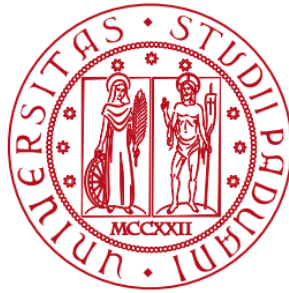


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Prof. Roberto Vettor

U.O.C. DI MALATTIE DEL METABOLISMO

Direttore: Prof. Angelo Avogaro

TESI DI LAUREA

**EFFETTI DELLA TERAPIA CON SGLT2 INIBITORI IN
CONFRONTO A GLP1-RECETTORE AGONISTI E
METFORMINA SUL TRASCRIPTOMA DELLE PIASTRINE
DI SOGGETTI AFFETTI DA DIABETE MELLITO DI TIPO 2**

Relatore: Prof.ssa Saula Vigili de Kreutzenberg

Correlatore: Prof. Giulio Ceolotto

Laureanda: Giorgia Biasiotto

Anno accademico 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO	1
INTRODUZIONE	3
1. IL DIABETE MELLITO.....	3
1.1 Definizione ed epidemiologia.....	3
1.2 Classificazione.....	4
1.3 Diagnosi di prediabete e diabete	6
1.4 Fisiopatologia del diabete mellito di tipo 2.....	7
1.5 Complicanze microvascolari	8
1.6 Complicanze macrovascolari: il rischio cardiovascolare	11
1.7 Il ruolo delle alterazioni coagulative nella macroangiopatia diabetica	12
2. LE PIASTRINE	14
2.1 La funzione piastrinica.....	15
2.2 Ruolo delle piastrine nell'aterosclerosi	17
2.3 Funzionalità piastrinica nel diabete mellito di tipo 2.....	18
2.4 Il trascrittoma piastrinico	19
3. TRATTAMENTO DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2	21
3.1 Metformina	22
3.2 Inibitori di SGLT2	24
3.3 Agonisti del recettore di GLP-1	26
OBIETTIVO DELLO STUDIO	28
MATERIALI E METODI.....	29
1. Selezione dei pazienti	29
2. Raccolta dei campioni e dei dati clinici.....	29
3. Isolamento e quantifica delle piastrine	30
4. Estrazione dell'RNA.....	31

5. Quantifica dell'RNA	32
6. Preparazione librerie	32
7. Quantificazione e controllo qualità delle librerie	35
8. Preparazione del pool per il sequenziamento	36
9. Sequenziamento con NextSeq 550	37
10. Analisi bioinformatica	38
RISULTATI.....	39
1. Caratteristiche dei soggetti	39
2. Controllo qualità dell'estrazione delle piastrine	45
3. Analisi dell'espressione degli mRNA	46
4. Analisi differenziale degli mRNA	50
4.1 SGLT2 inibitori vs Metformina	52
4.2 GLP1-recettore agonisti vs Metformina	55
4.3 GLP1-recettore agonisti vs SGLT2 inibitori	56
4.4 Influenza della terapia antiaggregante	58
5. Gene ontology.....	59
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	60
BIBLIOGRAFIA	65

RIASSUNTO

Introduzione. La principale causa di mortalità e morbilità nel diabete di tipo 2 (DM2) è rappresentata dalle complicanze cardiovascolari ed è quindi necessario che la loro gestione sia parte integrante del trattamento del diabete. I principali fattori che promuovono il processo di aterosclerosi nel DM2 sono la disfunzione endoteliale e l'iperattività piastrinica. Tra i farmaci antidiabetici, gli inibitori di SGLT2 e gli agonisti recettoriali di GLP1 sono le due classi di farmaci che, in diversi trials clinici, si sono dimostrati efficaci nel ridurre gli eventi cardiovascolari e nell'indurre protezione renale, nel paziente con DM2. Tuttavia, i meccanismi d'azione non sono ancora del tutto chiariti, anche se uno dei meccanismi di protezione sembra essere la loro capacità di ridurre l'aggregazione piastrinica.

Obiettivo dello studio. L'obiettivo di questo studio è, pertanto, confrontare gli effetti di SGLT2 inibitori, GLP1-RA e metformina sul trascrittoma delle piastrine di pazienti con DM2.

Materiali e metodi. Sono stati reclutati pazienti DM2, che assumevano i trattamenti antidiabetici sopracitati; per ciascun soggetto sono stati registrati i principali parametri demografici, antropometrici e clinici; inoltre è stato raccolto un prelievo venoso per la preparazione delle piastrine, che sono state poi processate per l'estrazione di RNA. L'RNA è stato utilizzato per la trascrittomica mediante tecnologia Next Generation Sequencing (RNA-Seq).

Risultati. Con questa tecnologia abbiamo potuto identificare e caratterizzare numerosi trascritti (mRNA) piastrinici e quindi evidenziare la loro diversa espressione nei tre gruppi di trattamento.

Conclusioni. Questo studio pilota ha evidenziato come un diverso trattamento farmacologico per il DM2 possa modulare l'espressione degli mRNA nelle piastrine, influenzandone la funzionalità. In particolare, sia gli inibitori di SGLT2 sia i GLP1-recettore agonisti sono risultati associati a modifiche del trascrittoma piastrinico in senso anti-aterosclerotico. Questi risultati potrebbero contribuire a spiegare i meccanismi mediante cui questi farmaci sono in grado di ridurre l'incidenza degli eventi cardiovascolari nei soggetti trattati.

ABSTRACT

Introduction. Cardiovascular complications are the leading cause of mortality and morbidity in type 2 diabetes (DM2) and their management must therefore be an integral part of diabetes treatment. The main factors promoting the atherosclerosis in DM2 are endothelial dysfunction and platelet hyperactivity. Among the antidiabetic drugs, SGLT2 inhibitors and GLP1 receptor agonists are the two classes of drugs that, in various clinical trials, have been shown to be effective in reducing cardiovascular events and inducing renal protection in patients with DM2. However, the mechanisms of action are not yet fully understood, even if one of the protection mechanisms seems to be their ability to reduce platelet aggregation.

The aim of the study. The goal of this study is to compare the effects of SGLT2 inhibitors, GLP1- receptor agonists and metformin on the platelet transcriptome of patients with DM2.

Materials and methods. DM2 patients were recruited, taking the mentioned antidiabetic treatments; the main demographic, anthropometric and clinical parameters were recorded for each subject; a blood sample was also collected for the preparation of platelets, which were then processed for the extraction of RNA. RNA was used for transcriptomics using Next Generation Sequencing (RNA-Seq) technology.

Results. With this technology we were able to identify and characterize numerous platelet transcripts (mRNAs) and thus highlight their different expression in the three treatment groups.

Conclusions. This pilot study has shown how a different drug treatment for DM2 can modulate the expression of mRNA in platelets, influencing their functionality. Both SGLT2 inhibitors and GLP1-receptor agonists were associated with anti-atherosclerotic modifications of the platelet transcriptome. These results could help to explain the mechanisms by which these drugs are able to reduce the incidence of cardiovascular events in treated subjects.

INTRODUZIONE

1. IL DIABETE MELLITO

1.1 Definizione ed epidemiologia

Il diabete mellito (DM) comprende un gruppo di disordini metabolici, ad eziologia multifattoriale, caratterizzati da iperglicemia cronica. A seconda dell'eziologia, l'iperglicemia può essere causata da un difetto di secrezione dell'insulina, da un difetto della sua azione o da entrambi.¹ L'iperglicemia cronica del DM causa gravi danni a diversi organi e apparati, peggiorando le condizioni di salute dell'individuo affetto e gravando sul sistema sanitario. Il diabete mellito è infatti uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari, è la causa più frequente di insufficienza renale terminale ed è una delle principali cause di cecità e di amputazioni non traumatiche agli arti inferiori nell'adulto.²

Secondo l'International Diabetes Federation (IDF) la prevalenza di diabete è in costante crescita e attualmente si stima che al mondo ci siano 537 milioni di adulti, tra i 20 e i 79 anni, affetti da diabete. Questo numero è destinato ad aumentare ulteriormente nei prossimi anni e si stima che raggiungerà i 783 milioni di affetti nel 2045 (Figura 1).³ L'incremento dei casi di diabete nel mondo è dovuto in parte all'aumento dell'età media della popolazione generale, ma principalmente alla diffusione delle condizioni a rischio come alimentazione scorretta, vita sedentaria, sovrappeso e obesità, anch'essa in costante aumento.⁴

È importante sottolineare che queste stime tengono conto anche dei casi di diabete non diagnosticato; si è calcolato infatti che circa 240 milioni di adulti affetti da diabete siano inconsapevoli della loro condizione, vale a dire quasi 1 su 2.³

Il diabete è una delle principali cause di morte in tutto il mondo. Nel 2021, escludendo la mortalità associata alla pandemia di COVID-19, si stima che circa 6,7 milioni di adulti, tra 20 e 79 anni, siano morti a causa del diabete o delle sue complicanze. Inoltre, circa un terzo (32,6%) di tutti i decessi associati al diabete si è verificato in persone con meno di 60 anni.³

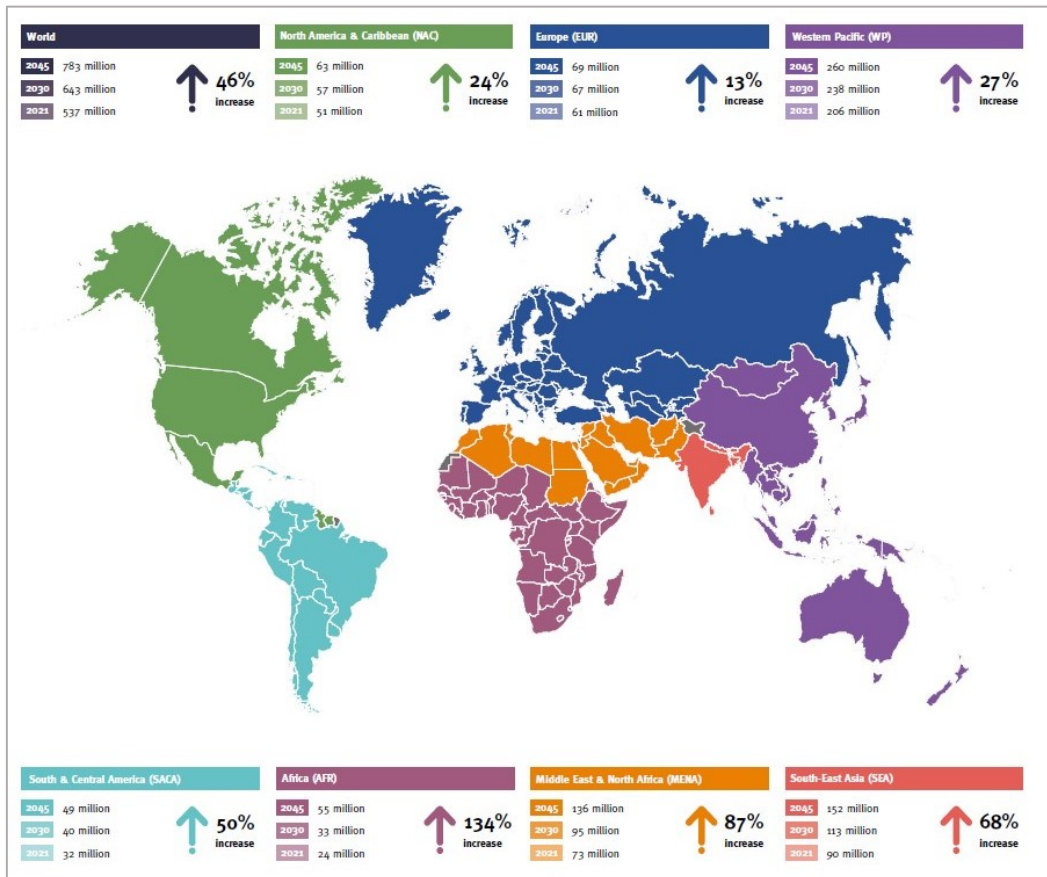


Figura 1. Numero di persone nel mondo affette da diabete (tra i 20 e 79 anni) e stime per il 2045.

1.2 Classificazione

Secondo l'attuale classificazione dell'American Diabetes Association, il DM può essere classificato, in base alla patogenesi, in quattro categorie: DM di tipo 1, DM di tipo 2, tipi specifici di diabete dovuti ad altre cause e DM gestazionale.⁵

- **Diabete mellito di tipo 1**

Rappresenta il 5-10% dei casi di DM ed è la forma più comune di diabete nell'infanzia e nell'adolescenza; tuttavia può comparire a qualunque età.

La causa dell'insorgenza dell'iperglicemia cronica è la distruzione, di tipo autoimmune, delle cellule β pancreatiche che producono insulina; per cui il risultato finale sarà un deficit assoluto di secrezione insulinica.

La progressiva distruzione delle cellule β può avvenire più o meno rapidamente ed il diabete diventa manifesto quando la quota residua di cellule β non è più

sufficiente a mantenere un adeguato controllo glicemico. Spesso l'esordio è acuto con chetoacidosi diabetica come prima manifestazione, soprattutto in bambini e adolescenti.⁶ Inoltre, i soggetti con DM di tipo 1 sono raramente obesi e sono propensi allo sviluppo di altre patologie autoimmuni.

Oltre alla forma immuno-mediata del DM di tipo 1 esiste anche un'altra forma definita idiopatica, più rara, in cui non c'è evidenza di autoimmunità contro le cellule β .⁵

- **Diabete mellito di tipo 2**

È la forma più frequente e rappresenta il 90-95% di tutti i casi di diabete.

Insorge a causa di un progressivo calo della secrezione di insulina in un background di insulino-resistenza. In questo caso, a differenza del DM di tipo 1, il deficit di insulina è relativo piuttosto che assoluto.⁵

I fattori di rischio che predispongono all'insorgenza di questo tipo di diabete comprendono sia fattori genetici (etnia e familiarità) che ambientali, quali l'obesità, uno stile di vita sedentario e una dieta scorretta. Tra questi il più fortemente associato al DM di tipo 2 è l'obesità (definita da un BMI ≥ 30 kg/m²) ed in particolare l'obesità di tipo viscerale, con accumulo di tessuto adiposo prevalentemente a livello addominale.⁷ È dunque particolarmente importante cercare di modificare questi fattori di rischio associati allo stile di vita per poter prevenire o ritardare l'insorgenza del diabete.

Il DM di tipo 2 rimane a lungo non diagnosticato in quanto l'iperglicemia aumenta gradualmente senza dare segni e sintomi acuti. È tuttavia possibile, e necessario, riconoscere la fase di alterata omeostasi glucidica che precede il diabete manifesto, indicata con il termine di "pre-diabete", attraverso il riscontro di un'alterata glicemia a digiuno (impaired fasting glucose, IFG) o di alterata tolleranza glucidica (impaired glucose tolerance, IGT).⁸

- **Tipi specifici di diabete dovuti ad altre cause**

Questa categoria comprende le sindromi di diabete monogenico (come il diabete neonatale e il diabete giovanile ad insorgenza nell'età matura, detto MODY), le

malattie del pancreas esocrino (come la fibrosi cistica e la pancreatite) ed il diabete indotto da farmaci o sostanze chimiche (come l'uso prolungato di glucocorticoidi).

- **Diabete mellito gestazionale**

Corrisponde al diabete diagnosticato nel secondo o terzo trimestre di gravidanza. Insorge a causa delle alterazioni metaboliche che avvengono nell'ultimo periodo di gestazione che portano all'instaurarsi di insulino-resistenza. La maggior parte delle donne recupera la normale tolleranza glucidica dopo il parto, ma permane un aumentato rischio di sviluppare DM nei successivi 10-20 anni.⁹

1.3 Diagnosi di prediabete e diabete

Secondo i criteri dell'American Diabetes Association viene posta diagnosi di diabete mellito quando si presenta una delle seguenti condizioni¹⁰ :

- HbA1C \geq 48 mmol/mol (6,5%). Corrisponde alla quota di emoglobina a cui sono stati legati glucidi in modo non enzimatico, ed è un indicatore della glicemia media degli ultimi 3 mesi circa.
- Glicemia a digiuno \geq 126 mg/dl. Per digiuno si intende nessun apporto calorico per almeno 8 h.
- Glicemia \geq 200 mg/dL dopo 2 ore dal carico orale di glucosio (OGTT). Il test deve essere eseguito utilizzando un carico di glucosio di 75 g.
- Glicemia casuale \geq 200 mg/dL in un paziente con sintomi classici di iperglicemia (poliuria, polidipsia e calo ponderale), indipendentemente dall'assunzione di cibo.

Ad eccezione dell'ultimo criterio, gli altri tre vanno confermati ripetendo il test in una seconda occasione.

Il prediabete, invece, indica una condizione in cui è già presente un'alterazione del metabolismo glucidico sebbene i livelli di glicemia non soddisfino i criteri di diagnosi di diabete. Si tratta di soggetti ad alto rischio di sviluppare sia diabete sia malattie cardiovascolari. Si diagnostica quando è presente una delle seguenti condizioni:

- Alterata glicemia a digiuno (impaired fasting glucose, IFG): definita come glicemia a digiuno tra 100 e 125 mg/dl;
- Ridotta tolleranza al glucosio (impaired glucose tolerance, IGT): definita come glicemia a 2 ore dal carico orale di glucosio compresa tra 140 e 199 mg/dl;
- HbA1C compresa tra 39 e 47 mmol/mol (5.7-6.4%).

In questi pazienti è necessario ricercare gli altri fattori di rischio per il diabete e quelli per malattie cardiovascolari.

1.4 Fisiopatologia del diabete mellito di tipo 2

I due elementi principali che sono alla base dello sviluppo del diabete mellito di tipo 2 sono la resistenza all'insulina e la disfunzione delle cellule β pancreatiche. La complessa interazione tra questi due meccanismi porta ad un progressivo aumento della glicemia. Esistono quadri eterogenei di DM di tipo 2 in cui queste due condizioni si presentano con gradi variabili: la patologia può svilupparsi con un quadro prevalentemente insulino-resistente oppure può prevalere il deficit secretorio.¹¹

Vari organi giocano un ruolo nella fisiopatogenesi del DM di tipo 2, principalmente sono coinvolti il pancreas endocrino, il fegato, il muscolo scheletrico e il tessuto adiposo. Quest'ultimo svolge un ruolo cruciale soprattutto quando la sua distribuzione è intra-addominale, o viscerale; è infatti questo tipo di deposito di tessuto adiposo ad essere correlato allo sviluppo di insulino-resistenza.¹²

Gli adipociti sono in grado di regolare la sensibilità all'insulina attraverso la produzione di adipochine e di acidi grassi liberi; questi possono causare insulino-resistenza nel fegato e nel muscolo scheletrico. Nel muscolo, l'insulino-resistenza determina un ridotto utilizzo di glucosio, mentre nel fegato induce un aumento della gluconeogenesi, che è la principale causa di iperglicemia a digiuno. Inoltre, l'aumento di acidi grassi liberi causa un'augmentata produzione epatica di VLDL, LDL e trigliceridi che sono responsabili della dislipidemia presente nei pazienti con DM di tipo 2 e concorre al rischio cardiovascolare.¹³ Inoltre nell'obesità viscerale il

tessuto adiposo produce meno adiponectina, un peptide che aumenta l'insulino-sensibilità.¹⁴

Sono stati riconosciuti diversi altri fattori che contribuiscono alla genesi dell'insulino-resistenza come lo stress ossidativo, l'infiammazione, mutazioni del recettore dell'insulina e disfunzioni nella sua via di trasduzione del segnale.¹⁵

Nelle prime fasi della malattia, sebbene si sia già instaurata un'insulino-resistenza periferica, i livelli di glicemia risultano normali. Questo è dovuto al fatto che le cellule β del pancreas aumentano la loro produzione di insulina come meccanismo di compenso. Questo stato di iperinsulinemia però non può essere sostenuto a lungo dalle cellule β che vanno gradualmente incontro ad una disfunzione finché la produzione di insulina risulta inadeguata ed il diabete diventa manifesto.¹⁶

Nei pazienti con DM di tipo 2 di lunga durata è stata riscontrata una perdita di quasi la metà delle cellule β pancreatiche. I meccanismi che causano apoptosi di queste cellule sono diversi. Innanzi tutto, l'iperstimolazione a produrre insulina, data dall'iperglicemia cronica, causa in queste cellule uno stress del reticolo endoplasmatico che a lungo andare porta alla produzione e all'accumulo di proteine misfolded. Inoltre, insieme all'insulina viene iper-prodotto e secreto anche il polipeptide amiloide insulare, o amilina, che forma accumuli di fibrille amiloidi nelle isole di Langerhans dei pazienti. Oltre a questi meccanismi che danneggiano in modo importante le cellule β , vi è anche un'azione tossica diretta dell'iperglicemia e dell'iperlipidemia (glucotossicità e lipotossicità), che promuovono lo stress ossidativo e uno stato di infiammazione cronica che portano a disfunzione delle cellule.¹⁷

1.5 Complicanze microvascolari

Il diabete mellito può dare complicanze sia acute che croniche. Le complicanze acute includono la chetoacidosi diabetica, che insorge principalmente in pazienti con DM di tipo 1, ed il coma iperglicemico iperosmolare, tipico del DM di tipo 2.

