

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

Dottorato di Ricerca in  
Malattie Osteometaboliche e Disordini del Metabolismo  
Idroelettrolitico e Acido-Base

Ciclo XXV

**ASSETTO OSTEOMETABOLICO IN UNA POPOLAZIONE  
DI SOGGETTI DIABETICI DISLIPIDEMICI**

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. **PAOLO SANSONI**

Tutore:  
Chiar.mo Prof. **GIOVANNI PASSERI**

Dottoranda:  
**LAURA FRANZINI**

## **INDICE**

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>5</b>
Introduzione e scopo del lavoro.....	5
Materiali e metodi.....	6
Risultati.....	8
Conclusioni.....	10
<b>PARTE INTRODUTTIVA.....</b>	<b>12</b>
<u>DIABETE TIPO 2 E RISCHIO CARDIOVASCOLARE</u> .....	13
<u>DISLIPIDEMIA DIABETICA</u> .....	14
Caratteristiche fisiopatologiche.....	14
Significato clinico.....	18
<u>VITAMINA D</u> .....	22
Sintesi e metabolismo.....	22
Azioni della vitamina D.....	33
Ruolo della Vitamina D nel metabolismo fosfo-calcico .....	37
Effetti extrascheletrici della vitamina D .....	41
Vitamina D e malattie cardiovascolari.....	43

Vitamina D e diabete mellito.....	45
Valutazione dei livelli circolanti di vitamina D .....	45
<b><u>SPESSORE MEDIO-INTIMALE CAROTIDEO</u></b> .....	<b>46</b>
Significato clinico come predittore del rischio cardiovascolare .....	46
Metodica e sue criticità .....	52
<b>PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>56</b>
SCOPO DELLO STUDIO.....	57
MATERIALI E METODI .....	59
Popolazione dello studio .....	59
Criteri di inclusione .....	60
Criteri di esclusione .....	61
Variabili in studio .....	62
Dati anamnestici e fisico-antropometrici.....	63
Dati laboratoristici .....	64
Esami strumentali: ecocolordoppler carotideo e misurazione dello spessore medio-intimale (IMT).....	67
Analisi statistica .....	78
RISULTATI.....	80

CONCLUSIONI.....	90
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>94</b>

## **RIASSUNTO**

### **Introduzione e scopo del lavoro**

Il diabete mellito tipo 2 (DM2) si associa ad un incremento di 2-4 volte del rischio di sviluppo della patologia cardiovascolare (CV) e la malattia ischemica coronarica è responsabile di gran parte della morbilità e mortalità nei pazienti con diabete.

L'ipovitaminosi D viene considerata un fattore di rischio CV e secondo diversi studi sarebbe associata ad una maggior mortalità totale e CV. I soggetti diabetici presentano tipicamente livelli sierici più bassi di vitamina D (25-OH-vitD) rispetto ai non diabetici.

La dislipidemia è uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo della patologia aterosclerotica nei pazienti con DM2. Tra i possibili spettri di alterazioni lipidiche nel diabete un fenotipo comune è la cosiddetta dislipidemia diabetica (DD), caratterizzata da bassi livelli di HDL e valori moderatamente elevati di trigliceridi (TG), senza necessariamente un'alterazione delle concentrazioni circolanti di LDL totali. Nonostante i livelli plasmatici di LDL siano tradizionalmente considerati il parametro di maggiore importanza nell'assetto lipidico, la DD è un esempio di come sia di grande rilevanza, per meglio definire il grado di rischio CV, una sua valutazione in tutte le sue sfaccettature, che vada oltre i livelli totali di HDL, LDL e TG e consideri anche la concentrazione delle sottofrazioni lipoproteiche. In particolare, la composizione delle LDL, con prevalenza di LDL piccole e dense rispetto alle LDL larghe e di LDL

ossidate, potrebbe essere responsabile di una maggiore progressione della patologia aterosclerotica.

L'ipovitaminosi D, frequente nei soggetti diabetici e considerata ormai un vero e proprio fattore di rischio CV potrebbe essere coinvolta nella relazione tra composizione delle sottofrazioni lipoproteiche e la patologia aterosclerotica nella popolazione diabetica.

Lo studio DiAL-ER (Diagnostica Avanzata in Lipidologia – Emilia Romagna) si è proposto di valutare quali parametri del metabolismo lipidico si associno maggiormente al grado di rischio CV in una popolazione di soggetti con DM2 e DD. In particolare lo scopo del presente studio è stato di valutare la relazione tra i livelli sierici di 25-idrossivitamina D (25-OH-vitD) e le alterazioni del profilo lipidico in termini di livelli circolanti di LDL, HDL e trigliceridi ed anche di composizione delle LDL, e di valutare quali fossero i fattori in grado di influenzare maggiormente la patologia aterosclerotica, valutata mediante misurazione dello spessore medio-intimale (IMT) carotideo, un valido indicatore “diretto” di danno aterosclerotico precoce.

## **Materiali e metodi**

Sono stati arruolati 138 pazienti affetti da DM2, di età compresa tra i 40 e 75 anni, con HbA1c non superiore a 8,5%, senza pregressi eventi CV o progressione di nefropatia o retinopatia, che fossero anche affetti da DD, definita come livelli plasmatici di HDL $\leq$ 40 mg/dL, TG $\geq$ 150 mg/dL ed LDL $<$ 160 mg/dL, sia in trattamento con statine che naive ad alcuna

terapia ipolipemizzante. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecodoppler carotideo per la misurazione dell'IMT, secondo protocollo di Manneheim. La valutazione è stata effettuata bilateralmente a livello della carotide comune distale in tre proiezioni (anteriore, laterale, posteriore) e in biforcazione e bulbo della carotide interna nella sola proiezione laterale. Le misurazioni sono state poi condotte in modo semi-automatico mediante un software validato (Carotid Analyzer, mia-llc, Coralville, IA, USA) e da tutte le misurazioni sono stati poi considerati due parametri: il valore massimo misurato tra tutti i distretti analizzati (IMTmax) e il valore derivato dalla media di tutte le misurazioni effettuate nelle diverse proiezioni (IMTmean). In tutti i pazienti sono stati raccolti i principali parametri emodinamici (pressione arteriosa), antropometrici (peso e altezza, circonferenza vita) e metabolici (glicemia a digiuno, HbA1c, colesterolo totale, HDL e trigliceridi). La valutazione delle LDL piccole e dense (sdLDL) e delle LDL larghe (lLDL) è stato effettuato su campioni di plasma, tramite elettroforesi non denaturante su gel di poliacrilamide (LIOPRINT). I valori sono espressi come % di sdLDL e di lLDL rispetto alle concentrazioni di colesterolo totale. I livelli di LDL ossidate (oxLDL), sono stati dosati mediante kit ELISA. Sono stati effettuati inoltre i dosaggi di 25-OH-vitD, di paratormone (PTH), calcemia (Ca) e fosforemia (P), secondo metodica standard.

## **Risultati**

In linea con quanto già osservato in altre casistiche di pazienti diabetici, lo studio ha dimostrato che la nostra popolazione di soggetti con DM2 e DD presenta livelli circolanti di 25-OH-vitD mediamente al di sotto della norma ( $14,7 \pm 7,67$  ng/mL;  $VN \geq 30$  ng/mL). Solo in 5 individui (3,6%) i valori erano “sufficienti” (maggiori o uguali di 30 ng/mL); 110 pazienti (79,7%) presentavano una carenza di 25-OH-vitD (valori inferiori a 20 ng/mL), di cui 47 (il 34% del totale e il 43% dei carenti) avevano una “carenza grave” (livelli  $< 10$  ng/mL) e 63 (45,7% del totale e 57% dei carenti) presentavano una carenza “moderata” (valori tra 10 e 20 ng/mL); 23 individui (16,7%) presentavano valori considerati “insufficienti” (tra 20 e 29). In considerazione di questa elevata prevalenza di soggetti con livelli al di sotto dei limiti della norma, la popolazione non è stata suddivisa in base ai cut off di sufficienza/insufficienza/carenza, ma in quartili di 25-OH-vitD, in modo da avere una numerosità accettabile nei diversi sottogruppi. Da tale analisi si è osservato che i soggetti appartenenti ai quartili più alti di 25-OH-vitD erano mediamente più giovani (età media 66 anni nel I quartile, vs 61 nel IV,  $p$  per trend 0.05), più frequentemente di sesso maschile ( $p$  per trend=0.025); presentavano valori pressori mediamente più bassi ( $p$  per trend 0.012 per la sistolica e 0.010 per la diastolica). Dall’analisi dei parametri lipidici emergeva che i pazienti dei quartili più bassi di 25-OH-vitD erano anche quelli con colesterolo totale più alto ( $p$  per trend 0.024), mentre non vi erano differenze significative in termini di colesterolo HDL, LDL e TG. Si



osservava invece una più elevata % di sdLDL (18.5% rispetto al colesterolo totale nel I quartile vs 13.1% nel IV quartile,  $p$  per trend=0.015) e una maggiore concentrazione di oxLDL (34.9 vs 30.4 U/L,  $p$  per trend=0.045). I soggetti appartenenti ai quartili più alti di 25-OH-vitD erano anche quelli con IMTmax più sottile (IV quartile vs I quartile 1.603 vs 2.017,  $p$  per trend=0.036).

Dall'analisi multivariata i livelli circolanti di 25-OH-vitD risultavano inversamente correlati in maniera indipendente alla percentuale di sdLDL ( $p=0.006$ ) e alla concentrazione di oxLDL ( $p=0.008$ ), dopo correzione per età, sesso e terapia con statine.

Per valutare la relazione tra i livelli circolanti di 25-OH-vitD, sdLDL e oxLDL e lo spessore medio-intimale carotideo (IMTmean e IMTmax), sono stati condotti una serie di modelli di regressioni lineari multiple, introducendo come variabili dipendenti prima l'IMTmean poi l'IMTmax e come variabili indipendenti l'età, il sesso, la terapia con statine e, prima singolarmente, poi tutti e tre insieme i livelli di oxLDL, sdLDL e 25-OH-vitD. Da questa serie di analisi è emerso che i livelli circolanti di oxLDL predicono in maniera indipendente, insieme all'età ed al sesso, un valore maggiore di IMT (sia IMTmean che IMTmax,  $p=0,024$  e  $p=0,041$ , rispettivamente). Un trend analogo (che non raggiunge la significatività statistica) si osserva per le sdLDL e per i livelli di 25-OH-vitD. Dal modello in cui le tre variabili citate sono state introdotte insieme, è emerso che, accanto all'età ed al sesso, le concentrazioni di oxLDL risultano predittori indipendenti di un maggiore valore di

IMTmean ( $p=0,033$ ) e i livelli di 25-OH-vitD mostrano un trend (che non raggiunge la significatività -  $p=0,076$ ) per quanto riguarda l'IMTmax. Età, sesso ed oxLDL sono in grado di giustificare circa il 30% della variabilità dell'IMTmean ed età, sesso e concentrazioni sieriche di 25-OH-vitD circa il 25% della variabilità dell'IMTmax.

## **Conclusioni**

In una popolazione di pazienti diabetici con dislipidemia diabetica si riscontra un'elevata prevalenza di grave ipovitaminosi D, con solo il 3,6% di individui con livelli di 25-OH-vitD superiori ai limiti della norma. I soggetti con livelli più bassi di 25-idrossivitamina D sono tendenzialmente più anziani, più frequentemente donne e presentano valori pressori più elevati. Relativamente all'assetto lipidico la percentuale di LDL piccole e dense rispetto al colesterolo totale e i livelli di LDL ossidate sono significativamente aumentati nei soggetti con concentrazioni sieriche più basse di 25-OH-vitD, senza una differenza significativa nei livelli totali di LDL e nel restante profilo lipidico (HDL e trigliceridi). Le concentrazioni sieriche di 25-OH-vitD risultano inoltre essere predittori indipendenti dei livelli di LDL piccole e dense e di LDL ossidate. I livelli di LDL ossidate risultano a loro volta essere il principale predittore indipendente, insieme ad età e sesso, di uno spessore medio-intimale carotideo aumentato.

Benchè si tratti di uno studio osservazionale, che non permette pertanto di dimostrare alcuna relazione di tipo causale, tali risultati supportano

l'ipotesi che in soggetti diabetici con dislipidemia diabetica, bassi livelli di vitamina D si associno ad un profilo lipidico pro-aterogeno, caratterizzato da una maggiore prevalenza di LDL piccole dense e di LDL ossidate. I livelli di LDL ossidate a loro volta si accompagnano in maniera indipendente ad uno spessore medio-intimale carotideo aumentato. L'impatto delle basse concentrazioni sieriche di vitamina D sullo spessore medio intinale carotideo sembra pertanto "mediato" da un incremento nei livelli di LDL ossidate circolanti.

Questi risultati potrebbero contribuire a spiegare la stretta associazione tra ipovitaminosi D e patologia cardiovascolare in una popolazione ad elevato rischio come quella diabetica affetta da dislipidemia aterogena.

