelli sierici di AST/ALT e la presenza o meno di diabete.

In uno studio condotto in Italia (32) su 78.895 pazienti affetti da DMT2, nel periodo compreso tra il 2016 e il 2017, è stata valutata la prevalenza di steatosi epatica. Quello che

è stato riscontrato che HSI > 36 era presente in 60.233 soggetti (76,3%), mentre solo 2.117 (2,7%) presentavano un HSI basso; pertanto, quasi tre pazienti su quattro con DMT2 mostravano valori elevati di HSI, suggerendo la presenza di steatosi epatica e quindi di essere affetti da MASLD. Sebbene l'HSI abbia un valore predittivo positivo moderato per la presenza di steatosi, i pazienti affetti da DMT2 con un HSI elevato (> 36) avevano una probabilità 3,5 volte superiore di avere una steatosi epatica rilevata ecograficamente, rispetto ai pazienti con HSI ridotto. Ciò conferma che l'HSI è uno strumento di screening semplice e utilizzabile nei pazienti con DMT2, più sensibile rispetto all'utilizzo del solo BMI o dei valori di AST/ALT.

Tra i test clinico-biologici non invasivi per l'identificazione di pazienti ad alto rischio di fibrosi avanzata è importante citare NAFLD fibrosis score (NFS) e fibrosis-4 index (FIB-4). Questi score si basano su valori biochimici prontamente disponibili e caratteristiche cliniche del paziente. Un'importante limitazione di questi test è che la loro accuratezza è ridotta nei pazienti di età inferiore ai 35 anni e di età superiore ai 65 anni (36). Il FIB-4 è raccomandato come NIT preferenziale, grazie alla sua adeguata capacità predittiva negativa in contesti a bassa prevalenza, infatti un valore di FIB-4 < 1,3 permette di escludere una fibrosi avanzata o addirittura cirrosi (53). FIB-4 sembra inoltre, essere più efficace nel rilevare fibrosi negli individui affetti da DMT2. L'NFS e la FIB-4 tendono ad essere meno accurati di test più "complessi", che si basano su misure dirette della fibrogenesi o della fibrolisi (36).

I NITs sono test molto utili per escludere la steatosi o la fibrosi avanzata, ma purtroppo non sono sufficientemente predittivi se utilizzati da soli. Inoltre, non sono in grado di riflettere accuratamente i cambiamenti della steatosi/fibrosi in seguito a terapie mirate, limitando quindi il loro utilizzo durante il monitoraggio della malattia. In caso di punteggi intermedi o elevati, sono quindi necessari ulteriori esami come l'ecocolordoppler e l'elastasonografia transiente monodimensionale. La combinazione di score basati su esami ematochimici, caratteristiche cliniche del paziente e l'impiego dell'ecocolordoppler/elastasonografia migliora l'accuratezza diagnostica, consentendo di utilizzarli efficacemente come test di screening, di conferma e di valutazione dell'evoluzione nel tempo della condizione (36).

2.5.2. Tecniche di imaging

Ecocolordoppler

L'ecocolordoppler è la modalità di imaging di prima linea più frequentemente utilizzata per individuare la presenza di MASLD. Permette di valutare la superficie del fegato, il parenchima e la vascolarizzazione, in aggiunta agli altri organi addominali, in particolare la milza e la vena splenica. Tuttavia, non è abbastanza sensibile nell'individuare la steatosi lieve e non è sufficientemente preciso nella quantificazione della steatosi o nella valutazione dello stadio della fibrosi (consente solo di rilevare i segni di cirrosi e ipertensione portale) (36).

Elastosonografia transiente monodimensionale (1-D)

La relazione diretta esistente tra entità di fibrosi e rigidità del tessuto epatico rende possibile l'utilizzo di diverse tecniche elastosonografiche, delle quali la più nota è l'elastosonografia transiente monodimensionale (1-D) commercializzata con il nome di FibroScan dalla compagnia francese EchoSens. Il FibroScan è quindi un esame importante per individuare precocemente pazienti con un grado di fibrosi avanzata ed è utile nel monitoraggio della progressione/regressione della patologia.

L'elastosonografia transiente monodimensionale richiede una sonda capace di trasmettere nel mezzo onde trasversali a bassa frequenza (50Hz), di breve durata (ms), e contestualmente un trasduttore ultrasonico che emetta onde ad alta frequenza. L'onda trasversale a bassa frequenza genera spostamenti e deformazioni dell'organo investigato che sono misurati dall'eco indotto sull'onde ad alta frequenza.

Il modello prevede nello specifico tre tipologie di sonda:

- Sonda per bambini (S) funzionante a 5Mhz. Viene utilizzata tale frequenza in quanto la profondità richiesta è minore rispetto ad un adulto medio, solitamente dai 15 ai 50 mm.
- Sonda standard (M) funzionante a 3.5Mhz. La profondità richiesta nell'adulto medio varia dai 25 ai 65 mm.

-Sonda per pazienti sovrappeso (XL) funzionante a 2.5Mhz. La profondità richiesta in questo caso varia dai 35 ai 75 mm.

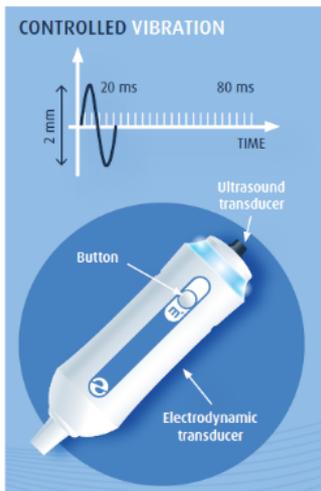


Figura 3: Sonda utilizzata nel FibroScan modello 502 (tratto da (54))

In sede d'esame, l'estremità della sonda ricoperta di gel viene posizionata sulla cute a livello degli spazi intercostali in corrispondenza del lobo destro del fegato. Durante l'operazione il paziente pone il braccio in massima abduzione, dietro il capo, per massimizzare l'esposizione della zona di interesse. Viene quindi individuata un'area del parenchima con profondità sufficientemente elevata, tipicamente alcuni centimetri. Il sistema rifiuta automaticamente le stime in cui non è possibile estrapolare un valore della velocità di propagazione dell'onda trasversale. La propagazione dell'onda trasversale è riconoscibile dai profili caratterizzati da fase opposta, identificabili nell'alternanza tra deformazione +5% e -5% rispetto alla situazione a riposo. La velocità di propagazione è calcolata sulla base del tempo necessario all'onda per attraversare in profondità la porzione cilindrica di tessuto in esame, tipicamente di diametro inferiore a 1cm. Ne consegue che maggiore è la pendenza del profilo dell'onda, misurata dal modulo del coefficiente angolare della retta tratteggiata (Figura 4), maggiore sarà la sua velocità. Più l'onda trasversale si propaga velocemente nel mezzo maggiore sarà la rigidità (espressa in kPa) misurata con il modulo di Young (55).

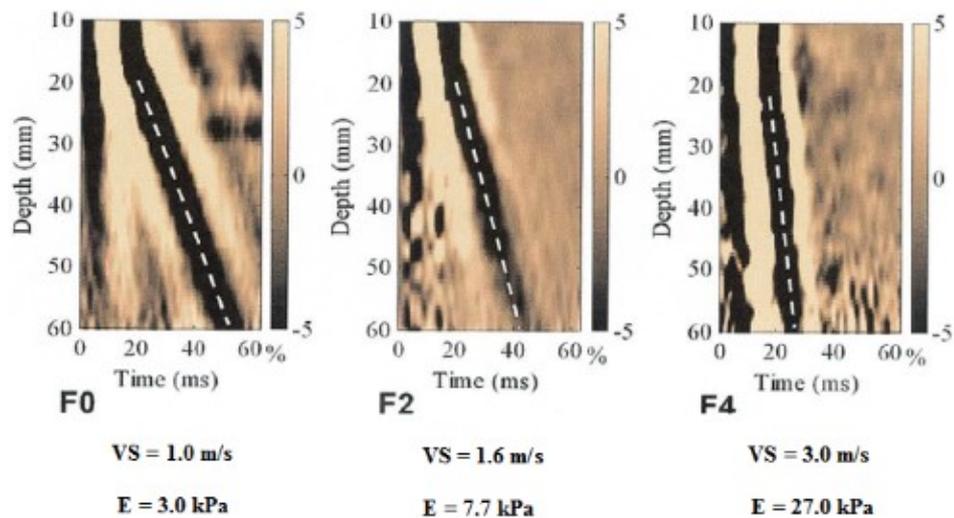


Figura 3: Esempi di misure di rigidità tramite FibroScan (figura tratta da Sandrin et al. 2003)

Durante l'esame, vengono prese dieci misurazioni della rigidità e successivamente viene considerata la mediana come valore di riferimento. Per valutare l'accuratezza delle misurazioni si utilizza il rapporto tra l'IQR e la mediana (IQR/mediana), che non dovrebbe essere maggiore di 0,3 (56). Numerosi studi hanno dimostrato che l'obesità e altri fattori ad essa associati, come la circonferenza vita e distanza tra la pelle e la capsula epatica possono non rendere affidabili i risultati. Inoltre, nei pazienti obesi, il tessuto adiposo sottocutaneo può portare ad una sovrastima della rigidità epatica. Per ovviare a questi problemi, frequentemente riscontrati nella pratica clinica nei pazienti affetti da MASLD/MASH, si dovrebbe utilizzare la sonda XL al posto della sonda M (57). Altre condizioni che possono portare ad un'errata valutazione del valore di *stiffness* sono: infiammazione, scompenso cardiaco destro con congestione epatica, colestasi e amiloidosi. Le misurazioni devono essere fatte a digiuno, perché l'assunzione di cibo può elevare il valore di *stiffness* epatica (58). In base ai valori di rigidità epatica i pazienti vengono suddivisi in cinque categorie che corrispondono alla classificazione METAVIR (59):

- F0. Assenza di fibrosi.
- F1. Fibrosi leggera; è caratterizzata da un'espansione fibrosa nell'area portale senza setti.
- F2. Fibrosi moderata; è caratterizzata dalla presenza di setti fibrosi organizzati in modo da formare ponti occasionali tra strutture vascolari adiacenti.
- F3. Fibrosi severa; il numero di ponti è incrementato rispetto alla categoria F2 ma non c'è cirrosi.

- F4. Cirrosi; tessuto composto di noduli circondati completamente da fibrosi

Le aree sotto le curve ROC (AUROC) per stadi di fibrosi epatica uguali o superiori a F1, F2, F3 e F4, sono stati valutati rispettivamente 0,881, 0,876, 0,914 e 0,997. Questi risultati indicano che il FibroScan ha una buona capacità nel discriminare le diverse fasi della fibrosi epatica, con un'accuratezza particolarmente elevata per lo stadio F4 (60).

Questo strumento, inoltre, può essere utilizzato per stabilire il grado di steatosi attraverso il *controlled attenuation parameter* (CAP). Il CAP permette una valutazione semi-quantitativa del contenuto di grasso epatico. Essa misura l'attenuazione delle onde ultrasonore, emesse dallo strumento, da parte del fegato. Maggiore è la steatosi maggiore il segnale sarà attenuato. Il valore di CAP varia da 100 a 400dB/m (58). In base ai valori di CAP, i pazienti vengono suddivisi in tre categorie:

- S0. Assenza di steatosi.
- S1. Steatosi moderata.
- S2-S3. Steatosi avanzata.

Le AUROC per rilevare gli stadi di steatosi ≥ 1 , ≥ 2 e 3 sono state valutate rispettivamente come 0,77–0,97, 0,638–0,92 e 0,67–0,83 (56). Il valore medio di dieci misurazioni della CAP viene poi utilizzato per definire il grado di steatosi, per determinare l'accuratezza della misurazione si usa la deviazione standard (56). Un BMI elevato può influenzare la misurazione della CAP, portando a una sovrastima della gravità della steatosi epatica in individui obesi o sovrappeso (56).

Risonanza magnetica elastografica

La risonanza magnetica elastografica è considerata la tecnica non invasiva più precisa per la diagnosi di steatosi, fibrosi e cirrosi nei pazienti con malattie epatiche croniche. Un vantaggio notevole, rispetto all'elastosonografia transiente monodimensionale, è l'affidabilità anche nei soggetti affetti da obesità grave(40,36).

2.5.3. Opzioni terapeutiche in pazienti affetti da DMT2 e MASLD

Le opzioni terapeutiche per i pazienti affetti da MASLD sono attualmente limitate. Per tale ragione, sono al momento in corso numerosi studi clinici a riguardo. Al momento la modifica dello stile di vita è alla base dell'approccio terapeutico. Le principali strategie nel trattamento della MASLD sono riassunte in tre punti principali (52,36):

- Modifiche dello stile di vita: attività fisica, restrizione calorica, dieta mediterranea, riduzione dell'assunzione di fruttosio, perdita di peso > 7-10%, astinenza da alcol.
- Trattamento del dismetabolismo e quindi della dislipidemia, del controllo glicemico e dell'obesità (attraverso anche la chirurgia bariatrica).
- I trattamenti farmacologici per la MASH sono per lo più off-label, ma approvati in circostanze specifiche come farmaci efficaci nella riduzione della glicemia nel trattamento del DMT2.

I tiazolodinedioni (agonisti del recettore PPAR γ) si sono dimostrati efficaci nel migliorare le lesioni istologiche della MASH. L'attivazione di PPAR γ migliora il quadro d'insulino-resistenza e di conseguenza il metabolismo glucidico e lipidico, con una redistribuzione di trigliceridi in eccesso dal fegato al tessuto adiposo (questo spiega l'aumento di peso come frequente effetto collaterale). Altri meccanismi di azione includono un aumento dell'adiponectina plasmatica e un miglioramento dell'infiammazione subclinica. Il pioglitazone ha mostrato portare un maggiore beneficio nella MASH grazie al suo agonismo parziale verso PPAR α , a differenza degli agonisti puri verso PPAR γ (come il rosiglitazone) ed un migliore profilo di sicurezza per quanto riguarda il rischio cardiovascolare, rispetto ad altre molecole della stessa classe (52).

I GLP1-RA, che appartengono alla famiglia degli incretino-mimetici, migliorano il controllo glicemico e riducono il peso. Sono diventati, insieme agli inibitori del SGLT2, la terapia di seconda linea per il DMT2 dopo la metformina, grazie ai loro potenti effetti ipoglicemici, agli effetti antiproteinurici e a un effetto sostanziale nel ridurre il rischio cardiovascolare. Hanno anche numerosi effetti metabolici benefici e rilevanti nella fisiopatologia della MASLD (52).

I DPP-4 inibitori esercitano i loro effetti di riduzione della glicemia bloccando l'enzima DPP-4 che è coinvolto nella degradazione delle incretine, ossia GLP-1 e GIP (polipeptide insulino-tropico glucosio-dipendente). Tra gli inibitori della DPP-4, sitagliptin è il principio attivo più studiato in relazione ai suoi effetti sulla MASLD/MASH (52).

Gli SGLT2 hanno dimostrato di migliorare l'omeostasi del glucosio e di conferire una protezione cardiorenale attraverso molteplici meccanismi. Vi è inoltre una crescente aspettativa che questa classe di agenti possa contribuire al trattamento della MASH, poiché diversi studi riportano una efficacia significativa nella regressione della steatosi epatica, della necrosi epatocitaria, dell'infiammazione e

della fibrosi. Dapaglifozin è in grado di ridurre significativamente la steatosi e la fibrosi in pazienti con DMT2 con MASLD, Empaglifozin è in grado di ridurre significativamente la steatosi e migliorare i livelli degli enzimi epatici nei pazienti con DMT2 e MASLD (52).

In uno studio recente (48), sono stati esaminati gli effetti di Tirzepatide rispetto all'insulina degludec sul contenuto di grasso epatico (LFT), sul tessuto adiposo viscerale (VAT) e sul tessuto adiposo sottocutaneo addominale (ASAT) attraverso la risonanza magnetica. Tutte e tre le dosi di Tirzepatide (5 mg, 10 mg e 15 mg) hanno determinato una riduzione del LFC, VAT e ASAT dopo 52 settimane di trattamento. Si ipotizza che gli effetti epatici degli agonisti dei recettori di GLP-1 e GIP siano in parte mediati da vie indirette, quali la modulazione delle concentrazioni di insulina e glucagone con la conseguente miglioramento dell'insulino-resistenza epatica e la riduzione della lipogenesi ex novo.

Altre molecole promettenti sono: Acido Obeticolico, Resmetirom (MGL-3196), Lanifibranor (IVA-337), in grado di attivare le tre isoforme di PPAR, e Pemafibrato (36).

Nel complesso, risulta fondamentale la prevenzione primaria attraverso una terapia comportamentale. La prevenzione secondaria dovrebbe avvenire applicando, regolarmente in ambito clinico, algoritmi predittivi capaci di identificare pazienti ad alto rischio e stadiarli.

Infine, la prevenzione terziaria dovrebbe essere attuata trattando i pazienti, quando non controindicato, con farmaci con comprovato beneficio verso la MASLD/MASH.

3. CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI

3.1. Definizione

Le cellule staminali ematopoietiche sono in grado di generare tutte le cellule del sangue mantenendo la capacità di dividersi “automantenendosi” e dando origine a cellule più “specializzate” (divisione asimmetrica), ovvero i progenitori multipotenziali (MPP, *multipotent progenitors*), in grado a loro volta di dare origine alle cellule della linea mieloide e linfoide. Nel midollo osseo, le nicchie, in cui risiedono le *hematopoietic stem cells* (HSCs), svolgono un ruolo essenziale nel mantenimento di un pool di HSCs in grado di fornire un numero adeguato di cellule ematiche mature per tutta la vita dell'individuo.

Si ritiene che le HSCs si trovino in prossimità della superficie ossea, nelle nicchie endostali e nelle nicchie vascolari (61). La popolazione di HSCs è molto eterogenea. In numerosi studi si è cercato di definire l'eterogeneità fenotipica e funzionale delle HSCs, rivelando la coesistenza di diverse sottopopolazioni con caratteristiche distinte nella proliferazione, auto-rinnovamento e potenziale differenziativo. I fattori – intrinseci ed estrinseci – che possono determinare la diversificazione funzionale delle HSCs non sono tuttavia ancora ben compresi. Tra di essi è importante citare: le caratteristiche genetiche ed epigenetiche acquisite durante lo sviluppo precoce e la maturazione, la localizzazione nelle nicchie endostali/vascolari e la riprogrammazione genetica ed epigenetica indotta dalla risposta a diversi stimoli molecolari e cellulari. Durante l'omeostasi, la maggior parte delle HSCs sono in uno stato di quiescenza e appartengono al sottogruppo CD34⁻; mentre il sottogruppo CD34⁺ è caratterizzato da HSCs attive in grado di auto-rinnovarsi. In risposta a stress e a stimoli lesivi (ad esempio, infezioni, perdita acuta di cellule ematiche, chemioterapia o citotossicità indotta da irradiazioni), le HSCs quiescenti (CD34⁻) passano allo stato CD34⁺, attivandosi. Una volta rigenerate le cellule del sangue e ristabilita l'omeostasi, le HSCs attivate ritornano a uno stato di dormienza. Questo meccanismo risulta essere molto importante perché il ritorno delle HSCs a uno stato di quiescenza riduce al minimo lo stress replicativo e l'accumulo di danni al DNA, prevenendo così l'esaurimento delle HSCs e l'insufficienza midollare (62).