Le complicanze croniche sono causate principalmente da alterazioni dei vasi arteriosi e insorgono in seguito alla prolungata esposizione ad alti livelli di glicemia.

Si possono distinguere complicanze microvascolari che comprendono la nefropatia, la retinopatia e la neuropatia periferica, e complicanze macrovascolari. Queste ultime sono la causa dell'aumentato rischio cardiovascolare in questi pazienti.¹⁸

- **Retinopatia diabetica**

È la complicanza microvascolare più frequente ed il rischio di svilupparla è correlato alla durata e alla gravità dell'iperglicemia.¹⁹ Le alterazioni che avvengono a livello della retina sono: alterata permeabilità vascolare, alterazione e degenerazione delle cellule endoteliali, formazione di microaneurismi e neoformazione vascolare. Clinicamente vengono distinte due fasi della retinopatia: non proliferativa e proliferativa. Inizialmente l'iperglicemia danneggia l'integrità dei capillari retinici alterandone la permeabilità e favorendo la formazione di microaneurismi. In questa fase non proliferativa i pazienti possono presentare microemorragie, formazione di essudati organizzati e edema. Successivamente queste alterazioni vascolari e le emorragie possono condurre a zone ischemiche nella retina che, per compenso, stimolano la neo-angiogenesi. Quest'ultimo stadio in cui c'è formazione di nuovi vasi viene definito retinopatia proliferativa.²⁰ L'aumento di pressione all'interno dei vasi neoformati, che sono fragili e disorganizzati, può causare edema maculare che porta infine allo sviluppo di deficit visivo. Oltre alle alterazioni vascolari è presente anche una sofferenza neuronale con perdita di fotorecettori.²¹

Per lo screening di questa complicanza si effettua l'esame del fondo dell'occhio al momento della diagnosi di DM e poi ogni uno o due anni.²²

- **Neuropatia diabetica**

Esistono diversi disordini neuropatici che possono insorgere nel diabetico. Le due più comuni forme di neuropatie diabetiche sono la polineuropatia distale simmetrica e la neuropatia autonoma.

La polineuropatia distale simmetrica è caratterizzata da perdita della sensibilità che esordisce distalmente agli arti inferiori e poi progredisce verso le zone più

prossimali. Tra i sintomi possono essere presenti dolore neuropatico e disestesie.²³

La neuropatia autonoma colpisce il SNA e causa disfunzioni in differenti apparati: a livello cardiocircolatorio causa tachicardia sinusale e ipotensione ortostatica, nel sistema gastroenterico causa gastroparesi e diarrea o stipsi, a livello dell'apparato urogenitale causa vescica neurogena e disfunzione erettile ed infine è causa di anidrosi.²⁴

La perdita di sensibilità e l'anidrosi a livello degli arti inferiori, unite all'arteriopatia, sono fattori che predispongono allo sviluppo del piede diabetico.

- **Nefropatia diabetica**

La nefropatia diabetica è la prima causa di insufficienza renale cronica ed una delle principali cause di mortalità e morbilità associate al diabete. È una complicanza che si sviluppa in circa il 20-40% dei pazienti diabetici.²⁵

L'iperglicemia cronica causa un danno principalmente glomerulare che porta a perdita della selettività di filtrazione del rene, causando come prima manifestazione microalbuminuria seguita poi da diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare.

I meccanismi che causano il danno glomerulare sono molteplici e comprendono anche un'iperproduzione di citochine, di fattori di crescita, di fattori pro-fibrotici e pro-infiammatori. Questi elementi causano un'ipertrofia delle cellule mesangiali con aumento della matrice e fibrosi, a cui si aggiunge un'alterazione delle cellule endoteliali con conseguente disfunzione del microcircolo.²⁶

La microalbuminuria è il primo segno di malattia ed è definita come escrezione urinaria di albumina tra 30 e 300 mg/gr di creatinina nelle 24 ore. Questa può poi peggiorare e progredire a macroalbuminuria, fino all'insorgenza di una sindrome nefrosica caratterizzata da una perdita di proteine maggiore di 3gr/gr di creatinina nelle 24 ore. Se la patologia non viene trattata il GFR diminuisce progressivamente fino allo sviluppo di insufficienza renale che può rendere necessaria la dialisi.²⁷

La diagnosi di nefropatia diabetica si basa su dosaggio di creatinina, stima del GFR, ed esame delle urine per il dosaggio della albuminuria. Nel soggetto diabetico è opportuno controllare l'albuminuria annualmente.²⁵

È importante ricordare che parallelamente alla riduzione della VFG aumenta il volume plasmatico, la pressione arteriosa e quindi il rischio cardiovascolare.

1.6 Complicanze macrovascolari: il rischio cardiovascolare

La principale causa di mortalità e morbilità nel paziente diabetico sono le malattie cardiovascolari aterosclerotiche quali: malattia coronarica, malattia cerebrovascolare e arteriopatia obliterante degli arti inferiori. Per la prevenzione e la gestione di queste complicanze è raccomandata la valutazione dei fattori di rischio cardiovascolari almeno una volta all'anno in tutti i pazienti con diabete. Questi fattori di rischio includono l'obesità, l'ipertensione, la dislipidemia, il fumo, la malattia renale cronica e l'albuminuria.²⁸

L'iperglicemia, la dislipidemia e le altre alterazioni metaboliche presenti nel DM sono fortemente coinvolte nello sviluppo dell'aterosclerosi e spesso ne accelerano l'evoluzione.²⁹ Due dei principali meccanismi con cui il DM predispone all'aterosclerosi sono: l'instaurarsi di un'iperattività piastrinica e lo sviluppo di una disfunzione dell'endotelio.

L'iperglicemia cronica, infatti, interferisce con l'azione vasodilatatrice endoteliale diminuendo sia la produzione di monossido d'azoto (NO) da parte dell'endotelio stesso sia la produzione di prostaglandine vasodilatatrici ed antiaggreganti.³⁰ Inoltre, l'iperglicemia e la dislipidemia causano stress ossidativo e un'aumentata produzione di fattori pro-infiammatori e pro-trombotici a livello vasale che inducono una maggior aggregazione piastrinica.³¹

La combinazione di stress ossidativo ed iperglicemia provoca anche la glicazione di proteine plasmatiche e di lipidi generando prodotti finali di glicazione avanzata (AGE). Questi AGE, legandosi ai loro recettori (RAGE), sembrano svolgere un ruolo importante nello sviluppo dell'aterosclerosi. Infatti, l'attivazione di RAGE nelle cellule endoteliali induce un'inibizione della produzione di monossido d'azoto e stimola l'espressione della molecola di adesione E-selectina e dell'endotelina-1, che ha effetto vasocostrittore. Inoltre, gli AGE aumentano il rilascio di citochine da parte dei macrofagi mantenendo così un contesto pro-infiammatorio all'interno

della placca in via di sviluppo.³² In modelli murini di aterosclerosi, con diabete indotto, il deficit di RAGE ha ridotto lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche.³³

I fattori che nel diabete favoriscono un aumentato rischio cardiovascolare sono molteplici; non solo l'iperglicemia cronica, ma anche la dislipidemia, l'ipertensione arteriosa, l'obesità, l'infiammazione subclinica cronica e le alterazioni emoreologiche promuovono il processo aterosclerotico e gli eventi acuti ad esso associati.

1.7 Il ruolo delle alterazioni coagulative nella macroangiopatia diabetica

Nel DM2 sono da tempo state dimostrate alterazioni della coagulazione in senso procoagulativo.³⁴ Sono molteplici i fattori della coagulazione che sono risultati alterati nelle persone con diabete ma quelli che hanno mostrato un'associazione più forte e che sono stati maggiormente studiati sono: il fattore VII, il fibrinogeno e il fattore di von Willebrand (vWF).

Elevati livelli di fattore VII sono stati riscontrati in soggetti con sindrome metabolica e in soggetti con diabete di tipo 2.³⁵ La causa sembra essere legata all'alterato profilo lipidico; infatti, è stata dimostrata una correlazione significativa tra i livelli di fattore VII e la concentrazione di trigliceridi plasmatici.³⁶

La maggior parte degli studi ha anche riportato un aumento dei livelli di fibrinogeno plasmatico nei pazienti diabetici; Ajjan e Grant hanno associato questo aumento alla presenza di un'infiammazione di basso grado che stimola gli epatociti a produrre più fibrinogeno.³⁷

Un altro elemento la cui concentrazione risulta elevata nel diabete è il vWF. Inoltre, lo stress ossidativo causato dall'iperglicemia favorisce l'accumulo di multimeri di vWF ad alto peso molecolare che hanno una più alta capacità di reclutare e attivare le piastrine.³⁸

Contemporaneamente all'aumento dei fattori protrombotici della coagulazione, nel diabete è stata riscontrata anche una ridotta attività fibrinolitica dovuta soprattutto ad una elevata concentrazione dell'inibitore dell'attivatore del

plasminogeno-1 (PAI-1) che riduce la produzione di plasmina e quindi la degradazione della fibrina.³⁴

Infine, la proteina C e la proteina S, che hanno attività anticoagulante, presentano una concentrazione plasmatica ridotta nel paziente diabetico.³²

Oltre alle alterazioni della cascata coagulativa e della fibrinolisi, un ruolo importante nello sviluppo dello stato procoagulativo nel diabete è svolto dalle piastrine.

2. LE PIASTRINE

Le piastrine (o trombociti) sono piccoli elementi circolanti anucleati che derivano dalla frammentazione del citoplasma dei megacariociti midollari. Il principale fattore che regola il processo di trombopoiesi è la trombopoietina (TPO), che viene prodotta principalmente dal fegato. Il numero di piastrine circolanti varia tra 150.000 a 350.000 su μL di sangue e una volta rilasciate in circolo hanno una vita media di circa 7-10 giorni.³⁹

Strutturalmente presentano una forma discoidale con un diametro compreso tra da 2 a 5 μm . La membrana cellulare è rivestita esternamente dal glicocalice, uno strato ricco di glicoproteine necessarie per l'interazione delle piastrine con le strutture subendoteliali e per la loro attivazione, adesione ed aggregazione. In particolare, i complessi GPIb-IX-V e GPIIb/IIIa sono molto importanti per il processo emostatico. Nel doppio strato fosfolipidico sottostante al glicocalice è invece contenuto il fattore tissutale (FT) nella sua forma inattiva.

Al di sotto della membrana piastrinica si trova il citoscheletro contrattile della cellula formato da filamenti di actina e miosina e necessario per il cambiamento di forma nel corso dell'attivazione piastrinica. Quest'apparato contrattile è sostenuto da microtubuli disposti in modo circolare alla periferia della cellula, che hanno anche il compito di mantenere la forma discoidale delle piastrine.

La membrana plasmatica forma numerose inflessioni che si portano in profondità nella cellula andando a costituire delle strutture tubulari che creano un sistema canalicolare aperto, connesso con la superficie. Questo sistema ha un ruolo nel trasporto del contenuto dei granuli verso l'esterno. È inoltre presente anche un sistema tubulare denso, essenziale per la funzione piastrinica in quanto accumula e rilascia il calcio.⁴⁰

Nella zona più centrale della piastrina infine troviamo i tre principali organelli secretori:

- Granuli α : sono i più rappresentati, ne sono presenti circa 50-80 in ogni piastrina. Contengono diverse proteine tra cui: il fattore di von Willebrand (VWF), il fattore V, la trombospondina, la P-selectina, il fibrinogeno, il fattore piastrinico 4 (PF4), e fattori di crescita cellulare. Sono quindi

coinvolti in numerosi processi, tra cui l'adesione cellulare, la coagulazione, l'infiammazione e la crescita cellulare.

- Granuli densi o granuli δ : sono presenti in piccole quantità (circa 3-8 per piastrina) e sono più piccoli dei granuli α . Contengono nucleotidi (ATP e ADP), amine biogene (serotonina, istamina), ioni calcio e pirofosfato.
- Granuli lisosomiali o granuli λ : sono meno di 3 per piastrina e contengono enzimi idrolitici: fosfatasi acida, catepsina D, glucosidasi e galattosidasi.⁴¹

Inoltre, le piastrine contengono mitocondri, importanti per il loro metabolismo energetico, numerosi granuli di glicogeno ed RNA (Figura 2⁴²).

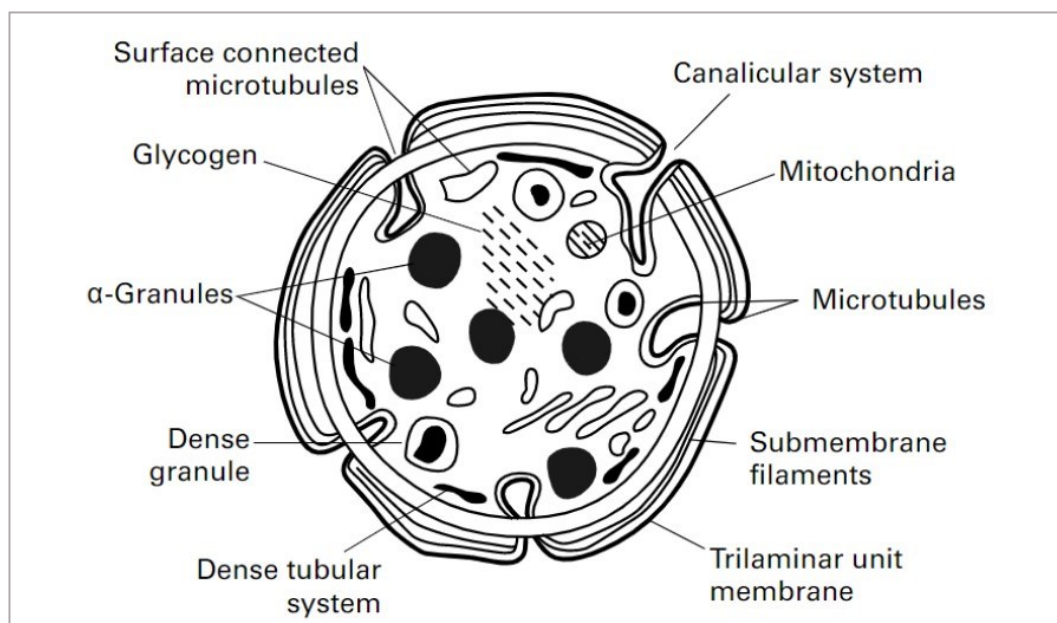


Figura 2. Struttura delle piastrine.

2.1 La funzione piastrinica

Il ruolo principale delle piastrine è quello di mediare la formazione del trombo bianco piastrinico durante l'emostasi primaria. Questo avviene attraverso una serie di eventi.

In seguito ad un danno endoteliale le piastrine aderiscono rapidamente al collagene subendoteliale che viene esposto al flusso sanguigno. L'adesione avviene grazie all'interazione con le glicoproteine (GP) presenti sulla superficie delle piastrine, chiamate integrine. In particolare, sono coinvolti i complessi GPIIb/IIIa e GPIb-IX-V che sono in grado di legare il fattore di von Willebrand (vWF).

Questo fattore viene rilasciato sia dai granuli α piastrinici sia dalle cellule endoteliali, ed è in grado di legare le fibre collagene formando un ponte molecolare tra queste e la membrana piastrinica.⁴³ Nel processo vengono coinvolte anche altre proteine adesive subendoteliali come la fibronectina e la laminina.

L'adesione all'endotelio danneggiato attiva una via di segnale intracellulare che determina un aumento della concentrazione di calcio citosolico nelle piastrine. Questo determina l'attivazione piastrinica che è caratterizzata principalmente da tre eventi: cambiamento morfologico, degranulazione ed infine aggregazione piastrinica (Figura 3).

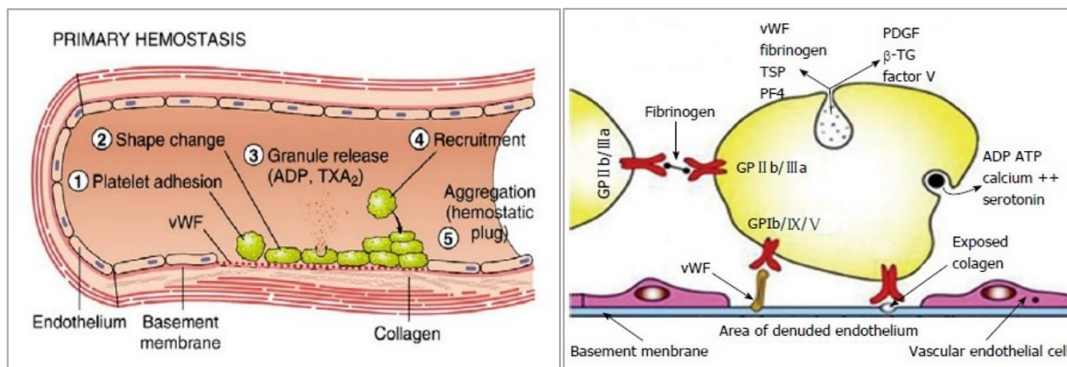


Figura 3. Fasi dell'emostasi primaria¹⁰⁶ e principali processi piastrinici coinvolti.¹⁰⁷

Il cambiamento morfologico inizia con l'aumento intracellulare di calcio che determina una riorganizzazione dei filamenti di actina e miosina del citoscheletro; questo porta le piastrine a perdere la loro normale forma discoidale e ad assumere invece una forma sferica con estroflessioni sulla superficie e formazione di pseudopodi, che permettono di stabilire contatti con le piastrine vicine.⁴⁴

L'azione contrattile dei complessi actina-miosina, oltre alle modifiche morfologiche, causa lo spostamento dei granuli verso la zona centrale della piastrina in prossimità del sistema canalicolare aperto. Successivamente avviene la degranulazione attraverso la fusione della membrana canalicolare con quella dei granuli con liberazione del loro contenuto all'esterno. In particolare, la liberazione di ADP, serotonina e trombossano A_2 (TXA_2) induce l'attivazione di

ulteriori piastrine. Il TXA₂ inoltre, dopo l'attivazione piastrinica, viene prodotto ex novo partendo dall'acido arachidonico attraverso l'azione della COX-1.⁴⁵

Per la formazione del tappo emostatico piastrinico è necessario che ulteriori piastrine si accumulino sul sito di lesione endoteliale e che aderiscano tra loro. Questo avviene attraverso il processo di aggregazione piastrinica. La molecola di adesione che permette alle piastrine di legarsi tra loro è il complesso GPIIb/IIIa che viene esposto sulle piastrine attivate. Questo complesso lega il fibrinogeno che forma un ponte tra i recettori di piastrine adiacenti. GPIIb/IIIa è in grado di legare anche il vWF, la fibronectina e la trombospondina, usati per stabilizzare l'aggregato piastrinico.

Si conclude così l'emostasi primaria con la formazione di un trombo piastrinico provvisorio. Le piastrine sono coinvolte anche nell'emostasi secondaria, infatti, una volta attivate, espongono sullo strato esterno della loro membrana dei fosfolipidi carichi negativamente che permettono il legame con il complesso della protrombinasi, che ha il compito di convertire la protrombina in trombina.⁴⁶

L'attivazione piastrinica fin qui descritta avviene solo in caso di lesione endoteliale; infatti, l'endotelio intatto produce fattori in grado di inibirla, i più importanti sono la prostaciclina (o prostaglandina I₂) e il monossido di azoto (NO).⁴⁶

2.2 Ruolo delle piastrine nell'aterosclerosi

Le piastrine svolgono anche un ruolo nella formazione ed estensione delle placche aterosclerotiche e, in caso di rottura di placca, sono coinvolte nella trombosi arteriosa acuta. In condizioni fisiologiche le piastrine circolano in uno stato di quiescenza e non esprimono i marcatori di attivazione, come la P-selectina o il ligando CD40, né formano aggregati piastrinici-leucocitari. Gli individui con malattia aterosclerotica avanzata, invece, presentano un numero di piastrine attivate circolanti più elevato rispetto ai soggetti sani.⁴⁷

Un ruolo importante nell'aterogenesi è svolto dal vWF che media il legame iniziale delle piastrine ai vasi danneggiati. L'importanza di questo fattore è stata dimostrata attraverso uno studio con topi knock-out per vWF, i quali sviluppano lesioni più piccole rispetto ai wild-type.⁴⁸

Un'altra proteina fondamentale per il processo aterosclerotico è la glicoproteina P-selectina, che viene esposta sulla superficie sia delle piastrine attivate sia delle cellule endoteliali attivate. Inoltre, attraverso la P-selectina, le piastrine si legano al PSGL-1 (ligando per la glicoproteina P-selectina 1) sui leucociti. Questo permette alle piastrine da un lato di reclutare leucociti direttamente nel sito di danno e dall'altro causa la formazione di aggregati piastrinici-leucocitari che promuovono il rilascio di chemochine e citochine che favoriscono ulteriormente l'aterosclerosi. Le piastrine attivate esprimono anche il ligando CD40 sulla loro superficie, il quale lega il recettore CD40 presente sia sull'endotelio sia su diversi sottogruppi di leucociti provocando un ulteriore reclutamento di leucociti.