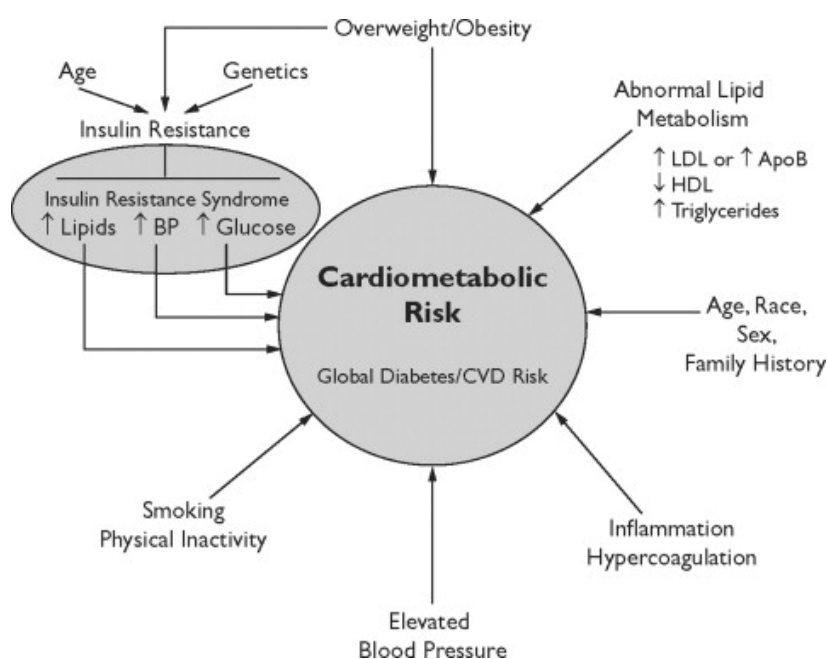
## **PARTE INTRODUTTIVA**

## DIABETE TIPO 2 E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Il diabete mellito amplifica il rischio cardiovascolare (CV) aumentando l'incidenza (di 2-4 volte) e accelerando il decorso delle patologie CV su base aterosclerotica<sup>1</sup>.

La patologia CV nella popolazione diabetica è la complicanza a lungo termine maggiormente correlata ad un peggior outcome in termini di morbilità e mortalità<sup>2,4</sup>. **Errore. Il segnalibro non è definito..**

I fattori di rischio per malattia cardiovascolare (CVD) sono molteplici.



Fattori predittivi del rischio cardiovascolare nel diabete mellito ed in altre condizioni di insulino-resistenza<sup>3</sup>.

Accanto ai fattori di rischio (FDR) tradizionali (scarso controllo glicemico, dislipidemia, ipertensione arteriosa, fumo di sigaretta, obesità centrale, sedentarietà), vi sono numerosi altri FDR “non convenzionali”, che stanno acquisendo sempre maggiore rilevanza nel giustificare il

cosiddetto rischio CV “residuo”, cioè quella parte di rischio CV che persiste anche dopo correzione di tutti i principali FDR tradizionali. **Errore. Il segnalibro non è definito.**<sup>4</sup>.

## **DISLIPIDEMIA DIABETICA**

### **Caratteristiche fisiopatologiche**

La dislipidemia è uno dei maggiori fattori di rischio per patologia cardiovascolare nei pazienti con diabete mellito.

Benché il colesterolo LDL sia un importante predittore della morbilità e mortalità CV<sup>5</sup>, i pazienti affetti da DM2 hanno un rischio CV elevato e da due a tre volte maggiore rispetto alla controparte non diabetica a parità di livelli di colesterolo LDL<sup>6</sup>. Inoltre elevati livelli di trigliceridi e bassi valori di colesterolo HDL hanno dimostrato di aumentare in maniera indipendente la mortalità CV nei pazienti diabetici. **Errore. Il segnalibro non è definito.** Non solo i livelli sierici di colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi hanno grande rilevanza, ma ci sono importanti altri aspetti relativi alla loro composizione qualitativa ed alla loro funzione. In particolare è stato dimostrato che le particelle LDL dei soggetti diabetici sono più piccole e dense e più facilmente ossidabili; queste alterazioni aumentano la progressione aterosclerotica e sono indipendenti dalla concentrazione plasmatica delle LDL<sup>6</sup>.

Lo spettro di alterazioni lipidiche che possiamo osservare nel diabete mellito possono comprendere tutti i diversi tipi di dislipidemia

identificati nella popolazione generale<sup>7</sup>; un fenotipo in particolare è considerato comune nei pazienti diabetici e viene attribuito soprattutto all'insulino-resistenza ed al deficit insulinico<sup>8,9</sup>.

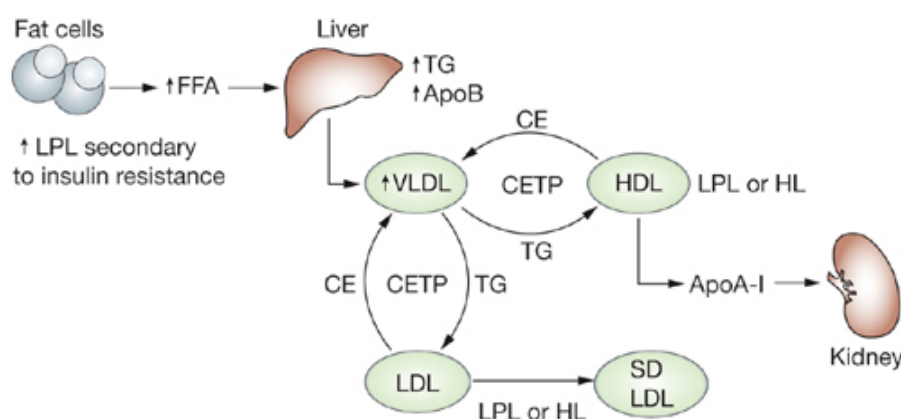
Le caratteristiche di questo specifico fenotipo sono rappresentate da un'alta concentrazione plasmatica di trigliceridi, da bassi livelli di colesterolo HDL ed elevati livelli di particelle LDL più piccole e dense.

Lo studio Framingham **Errorre. Il segnalibro non è definito.**<sup>10</sup> ha comparato i livelli di colesterolo plasmatici di pazienti diabetici e non diabetici: è emerso che il 13% degli uomini e il 24% delle donne con diabete mellito hanno livelli di colesterolo totale plasmatico aumentati, rispetto al 14% degli uomini ed al 21% delle donne non diabetici. La prevalenza degli elevati livelli di colesterolo non presenta pertanto differenze significative tra i due gruppi; per contro, la prevalenza degli elevati livelli plasmatici di trigliceridi nei soggetti diabetici (19% negli uomini, 17% nelle donne) è significativamente maggiore rispetto a quella di uomini e donne non diabetici (rispettivamente 9% e 8%)<sup>10</sup>. Per quanto riguarda la prevalenza dei bassi livelli di colesterolo HDL, questa è circa doppia nei soggetti diabetici (21% negli uomini, 25% nelle donne) rispetto alla controparte non diabetica (12% negli uomini, 10% nelle donne)<sup>10</sup>.

Da questi dati si può dedurre che sia negli uomini che nelle donne con diabete si riscontra una ipertrigliceridemia plasmatica e bassi livelli di colesterolo HDL, mentre il colesterolo totale ed i livelli di colesterolo

LDL non sono sostanzialmente differenti rispetto a quelli dei pazienti non diabetici<sup>10</sup>.

La precisa patogenesi della dislipidemia diabetica non è nota; tuttavia, si è ipotizzato che l'insulino-resistenza giochi un ruolo centrale nello sviluppo di questa condizione.



Ruolo dell'insulino-resistenza nella dislipidemia diabetica.

L'aumentato rilascio di acidi grassi liberi dagli adipociti insulino-resistenti rappresenterebbe la principale causa di dislipidemia diabetica. Da ciò deriverebbe infatti un aumentato flusso di acidi grassi liberi al fegato. Quest'ultimo, in presenza di adeguate riserve di glicogeno, promuove la produzione di trigliceridi, che stimolano a loro volta la secrezione di apolipoproteina B (ApoB) e colesterolo VLDL. La minore capacità dell'insulina di inibire il rilascio di acidi grassi liberi conduce pertanto ad un aumento di produzione epatica di colesterolo VLDL<sup>11</sup>.

L'iperinsulinemia è inoltre associata ai bassi livelli di colesterolo HDL<sup>12</sup>. L'aumentato numero di particelle di colesterolo VLDL e gli



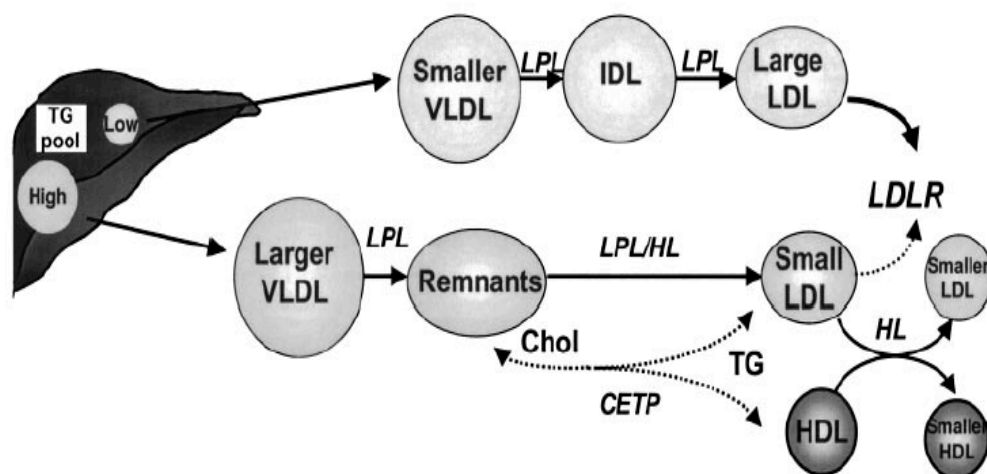
aumentati livelli di trigliceridi plasmatici diminuiscono infatti i livelli di colesterolo HDL ed aumentano la concentrazione delle particelle LDL piccole e dense attraverso diversi meccanismi.

I trigliceridi trasportati dalle particelle VLDL sono scambiati con il colesterolo esterificato trasportato dalle HDL attraverso l'azione della proteina CETP (cholesteryl ester transfer protein): ne deriva un aumento sia dei residui di VLDL ricchi di colesterolo sia delle HDL ricche di trigliceridi e povere di colesterolo. Le HDL ricche di trigliceridi sono successivamente idrolizzate dalla lipasi epatica o lipoprotein-lipasi (LPL); in questo modo l'apoA-I si dissocia dalle HDL di dimensione ridotta, le quali vengono poi filtrate dai glomeruli renali e demolite nelle cellule tubulari renali.<sup>12</sup>

L'aumentata concentrazione delle particelle di colesterolo LDL più piccole e dense può essere spiegata con un meccanismo di scambio lipidico simile. Gli elevati livelli di trigliceridi trasportati dalle VLDL stimolano la proteina CETP nel promuovere il trasferimento di trigliceridi all'interno delle LDL in scambio con il colesterolo esterificato trasportato dalle stesse LDL. Le LDL ricche di trigliceridi che ne risultano sono poi sottoposte all'azione della LPL e da ciò derivano particelle LDL più piccole e dense e povere di lipidi.

La riduzione delle HDL che si osserva nella dislipidemia diabetica può essere considerata di tipo multifattoriale; un mediatore comune tra l'insulino-resistenza ed i bassi livelli di colesterolo HDL potrebbe essere rappresentato dal TNF-alfa. Esso è infatti implicato nell'insulino-

resistenza correlata all'obesità ed è nota la sua azione nel determinare bassi livelli sierici di colesterolo HDL<sup>13</sup>.



Alterato metabolismo lipoproteico e sviluppo del pattern aterogenico.

### Significato clinico

Il colesterolo LDL deriva dalle VLDL quando il core di queste ultime viene rimosso per lipolisi ed i componenti di superficie sono trasferiti al colesterolo HDL. Il principale ruolo fisiologico delle LDL è quello di rendere disponibile il colesterolo per la riparazione delle membrane cellulari e, negli organi endocrini specializzati, per la sintesi degli ormoni steroidei e della vitamina D<sup>14</sup>.

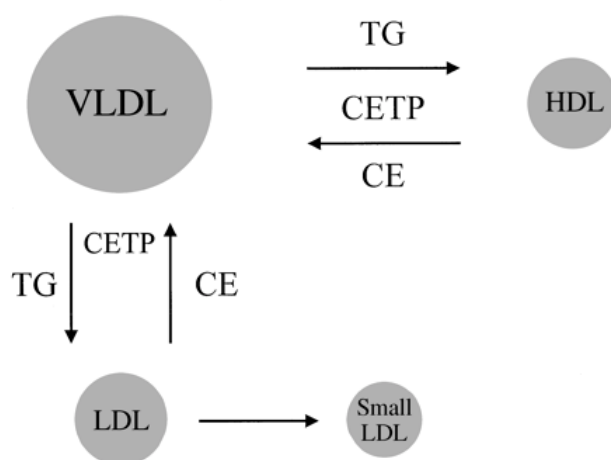
Un aumento cronico dei livelli di colesterolo LDL causa un elevato rischio di ossidazione ed un accumulo di colesterolo subintimale a livello arterioso, con conseguente inizio del processo aterosclerotico. Questo meccanismo è inoltre accelerato dalla presenza di particelle LDL

più piccole e dense<sup>8</sup>. Esiste infatti una certa eterogeneità nelle dimensioni e nella composizione delle diverse classi di lipoproteine. Nel caso di VLDL ed HDL, le particelle differiscono anche per il contenuto di apolipoproteine, specialmente per quanto riguarda la quantità di ApoC ed ApoE.

La porzione centrale delle lipoproteine contiene colesterolo esterificato idrofobico e trigliceridi. La proporzione di questi lipidi è determinata da uno scambio lipidico mediato dalla proteina CETP e dall'azione delle lipasi che rimuovono i trigliceridi trasformandoli in monogliceridi, glicerolo ed acidi grassi liberi. In assenza di deficit enzimatici, le lipoproteine ricche in trigliceridi saranno convertite in particelle più piccole e dense.

Dal punto di vista classificativo, possono essere effettuate delle valutazioni delle dimensioni delle LDL tramite elettroforesi non denaturante su gel di poliacrilamide (LIPOPRINT); questo sistema permette la separazione delle frazioni e sottofrazioni delle lipoproteine secondo le dimensioni delle particelle e successivamente quantifica il loro contenuto in colesterolo, distinguendole pertanto in LDL numerate da 1 a 7 con un progressivo aumento della quantità di colesterolo e una progressiva riduzione delle dimensioni<sup>15</sup>.