Molteplici studi hanno individuato, sia nell'uomo che nel topo, l'esistenza di *short-term repopulating HSCs* (STR-HSCs) e *long-term repopulating HSCs* (LTR-HSCs) e la presenza di diverse sottopopolazioni di HSCs con una diversa propensione, in vivo, a generare cellule della linea mieloide o della linea linfoide. Sebbene le HSCs siano in grado

di generare tutte le cellule ematopoietiche, il rapporto tra cellule linfoidi e cellule mieloidi che producono può differire; come pure la capacità di auto-rinnovamento e la cinetica di differenziazione. Le *myeloid-biased-HSCs* (My-HSCs) sembrerebbero essere più quiescenti e presentare una maggiore capacità di auto-rinnovamento che perdura più a lungo. Al contrario, le *lymphoid-HSCs* (Ly-HSCs) si dividono più frequentemente e presentano una capacità di auto-rinnovamento minore e di minor durata. Oltre alle sottopopolazioni di HSCs con una "propensione" verso la generazione della linea mieloide o linfoide, esiste anche una sottopopolazione di HSCs che mostra una capacità di differenziazione verso la linea megacariocitica (62). Citochine infiammatorie (quali, IFN e IL-6 di tipo I e II) e chemochine sono in grado di attivare le HSCs, con conseguente aumento della proliferazione e temporanea espansione del pool di HSCs, della differenziazione mieloide/linfoide e della mobilizzazione nel sangue periferico. L'esposizione a infezioni ricorrenti e infiammazioni croniche porta a una riduzione della capacità di auto-rinnovamento e di ripopolamento delle LTR-HSCs, determinando la riduzione del pool di HSCs e talvolta anche alla sua completa deplezione. I tratti distintivi dell'invecchiamento del sistema emopoietico sono l'aumento della mielopoiesi con una conseguente compromissione della linfopoiesi, deficit del sistema immunitario e anemia. Inoltre, le My-HSCs "mature" presentano una maggiore capacità di proliferazione, con una ridotta capacità di auto-rinnovarsi e ripopolare la nicchia staminale rispetto alle My-HSCs più "giovani" (62).

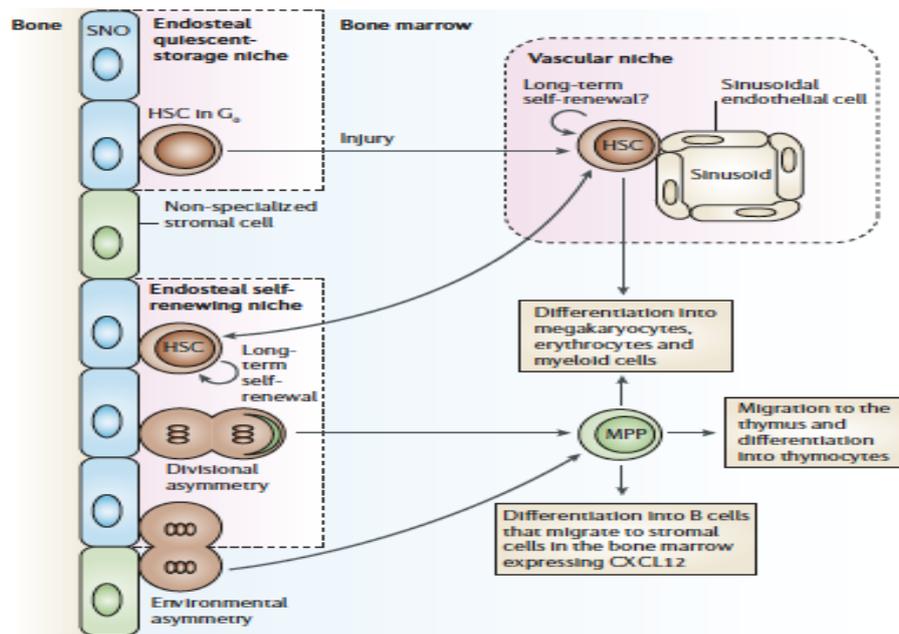


Figura 5: La nicchia delle HSCs nel midollo osseo (Figura tratta da Wilson et al. 2006)

3.1.1. La nicchia endostale delle HSCs nel midollo osseo

Numerosi studi hanno dimostrato che gli osteoblasti sono necessari per il mantenimento della ematopoiesi, una perdita di osteoblasti porta ad una conseguente perdita di LTR-HSCs. Ciò suggerisce che gli osteoblasti (o un sottoinsieme di queste cellule) sono una parte essenziale della nicchia regolandone l'attività e le dimensioni (63). Un meccanismo attraverso il quale gli osteoblasti regolano il numero di HSCs nel midollo osseo è la secrezione di osteopontina (OPN), una glicoproteina, nella matrice ossea. I topi OPN knockout presentano un aumento due volte superiore, rispetto ai controlli, del numero di HSCs. Si è ipotizzato che l'aumento del numero di HSCs, nei topi privi di OPN, sia il risultato di una diminuzione del processo apoptotico. Inoltre, sembrerebbe che questa glicoproteina agisca come regolatore negativo delle HSCs, mantenendole attivamente in uno stato di quiescenza (61).

3.1.2. La nicchia vascolare delle HSCs nel midollo osseo

Esiste un secondo microambiente essenziale per la sopravvivenza e mantenimento delle HSCs nel midollo osseo. Una grande percentuale di HSCs risulta infatti essere adesa all'endotelio fenestrato dei sinusoidi del midollo osseo (64).

Le cellule endoteliali sinusoidali del midollo osseo (BMECs, bone marrow endothelial cells) sono funzionalmente e fenotipicamente distinte dalle cellule endoteliali della microvascolatura di altri organi. Esse esprimono costitutivamente citochine come CXCL12 e molecole di adesione come la selectina (E) e VCAM1, importanti per la mobilizzazione, l'*homing* e l'*engraftment* delle HSCs. È probabile che la "nicchia vascolare" contenga HSCs in grado di auto-rinnovarsi continuamente, piuttosto che delle forme "dormienti". La posizione delle HSCs, in prossimità dei sinusoidi, permette un continuo monitoraggio della concentrazione di fattori ematici che riflettono lo stato del sistema ematopoietico dell'individuo. È stato ipotizzato che in caso di stress ematologico siano in grado di organizzare una risposta rapida, reclutando, se necessario, HSCs anche dalle nicchie endostali (61). È probabile che il pool di HSCs situate nella nicchia vascolare e in quella endostale vengano continuamente scambiate al fine di mantenere in omeostasi questo "ambiente" ematopoietico che è in costante cambiamento (61).

3.1.3. La mobilizzazione

Sebbene la grande maggioranza delle HSCs sia localizzata nel midollo osseo, le HSCs mostrano una notevole motilità. In risposta a segnali specifici, possono uscire e rientrare dalla nicchia ematopoietica; questi processi sono noti e chiamati rispettivamente con il termine "mobilizzazione" e "*homing*". La mobilitazione massiva delle HSCs si verifica in risposta al trattamento con ciclofosfamide, il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti (G-CSF) e in seguito a lesioni del midollo osseo. Il rilascio di HSCs non avviene solo durante la mobilizzazione in seguito a stimolo lesivo, ma si osserva anche durante l'omeostasi, quando un piccolo numero di HSCs viene costantemente rilasciato in circolo. Un fattore cruciale coinvolto nella migrazione, ritenzione e nella mobilitazione delle HSCs, durante l'omeostasi e dopo una lesione, è il CXCL12, espresso da diverse tipologie di cellule stromali del midollo osseo, tra cui osteoblasti e le cellule endoteliali. Gli effetti biologici di CXCL12 in seguito ad interazione con il suo recettore CXCR4 sono molteplici: stimola la chemiotassi, adesione, secrezione di metallo proteasi di matrice (MMPs) e fattori pro-angiogenici (VEGF). L'interazione tra CXCL12-CXCR4 è cruciale per la ritenzione e il mantenimento delle HSCs nella nicchia ematopoietica (61). La maggior parte delle HSCs è in contatto con cellule che esprimono elevate quantità di CXCL12, chiamate CAR (*CXCL12-abundant reticular cells*). Le cellule CAR solitamente circondano le cellule endoteliali dei sinusoidi o si trovano in prossimità dell'endostio. La segnalazione CXCL12-

CXCR4 mantiene il pool di HSCs in uno stato quiescente. Le cellule CAR sembrerebbero quindi essere una componente chiave di queste nicchie. La delezione di CXCR4, recettore del ligando CXCL12 nei topi, porta a una grave riduzione del numero di HSCs e ad un aumento della sensibilità alle lesioni mielotossiche, pur non compromettendo l'espansione dei progenitori più maturi (65).

Importanti studi hanno dimostrato che le HSCs non vengono rilasciate costantemente o casualmente in condizioni di omeostasi, ma seguono piuttosto un ritmo di rilascio circadiano. Il traffico circadiano delle HSCs è orchestrato dal sistema nervoso centrale, attraverso la secrezione ritmica di noradrenalina da parte dei terminali nervosi. Questo permette l'attivazione del recettore β 3-adrenergico che porta alla degradazione di Sp1 (fattore di trascrizione nucleare) e la *downregulation* di CXCL12. Il sistema nervoso centrale ha perciò un'azione diretta sulla nicchia di cellule staminali (66). In definitiva, il quadro che emerge da numerosi studi indica che il cross-talk molecolare tra le HSCs e le cellule della nicchia (in particolare gli osteoblasti) coinvolge un gran numero di molecole (caderine, integrine, chemochine, citochine, molecole di segnalazione e recettori). Si possono delineare due tipi di interazione principali: interazioni adesive cellula-matrice extracellulare (ECM), e, in secondo luogo, interazioni ligando-recettore espressi dalle HSCs e dalle cellule stromali, attraverso le quali vengono attivate vie di segnalazione intracellulare (61).

3.2. Significato clinico

Nel 2001 la scoperta rivoluzionaria che le cellule extra-cardiache sono in grado di ripopolare il miocardio infartuato (67) ha dato vita a una moltitudine di studi sul potenziale rigenerativo cardiovascolare delle cellule derivanti dal midollo osseo (BM, *bone marrow*) e sul loro potenziale terapeutico. Oltre alla capacità di trasformarsi fisicamente in cardiomiociti, le CSCs (cellule staminali circolanti) sono in grado di esercitare gran parte della loro attività rigenerative attraverso segnali paracrini. Di recente, la misura in cui le CSCs derivate dal BM contribuiscono fisicamente alla riparazione cardiovascolare è stata rivisitata e sembra essere più limitata di quanto ritenuto in precedenza (68,69).

La stragrande maggioranza delle cellule staminali circolanti è composta da HSCs che originano dal midollo osseo e che si trovano più a valle nel processo differenziativo: esse sono dette *hematopoietic stem cells progenitor* (HSPCs).

Un altro gruppo di cellule staminali circolanti, caratterizzato da un tropismo vascolare, è noto con il nome di cellule progenitrici endoteliali (EPCs). Un' interazione stretta tra HSCs e cellule endoteliali non è inaspettata, poiché entrambe le linee cellulari originano da un precursore embrionale comune, l'emangioblasto (70). Sembrerebbe che le HSPCs diano origine alle EPCs, in età adulta. Tuttavia, il potenziale endoteliale delle HSPCs/EPCs adulte appare essere incompleto e le cellule staminali con una vera capacità di differenziazione endoteliale paiono originare dai vasi stessi. Altre cellule di origine ematopoietica, come i monociti-macrofagi, sono dotate di grande plasticità, potendo assumere un potenziale simile a quello endoteliale, a quello delle *smooth muscle cell* (SMC) o pro-calcifico. Tali cellule sono prive di caratteristiche di staminalità, ma possono comunque svolgere un ruolo importante nell'omeostasi del sistema cardiovascolare (68) (71).

Le HSPCs circolanti hanno funzioni di pattugliamento nei tessuti, contribuiscono a combattere le infezioni e a promuovere la rigenerazione cellulare, soprattutto a livello vascolare (2). In generale, i livelli di HSCs, HSPCs ed EPCs sono considerati indicativi della capacità rigenerativa endogena dell'organismo nel suo complesso e, in particolare, del sistema cardiovascolare. Questo è di grande rilevanza perché mette in relazione le CSCs e il rischio cardiovascolare (68, 71).

In un recente studio effettuato su oltre 2500 pazienti, volto a riscontrare una riduzione del numero di CSCs legato all'età, si è visto che questo declino è presente ed è associato principalmente alla presenza di fattori di rischio cardiovascolari. La riduzione delle CSCs è stata osservata infatti solo nei pazienti con un maggior numero di fattori di rischio cardiovascolare. Al contrario, tra gli individui sani e privi di fattori di rischio non è stato riscontrato un apparente declino delle CSCs associato all'età. Inoltre, è stato osservato che i soggetti giovani con fattori di rischio cardiovascolare presentano un numero più elevato di CSCs rispetto ai coetanei sani. Questo suggerisce che l'esposizione a fattori di rischio in giovane età possa stimolare il midollo osseo a rilasciare CSCs nella circolazione periferica, presumibilmente in risposta al danno vascolare mediato dai fattori di rischio. Dopo decenni di mobilità prolungata, il potenziale riparativo endogeno si esaurisce e il numero di CSCs tende a diminuire. Ad esempio, nei soggetti con ipertensione essenziale è stata dimostrata una senescenza accelerata delle CSCs e un'alterata capacità di riparazione endoteliale. Il fumo di sigaretta compromette l'attività funzionale delle CSCs e la cessazione del fumo è in grado di aumentare le CSCs circolanti tra i fumatori cronici. È stato dimostrato che le LDL-*oxidized* inducono senescenza precoce delle EPCs umane, in

vitro (72, 68). Tra i fattori di rischio tradizionali più fortemente associati ai difetti quantitativi e qualitativi delle CSCs troviamo sicuramente il diabete. Inoltre, si è rilevato che l'aumento delle condizioni predisponenti allo sviluppo della sindrome metabolica comporta un declino lineare e progressivo nel numero di CSCs.

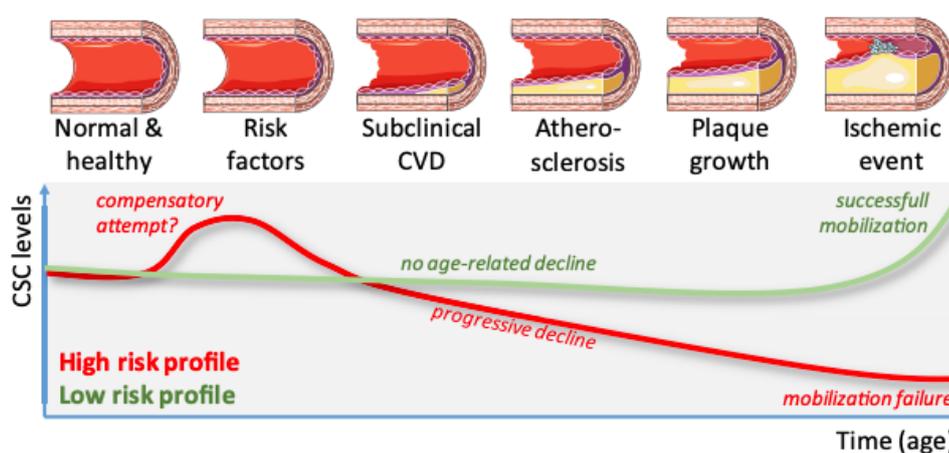


Figura 6: Declino delle CSCs in seguito ad esposizione a fattori di rischio cardiovascolare ed effetto sull'albero vascolare (Figura tratta da Fadini et al. 2020)

Un numero maggiore di CSCs è stato associato a una migliore funzione endoteliale e il numero di cellule circolanti CD34+ VEGFR2+ (EPCs) è risultato inversamente correlato allo spessore dell'intima media carotidea (68). La CVD subclinica progredisce nel tempo verso la CVD sintomatica che si manifesta come malattia coronarica, insufficienza cardiaca, malattia arteriosa periferica o malattia cerebrovascolare; contestualmente, il numero e la funzione delle CSCs continua a diminuire in maniera progressiva.

Al contrario, nel contesto di un evento ischemico acuto, come un infarto miocardico acuto (IMA) o un ictus, le CSCs vengono mobilitate dal BM alla periferia. L'ischemia e la lesione tissutale innescano una risposta infiammatoria acuta con un'*up-regulation* del fattore inducibile dall'ipossia 1-alfa (HIF-1 α), che a sua volta stimola l'espressione di SDF-1 α /CXCL12, un segnale di 'homing' per il reclutamento delle CSCs nei tessuti ischemici. L'attivazione di HIF-1 α promuove anche la sintesi e il rilascio di VEGF, che circola in concentrazioni più elevate, stimolando la trascrizione e il rilascio di metalloproteinasi nella matrice del BM, innescando così la liberazione di CSCs dal BM nella circolazione periferica (68).

In conclusione, un valore inferiore alla norma di CSCs (una media di 3 cellule CD34+/ μ L) è stato dimostrato essere associato a un aumento del rischio di eventi cardiovascolari, morte cardiovascolare e mortalità per altre cause (68,2). Un basso livello di cellule CD34+ nel sangue periferico è in grado di predire, indipendentemente da altri fattori di rischio, la

futura comparsa di microangiopatia e macroangiopatia nei pazienti diabetici e può essere utilizzato per migliorare la stratificazione del rischio cardiovascolare individuale (9)

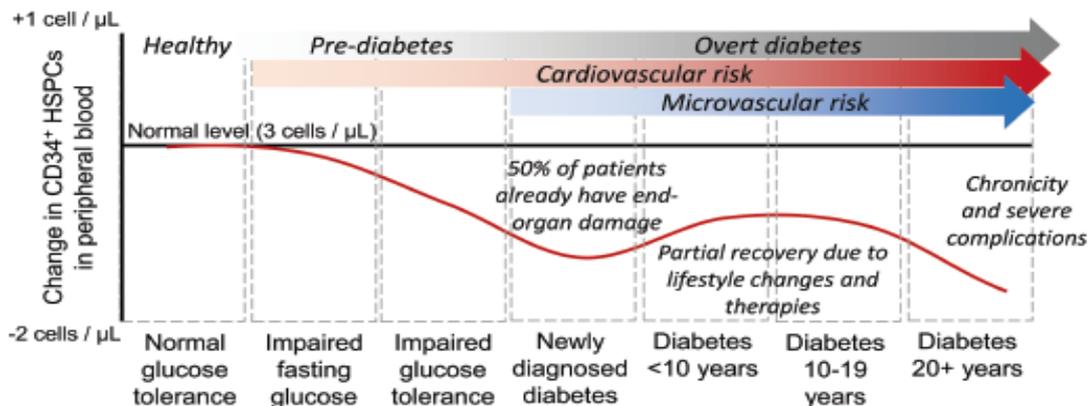


Figura 7: Livelli di CSCs durante il decorso DMT2 (Figura tratta da Fadini et al. 2022)

3.3. Quantificazione delle CSCs

Per comprendere la patogenesi delle patologie cardiovascolari, chiarire in che modo i fattori di rischio contribuiscono alle alterazioni vascolari e che ruolo hanno le HSCs, è necessario utilizzare metodi affidabili per quantificare le CSCs nel sangue periferico. La citofluorimetria a flusso è una tecnica rapida e conveniente per valutare il numero di HSPCs e EPCs (73).

Le HSPCs e le EPCs vengono così identificate grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali, coniugati a fluorocromi, capaci di legare recettori espressi sulla superficie cellulare, i quali caratterizzano le cellule staminali ematopoietiche. L'appartenenza delle cellule ricercate alla popolazione di cellule staminali è confermata dalla bassa espressione di CD45 (CD45^{dim}), la positività di espressione di CD34 (CD34⁺) e la positività di espressione di CD133 (CD133⁺). I marcatori CD45^{dim}, CD34⁺, CD133⁺ identificano quindi le HSPCs.

Le cellule progenitrici endoteliali sono caratterizzate invece dalla positività di espressione per CD34⁺, CD133⁺ e KDR⁺(VEGF-2) (68). Le EPCs circolanti esprimono, con diversa "intensità", una varietà di recettori tipici del *lineage* endoteliale. In generale, le EPCs appena rilasciate dal midollo osseo, o immediatamente dopo la loro migrazione nella circolazione sistemica, sono positive per CD133/CD34/KDR, mentre le EPC circolanti più differenziate sono positive a CD34/KDR/CD31/CD144, perdono il CD133 e iniziano a esprimere il fattore von Willebrand (73).