La comunicazione tra piastrine e leucociti è bidirezionale: le piastrine stimolano la migrazione e la differenziazione dei leucociti in un fenotipo pro-adesione e i leucociti secernono mediatori che promuovono un'ulteriore attivazione piastrinica.⁴⁹

Infine, le piastrine attivate secernono il fattore piastrinico 4 che lega i neutrofili e i monociti attivati, promuove la differenziazione dei monociti in macrofagi e stimola le cellule endoteliali ad esprimere la E-selectina.⁵⁰

2.3 Funzionalità piastrinica nel diabete mellito di tipo 2

È stato dimostrato che uno dei principali meccanismi che promuove lo stato protrombotico nei pazienti diabetici è la maggior attivazione basale e reattività delle piastrine.⁵¹

Diversi studi hanno mostrato come l'iperglicemia sia causa diretta di un'aumentata espressione di P-selectina, di GPIIb/IIIa e di ligando CD40 sulla superficie delle piastrine, promuovendo così l'aggregazione piastrinica.^{52,53}

È stato anche dimostrato che il recettore piastrinico P2Y12 è maggiormente espresso ed è più attivo nei pazienti con DM rispetto agli individui sani. Questo recettore lega l'ADP e la sua attivazione favorisce l'aggregazione piastrinica; inoltre riveste un ruolo importante dal punto di vista terapeutico in quanto è il bersaglio delle tienopiridine, una classe di farmaci antiaggreganti di cui fa parte clopidogrel.⁵¹

Le piastrine esprimono fisiologicamente un recettore per l'insulina, che, nell'individuo sano, regola la funzione piastrinica diminuendone l'aggregazione e riducendo la produzione di trombossano. Sebbene nel DM2 sia presente iperinsulinemia questa non si traduce in una soppressione dell'attività piastrinica a causa dell'insulino-resistenza. Questa non solo impedisce l'azione anti-aggregante dell'insulina, ma ne altera anche la via di segnale⁵⁴, tanto che nei soggetti insulino-resistenti l'insulina sembra causare un aumento del calcio citosolico delle piastrine promuovendone l'aggregazione e l'attivazione, al contrario di ciò che accade nel soggetto sano.⁵⁵ Nel diabetico è anche ridotta la produzione dei fattori antiaggreganti prodotti dall'endotelio: monossido di azoto (NO) e prostaciclina.

Anche l'alterato profilo lipidico presente nel DM2 altera la funzione delle piastrine: bassi livelli di colesterolo HDL e alti livelli di trigliceridi e di colesterolo LDL potenziano l'attività piastrinica attraverso l'interazione della apolipoproteina E con il recettore piastrinico per le LDL. Inoltre, le LDL riducono la produzione di NO e aumentano la concentrazione di calcio intrapiastrinico.⁵¹

Per concludere, le piastrine nel DM2 non solo presentano un'iperattivazione ma sono anche morfologicamente alterate in quanto nei soggetti diabetici è stato riscontrato un volume piastrinico medio (MPV) significativamente più elevato rispetto ai controlli sani.⁵⁶

2.4 Il trascrittoma piastrinico

Il trascrittoma definisce l'insieme degli RNA contenuti in una cellula. La trascrittomica permette di studiare tutti i trascritti presenti in un determinato tipo cellulare che comprendono non solo gli mRNA ma anche RNA non codificanti e microRNA. Le piastrine, essendo prive di nucleo, non contengono DNA ma, nonostante questo, nel loro citoplasma è presente mRNA e tutti i fattori per la sua traduzione in proteine. L'RNA presente nelle piastrine circolanti origina dai loro progenitori midollari; infatti, durante la trombopoiesi, i megacariociti trasmettono parte dei loro trascritti alle piastrine. La maggior parte di questi mRNA traducono

principalmente per proteine coinvolte nelle modifiche del citoscheletro, nelle vie di segnalazione delle chemochine, nell'adesione cellulare, nell'aggregazione piastrinica e nelle vie di segnale dei recettori. Inoltre, le piastrine ereditano dai megacariociti anche lo spliceosoma ed è stato dimostrato che lo splicing dell'mRNA permette alle piastrine di modulare l'espressione proteica quando vengono attivate.⁵⁷

Un recente studio condotto in 204 individui sani ha dimostrato che, in assenza di malattia, il trascrittoma piastrinico è piuttosto stabile. È stata infatti dimostrata una sostanziale somiglianza del trascrittoma tra soggetti di età e di sesso differente. Le minime differenze trovate, sebbene statisticamente significative, non sono state giudicate avere un'importanza biologica. Lo studio conclude quindi che il trascrittoma delle piastrine non è influenzato né dal sesso né dall'età.⁵⁸ È invece dimostrato che il trascrittoma piastrinico viene modificato in presenza di stati patologici come sepsi, infarto del miocardio, infezioni virali e cancro.⁵⁹

Oggi gli studi di trascrittomica possono avvalersi della tecnologia del Next Generation Sequencing (NGS), che ha sostituito le analisi tramite microarray. A differenza dei microarray, l'NGS non richiede sonde specifiche per i trascritti e può quindi rilevare trascritti rari o sconosciuti, trascritti non codificanti e splicing alternativi.⁵⁷

3. TRATTAMENTO DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2

Le attuali linee guida della Società Italiana di Diabetologia (SID) e dell'Associazione dei Medici Diabetologi (AMD)⁶⁰ raccomandano come obiettivo terapeutico nel trattamento del diabete di tipo 2 un target di HbA1c inferiore a 53 mmol/mol; da tenere leggermente più alto (58 mmol/mol) se il paziente viene trattato con farmaci a rischio di ipoglicemia.

Parallelamente alla terapia farmacologica è sempre bene associare modifiche dello stile di vita introducendo esercizio fisico regolare e dieta equilibrata, finalizzata anche al controllo del peso corporeo.

Il farmaco di prima scelta dipende dalle comorbidità e caratteristiche del paziente. Nei pazienti senza pregressi eventi cardiovascolari il farmaco di prima scelta è rappresentato dalla metformina. Se non è sufficiente a raggiungere un buon controllo glicemico è possibile aggiungere un farmaco di seconda scelta: un agonista del recettore del glucagon-like peptide-1 (GLP1-RA) oppure un inibitore del cotrasportatore sodio-glucosio 2 (SGLT2-i). Gli inibitori di DPP4, l'acarbose, il pioglitazone e l'insulina sono considerati farmaci di terza scelta (Figura 4).



Figura 4. Farmaci di prima, seconda e terza scelta nei pazienti DM2 senza pregressi eventi cardiovascolari.⁶⁰

Nei pazienti con pregresso evento cardiovascolare andrebbero considerati come farmaci di prima scelta gli inibitori di SGLT2 o i GLP1-RA, ed in particolare gli inibitori SGLT2 hanno mostrato effetti favorevoli nei pazienti con scompenso cardiaco (Figura5).

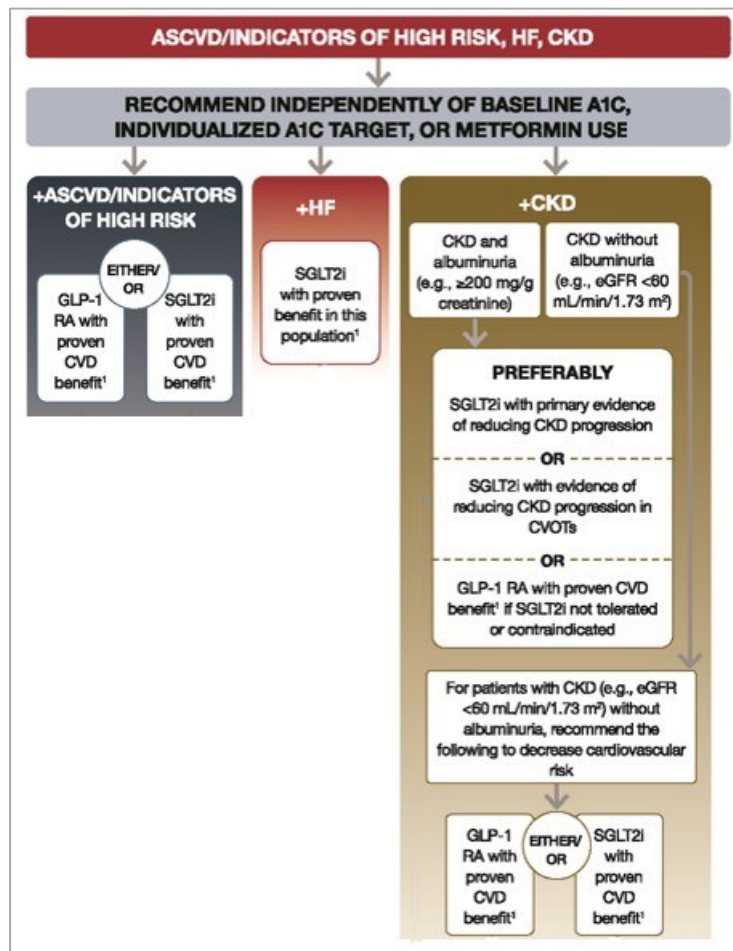


Figura 5. Farmaci antidiabetici raccomandati in soggetti con DM2 con pregresso evento cardiovascolare, scompenso cardiaco o malattia renale cronica.¹⁰⁸

In generale quindi i farmaci attualmente più indicati nel trattamento del DM2 sono metformina, SGLT2-i o GLP1-RA perché presentano una maggior efficacia nel ridurre i livelli di HbA1c, un basso rischio di insorgenza di ipoglicemia e si sono dimostrati efficaci nella riduzione gli eventi cardiovascolari e della mortalità.

3.1 Metformina

La metformina cloridrato è un anti-iperglicemizzante appartenente al gruppo delle biguanidi ed è in grado di ridurre sia la glicemia basale che quella postprandiale, senza rischio di indurre ipoglicemia, in quando non stimola la secrezione insulinica da parte delle beta-cellule pancreatiche. I meccanismi d'azione con cui agisce sono molteplici e non ancora completamente definiti. Il principale organo bersaglio è il fegato, nel quale riduce la produzione di glucosio attraverso l'inibizione della

gluconeogenesi e della glicogenolisi. Nel muscolo invece aumenta la sensibilità dell'insulina e incrementa l'attività dei trasportatori di membrana del glucosio (GLUTs).⁶¹

Durante il trattamento con metformina possono comparire effetti collaterali principalmente gastrointestinali, come nausea, vomito, diarrea e dolore addominale, che nella maggior parte dei casi si risolvono spontaneamente. In caso di sovradosaggio è possibile sviluppare acidosi lattica. Le controindicazioni sono: insufficienza renale grave e patologie che possono causare ipossia tissutale, come l'insufficienza cardiaca e recente infarto miocardico.

- **Effetti protettivi cardiovascolari**

Sono stati dimostrati effetti positivi anche sul controllo del rischio cardiovascolare. Uno studio di meta-analisi condotto nel 2020 ha evidenziato una significativa riduzione del rischio cardiovascolare nei pazienti con DM2 in trattamento con metformina, sia per quanto riguarda l'incidenza di eventi cardiovascolari, sia per la mortalità.⁶² I meccanismi alla base di questi effetti sono molteplici. Il trattamento con metformina è innanzitutto associato ad un miglioramento del profilo lipidico, con diminuzione del colesterolo totale, del colesterolo LDL e dei trigliceridi. Inoltre, la metformina sembra influenzare anche la funzionalità endoteliale avendo un effetto stimolante sull'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), aumentando la produzione di monossido di azoto ed esercitando un effetto inibente sulla produzione di vWF.

- **Effetti della metformina sulle piastrine**

Per quanto riguarda la funzionalità delle piastrine sono stati riscontrati una riduzione del MVP e una normalizzazione dell'attività piastrinica nei pazienti diabetici trattati con metformina.⁶³ Tuttavia l'esatto meccanismo d'azione con cui il farmaco agisce sulle piastrine non è ancora chiarito e diversi Autori ipotizzano che non sia un effetto diretto del farmaco ma sia piuttosto secondario al migliorato controllo glicemico.⁶⁴

3.2 Inibitori di SGLT2

Gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT2), o gliflozine, sono una classe di farmaci antidiabetici orali che hanno un'azione ipoglicemizzante insulina-indipendente che evita il rischio di ipoglicemie. I farmaci attualmente utilizzati per il DM2 sono dapagliflozin, canagliflozin, empagliflozin ed ertugliflozin.

Ci sono due principali cotrasportatori renali di sodio-glucosio: SGLT1 e SGLT2. La loro funzione fisiologica è quella di riassorbire il 100% del glucosio filtrato dal rene attraverso un meccanismo di trasporto unidirezionale accoppiato al sodio. Gli SGLT2 si trovano nei segmenti S1 ed S2 del tubulo contorto prossimale e sono responsabili del riassorbimento di circa il 90% del glucosio. Il restante 10% è riassorbito dai co-trasportatori SGLT1 nel segmento S3. Esiste però un limite a questa capacità di riassorbimento renale del glucosio che viene superato quando la glicemia raggiunge valori tra 180 e 200 mg/dL, con conseguente comparsa di glicosuria. Tuttavia, nel diabete, a causa dell'iperglicemia cronica, il rene adatta la sua capacità di riassorbimento aumentando il numero di cotrasportatori SGLT2 nei tubuli prossimali. Questa alterazione dell'espressione dei trasportatori renali si ritiene svolga un ruolo centrale nella fisiopatologia della nefropatia diabetica.⁶⁵

I farmaci inibitori di SGLT2 riducono la quota di glucosio riassorbita dal rene causando glicosuria e conseguente abbassamento della glicemia. Oltre a questo, l'inibizione dei co-trasportatori causa anche natriuresi, che si associa ad un bilancio idrico e salino negativo e miglioramento della pressione sanguigna. Infine, il trattamento con questi farmaci induce perdita di peso e miglioramento del profilo lipidico.⁶⁶ Per quanto riguarda gli effetti collaterali l'utilizzo di questi farmaci è generalmente ben tollerato ma, a causa della glicosuria, c'è un rischio aumentato di sviluppare infezioni genito-urinarie e disidratazione.

- **Effetti protettivi cardiovascolari**

Diversi studi clinici hanno dimostrato benefici sia a livello cardiovascolare sia renale nei pazienti trattati con questi farmaci.

Lo studio EMPA-REG OUTCOME è un trial clinico randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, pubblicato nel 2015, che aveva lo scopo di valutare gli

effetti cardiovascolari della terapia con empagliflozin in pazienti con DM2 ad alto rischio cardiovascolare. I risultati ottenuti dopo un follow-up medio di 3 anni hanno mostrato che il trattamento con empagliflozin ha ridotto la mortalità per cause cardiovascolari del 38%, il rischio di ospedalizzazione per insufficienza cardiaca del 35% e la mortalità per tutte le cause del 32%, rispetto al gruppo placebo.⁶⁷ Una successiva analisi basata su questo trial ha anche dimostrato che il trattamento con empagliflozin è associato ad una ridotta incidenza di nefropatia e ad una sua più lenta progressione.⁶⁸

Lo studio CANVAS ha ottenuto risultati simili studiando pazienti con DM2 ad alto rischio cardiovascolare trattati con canagliflozin, i quali hanno mostrato una riduzione degli eventi cardiovascolari del 14%, della mortalità cardiovascolare del 13% e del 40% degli outcome renali avversi (peggioramento della funzione renale, dialisi o morte per cause renali) rispetto al placebo.⁶⁹

Infine, lo studio DECLARE-TIMI 58 del 2019 ha studiato in oltre 17.000 pazienti diabetici con alto rischio cardiovascolare gli effetti di dapagliflozin, dimostrando una diminuzione significativa delle ospedalizzazioni per insufficienza cardiaca e degli esiti avversi renali rispetto al gruppo placebo, senza tuttavia dimostrare una riduzione significativa dell'incidenza di infarto miocardico e ictus né della mortalità per cause cardiovascolari.⁷⁰

Sono stati anche condotti studi per valutare l'effetto degli inibitori di SGLT2 in pazienti ad alto rischio cardiovascolare non diabetici. Gli studi DAPA-HF⁷¹, EMPEROR-reduced⁷² ed EMPEROR-Preserved⁷³ hanno dimostrato che sia dapagliflozin sia empagliflozin, se usati in pazienti con insufficienza cardiaca e frazione di eiezione ridotta, sono in grado di ridurre la mortalità cardiovascolare e il rischio di peggioramento dell'insufficienza cardiaca, indipendentemente dalla presenza di diabete.

- Effetti degli SGLT2i sulle piastrine

Uno dei meccanismi fisiopatologici che è stato ipotizzato essere alla base dell'effetto protettivo cardiovascolare degli inibitori di SGLT2 è l'inibizione dell'attivazione ed aggregazione piastrinica che sono causa di trombosi acuta in seguito a rottura di placca aterosclerotica vulnerabile. Spigoni *et al.* hanno

condotto uno studio in vitro in cui hanno incubato delle piastrine attivate tramite stimolazione con ADP con diverse concentrazioni di dapagliflozin o di empagliflozin. Lo studio ha dimostrato che entrambi i farmaci hanno determinato una riduzione dell'attivazione delle piastrine, riducendo l'espressione sulla loro superficie di P-selectina e del complesso GPIIb/IIIa.⁷⁴ Un recente studio clinico condotto in pazienti con DM2 e coronaropatia ha dimostrato che i pazienti trattati con empagliflozin presentavano una ridotta reattività piastrinica. Sono tuttavia necessari ulteriori studi che confermino questi risultati.⁷⁵

3.3 Agonisti del recettore di GLP-1

Il glucagon-like peptide 1 (GLP-1) appartiene alla famiglia delle incretine che sono ormoni di origine intestinale, rilasciati in seguito all'ingestione di nutrienti, che hanno un'azione ipoglicemizzante. Il GLP-1 diminuisce la glicemia tramite diversi meccanismi: stimola la secrezione di insulina dalle beta-cellule pancreatiche e sopprime il rilascio di glucagone da parte delle alfa-cellule. Inoltre, diminuisce la glicemia post-prandiale rallentando lo svuotamento gastrico, che è anche causa della riduzione dell'appetito e della perdita di peso associata. I farmaci recettori agonisti del GLP-1 (GLP1-RA) mimano gli effetti dell'ormone e si possono distinguere in due classi: a breve e a lunga durata d'azione. Quelli a breve durata d'azione comprendono exenatide e lixisenatide, somministrati per via sottocutanea rispettivamente due e una volta al giorno. I GLP1-RA a lunga durata d'azione includono liraglutide, semaglutide e dulaglutide, questi vengono somministrati sottocute una volta a settimana. Nel 2020 è stata anche approvata la forma per via orale di semaglutide, da assumere una volta al giorno.⁷⁶

Il trattamento con GLP1-RA è generalmente ben tollerato; gli effetti collaterali più comuni sono nausea e vomito. Un evento avverso raro ma grave è la pancreatite acuta, è pertanto controindicato l'uso in pazienti con questo tipo di patologia.

- **Effetti protettivi cardiovascolari**

Diversi trials clinici hanno dimostrato una riduzione degli eventi cardiovascolari nei pazienti con DM2 trattati con GLP1-RA a lunga durata d'azione. Infatti, questi

farmaci oltre a migliorare il controllo glicemico sono anche associati ad una riduzione della pressione arteriosa, a perdita di peso e ad un miglioramento del profilo lipidico, tutti fattori che contribuiscono a migliorare gli outcome cardiovascolari.

Lo studio LEADER è un trial randomizzato controllato con placebo in cui sono stati reclutati 9340 pazienti con DM2 ed elevato rischio cardiovascolare per valutare gli effetti della terapia con liraglutide. I risultati hanno dimostrato che il trattamento con liraglutide, in aggiunta alla terapia antidiabetica standard, ha ridotto in maniera significativa gli eventi cardiovascolari maggiori (comprendenti morte per causa cardiovascolare, infarto miocardico e ictus). Tuttavia, non è stata riscontrata una riduzione delle ospedalizzazioni per insufficienza cardiaca.⁷⁷

Lo studio SUSTAIN-6 ha invece indagato gli effetti di semaglutide concludendo che, come liraglutide, è in grado di ridurre gli eventi cardiovascolari ed è associato soprattutto ad una diminuzione di infarto miocardico e ictus.⁷⁸

Infine, lo studio REWIND ha dimostrato che anche dulaglutide riduce il rischio di eventi cardiovascolari maggiori del 12% rispetto al placebo.⁷⁹

- Effetti dei GLP1-RA sulle piastrine

Diversi studi hanno dimostrato un effetto anti-aggregante dei GLP1-RA sia in vitro sia in vivo. Steven *et al.* hanno dimostrato un aumento dell'aggregazione piastrinica in topi knock-out per il recettore di GLP1 e parallelamente hanno evidenziato, in vitro, un'inibizione dell'attivazione piastrinica in piastrine umane incubate con GLP1-RA.⁸⁰

Inoltre, un recente studio clinico ha indagato l'effetto di exenatide sulla funzione coagulativa e sull'aggregazione piastrinica in pazienti con DM2. I risultati hanno evidenziato che dopo 8 settimane di trattamento l'espressione di P-selectina e di GPIIb/IIIa sulle piastrine era calata con una conseguente minor aggregazione piastrinica rispetto a prima del trattamento. Inoltre, è stato dimostrato un significativo aumento dei livelli di monossido d'azoto.⁸¹ L'inibizione dell'attivazione piastrinica è uno dei meccanismi alla base dell'effetto benefico di questi farmaci a livello cardiovascolare.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è valutare se la terapia antidiabetica possa interferire con l'espressione dell'RNA delle piastrine di pazienti affetti da DM2.