## Plasma Lipid Exchange



In presenza di elevate quantità di VLDL circolanti, la proteina CETP scambia i trigliceridi delle VLDL con il colesterolo esterificato nel core delle LDL e delle HDL. Questi trigliceridi possono essere convertiti in acidi grassi liberi attraverso l'azione delle lipasi plasmatiche. L'effetto complessivo è una diminuzione delle dimensioni ed un aumento della densità sia delle LDL che delle HDL.

Una diminuzione delle dimensioni ed un aumento della densità delle particelle LDL sono una caratteristica di molte condizioni cliniche caratterizzate da ipertrigliceridemia, compreso il diabete. Le LDL piccole e dense sono infatti considerate come uno dei principali marcatori di dislipidemia diabetica<sup>16</sup>. L'importanza attribuita alle dimensioni delle particelle LDL deriva da numerose evidenze cliniche e dati sperimentali che mettono in luce come questa tipologia di particelle conferisca un ulteriore rischio aterosclerotico. Come dimostrato da alcuni studi sui primati, questa correlazione tra LDL piccole e dense ed aterosclerosi potrebbe derivare dalla capacità di ciascuna LDL di trasportare una maggiore quantità di colesterolo<sup>17</sup>.

Nel DM2 il metabolismo delle LDL subisce modifiche sostanziali, nonostante il livelli stessi di colesterolo LDL siano nella norma<sup>18</sup>.

I pazienti diabetici mostrano infatti un ridotto turnover delle particelle LDL con una diminuzione del catabolismo che conduce automaticamente ad un aumento del tempo di permanenza plasmatica del colesterolo LDL; ciò promuove l'accumulo di colesterolo a livello della parete arteriosa<sup>19</sup>.

L'alterato metabolismo delle LDL osservato nel DM2 potrebbe essere dovuto ad una riduzione del numero di recettori LDL B/E, ovvero di quei recettori che sono in grado di legare l'apolipoproteina B e l'apolipoproteina E<sup>20</sup>. Questo è dimostrato dal fatto che il trattamento con insulina riesce a ripristinare un normale numero di tali recettori sulla superficie cellulare dei pazienti con DM2<sup>20</sup>.

Un ulteriore meccanismo implicato nella riduzione dei livelli di LDL potrebbe essere rappresentato da una riduzione dell'affinità delle particelle LDL nei confronti degli specifici recettori a causa di una glicazione dell'apolipoproteina B<sup>21</sup>.

Una relazione è stata inoltre osservata tra ipovitaminosi D e prevalenza di LDL piccole e dense<sup>22</sup>.

Numerosi dati indicano che le particelle LDL piccole e dense sono correlate ad un aumentato rischio cardiovascolare, in relazione alle loro proprietà aterogeniche<sup>23</sup>. Queste ultime sono molteplici e comprendono la ridotta affinità per il recettore B/E, da cui deriva un aumentato uptake da parte dei macrofagi con conseguente formazione di cellule schiumose. Inoltre le LDL piccole e dense hanno una maggiore affinità per i proteoglicani della tonaca intima e ciò promuove l'ingresso e la deposizione di LDL a livello della parete arteriosa<sup>24</sup>. Un'altra importante

proprietà aterogena di questo tipo di LDL è data dall'aumentata suscettibilità all'ossidazione. Che porta ad un aumento della concentrazione di LDL ossidate<sup>25,26,27</sup>.

I fattori che promuovono l'ossidazione delle LDL sono la glicazione, l'aumento del contenuto di trigliceridi e la ridotta proprietà anti-ossidante delle HDL<sup>28</sup>.

L'effetto delle LDL ossidate consiste nel promuovere un rapido uptake da parte dei macrofagi con formazione di cellule schiumose; le LDL ossidate sono infatti in grado di determinare un effetto chemiotattico sui monociti attraverso la produzione di molecole di adesione, come ICAM-1, da parte delle cellule endoteliali ed anche la formazione di citochine, come TNF-alfa o IL-1, da parte dei macrofagi, amplificando così il processo infiammatorio aterosclerotico.

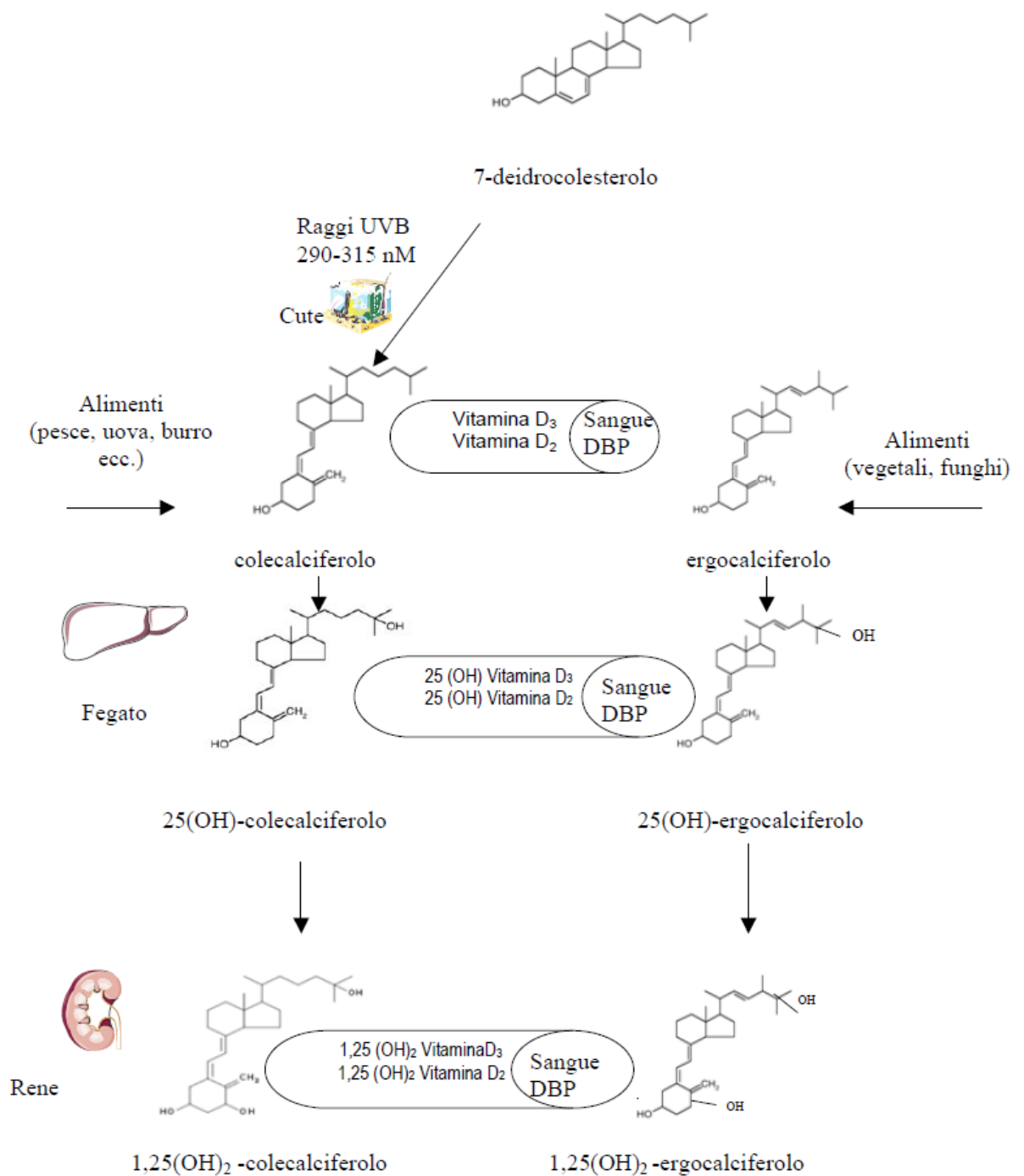
La glicazione delle LDL (ossia la glicazione dell'apolipoproteina B all'interno delle LDL), infine, riduce l'affinità nei confronti del recettore B/E<sup>28</sup>, ne favorisce l'uptake da parte dei macrofagi con formazione di cellule schiumose<sup>29</sup> e rende le LDL stesse più facilmente ossidabili.

## **VITAMINA D**

### **Sintesi e metabolismo**

Con il termine di vitamina D si intendono 2 composti chimici derivati dal 7-deidro colesterolo, denominati colecalciferolo o vitamina D3 ed

ergocalciferolo o vitamina D2: il **colecalfiferolo** è contenuto in piccola quantità in alcuni alimenti di origine animale ed è, per la maggior parte, sintetizzato dalla cute umana quando è esposta all'azione dei raggi solari UVB (lunghezza d'onda 290-315 nm); l'**ergocalciferolo**, di derivazione vegetale, viene assunto solo con gli alimenti. Pertanto, il termine di vitamina D in senso stretto può essere usato solo per l'ergocalciferolo, mentre il colecalfiferolo è da considerarsi a tutti gli effetti un ormone, in quanto può essere sintetizzato dall'organismo. In effetti, l'apporto di vitamina D è dovuto per la maggior parte (80-90%) alla sintesi cutanea di colecalfiferolo in condizioni di adeguata esposizione ai raggi solari di appropriata lunghezza d'onda, mentre la quantità di vitamina D (sia colecalfiferolo sia ergocalciferolo) contenuta negli alimenti (10-20%) è del tutto insufficiente a coprirne il fabbisogno.



Sintesi, metabolismo e struttura della vitamina D e dei suoi principali metaboliti (DBP = *Vitamin D-Binding protein*).

### Apporto esogeno



La sorgente alimentare di vitamina D è assai scarsa: pochi cibi naturali infatti contengono vitamina D e in quantità limitate, tanto da provvedere solamente al 10% del fabbisogno totale. Alimenti ricchi di vitamina D sono gli oli di pesce (soprattutto di fegato di merluzzo, sgombro, salmone e sardina); si ritiene sufficiente la loro assunzione 3-4 volte la settimana per assicurare un apporto ottimale di vitamina D; quantità molto più basse si ritrovano nei derivati del latte intero (la quantità di vitamina D2 in esso contenuta varia a seconda del tipo di latte), nelle uova, nel succo d'arancia, nel pane e nei cereali.

**Tabella 1.** Sorgenti alimentari, supplementari e farmaceutiche di vitamina D2 e D3

Sorgente		Contenuto in vitamina D
Alimenti	<ul style="list-style-type: none"><li>- salmone fresco naturale (100 g)</li><li>- salmone fresco coltivato (100 g)</li><li>- salmone in scatola (100 g)</li><li>- sardine in scatola (100 g)</li><li>- sgombro in scatola (100 g)</li><li>- tonno in scatola (100 g)</li><li>- olio di fegato di merluzzo (1 cucchiaino)</li><li>- funghi shiitake freschi (100 g)</li><li>seccati al sole (100 g)</li><li>- rosso d'uovo</li><li>- esposizione alla luce del sole, radiazione ultravioletta B (5-10 minuti di esposizione delle braccia e della gambe ai raggi del sole)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- circa 600-1000 UI di vitamina D3</li><li>- circa 100-250 UI di vitamina D3</li><li>- circa 300-600 UI di vitamina D3</li><li>- circa 300 UI di vitamina D3</li><li>- circa 250 UI di vitamina D3</li><li>- circa 230 UI di vitamina D3</li><li>- circa 400-1000 UI di vitamina D3</li><li>- circa 100 UI di vitamina D2</li><li>- circa 1.600 UI di vitamina D2</li><li>- circa 20 UI di vitamina D2 o D3</li> <li>- circa 3.000 UI di vitamina D</li></ul>
Cibi fortificati*	<ul style="list-style-type: none"><li>- latte fortificato</li><li>- succo di arancio</li><li>- latte artificiale per lattanti</li><li>- yogurth</li><li>- burro</li><li>- margarina</li><li>- formaggio</li><li>- cereali per colazione</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-circa 100 UI/250 g, usualmente vitamina D3</li><li>-circa 100 UI/250 g, usualmente vitamina D3</li><li>- circa 100 UI/250 g, usualmente vitamina D3</li><li>- circa 100 UI/250 g, usualmente vitamina D3</li><li>- circa 50 UI/100 g, usualmente vitamina D3</li><li>- circa 430 UI/100 g, usualmente vitamina D3</li><li>- circa 100 UI/100 g, usualmente vitamina D3</li><li>- circa 100 UI/per porzione, usualmente vitamina D3</li></ul>
Supplementi farmaceutici	<ul style="list-style-type: none"><li>-vitamina D2 (ergocalciferolo)</li> <li>-multivitamina</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 50.000 UI</li><li>- 100.000 UI</li><li>- 400.000 UI</li><li>- 400 UI di vitamina D2 o D3</li></ul>

In Italia gli alimenti rinforzati sono molto pochi.

## Sintesi endogena

La principale sorgente di vitamina D è costituita nell'uomo dall'esposizione cutanea alla luce solare, che costituisce la fonte del 90% della vitamina D circolante o in forma di deposito.

A livello cutaneo i raggi ultravioletti convertono il 7-deidrocolesterolo in previtamina D3<sup>30</sup>, biologicamente inerte, ma termolabile; essa, infatti, va spontaneamente incontro a un riarrangiamento molecolare, influenzato dalla temperatura, dei suoi triplici doppi legami con formazione di un 9,10-secoosterolo termostabile, la vitamina D3 (24h a temperatura corporea). La quantità di vitamina D prodotta dipende dalle radiazioni ultraviolette (sono più efficaci quelle comprese tra 290 e 315 nm), dalla superficie cutanea esposta, dal suo spessore e pigmentazione e dalla durata della permanenza alla luce. Nei mesi estivi la sovrapproduzione di vitamina D ne consente l'accumulo, così che la si possa avere a disposizione anche durante il periodo invernale.