3.4. CSCs nel diabete e disfunzione midollare

Il mantenimento dell'omeostasi del BM dipende dall'interazione tra le HSCs e le cellule del microambiente di supporto. Questo continuo feed-back permette alle cellule staminali di autorinnovarsi, differenziarsi o andare incontro a morte cellulare. Nella "nicchia" le cellule con funzione regolatrice sono: le cellule endoteliali, le cellule mesenchimali e gli adipociti. La composizione cellulare e la localizzazione della nicchia determinano "funzioni specifiche" della nicchia stessa. Ad esempio, la nicchia vascolare è composta da HSCs in uno stadio più avanzato del processo differenziativo, cellule stromali e cellule endoteliali che costituiscono i sinusoidi fenestrati ed hanno la funzione di presiedere al traffico di cellule e soluti tra il midollo e la circolazione. La nicchia osteoblastica, situata vicino all'osso endostale, è considerata il principale deposito di HSCs più "primitive" (74). La nicchia endostale, poco ossigenata, è ideale per il mantenimento della quiescenza delle HSCs, mentre la differenziazione delle HSCs avviene dove la perfusione e quindi la pressione parziale dell'ossigeno è maggiore. Esistono tuttavia alcune nicchie endostali ben perfuse, in quanto circondate da microvasi che penetrano nell'osso. In questo caso le cellule staminali ricevono segnali sia dagli osteoblasti che dalle cellule endoteliali, nonché da fattori rilasciati nella circolazione ematica. Esistono poi HSCs sparse tra le due nicchie principali che si pensa possano rappresentare entità di transizione che si muovono avanti e indietro tra l'endostio e i sinusoidi fenestrati (75).

Il diabete induce un rimodellamento esteso della nicchia ematopoietica, ciò è dovuto principalmente alla microangiopatia, all'alterazione dell'innervazione da parte delle fibre nervose del sistema simpatico (neuropatia) e all'infiltrazione del midollo osseo da parte degli adipociti e cellule infiammatorie, come i macrofagi (2,9).

3.4.1. Microangiopatia midollare

Il BM possiede una "microvascolatura" unica nel suo genere, composta da arteriole, capillari e sinusoidi. Questa complessa struttura del letto vascolare è fondamentale per il funzionamento del BM: permette un continuo traffico delle HSCs e il loro mantenimento nella nicchia staminale ematopoietica. Pertanto, il rimodellamento della microvascolatura, può provocare cambiamenti drammatici nel mantenimento e nel traffico delle HSCs. Questa è una delle alterazioni comuni nel diabete con conseguente coinvolgimento delle HSCs nella nicchia staminale e alterazione del rilascio delle stesse nel circolo ematico (9).

La peculiare distribuzione della microvascolatura crea ambienti più e meno perfusi in tutto il midollo osseo. Le cellule staminali primitive risiedono nelle nicchie ematopoietiche endostali in cui la perfusione risulta essere minore e quindi anche la pressione parziale dell'ossigeno; ciò le protegge dallo stress ossidativo. Il gradiente fisiologico dei *reactive oxygen species* (ROS) agisce come un meccanismo in grado di regolare la compartimentalizzazione e differenziazione delle cellule staminali. Le cellule necessarie per la rigenerazione cellulare ematopoietica risiedono nella "zona a basso rischio", ideale per il mantenimento della quiescenza. La funzione della zona ad alto ROS, adiacente ai capillari del midollo, è invece quella di facilitare la maturazione delle cellule staminali (75). Nel BM diabetico, la rarefazione microvascolare genera inevitabilmente una maggior distanza tra capillari e cellule staminali. La diffusione di ossigeno e nutrienti risulta quindi essere compromessa. Una frazione sempre più crescente di midollo diventa fortemente ipoperfusa e isolata dall'influenza della nicchia vascolare. Le cellule staminali della nicchia endostale sopravvivono a malapena in un ambiente così ipossico. L'ipoperfusione e l'elevata concentrazione di glucosio contribuiscono all'aumento dello stress ossidativo che a sua volta induce cambiamenti epigenetici cellulari, modulando l'attività della sirtuine e dei microRNAs (75).

La deplezione delle cellule staminali ematopoietiche e il rimodellamento della nicchia nel BM ricordano ciò che avviene durante il "declino ematopoietico" nei roditori che invecchiano. Il diabete agisce quindi causando una senescenza accelerata nei vari organi dell'organismo, legata ad un'eccessiva produzione di ROS che mette a rischio la vitalità delle cellule staminali dei tessuti (75, 2).

3.4.2. Neuropatia del midollo osseo

Nei soggetti diabetici numerosi studi hanno dimostrato una progressiva rarefazione, nel midollo osseo, delle fibre nervose. Questo porta ad un alterato rilascio giornaliero, nel circolo, delle HSCs da parte del midollo osseo (9). Il rilascio ritmico circadiano delle HSCs è orchestrato dal sistema nervoso centrale, attraverso la secrezione di noradrenalina da parte dei terminali nervosi; questo permette l'attivazione del recettore β 3-adrenergico che porta alla degradazione di Sp1 e la *downregulation* di CXCL12 (66).

3.4.3. Infiammazione del midollo osseo

Oltre alla microangiopatia e alla neuropatia, il BM diabetico presenta altre caratteristiche patologiche in grado di influenzare il mantenimento e la mobilizzazione delle HSCs. Lo stato infiammatorio, nel BM diabetico, porta ad un'eccessiva attivazione di macrofagi con un ruolo pro-infiammatorio. È stato dimostrato che quest'ultimi, in un quadro pro-infiammatorio, rilasciano citochine in grado di trattenere le HSCs nel midollo. L'Oncostatina M è fattore paracrino di derivazione macrofagica in grado di indurre l'espressione di CXCL12 nelle cellule stromali del BM, trattenendo così le HSCs (74). I cambiamenti stromali del BM, dovuti al diabete, sono caratterizzati da un incremento del contenuto di grasso e del numero di adipociti. Ciò è probabilmente dovuto ad una alterazione nella differenziazione delle cellule mesenchimali, che al posto di divenire osteoblasti si trasformano in adipociti. Gli adipociti del BM sono una fonte importante di CXCL12, trattenendo le HSCs all'interno della nicchia staminale e impedendogli di essere rilasciate nel sangue periferico (2,9). Gli osteoblasti sono a loro volta regolatori della cinetica delle cellule staminali, in quanto producono segnali di ritenzione, tra cui CXCL12. Le alterazioni della qualità dell'osso e/o della densità minerale, osservate in pazienti diabetici, possono contribuire ulteriormente alla compromissione della mobilitazione delle staminali (2,9).

3.4.4. Possibili approcci terapeutici

Un trattamento mirato nel contrastare l'iperglicemia e l'eccessivo stress ossidativo dovrebbe esercitare effetti benefici nel prevenire, e possibilmente invertire, la disfunzione midollare.

L'iperglicemia e lo stress ossidativo inducono cambiamenti epigenetici, modulando l'attività delle sirtuine e dei microRNAs. Tra le modifiche epigenetiche correlate al diabete, è importante citare la *downregulation* di miR-155, la quale regola la segnalazione di CXCL12. Questo micro-RNA potrebbe dunque essere un importante bersaglio nei pazienti con scarsa mobilizzazione. L'inibitore di DPP4 agisce potenziando l'effetto di G-CSF, perché in grado di degradare il CXCL12, consentendo il rilascio di cellule staminali dal BM. Tra i vari meccanismi attraverso il quale G-CSF induce la mobilizzazione delle cellule staminali c'è l'inibizione dell'azione paracrina esercitata dai macrofagi, che nel BM sostiene i livelli di CXCL12. La molecola prodotta dai macrofagi che mantiene i livelli di CXCL12 elevati, impedendo la mobilizzazione delle HSCs, è l'Oncostatina M (OSM). Pertanto,

l'inibizione di OSM potrebbe essere un'ulteriore strategia nel trattamento della disfunzione midollare.

Nei topi diabetici c'è un significativo aumento di CSCs in seguito all'utilizzo dell'antagonista di CXCR4, plerixafor, mentre il G-CSF rimane poco efficace nel ricostituire il numero di CSCs. Questo sembra suggerire che le strategie più efficaci per migliorare la mobilizzazione siano quelle che, come bersaglio, hanno l'inversione dei meccanismi molecolari legati all'interazione tra CXCL12/CXCR4. Anche le prostaglandine, mediatori dell'infiammazione, hanno un'azione di ritenzione delle cellule staminali nel BM.

Inoltre, la denervazione delle fibre del sistema simpatico è uno dei principali fattori che causa un'alterata mobilizzazione delle cellule staminali nel diabete. Un possibile rimedio a questa denervazione potrebbe essere il potenziamento del sistema nervoso simpatico residuo attraverso l'uso di un inibitore della ricaptazione della noradrenalina (9).

4. OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI

4.1. Valutare l'associazione tra il numero di CSCs, marcatori di glicazione e fibrosi epatica nel DMT2

L'obiettivo di questo studio è quello di individuare una possibile associazione tra il grado di steatosi e/o fibrosi epatica e il numero di CSCs e i marcatori di glicazione tissutali, nei pazienti affetti da DMT2.

È noto che la MASLD/MASH incrementa il rischio cardiovascolare indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio. La gravità del *grading* istologico della MASLD/MASH è stata associata ad un maggiore spessore dell'intima carotidea, marcatore di aterosclerosi precoce, e ad una maggior disfunzione endoteliale (47); questi fattori contribuiscono ad aumentare l'incidenza di eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da MASLD/MASH.

I livelli di HSPCs ed EPCs sono considerati indicativi della capacità rigenerativa endogena dell'organismo e, in particolare, del sistema cardiovascolare (68); la MASLD/MASH è un fattore di rischio cardiovascolare e potrebbe determinare, come gli altri fattori di rischio, un continuo richiamo di HSPCs in periferia. Ciò comporta un iniziale picco e una successiva riduzione delle CSCs e di conseguenza una progressiva perdita di capacità rigenerativa vascolare. È plausibile quindi ipotizzare che un grado più avanzato di MASLD/MASH sia correlato ad un minor numero di CSCs e di conseguenza a maggior rischio cardiovascolare. Questo dato potrebbe essere utile nella pratica clinica per una miglior valutazione del rischio individuale. I pazienti affetti sia da DMT2 che da MASLD/MASH, in questo caso, dovrebbero essere considerati con un rischio elevato di CVD e potrebbero trarre beneficio da trattamenti di prevenzione cardiovascolare più intensivi.

Inoltre, si potrebbe speculare che agendo sulla steatosi/fibrosi epatica potrebbe esserci una minore deplezione di CSCs e di conseguenza una riduzione del rischio cardiovascolare.

Gli AGEs, prodotti di reazioni non enzimatiche tra glucosio e proteine, acidi nucleici e lipidi, sono considerati uno dei principali fattori coinvolti nel danno multiorgano nei pazienti diabetici e sembrerebbero direttamente correlati a una maggiore incidenza di complicanze micro e macrovascolari; essi sono responsabili dell'invecchiamento e disfunzione precoce dei tessuti e degli organi. Ci si aspetta quindi che valori elevati della SAF siano direttamente correlati ad una maggior gravità del quadro di MASLD/MASH. Tuttavia,

essendo questo uno studio trasversale osservazione esso permette di identificare solo la presenza di un'associazione tra la gravità della MASLD/MASH e il numero di CSCs e il valore di SAF. Ulteriori studi prospettici dovrebbero essere pianificati per chiarire la relazione causa-effetto e dimostrare che il trattamento della MASLD/MASH riduca efficacemente il rischio di CVD, portando ad un aumento del numero di CSCs e, infine, riflettendosi in una riduzione dei prodotti di glicazione tissutale.

5. MATERIALI E METODI

5.1. Selezione e caratterizzazione dei pazienti

Da dicembre 2023 a maggio 2024 sono stati reclutati consecutivamente pazienti afferenti al Servizio di Diabetologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova durante l'esecuzione di un FibroScan, richiesto routinariamente come screening della MASLD e della possibile conseguente fibrosi epatica.

I criteri di inclusione sono stati i seguenti: DMT2, età compresa tra i 18 e 80 anni, entrambi i sessi. Tra i criteri di esclusione vi erano: DMT1, età <18 anni e >80 anni, neoplasie solide note o fortemente sospette, malattie ematologiche (linfoma, mieloma, leucemie acute o croniche, malattie mieloproliferative croniche) che potrebbero influenzare il conteggio delle HSPCs, recenti malattie acute o interventi chirurgici, malattie infiammatorie croniche (es. artrite reumatoide), gravidanza o allattamento, insufficienza renale terminale, nota cirrosi epatica o epatopatia virale cronica, immunosoppressione o trapianto d'organo, demenza o incapacità di fornire consenso informato.

Dopo accurata presentazione delle finalità e delle modalità di esecuzione dello studio, è stato raccolto il consenso informato scritto di ciascun soggetto partecipante.

Per tutti i pazienti sono state raccolte informazioni anagrafiche, demografiche, antropometriche, biochimiche, l'anamnesi patologica remota e l'anamnesi farmacologica.

Successivamente ciascun paziente è stato sottoposto ad un prelievo ematico (una provetta da 6 ml) per la determinazione citofluorimetrica delle cellule staminali circolanti.

5.1.1. Dati clinici

Per ciascun paziente sono stati raccolti, dalle cartelle cliniche informatizzate, i seguenti dati clinici:

- Dati antropometrici: età, sesso, altezza, peso corporeo e circonferenza vita. Per ogni paziente, a partire dal peso e dall'altezza, è stato calcolato il Body Mass Index (BMI, kg/m²)

- Dati clinico-anamnestici: durata della malattia, pressione arteriosa sistolica e diastolica, abitudine tabagica, consumo di bevande alcoliche, ipertensione arteriosa, dislipidemia.
- Presenza di complicanze croniche micro e macrovascolari associate al diabete:
 - Retinopatia: non proliferante, pre-proliferante, proliferante, laser-trattata, riscontrata all'esame del Fundus Oculi
 - Nefropatia: Albumin-to-creatinine ratio (ACR) ≥ 30 mg/g e/o velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) < 60 ml/min/1,73m² calcolata con formula CKD-EPI (Ref)
 - Neuropatia: presenza di sintomi tipici motori o sensoriali (intorpidimento, formicolio o dolore alle dita dei piedi, piedi, gambe, mani, braccia, dita delle mani, stanchezza ai muscoli dei piedi o delle mani) confermato da un'esaminazione clinica (riflessi della caviglia, soglia di percezione vibratoria, puntura di spillo e sensibilità del monofilamento 10 g) ed eventuale determinazione della velocità di conduzione neurale.
 - Malattia arteriosa coronarica: anamnesi positiva per infarto del miocardio, angina, sindrome coronarica acuta, evidenza di una stenosi coronarica significativa (sintomatica o asintomatica) ad una coronaro-TAC o alla coronarografia, pregressa rivascolarizzazione coronarica.
 - Arteriopatia periferica degli arti inferiori: presenza di claudicatio, dolore a riposo, ulcere ischemiche, dimostrazione con esame ultrasonografico o angiografia dell'effettiva ischemia agli arti inferiori, storia di precedente rivascolarizzazione.
 - Malattia cerebrovascolare: stenosi carotidea $> 20\%$ valutata tramite ecocolor Doppler delle carotidi, precedente attacco ischemico transitorio (TIA) o stroke, pregresso intervento di rivascolarizzazione carotidea.
- Dati biumorali: HbA1c, glicemia a digiuno (FPG), colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, ACR, creatinina, AST, ALT, GGT, emocromo. A partire dai valori misurati è stato calcolato anche il valore di colesterolo LDL secondo la formula di Friedewald [colesterolo LDL = colesterolo totale - (colesterolo HDL + trigliceridi/5)]
- Dati sulla terapia farmacologica: assunzione concomitante di farmaci per il trattamento di diabete, ipertensione e dislipidemia e per la prevenzione/trattamento di eventi cardiovascolari.

5.2. Misura delle CSCs

Come già menzionato, un campione di sangue venoso periferico (6 ml) è stato raccolto da ogni paziente per la determinazione citofluorimetrica delle cellule staminali/progenitrici circolanti.

L'analisi dei livelli di HSPCs è stata effettuata presso il laboratorio di citofluorimetria da parte di personale universitario.

Le HSPCs nel sangue periferico sono state identificate sulla base dell'espressione di antigeni di superficie marcati con anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi, mediante analisi citofluorimetrica a flusso: si tratta di una metodica di laboratorio che consente la valutazione multiparametrica delle caratteristiche antigeniche di particelle biologiche o singole cellule contenute in una sospensione liquida, sfruttando fenomeni di diffusione della luce e fluorescenza.

Il citometro è costituito da 4 elementi:

- un sistema fluidico, composto da una pompa idraulica, delle taniche di alimentazione e raccolta del liquido di trascinamento e da una cella di analisi;
- un sistema di eccitazione, costituito da una o più sorgenti luminose (laser ad Argon o Elio) che generano segnali monocromatici unidirezionali che intercettano le cellule;
- un sistema ottico, composto da filtri, specchi e lenti, che raccoglie i segnali luminosi;
- un sistema di analisi computerizzato dotato di programmi specifici tramite cui si controlla lo strumento e si eseguono le analisi digitalizzando il segnale.

Il campione viene aspirato dalla sospensione e, passando attraverso il foro di un ago, viene iniettato in un liquido di trascinamento per ottenere un flusso laminare pressurizzato nel capillare in quarzo sintetico della cella di analisi. Il flusso laminare è consentito, in particolare, da una bassa differenza di pressione tra il liquido di scorrimento ed il campione: in questo modo il volume del campione è minore e le cellule si allineano al centro del flusso.

All'interno della cella di analisi avviene l'interazione tra la cellula e raggi laser: questi ultimi generano un segnale stabile e riproducibile di fotoni ad una specifica lunghezza d'onda che interagiscono con il flusso laminare di cellule, attraversandole. Quando un fascio luminoso attraversa un collimatore, quale è la cellula, questo viene diffratto in diverse direzioni in base alle caratteristiche fisiche della singola cellula.

La luce che attraversa la cellula seguendo la direzione del raggio incidente prende il nome di Forward Scatter (FSC), ed è direttamente proporzionale alla dimensione della cellula.

La luce che viene invece raccolta perpendicolarmente rispetto al raggio incidente prende il nome di Side Scatter (SSC) e fornisce informazioni sulla complessità intracellulare, risultando maggiore nelle cellule granulate, ricche di vacuoli o con nuclei polilobati.

La combinazione di questi due parametri consente di ottenere un diagramma di dispersione chiamato "citogramma" o "dot plot", in cui è possibile evidenziare le diverse popolazioni cellulari in base alle sole caratteristiche morfologiche (dimensione e granulosità). Questo consente di creare una regione di analisi (gate morfologico) che circonda e seleziona il sottoinsieme cellulare di interesse.