In particolare, si è voluto studiare il trascrittoma piastrinico in soggetti DM2 trattati con due classi di farmaci che hanno dimostrato effetti protettivi a livello cardiovascolare: gli inibitori di SGLT2 e gli agonisti del recettore di GLP1; è stato inoltre studiato un terzo gruppo di soggetti, trattato con metformina, che rappresenta finora il gold standard della terapia del DM2.

L'analisi del trascrittoma è stata condotta utilizzando la tecnologia NGS, al fine di identificare possibili RNA modificati dalle diverse terapie antidiabetiche, che possano avere un ruolo nella fisiopatologia della funzione piastrinica.

MATERIALI E METODI

1. Selezione dei pazienti

I soggetti studiati sono stati reclutati tra i pazienti diabetici regolarmente afferenti al Servizio di Diabetologia dell'Azienda Ospedaliera - Università di Padova.

I criteri di inclusione sono stati:

- Diagnosi di diabete mellito di tipo 2, posta secondo i criteri dell'American Diabetes Association, da almeno 1 anno;
- Età compresa tra 18 e 85 anni;
- Entrambi i generi;
- Assenza di complicanze croniche avanzate o altre patologie rilevanti;
- Terapia con solo metformina oppure terapia con associazione di metformina e GLP1-RA o associazione di metformina e SGLT2i, da almeno 6 mesi.

I criteri di esclusione sono stati:

- Diagnosi di diabete mellito di tipo 1;
- Diagnosi di altri tipi di diabete;
- Presenza di complicanze croniche avanzate o altre patologie rilevanti;
- Terapia con insulina o con altri farmaci antidiabetici.

Sono stati selezionati in maniera consecutiva 17 pazienti diabetici di tipo 2, di cui: 5 erano in trattamento con sola metformina, 6 con associazione GLP1-RA e metformina e 6 con associazione SGLT2i e metformina.

2. Raccolta dei campioni e dei dati clinici

In seguito alla firma del consenso informato, ad ogni paziente è stato effettuato un prelievo venoso a digiuno. Sono state raccolte 2 provette Vacutainer da 6mL contenenti EDTA per l'isolamento delle piastrine e un campione ematico per il dosaggio degli esami di routine per il controllo metabolico; inoltre è stato raccolto un campione urine.

I parametri ematochimici studiati sono stati: emoglobina glicata (HbA1c), glicemia a digiuno, creatinina, colesterolo totale, colesterolo-HDL, colesterolo-LDL (calcolato tramite formula di Friedewald), trigliceridi e l'emocromo (leucociti, eritrociti, emoglobina, ematocrito, volume corpuscolare medio e piastrine). La velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) è stata stimata mediante formula MDRD. Sul campione estemporaneo di urine è stata valutata la microalbuminuria, mediante rapporto albumina/creatinina urinaria.

A ciascun paziente sono state inoltre misurate la pressione arteriosa sistolica e diastolica, il peso e l'altezza. È stato quindi calcolato l'indice di massa corporea (BMI) attraverso la formula: $\text{peso in kg}/(\text{altezza in m})^2$.

Attraverso la consultazione delle cartelle cliniche informatizzate si sono raccolte informazioni sulla terapia, sulla storia clinica e sulle complicanze vascolari del diabete, in ogni paziente. Si è inoltre registrata la data di inizio della terapia farmacologica antidiabetica con i farmaci in studio e si sono recuperati i valori di tutti i parametri sopracitati prima dell'inizio della terapia (entro 3 mesi), per poter fare un confronto tra prima e dopo il trattamento.

3. Isolamento e quantifica delle piastrine

Il sangue intero dei pazienti è stato prelevato mediante prelievo venoso e raccolto in due provette Vacutainer contenenti EDTA, un anticoagulante che chela il calcio ed impedisce l'aggregazione piastrinica.

Per l'isolamento delle piastrine si è utilizzato un protocollo di centrifugazione in due fasi.⁸² La prima centrifuga permette la separazione del sangue intero in tre strati caratteristici: il plasma ricco di piastrine (PRP) nella fase superiore, un sottile strato contenente leucociti chiamato "*buffy coat*" nel mezzo, e una fase contenente eritrociti sul fondo.

È stato quindi prelevato solo il PRP, ponendo particolare attenzione a non disturbare il *buffy coat* per evitare contaminazioni di leucociti. Il PRP è stato successivamente sottoposto ad una seconda centrifuga che permette di ottenere un pellet di piastrine sul fondo della provetta.

È stato quindi rimosso tutto il surnatante e le piastrine sono state risospese in *QIAzol Lysis Reagent*, una soluzione in grado di facilitare la lisi delle cellule e inibire le RNasi; questo è necessario per migliorare la resa delle successive fasi di estrazione e purificazione dell'RNA.

Un'aliquota del campione di piastrine è stata prelevata per effettuare la quantifica tramite l'analizzatore ematologico CELL-DYN Emerald (*Abbott*), questo ha permesso anche di valutare eventuali contaminazioni di altri tipi cellulari.

Il campione sospeso in *QIAzol Lysis Reagent* è stato conservato a -80°C.

4. Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA dalle piastrine è stato seguito il protocollo del kit miRNeasy Micro (*Qiagen*)⁸³, un kit appositamente progettato per la purificazione dell'RNA totale partendo da piccole quantità di cellule o tessuti.

Ai campioni di piastrine è stato aggiunto del cloroformio ed è stata effettuata una centrifuga che ha permesso di separare il campione in tre fasi: la fase superiore acquosa contiene l'RNA, mentre l'interfase e la fase organica inferiore contengono DNA e proteine. È stata quindi estratta solo la fase superiore, facendo attenzione a non trasportare materiale dalle altre due fasi. È stato poi aggiunto dell'etanolo assoluto e la miscela è stata trasferita in una colonnina *RNeasy MinElute*, posizionata su una provetta, e centrifugata.

Durante questa fase l'RNA si lega alla membrana presente sul fondo della colonnina ed il fenolo e altri contaminanti vengono eliminati passando nella provetta sottostante. L'eluato presente nella provetta a fine centrifuga è stato quindi eliminato, mentre la colonnina con l'RNA legato è stata posizionata su una nuova provetta pulita.

È stata poi effettuata una digestione tramite DNasi e una serie di lavaggi della membrana. La colonnina è infine stata posizionata su una provetta eppendorf e centrifugata alla massima velocità per la fase di eluizione. Con quest'ultimo passaggio l'RNA, prima legato alla membrana, viene eluito e raccolto nella eppendorf sottostante. I campioni di RNA così ottenuti sono poi stati conservati a -80°C.

5. Quantifica dell'RNA

L'RNA estratto è stato quantificato utilizzando lo strumento Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) che permette di misurare la concentrazione di una determinata sostanza tramite l'utilizzo di coloranti fluorescenti che legano in modo specifico la molecola di interesse. In questo caso è stato utilizzato il kit specifico per l'RNA. I coloranti utilizzati emettono fluorescenza solo quando sono legati ai loro target e l'intensità del segnale fluorescente è direttamente proporzionale alla concentrazione del target nella soluzione.

La procedura prevede che oltre ai campioni da analizzare vengano preparati anche due campioni standard, contenenti concentrazioni note di RNA, che servono allo strumento per sviluppare una curva di calibrazione. Così lo strumento, una volta rilevato il segnale fluorescente, grazie alla curva costruita con i due standard, è in grado di calcolare la concentrazione di RNA del campione (ng/ μ l).

6. Preparazione librerie

Per la preparazione delle librerie è stato seguito il protocollo del kit Illumina Stranded mRNA Prep Ligation (Illumina)⁸⁴. I passaggi principali del protocollo sono riassunti in figura 6 e 7.

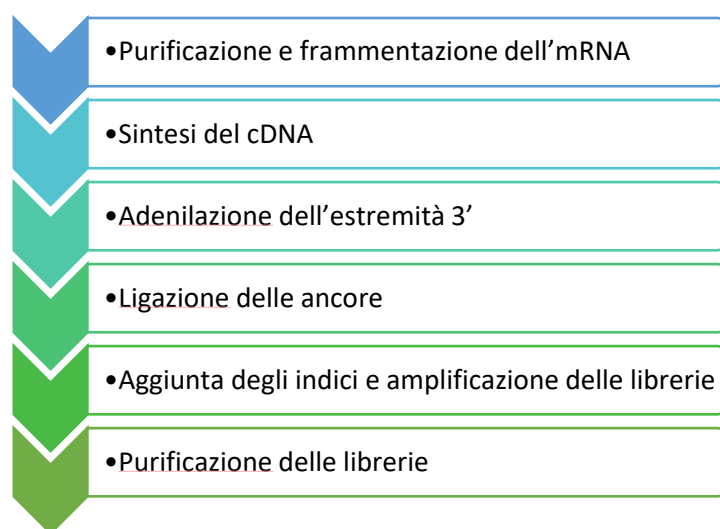


Figura 6. Passaggi per la preparazione delle librerie.

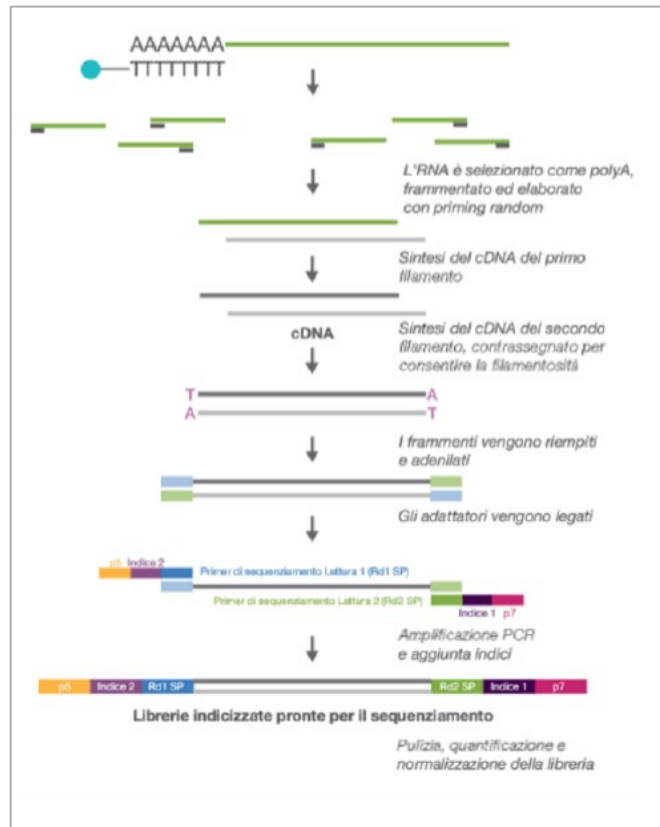


Figura 7. Illustrazione dei passaggi per la preparazione delle librerie.¹⁰⁵

- Purificazione e frammentazione dell'mRNA

Per ogni campione è stata presa la stessa quantità di RNA diluita in acqua priva di nucleasi. I campioni sono stati posti su di una piastra per PCR e in ogni pozzetto sono state aggiunte delle sfere magnetiche che presentano sulla loro superficie delle sequenze oligo(dT) e permettono di catturare le molecole di mRNA che presentano code di poliA. La piastra è stata quindi posta nel termociclatore per far avvenire la reazione di legame tra le biglie e l'mRNA.

Per purificare l'RNA la piastra è stata posizionata su un supporto magnetico, il quale attrae le biglie legate all'mRNA. È stato quindi eliminato tutto il surnatante, non legato alle biglie, e sono stati effettuati una serie di lavaggi.

Terminata la fase di purificazione si è proseguito con la frammentazione dell'mRNA attraverso l'aggiunta della Fragmentation Master Mix ed uno specifico programma al termociclatore. Al termine della reazione l'mRNA è stato frammentato e non risulta più legato alle biglie; quindi, con il supporto magnetico, le biglie sono state sequestrate ed il surnatante è stato trasferito in una nuova piastra per le fasi successive.

- **Sintesi del cDNA**

In questo step l'RNA frammentato viene retrotrascritto per produrre cDNA a doppio filamento.

Per la sintesi del primo filamento è stata utilizzata la First Strand Synthesis Master Mix, preparata con FSA (First Strand Synthesis Act D mix) e l'enzima trascrittasi inversa. FSA contiene Actinomicina D, che consente la sintesi RNA-dipendente e previene la sintesi spuria dipendente dal DNA.

I campioni sono quindi stati posti nel termociclatore per far avvenire la sintesi del primo filamento.

Con un procedimento simile è stato generato anche il secondo filamento di cDNA. Successivamente si è effettuata la purificazione dei frammenti tramite l'uso di biglie magnetiche leganti il DNA, con lo stesso procedimento descritto in precedenza.

- **Adenilazione dell'estremità 3'**

Questo passaggio permette di aggiungere un nucleotide di adenina alle estremità 3' dei frammenti di cDNA. Questo impedisce che i frammenti si leghino tra loro e permette inoltre agli adattatori di legarsi ai frammenti poiché sull'estremità degli adattatori è presente un nucleotide complementare di timina. Gli adattatori sono sequenze nucleotidiche che comprendono le ancore, gli indici e i primers per il sequenziamento NGS.

- **Ligazione delle ancore**

Durante questo step vengono legate le ancore alle estremità dei frammenti. Le ancore sono oligonucleotidi complementari alle sequenze presenti sulla flowcell del sequenziatore NextSeq.

- **Aggiunta degli indici e amplificazione delle librerie**

I frammenti di cDNA legati alle ancore vengono amplificati utilizzando la PCR. Inoltre, vengono aggiunti gli indici e le sequenze primer, necessarie per poter poi effettuare il sequenziamento NGS.

Gli indici (UDPOXXX) sono sequenze oligonucleotidiche uniche, che vengono assegnate in modo univoco ad ogni campione. Ad ogni campione vengono assegnate due sequenze distinte: l'indice 1 (i7) e l'indice 2 (i5), che si legheranno a ciascuna estremità dei frammenti di cDNA.

Ad ogni pozzetto della nostra piastra si è quindi aggiunto l'indice UDPOXXX scelto per quel determinato campione e la piastra è poi stata posta nel termociclatore per effettuare la PCR. Il prodotto finale è una libreria a doppia indicizzazione, cioè frammenti di cDNA con adattatori legati a ciascuna estremità.

- **Purificazione delle librerie**

Con lo stesso procedimento utilizzato nelle fasi precedenti si è effettuata la purificazione delle librerie tramite biglie magnetiche. Alla fine della purificazione le librerie sono pronte per il sequenziamento.

7. Quantificazione e controllo qualità delle librerie

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

Il controllo qualità delle librerie è stato effettuato mediante LabChip GX. Questo strumento utilizza un sistema di elettroforesi capillare per determinare la lunghezza dei frammenti di DNA nei campioni, i quali vengono precedentemente marcati con un fluoroforo. Lo strumento, quindi, legge l'intensità della fluorescenza lungo il capillare e alla fine genera un elettroferogramma. Inoltre, viene anche prodotta una rappresentazione digitale della corsa elettroforetica. Un esempio dei risultati è visibile in figura 8. La lunghezza media dei frammenti ottimale per il sequenziamento NGS è di 300-400 paia di basi.

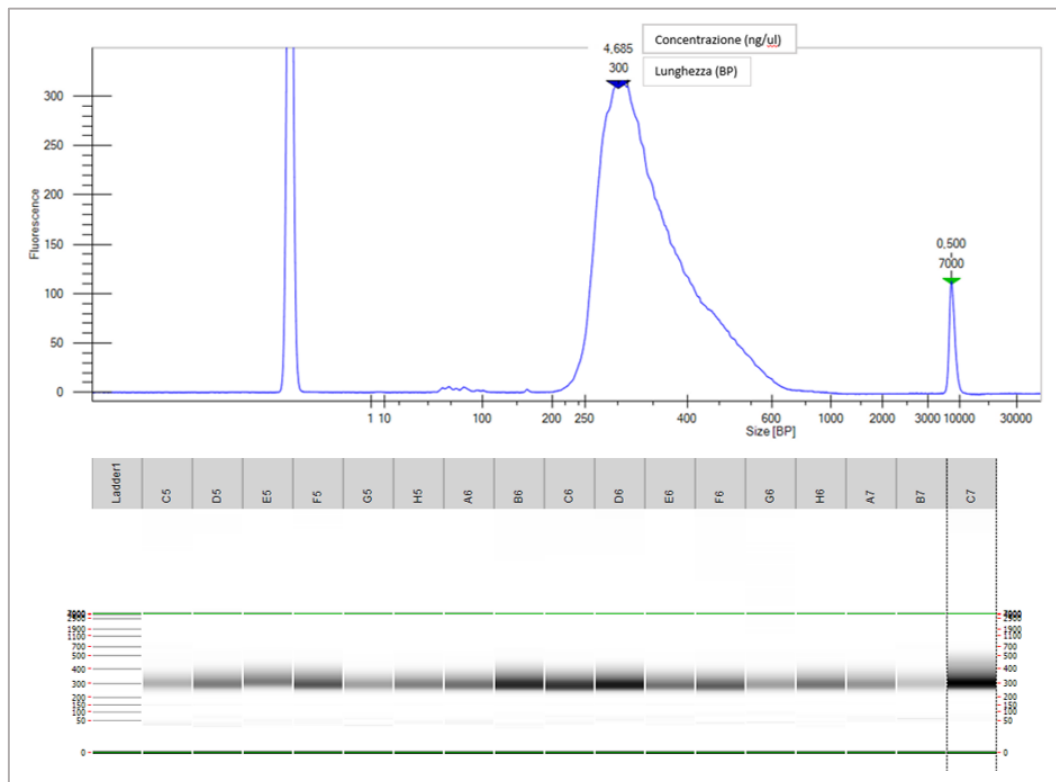


Figura 8. In alto: un elettroferogramma mostra l'intensità della fluorescenza emessa dai frammenti marcati in relazione alla loro lunghezza (espressa in paia di basi). In basso: rappresentazione digitale del gel della corsa elettroforetica nei 17 campioni.

8. Preparazione del pool per il sequenziamento

In base alla lunghezza media dei frammenti, ottenuta dopo l'analisi tramite LabChip, ed in base alla concentrazione letta al Qubit, si è calcolata la concentrazione molare di ogni libreria attraverso la formula: $[(\text{concentrazione in ng}/\mu\text{l}) / (660\text{g/mol} \times \text{dimensione media della libreria})] \times 10^6 = \text{Molarità (nM)}$.

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

Per eseguire il sequenziamento su NextSeq™ 550 (Illumina) il pool di librerie deve essere denaturato e diluito ulteriormente ad una concentrazione finale di 1.2 pM.

Il pool è stato infine combinato con una libreria PhiX denaturata e diluita a 1.8 pM. La libreria PhiX è una libreria conosciuta, derivata dal genoma di un batteriofago ben caratterizzato, e contiene una quantità bilanciata di basi (circa 45% GC e 55% AT). Viene utilizzata come controllo durante il sequenziamento.

La combinazione dei due pool è quindi stata caricata nel sequenziatore NextSeq™ 550 (Illumina).⁸⁵

9. Sequenziamento con NextSeq 550

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) Illumina si basa sulla tecnologia del sequenziamento per sintesi (SBS), che consiste nel rilevare le singole basi man mano che vengono incorporate in un filamento di DNA in crescita. La variante di SBS usata per la trascrittomiche viene chiamata RNA-Seq.

Una volta avviata la corsa nel sequenziatore NextSeq™ 550 il cDNA, frammentato e legato agli adattatori su entrambi i lati, si ibridizza alla superficie della flowcell. Questa rappresenta il supporto solido su cui avviene il sequenziamento ed è composta da un denso strato di oligonucleotidi complementari agli adattatori.

Una volta avvenuto il legame dei frammenti alla flowcell la prima serie di reazioni che avviene serve per formare i cluster: con una serie di cicli di amplificazione viene generata un'alta densità di frammenti uguali riuniti in una piccola area. Ciò garantisce che l'intensità del segnale generata durante il sequenziamento sia sufficiente per la rilevazione.