Vi sono molteplici fattori che regolano questa prima tappa del metabolismo della vitamina D:

- radiazioni ultraviolette: sono più efficaci quelle comprese fra 290 e 315 nm
- età: con l'aumentare dell'età si riduce la quantità di vitamina D sintetizzata

- sede, superficie cutanea esposta, ora e durata della permanenza alla solare
- spessore e pigmentazione cutanea, utilizzo di creme solari: l'elevata concentrazione di melanina cutanea e le creme solari ad alto fattore di protezione riducono la produzione di vitamina D in quanto ostacolano efficacemente la penetrazione cutanea delle radiazioni ultraviolette
- fattori ambientali, quali latitudine, altitudine e inquinamento
- razza: considerando la diversa concentrazione di melanina a livello cutaneo, le popolazioni con cute di fenotipo 5-6 o di pelle nera necessitano di un'esposizione 10-50 volte maggiore rispetto a quelle di pelle 2-3 o bianca<sup>31</sup>.

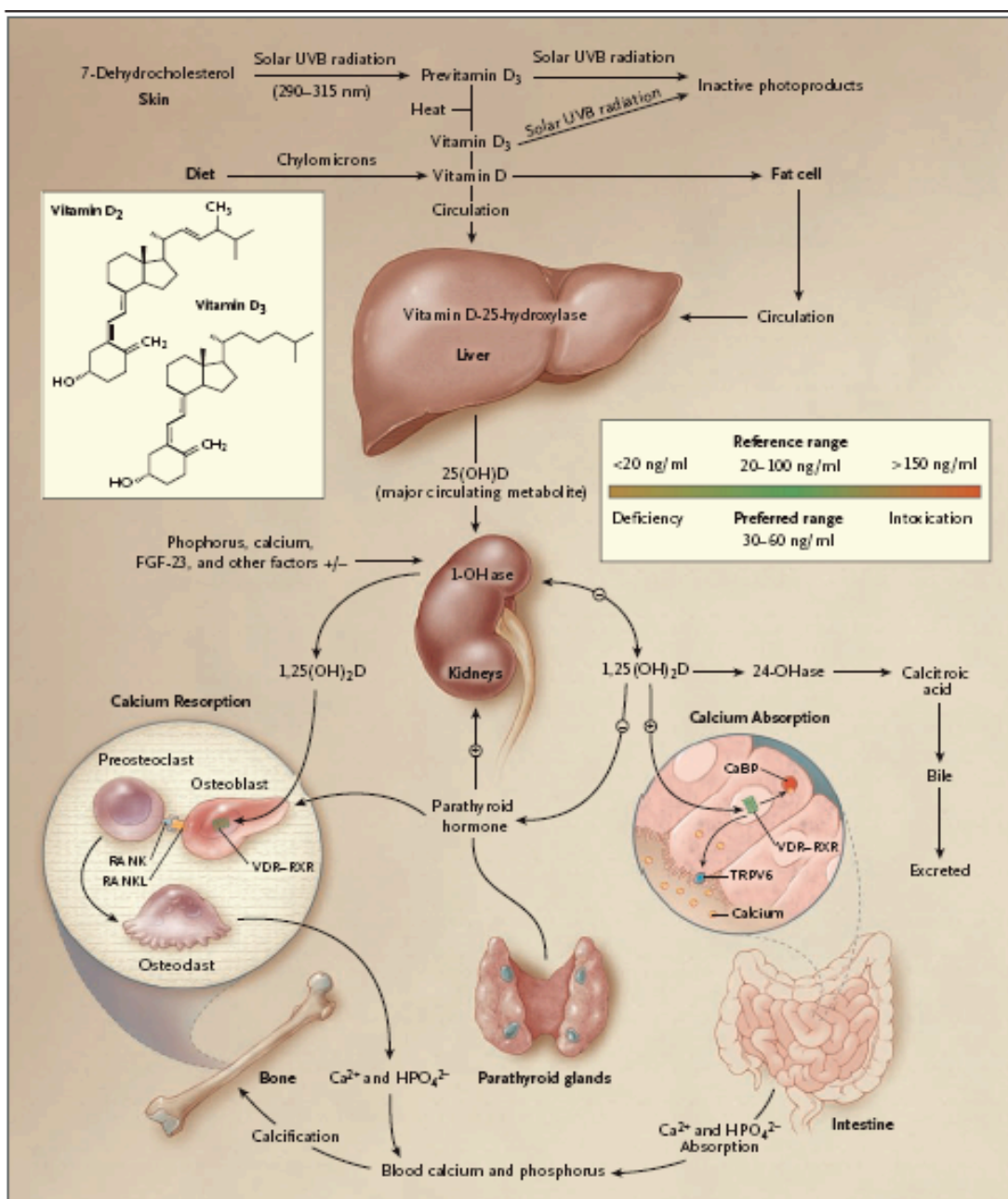
Infatti, la melanina, assorbendo le radiazioni UV, può ridurre l'efficacia della radiazione solare nella produzione cutanea di vitamina D. Questo potrebbe quindi spiegare i bassi livelli di 25(OH)D nei soggetti di razza nera e ispanica che vivono a latitudini temperate<sup>32</sup>. L'esposizione solare incrementa la produzione di melanina e questo rappresenta un ulteriore meccanismo per la prevenire l'eccessiva produzione di vitamina D. Come già accennato, determinante è anche l'intensità della radiazione UV: le variazioni stagionali dei livelli di 25(OH)D sono abbastanza spiccate, con valori elevati in estate e valori bassi in inverno. L'ampiezza di queste variazioni dipende soprattutto dalla latitudine e dalla superficie cutanea esposta alla radiazione solare<sup>33</sup>: vestiti<sup>34</sup> e tendaggi<sup>35</sup> ad esempio

riducono la produzione di vitamina D, produzione che raggiunge il valore massimo in estate a mezzogiorno.

La prolungata esposizione alla luce del sole degrada la previtamina D3 e la vitamina D3 in fotoprodotti inattivi (il lumisterolo ed il tachisterolo), pertanto un'eccessiva esposizione solare non causa mai intossicazione da vitamina D3<sup>36</sup>.

La vitamina D3 di origine cutanea raggiunge il circolo, dove è trasportata dalla proteina *Vitamin D-Binding Protein* (DBP), un'alfa-globulina di origine epatica, mentre le vitamine D3 e D2 di origine alimentare, sono assorbite a livello dell'intestino tenue. L'assorbimento della vitamina D segue gli analoghi processi cui le altre vitamine liposolubili sono sottoposte. Essa, infatti, viene inglobata nelle micelle formate dall'incontro dei lipidi idrolizzati con la bile, entra nell'epitelio intestinale dove viene incorporata nei chilomicroni i quali entrano nella circolazione linfatica (emivita plasmatica 4-6 ore). Per la maggior parte la vitamina D3 viene idrossilata a livello epatico a 25-idrossivitaminaD3 (25-OH-vitD) ad opera dell'enzima 25-alfa-idrossilasi (enzima mitocondriale e microsomiale simile al citocromo P450, l'attività di questo enzima non è sottoposto a stretta regolazione), una minima quota viene invece depositata a livello del tessuto adiposo (emivita di circa 2 mesi). La 25-OH-vitD rappresenta la principale forma circolante e di deposito della vitamina D. Circa l'88% della 25-OH-vitD circola legata alla specifica proteina legante (DBP), lo 0,03% è in forma libera e la quota restante è legata all'albumina. L'emivita della 25-OH-vitD è di

circa 2-3 settimane; tuttavia risulta notevolmente minore quando si riducono i livelli della specifica proteina legante, come nel caso di aumentata perdita urinaria nella sindrome nefrosica<sup>37</sup>.



### Sintesi e metabolismo della Vitamina D

L'idrossilazione finale, necessaria per la formazione dell'ormone attivo, avviene nei reni. La 25-idrossivitaminaD-1alfa-idrossilasi è un'ossidasi a funzione mista simile al citocromo P450 espressa nelle cellule del tubulo contorto prossimale e sottoposta a stretta regolazione, responsabile della idrossilazione in posizione 1 e portando così alla formazione di 1,25-diidrossivitaminaD [1,25(OH)<sub>2</sub>D] o calcitriolo, che entra in circolo.

La produzione renale di 1,25-diidrossivitamina D è strettamente regolata dai livelli plasmatici di ormone paratiroideo (PTH) e dai livelli di calcio e di fosforo: il PTH stimola l'idrossilasi renale mentre il calcio, il fosforo e lo stesso calcitriolo lo inibiscono. Più precisamente, come mostrato in figura 2, diversi fattori controllano la produzione di vitamina D attiva potendo aumentare (+) o diminuire (-) la produzione renale di 1,25(OH)<sub>2</sub>D. L'attività dell'enzima 25-idrossivitaminaD-1alfa-idrossilasi è infatti strettamente regolata:

- inibita da iperfosforemia, ipercalcemia, fattore 23 di crescita fibroblastica e dallo stesso calcitriolo;
- stimolata da ipocalcemia, ipofosforemia e paratormone (PTH).

Anche altri ormoni non primariamente coinvolti nel metabolismo fosfo-calcico regolano la sintesi di vitamina D attiva: alcuni ormoni ipofisari (prolattina e GH), insulina e glucocorticoidi, così come gli estrogeni e il progesterone, stimolano la 1-alfaidrossilazione.

L'1,25(OH)<sub>2</sub>D pertanto:

- diminuisce la sua propria sintesi attraverso un feedback negativo

- diminuisce la sintesi e la secrezione dell'ormone paratiroideo da parte delle ghiandole paratiroidi
- aumenta l'espressione della 25-idrossivitamina D-24-idrossilasi (24-OHasi) a catabolizzare l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  in acido calcitroico, idrosolubile e biologicamente inattivo, che è escreto nella bile
- aumenta l'assorbimento intestinale di calcio nel tenue, interagendo con il complesso recettore della vitamina D-recettore dell'acido retinoico X (VDRRXR); questo aumenta l'espressione dei canali epiteliali del calcio e della calbindina-D9k, una proteina legante calcio. L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  è riconosciuto dal suo recettore nell'osteoblasto, in modo da causare un aumento dell'espressione dell'attivatore del recettore del ligando nucleare fattore-kB (RANKL). RANK, il recettore del RANKL presente sui preosteoclasti, lega il RANKL, che induce la maturazione del preosteoclasto in osteoclasto maturo. L'osteoclasto maturo rimuove il calcio e il fosforo dall'osso, mantenendo i livelli necessari di calcio e fosforo nel sangue. Adeguati livelli di calcio e di fosforo promuovono la mineralizzazione dello scheletro.

Il fattore 23 di crescita fibroblastica, secreto dall'osso, fa sì che il controtrasportatore sodio-fosfato si internalizzi nelle cellule del rene e del tenue, in modo tale da sopprimere la sintesi della 1,25-diidrossivitamina D. L'efficienza dell'assorbimento del calcio renale e del calcio intestinale e del fosforo aumenta in presenza di 1,25-diidrossivitamina D (Fig. 2). Esso induce anche l'espressione dell'enzima

25-idrossivitamina D-24-idrossilasi (CYP24), che catabolizza sia la 25 idrossivitamina D che la 1,25-diidrossivitamina D in acido calcitroico, biologicamente inattivo e solubile in acqua.

L'enzima 25(OH)-1alfa-idrossilasi non è però localizzato solo a livello renale, ma è stato identificato in numerosi altri tessuti e diversi tipi di cellule, in particolare a livello della mammella, del colon, delle cellule muscolari lisce vascolari, dei cheratinociti della cute, dei macrofagi, a livello delle beta cellule pancreatiche, dove la produzione di vitamina D attiva svolge un'azione prevalentemente autocrina e paracrina, come vedremo meglio in seguito.

La principale via di inattivazione dei metaboliti della vitamina D è, come già anticipato, un'idrossilazione aggiuntiva da parte della vitamina D-24-idrossilasi, un enzima espresso nella maggior parte dei tessuti. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D è il maggior induttore della vitamina D-24-idrossilasi e promuove così la propria inattivazione, limitando i propri effetti biologici. I metaboliti polari dell'1,25(OH)<sub>2</sub>D vengono secreti nella bile e riassorbiti attraverso il circolo enteroepatico. Alterazioni di questo circolo, quali si osservano nelle malattie dell'ileo terminale, portano a una perdita accelerata dei metaboliti della vitamina D.

La 25(OH)D, la forma presente in circolo in maggiori quantità (pool plasmatico di circa 200 mcg) ha un'emivita di circa 15 giorni, un turnover di 7 mcg/die e livelli sierici di 5-55 ng/mL. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D ha invece un pool plasmatico molto inferiore alla 25(OH)D (0,5 mcg),



un'emivita più breve (circa 5 ore), un turnover di 1 mcg/die, quindi proporzionalmente molto più lento, con livelli sierici di 20-75 pg/mL<sup>38</sup>.

## **Azioni della vitamina D**

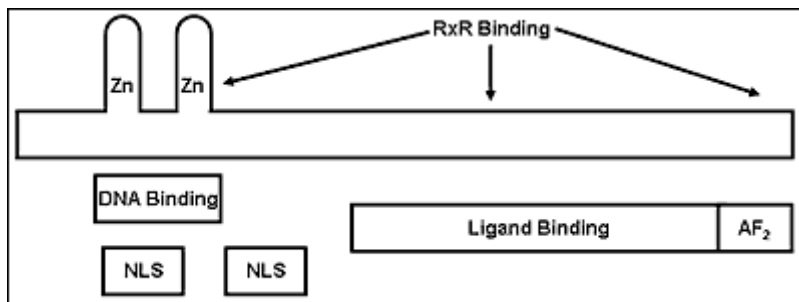
### **Il VDR (Vitamin D Receptor)**

La 1,25(OH)<sub>2</sub>D esercita i propri effetti biologici legandosi al recettore della vitamina D (VDR), che appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari. Questo recettore appartiene alla sottofamiglia che include i recettori per gli ormoni tiroidei, i recettori dei retinoidi e i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi<sup>39</sup> (PPAR). A differenza degli altri membri di questa sottofamiglia tuttavia è stata isolata una sola isoforma del VDR.