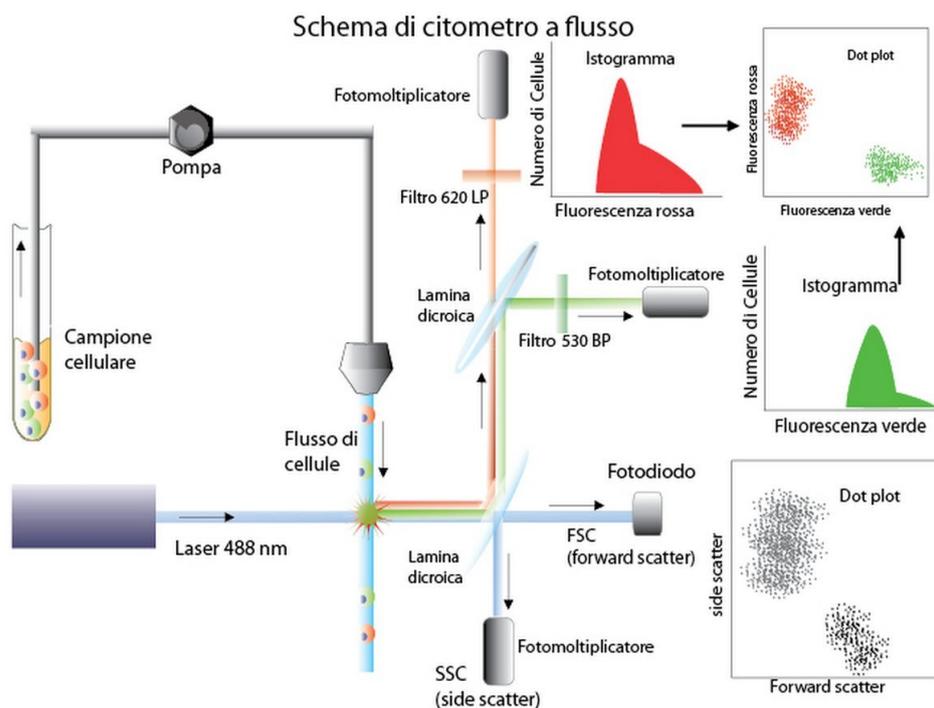


Figura 8: Componenti del citometro a flusso

È possibile, inoltre, selezionare le diverse popolazioni cellulari da studiare in base all'espressione di un determinato marcatore che le caratterizza (gate immunologico). Le maggiori applicazioni della citofluorimetria sono infatti legate all'utilizzo di anticorpi monoclonali (AcMo) coniugati con fluorocromi, cioè molecole che se eccitate ad una specifica lunghezza d'onda, emettono ad una diversa lunghezza d'onda (λ). Questi anticorpi monoclonali consentono di rilevare la presenza di determinati antigeni di superficie e/o intracellulari, permettendo di identificare l'appartenenza ad una determinata linea cellulare e il grado di differenziazione delle diverse cellule.

Lo strumento impiegato in questo studio è stato un analizzatore FACS CANTO II (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA), che è dotato di una sorgente laser ad Argon che emette ad una lunghezza d'onda di 488 nm, una ad Elio che emette invece a 633 nm e un laser allo stato solido che emette nel violetto a 405 nm. I dati sono stati processati utilizzando il programma BD FACSDiva Software™.

Per ricercare le HSPCs nel sangue periferico tramite la citofluorimetria a flusso sono stati utilizzati anticorpi monoclonali diretti contro i seguenti antigeni di superficie: CD45, CD34, CD133 e KDR (CD309).

In seguito, le cellule sono state divise in cellule staminali ematopoietiche (CD34+CD45dim) e cellule progenitrici endoteliali (CD34+KDR+).

I fluorocromi utilizzati per le analisi fluorimetriche sono stati: FITC (Isotiocianato di fluoresceina), PE (Ficoeritrina), PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex), APC (Allofococianina).

Il fluorocromo FITC stabilisce un legame covalente fra il suo radicale tiocianato ed il gruppo amminico primario della proteina. Le sue caratteristiche spettrofluorimetriche sono ideali per un'eccitazione alla lunghezza d'onda di 488 nm del laser ad Argon del citofluorimetro, essendo lo spettro di assorbimento massimo intorno a 490 nm. Lo spettro di emissione è nella regione del verde (530 +/- 30 nm). Esso rappresenta uno dei fluorocromi più stabili, più efficienti e più facilmente coniugabili, grazie ad un basso peso molecolare e ad un basso rischio di impedimento sterico.

Il fluorocromo PE appartiene alla famiglia delle bi-lipoproteine, è dotato di un peso molecolare elevato e possiede caratteristiche spettrofluorimetriche ottimali per un'eccitazione alla lunghezza d'onda di 488 nm del laser ad Argon. Esso presenta uno spettro di emissione a 585 +/- 42 nm.

L'allofococianina (APC) è una proteina di colore blu-turchese contenente 6 gruppi prostetici cromofori, che viene eccitata a 635 nm ed emette a 660 nm. Questo fluorocromo per le sue caratteristiche non può essere eccitato con un laser ad Argon (emissione a 488 nm), ma viene eccitato di regola da un secondo laser ad Elio (emissione a 635 nm).

Il fluorocromo PerCP è un pigmento carotenoide idrosolubile che si trova nei dinoflagellati fotosintetici. Esso viene eccitato da un laser a Argon a 488 nm ed emette ad una lunghezza d'onda massima di 675 nm.

Nel presente studio il procedimento prevedeva di dispensare sul fondo di provette a 5 ml una quantità pari a 150 µL di sangue periferico e di aggiungere 10 µL di anticorpi monoclonali anti-CD34 marcati con FITC (Becton Dickinson), 10 µL di anticorpi

monoclonali anti-KDR marcati con PE (R&D Systems), 5 μ L di anticorpi monoclonali anti-CD45 marcati con PerCP (Becton Dickinson) e 10 μ L di anticorpi monoclonali anti-CD133 marcati con APC (Miltenyi Biotec).

Inoltre, è sempre necessario prevedere un controllo costituito da due anticorpi monoclonali diretti contro antigeni non rilevanti, ma appartenenti alla stessa sottoclasse e marcati con gli stessi fluorocromi dell'anticorpo monoclonale di interesse (controllo isotipico), in modo da valutare il livello del legame aspecifico degli anticorpi alle cellule.

Alla preparazione del campione è seguita un'incubazione della durata di 30 minuti ad una temperatura di 4°C ed al buio.

Successivamente, per lisare gli eritrociti, sono stati aggiunti 3-4 ml di soluzione lisante (cloruro di ammonio NH₄Cl 0,15M), per 5 minuti.

A lisi avvenuta, il campione è stato centrifugato a 1600g per 5 minuti con freno, è stato eliminato il sovrantante e successivamente si è proceduto alla lettura del campione.

Sono stati acquisiti 500,000 eventi totali per ogni tubino.

Prima di analizzare quantitativamente le cellule acquisite, è stata controllata ed eventualmente corretta la compensazione tra i diversi fluorocromi.

Esaminando contemporaneamente FSC e SSC in un dot plot, è stato possibile distinguere le diverse popolazioni in base alle loro caratteristiche morfologiche (dimensioni e granulosità). In questo modo, è stata creata una regione di analisi (gate morfologico) che racchiudeva la popolazione cellulare di nostro interesse, ovvero quella dei linfo-monociti (A, Figura 9).

Successivamente è stato selezionato un gate immunologico rispettivamente sulle cellule CD34 positive (B, Figura 9) e sulle cellule CD133 positive, ed intersecando le cellule separate esprimenti sia il CD34 che il CD133 sono state identificate le cellule CD34+CD133+ (C, Figura 9).

È stata poi selezionata, rispettivamente per le cellule CD34+ e CD133+, la popolazione cellulare risultante per la coespressione del KDR. Intersecando infine le cellule separate esprimenti sia il CD34 che il CD133 che il KDR, sono state identificate le cellule CD34+CD133+KDR+ (D, Figura 9).

In analisi separate, è stato eseguito il CD45costaining che ha mostrato che più del 90% delle cellule CD34+ sono CD45dim, ovvero a bassa intensità di fluorescenza (E, Figura 9).

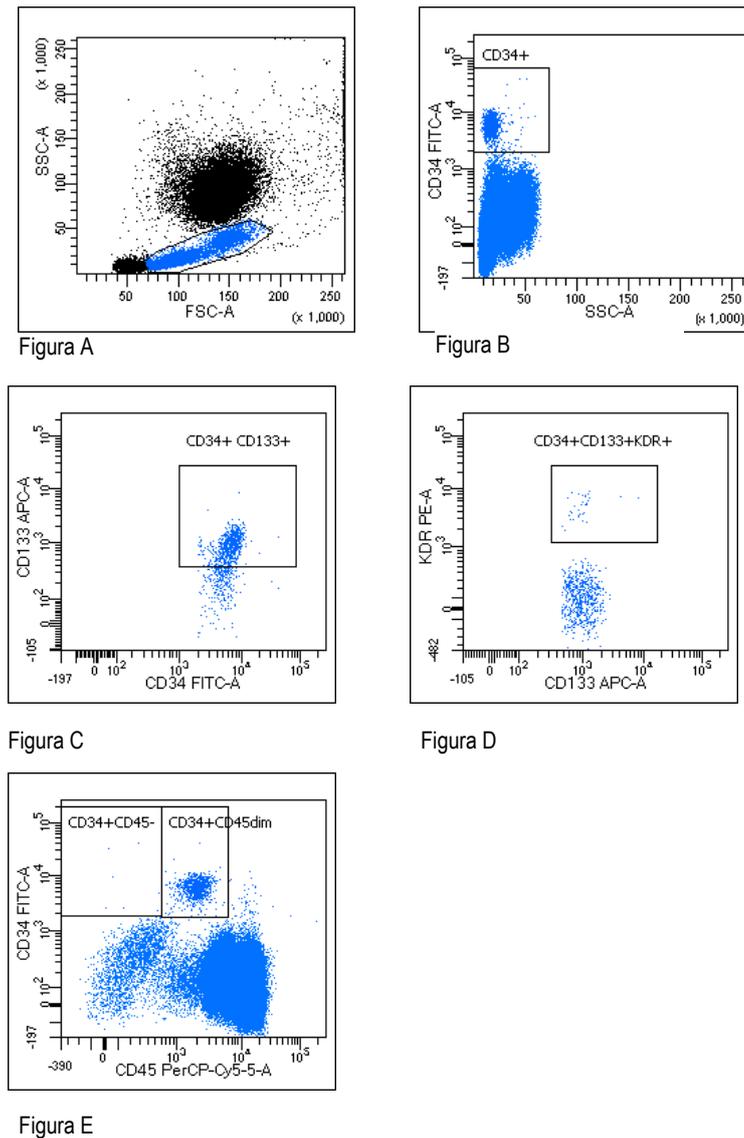


Figura 9: Strategia di gating per l'analisi delle cellule staminali circolanti.

5.3. FibroScan

Il FibroScan (*transient elastography* TE) trasmette una vibrazione a bassa frequenza (50Hz) dalla cute, attraverso lo spazio intercostale, a tutto il fegato. La velocità di propagazione di queste onde, nel tessuto epatico, viene utilizzata per calcolare la rigidità del tessuto che viene espressa in kilopascal (kPa) (58).

Durante l'esame, viene chiesto al paziente di posizionarsi in modo che gli spazi intercostali a destra si "aprano" il più possibile: in posizione supina con il braccio destro sollevato dietro la testa e la gamba destra incrociata sopra la gamba sinistra. La sonda viene posizionata tra gli spazi intercostali che danno miglior visibilità, perpendicolare alla glissoniana ad almeno 15-20mm da essa, generalmente lungo la linea ascellare anteriore

destra. L'immagine B-mode dell'ecografo vengono utilizzate per avvalorare la scelta del posizionamento della sonda e quindi procedere con le misurazioni.

Durante l'esame, vengono prese dieci misurazioni della stiffness e successivamente viene presa la mediana dei valori ottenuti; per valutare l'accuratezza delle misurazioni si utilizza (IQR/mediana) che non dovrebbe essere $>0,3$ (56). Le misurazioni devono essere fatte a digiuno, perché l'assunzione di cibo può elevare il valore di *stiffness* epatica (58).

Il FibroScan viene utilizzato inoltre per stabilire il grado di steatosi, attraverso il *Controlled Attenuation Parameter* (CAP). Il CAP permette una valutazione semi-quantitativa del contenuto di grasso epatico (58). Essa misura l'attenuazione delle onde ultrasonore, emesse dallo strumento, da parte del fegato. Maggiore è la steatosi maggiore il segnale sarà attenuato. Il valore di CAP varia da 100 a 400dB/m; per valutare l'accuratezza della misurazione si usa la deviazione standard (56).

5.4. Skin autofluorescence

Per ogni paziente è stata effettuata una misurazione della skin autofluorescence mediante AGEs Reader (Diagnoptics, Groningen, Paesi Bassi). Gli AGEs sono considerati uno dei principali fattori coinvolti nel danno multiorgano nei pazienti diabetici; essi sono responsabili dell'invecchiamento precoce dei tessuti e degli organi. Diversi studi hanno evidenziato che nei pazienti affetti da diabete mellito, i livelli tissutali degli AGEs, valutati tramite biopsie cutanee, sono correlati in modo significativo ad una maggior incidenza di complicanze micro/macrovascolari quali retinopatia, nefropatia e progressione della malattia, rispetto ai valori della emoglobina glicata. Ciò suggerisce che i livelli di AGEs possono essere un parametro importante da monitorare per valutare il rischio di complicanze nelle persone con diabete (25). La misura della *skin autofluorescence* (SAF) rappresenta una metodica nuova, non invasiva, rapida e affidabile per valutare il livello di AGEs nei tessuti. Un centimetro quadrato di pelle, sulla parte volare dell'avambraccio viene esposta a una fonte di luce ultravioletta (UV), con una lunghezza d'onda compresa tra i 300 e i 420 nanometri, gli AGEs presenti nei tessuti che hanno proprietà fluorescenti vengono eccitati. Questa eccitazione fa sì che gli AGEs emettano luce con una lunghezza d'onda maggiore, generalmente compresa tra i 420 e i 600 nm. Questa luce emessa viene rilevata e misurata dallo strumento. La SAF viene espressa come il rapporto tra l'intensità della luce di emissione nell'intervallo 420-600 nm e l'intensità della luce di eccitazione tra 300 e 420 nm moltiplicata per 100 (76).

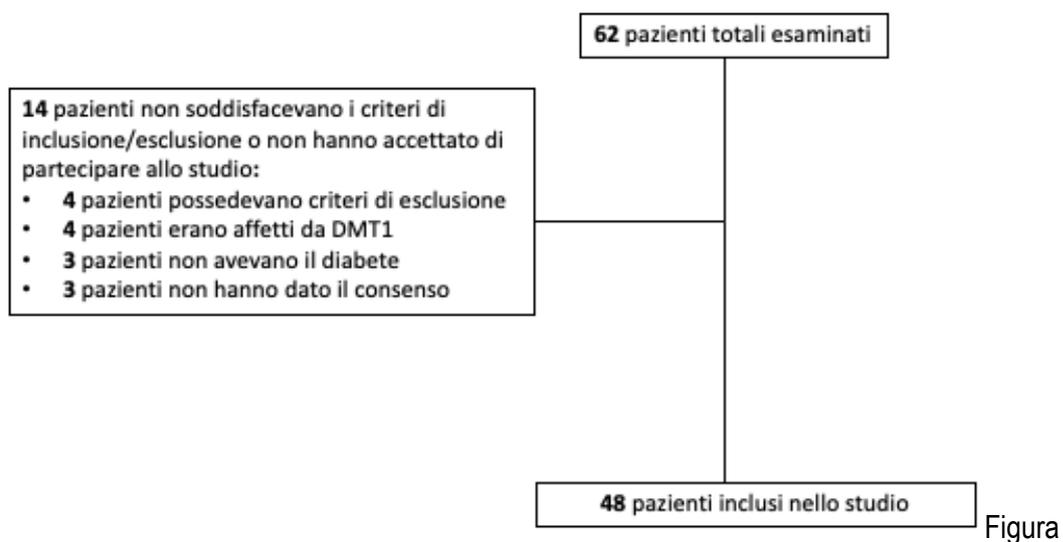
Diversi fattori possono influenzare le misurazioni della SAF come la pigmentazione scura della pelle (fototipo cutaneo 4-6), le applicazioni di prodotti cutanei (in particolare creme solari e abbronzanti), lo stato di digiuno o postprandiale, l'estrema iperemia locale e la vasocostrizione. Inoltre, la SAF è più elevata nelle donne in premenopausa rispetto agli uomini, questo è dovuto agli estrogeni; gli ormoni sessuali influenzano il deposito di AGEs nel tessuto modificando il tempo di turn-over del collagene. Nel post-menopausa invece, la differenza dei valori della SAF tra sesso maschile e femminile non è più significativa (77). È noto, inoltre, che le concentrazioni di AGEs aumentano con l'età e che la SAF è direttamente correlata all'età cronologica (24).

5.5. Analisi statistica

Le variabili continue normali sono state espresse come media e deviazione standard, quelle non normali come mediana e range interquartile. Le variabili categoriche sono state espresse come percentuale. La normalità della distribuzione delle variabili è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk. Le variabili continue non normali sono state trasformate nel loro logaritmo prima dell'analisi statistica. Per i confronti intragruppo è stato utilizzato il test t di Student a due code per dati appaiati, per i confronti tra due gruppi (pazienti con fibrosi significativa vs non significativa) il test t di Student a due code per dati non appaiati per le variabili continue, il test chi quadrato per le variabili categoriche. Per i confronti tra più gruppi (stadi di fibrosi) è stata utilizzata l'analisi della varianza ANOVA. Le correlazioni lineari sono state analizzate mediante il coefficiente r di Pearson. Le variabili con un livello di significatività all'univariata sono state inserite in un modello multivariato di regressione multipla. La significatività statistica è stata settata per $p < 0.05$. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il programma Microsoft Excel e SPSS versione 28.

6. RISULTATI

6.1. Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio



10: Flowchart dei pazienti inclusi nello studio

Sono stati inclusi nello studio 48 soggetti (35 maschi, 13 femmine) di età media 64.67 ± 8.09 anni. Dalla figura 11, è possibile osservare la distribuzione del BMI tra i pazienti arruolati: 7 (14,5%) erano normopeso, 20 (41,7%) sovrappeso, 14 (29,1%) di obesità I, 5 (10,4%) di obesità II, 2 (4,2%) obesità III.

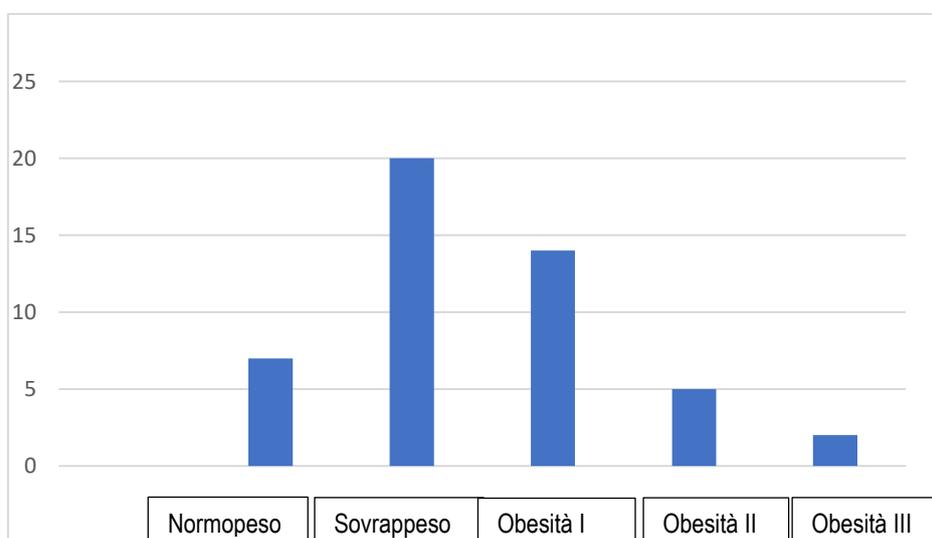


Figura 11: Distribuzione delle classi del BMI dei pazienti presi in esame

La maggior parte dei pazienti aveva un buon controllo pressorio con una pressione arteriosa sistolica (PAS) media di 144.2 ± 17.6 , una funzionalità renale conservata con un eGFR media di 86.4 ± 15.3 , un buon controllo glicemico con l'HbA1c (%) media di 6.8 ± 0.8 e un buon assetto lipidico, la media del colesterolo totale era di 142.6 ± 37.3 , la media del colesterolo LDL era di 70.6 ± 29.5 .