Terminata la generazione dei clusters avviene la vera reazione di sequenziamento. Una DNA polimerasi sintetizza il filamento complementare a quello del campione utilizzando dei nucleotidi marcati. Ciascuna delle quattro basi usate è legata ad un diverso colorante fluorescente che solo nel momento in cui il nucleotide viene incorporato genera un segnale. In base alle caratteristiche della fluorescenza emessa il software risale alla sequenza delle basi incorporate. (Figura 9)

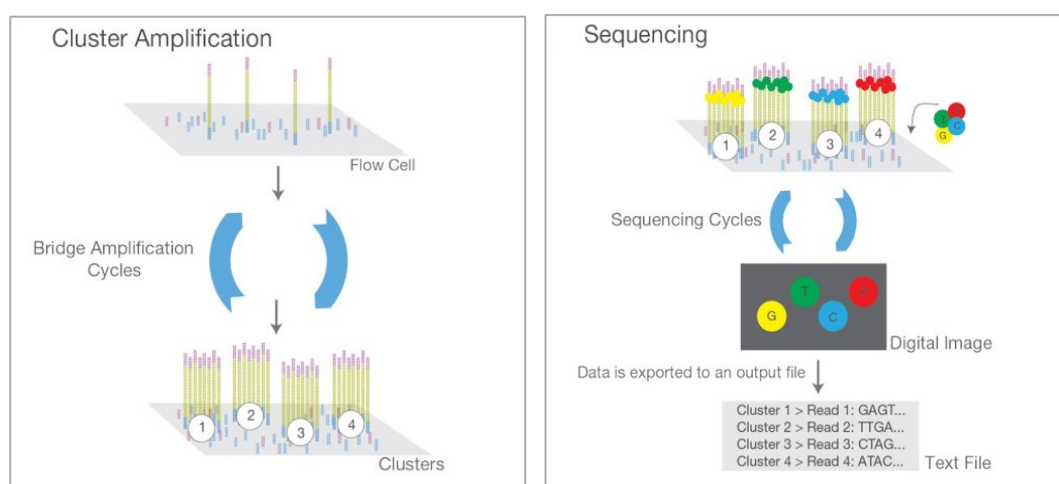


Figura 9. Illustrazione del funzionamento del NGS Illumina. A sinistra la prima fase di amplificazione dei cluster. A destra la fase di sequenziamento con i nucleotidi marcati.⁸⁶

Questa tecnica di NGS permette di analizzare milioni di brevi frammenti di DNA durante una singola corsa.^{86,87}

Insieme a ciascun frammento vengono anche sequenziati gli indici univoci (i5 ed i7) legati ai frammenti durante la preparazione delle librerie. Questo permette poi di poter ricondurre ogni trascritto al campione iniziale di appartenenza.

10. Analisi bioinformatica

Nella fase terminale del sequenziamento vengono generati dei file in formato FASTQ che sono poi stati elaborati utilizzando il software bioinformatico CLC Genomics Workbench v.22.

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

Dopo di che, le sequenze sono state allineate al genoma umano di riferimento per la ricostruzione e l'identificazione di tutti i trascritti.

Infine, è stata fatta una normalizzazione delle conte dei trascritti per permettere il confronto tra i campioni.

RISULTATI

1. Caratteristiche dei soggetti

Sono stati arruolati complessivamente 17 pazienti diabetici di tipo 2. I principali parametri demografici, antropometrici, l'emocromo e i principali parametri metabolici dell'intero gruppo al momento dell'arruolamento nello studio sono riassunti in tabella 1.

Parametro	Tutti i soggetti DM2 (n 17)
Sesso (M/F)	10/7
Età (anni)	69±8
Durata DM2 (anni)	12±7
Durata trattamento (anni)	4,1±2,9
HbA1c (mmol/mol)	55,4±11,0
Glicemia (mg/dl)	136±23
Creatinina (mg/dl)	0,95±0,32
eGFR (ml/min/1,7)	81±20
Microalbuminuria (mg/gr creatinina)	11,4±14,3
Colesterolo totale (mg/dl)	151±45
Colesterolo-HDL (mg/dl)	47±9
Colesterolo-LDL (mg/dl)	80±39
Trigliceridi (mg/dl)	118±33
Leucociti (mille/mm ³)	7,868±1,972
Eritrociti (milioni/mm ³)	4,855±0,441
Emoglobina (gr/dl)	13,8±1,4
Ematocrito (%)	42,5±3,4
MCV (fl)	87,6±6,7
Piastrine (mille/mm ³)	228±61
BMI (kg/m ²)	28,4±3,6
PAS (mmHg)	136±22
PAD (mmHg)	75±12

Tabella 1. Media±variazione standard dei parametri al momento dell'arruolamento nello studio. HbA1c=emoglobina glicata; eGFR=velocità di filtrazione glomerulare stimata con formula MDRD; MCV=volume corpuscolare medio; BMI=indice di massa corporea; PAS=pressione arteriosa sistolica; PAD= pressione arteriosa diastolica.

Il gruppo studiato è composto da 10 maschi e 7 femmine di età compresa tra 57 e 82 anni. La media dell'emoglobina glicata risulta essere superiore all'obiettivo terapeutico di HbA1c < 53 mmol/mol (7%); infatti, al momento del prelievo solo 8 pazienti su 17 avevano un buon controllo glicemico con l'emoglobina glicata a target.

Dei 17 pazienti reclutati 5 soggetti erano in trattamento con sola metformina, 6 pazienti assumevano un'associazione di GLP1-RA e metformina e altri 6 un'associazione di SGLT2i e metformina.

I principi attivi prescritti ai 6 pazienti in terapia con GLP1-RA erano: dulaglutide, assunta da 5 soggetti e semaglutide, assunta da un soggetto; tutti per via sottocutanea. Mentre i pazienti trattati con SGLT2i erano tutti in terapia con empagliflozin.

La tabella 2 riassume il confronto dei parametri valutati tra i 3 sottogruppi di trattamento prima dell'inizio della terapia farmacologica per il diabete.

Dall'analisi risulta che i tre gruppi, prima dell'inizio del trattamento, non differivano significativamente per nessun parametro.

Parametro	Pre-Metformina (n 5)	Pre-GLP1RA (n 6)	Pre-SGLT2i (n 6)	p
Sesso (M/F)	3/2	2/4	5/1	0,212
HbA1c (mmol/mol)	55,8±11,1	62,7±5,7	57,0±8,8	0,392
Glicemia (mg/dl)	159±28	148±28	150±25	0,782
Creatinina (mg/dl)	0,93±0,29	0,77±0,09	0,94±0,10	0,347
eGFR (ml/min/1,7)	80±17	91±12	82±18	0,539
Microalb (mg/gr creatinina)	4,3±3,8	13,6±9,4	6,0±3,6	0,072
Colesterolo totale (mg/dl)	182±36	198±39	168±43	0,490
Colesterolo-HDL (mg/dl)	49±9	50±10	39±7	0,128
Colesterolo-LDL (mg/dl)	109±25	121±39	98±41	0,641
Trigliceridi (mg/dl)	117±43	136±64	153±87	0,700
Leucociti (mille/mm ³)	7,78±2,01	7,61±1,78	5,71±1,01	0,268
Eritrociti (milioni/mm ³)	5,01±0,34	4,99±0,43	4,88±0,26	0,875
Emoglobina (gr/dl)	15,0±1,4	13,9±1,7	14,3±0,5	0,520
Ematocrito (%)	44±4	42±4	42±1	0,646
MCV (fl)	86,9±3,3	84,8±9,3	86,2±2,7	0,887
Piastrine (mille/mm ³)	211±41	199±44	221±95	0,846
BMI (kg/m ²)	28,8±4,1	31,9±3,8	28,3±2,8	0,232
PAS (mmHg)	135±16	143±16	126±29	0,426
PAD (mmHg)	81±13	83±9	76±11	0,578

Tabella 2. Pre-metformina=soggetti studiati prima dell'inizio del trattamento con sola metformina; Pre-GLP1-RA=soggetti studiati prima dell'inizio del trattamento con metformina e GLP1 recettore agonisti; Pre-SGLT2i=soggetti studiati prima dell'inizio del trattamento con metformina ed empagliflozin. I valori sono espressi come media±deviazione standard.

Per quanto riguarda le complicanze microvascolari indagate, prima dell'inizio della terapia, l'esame del fondo dell'occhio è risultato negativo per retinopatia diabetica in tutti i pazienti eccetto uno, che presentava una retinopatia non proliferante; il dosaggio della microalbuminuria risultava nella norma in tutti i soggetti.

Per quanto riguarda le complicanze cardiovascolari nei 17 pazienti, lo screening dei tronchi sovraortici mediante ecocolordoppler ha dimostrato la presenza di placche aterosclerotiche in 10 soggetti, tutte emodinamicamente non significative (stenosi <50%). Infine, 7 pazienti su 17 presentavano un infarto miocardico acuto pregresso. Dall'analisi statistica relativa a questi parametri è risultato che la differenza tra i tre gruppi non era significativa per nessuna delle complicanze indagate (χ^2 =ns per la retinopatia; $p=0,072$ per l'ACR; $p=0,652$ per la stenosi carotidea, $\chi^2=0,260$ per IMA pregresso).

Ai pazienti veniva quindi prescritta -o confermata- una diversa terapia anti-iperlipemizzante, in base alle caratteristiche cliniche e alla scelta del diabetologo. La durata delle specifiche terapie, al momento dell'arruolamento nello studio, viene riportata in tabella 3. Nella stessa tabella sono riassunti i valori degli altri parametri indagati ed i confronti tra i 3 gruppi di trattamento.

Parametro	Metformina (n 5)	GLP1-RA (n 6)	SGLT2i (n 6)	p
Durata trattamento (anni)	7±3,2	2,2±1,2	3,5±2	0,009*
Età (anni)	77±3	67±9	66±5**	0,021
Durata DM2 (anni)	13±8	9±7	15±5	0,320
HbA1c (mmol/mol)	58,0±12,9	51,4±11,9	56,5±9,7	0,641
Glicemia (mg/dl)	145±34	126±19	136±14	0,432
Creatinina (mg/dl)	1,10±0,51	0,83±0,26	0,93±0,13	0,436
eGFR (ml/min/1,7)	72,6±27,6	88,2±22,5	82,2±6,8	0,468
Microalb (mg/gr creatinina)	11,5±8,2	16,9±22,1	5,9±5,8	0,430
Colesterolo totale (mg/dl)	151±26	182±61	125±24	0,112
Colesterolo-HDL (mg/dl)	47±3	48±16	46±3	0,930
Colesterolo-LDL (mg/dl)	83±26	109±51	55±17	0,067
Trigliceridi (mg/dl)	104±24	127±45	120±29	0,606
Leucociti (mille/mm ³)	8,520±1,933	8,065±2,089	7,128±1,992	0,514
Eritrociti (milioni/mm ³)	4,622±0,275	4,892±0,594	5,013±0,350	0,353
Emoglobina (gr/dl)	14,0±1,1	13,3±1,5	14,1±1,7	0,716
Ematocrito (%)	42±3,3	41,8±3,4	43,5±3,8	0,685

Parametro	Metformina (n 5)	GLP1-RA (n 6)	SGLT2i (n 6)	p
MCV (fl)	90,7±2	86±8,1	86,8±8	0,502
Piastrine (mille/mm ³)	231,2±51	215,7±64,2	237,2±74,6	0,841
BMI (kg/m ²)	26,9±4,9	30,6±2,4	27,1±2,9	0,150
PAS (mmHg)	134±23	144±14	130±28	0,572
PAD (mmHg)	79±10	82±15	68±8	0,123

Tabella 3. Metformina=soggetti in trattamento con sola metformina; GLP1-RA=soggetti in trattamento con associazione metformina e GLP1 recettore agonisti; SGLT2i=soggetti in trattamento con associazione metformina ed empagliflozin. I valori sono espressi come media±deviazione standard.

*p=0,003 metformina vs GLP1-RA, p=0,020 metformina vs SGLT2i

**p=0,032 metformina vs SGLT2i

I tre gruppi, al momento dell'arruolamento nello studio, differenziavano significativamente per la durata del trattamento con i farmaci in studio e per l'età. I pazienti trattati con metformina avevano assunto il farmaco per un tempo significativamente maggiore rispetto agli altri due gruppi e presentavano un'età più elevata rispetto ai soggetti in trattamento con l'associazione di metformina e SGLT2i, ma simile a quella dei soggetti in trattamento con l'associazione di metformina e GLP1-RA.

Si sono quindi confrontati i valori dei parametri studiati prima e dopo il trattamento con i farmaci oggetti dello studio, i cui risultati sono riassunti in tabella 4.

Parametro	Basale (n 17)	Post-terapia (n 17)	p
HbA1c (mmol/mol)	58,3±8,7	54,5±10,8	0,080
Glicemia (mg/dl)	154±26	133±23	0,193
Creatinina (mg/dl)	0,89±0,19	0,95±0,35	0,002*
eGFR (ml/min/1,7)	84±15	81±21	0,076
Microalb (mg/gr creatinina)	8,3±7,4	11,1±14,6	0,054
Colesterolo totale (mg/dl)	181±40	153±46	0,034*
Colesterolo-HDL (mg/dl)	44±8	48±9	0,016*
Colesterolo-LDL (mg/dl)	108±35	83±42	0,053
Trigliceridi (mg/dl)	139±65	118±34	0,002*
Leucociti (mille/mm ³)	7,27±1,83	7,70±2,12	<0,001*
Eritrociti (milioni/mm ³)	4,97±0,34	4,82±0,47	0,049*
Emoglobina (gr/dl)	14,6±1,3	13,9±1,4	0,426
Ematocrito (%)	42,8±3,7	39,4±11,7	0,118

Parametro	Basale (n 17)	Post-terapia (n 17)	p
MCV (fl)	85,8±6,4	88,5±6,3	<0,001*
Piastrine (mille/mm ³)	207,6±52,2	217,9±56,6	<0,001*
BMI (kg/m ²)	30,0±3,8	28,1±3,6	<0,001*
PAS (mmHg)	138±20	136±23	0,115
PAD (mmHg)	82±9	77±12	0,432

Tabella 4. Basale=valori prima dell'inizio del trattamento antidiabetico farmacologico; Post-terapia=valori dopo il trattamento con i farmaci in esame. I valori sono espressi come media±deviazione standard.

Considerando l'intero gruppo di pazienti risulta che dopo il trattamento anti-iperlipidico sono significativamente diminuiti i seguenti parametri: colesterolo totale, trigliceridi, eritrociti e BMI. Sono invece aumentati: creatinina, colesterolo-HDL, leucociti, MCV e piastrine. L'incremento di alcuni parametri potrebbe in parte essere secondario al progredire della patologia (creatinina e microalbuminuria), mentre è evidente l'efficacia della terapia su BMI e profilo lipidico, borderline per il controllo glicemico.

Lo stesso confronto è stato eseguito considerando separatamente i tre gruppi di trattamento. I risultati di tali analisi sono riportati nelle tabelle 5, 6 e 7.

Parametro	Pre-metformina (n 5)	Post-metformina (n 5)	p
HbA1c (mmol/mol)	55,8±11,1	58,0±12,9	0,530
Glicemia (mg/dl)	159,4±27,6	145,4±33,6	0,093
Creatinina (mg/dl)	0,93±0,29	1,09±0,51	0,034*
eGFR (ml/min/1,7)	80,0±16,9	72,6±27,6	0,149
Microalb (mg/gr creatinina)	4,3±3,8	11,5±8,2	0,035*
Colesterolo totale (mg/dl)	176,5±38,4	151,3±26,0	0,500
Colesterolo-HDL (mg/dl)	45,5±3,9	47,0±2,8	0,696
Colesterolo-LDL (mg/dl)	106,2±27,8	83,4±26,3	0,403
Trigliceridi (mg/dl)	124,3±46,4	104,0±24,2	0,343
Leucociti (mille/mm ³)	7,788±2,020	8,520±1,933	0,044*
Eritrociti (milioni/mm ³)	5,018±0,338	4,622±0,275	0,640
Emoglobina (gr/dl)	15,4±1,3	14,0±1,1	0,681
Ematocrito (%)	44,1±4,3	42,0±3,3	0,638
MCV (fl)	86,9±3,3	90,9±2,3	0,091
Piastrine (mille/mm ³)	210,8±40,8	231,2±51,0	0,024*
BMI (kg/m ²)	29,15±4,63	26,88±4,94	0,006*

Parametro	Pre-metformina (n 5)	Post-metformina (n 5)	p
PAS (mmHg)	140,8±8,3	133,8±23,0	0,558
PAD (mmHg)	86,5±4,7	79,0±9,8	0,053

Tabella 5. Valori prima e dopo il trattamento considerando il gruppo di pazienti trattati con solo metformina.

Il gruppo trattato con sola metformina presenta un significativo miglioramento del BMI.

Parametro	Pre-GLP1RA (n 6)	Post-GLP1RA (n 6)	p
HbA1c (mmol/mol)	62,0±6,2	51,4±11,9	0,095
Glicemia (mg/dl)	150,3±31,8	117,5±3,4	0,780
Creatinina (mg/dl)	0,77±0,09	0,81±0,30	0,201
eGFR (ml/min/1,7)	90,8±12,3	87,6±25,1	0,619
Microalb (mg/gr creatinina)	13,6±9,4	16,9±22,1	0,193
Colesterolo totale (mg/dl)	198,4±39,6	181,6±61,5	0,327
Colesterolo-HDL (mg/dl)	50,0±9,6	51,0±15,8	0,157
Colesterolo-LDL (mg/dl)	120,9±39,3	115,4±55,9	0,289
Trigliceridi (mg/dl)	136,4±64,1	126,8±44,7	0,118
Leucociti (mille/mm ³)	7,610±1,787	8,065±2,090	0,208
Eritrociti (milioni/mm ³)	4,985±0,426	4,892±0,594	0,098
Emoglobina (gr/dl)	13,9±1,7	12,7±1,1	0,424
Ematocrito (%)	42,1±4,2	41,8±3,4	0,526
MCV (fl)	84,8±9,3	85,9±8,1	<0,001*
Piastrine (mille/mm ³)	198,5±43,5	215,7±64,2	0,061
BMI (kg/m ²)	31,9±3,8	30,6±2,4	0,001*
PAS (mmHg)	147,4±12,8	144,4±13,8	0,425
PAD (mmHg)	83,2±9,6	81,8±14,6	0,711

Tabella 6. Valori prima e dopo il trattamento considerando solo i pazienti trattati con associazione di metformina e GLP1 recettore agonisti.

Il trattamento con GLP1-RA influisce marcatamente sulla riduzione del BMI, risultato in linea con l'effetto conosciuto di questi farmaci sul peso corporeo.

Parametro	Pre-SGLT2i (n 6)	Post-SGLT2i (n 6)	P
HbA1c (mmol/mol)	57,0±8,8	54,0±8,5	0,061
Glicemia (mg/dl)	150,4±24,8	133,6±14,5	0,386
Creatinina (mg/dl)	0,94±0,10	0,91±0,14	0,317
eGFR (ml/min/1,7)	82,4±17,5	82,8±7,4	0,947

Parametro	Pre-SGLT2i (n 6)	Post-SGLT2i (n 6)	P
Microalb (mg/gr creatinina)	5,9±3,6	3,6±1,6	0,573
Colesterolo totale (mg/dl)	167,6±43,3	126,2±26,8	0,387
Colesterolo-HDL (mg/dl)	38,8±7,3	46,2±3,3	0,435
Colesterolo-LDL (mg/dl)	98,1±40,5	55,8±19,0	0,772
Trigliceridi (mg/dl)	153,4±87,1	121,2±31,8	0,054
Leucociti (mille/mm ³)	5,713±1,017	5,597±1,489	0,234
Eritrociti (milioni/mm ³)	4,880±0,259	4,990±0,511	0,516
Emoglobina (gr/dl)	14,3±0,5	14,9±1,5	0,253
Ematocrito (%)	42,0±1,1	45,3±4,0	0,879
MCV (fl)	86,2±2,7	90,6±5,6	0,288
Piastrine (mille/mm ³)	220,7±95,4	200,0±66,0	0,114
BMI (kg/m ²)	28,3±2,8	26,1±1,9	0,291
PAS (mmHg)	126,0±28,6	130,0±30,8	0,325
PAD (mmHg)	76,0±10,8	69,6±7,1	0,183

Tabella 7. Valori prima e dopo il trattamento considerando solo i pazienti trattati con associazione di metformina e SGLT2 inibitori.

Il gruppo di pazienti in terapia con SGLT2 inibitori non ha presentato differenze statisticamente significative dei valori studiati, probabilmente anche a causa della scarsa numerosità del campione.

Valutando le differenze dei parametri tra i valori pre- e quelli post-terapia in un confronto tra i 3 gruppi di trattamento non si osservavano differenze statisticamente significative.

2. Controllo qualità dell'estrazione delle piastrine

La quantità di piastrine isolate dal sangue dei pazienti è stata determinata attraverso l'analizzatore Emerald CELL-DYN. Sono inoltre state quantificate le concentrazioni di eritrociti e leucociti presenti nei campioni dopo l'estrazione. La media delle cellule/ μL presenti nei campioni è visibile nel grafico in figura 10.

I risultati mostrano che la contaminazione di altre cellule diverse dalle piastrine è stata minima, tale da non influire significativamente sulle analisi successive.