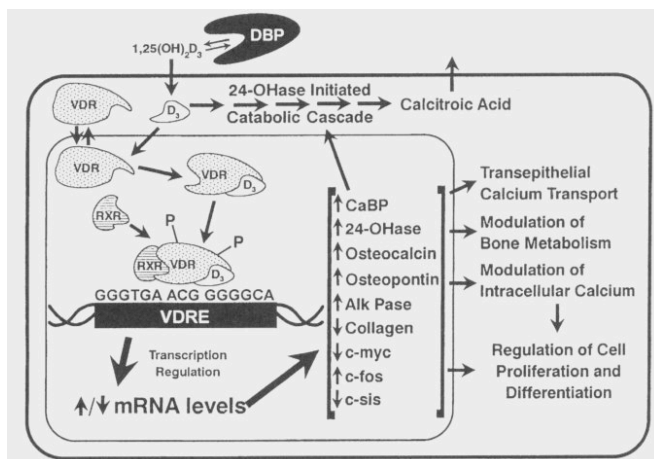
Il VDR è una piccola proteina (427 aminoacidi) formata da tre principali domini funzionali<sup>40</sup> localizzati in tratti distinti della catena proteica:

- DNA binding domain (DBD): è la regione centrale deputata al legame con il DNA. E' una regione ricca in molecole di cisteina che costituiscono due formazioni digitiformi, gli *zinc fingers*, ciascuna stabilizzata da un atomo di zinco: tali formazioni sono responsabili del riconoscimento delle sequenze di DNA specifiche per l'attivazione dei geni regolati (HRE) presenti nella cellula bersaglio (zinc finger N-terminale) e stabilizzano il legame al DNA (zinc finger C-terminale):

- Ligand binding domain (LBD): è la regione C-terminale responsabile del legame con l'ormone. Presenta, infatti, amminoacidi idrofobi che nella conformazione terziaria formano una tasca in cui si impegna l'ormone. E' deputata al processo di dimerizzazione e contiene anche strutture che regolano l'attività transattivante del recettore
- Regione N-terminale: coinvolta principalmente nei fenomeni di trascrizione.
- 



VDR: struttura.



VDR: trasduzione del segnale.

### Pathway d'azione

All'interno del nucleo l'ormone si lega al recettore con elevata affinità, convertendolo in una forma attiva in grado di legarsi al sito accettore (LBD). Il calcitriolo interagisce con il VDR attivandolo e dando luogo alla fosforilazione del complesso 1,25(OH)<sub>2</sub>D-VDR; questo complesso a sua volta interagisce con un fattore recettoriale accessorio (RXR = recettore retinoideo) per formare un eterodimero. Questo eterodimero riconosce e si lega ad una specifica sequenza di basi presente nel gene bersaglio nota come VDRE (elemento responsivo alla vitamina D). E' da notare che il VDR si lega al DNA del VDRE (attraverso il DBD) come dimero perché questa conformazione conferisce maggiore stabilità del legame e maggiore affinità del recettore per il proprio HRE, probabilmente aumentando la superficie di contatto con il DNA. Il legame con HRE provoca un aumento dell'espressione dell'mRNA e un conseguente aumento della sintesi della proteina per la quale l'mRNA codifica. Gli HRE sono localizzati in regioni deputate alla regolazione della trascrizione in un dato gene e denominate intensificatore e promotore. Il legame dell'ormone al VDR è così in grado di modificare il ritmo dell'attività RNA-polimerasica e quindi l'espressione del gene controllato<sup>41</sup>.

L'affinità del VDR per la 1,25(OH)<sub>2</sub>D è approssimativamente di tre ordini di grandezza superiore a quella per altri metaboliti della vitamina D. In condizioni fisiologiche, dunque, gli altri metaboliti non stimolano il recettore; tuttavia in condizioni di intossicazioni da vitamina D, livelli notevolmente elevati di 25(OH)D possono determinare ipercalcemia sia

per interazione diretta della 25(OH)D col VDR sia spiazzando la 1,25(OH)<sub>2</sub>D dalla specifica proteina legante sierica e aumentando così la biodisponibilità dell'ormone attivo.

Il VDR è espresso in numerosi tipi cellulari e tessuti. Le azioni molecolari della 1,25(OH)<sub>2</sub>D sono state approfonditamente studiate soprattutto dei tessuti coinvolti nella regolazione dell'omeostasi minerale. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D è un potente induttore della calbindina-D9k, una proteina legante il calcio espressa nell'intestino, che svolge un ruolo importante nel trasporto attivo del calcio attraverso l'enterocita. Anche i due più importanti trasportatori del calcio espressi dall'epitelio intestinale, ECaC e ICaC, sono regolati dalla vitamina D. Inducendo l'espressione di questi e di altri geni nell'intestino tenue, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D aumenta l'assorbimento intestinale di calcio.

Il VDR regola l'espressione di numerosi geni degli osteoblasti. I geni bersaglio comprendono le proteine della matrice ossea osteocalcina e osteopontina, che sono stimulate, oltre al collagene di tipo I, la cui trascrizione è invece repressa dalla 1,25(OH)<sub>2</sub>D. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D, come il PTH, induce l'espressione del ligando di RANK, che stimola la differenziazione e l'attività degli osteoclasti.

Nelle paratiroidi il VDR esercita effetti anti-proliferativi sulle cellule paratiroidi e sopprime la trascrizione del gene del PTH. Questi effetti della 1,25(OH)<sub>2</sub>D sulle paratiroidi costituiscono almeno in parte il razionale per le attuali terapie dirette a prevenire e trattare l'iperparatiroidismo associato all'insufficienza renale.

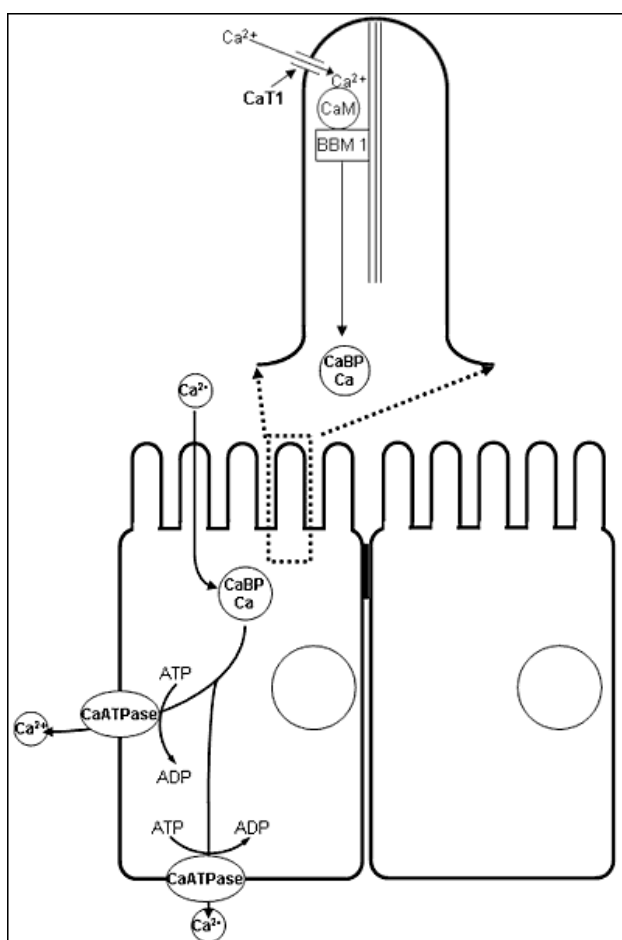
Il VDR è anche espresso in tessuti e organi che non giocano un ruolo nell'omeostasi minerale. A questo proposito è importante ricordare che la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  ha un effetto antiproliferativo su numerosi tipi cellulari tra cui cheratinociti e cellule di carcinoma mammario e prostatico.

### **Ruolo della Vitamina D nel metabolismo fosfo-calcico**

Il ruolo della vitamina D nel metabolismo dell'osso è molto conosciuto, in quanto la sua presenza è condizione necessaria perché il calcio e il fosforo introdotti con l'alimentazione siano adeguatamente assorbiti a livello intestinale. Infatti, è stato dimostrato<sup>42</sup> che, in assenza dell'azione della vitamina D, solo il 15% del calcio e il 60% del fosforo introdotti con la dieta sono effettivamente assorbiti. Tali percentuali salgono al 30-40% e all'80% rispettivamente, in presenza di adeguati livelli circolanti di vitamina D. In caso di inadeguati livelli di vitamina D, proprio allo scopo di evitare un riduzione dei livelli circolanti di calcio e fosforo, si ha un aumento nella sintesi e produzione di paratormone (PTH) da parte delle cellule C delle paratiroidi. Il conseguente iperparatiroidismo secondario si accompagna ad una tendenza al riassorbimento a livello del tubulo renale del calcio e all'eliminazione invece del fosforo, inducendo tendenzialmente ipofosfatemia e fosfaturia. Il PTH a sua volta tende a stimolare la sintesi di vitamina D attiva favorendo la produzione di 1alfa-idrossilasi. A livello dell'osso il PTH attiva gli osteoblasti, che a loro volta agiscono favorendo la maturazione degli osteoclasti, i quali inducono pertanto demineralizzazione dell'osso, favorendo pertanto

l'immissione in circolo di calcio e fosforo in modo da riportare a livelli normali le loro concentrazioni sieriche, ma a scapito di favorire l'ostemalacia e l'osteoporosi, e conseguentemente un aumento del rischio di fratture.

La principale attività biologica della vitamina D si esplica a livello intestinale, dove stimola l'assorbimento di calcio che avviene per il 60% a livello del digiuno e dell'ileo. Questa attività è una delle più antiche e meglio conosciute azioni della vitamina D ed è stata descritta per la prima volta in vitro da Schachter e Rosen<sup>43</sup> nel 1959 e in vivo da Wasserman et al<sup>44</sup> nel 1961.



Assorbimento intestinale del calcio

Come mostrato sopra, il calcio penetra nei microvilli intestinali attraverso un canale per il calcio (CaT1) e successivamente si lega alla calmodulina (CaM), a sua volta adesa alla miosina I dell'orletto a spazzola (BBMI). Questo legame favorisce lo spostamento del complesso calcio-calmodulina attraverso il microvillo intestinale fino a raggiungere la calbindina (CaBP), cui il calcio si lega e che ne media il trasporto citoplasmatico all'interno di vescicole endocitotiche. Il passaggio attraverso la membrana basolaterale è mediato dalla pompa del calcio (Ca-ATPasi). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  accresce l'assorbimento di calcio inducendo la sintesi di CaT1, CaBP e Ca-ATPasi e incrementando il legame di CaM con la BBMI dell'orletto a spazzola.

Anche l'assorbimento intestinale di fosfato è controllato dalla vitamina  $\text{D}^{45}$ . Il trasporto attivo di fosfato è maggiore nel digiuno, diversamente dal trasporto di calcio che avviene prevalentemente a livello del duodeno. Il passaggio di fosfato attraverso sia la membrana dell'orletto a spazzola sia la membrana basolaterale richiede sodio ed è mediato da un trasportatore sodio-fosfato (NaPi-IIb), omologo per struttura al trasportatore sodio-fosfato IIa localizzato a livello renale<sup>46</sup>, e la cui espressione è stimolata dalla vitamina  $\text{D}^{47}$ .

A livello renale la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  inibisce la 1alfa-idrossilasi e stimola il riassorbimento di calcio e fosforo.

In particolare, circa otto grammi di calcio sono filtrati dal glomerulo renale ogni giorno e circa il 98% viene riassorbito, la maggior parte a

livello del tubulo prossimale, mediante un processo Na-dipendente che avviene per via paracellulare scarsamente regolato da PTH e vitamina D<sup>48</sup>. La regolazione del riassorbimento di calcio da parte della vitamina D si esplica soprattutto a livello del nefrone distale, dove il calcio si muove contro gradiente elettrochimico in maniera indipendente dal sodio e attraverso una via transcellulare<sup>49</sup>, in maniera del tutto simile a quella descritta per l'assorbimento intestinale.

Il fosfato è invece riassorbito per circa l'80% a livello del tubulo prossimale attraverso un processo regolato dal PTH<sup>50</sup>.

La 1,25(OH)<sub>2</sub>D up-regola il VDR, azione opposta rispetto al PTH<sup>51</sup>, induce la calbindina e stimola l'azione della pompa del calcio, meccanismi questi che in sintesi aumentano il riassorbimento di calcio a livello renale.

A livello osseo la vitamina D favorisce la mineralizzazione dell'osteoidi in presenza di sufficiente apporto di calcio mentre promuove il riassorbimento da parte degli osteoclasti maturi in presenza di elevato apporto di calcio.

Infatti, patologie differenti sul piano eziopatologico come il deficit nutrizionale di vitamina D, l'alterata risposta all'azione della vitamina D (che si verifica ad esempio nel rachitismo da resistenza ereditaria alla vitamina D) e il deficit di produzione di vitamina D (per mutazione ad esempio del gene CYP27B1 per la 25(OH)-1alfa-idrossilasi nel rachitismo da pseudodeficit di vitamina D) hanno come manifestazione fenotipica comune la comparsa di rachitismo. Questo suggerisce che la



vitamina D e in particolare la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  è critica per il mantenimento della salute dell'osso. Inoltre, recettori per la vitamina D sono stati ritrovati a livello osseo<sup>52,53</sup>. La vitamina D quindi stimola il riassorbimento osseo, promuovendo fusione e differenziazione delle cellule progenitrici in osteoclasti maturi e attivando gli osteoclasti stessi; stimola la produzione di osteocalcina, di osteopontina e di fosfatasi alcalina.