Il 77% dei soggetti era affetta da ipertensione arteriosa e quasi la totalità era dislipidemico. Un quinto dei pazienti aveva storia di cardiopatia ischemica diabetica e il 56,3% di vasculopatia carotidea. Il 18,8% era affetto da nefropatia diabetica. Circa la metà dei pazienti aveva un consumo alcolico abituale.

Per quanto riguarda la terapia farmacologica dei pazienti in esame al momento dell'arruolamento, quasi tutti assumevano la metformina come parte della terapia ipoglicemizzante e più della metà i GLP-1RA, il 37,5% i SGLT2i. Più del 90% era in terapia con una statina.

Tabella I. Caratteristiche cliniche dei soggetti.

Variabile	Pazienti (n=48)
Demografiche e antropometriche	
Età (anni)	64.7 ± 8.1
Sesso maschile, n (%)	35 (72.9)
BMI (kg/m ²)	29.8 ± 5.2
PAS (mmHg)	144.2 ± 17.6
PAD (mmHg)	76.9 ± 11.2
HbA1c (%)	6.8 ± 0.8
Durata di malattia (anni)	9.3 ± 6.9
Fattori di rischio concomitanti	
Iipertensione, n (%)	37 (77.1)
Dislipidemia, n (%)	46 (95.8)
Fumo di sigaretta, n (%)	6 (12.5)
Consumo alcolico, n (%)	25 (52.1)
Biochimiche	
Colesterolo totale (mg/dl)	142.6 ± 37.3
Colesterolo HDL (mg/dl)	50.4 ± 14.3
Colesterolo LDL (mg/dl)	70.6 ± 29.5
Trigliceridi (mg/dl)	$85.5 (78.0-138.2)$
ACR (mg/g)	$4.2 (3.8-7.6)$
Creatinina (mg/dl)	0.9 ± 0.2
eGFR (ml/min/1.73 mq)	86.4 ± 15.3
AST (U/L)	31.9 ± 16.8

ALT (U/L)	37.5 ± 22.4
PLTs (10³/ul)	255.3 ± 64.8
Complicanze	
Retinopatia, n (%)	6 (12.8)
Nefropatia, n (%)	9 (18.8)
Neuropatia, n (%)	7 (14.6)
CAD, n (%)	10 (20.8)
PAD, n (%)	3 (6.3)
CerVD, n (%)	27 (56.3)
Terapia	
Metformina, n (%)	46 (95.8)
SU/glinidi, n (%)	6 (12.5)
Pioglitazone, n (%)	3 (6.3)
DPP-4i, n (%)	3 (6.3)
GLP-1RA, n (%)	32 (66.7)
SGLT2i, n (%)	18 (37.5)
Insulina basale (%)	5 (10.4)
Insulina basal-bolus (%)	2 (4.2)
ACEi / Sartani, n (%)	31 (64.6)
Beta-bloccanti, n (%)	13 (27.1)
Calcio-antagonisti, n (%)	15 (31.3)
Diuretici, n (%)	16 (33.3)
Statina, n (%)	44 (91.7)
Anti-aggreganti, n (%)	17 (35.4)

I dati sono presentati come media ± deviazione standard o come numero di soggetti (n) e percentuale (%). BMI=body mass index; PAS=pressione arteriosa sistolica; PAD (mmHg)=pressione arteriosa diastolica, ACR=rappporto albumina/creatinina nelle urine; eGFR= estimated glomerular filtration rate CAD= coronay artery disease; PAD= peripheral artery disease; CerVD= cerebral vascular disease.

Le misurazioni della CAP e della stiffness tramite FibroScan sono state eseguite da un unico operatore, garantendo coerenza nei risultati. L'accuratezza diagnostica per la stiffness ha mantenuto una mediana/IQR < 0,3, mentre la deviazione standard per la CAP è stata costantemente inferiore a 30. Questi risultati confermano l'affidabilità dei dati.

Grazie ai valori presenti nella tabella sottostante è stato possibile per ciascun parametro (HSI, CAP, FIB4 e stiffness) valutare la classe media di appartenenza della popolazione in esame. Per esempio l'indice HSI è classificato in tre classi (1,2,3) e, noto il numero di soggetti appartenenti a ciascuna classe, nel seguito indicato come n1, n2, n3, si calcola quindi la media pesata $(1*n1+2*n2+3*n3)/(n1+n2+n3)$. Il valore così ottenuto, arrotondato all'intero più vicino, indica qual è la classe media rappresentativa del campione.

La classe media rappresentativa del campione relativa al parametro HSI è stata quella con HSI>36 (steatosi grave) mentre per il valore della CAP la classe media rappresentativa è stata quella con CAP compresa tra 268-280(dB/m).

La classe media rappresentativa del campione relativa al parametro FIB-4 è stata quella con FIB-4 compreso tra 1.30-2.67 (rischio intermedio di fibrosi avanzata (40)), mentre per il valore della stiffness la classe media rappresentativa è stata quella con stiffness < 8 kPa (che esclude fibrosi avanzata (40)).

La valutazione della statosi mediante FibroScan ha rilevato che la metà dei soggetti *screenati* aveva una statosi grave.

La valutazione del grado di fibrosi mediante FibroScan ha rivelato che il 70,8% dei pazienti presentava una rigidità epatica inferiore a 8 kPa, indicativa dell'assenza di fibrosi avanzata. D'altra parte, il 29,2% mostrava una rigidità epatica pari o superiore a 8 kPa, suggerendo la presenza di fibrosi da moderata ad avanzata.

Tabella II. Parametri non invasivi di steatosi epatica e fibrosi

Variabile	Pazienti (n=75)
HSI	41.7 ± 6.9
HSI < 30	-
HSI 30-36	10 (20.8)
HSI > 36	38 (79.2)
CAP (dB/m)	282.5 ± 46.2
<248	8 (16.7)
248-267	10 (20.8)
268-280	5 (10.4)
>280	25 (52.1)
FIB-4	1.23 (1.0-1.7)
FIB-4 < 1.30	26 (54.2)
FIB-4 1.30-2.67	21 (44.7)
FIB-4 > 2.67	1 (2.1)
Stiffness (kPa)	7.1 ± 2.8
<8.0	34 (70.8)
8.0-12	12 (25.0)
>12	2 (4.2)

I dati sono presentati come media ± deviazione standard o come numero di soggetti (n) e percentuale (%).

6.1.1. Livelli delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule progenitrici endoteliali nel sangue periferico

La figura sottostante permette di visualizzare la distribuzione del numero di cellule CD34+/ml nel campione preso in esame che viene approssimata bene dalla funzione log-normale (Figura 13). La mediana è risultata 2470,8 e IQR (1625.6, 3939.1)

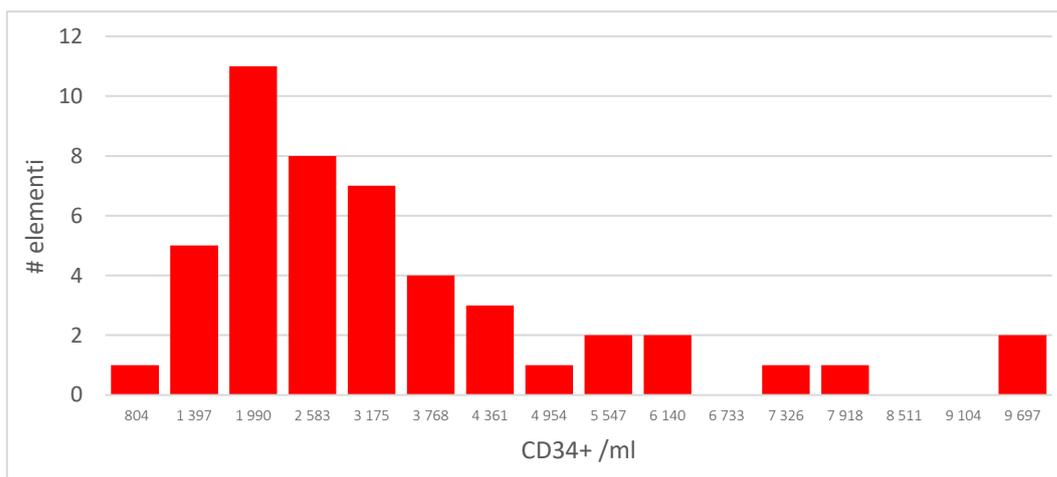


Figura 12: Distribuzione del numero di cellule staminali CD34+/ml nel sangue periferico del campione in esame

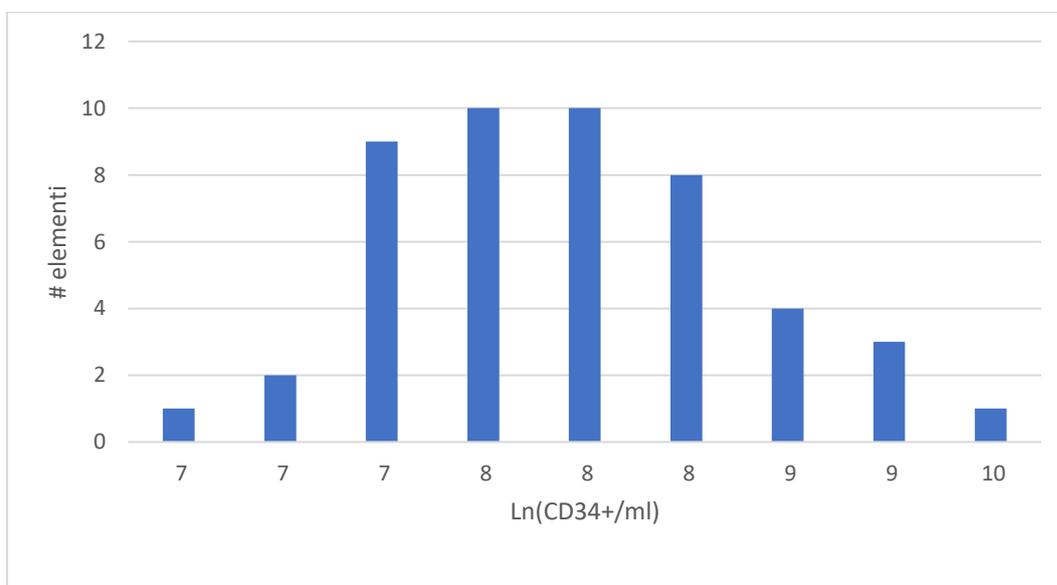


Figura 13: Distribuzione log-normale del numero di cellule staminali CD34+/ml

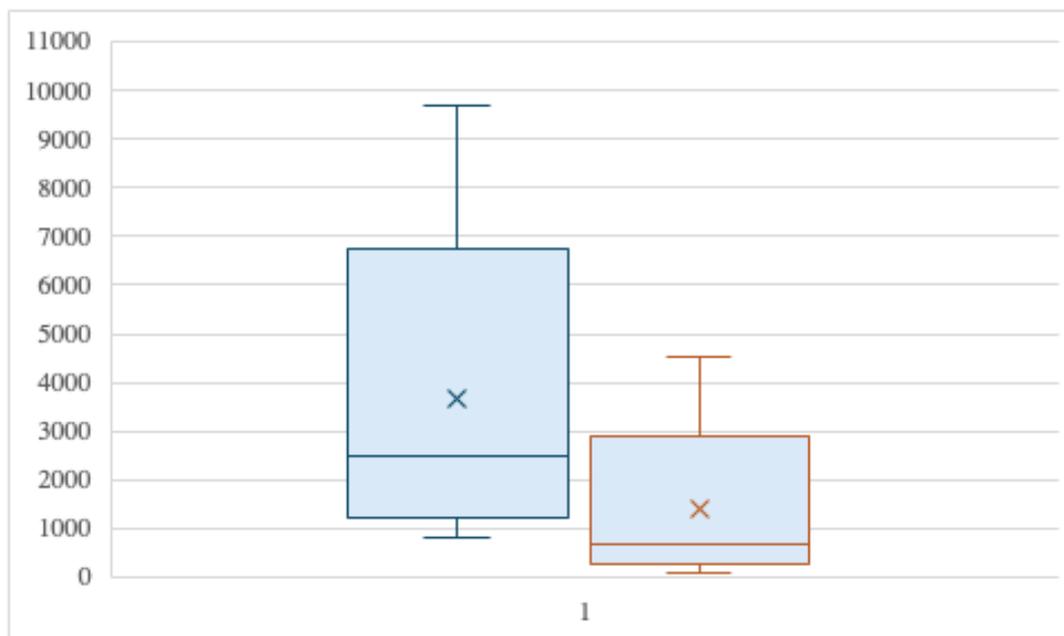


Figura 14: Box-plots del numero di cellule staminali CD34+/ml a sinistra e CD34+CD133+/ml a destra, misurate nel sangue periferico del campione in esame

Tabella III. Livelli cellule staminali circolanti e cellule progenitrici endoteliali

Variabile	Conte relative	Conte assolute
CD34+	335.9 [199.6, 506.4]	2470.8 [1625.6, 3939.1]
CD133+	96.9 [62.4, 174.7]	733.1 [459.3, 1398.3]
CD34+CD133+	84.2 [51.3, 162.7]	673.4 [468.7, 1280.8]
CD34+KDR+	2.2 [1.0, 4.0]	18.3 [7.8, 31.5]
CD133+KDR+	0.9 [0.0, 3.0]	6.8 [0.0, 26.6]
CD34+CD133+KDR	0.0 [0.0, 2.2]	0.0 [0.0, 17.0]
CD34tot	476.7 [365.3, 928.5]	3695.9 [2603.7, 6703.0]
CD34+CD45dim	216.2 [164.5, 333.7]	1806.8 [1240.7, 2338.6]
CD34+CD45neg	63.7 [40.5, 162.9]	456.5 [276.6, 1080.2]

La conta cellulare è espressa nella conta relativa come cellule/10⁶ eventi, mentre nella conta assoluta come cellule/ml (la conta cellulare assoluta è ottenuta moltiplicando la conta cellulare relativa per il numero di globuli bianchi rilevati all'emocromo di ciascun paziente). I dati sono presentati come mediana e range interquartile

6.2. Test T di Student e Test del chi-quadrato

In base al valore della stiffness epatica sono stati suddivisi i soggetti arruolati in due gruppi: il primo composto da pazienti con una stiffness assente o lieve (<8kPa) e il

secondo composto da pazienti con una stiffness moderata o grave ($\geq 8\text{kPa}$). In seguito, è stato valutato se, tra i due gruppi, esistessero differenze rilevanti in relazione alle medie delle variabili da noi valutate; nel caso di variabili continue è stato utilizzato il Test T di Student mentre nel caso di variabili dicotomiche è stato utilizzato il Test del chi-quadrato. Settando un livello di significatività statistica $p < 0.05$.

È stato determinata la presenza di una differenza statisticamente significativa tra le medie dei due gruppi (stiffness assente o lieve, stiffness moderata o grave) per quanto riguarda le variabili BMI, valori dei trigliceridi, valori di ALT, CAP, HSI.

Questa differenza statisticamente significativa è stata rilevata anche per i valori della mediana delle cellule CD133+KDR+ e CD34+CD45neg tra i due gruppi con diversa stiffness.

Tabella IV. Test di Student e il Test del chi-quadrato per analizzare le variabili considerate, confrontandole sulla base della presenza o assenza di stiffness..

Variabile	Stiffness $< 8\text{kPa}$	Stiffness $\geq 8\text{kPa}$	p
Età	65.6 \pm 7.8	62.6 \pm 8.7	0.271
Sesso (M vs F)	26(24.8) 8(9.2)	9(10.2) 5(3.8)	0.388
BMI	28.6 \pm 4.5	32.5 \pm 6.0	0.019
HbA1c	6.7 \pm 0.7	7.0 \pm 1.1	0.180
Durata di malattia	10.2 \pm 6.7	7.4 \pm 7.3	0.208
Colesterolo Tot	136.2 \pm 36.3	158.1 \pm 36.3	0.064
HDLc	50.8 \pm 15.5	49.3 \pm 11.2	0.743
LDLc	65.9 \pm 27.7	76.9 \pm 37.7	0.268
Trigliceridi	97.7 \pm 37.1	162.1 \pm 143.0	0.017
eGFR	85.1 \pm 15.2	83.2 \pm 28.4	0.758
AST	29.7 \pm 17.5	36.4 \pm 13.8	0.207
ALT	32.4 \pm 20.8	49.4 \pm 21.7	0.014
PLTs	260.4 \pm 69.3	242.7 \pm 52.6	0.395
Skin autofluorescence	2.7 \pm 0.8	2.5 \pm 0.9	0.340
CAP	271.4 \pm 44.9	313.1 \pm 35.8	0.003
FIB-4	1.4 \pm 0.7	1.5 \pm 0.6	0.878
HSI	39.9 \pm 6.3	46.1 \pm 6.5	0.004

CD34+	335.9[186.8,430.9]	314.1[224.5,603.2]	0.234
CD133+	85.7 [62.3,166.5]	112.9[93.3,174.7]	0.833
CD34+CD133+	84.2[55.9,162.7]	86.5[48.4,141.2]	0.665
CD34+KDR+	2.3[1.2,4.1]	1.6[0.9,3.7]	0.488
CD133+KDR+	0.0[0,1.8]	2.8[0.8,3.8]	0.011
CD34+CD133+KDR+	0.00[0,1.24]	0.99[0,2.97]	0.066
CD34+CD45dim	219.6[175.0,321.4]	193.5[115.6,567.2]	0.237
CD34+CD45neg	62.3[40.3,98.0]	105.2[48.8,270.2]	0.007

I dati sono presentati come media \pm deviazione standard o come numero di soggetti (n) e percentuale (%) o come mediana e [range interquartile]. La conta cellulare è espressa come cellule/ 10^6 eventi.

6.3. Analisi di regressione lineare

6.3.1. Regressione lineare univariata delle variabili associate alla stiffness

È stata effettuata un'analisi di regressione univariata per valutare quali tra le variabili considerate fossero maggiormente associate alla stiffness, considerando come livello di significatività $p=0,05$.

L'analisi ha mostrato un'associazione statisticamente significativa ($p<0,05$) tra il valore di stiffness e rispettivamente il valore di ALT, HSI e CAP. Inoltre, è stata mostrata un'associazione altamente significativa dal punto di vista statistico ($p\leq 0,001$) tra il valore di stiffness e il BMI. In particolare, l'indice di regressione B dimostra come, all'aumentare del valore delle variabili BMI, ALT, CAP e del HSI si ha un aumento lineare della stiffness.

Per quanto riguarda i diversi fenotipi cellulari analizzati, è stata mostrata un'associazione statisticamente significativa ($p<0,05$) tra il valore di stiffness e rispettivamente numero delle EPCs (CD34+CD133+KDR+) e altamente significativa ($p\leq 0,001$) tra il valore di stiffness e EPCs (CD133+KDR+). L'indice di regressione B dimostra come, all'aumentare del valore delle EPCs (CD34+CD133+KDR+, CD133+KDR+) si ha un aumento lineare della stiffness.