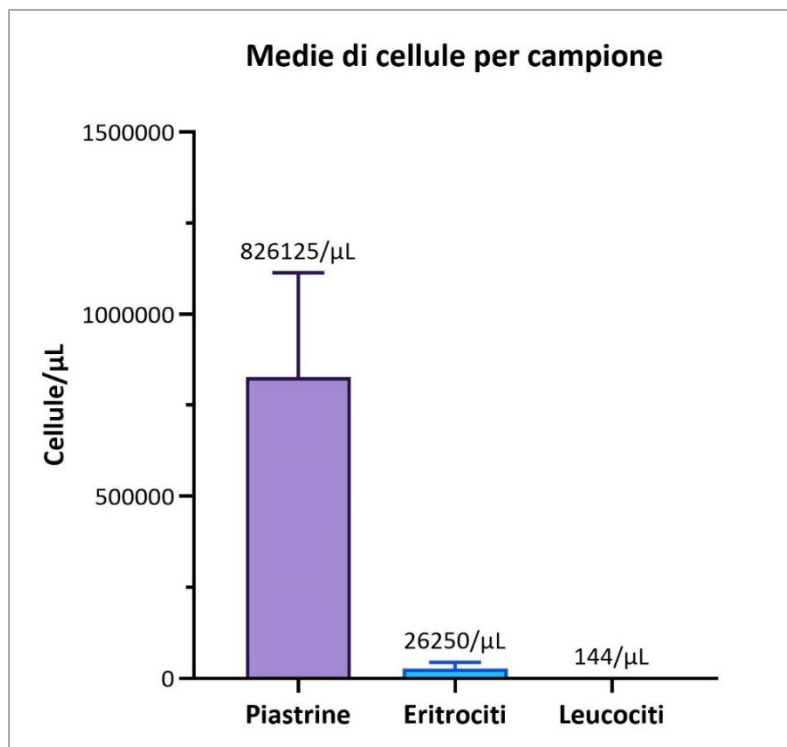


Figura 10. Cellule presenti nei campioni dopo l'isolamento delle piastrine.

3. Analisi dell'espressione degli mRNA

Le sequenze ottenute in seguito all'analisi NGS sono state allineate al genoma di riferimento e i risultati ottenuti hanno mostrato la presenza nei campioni di vari tipi di RNA, comprendenti mRNA, rRNA, tRNA e RNA non codificanti. Per questo studio sono stati valutati solo gli RNA codificanti per proteine.

Nella tabella 8 sono elencati i 50 trascritti più espressi, considerando tutti i pazienti in esame. Questi mRNA rappresentano pertanto quelli maggiormente espressi nelle piastrine e sono sostanzialmente concordi con quelli riscontrati in altri studi sul trascrittoma piastrinico, in soggetti non diabetici.^{57,58}

TRASCritto	MEDIA CONTE	NOME PROTEINA
MT-ND1	110101,32	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 1
MT-ND2	79528,90	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 2
MT-ND4	77031,14	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 4
MT-CO1	56229,51	Citocromo C mitocondriale ossidasi I
MT-CO3	42023,02	Citocromo C mitocondriale ossidasi III
MT-ND5	41565,52	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 5
MT-ATP6	40055,85	Subunità di membrana ATP sintasi mitocondriale 6
MT-CO2	36563,29	Citocromo C mitocondriale ossidasi II
MT-CYB	34060,32	Citocromo B mitocondriale
B2M	23830,81	Beta-2-microglobulina
TMSB4X	17467,99	Timosina Beta 4 legata all'X
NRGN	12164,58	Neurogranina
FTH1	12134,81	Catena pesante della ferritina 1
MT-ND3	11405,67	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 3
HLA-E	7857,83	Complesso maggiore di istocompatibilità-I, E
SPARC	7584,45	Proteine secrete acide e ricche di cisteina
F13A1	7053,35	Fattore di coagulazione XIII catena A
MT-ND4L	6787,67	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 4L
TUBB1	6517,12	Tubulina Beta 1, Classe VI
TLN1	6202,26	Talina 1
CAVIN2	6071,25	Proteina associata alle caveole 2
MT-ND6	5715,86	NADH mitocondriale: subunità dell'ubichinone ossidoreduttasi 6
FLNA	5681,32	Filamina A
TAGLN2	5607,72	Transgelina 2
MT-ATP8	5503,18	Subunità di membrana ATP sintasi mitocondriale 8
MAP3K7CL	5039,17	MAP3K7 C-Terminale Like
GNAS	4667,53	Locus complesso GNAS
ACTB	4611,87	Actina Beta
CLU	4513,45	Clusterina
PPBP	4376,50	Proteina di base pro-piastrinica
MYH9	3704,18	Catena pesante della miosina 9
RGS18	3529,40	Regolatore della segnalazione della proteina G18
PTGS1	3485,32	Prostaglandina-endoperossido sintasi 1
ITGA2B	3171,39	Subunità dell'integrina Alpha 2b
H2AC6	2997,18	Istone raggruppato H2A 6
PF4	2853,23	Fattore piastrinico 4
OAZ1	2814,15	Antizima dell'ornitina decarbossilasi 1
ITGB3	2747,74	Subunità di integrina Beta 3
CCL5	2719,20	Chemochine (CC Motif) Ligando 5
ITM2B	2699,55	Proteina integrale di membrana 2B
FTL	2647,59	Catena leggera della ferritina
PRKAR2B	2598,71	Subunità regolatoria tipo II dipendente dalla chinasi Beta
PGRMC1	2446,52	Componente del recettore del progesterone 1
SH3BGL3	2359,72	Proteine ricche di glutammato legante il dominio SH3 Like 3
ITGB1	2248,07	Subunità di integrina Beta 1
GRAP2	2019,57	Proteine dell'adattatore relative a GRB2 2
VCL	2015,32	Vinculin
MMD	2001,96	Fattore di differenziazione da monociti a macrofagi
CALM3	1934,78	Calmodulina 3
H3-3A	1929,74	Istone H3.3 A

Tabella 8. Primi 50 trascritti più espressi nei campioni.

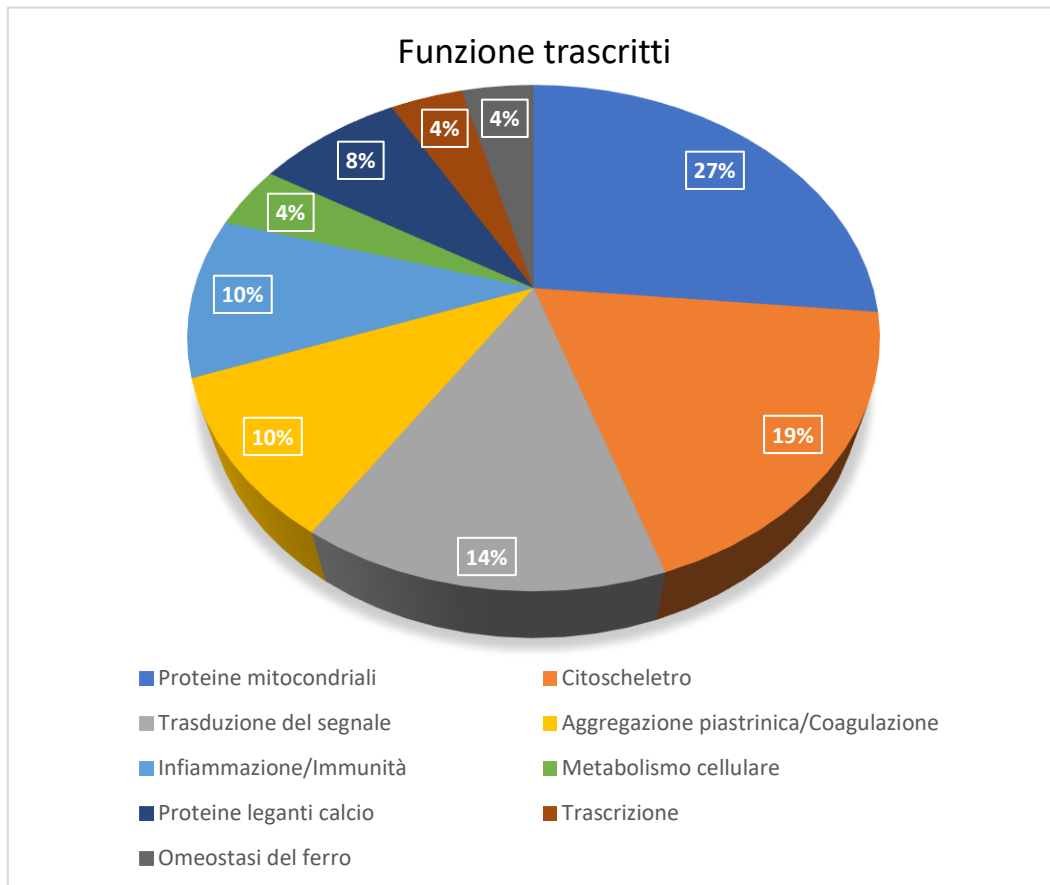


Figura 11. Funzioni cellulari in cui sono coinvolti i 50 trascritti più espressi nelle piastrine.

I primi 10 trascritti più espressi codificano per enzimi mitocondriali, mentre il 19% rappresentano proteine del citoscheletro o che sono implicate nel suo rimodellamento. Il contributo energetico dei mitocondri ed il rimodellamento del citoscheletro sono importanti per il funzionamento delle piastrine, in quanto implicati nelle modifiche morfologiche che avvengono nella prima fase di attivazione piastrinica.

Inoltre, 14% dei trascritti più espressi è implicato nella trasduzione di segnali intra- ed extra-cellulari, il 10% è strettamente correlato all'attivazione ed aggregazione piastrinica ed un ulteriore 10% è implicato in processi infiammatori e immunitari (Figura 11).

La figura 12 mostra graficamente il numero delle conte dei primi 10 trascritti identificati, implicati in processi diversi da quelli mitocondriali.

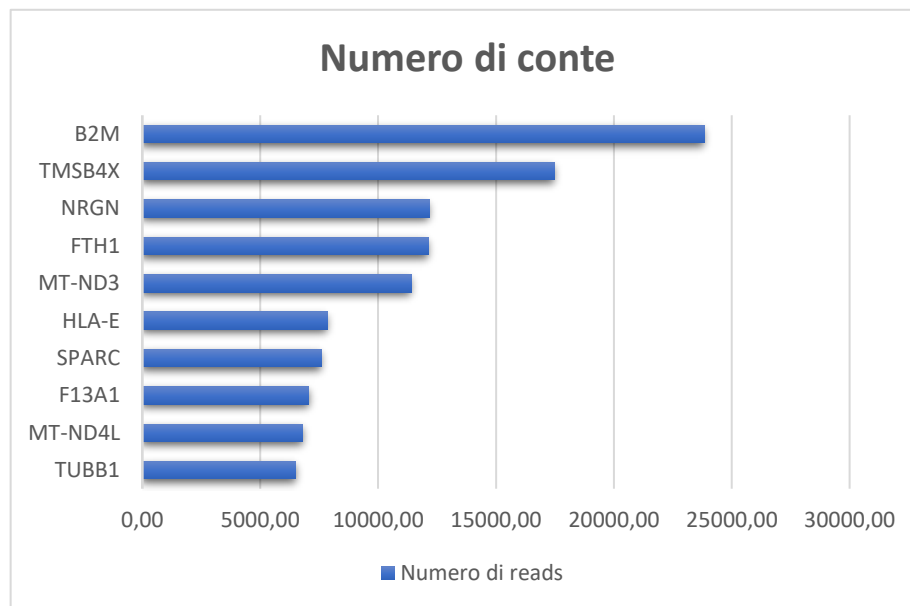


Figura 12. Numero medio di conte dei 10 trascritti più espressi, esclusi quelli mitocondriali.

Sui trascritti ottenuti dal sequenziamento è stata innanzitutto eseguita l'analisi bioinformatica *Principal Component Analysis* (PCA). Questo tipo di analisi è usata per la semplificazione di grandi insiemi di dati, il suo scopo è ridurre il numero di variabili minimizzando il più possibile la perdita di informazioni. Il grafico della PCA ci fornisce quindi un'indicazione delle relazioni tra i diversi gruppi prendendo in considerazione tutti i trascritti risultati dal sequenziamento.

L'analisi PCA è stata svolta confrontando il gruppo in terapia con la metformina, che rappresenta lo standard di trattamento per il diabete, rispetto agli altri due gruppi di trattamento: associazione di metformina e SGLT2 inibitori (Figura 13) e associazione con GLP1 recettore agonisti (Figura 14). I grafici mostrano una buona clusterizzazione dell'espressione degli mRNA tra il gruppo in trattamento con solo metformina e gli altri due gruppi di trattamento.

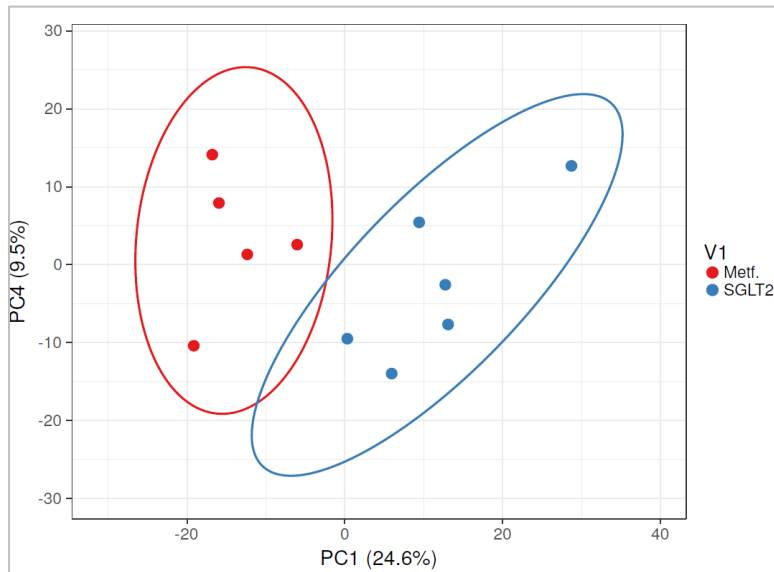


Figura 13. Clusterizzazione mediante analisi PCA. In rosso è segnato il gruppo in trattamento con metformina, in blu il gruppo in terapia con SGLT2i e metformina.

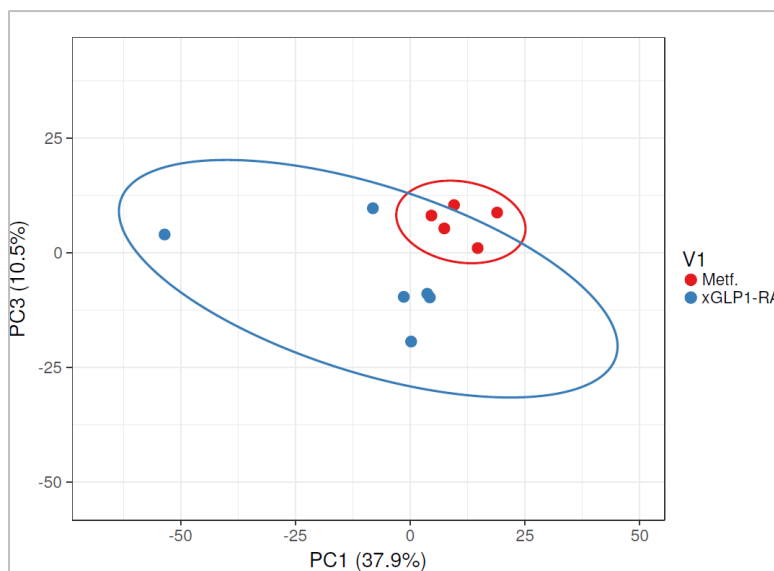


Figura 14. Clusterizzazione mediante analisi PCA. In rosso è segnato il gruppo in trattamento con metformina, in blu il gruppo in terapia con GLP1-RA e metformina.

4. Analisi differenziale degli mRNA

L'analisi differenziale dell'espressione degli mRNA è stata eseguita mediante il software *CLC Genomics*, considerando solamente i trascritti che presentavano una media di conte >2 in almeno uno dei tre gruppi; eliminando quindi quelli con un numero di conte molto basso o pari a zero. Da questo primo filtraggio sono risultati 14740 trascritti. L'analisi della diversa espressione degli mRNA viene visualizzata mediante il grafico Volcano Plot che mostra gli mRNA up-regolati (verde) e quelli

down-regolati (rosso) rispetto al gruppo in terapia con sola metformina (Figura 15 e 16).

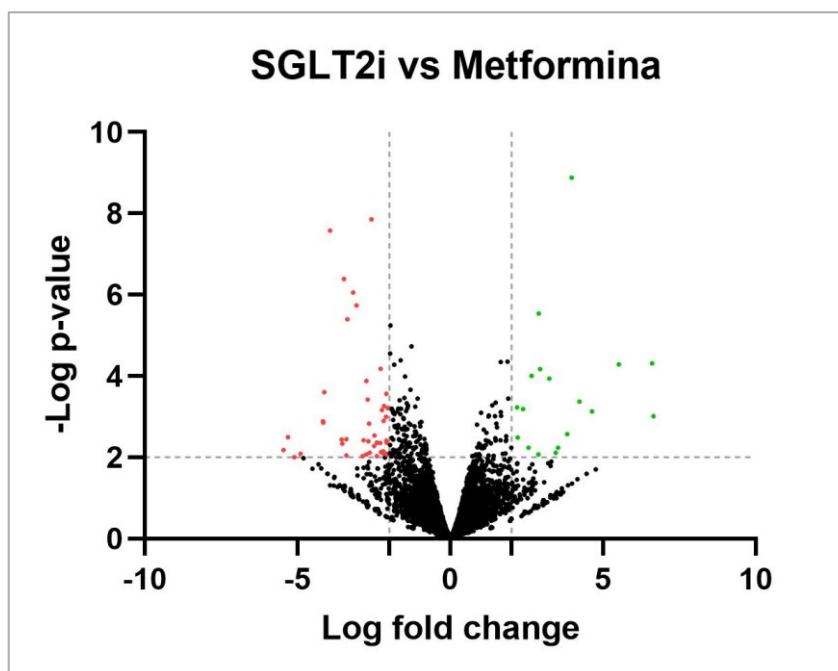


Figura 15. Volcano Plot che mostra i trascritti up-regolati (verde) e down-regolati (rosso) nel gruppo in trattamento con SGLT2 inibitori in confronto al gruppo in terapia con sola metformina.

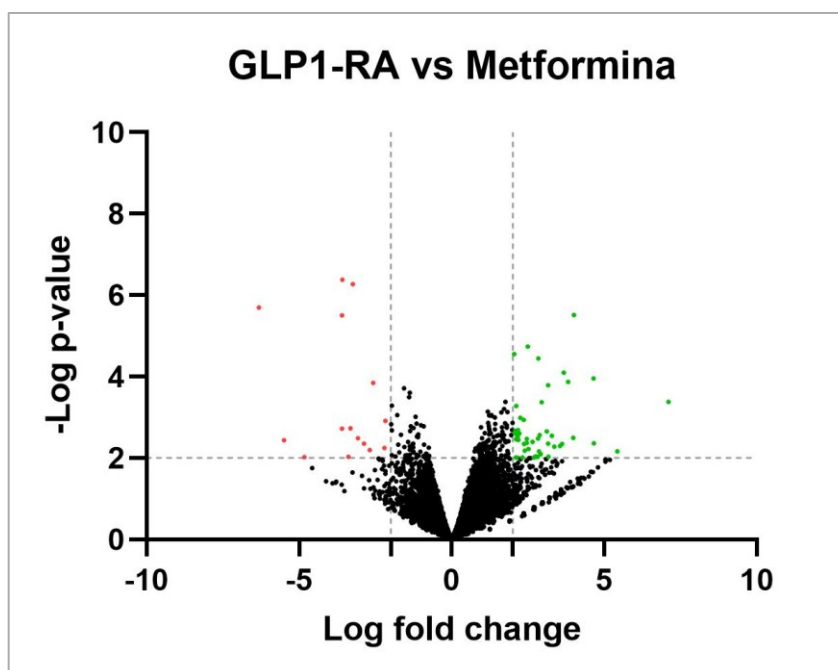


Figura 16. Volcano Plot che mostra i trascritti up-regolati (verde) e down-regolati (rosso) nel gruppo in trattamento con GLP1-RA in confronto al gruppo in terapia con sola metformina.

Tra gli mRNA identificati dall'analisi differenziale, sono stati selezionati i trascritti che potenzialmente potrebbero rivestire un ruolo nella fisiologia piastrinica.

Di seguito vengono mostrati i valori di Fold Change degli mRNA significativamente diversi tra i gruppi di trattamento considerati a coppie.

4.1 SGLT2 inibitori vs Metformina

	mRNA	Fold Change	p-value
Up-regolati	SLC4A1	3,140	4,53 E-05
	CCS	2,376	0,00098
Down-regolati	CEBPD	-1,710	0,037
	NAMPT	-1,862	0,0057
	ACSL1	-1,925	0,0013
	S100A9	-2,199	0,0023
	BASP1	-2,218	0,0006
	S100A12	-2,565	0,0014
	CXCR1	-2,651	0,00061
	EGR1	-3,316	0,0024
	MMP25	-3,891	5,71 E-06

Tabella 9. mRNA up- e down- regolati nel gruppo in terapia con SGLT2i rispetto al gruppo in trattamento con metformina.

Rispetto al gruppo in terapia con sola metformina, nel gruppo in trattamento con l'associazione di metformina e SGLT2i risultano significativamente up-regolati 2 trascritti, mentre 9 sono down-regolati (Tabella9).

I due mRNA up-regolati sono CCS e SLC4A1 (Figura 17).