### **Effetti extrascheletrici della vitamina D**

In aggiunta ai “classici” effetti sui tessuti direttamente coinvolti nell'omeostasi del calcio, la vitamina D regola la funzione di numerosi altri tipi cellulari, tutti esprimenti il VDR.

Interviene nella regolazione della secrezione del PTH, che stimola la produzione di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  e a sua volta la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  inibisce la produzione di PTH<sup>54,55</sup>; la secrezione insulinica, agendo sulla beta cellula pancreatica; a tal proposito numerosi studi osservazionali e caso-controllo hanno suggerito che il deficit di vitamina D può contribuire all'aumentare del rischio di sviluppare diabete mellito di tipo 2<sup>56</sup> (vedi in seguito).

Interviene nella regolazione della proliferazione e della differenziazione cellulare (è stata valutata in numerosi studi condotti sia su preparati cellulari sia su animali per il suo potenziale ruolo antineoplastico<sup>57</sup>).

Ha grande rilevanza nella regolazione del SISTEMA IMMUNITARIO: il potenziale ruolo della vitamina D e del suo metabolita attivo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  nella modulazione della risposta immune è stato ipotizzato da tempo, a

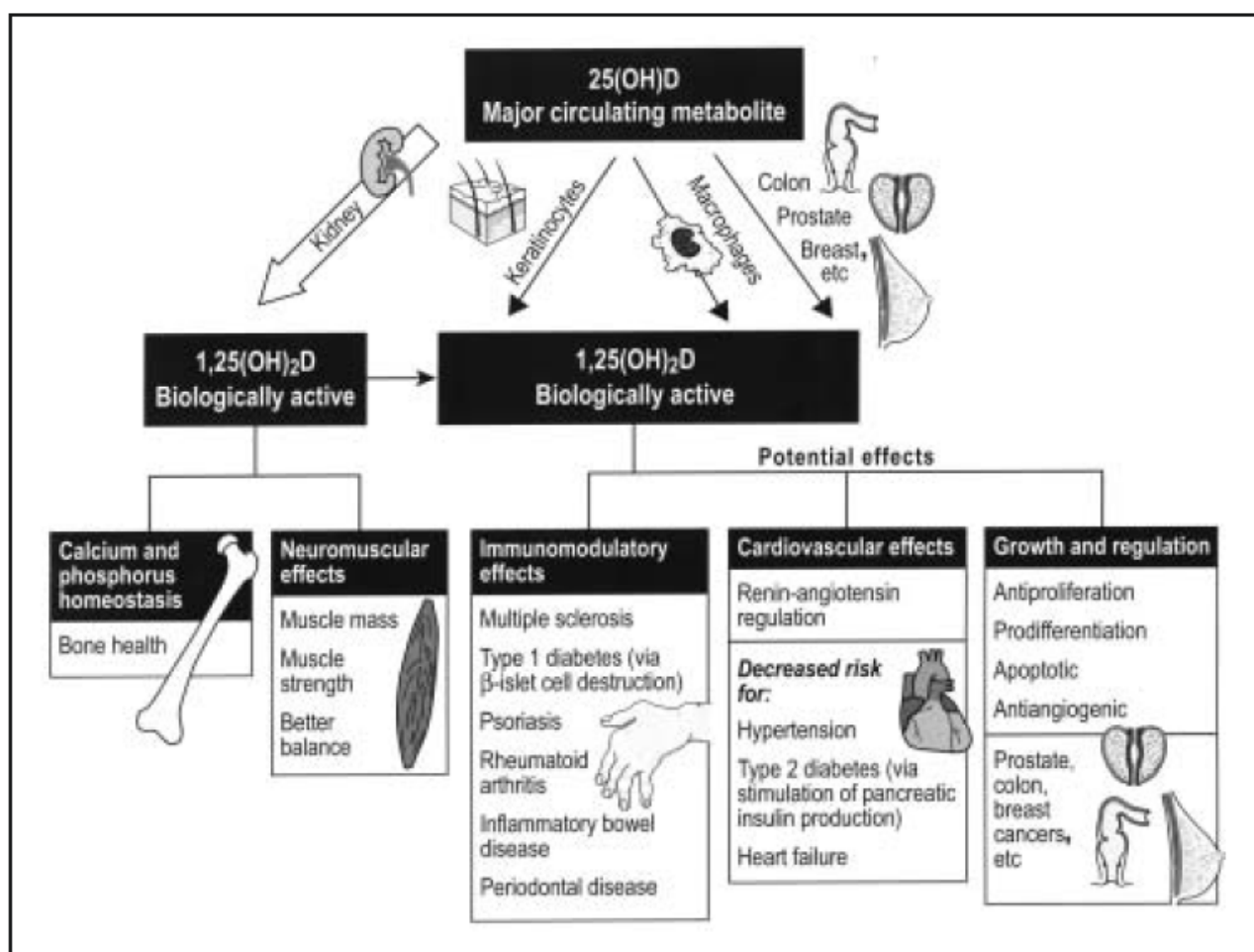
partire dalla scoperta del VDR a livello dei macrofagi, delle cellule dendritiche e dei linfociti B e T attivati, dalla capacità di tali cellule di esprimere il CYP27B1 e dalla dimostrazione che la proliferazione e la funzione di tali cellule è almeno in parte regolata dalla vitamina D<sup>58</sup>.

A livello del muscolo cardiaco è stato osservato che una riduzione della contrattilità cardiaca è stata osservata negli animali con deficit di vitamina D<sup>59</sup>. Questo potrebbe essere dovuto alla carenza di vitamina D o alla conseguente ipocalcemia e ipofosfatemia. In ogni caso, in vitro la 1,25(OH)<sub>2</sub>D stimola l'uptake di calcio da parte della cellula muscolare cardiaca<sup>60,61</sup>, e inibisce l'espressione del peptide natriuretico atriale<sup>62</sup>.

A livello del muscolo scheletrico è stato osservato che l'ipostenia della muscolatura prossimale è un segno del deficit di vitamina D. I mioblasti, ma non le cellule muscolari mature esprimono il VDR, pertanto la debolezza muscolare potrebbe riflettere sia il deficit di calcio e fosfato sia la carenza di vitamina D. comunque, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D potrebbe avere azioni sui muscoli che non dipendono dall'interazione con il VDR<sup>63</sup>.

Quindi, riassumendo, la presenza del VDR in organi e tessuti diversi da muscolo e scheletro suggerisce che la vitamina D sembra essere importante anche per i processi biologici extrascheletrici<sup>64</sup>. Varianti genetiche del gene che codifica per il VDR sono state inoltre associate all'incrementato rischio di sviluppare diversi tipi di cancro<sup>65</sup> e disordini immunitari, compreso il diabete mellito di tipo 1<sup>66</sup>.

Inoltre, come già detto in precedenza, l'enzima responsabile della conversione della vitamina D nel suo metabolita attivo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  è stato isolato in numerosi tipi cellulari oltre al rene<sup>67</sup> e diverse evidenze sembrano dimostrare l'importanza della sintesi extrarenale di vitamina D per la regolazione della crescita e differenziazione cellulare<sup>68</sup> attraverso meccanismi di regolazione autocrini e paracrini.



Funzioni endocrine, paracrine e autocrine della vitamina D<sup>69</sup>.

## Vitamina D e malattie cardiovascolari

L'ipovitaminosi D è una condizione che si associa frequentemente a ipertensione<sup>70</sup>, diabete<sup>71</sup>, arteriopatia periferica<sup>72</sup>, infarto del miocardio e maggiore mortalità CV<sup>73,74</sup>.

La vitamina D ed il paratormone potrebbero influenzare il rischio cardiovascolare mediante un effetto sulla formazione e lo sviluppo della placca aterosclerotica, anche se finora scarseggiano gli studi che abbiano dimostrato un'associazione tra livelli di vitamina D e markers di aterosclerosi come lo spessore medio-intimale<sup>75,76,77</sup>. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D è infatti coinvolta nella produzione di renina, uno dei più importanti ormoni che regolano la pressione arteriosa<sup>78</sup>; inoltre la razza afro-americana, che è stato dimostrato essere ad elevato rischio per il deficit di vitamina D, ha anche un più alto rischio di ipertensione<sup>79</sup> e malattie cardiovascolari<sup>80</sup>.

Tra i principali fattori che si associano ad ipovitaminosi D vi è l'obesità<sup>81,82</sup>. In effetti, la massa adiposa è inversamente correlata con i livelli di vitamina D sierica e correla positivamente con le concentrazioni di paratormone. Questo potrebbe derivare dalla grande capacità del tessuto adiposo di immagazzinare la vitamina D rendendola quindi biologicamente inattiva. Gli aumentati livelli di PTH e i diminuiti livelli di 1,25(OH)<sub>2</sub>D comportano un incremento del calcio intracellulare, che stimola la lipogenesi e predispone all'incremento ponderale. Non è tuttavia ancora chiaro se il deficit di vitamina D sia concausa o conseguenza dell'obesità.

## **Vitamina D e diabete mellito**

La carenza di vitamina D è stata inoltre associata con un aumentato rischio di sindrome metabolica e DM2<sup>83,84,85</sup>, in quanto la 1,25(OH)<sub>2</sub>D sembra migliorare la funzionalità beta-cellulare e l'insulinoresistenza. Il National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), un ampio studio longitudinale, ha mostrato una correlazione inversa tra i livelli sierici di 25(OH)D e l'incidenza di DM2 e insulinoresistenza<sup>86</sup>. Dall'analisi prospettica condotta nell'ambito del Medical Research Council Ely Study durante il decennio 1990-2000, è emersa una correlazione inversa tra le concentrazioni di vitamina D e il compenso glicometabolico<sup>87</sup>. Inoltre, è stato osservato che trattamenti prolungati con vitamina D nei pazienti affetti da osteomalacia sono in grado di incrementare la secrezione insulinica e potenziare la tolleranza glucidica<sup>88,89</sup>.

In aggiunta, i soggetti con carenza di vitamina D hanno aumentati livelli di proteina C-reattiva, fibrinogeno ed emoglobina glicata rispetto ai controlli<sup>90</sup>, confermando la presenza di uno stato pro-infiammatorio nei soggetti con insulinoresistenza e DM2. La somministrazione di vitamina D è in grado di ridurre la concentrazione dei marker di infiammazione sistemica e probabilmente migliorare la sopravvivenza beta-cellulare<sup>91</sup>.

## **Valutazione dei livelli circolanti di vitamina D**

Nonostante la 1,25-diidrossivitamina D sia la forma biologicamente attiva di vitamina D non può essere considerata un indice attendibile, a causa della breve emivita (<di 4 ore), al contrario la 25-idrossivitamina D, con un'emivita di circa 2 settimane, risulta essere affidabile ed il suo valore viene utilizzato per monitorare i livelli di vitamina D del nostro organismo.

Recentemente sono stati modificati i parametri per valutare lo status vitaminico D, con la determinazione dei seguenti livelli:

sufficienza:  $\geq 30$  ng/ml ( $>75$  nmol/L); insufficienza: 20-29 ng/ml (51-74 nmol/L); carenza:  $< 20$  ng/ml ( $<50$  nmol/L). Il valore di laboratorio può essere rappresentato in ng/mL oppure in nmol/L. La conversione da una unità di misura all'altra è possibile nel seguente modo:

nmol/L = moltiplicare per 2,5; ng/mL = dividere per 2,5

## **SPESSORE MEDIO-INTIMALE CAROTIDEO**

### **Significato clinico come predittore del rischio cardiovascolare**

L'IMT è lo spessore combinato dei due strati, intima e media, che, insieme all'avventizia, costituiscono la parete del vaso. L'aumento di tale spessore è secondario alla progressione del processo aterosclerotico e la sua misurazione si è dimostrata in grado di identificare e quantificare il grado di aterosclerosi.<sup>92</sup>

Il processo aterosclerotico è un processo generalizzato che interessa l'albero vascolare arterioso a partire dall'infanzia, con progressione

durante i decenni e che può rimanere silente dal punto di vista clinico nella maggior parte dei soggetti. A livello delle arterie coronarie rimane asintomatica fino a che non determina la formazione di una lesione che riduce significativamente il flusso sanguigno, causando sintomi di ischemia miocardica. Tuttavia, in un importante numero di casi, i pazienti possono mostrare una brusca progressione da malattia asintomatica verso infarto miocardico o addirittura morte, dovuta alla formazione del trombo seguita da rottura o erosione della placca<sup>93,94</sup>.

La misurazione dell'IMT viene effettuata a partire da immagini ecografiche e si tratta pertanto di una metodica non invasiva<sup>95</sup>. Attualmente si ritiene che questa misurazione sia particolarmente utile nel quantificare il grado di progressione dell'aterosclerosi, e quindi il rischio cardiovascolare, in soggetti considerati a rischio "moderato", in base ai classici parametri clinico-laboratoristici e che pertanto contribuisca ad identificare il miglior percorso diagnostico-terapeutico da applicare a tali soggetti<sup>96</sup>.

Lo sviluppo dell'ecografia B-mode ad alta risoluzione ha reso possibile lo studio anatomico della parete arteriosa in modo non-invasivo e la sua possibile applicazione alla ricerca e alla pratica clinica. Con gli ecografi attualmente sul mercato è possibile non solo identificare la presenza di una placca ateromasica e quantificarne il grado di espansione luminale, ma anche identificare gli strati più importanti della parete vasale, in particolare intima e media<sup>97</sup>.