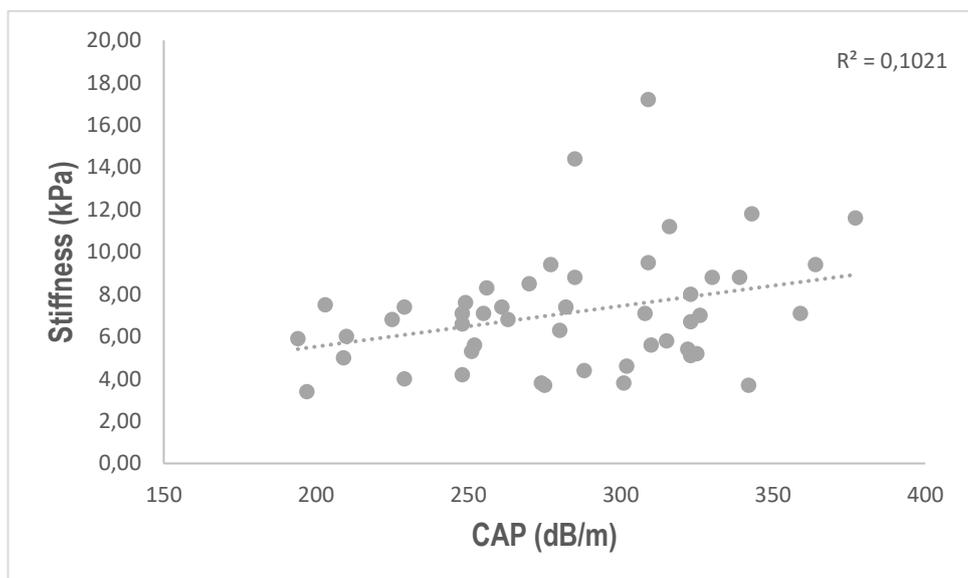
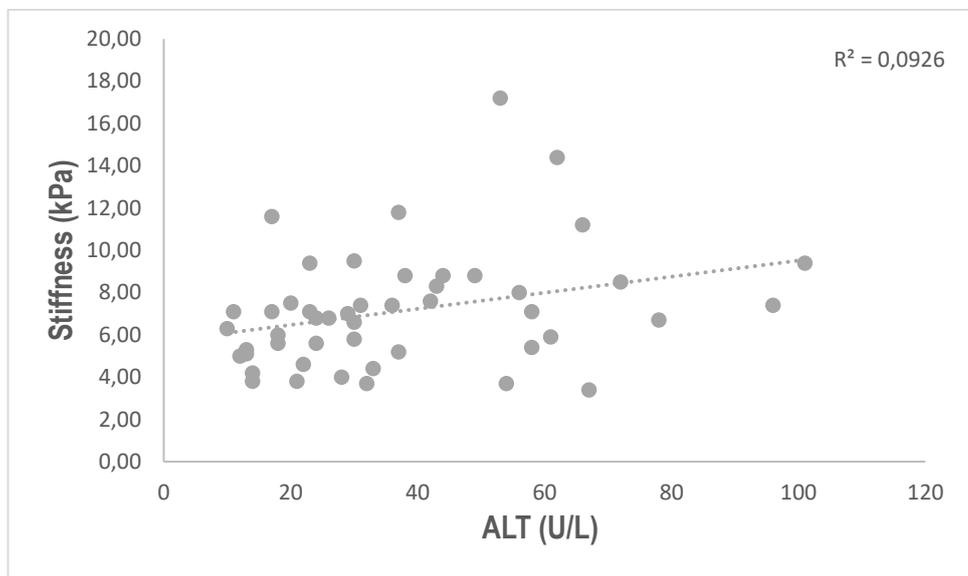
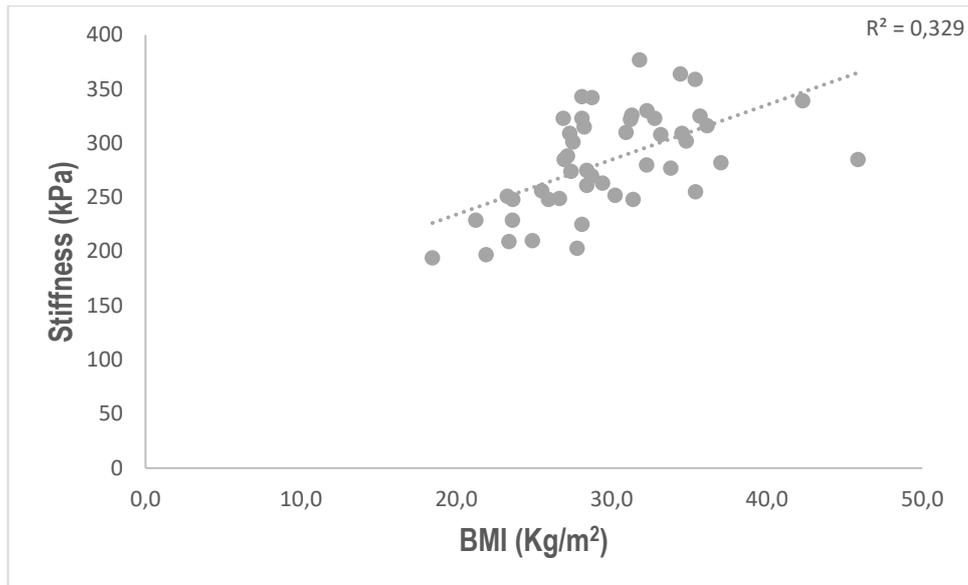
Tabella V. Regressione lineare univariata delle variabili associate alla stiffness

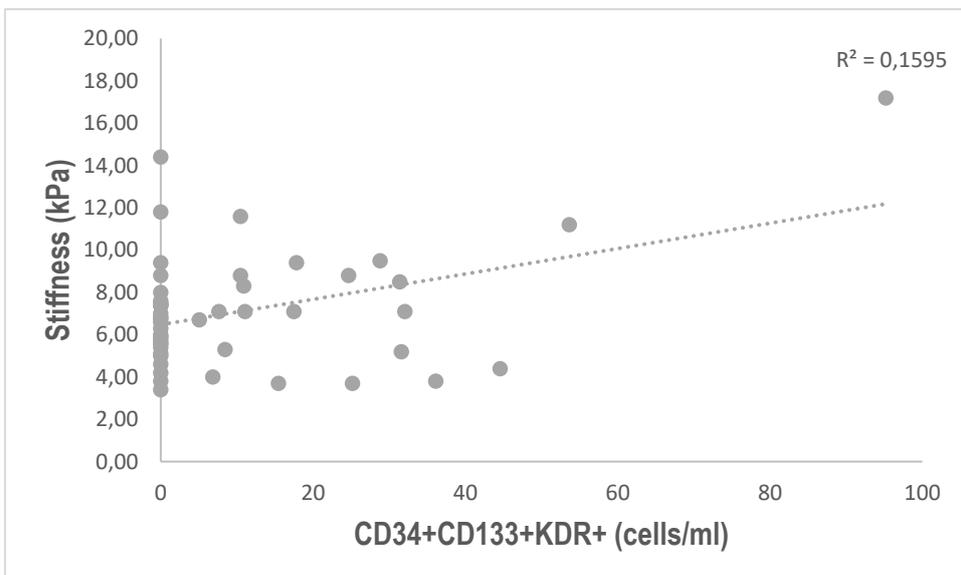
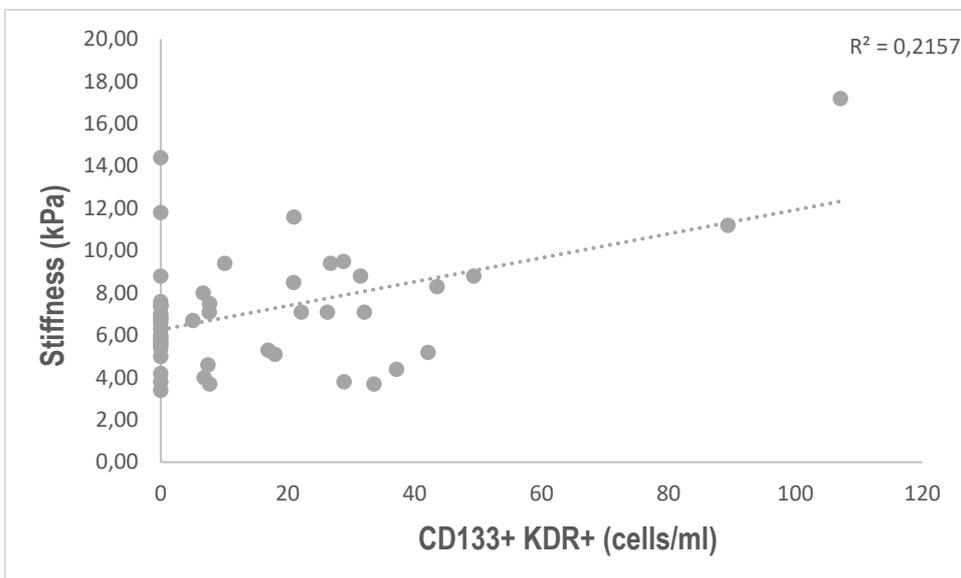
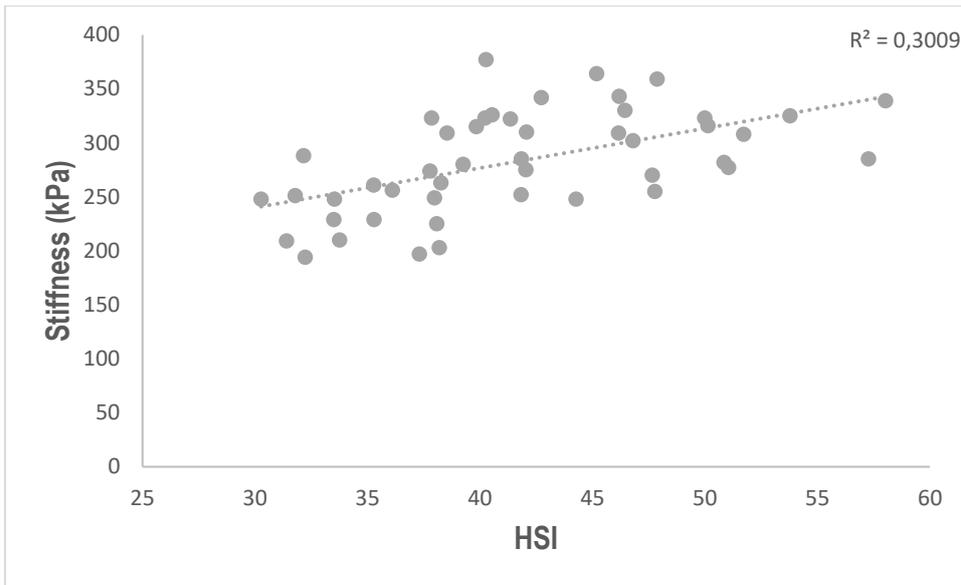
Variabile	B	95% CI	p
Età	0.1	0.2; 0.1	0.343

Sesso (M vs F)	-0.5	-2.3; 1.4	0.600
BMI	0.3	0.1; 0.4	0.001
HbA1c	-0.2	-1.2; 0.9	0.774
Durata di malattia	-0.1	-0.2; 0.0	0.101
Colesterolo Tot	0.0	0.0; 0.0	0.244
HDLc	0.0	-0.1; 0.1	0.912
LDLc	0.0	0.0; 0.0	0.404
Trigliceridi	0.0	0.0; 0.0	0.132
eGFR	0.0	0.0; 0.1	0.192
AST	0.0	0.0; 0.1	0.103
ALT	0.0	0.0; 0.1	0.035
PLTs	0.0	0.0; 0.0	0.455
Skin autofluorescence	-0.2	-1.5; 1.0	0.695
CAP	0.0	0.0; 0.0	0.027
FIB-4	0.4	-0.8; 1.6	0.508
HSI	0.2	0.1; 0.3	0.002
CD34+	0.0	0.0; 0.0	0.957
CD133+	0.0	0.0; 0.00	0.867
CD34+CD133+	0.0	0.0; 0.0	0.342
CD34+KDR+	0.0	-0.4; 0.3	0.917
CD133+KDR+	0.4	0.2; 0.6	<0.001
CD34+CD133+KDR+	0.4	0.1; 0.6	0.003
CD34+CD45dim	0.0	0.0; 0.0	0.935
CD34+CD45neg	0.0	0.0; 0.0	0.344

B= coefficiente di regressione lineare; CI= intervallo di confidenza; p= livello di significatività.

Di seguito sono riportati i grafici della regressione lineare univariata per le variabili che mostrano un'associazione statisticamente significativa con la stiffness epatica





6.3.2. Regressione lineare multivariata delle variabili associate alla stiffness

È stata costruita un'analisi multivariata con le variabili che nell'analisi univariata erano risultate associate in modo statisticamente significativo alla stiffness epatica. Qualora due variabili collineari fossero risultate entrambe avere un valore predittivo significativo all'analisi univariata, solo una tra esse è stata inclusa nel modello

Nella prima analisi è stata valutato se il BMI, l'ALT, CAP e la conta delle CD133+KDR+ erano associate in modo statisticamente significativo al valore di stiffness, quello che è risultato è che l'associazione era presente ma solo per il BMI e il valore delle cellule CD133+KDR+. È stata evidenziata una relazione di proporzionalità diretta tra BMI, il valore delle cellule CD133+KDR+ e la stiffness.

Nella seconda analisi è stata valutato se il BMI, l'ALT, CAP e la conta delle CD34+CD133+KDR erano associate in modo statisticamente significativo al valore di stiffness, quello che è risultato è che l'associazione era presente ma solo per il BMI e il valore delle cellule CD34+CD133+KDR e la relazione di proporzionalità era diretta.

Tabella VI. Regressione lineare multivariata delle variabili correlate alla stiffness

Model 1

Variabile	B	95% CI	P
BMI	0.20	0.02; 0.33	0.031
ALT	0.03	-0,00; 0.06	0.063
CAP	0.00	-0.16; 0.02	0.771
CD133+KDR (xDS)	1.08	0.28; 1.68	0.003

Model 2

Variabile	B	95% CI	P
BMI	0.19	0.03; 0.35	0.031
ALT	0.03	-0,00; 0.06	0.061
CAP	0.00	-0.02; 0,02	0.713
CD34+CD133+KDR (xDS)	0.84	0.14; 1.53	0.019

B= coefficiente di regressione lineare; CI= intervallo di confidenza; p= livello di significatività

6.3.3. Regressione lineare univariata delle variabili associate alla CAP

È stata effettuata un'analisi di regressione univariata per valutare quali tra le variabili considerate fossero maggiormente associate alla CAP, considerando come livello di significatività $p=0,05$.

Essa ha mostrato un'associazione statisticamente significativa ($p<0,05$) tra il valore di CAP e rispettivamente il valore di colesterolo totale, colesterolo LDL, stiffness e numero di cellule CD34+. Inoltre, è stata mostrata un'associazione altamente significativa dal punto di vista statistico ($p\leq 0,001$) tra il valore di CAP e il BMI e HSI.

In particolare, l'indice di regressione B dimostra come, all'aumentare del valore delle variabili colesterolo totale, colesterolo LDL, stiffness, numero di CD34+, BMI e HSI si ha un aumento lineare della CAP.

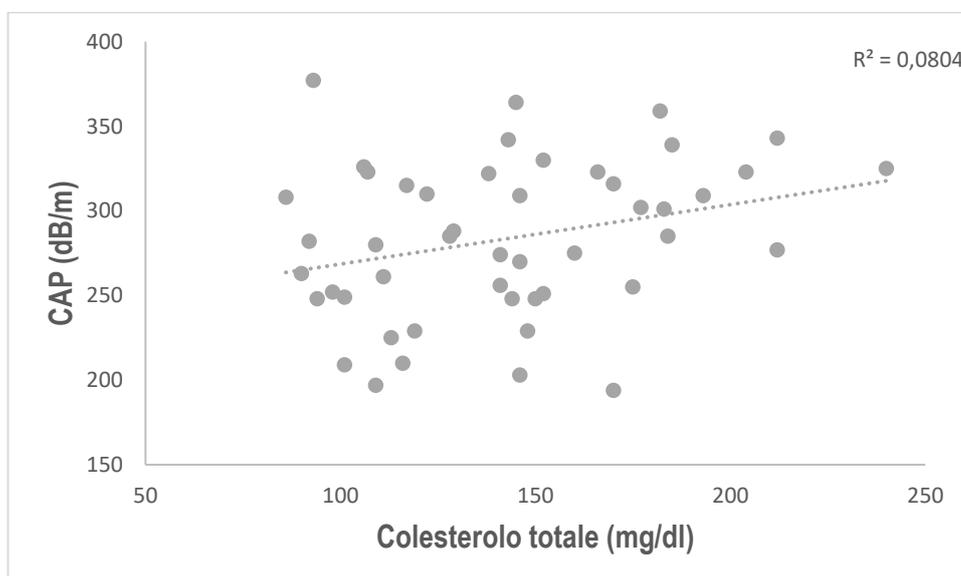
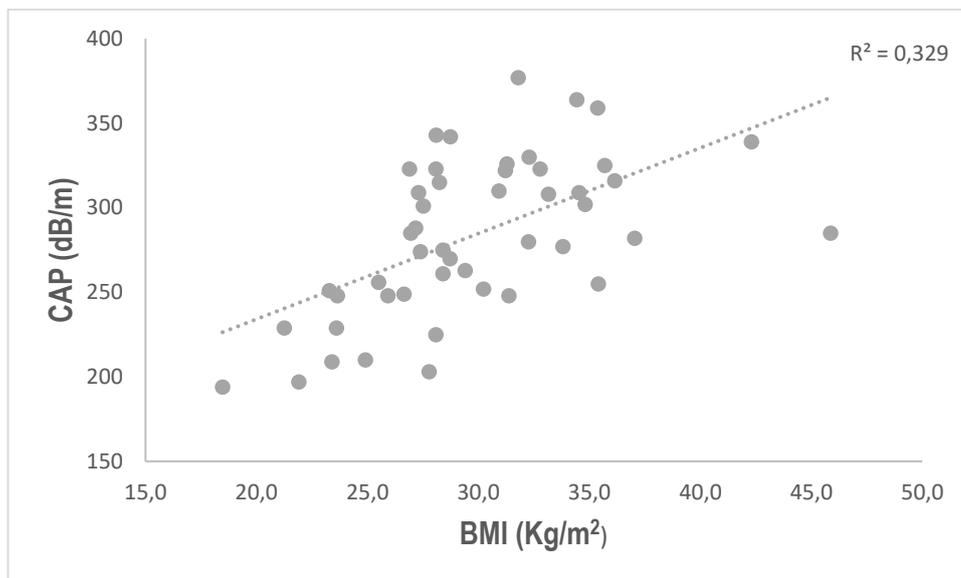
Tabella VII. Regressione lineare univariata delle variabili associate alla CAP