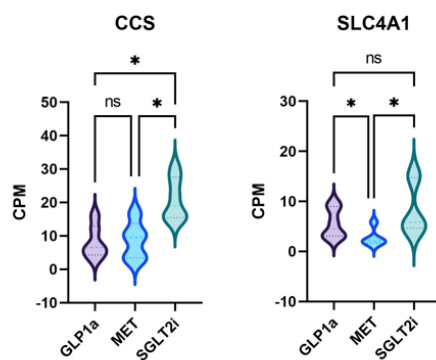


Figura 17. Grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi up-regolati tra i due gruppi in studio (SGLT2i vs Metformina).

Le funzioni delle proteine derivate da questi trascritti sono⁸⁸:

- **CCS** è una proteina chaperone che fornisce specificamente rame alla superossido dismutasi rame/zinco e può così attivare l'enzima. Svolge quindi un ruolo nella disintossicazione delle specie reattive dell'ossigeno.
- **SLC4A1** è una proteina che appartiene alla famiglia dei Solute Carrier. Ha una funzione di trasportatore che media lo scambio anionico attraverso la membrana cellulare. È anche una proteina strutturale che mantiene la normale flessibilità e stabilità della membrana cellulare attraverso le interazioni del suo dominio citoplasmatico con proteine citoscheletriche.

I 9 trascritti down-regolati nei pazienti in terapia con SGLT2 inibitori sono visibili in figura 18.

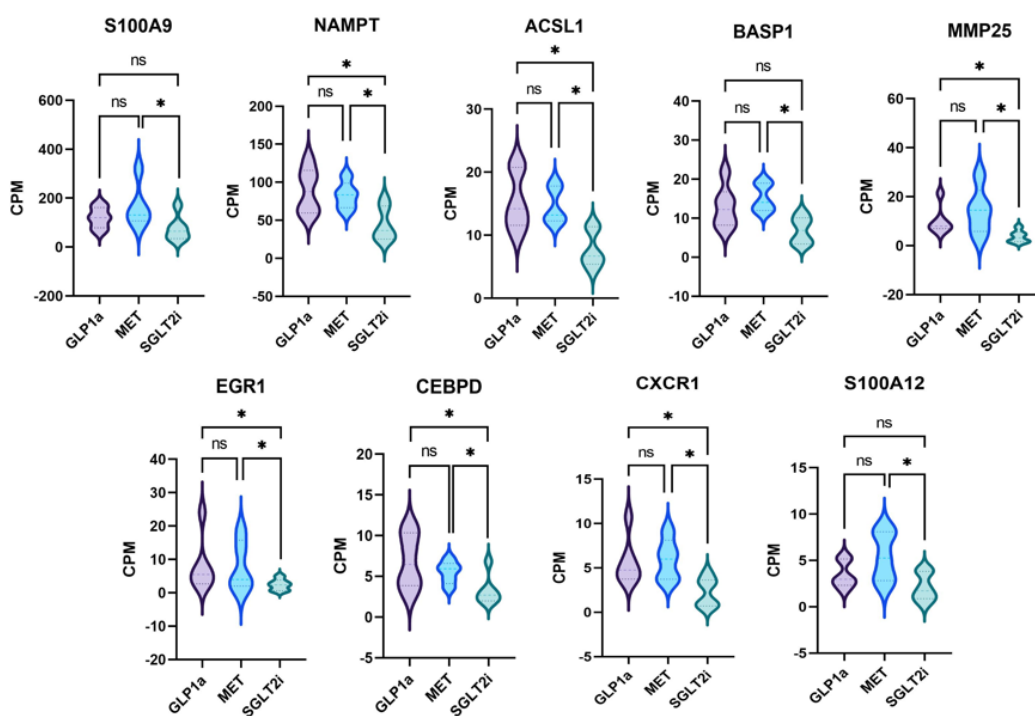


Figura 18. Grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi down-regolati tra i due gruppi in studio (SGLT2i vs Metformina).

Le funzioni delle proteine da loro codificate⁸⁸:

- **S100A9** è una proteina legante il calcio appartenente alla famiglia delle S100. È anche conosciuta con il nome di Calprotectina o MRP-14 (proteina correlata alla mieloide 14). Le proteine S100 sono coinvolte nella regolazione di numerosi processi cellulari; in particolare S100A9 svolge un

importante ruolo nella regolazione dei processi infiammatori e della risposta immunitaria.

- **NAMPT** (nicotinamide fosforibosiltransferasi), anche detta Visfatina, è una proteina coinvolta in molti importanti processi biologici. La forma secreta si comporta sia come citochina, con proprietà immunomodulanti, che come adipochina con proprietà insulino-mimetiche.
- **ACSL1** (Acil-CoA sintetasi a catena lunga) è una ligasi del coenzima A degli acidi grassi a catena lunga e svolge un ruolo chiave nella biosintesi dei lipidi e nella degradazione degli acidi grassi. L'espressione di ACS1 è correlata negativamente alle misure di insulino-resistenza negli adipociti.
- **BASP1** è una proteina legata alla membrana con diversi siti di fosforilazione. Tra i suoi percorsi correlati ci sono la trasduzione del segnale e la segnalazione delle GTPasi Rho.
- **MMP25** è una metallopeptidasi di matrice appartenente alla sottofamiglia delle MMP di membrana ed è quindi ancorata alla membrana plasmatica. Collettivamente, questi enzimi sono in grado di degradare le proteine della matrice extracellulare.
- **EGR1** (Early Growth Response 1) è una proteina che funge da regolatore trascrizionale. Media le risposte all'ischemia e all'ipossia e regola l'espressione di proteine coinvolte nei processi infiammatori come IL1B e CXCL2. Inoltre, è stato dimostrato che modula il livello di espressione di CD40L nei megacariociti.
- **CEBPD** è un fattore di trascrizione importante nella regolazione dei geni coinvolti nelle risposte immunitarie e infiammatorie. Nelle cellule megacariocitiche riduce i livelli di espressione dell'mRNA del recettore per la prostaciclina.
- **CXCR1** (recettore per chemochine con motivo CXC-1) è un recettore per l'interleuchina 8, accoppiato a una proteina G.
- **S100A12**, anche detta EN-RAGE (proteina extracellulare legante RAGE) è un membro della famiglia di proteine S100 leganti il calcio. Legandosi al recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE) attiva le vie di segnalazione che portano alla produzione di citochine pro-

infiammatorie e alla sovraregolazione delle molecole di adesione cellulare ICAM1 e VCAM1. La sua attività pro-infiammatoria prevede anche il reclutamento di leucociti e la regolazione della loro adesione e migrazione.

4.2 GLP1-recettore agonisti vs Metformina

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

Tabella 10. mRNA up- e down- regolati nel gruppo in terapia con GLP1-RA rispetto al gruppo in trattamento con metformina.

Un solo trascritto risulta over-espresso nel gruppo in trattamento con l'associazione di metformina e GLP1-RA rispetto al gruppo in terapia con metformina, mentre due mRNA risultano down-regolati (Tabella 10).

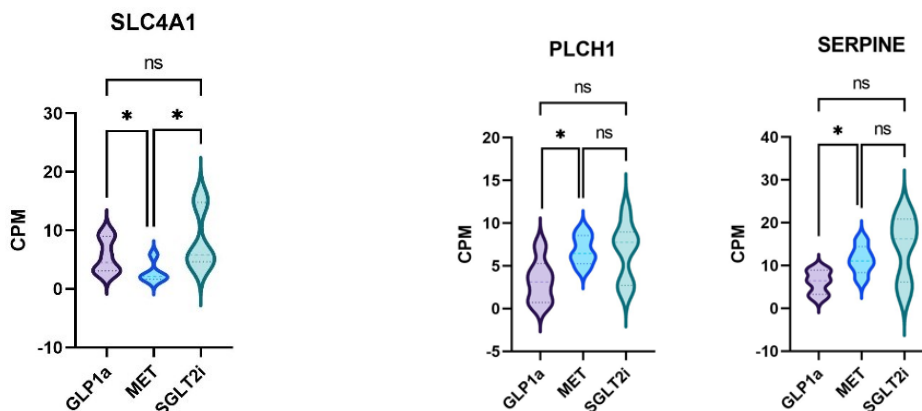


Figura 19. Grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi up-regolati (a sinistra) e down-regolati (a destra) tra i due gruppi in studio (GLP1-RA vs metformina).

Il trascritto up-regolato è SCL4A1, che risultava up-regolato anche nel gruppo in trattamento con gli inibitori di SGLT2. I due mRNA down-regolati invece sono PLCH1 e SERPINE1 (Figura 19), i cui corrispondenti proteici svolgono le seguenti funzioni⁸⁸:

- **PLCH1** (fosfolipasi C Eta 1) è un membro della superfamiglia di enzimi fosfolipasi C che scinde il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato per generare i secondi messaggeri IP3 e DAG.
- **SERPINE1**, anche chiamato PAI1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1) è un membro della superfamiglia degli inibitori della serina proteasi (Serpine). È il principale inibitore dell'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA) e dell'urochinasi (uPA); è quindi un inibitore della fibrinolisi.

4.3 GLP1-recettore agonisti vs SGLT2 inibitori

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

Tabella 11. mRNA up- e down- regolati nel gruppo in terapia con GLP1-RA rispetto al gruppo in trattamento con SGLT2i.

Il gruppo in terapia con l'associazione di GLP1-RA e metformina è stato confrontato rispetto al gruppo in trattamento con l'associazione di SGLT2i e metformina. Sono risultati 7 trascritti up-regolati e 4 down-regolati (Tabella 9).

Dei 7 trascritti up-regolati 6 risultavano anche down-regolati nel gruppo in trattamento con SGLT2 inibitori rispetto alla metformina, ad eccezione di MYADM (Figura 20):

- **MYADM** (marcatore associato alla differenziazione mieloide) codifica per una proteina coinvolta in diversi processi, tra cui la regolazione negativa dell'adesione cellula-cellula e della segnalazione della proteina chinasi C. Inoltre, svolge un ruolo importante nel differenziamento mieloide.⁸⁸

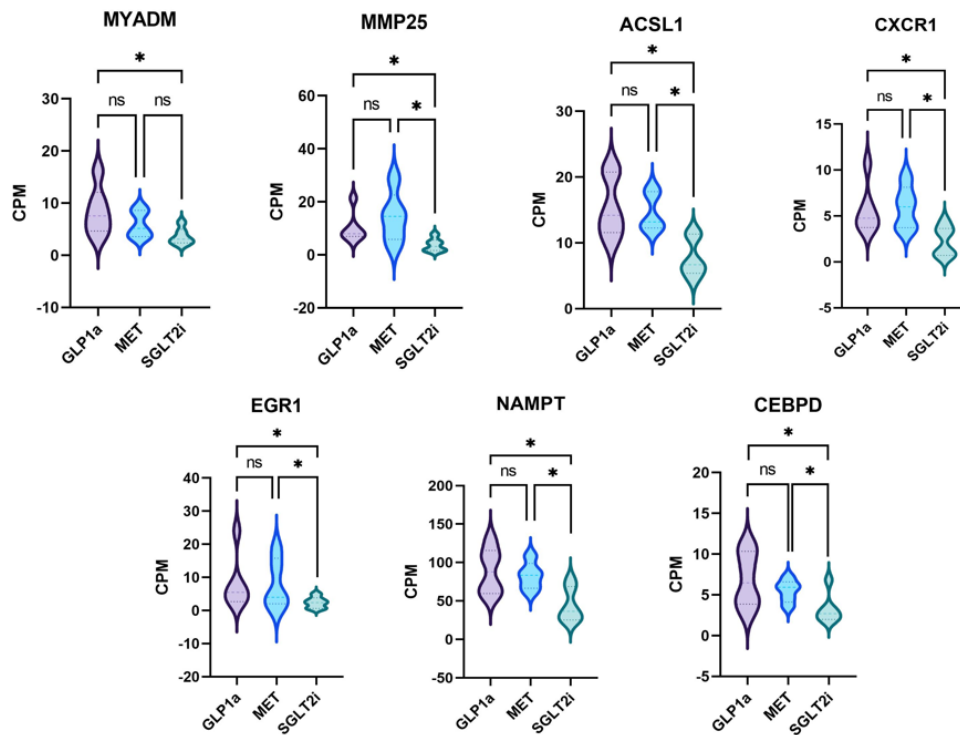


Figura 20. Grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi up-regolati tra i due gruppi in studio (GLP1-RA vs SGLT2i).

Tra i trascritti down-regolati (Figura21) CCS risultava anche up-regolato nel gruppo in terapia con SGLT2 inibitori rispetto alla metformina.

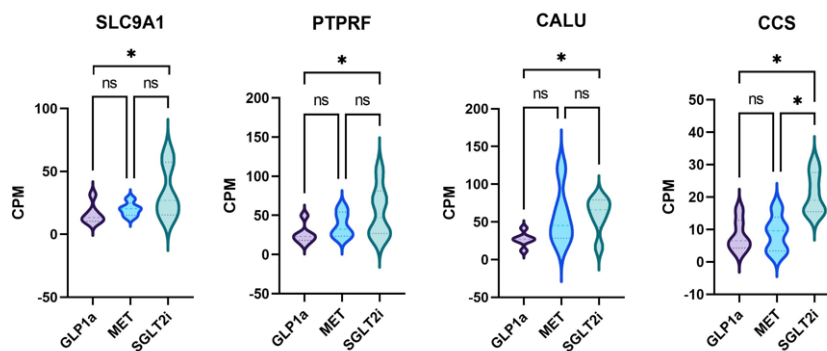


Figura 21. Grafici a violino dell'espressione differenziale degli mRNA più significativi down-regolati tra i due gruppi in studio (GLP1-RA vs SGLT2i).

Gli altri mRNA e le funzioni delle proteine corrispondenti sono presentati di seguito⁸⁸:

- **SLC9A1**, anche chiamato NHE1 (scambiatore Na^+/H^+ 1), è un antiporto Na^+/H^+ che svolge un ruolo centrale nella regolazione del pH, della migrazione e del volume della cellula.
- **PTPRF**, anche detta LAR (antigene correlato ai leucociti), è una proteina tirosina fosfatasi di tipo recettore F che regola i contatti tra cellule, l'adesione cellulare e la via di segnalazione della beta-catenina. Un aumento del livello di espressione di questa proteina è stato riscontrato in individui obesi e può contribuire alla patogenesi dell'insulino-resistenza.
- **CALU** (Calumenina) è una proteina legante il calcio localizzata nel reticolo endoplasmatico. È coinvolta nella risposta all'aumento del Ca^{2+} citosolico piastrinico.

4.4 Influenza della terapia antiaggregante

Dato che è possibile che anche la terapia antiaggregante possa influire sul trascrittoma delle piastrine, i trascritti discussi precedentemente sono stati analizzati anche considerando questo elemento.

Nove pazienti su 17 assumevano terapia antiaggregante piastrinica, di cui 6 erano trattati con acido acetilsalicilico (inibitore della COX-1), 2 erano in terapia con clopidogrel (inibitore di P2Y12) e 1 con dabigatran (inibitore della trombina).

I 17 trascritti modificati dalle diverse terapie anti-iperglicemiche sono quindi stati confrontati nuovamente dividendo i 17 pazienti in due gruppi differenti: soggetti che assumevano terapia antiaggregante e soggetti che non la assumevano.

L'espressione di nessuno degli mRNA studiati è risultata significativamente diversa tra i due gruppi. Possiamo pertanto concludere che la terapia antiaggregante non influisce sull'espressione dei trascritti esaminati.

5. Gene ontology

Sui trascritti espressi in modo differente nei diversi gruppi di trattamento farmacologico è stata effettuata l'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO), mediante il software David Functional Analysis (<https://david.ncicrf.gov/>). Attraverso questa analisi è possibile indagare se i trascritti possono avere caratteristiche funzionali correlate, in modo da ottenere un'interpretazione biologica dell'esperimento.

L'analisi dei trascritti down-regolati dal trattamento con SGLT2 inibitore in associazione a metformina rispetto alla terapia con solo metformina ha indicato due importanti relazioni funzionali: un terzo dei trascritti è implicato nella chemiotassi dei neutrofili e un terzo nella risposta infiammatoria (Figura 22).

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	neutrophil chemotaxis	RT		3	33,3	4,9E-4	6,4E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	inflammatory response	RT		3	33,3	1,2E-2	6,3E-1

Figura 22. Risultato dell'analisi di arricchimento GO dei 9 trascritti down-regolati nel gruppo in trattamento con SGLT2i rispetto a metformina.

Nell'analisi dei trascritti down-regolati nel gruppo in terapia con GLP1-RA rispetto a quello in trattamento con SGLT2 inibitori si sono individuate le seguenti relazioni funzionali: trasporto ionico e migrazione cellulare (Figura 23).



Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	ion transport	RT		2	40,0	2,2E-2	1,0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	cell migration	RT		2	40,0	4,1E-2	1,0E0

Figura 23. Risultato dell'analisi di arricchimento GO dei 4 trascritti down-regolati nel gruppo in trattamento con GLP1-RA rispetto a quelli con SGLT2i.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio pilota è stato analizzato il profilo del trascrittoma piastrinico di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (DM2), confrontando l'espressione degli mRNA tra tre gruppi di trattamento con diverse classi di farmaci antidiabetici, ovvero la metformina, che ha rappresentato finora il *gold-standard* della terapia per il DM2, gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio 2 (SGLT2-i) e gli agonisti del recettore del glucagon-like peptide-1 (GLP1-RA).

Il diabete mellito di tipo 2 è associato allo sviluppo di complicazioni microvascolari (retinopatia, neuropatia e nefropatia) e complicanze macrovascolari aterosclerotiche che comprendono: cardiopatia ischemica, stenosi carotidea, malattia cerebro-vascolare e arteriopatia obliterante degli arti inferiori. Nel promuovere il processo aterosclerotico e gli eventi acuti associati ad esso, giocano un ruolo importante l'iperattività piastrinica e le alterazioni della coagulazione. Nel DM2 si riscontra un aumento dei fattori protrombotici (fattore di von Willebrand, fattore VII, fibrinogeno), una diminuzione dell'attività fibrinolitica principalmente per aumento del PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno) e una riduzione delle proteine anticoagulanti (proteina C ed S).³⁴ Anche la produzione di prodotti finali di glicazione avanzata (AGE) svolge un ruolo importante nello sviluppo dell'aterosclerosi poiché promuovono l'infiammazione, riducono la produzione di monossido d'azoto e stimolano l'espressione di E-selectina e dell'endotelina-1.³² Un ruolo centrale nel promuovere lo stato protrombotico è svolto dalle piastrine, che nel diabete risultano iperattive e più propense all'aggregazione. Infatti, l'ambiente iperglicemico causa un aumento di espressione sulla superficie delle piastrine di P-selectina, di GPIIb/IIIa e di ligando CD40, promuovendo così l'aggregazione.^{52,53}

Recentemente diversi trials clinici hanno dimostrato i vantaggi dell'uso dei farmaci SGLT2i e GLP1-RA in soggetti ad alto rischio cardiovascolare: sugli effetti cardiovascolari e renali degli SGLT2i nel soggetto diabetico sono stati condotti gli studi EMPA-REG OUTCOME⁶⁸, CANVAS⁶⁹ e DECLARE-TIMI 58⁷⁰, mentre sugli effetti di GLP1-RA sono stati svolti gli studi LEADER⁷⁷, SUSTAIN-6⁷⁸ e REWIND⁷⁹. In questi studi è stata osservata una riduzione degli eventi cardiovascolari, della mortalità

ad essi associata, del rischio di ospedalizzazione per insufficienza cardiaca, dell'incidenza di malattia renale e della sua progressione nei soggetti trattati rispetto al placebo. È stato ipotizzato che gli effetti cardio-nefroprotettivi di questi farmaci siano, almeno in parte, anche mediati da effetti favorevoli a livello della coagulazione. A tale riguardo la letteratura è ancora scarsa, ma fornisce iniziali risultati su studi sia sperimentali sia condotti nell'uomo. Spigoni *et al.* hanno dimostrato, in uno studio su piastrine in vitro, che gli SGLT2i possono indurre una riduzione dell'espressione di P-selectina e del complesso GPIIb/IIIa.⁷⁴ Anche in vivo Seecheran *et al.* hanno riscontrato una riduzione dell'aggregazione piastrinica in pazienti con DM2 e coronaropatia trattati con empagliflozin.⁷⁵

Anche per i farmaci GLP1-recettore agonisti è stato dimostrato un effetto anti-aggregante sia in vitro sia in vivo. Steven *et al.* hanno dimostrato un'inibizione dell'attivazione piastrinica in piastrine umane incubate con GLP1-RA.⁸⁰ Zhang *et al.* hanno invece condotto uno studio clinico che ha evidenziato una riduzione dell'espressione di P-selectina e di GPIIb/IIIa sulle piastrine di pazienti con DM2 dopo 8 settimane di trattamento con exenatide.⁸¹

Non esistono tuttavia studi che abbiano indagato il trascrittoma piastrinico in relazione alla terapia antidiabetica. Pertanto, alla luce di tali premesse, abbiamo voluto investigare gli effetti del trattamento con metformina, SGLT2i e GLP1-RA sul trascrittoma delle piastrine, in pazienti affetti da DM2, utilizzando una metodica di sequenziamento molto recente ed innovativa, la *Next Generation Sequencing* (NGS). Tramite sequenziamento NGS, abbiamo quindi confrontato l'espressione degli RNA messaggeri nei tre gruppi di pazienti:

- pazienti DM2 in terapia con solo metformina;
- pazienti DM2 in terapia con associazione di metformina e SGLT2 inibitore;
- pazienti DM2 in terapia con associazione di metformina e GLP1- RA.