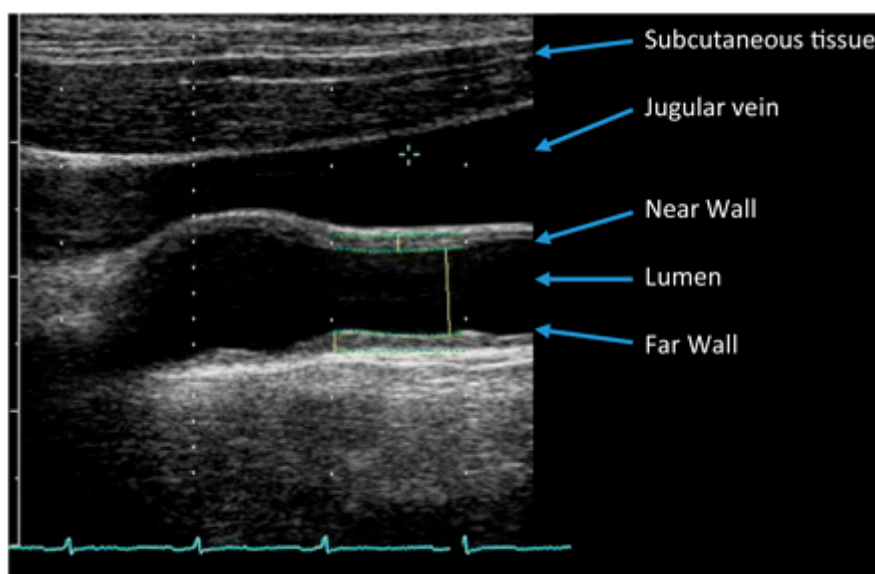


Immagine ultrasonografica che mostra l'identificazione della parete prossimale e distale nell'arteria carotide comune (CCA)<sup>98</sup>

La tonaca intima è lo strato più interno della parete arteriosa ed è costituito da un singolo strato di cellule endoteliali in diretto contatto con il flusso sanguigno, mentre la tonaca media è composta principalmente da cellule muscolari lisce, dalle quali dipende la maggior parte dello spessore della parete vascolare. L'avventizia, invece, rappresenta lo strato parietale più esterno ed è formata soprattutto da collagene<sup>99</sup>.

Ecograficamente è ben osservabile il passaggio dal lume (anecogeno) alla tonaca intima (ecogena) e il passaggio da tonaca media ad avventizia, in quanto la lamina elastica dell'avventizia è la porzione più iperecogena del vaso. Si può quindi visivamente isolare e misurare il complesso intima-media, mentre non è possibile distinguere tra le due, a causa di insufficiente risoluzione assiale<sup>96,99</sup>.



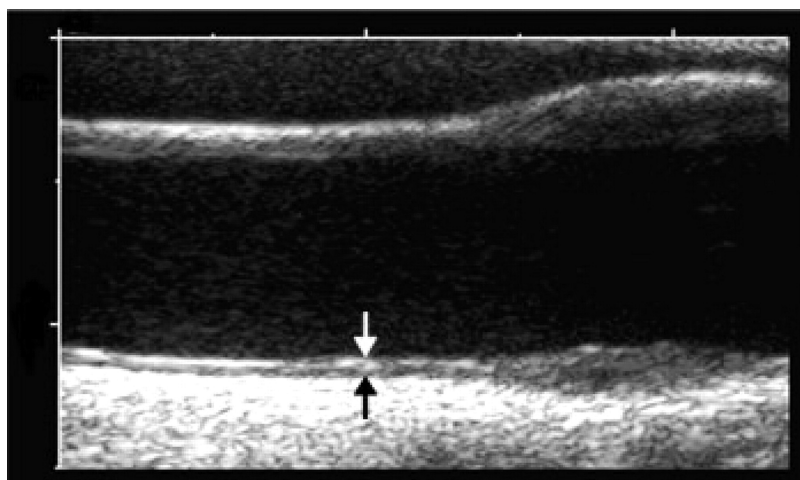


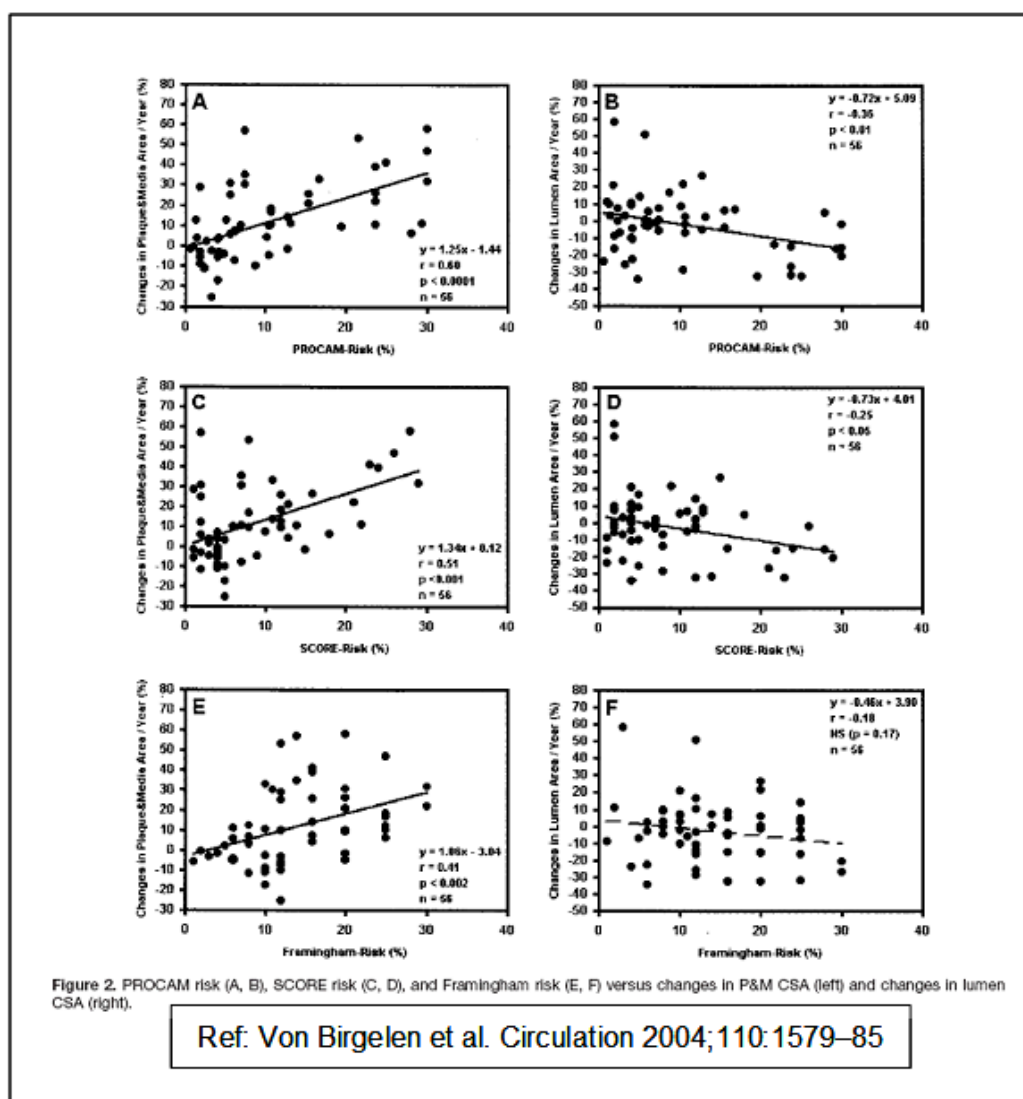
Immagine ad alta risoluzione della carotide comune e del bulbo carotideo. La distanza tra le due frecce (bianca e nera) indica lo spessore medio-intimale nella parete distale della carotide comune.<sup>99</sup>

In condizioni normali (assenza di ispessimento), lo spessore dell'intima è minore di quello della media e lo spessore medio-intimale è sostanzialmente costituito dalla media.

In presenza di aterosclerosi, però, la deposizione di lipidi a livello sub-endoteliale rende l'intima significativamente più spessa della media, che non si modifica sostanzialmente, per cui il rilevamento di un ispessimento medio-intimale rappresenta un indicatore sensibile dell'ipertrofia intimale indotta dalle fasi iniziali dell'aterogenesi. La presenza di un ispessimento medio-intimale carotideo non serve solo a valutare il danno d'organo cerebro-vascolare, ma funziona come proxy per il sistema arterioso di conduttanza a livello sistemico<sup>96</sup>.

Molteplici evidenze epidemiologiche supportano ormai ampiamente questa visione, dimostrando che l'IMT risulta correlato a tutti i principali fattori di rischio CV e proporzionale a presenza ed estensione della patologia cardiovascolare ateromastica<sup>93,95,100</sup>.

Inoltre l'IMT può essere utilizzato per stratificare il livello di rischio, in quanto risulta proporzionale al rischio globale misurato con i principali score internazionali di rischio (Framingham, PROCAM, etc.), come mostrato nella figura<sup>98</sup>.



PROCAM score (A,B), rischio SCORE (C,D), rischio Framingham (E,F) confrontati con i cambiamenti della sezione trasversale vascolare (a sinistra) e lo spessore della media (a destra).

Lo spessore medio intimale rappresenta, infine, un predittore indipendente di eventi cardiovascolari ed è strettamente associato alla

velocità di progressione della patologia ateromasica, dimostrando ulteriormente di essere un marcatore non solo di rischio ma anche di danno d'organo.<sup>101</sup>

Da alcuni anni, il successo dell'IMT ha indotto diversi sperimentatori e autorità regolatorie (come l'FDA) a considerare l'IMT anche come un potenziale marker di efficacia della terapia per la prevenzione degli eventi cardiovascolari.<sup>95,101</sup>

Gli studi di intervento che hanno adottato variazioni dell'IMT come end-point surrogato di progressione/ regressione di malattia vascolare e nei quali sono stati registrati anche gli eventi clinici come end-points sono stati recentemente meta-analizzati e hanno dimostrato che una riduzione di 0.012 mm/anno di IMT in corso di trattamento ipolipemizzante è associata con un odds-ratio (OR) di 0.48 per lo sviluppo di eventi in 5 anni di follow-up (tabella sottostante).

**TABLE 2**  
*Clinical trials involving 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors (statins) using both cIMT and cardiovascular event outcomes*

Clinical Trials	n°	Statin	Relative Impact on IMT Progression of Primary Outcome <sup>a</sup>	Relative Impact on Reported Cardiovascular Endpoints	
				Abstracted CVD Events	Odds Ratio (95% CI)
			<i>mm/yr</i>		
ACAPS	919	Lovastatin	-0.015 (-0.023 to -0.007) (p = 0.001)	CVD death, MI, stroke	0.34 (0.12-0.69)
KAPS	447	Pravastatin	-0.014 (-0.022 to -0.006) (p = 0.005)	CVD death, MI, stroke	0.57 (0.22-1.47)
PLAC-II	151	Pravastatin	-0.009 (-0.031 to -0.013) (p = 0.44)	Clinical coronary events	0.37 (0.11-1.24)
CAIUS	305	Pravastatin	-0.014 (-0.021 to -0.005) (p = 0.0007)	CVD death, MI, stroke	1.02 (0.14-7.33)
REGRESS	255	Pravastatin	-0.030 (-0.056 to -0.004) (p = 0.002)	Clinical events	0.51 (0.24-1.07)
BCAPS	793	Fluvastatin	-0.008 (-0.013 to -0.003) (p = 0.002)	CVD death, MI, stroke	0.64 (-0.24 to 1.66)
FAST	164	Pravastatin	Significant benefit (p < 0.001)	CVD death, MI	0.32 (0.10-1.06)
Pooled estimate			-0.012 (-0.016 to -0.007) <sup>f</sup>		0.48 (0.30-0.78)

ACAPS, Asymptomatic Carotid Artery Progression Study; KAPS, Kuopio Atherosclerosis Prevention Study; PLAC-II, Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries; CAIUS, Carotid Atherosclerosis Italian Ultrasound Study; REGRESS, Regression Growth Evaluation Statin Study; BCAPS, Beta-Blocker Cholesterol-Lowering Asymptomatic Plaque Study; FAST, Fukuoka Atherosclerosis Trial.

<sup>a</sup> Arms used in meta-analyses.  
<sup>b</sup> Data are means (95% CI) (reported p value).  
<sup>c</sup> Excludes FAST.

Ref: Revkin JH et al. *Pharmacol Rev.* 2007;59(1):40-53.

Relazione fra il trattamento con statine e spessore medio-intimale carotideo ed outcomes di eventi cardiovascolari.

Sulla base di queste evidenze è possibile concludere che l'IMT rappresenta un affidabile marker surrogate di patologia cardiovascolare e

di danno d'organo vascolare, nonché un fattore di rischio indipendente per futuri eventi clinici<sup>101</sup>.

### **Metodica e sue criticità**

L'IMT rimane attualmente un utile tool per la ricerca clinica in ambito cardiovascolare<sup>102</sup>, ma non rappresenta ancora uno strumento direttamente utilizzabile nella pratica clinica, in quanto il suo ruolo come predittore nel singolo individuo (al di fuori del contesto epidemiologico) rimane da definire in modo chiaro.

Infatti, alcuni studi<sup>95,103,104</sup> hanno cercato di identificare una soglia di valore di IMT ottimale per l'utilizzo clinico, ma questa sembra fortemente dipendente dalla popolazione studiata e dal rischio a priori, nonché da diversi fattori clinici e confounders. Diverse variabili condizionano significativamente lo spessore medio-intimale, anche in soggetti sani senza importanti fattori di rischio cardiovascolare, in particolare l'età, ma anche il sesso e l'etnia di provenienza.

Inoltre alcuni fattori di rischio (es: l'ipertensione arteriosa) hanno un impatto maggiore di altri nello sviluppo di un ispessimento e il loro peso nella determinazione del valore di IMT non è necessariamente proporzionale al loro peso relativo dal punto di vista clinico.<sup>105</sup> Per queste ragioni, l'utilizzo di una soglia unica (es: 1 mm che è quella attualmente più utilizzata) può comportare un sistematico errore di sottostima del rischio in alcune categorie, ad esempio nei giovani-adulti non ipertesi.