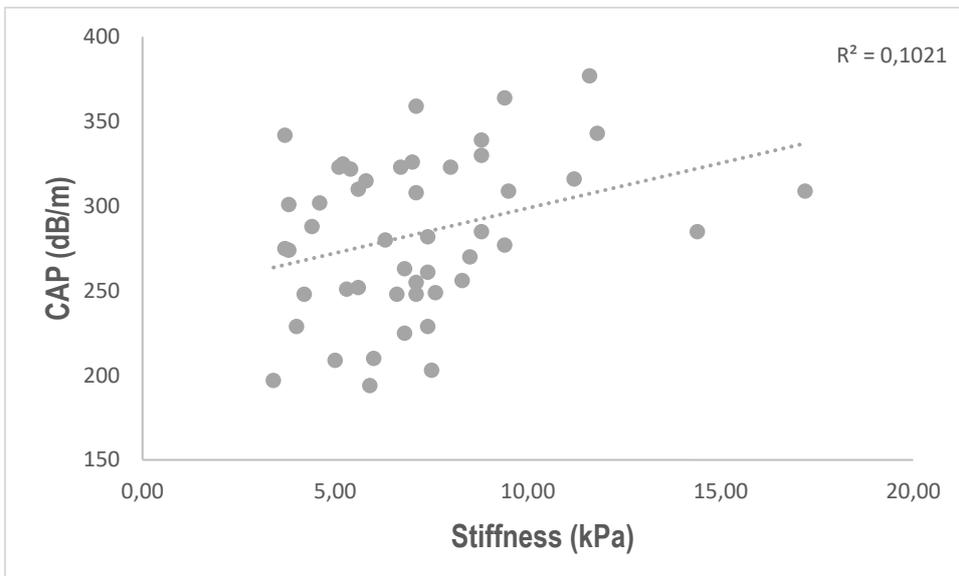
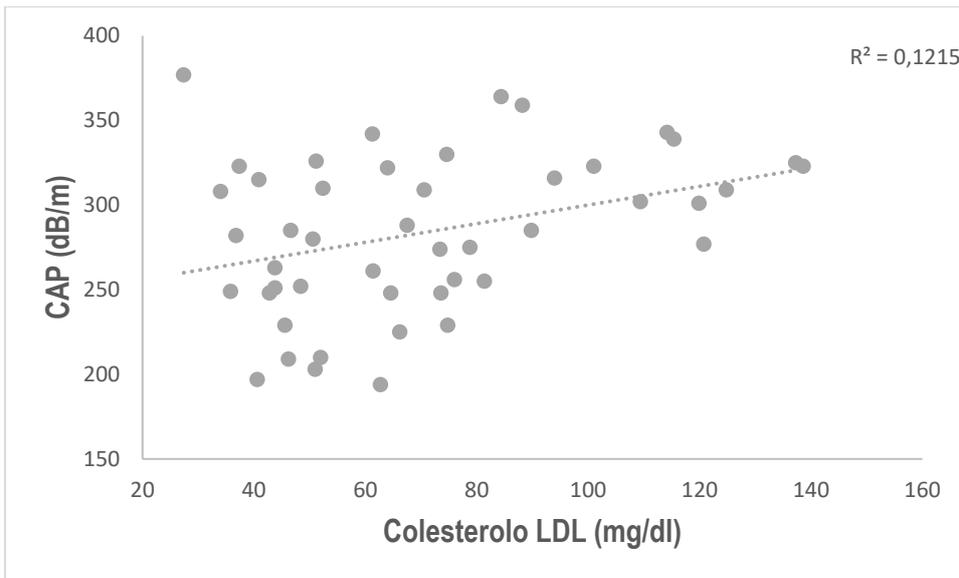
Variabile	B	95% CI	p
Età	-0.6	-2.3; 1.1	0.493
Sesso (M vs F)	-20.7	-50.6; 9.2	0.170
BMI	5.1	2.9; 7.2	<0.001
HbA1c	-5.2	-22.3; 11.9	0.544
Durata di malattia	-1.4	-3.3; 0.6	0.164
Colesterolo Tot	0.4	-0.0; 0.7	0.051
HDLc	-0.2	-1.2; 0.7	0.630
LDLc	0.6	0.1; 1.0	0.016
Trigliceridi	0.0	-0.1; 0.2	0.711
eGFR	0.0	-0.9; 0.9	0.946
AST	0.2	-1.0; 0.6	0.651
ALT	0.0	-0.6; 0.6	0.975
PLTs	-0.00	-0.2; 0.2	0.852
Skin autofluorescence	-6.1	-26.2; 14.1	0.548
Stiffness	5.3	0.6; 10.0	0.027
FIB-4	-7.5	-27.5; 12.5	0.452
HSI	3.6	2.0; 5.3	<0.001
CD34+	0.1	0.0; 0.1	0.027

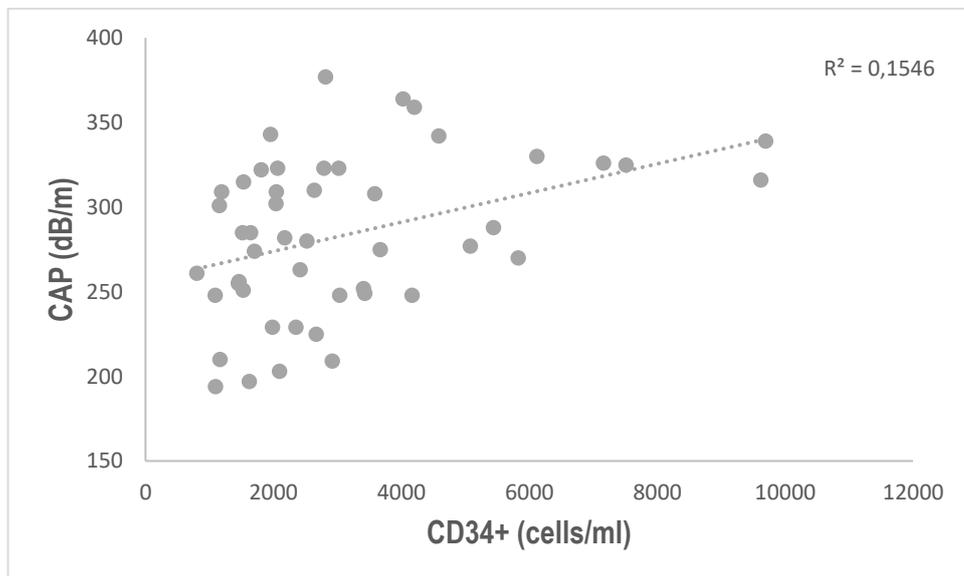
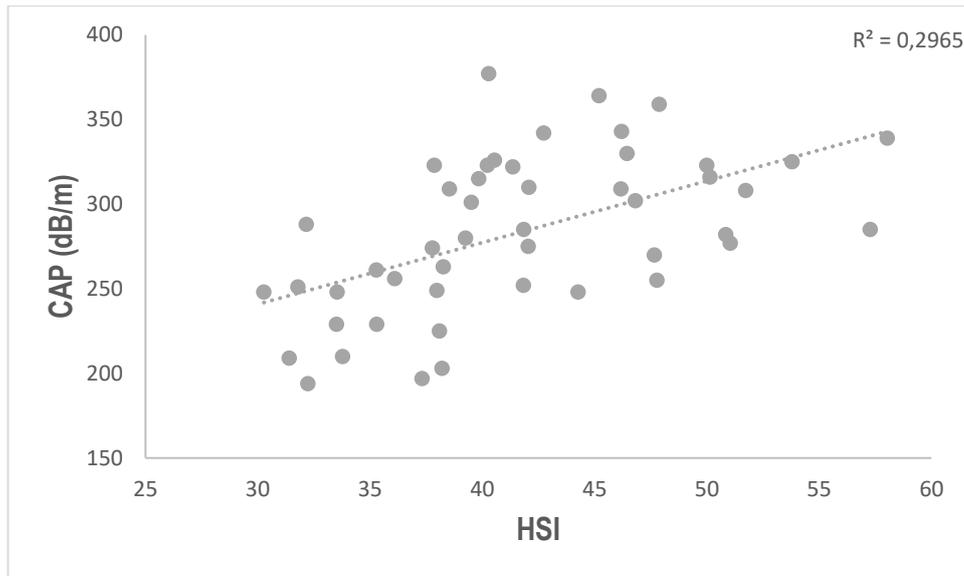
CD133+	-0.00	-0.1; 0.0	0.355
CD34+CD133+	0.1	-0.0; 0.3	0.092
CD34+KDR+	1.6	-4.0; 7.2	0.565
CD133+KDR+	3.2	-0.4; 6.9	0.082
CD34+CD133+KDR+	2.9	-1.4; 7.1	0.180
CD34+CD45dim	0.0	-0.1; 0.1	0.854
CD34+CD45neg	0.1	-0.0; 0.2	0.109

B= coefficiente di regressione lineare; CI= intervallo di confidenza; p= livello di significatività

Di seguito sono riportati i grafici della regressione lineare univariata per le variabili che mostrano un'associazione statisticamente significativa con la CAP







6.3.4. Regressione lineare multivariata delle variabili correlate alla CAP

È stata costruita un'analisi multivariata con le variabili che nell'analisi univariata erano risultate associate in modo statisticamente significativo alla CAP epatica. Qualora due variabili collineari fossero risultate entrambe avere un valore predittivo significativo all'analisi univariata, solo una tra esse è stata inclusa nel modello. È stato valutato se il BMI, il colesterolo LDL, la stiffness e le cellule CD34+ erano associate in modo statisticamente significativo al valore di CAP; non è stata rilevata nessuna associazione tra queste variabili prese in esame.

Tabella VIII. Regressione lineare multivariata delle variabili correlate alla CAP

Variabile	B	95% CI	P
BMI	3.6	0.8; 6.5	0.013
LDLc	0.2	-0.2; 0.7	0.282
Stiffness	1.9	-2.9; 6.6	0.440
CD34+ (xDS)	7.2	-5.7; 20,0	0.265

B= coefficiente di regressione lineare; CI= intervallo di confidenza; p= livello di significatività

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo primario di questo studio era individuare una associazione tra le cellule staminali ematopoietiche circolanti e il grado di fibrosi e steatosi nei pazienti arruolati. Inoltre, si è voluto valutare anche la possibile associazione tra gli AGEs tissutali, misurati attraverso l'AGE Reader, e il grado di fibrosi e steatosi epatica.

Per la fibrosi epatica è stato valutato se le mediane dei vari fenotipi delle cellule staminali ematopoietiche, misurate nel sangue periferico dei pazienti arruolati nello studio, differivano in modo significativo tra due gruppi: quelli con stiffness epatica assente o lieve (<8 kPa) e quelli con stiffness moderata o grave (≥ 8 kPa). Una differenza statisticamente significativa tra questi due gruppi è stata riscontrata per le EPCs (CD133+KDR+) e per il fenotipo delle HSPCs CD34+CD45neg. Nell'analisi di regressione lineare, è stata rilevata un'associazione tra la rigidità epatica e le EPCs con i fenotipi CD34+CD133+KDR+ e CD133+KDR+. È stato osservato che un aumento delle EPCs è correlato ad un incremento lineare della rigidità epatica.

Per quanto riguarda la steatosi è stata ricercata, attraverso l'analisi di regressione lineare, un'associazione con i livelli di cellule staminali circolanti ematopoietiche. Ciò che è stato riscontrato è la presenza di un'associazione tra grado di steatosi (misurata attraverso la CAP) e cellule staminali ematopoietiche con fenotipo CD34+. Un aumento del valore delle HSPCs CD34+ è stato correlato ad un incremento lineare della steatosi.

I risultati di questo studio sembrerebbero in contrasto con le evidenze riportate in letteratura secondo cui i pazienti con MASLD presentano un numero ridotto di EPCs circolanti e una compromissione della loro funzione adesiva e migratoria, rispetto ai pazienti senza MASLD (78). Inoltre, la letteratura indica che un incremento del grado di steatosi e dell'infiammazione è associato a una diminuzione dei livelli di EPCs circolanti. Le evidenze disponibili suggeriscono che una ridotta capacità di riparazione endoteliale, mediata dalle cellule EPCs, possa favorire la progressione della malattia aterosclerotica e incrementare il rischio di eventi cardiovascolari nei pazienti con MASLD.

In un altro studio (79) il numero delle cellule staminali endoteliali è risultato maggiore nei pazienti con MASLD, sindrome metabolica o resistenza insulinica rispetto a coloro che non presentavano tali condizioni, e il numero delle EPCs era direttamente proporzionale al grado di steatosi. Nello studio veniva ipotizzato che la MASLD rappresenti uno stadio precoce nel processo di danneggiamento endoteliale sistemico, mediato dall'iperglicemia, ipercolesterolemia e altri fattori legati ad essa. Tale danneggiamento stimola le EPCs a

riparare l'endotelio lesionato e questo viene evidenziato dall'incremento osservato nel loro numero che tende a diminuire progressivamente con la progressione della patologia.

Purtroppo, però, anche le conclusioni di questo studio sembrano in contrasto con i nostri dati. Infatti, nel nostro studio è stato rilevato un aumento di EPCs in relazione al grado di fibrosi, che rappresenta uno stadio successivo rispetto alla semplice steatosi, in cui la condizione è cronicizzata e quindi dovrebbe evidenziare una riduzione delle EPCs. Mentre nel caso della steatosi epatica si è riscontrata un'associazione solo con le HPSCs CD34+ che non avevano nessun marker di appartenenza alle EPCs.

La correlazione positiva tra CAP e HPSCs CD34+ può, però, in parte essere interpretata da ricerche in cui viene dimostrato che i macrofagi del tessuto adiposo viscerale possiedono recettori che legano i DAMP (damage-associated molecular patterns) e questa interazione tra ligando e recettore stimola la produzione e il rilascio di IL-1 β . L'IL-1 β gioca un ruolo cruciale nell'indurre la proliferazione delle cellule progenitrici mieloidi, che si differenziano successivamente in neutrofilo e monociti, contribuendo al loro volta allo stato infiammatorio (80) e causando una lieve leucocitosi (81). In un ulteriore studio (82), sono stati valutati i livelli di cellule CD34+ tra individui in sovrappeso/obesi e quelli con peso normale, escludendo soggetti con diabete o patologie cardiovascolari. È emerso che il numero di cellule CD34+ era significativamente più alto negli individui sovrappeso/obesi. Inoltre, un aumento di queste cellule era in grado di predire un peggioramento dell'adiposità addominale e lo sviluppo della sindrome metabolica, oltre ad un deterioramento della sensibilità all'insulina. Lo studio suggerisce che l'incremento delle cellule CD34+ potrebbe rappresentare una conseguenza indiretta dell'espansione del tessuto adiposo viscerale infiammato, manifestandosi anche anni prima dell'insorgenza della resistenza all'insulina e della sindrome metabolica. Questo studio è molto interessante e permette in parte di spiegare la correlazione positiva trovata tra le cellule CD34+ e la CAP, purtroppo però la nostra popolazione era costituita da pazienti tutti affetti da DMT2 che in altri studi (81) viene considerato un fattore che correla negativamente con il livello di cellule staminali ematopoietiche nel sangue.

La discrepanza tra i nostri risultati e la letteratura potrebbe essere attribuibile alla limitata dimensione del campione, alla presenza di outliers e alla rarità delle cellule staminali ematopoietiche circolanti, fattori che potrebbero aver influito sui risultati ottenuti. Va notato che la letteratura disponibile su questa correlazione è scarsa, nonostante sia un'area di ricerca importante. Inoltre, l'incertezza riguardo al processo fisiopatologico tramite cui

MASLD/MASH incrementa il rischio cardiovascolare e la sua progressione nel tempo contribuisce alla variabilità dei risultati.

I prodotti avanzati di glicazione (AGEs) vengono degradati in modo inefficace, determinando un aumento stabile della loro concentrazione nell'organismo, che può attivare vie pro-infiammatorie e pro-fibrotiche. L'interazione tra gli AGEs e il recettore RAGE innesca una cascata di segnalazione che promuove l'espressione di vari geni regolati da NF- κ B, responsabili della produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie, come il TNF- α , e molecole di adesione. È stato osservato che il recettore RAGE attivato è presente in diversi tipi cellulari, tra cui epatociti, cardiomiociti, cellule endoteliali vascolari, cellule renali e numerose cellule del sistema immunitario (83). Tra i vari AGEs, la N ϵ -carboximetil lisina (CML) sembra avere un ruolo cruciale; legandosi a RAGE, compromette le difese antiossidanti cellulari e aumenta la produzione di ROS. Questa interazione gioca un ruolo significativo nello sviluppo dell'aterosclerosi. Inoltre, gli AGEs si pensa possano esercitare un effetto rilevante anche sulle cellule epatiche, promuovendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie e contribuendo alla formazione della fibrosi epatica (84). In uno studio (84), è stato rilevato che l'accumulo di CML nel tessuto epatico di pazienti con MASLD aumenta significativamente con il progredire della steatosi epatica. Queste considerazioni ci hanno portato a valutare se fosse possibile evidenziare un'associazione tra gli AGEs, misurati mediante l'AGEs Reader, e la steatosi e la fibrosi epatica dei pazienti arruolati nello studio, che purtroppo non è stata riscontrata. Probabilmente, se c'è un'associazione, quest'ultima deve essere complessa e dipendere anche da altri fattori, che giustifichino da una parte la diversa prevalenza di MASLD nei pazienti con diabete e dall'altra la diversa velocità di progressione della stessa in questa popolazione.

Una risposta più chiara su tutti questi aspetti potrà venire dalla prosecuzione della ricerca iniziata da questa Tesi, con un significativo aumento del campione analizzato.

Come obiettivi secondari si è poi valutato se esistessero dei fattori che influenzassero la misurazione della stiffness epatica e della CAP.

Per quanto riguarda la fibrosi epatica è stato quindi valutato se le medie delle variabili da noi considerate differivano in modo significativo tra due gruppi di pazienti, divisi in base al grado di stiffness epatica, classificata come assente o lieve (<8kPa) e moderata o grave (\geq 8kPa). Le variabili la cui media differiva in maniera statisticamente significativa tra i due gruppi sono state BMI, valori dei trigliceridi, CAP, HSI e infine ALT. Attraverso l'analisi di

regressione lineare univariata l'associazione tra stiffness e le variabili BMI, CAP, HSI e ALT è stata riconfermata; inoltre, per tutte le variabili si è osservata una proporzionalità diretta; quindi, all'aumentare del valore della variabile corrisponde un aumento del valore della stiffness.

In alcuni studi viene riferito che la steatosi (85), un alto indice di massa corporea (86) e l'insulino-resistenza (87), che favorisce l'accumulo di grasso all'interno degli epatociti inducendo quindi steatosi, sono in grado di influenzare le misurazioni della fibrosi effettuate tramite il FibroScan. In un ulteriore studio (88) è emerso che la presenza di steatosi severa era associata alla stiffness ed interferiva con le prestazioni diagnostiche del FibroScan nei pazienti affetti da MASLD/MASH, portando a sovrastime della fibrosi epatica. In questo studio si ipotizzava inoltre che la presenza di gocce lipidiche negli epatociti influenzasse la struttura architettonica del fegato alterando il tempo di propagazione dell'onda vibratoria emessa dallo strumento. Questo potrebbe quindi spiegare le associazioni da noi riscontrate tra stiffness e CAP, ma anche BMI e HSI.

Tuttavia, non in tutti i lavori scientifici viene confermato quello che è stato precedentemente detto; alcuni papers (89,56) affermano che la misura della stiffness non sia influenzata né dalla CAP né dal BMI. Anche per quanto riguarda i valori di ALT che si rialzano in condizione di necroinfiammazione epatica, essendo l'ALT più specifica per il danno epatico rispetto ad AST, le informazioni in letteratura a riguardo sono discordanti (88,89,56).

Per quanto riguarda la steatosi epatica, si è valutata la possibile presenza di un'associazione tra le variabili da noi considerate e la CAP attraverso la regressione lineare univariata. Le variabili che sono risultate essere associate alla CAP sono state BMI, colesterolo totale, colesterolo LDL, stiffness, e HSI; per ognuna di queste la proporzionalità è diretta. In letteratura è nota l'associazione tra CAP e BMI (56,90); la capacità di differenziare correttamente il grado di steatosi attraverso la CAP diminuisce notevolmente nei soggetti obesi; questo è dovuto all'aumento del tessuto sottocutaneo che è in grado di influenzare le misurazioni della CAP (90). Ulteriori associazioni note sono tra CAP e colesterolo totale, ma non tra CAP e colesterolo LDL e l'associazione tra CAP e stiffness epatica rimane non chiara (91,90)

In generale l'eterogeneità dei risultati tra i diversi studi scientifici può essere spiegata dalla mancata chiarezza riguardo la fisiopatologia di questa condizione: infatti è noto che la MASLD/MASH si sviluppa in un contesto dismetabolico dove l'insulino-resistenza favorisce accumulo di grasso a livello epatico che a sua volta può causare infiammazione e danno epatocitario e successivamente deposizione di tessuto fibrotico; tuttavia non è chiaro

perché alcuni pazienti progrediscono verso fibrosi avanzata e addirittura cirrosi e altri invece no. Inoltre, tra i pazienti che progrediscono la cinetica di progressione non è facilmente prevedibile. La mancata concordanza riguardo all'associazione tra stiffness e CAP nei vari studi mette in dubbio il ruolo della steatosi stessa come condizione necessaria e sufficiente per lo sviluppo di fibrosi.