Con il sequenziamento del trascrittoma tramite NGS è stato possibile identificare numerosi mRNA e si è potuto evidenziare come quelli maggiormente espressi fossero coinvolti nei principali processi piastrinici: rimodellamento del citoscheletro, trasduzione dei segnali, aggregazione, processi infiammatori ed immunitari e regolazione del calcio intracellulare.

Dall'analisi differenziale dell'espressione degli mRNA nei tre gruppi di trattamento è risultato che alcuni trascritti vengono significativamente modificati dalle diverse terapie. Considerando la funzione delle proteine codificate da questi trascritti è stata inoltre valutata una loro possibile influenza sulla funzionalità piastrinica.

La terapia con SGLT2i, rispetto alla terapia con sola metformina, si associava ad una ridotta espressione del trascritto S100A9 (Calprotectina). La calprotectina è una proteina che sembra rivestire un importante ruolo nella genesi dell'aterosclerosi nel soggetto diabetico, oltre che nell'infiammazione. Questa proteina viene secreta durante l'attivazione delle piastrine come eterodimero S100A8/S100A9 e ha una funzione regolatrice dell'infiammazione. Le concentrazioni circolanti di S100A9 sono state correlate all'attivazione piastrinica, all'infiammazione cronica di basso grado e all'insulino-resistenza e predicono il rischio di eventi cardiovascolari.^{89,90} Inoltre, i pazienti diabetici con patologia coronarica presentano livelli plasmatici elevati di calprotectina, che risultano anche correlati positivamente alla gravità della coronaropatia stessa e con lo spessore medio-intimale carotideo.⁹¹ Recentemente le proteine S100 sono state identificate come ligandi di RAGE (recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata), la cui via di segnalazione pro-infiammatoria svolge un ruolo patogenetico importante nelle tappe iniziali dell'aterosclerosi, specialmente in condizioni in cui i ligandi di RAGE si accumulano, come nel diabete mellito.⁹² L'interazione di S100A8/A9 con GPIIb/IIIa è stata infine suggerita come un possibile nuovo target terapeutico, in quanto attiva una pathway protrombotica, che favorisce l'attivazione piastrinica e la formazione di fibrina, soprattutto in patologie associate a elevati livelli di S100A8/A9, come il COVID-19.⁹³

Un'altra proteina S100 che viene down-regolata dagli SGLT2i è S100A12, anche chiamata EN-RAGE (proteina extracellulare legante RAGE): anch'essa è in grado di legare i RAGE e i suoi livelli plasmatici nel paziente diabetico sono aumentati e correlati con la presenza e la gravità della malattia coronarica.^{94,95} La down-regolazione di queste proteine S100 potrebbe quindi essere uno dei meccanismi con cui i farmaci inibitori di SGLT2 riescono a ridurre gli eventi aterosclerotici.

Un altro trascritto che risulta down-regolato dagli SGLT2i è NAMPT (o Visfatina), una proteina che nella forma secreta si comporta sia come citochina, con proprietà immunomodulanti, che come adipochina con proprietà insulino-mimetiche.⁹⁶ NAMPT si lega al recettore dell'insulina, in un sito distinto da quello dell'ormone, e provoca ipoglicemia riducendo il rilascio di glucosio dagli epatociti e stimolandone l'utilizzo in adipociti e miociti.⁹⁷ Nei pazienti con DM2, NAMPT è presente in una concentrazione più elevata, rispetto ai soggetti non diabetici, probabilmente come meccanismo compensatorio per contrastare la carenza di insulina.⁹⁸ A livello vascolare, NAMPT attiva la segnalazione pro-infiammatoria nelle cellule muscolari lisce e potrebbe in tal modo contribuire all'infiammazione che si sviluppa a livello della placca aterosclerotica.⁹⁹ È stato inoltre dimostrato che i livelli sierici elevati di NAMPT sono significativamente associati all'aterosclerosi carotidea avanzata nei pazienti con DM2.¹⁰⁰

Confrontando il gruppo in trattamento con GLP1-RA rispetto a quello in terapia con sola metformina, risulta significativamente down-regolato un importante trascritto implicato nella trombosi: SERPINE1, conosciuto anche come PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1). Le piastrine sintetizzano grandi quantità di PAI-1¹⁰¹ e l'iperglicemia può indurre un aumento della sua espressione, promuovendo la formazione di trombi nel DM2.¹⁰² Il PAI-1 è un inibitore della fibrinolisi per cui una down-regolazione della sua espressione aumenta l'attività fibrinolitica con conseguente minor rischio di formazione di trombi.

Infine, è stato confrontato il gruppo in trattamento con GLP1-RA con il gruppo in terapia con SGLT2i. Nel confronto tra i trascritti significativamente modificati nei 2 gruppi di trattamento (GLP1-RA vs SGLT2i), un ruolo interessante lo ricopre SLC9A1 (*Solute Carrier-9A1*), anche chiamato NHE1 (*Na⁺/H⁺ exchanger-1*), uno scambiatore Na⁺/H⁺ che regola il pH intracellulare e svolge un ruolo importante nell'attivazione piastrinica. Infatti, dopo la stimolazione delle piastrine con agonisti, come la trombina, si osserva un rapido incremento del pH intracellulare mediato da NHE1; questa alcalinizzazione induce l'aumento del calcio citosolico e l'attivazione della piastrina.¹⁰³ L'espressione di questo trasportatore è risultata down-regolata nel gruppo in terapia con GLP1-RA rispetto a quello in trattamento

con SGLT2i. Sembra inoltre che NHE1 possa fungere da bersaglio per gli inibitori di SGLT2 e che questi svolgano la loro azione antiaggregante inibendo direttamente questo trasportatore piastrinico.¹⁰⁴ Tuttavia, la regolazione dell'attività di NHE1 è complessa e non è completamente compresa.

Infine, va sottolineato che i risultati di questo studio, benché interessanti e meritevoli di ulteriore approfondimento, si riferiscono ad uno studio di tipo osservazionale e ad un numero decisamente esiguo di soggetti; inoltre, anche se la concomitante terapia antiaggregante non sembra influire sui trascritti piastrinici, andrebbe escluso anche il possibile effetto di altre terapie sul trascrittoma piastrinico. Un altro limite dallo studio è rappresentato dalla mancanza di dati riguardanti la funzionalità piastrinica dei pazienti studiati.

In conclusione, questo studio pilota ha evidenziato come un diverso trattamento farmacologico a lungo termine per il diabete mellito di tipo 2 possa modulare l'espressione degli mRNA nelle piastrine, influenzandone la funzionalità.

In particolare, i risultati di questo studio hanno messo in luce come sia gli inibitori di SGLT2 sia i GLP1-recettore agonisti siano associati a modifiche del trascrittoma piastrinico in senso anti-aterosclerotico. Questi risultati potrebbero contribuire a spiegare i meccanismi mediante cui questi farmaci sono in grado di ridurre l'incidenza degli eventi cardiovascolari nei soggetti trattati.

BIBLIOGRAFIA

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **37**, (2014).
2. Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M. & Schootman, M. *Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications Diabetes Special Issue. Physical Therapy* vol. 88 www.ptjournal.org (2008).
3. *IDF Diabetes Atlas 10th edition*. www.diabetesatlas.org.
4. Glovaci, D., Fan, W. & Wong, N. D. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reports* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1107-y> (2019).
5. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* **45**, S17–S38 (2022).
6. Jensen, E. T. *et al.* Increase in prevalence of diabetic ketoacidosis at diagnosis among youth with type 1 diabetes: The SEARCH for diabetes in youth study. *Diabetes Care* **44**, 1573–1578 (2021).
7. Chan, J. M., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J. & Willett, W. C. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* **17**, 961–9 (1994).
8. Lee, E. Diabetes: Screening, Diagnosis, and Prevention of Type 2 Diabetes. *FP Essent* **504**, 16–21 (2021).
9. Diaz-Santana, M. v, O'Brien, K. M., Park, Y.-M. M., Sandler, D. P. & Weinberg, C. R. Persistence of Risk for Type 2 Diabetes After Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **45**, 864–870 (2022).
10. American Diabetes Association Professional Practice Committee. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care* **45**, S17–S38 (2022).
11. Kahn, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **46**, 3–19 (2003).

12. Banerji, M. A., Faridi, N., Atluri, R., Chaiken, R. L. & Lebovitz, H. E. Body composition, visceral fat, leptin, and insulin resistance in Asian Indian men. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 137–44 (1999).
13. Scheen, A. J. *Pathophysiology of type 2 diabetes Continuing Medical Education. Acta Clinica Belgica* (2003).
14. James, D. E., Stöckli, J. & Birnbaum, M. J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 751–771 (2021).
15. Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E. & Sahebkar, A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol* **234**, 8152–8161 (2019).
16. Christensen, A. A. & Gannon, M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* **19**, 81 (2019).
17. Galicia-Garcia, U. *et al.* Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
18. Fowler, M. J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes* **26**, 77–82 (2008).
19. Cheung, N., Mitchell, P. & Wong, T. Y. Diabetic retinopathy. *The Lancet* **376**, 124–136 (2010).
20. Forbes, J. M. & Cooper, M. E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* **93**, 137–88 (2013).
21. Antonetti, D. A., Silva, P. S. & Stitt, A. W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol* **17**, 195–206 (2021).
22. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* **45**, S185–S194 (2022).
23. Zakin, E., Abrams, R. & Simpson, D. M. Diabetic Neuropathy. *Semin Neurol* **39**, 560–569 (2019).

24. Freeman, R. Diabetic autonomic neuropathy. *Handb Clin Neurol* **126**, 63–79 (2014).
25. Chronic Kidney Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* **45**, S175–S184 (2022).
26. Forbes, J. M. & Cooper, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol Rev* **93**, 137–188 (2013).
27. Fowler, M. J. *Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. ClinCal Diabetes* • vol. 26 <http://clinical.diabetesjournals.org> (2008).
28. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* **45**, S144–S174 (2022).
29. Poznyak, A. *et al.* The Diabetes Mellitus–Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci* **21**, 1835 (2020).
30. Knapp, M., Tu, X. & Wu, R. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin* **40**, 1–8 (2019).
31. Kaur, R., Kaur, M. & Singh, J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol* **17**, 121 (2018).
32. Sobczak, A. I. S. & Stewart, A. J. Coagulatory Defects in Type-1 and Type-2 Diabetes. *Int J Mol Sci* **20**, 6345 (2019).
33. Soro-Paavonen, A. *et al.* Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Deficiency Attenuates the Development of Atherosclerosis in Diabetes. *Diabetes* **57**, 2461–2469 (2008).
34. Grant, P. J. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med* **262**, 157–172 (2007).
35. Heywood, D. M., Mansfield, M. W. & Grant, P. J. Factor VII gene polymorphisms, factor VII:C levels and features of insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost* **75**, 401–6 (1996).

36. Folsom, A. R. *et al.* Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* **91**, 191–205 (1991).
37. Ajjan, R. & Grant, P. J. Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis* **186**, 240–259 (2006).
38. Oggianu, L. *et al.* The oxidative modification of von Willebrand factor is associated with thrombotic angiopathies in diabetes mellitus. *PLoS One* **8**, e55396 (2013).
39. Machlus, K. R. & Italiano, J. E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology* **201**, 785–796 (2013).
40. Thon, J. N. & Italiano, J. E. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure. in 3–22 (2012). doi:10.1007/978-3-642-29423-5_1.
41. Rendu, F. & Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* **12**, 261–273 (2001).
42. Saif, M. W. & Hamilton, J. M. A 25 year old woman presenting with bleeding disorder and nystagmus. *Postgrad Med J* **77**, E6 (2001).
43. Lenting, P. J., Christophe, O. D. & Denis, C. v. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* **125**, 2019–2028 (2015).
44. Aslan, J. E., Itakura, A., Gertz, J. M. & McCarty, O. J. T. Platelet Shape Change and Spreading. in 91–100 (2012). doi:10.1007/978-1-61779-307-3_7.
45. Rendu, F. & Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* **12**, 261–273 (2001).
46. Clemetson, K. J. Platelets and Primary Haemostasis. *Thromb Res* **129**, 220–224 (2012).
47. Huo, Y. *et al.* Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* **9**, 61–7 (2003).

48. Methia, N., André, P., Denis, C. v., Economopoulos, M. & Wagner, D. D. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* **98**, 1424–1428 (2001).
49. Lindemann, S., Krämer, B., Seizer, P. & Gawaz, M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost* **5 Suppl 1**, 203–11 (2007).
50. Davì, G. & Patrono, C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* **357**, 2482–94 (2007).
51. Carrizzo, A. *et al.* The main determinants of diabetes mellitus vascular complications: Endothelial dysfunction and platelet hyperaggregation. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms19102968> (2018).
52. Keating, F. K., Sobel, B. E. & Schneider, D. J. Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* **92**, 1362–5 (2003).
53. Vaidyula, V. R. *et al.* Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD40 ligand. *Diabetes* **55**, 202–8 (2006).
54. Westerbacka, J. *et al.* Inhibition of platelet-collagen interaction: an in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 167–72 (2002).
55. Baldi, S. *et al.* In vivo effect of insulin on intracellular calcium concentrations: relation to insulin resistance. *Metabolism* **45**, 1402–7 (1996).
56. Bhatta, S., Singh, S., Gautam, S. & Osti, B. P. Mean Platelet Volume and Platelet Count in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Impaired Fasting Glucose. *J Nepal Health Res Council* **16**, 392–395 (2019).

57. de Wispelaere, K. & Freson, K. The Analysis of the Human Megakaryocyte and Platelet Coding Transcriptome in Healthy and Diseased Subjects. *Int J Mol Sci* **23**, 7647 (2022).
58. Supernat, A. *et al.* Transcriptomic landscape of blood platelets in healthy donors. *Sci Rep* **11**, 15679 (2021).
59. Davizon-Castillo, P., Rowley, J. W. & Rondina, M. T. Megakaryocyte and Platelet Transcriptomics for Discoveries in Human Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 1432–1440 (2020).
60. *Linea Guida della Società Italiana di Diabetologia (SID) e dell'Associazione dei Medici Diabetologi (AMD) La terapia del diabete mellito di tipo 2.* <https://snlg.iss.it> (2021).
61. Foretz, M., Guigas, B. & Viollet, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 569–589 (2019).
62. Zhang, K., Yang, W., Dai, H. & Deng, Z. Cardiovascular risk following metformin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus: Results from meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* **160**, 108001 (2020).
63. Markowicz-Piasecka, M. *et al.* An investigation into the pleiotropic activity of metformin. A glimpse of haemostasis. *Eur J Pharmacol* **872**, 172984 (2020).
64. Papazafiropoulou, A., Papanas, N., Pappas, S., Maltezos, E. & Mikhailidis, D. P. Effects of oral hypoglycemic agents on platelet function. *J Diabetes Complications* **29**, 846–851 (2015).
65. Fonseca-Correa, J. I. & Correa-Rotter, R. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Mechanisms of Action: A Review. *Front Med (Lausanne)* **8**, 777861 (2021).
66. Fonseca-Correa, J. I. & Correa-Rotter, R. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Mechanisms of Action: A Review. *Front Med (Lausanne)* **8**, (2021).

67. Zinman, B. *et al.* Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **373**, 2117–2128 (2015).
68. Wanner, C. *et al.* Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **375**, 323–334 (2016).
69. Neal, B. *et al.* Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **377**, 644–657 (2017).
70. Wiviott, S. D. *et al.* Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **380**, 347–357 (2019).
71. McMurray, J. J. V. *et al.* Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine* **381**, 1995–2008 (2019).
72. Packer, M. *et al.* Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *New England Journal of Medicine* **383**, 1413–1424 (2020).
73. Packer, M. *et al.* Effect of Empagliflozin on Worsening Heart Failure Events in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: EMPEROR-Preserved Trial. *Circulation* **144**, 1284–1294 (2021).
74. Spigoni, V. *et al.* Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors antagonize lipotoxicity in human myeloid angiogenic cells and ADP-dependent activation in human platelets: potential relevance to prevention of cardiovascular events. *Cardiovasc Diabetol* **19**, 46 (2020).
75. Seecheran, N. *et al.* The Effect of Empagliflozin on Platelet Function Profiles in Patients with Stable Coronary Artery Disease in Trinidad: The EFFECT Pilot Study. *Cardiol Ther* **10**, 189–199 (2021).
76. Ma, X. *et al.* GLP-1 receptor agonists (GLP-1RAs): cardiovascular actions and therapeutic potential. *Int J Biol Sci* **17**, 2050–2068 (2021).
77. Marso, S. P. *et al.* Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **375**, 311–322 (2016).

78. Marso, S. P. *et al.* Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **375**, 1834–1844 (2016).
79. Gerstein, H. C. *et al.* Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* **394**, 121–130 (2019).
80. Steven, S. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor signalling reduces microvascular thrombosis, nitro-oxidative stress and platelet activation in endotoxaemic mice. *Br J Pharmacol* **174**, 1620–1632 (2017).
81. Zhang, Y., Chen, R., Jia, Y., Chen, M. & Shuai, Z. Effects of Exenatide on Coagulation and Platelet Aggregation in Patients with Type 2 Diabetes. *Drug Des Devel Ther* **Volume 15**, 3027–3040 (2021).
82. Best, M. G., In 't Veld, S. G. J. G., Sol, N. & Wurdinger, T. RNA sequencing and swarm intelligence–enhanced classification algorithm development for blood-based disease diagnostics using spliced blood platelet RNA. *Nat Protoc* **14**, 1206–1234 (2019).
83. *Sample to Insight__ miRNeasy Micro Handbook*. Qiagen. (2021).
84. *Illumina Stranded mRNA Prep Ligation Reference Guide*. (2020).
85. NextSeq 500-550 denature and dilute libraries guide. Illumina.
86. Illumina. *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*.
87. Mutz, K. O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J. G. & Stahl, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 24 22–30.
88. GeneCards. <https://www.genecards.org>.
89. Ortega, F. J. *et al.* Serum and urinary concentrations of calprotectin as markers of insulin resistance and type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* **167**, 569–78 (2012).

90. Santilli, F. *et al.* Circulating myeloid-related protein-8/14 is related to thromboxane-dependent platelet activation in patients with acute coronary syndrome, with and without ongoing low-dose aspirin treatment. *J Am Heart Assoc* **3**, (2014).
91. Peng, W. H. *et al.* Increased serum myeloid-related protein 8/14 level is associated with atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* **10**, 41 (2011).
92. Ehlermann, P. *et al.* Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. *Cardiovasc Diabetol* **5**, 6 (2006).
93. Colicchia, M. *et al.* S100A8/A9 drives the formation of procoagulant platelets through GPIb α . *Blood* (2022) doi:10.1182/blood.2021014966.
94. Zhao, P. *et al.* Serum S100A12 levels are correlated with the presence and severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Investig Med* **61**, 861–6 (2013).
95. Skrha, J. *et al.* Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and EN-RAGE to endothelial dysfunction in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **120**, 277–81 (2012).
96. Dogru, T. *et al.* Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* **76**, 24–9 (2007).
97. Adeghate, E. Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem* **15**, 1851–62 (2008).
98. Zhu, J. *et al.* Intensive glycemic control lowers plasma visfatin levels in patients with type 2 diabetes. *Horm Metab Res* **40**, 801–5 (2008).
99. Romacho, T. *et al.* Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia* **52**, 2455–2463 (2009).

100. Kadoglou, N. P. E. *et al.* Visfatin (nampt) and ghrelin as novel markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **118**, 75–80 (2010).
101. Brogren, H. *et al.* Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood* **104**, 3943–8 (2004).
102. Luo, M. *et al.* Hyperglycaemia-induced reciprocal changes in miR-30c and PAI-1 expression in platelets. *Sci Rep* **6**, 36687 (2016).
103. Roskopf, D. Sodium-hydrogen exchange and platelet function. *J Thromb Thrombolysis* **8**, 15–24 (1999).
104. Wichaiyo, S. & Saengklub, N. Alterations of sodium-hydrogen exchanger 1 function in response to SGLT2 inhibitors: what is the evidence? *Heart Failure Reviews* Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10741-022-10220-2> (2022).
105. Illumina Stranded mRNA Prep, ligazione.
106. Cito, S., Mazzeo, M. D. & Badimon, L. A review of macroscopic thrombus modeling methods. *Thromb Res* **131**, 116–24 (2013).
107. Kubisz, P. Endothelial and platelet markers in diabetes mellitus type 2. *World J Diabetes* **6**, 423 (2015).
108. Standards of Medical Care in Diabetes—2022. Abridged for Primary Care Providers. *Clinical Diabetes* **40**, 10–38 (2022).