Nello studio, la prevalenza della MASLD è risultata pari all'83,3% (valutata come CAP \geq 248dB/m), mentre la prevalenza della MASH e quindi di fibrosi epatica da moderata ad avanzata (stiffness >8 kPa), è stata del 29% tra i pazienti esaminati. Questi valori possono essere confrontati con le prevalenze riportate in letteratura della MASLD e della MASH, determinate mediante risonanza magnetica in pazienti affetti da diabete, che sono rispettivamente risultate del 69,6% e del 13,6% (51). In un altro studio (92) condotto mediante FibroScan su 561 pazienti affetti da DMT2 e non, utilizzando cut-off leggermente diversi (per MASLD, CAP \geq 274 dB/m e per MASH, stiffness \geq 7kPa) le prevalenze si sono attestate attorno al 70% per la MASLD e 21% per la MASH. Le prevalenze osservate nel nostro studio risultano quindi superiori. Questo potrebbe essere dovuto alla ridotta dimensione del campione, al fatto che tutti i nostri pazienti fossero affetti da DMT2, condizione che predispone allo sviluppo della MASLD/MASH; e infine una volta rilevata la presenza di steatosi o fibrosi, i pazienti da noi esaminati dovevano sottoporsi a ulteriori esami per escludere la concomitanza di altre noxae patologiche che avrebbero potuto influenzare i risultati. Inoltre, è riportato in letteratura (88) che il FibroScan tenda a sovrastimare la rigidità epatica nei casi di steatosi grave, condizione riscontrata in oltre la metà dei pazienti dello studio. In ogni modo, il FibroScan ha un tasso più alto di falsi positivi rispetto ai falsi negativi e un valore predittivo negativo (VPN) superiore al valore predittivo positivo (VPP) (93).

È stata valutata l'affidabilità dei NITs per stimare il rischio individuale di steatosi grave e fibrosi avanzata. Nel nostro studio, HSI tende a sovrastimare la prevalenza della steatosi grave. Mentre l'HSI ha stimato che il 79,2% dei partecipanti allo studio presentava steatosi grave, la valutazione con VCTE ha riscontrato questa condizione solo nel 52% dei casi. Questi risultati sono coerenti con le indicazioni di letteratura (94), che indicano l'HSI come un buon test di screening, con una sensibilità intorno al 96%, ma con una bassa specificità (44%). FIB-4 evidenziava un rischio intermedio ed elevato di fibrosi avanzata rispettivamente nel 44% e nel 2% dei casi; tramite valutazione attraverso il FibroScan è stata individuata una fibrosi moderata nel 25% dei soggetti mentre una fibrosi avanzata nel 4% dei soggetti. In letteratura (95,96) l'indice FIB-4 presenta un elevato VPN nella diagnosi

della fibrosi epatica avanzata, ma un VPP non altrettanto elevato; pertanto, è efficace nell'escludere la fibrosi epatica avanzata anziché nel diagnosticarla. Inoltre, l'indice FIB-4 aumenta con l'età, suggerendo la necessità di utilizzare diversi cut-off in base all'età del paziente. In ogni caso, questo test si dimostra utile come strumento di screening preliminare. In definitiva, i nostri risultati sono in linea con quanto riportato nella letteratura scientifica.

In conclusione, nel nostro studio quattro pazienti su cinque presentavano steatosi epatica, mentre uno su quattro presentava fibrosi epatica di grado moderato o avanzato. Questi risultati sono coerenti con le evidenze scientifiche esistenti che sottolineano l'importanza dell'integrazione del FibroScan nel processo diagnostico e nel monitoraggio dei pazienti con DMT2, data l'elevata prevalenza e la natura progressiva della MASLD/MASH.

8. BIBLIOGRAFIA

1. IDF Diabetes Atlas 10th edition [Internet]. Available from: www.diabetesatlas.org
2. Fadini GP, Albiero M. Impaired Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Traffic and Multi-organ Damage in Diabetes. Vol. 40, Stem Cells. Oxford University Press; 2022. p. 716–23.
3. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. Diabetes Care. 2022 Jan 1;45:S17–38.
4. IDF DIABETES ATLAS 2017.
5. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract. 2019 Nov 1;157.
6. Steck AK, Vehik K, Bonifacio E, Lernmark A, Ziegler AG, Hagopian WA, et al. Predictors of Progression From the Appearance of Islet Autoantibodies to Early Childhood Diabetes: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY). Diabetes Care. 2015 May 1;38(5):808–13.
7. Fadini GP, Bonora BM, Avogaro A. SGLT2 inhibitors and diabetic ketoacidosis: data from the FDA Adverse Event Reporting System. Diabetologia. 2017 Aug 12;60(8):1385–9.
8. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes [Internet]. Vol. 26, Clinical Diabetes •. 2008. Available from: <http://clinical.diabetesjournals.org>
9. Fadini GP, DiPersio JF. Diabetes mellitus as a poor mobilizer condition. Vol. 32, Blood Reviews. Churchill Livingstone; 2018. p. 184–91.
10. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). The Lancet. 1998 Sep;352(9131):837–53.
11. London SL. DOES ALDOSE REDUCTASE HAVE A ROLE IN THE DEVELOPMENT OF THE OCULAR COMPLICATIONS OF DIABETES?
12. Saad MI, Abdelkhalek TM, Saleh MM, Kamel MA, Youssef M, Tawfik SH, et al. Insights into the molecular mechanisms of diabetes-induced endothelial dysfunction: focus on oxidative stress and endothelial progenitor cells. Vol. 50, Endocrine. Humana Press Inc.; 2015. p. 537–67.
13. Watkins PJ. ABC of diabetes: Retinopathy. BMJ. 2003 Apr 26;326(7395):924–6.

14. Pugliese G, Solini A, Bonora E, Fondelli C, Orsi E, Nicolucci A, et al. Chronic kidney disease in type 2 diabetes: Lessons from the Renal Insufficiency And Cardiovascular Events (RIACE) Italian Multicentre Study. Vol. 24, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. Elsevier; 2014. p. 815–22.
15. Bonora E, Trombetta M, Dauriz M, Travia D, Cacciatori V, Brangani C, et al. Chronic complications in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: Prevalence and related metabolic and clinical features: The Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 9. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 Aug 20;8(1).
16. Tuttle KR, Brosius FC, Cavender MA, Fioretto P, Fowler KJ, Heerspink HJL, et al. SGLT2 Inhibition for CKD and Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: Report of a Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation. *Diabetes*. 2021 Jan 1;70(1):1–16.
17. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic Neuropathies. *Diabetes Care*. 2005 Apr 1;28(4):956–62.
18. Boyle PJ. Diabetes Mellitus and Macrovascular Disease: Mechanisms and Mediators. *Am J Med*. 2007 Sep;120(9):S12–7.
19. Leon BM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*. 2015;6(13):1246.
20. Holman R, Turner R, Stratton I, Cull C, Frighi V, Manley S, et al. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. *Br Med J*. 1998 Sep 12;317(7160):713–20.
21. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, W Neil HA, Livingstone SJ, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2004 Aug;364(9435):685–96.
22. Schmidt AM. Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019 Apr;39(4):558–68.
23. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001 Feb 5;44(2):129–46.
24. Maran A, Morieri ML, Falaguasta D, Avogaro A, Fadini GP. The Fast-Glycator Phenotype, Skin Advanced Glycation End Products, and Complication Burden Among People With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2022 Oct 1;45(10):2439–44.

25. Ahmed N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 Jan;67(1):3–21.
26. Elsayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care.* 2023 Jan 1;46(sup):S140–57.
27. Gorter KJ, Alexander van de Laar F, H Janssen PG, Houweling ST, H M Rutten GE. Diabetes: glycaemic control in type 2 (drug treatments). 2010.
28. García-Molina L, Lewis-Mikhael AM, Riquelme-Gallego B, Cano-Ibáñez N, Oliveras-López MJ, Bueno-Cavanillas A. Improving type 2 diabetes mellitus glycaemic control through lifestyle modification implementing diet intervention: a systematic review and meta-analysis. Vol. 59, *European Journal of Nutrition.* Springer; 2020. p. 1313–28.
29. Aas AM, Axelsen M, Churuangasuk C, Hermansen K, Kendall CWC, Kahleova H, et al. Evidence-based European recommendations for the dietary management of diabetes. *Diabetologia.* 2023 Jun 1;66(6):965–85.
30. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):854–65.
31. Davies MJ, Aroda VR, Collins BS, Gabbay RA, Green J, Maruthur NM, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia.* 2022 Dec 24;65(12):1925–66.
32. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *The Lancet.* 2005 Oct;366(9493):1279–89.
33. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine.* 2015 Nov 26;373(22):2117–28.
34. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondu N, et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine.* 2017 Aug 17;377(7):644–57.

35. Matthews DR, Paldánus PM, Proot P, Chiang Y, Stumvoll M, Del Prato S. Glycaemic durability of an early combination therapy with vildagliptin and metformin versus sequential metformin monotherapy in newly diagnosed type 2 diabetes (VERIFY): a 5-year, multicentre, randomised, double-blind trial. *The Lancet*. 2019 Oct;394(10208):1519–29.
36. Binet Q, Lanthier N, Loumaye A, Preumont V, Thissen JP, Hermans MP. Non-invasive screening, staging and management of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) in type 2 diabetes mellitus patients : what do we know so far ? *Acta Gastroenterol Belg*. 2022 Apr 1;85(2):346–57.
37. Rinella ME, Lazarus J V., Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology*. 2023 Dec;78(6):1966–86.
38. Watt MJ, Miotto PM, De Nardo W, Montgomery MK. The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocr Rev*. 2019 Oct 1;40(5):1367–93.
39. Rhee EJ. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes: An epidemiological perspective. Vol. 34, *Endocrinology and Metabolism*. Korean Endocrine Society; 2019. p. 226–33.
40. Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, Abdelmalek MF, Caldwell S, Barb D, et al. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2023 May;77(5):1797–835.
41. Morieri ML, Vitturi N, Avogaro A, Targher G, Fadini GP, Consoli A, et al. Prevalence of hepatic steatosis in patients with type 2 diabetes and response to glucose-lowering treatments. A multicenter retrospective study in Italian specialist care. *J Endocrinol Invest*. 2021 Sep 1;44(9):1879–89.
42. PARK SH, KIM BI, YUN JW, KIM JW, PARK D IL, CHO YK, et al. Insulin resistance and C-reactive protein as independent risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in non-obese Asian men. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Jun 18;19(6):694–8.
43. Choe YG, Jin W, Cho YK, Chung WG, Kim HJ, Jeon WK, et al. Apolipoprotein B / AI ratio is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease in nondiabetic subjects. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Apr 25;28(4):678–83.

44. Jeon WS, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, et al. Association of Serum Adipocyte-Specific Fatty Acid Binding Protein with Fatty Liver Index as a Predictive Indicator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinology and Metabolism*. 2013;28(4):283.
45. Seo YY, Cho YK, Bae JC, Seo MH, Park SE, Rhee EJ, et al. Tumor Necrosis Factor- α as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. *Endocrinology and Metabolism*. 2013;28(1):41.
46. Sung KC, Ryu S, Lee JY, Kim JY, Wild SH, Byrne CD. Effect of exercise on the development of new fatty liver and the resolution of existing fatty liver. *J Hepatol*. 2016 Oct;65(4):791–7.
47. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007 Aug;30(8):2119–21.
48. Caussy C, Aubin A, Loomba R. The Relationship Between Type 2 Diabetes, NAFLD, and Cardiovascular Risk. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11892-021-01383-7>
49. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004 Dec;40(6):1387–95.
50. Younossi ZM, Tampi RP, Racila A, Qiu Y, Burns L, Younossi I, et al. Economic and clinical burden of nonalcoholic steatohepatitis in patients with type 2 diabetes in the U.S. *Diabetes Care*. 2020 Feb 1;43(2):283–9.
51. Mittal N, Siddiqi H, Madamba E, Richards L, Bettencourt R, Ajmera V, et al. A prospective study on the prevalence of at-risk <sc>MASH</sc> in patients with type 2 diabetes mellitus in the United States. *Aliment Pharmacol Ther*. 2024 Jun 8;59(12):1571–8.
52. Heyens LJM, Busschots D, Koek GH, Robaey G, Francque S. Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Apr 14;8.
53. Archer AJ, Belfield KJ, Orr JG, Gordon FH, Abeysekera KW. EASL clinical practice guidelines: non-invasive liver tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Frontline Gastroenterol*. 2022 Sep;13(5):436–9.
54. VCTE TM.

55. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.* 2003 Dec;29(12):1705–13.
56. Oeda S, Tanaka K, Oshima A, Matsumoto Y, Sueoka E, Takahashi H. Diagnostic accuracy of fibroscan and factors affecting measurements. Vol. 10, *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020.
57. Foucher J, Castéra L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Apr;18(4):411–2.
58. Bonder A, Afdhal N. Utilization of FibroScan in clinical practice. *Curr Gastroenterol Rep.* 2014 Feb 1;16(2).
59. Chowdhury AB, Mehta KJ. Liver biopsy for assessment of chronic liver diseases: a synopsis. *Clin Exp Med.* 2022 Feb 22;23(2):273–85.
60. Yoneda M, Fujita K, Inamori M, Nakajima A, Tamano M, Hiraishi H. Transient elastography in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Gut.* 2007 Apr 5;56(9):1330–1.
61. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Vol. 6, *Nature Reviews Immunology*. 2006. p. 93–106.
62. Jurecic R. Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2019. p. 195–211.
63. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):836–41.
64. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005 Jul 1;121(7):1109–21.
65. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity.* 2006 Dec;25(6):977–88.
66. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 2008 Mar 27;452(7186):442–7.

67. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701–5.
68. Fadini GP, Mehta A, Dhindsa DS, Bonora BM, Sreejit G, Nagareddy P, et al. Circulating stem cells and cardiovascular outcomes: From basic science to the clinic. Vol. 41, *European Heart Journal*. Oxford University Press; 2020. p. 4271–82.
69. Chien KR. Lost in translation. *Nature*. 2004 Apr 21;428(6983):607–8.
70. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*. 2004 Dec 2;432(7017):625–30.
71. Ballard VLT, Edelberg JM. Stem Cells and the Regeneration of the Aging Cardiovascular System. *Circ Res*. 2007 Apr 27;100(8):1116–27.
72. Al Mheid I, Hayek SS, Ko YA, Akbik F, Li Q, Ghasemzadeh N, et al. Age and Human Regenerative Capacity Impact of Cardiovascular Risk Factors. *Circ Res*. 2016 Sep 16;119(7):801–9.
73. Rustemeyer P, Wittkowski W, Greve B, Stehling M. Flow-cytometric identification, enumeration, purification, and expansion of CD133+ and VEGF-R2+ endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Immunoassay Immunochem*. 2006 Dec 1;28(1):13–23.
74. Fadini GP, Ciciliot S, Albiero M. Concise Review: Perspectives and Clinical Implications of Bone Marrow and Circulating Stem Cell Defects in Diabetes. *Stem Cells*. 2017 Jan 1;35(1):106–16.
75. Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, Mangialardi G, Katare RG, Caporali A, et al. Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Mar;30(3):498–508.
76. Da Moura Semedo C, Webb M, Waller H, Khunti K, Davies M. Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: clinical relevance and limitations. *Postgrad Med J*. 2017 May 1;93(1099):289–94.
77. Hosseini M sadat, Razavi Z, Ehsani AH, Firooz A, Afazeli S. Clinical significance of non-invasive skin autofluorescence measurement in patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2021 Dec;42:101194.
78. Chiang CH, Huang PH, Chung FP, Chen ZY, Leu HB, Huang CC, et al. Decreased Circulating Endothelial Progenitor Cell Levels and Function in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2012 Feb 16;7(2):e31799.

79. Gutiérrez-Grabe Y, Gavilanes-Espinar JG, Masso-Rojas FA, Sánchez-Valle V, Páez-Arenas A, Ponciano-Rodríguez G, et al. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. The role of endothelial progenitor cells ♦. *Ann Hepatol.* 2013 Nov;12(6):908–14.
80. Nagareddy PR, Kraakman M, Masters SL, Storzaker RA, Gorman DJ, Grant RW, et al. Adipose Tissue Macrophages Promote Myelopoiesis and Monocytosis in Obesity. *Cell Metab.* 2014 May;19(5):821–35.
81. Fadini GP, Marcuzzo G, Marescotti MC, de Kreutzenberg SV, Avogaro A. Elevated white blood cell count is associated with prevalence and development of the metabolic syndrome and its components in the general population. *Acta Diabetol.* 2012 Dec 24;49(6):445–51.
82. Fadini GP, Bonora BM, Marcuzzo G, Marescotti MC, Cappellari R, Pantano G, et al. Circulating Stem Cells Associate With Adiposity and Future Metabolic Deterioration in Healthy Subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Dec 1;100(12):4570–8.
83. Petriv N, Neubert L, Vatashchuk M, Timrott K, Suo H, Hochnadel I, et al. Increase of α -dicarbonyls in liver and receptor for advanced glycation end products on immune cells are linked to nonalcoholic fatty liver disease and liver cancer. *Oncoimmunology.* 2021 Jan 8;10(1).
84. Pang Q, Sun Z, Shao C, Cai H, Bao Z, Wang L, et al. CML/RAGE Signal Bridges a Common Pathogenesis Between Atherosclerosis and Non-alcoholic Fatty Liver. *Front Med (Lausanne).* 2020 Nov 6;7.
85. Macaluso FS, Maida M, Cammà C, Cabibbo G, Cabibi D, Alduino R, et al. Steatosis affects the performance of liver stiffness measurement for fibrosis assessment in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2014 Sep;61(3):523–9.
86. Wong GL, Chan HL, Choi PC, Chan AW, Lo AO, Chim AM, et al. Association Between Anthropometric Parameters and Measurements of Liver Stiffness by Transient Elastography. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2013 Mar;11(3):295-302.e3.
87. PETTA S, CAMMÀ C, DI MARCO V, CALVARUSO V, ENEA M, BRONTE F, et al. Insulin resistance is a major determinant of liver stiffness in nondiabetic patients with HCV genotype 1 chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 Sep 18;30(6):603–13.

88. Petta S, Maida M, Macaluso FS, Di Marco V, Cammà C, Cabibi D, et al. The severity of steatosis influences liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2015 Oct 20;62(4):1101–10.
89. Wong VWS, Vergniol J, Wong GLH, Foucher J, Chan HLY, Le Bail B, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):454–62.
90. Chan W, Nik Mustapha NR, Mahadeva S. Controlled attenuation parameter for the detection and quantification of hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jul 15;29(7):1470–6.
91. Myers RP, Pollett A, Kirsch R, Pomier-Layrargues G, Beaton M, Levstik M, et al. Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography. *Liver International*. 2012 Jul 21;32(6):902–10.
92. Lomonaco R, Godinez Leiva E, Brill F, Shrestha S, Mansour L, Budd J, et al. Advanced Liver Fibrosis Is Common in Patients With Type 2 Diabetes Followed in the Outpatient Setting: The Need for Systematic Screening. *Diabetes Care*. 2021 Feb 1;44(2):399–406.
93. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia*. 2016 Jun 7;59(6):1121–40.
94. Abdelhameed F, Kite C, Lagojda L, Dallaway A, Chatha KK, Chaggar SS, et al. Non-invasive Scores and Serum Biomarkers for Fatty Liver in the Era of Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A Comprehensive Review From NAFLD to MAFLD and MASLD. *Curr Obes Rep*. 2024 May 29;
95. Kjaergaard M, Lindvig KP, Thorhauge KH, Andersen P, Hansen JK, Kastrup N, et al. Using the ELF test, FIB-4 and NAFLD fibrosis score to screen the population for liver disease. *J Hepatol*. 2023 Aug;79(2):277–86.
96. Sumida Y, Yoneda M, Tokushige K, Kawanaka M, Fujii H, Yoneda M, et al. FIB-4 First in the Diagnostic Algorithm of Metabolic-Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease in the Era of the Global Metabodemic. *Life*. 2021 Feb 14;11(2):143.