Altri problemi tuttora aperti nella misurazione dell'IMT e che ne limitano la possibilità di utilizzo nella pratica clinica sono sostanzialmente legati ad aspetti di tipo tecnico come la standardizzazione dei punti di misurazione e la riduzione della variabilità inter-operatore.

E' possibile, infatti, misurare l'IMT in oltre 36 punti differenti a livello della carotide comune, della biforcazione (spesso chiamata dagli anglosassoni "bulb") e del bulbo della carotide interna. Questi tre segmenti possono essere approcciati ecograficamente con diverse finestre identificate da reperi a livello del muscolo sternocleidomastoideo: anteriore (lungo il margine anteriore del ventre muscolare), laterale (con la sonda in posizione orizzontale a livello della zona ventrale) e posteriore (lungo il margine posteriore). In aggiunta, per ogni segmento e proiezione è possibile misurare l'IMT a livello sia della parete ecograficamente più vicina (superficiale) che di quella più lontana (profonda). Infine, i valori misurati a livello di questi 36 punti possono essere espressi sia come media che utilizzando il valore massimo registrato. Le differenze non sono triviali in quanto il valore di IMT non è costante in tutti i segmenti, ma dipende dall'andamento spirale del sangue lungo l'albero carotideo, che condiziona uno shear stress variabile sulla parete vascolare.

Bisogna considerare che l'IMT ed il diametro vascolare variano durante le diverse fasi del ciclo cardiaco. Durante la sistole, infatti, il diametro luminale si espande con un assottigliamento dell'IMT dovuto

all'allungamento longitudinale della parete e il contrario accade durante la diastole. La Società Americana di Ecocardiografia raccomanda l'utilizzo della misurazione dell'IMT alla fine della diastole<sup>99</sup>.

In aggiunta, alcuni segmenti sono più facili da misurare di altri dal punto di vista ecografico e l'ecogenicità del paziente può rendere complessa la misurazione in diversi segmenti. La misurazione dell'IMT può essere infatti effettuata a livello della carotide comune (CCA), della biforcazione carotidea (bulbo) e dell'arteria carotide interna (ICA); poiché la CCA è una struttura tubulare e perpendicolare agli ultrasuoni, la misurazione e la riproducibilità dell'IMT in questa regione è migliore rispetto alla misurazione dell'IMT a livello della biforcazione carotidea o dell'ICA<sup>99</sup>.

Infine l'IMT è ancora un esame fortemente operatore-dipendente e pertanto la variabilità inter-operatore risulta piuttosto elevata. Per questo motivo negli studi multi-centrici, in cui sono previsti molteplici operatori, viene in genere stilato un protocollo d'esame ad hoc, viene condotto un briefing prima, e periodicamente durante, lo studio per assicurare uniformità di registrazione e la lettura dei filmati IMT avviene in genere in modo centralizzato da parte di un operatore unico<sup>106</sup>. Apparecchi ultrasonografici differenti hanno inoltre risoluzioni differenti, frequenze di spettro differenti, scale di grigio differenti, eccetera. Infine l'utilizzo di software di lettura ha reso la misurazione più semplice permettendo aggiustamenti anche per vasi in posizione obliqua o curvi, ma la risoluzione ecografica migliore rimane comunque

per oggetti (interfaccia vascolare in questo caso) paralleli alla superficie della sonda, rendendo complessa la scelta di una finestra e una posizione del collo “universali” per la misurazione.

Un fondamentale vantaggio, però, dell’IMT rispetto a ogni altro marker di danno d’organo anatomo-radiologicamente identificabile (i.e. angiografia coronarica, angio-TC, IVUS) è la completa non invasività e assenza di danno radiante della metodica. Questo vantaggio non solo permette l’applicazione a fasce più ampie di popolazione (inclusi i soggetti a rischio meno elevato), ma rende anche possibile la serialità nelle misurazioni durante follow-up per l’utilizzo come marker di riduzione del rischio durante terapia.

## **PARTE SPERIMENTALE**



## **SCOPO DELLO STUDIO**

Il diabete mellito tipo 2 (DM2) si associa ad un incremento di 2-4 volte del rischio di sviluppo della patologia cardiovascolare (CV) e la malattia ischemica coronarica è responsabile di gran parte della morbilità e mortalità nei pazienti con diabete.

La dislipidemia è uno dei maggiori fattori di rischio per patologia cardiovascolare nei pazienti con diabete mellito. Benchè le attuali linee guida relative al trattamento delle dislipidemie si focalizzino prevalentemente sul controllo dei livelli di colesterolo LDL, è noto che altri componenti dell'assetto lipidico intervengono nel definire il rischio CV dei pazienti affetti da DM2.

Lo spettro di alterazioni lipidiche che possiamo osservare nel diabete mellito possono comprendere tutti i diversi tipi di dislipidemia identificati nella popolazione generale; un fenotipo in particolare è la dislipidemia diabetica, considerato comune nei pazienti diabetici e attribuito soprattutto all'insulino-resistenza ed al deficit insulinico. La dislipidemia diabetica (DD), caratterizzata da bassi livelli di HDL e valori moderatamente elevati di trigliceridi, senza necessariamente alterazione dei livelli LDL, è un esempio di come sarebbe auspicabile, per meglio definire il grado di rischio CV, una valutazione dell'assetto lipidico in tutte le sue sfaccettature, considerando anche aspetti qualitativi e quantitativi come la concentrazione delle frazioni lipoproteiche. Queste ultime certamente influenzano il processo

aterosclerotico, ma il peso ed il meccanismo con cui queste lipoproteine influenzano il processo aterosclerotico nei pazienti con DM2 non è tuttora ben definito.

L'ipovitaminosi D, frequente nella popolazione diabetica, è considerato un fattore di rischio CV e potrebbe essere associato ad un profilo lipidico più aterogeno.

Lo studio DiAL-ER (Diagnostica Avanzata in Lipidologia – Emilia Romagna) si è proposto di valutare quali parametri del metabolismo lipidico si associno maggiormente al grado di rischio CV in una popolazione di soggetti con DM2 e DD. In particolare lo scopo del presente studio è stato di valutare la relazione tra i livelli sierici di 25-OH-vitD e le alterazioni del profilo lipidico, e di valutare quali fossero i fattori in grado di influenzare in maniera indipendente la patologia aterosclerotica, valutata mediante misurazione dello spessore medio-intimale (IMT) carotideo, considerato ormai un valido indicatore diretto di danno aterosclerotico precoce.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione dello studio**

Sono stati screenati tutti i pazienti di entrambi i sessi, di età compresa fra 45 e 75 anni, che hanno avuto accesso al Servizio di diabetologia ambulatoriale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, nel periodo tra gennaio e marzo del 2010 e 2011. Sono stati arruolati consecutivamente 150 pazienti, in funzione dei criteri di inclusione ed esclusione prestabiliti e sotto elencati.

La numerosità del campione è stata stimata in base al seguente piano di analisi statistica: per la regressione lineare multipla si è presunto di strutturare un modello che includesse un massimo di 10 variabili, comprese età, sesso, le principali variabili cliniche e i parametri DiAL-ER che risultassero significativamente correlati al valore di IMT nell'analisi univariata. Considerando una possibile stima di 3-4 variabili tradizionali e 3-4 parametri di lipidologia avanzata, il modello finale si è presunto contenesse 8-10 variabili indipendenti. Stimando un numero di 15-20 pazienti per variabile inclusa nel modello come sufficienti per generare un modello rappresentativo, i circa 150 pazienti arruolati risultavano adeguati a fornire un potere statistico sufficiente.

I pazienti arruolabili dovevano rispondere ai seguenti criteri di inclusione e di esclusione.

## **Criteri di inclusione**

- Volontà del soggetto di partecipare allo studio;
- Età compresa fra 40 e 85 anni;
- DM2 definito da:
  - Diagnosi nota certificata di DM2 (con o senza terapia ipoglicemizzante) oppure iperglicemia compatibile con diabete mellito secondo criteri dell'American Diabetes Association (ADA)<sup>107</sup>;
  - Diagnosi in età > 35 anni;
  - Assenza di riscontro di auto-anticorpi (GAD, ICA, AIA);
- Terapia con sola dieta, ipoglicemizzanti orali o in terapia insulinica iniziata almeno 2 anni dopo la diagnosi;
- Dislipidemia diabetica (DD) tipica definita come TG  $\geq$ 150 mg/dL e HDL-C  $\leq$ 40 mg/dL con LDL-C <160 mg/dL con o senza terapia ipolipemizzante;
- Assenza di pregressi eventi cardiovascolari maggiori o di significativa progressione di complicanze microvascolari (vedi esclusione per definizione);
- Terapia cronica in corso stabile da almeno 6 mesi, in particolare per quanto riguarda terapia antidiabetica, ipolipemizzante ed anti-ipertensiva;

- HbA1c < 8.5 % (stabile con oscillazioni inferiori a 0.5% negli ultimi 6 mesi).

### **Criteri di esclusione**

- Età inferiore a 40 e superiore a 85 anni;
- Pazienti affetti da una franca dislipidemia monogenica, con particolare riferimento ad ipercolesterolemia familiare e ipoalfalipoproteinemie familiari;
- Pazienti affetti da diabete di tipo 1, diabete autoimmune o diabete gestazionale;
- Positività documentata ad auto-anticorpi (GAD, ICA, AIA);
- Eventi cardiovascolari pregressi, in particolare:
  - Infarto miocardico o sindrome coronarica acuta, angina stabile di nuova insorgenza;
  - Ictus o TIA con chiara sintomatologia “di lato”;
  - Ischemia acuta arti inferiori o comparsa di vasculopatia periferica;
  - Comparsa di ulcerazione agli arti inferiori di accertata o sospetta natura vascolare arteriosa o nuova diagnosi di “piede diabetico”;
  - Rivascolarizzazione coronarica (trombolisi, by-pass, angioplastica ± stent), carotidea (TEA, stent) o agli arti inferiori (by-pass, angioplastica ± stent);

- Diagnosi di ateromasia carotidea di rilevanza clinica, definita come presenza di placche stenosanti a livello del distretto carotideo;
- Significativa progressione di complicanze micro-vascolari negli ultimi 6 mesi, in particolare:
  - Progressione di uno step nella scala di gravità della retinopatia diabetica o comparsa di maculopatia;
  - Incremento  $>0.5$  mg/dL della creatininemia plasmatica, comparsa ex novo di microalbuminuria o passaggio da micro-proteinuria a proteinuria franca;
  - Comparsa di manifestazioni cliniche di neuropatia agli arti inferiori di nuova insorgenza;
  - Comparsa di disfunzione erettile di nuova insorgenza;
- Insufficienza d'organo;
- Malattie neoplastiche, autoimmuni o infiammatorie croniche;
- Modifiche clinicamente significative apportate alla terapia ipoglicemizzante, anti-ipertensiva o ipolipemizzante negli ultimi 6 mesi;
- Assunzione di supplementazioni nutrizionali o integratori vitaminici;
- Patologie psichiatriche severe.

## **Variabili in studio**

In tutti i pazienti sono stati raccolti dati anamnestici, fisico-antropometrici e laboratoristici, durante la visita di screening e la visita 1 e durante la visita 2 è stato eseguito l'ecocolordoppler carotideo.

### **Dati anamnestici e fisico-antropometrici**

- Età in anni;
- Sesso;
- Anamnesi familiare (con particolare riferimento alle patologie metaboliche ed alle malattie cardiovascolari, specie se ad insorgenza precoce);
- Anamnesi patologica personale (con particolare riferimento alle patologie metaboliche, alle malattie cardiovascolari ed alle indagini strumentali finalizzate ad indagare lo stato di salute dei distretti vascolari principali);
- Anamnesi farmacologica (con particolare riferimento ai farmaci che possono modulare direttamente o indirettamente l'assetto lipidico);
- Peso in kg e altezza in m: è stato rilevato il peso a digiuno, a paziente con indosso solo abiti leggeri, senza scarpe; altezza misurata mediante altimetro rigido da parete, con paziente posizionato a talloni uniti e con il profilo del corpo in posizione eretta. Veniva poi calcolato l'Indice di Massa Corporea / Body Mass Index – BMI (calcolato a partire da peso e altezza come segue:  $BMI = \text{peso in kg} / \text{altezza in m}^2$ );

- **Circonferenza addominale:** è stato seguito il protocollo delle NHANES III: per individuare il livello in corrispondenza del quale va misurata la circonferenza addominale deve essere fissato un punto di repere osseo. Con il soggetto in piedi si individua la porzione prossimale del femore per localizzare la cresta iliaca di destra. Il punto di repere si trova appena al di sopra della porzione superiore del bordo laterale della cresta iliaca di destra. Il nastro per la misurazione viene posizionato in corrispondenza di un piano orizzontale a livello della cresta iliaca, e viene fatto passare tutto intorno all'addome. Il piano su cui giace il nastro è parallelo al pavimento ed il nastro è posizionato senza comprimere l'addome. La misurazione viene effettuata ad una respirazione minima normale.<sup>108</sup>
- **Pressione arteriosa:** la misurazione è effettuata dopo che il paziente è rimasto seduto per almeno 15 minuti ed in astensione da caffeina ed esposizione al fumo di sigaretta da almeno 1 ora, in un ambiente tranquillo e silenzioso, con un braccio denudato appoggiato su un tavolo standard o altro supporto in modo tale che il punto medio del braccio stia all'altezza del cuore. La misurazione viene ripetuta due volte dopo che siano trascorsi almeno 60 secondi tra l'una e l'altra misurazione, facendo poi la media delle due misurazioni.<sup>109</sup>

### **Dati laboratoristici**



Un prelievo ematico effettuato dopo 12 ore di digiuno, di 56 cc di sangue, è stato distribuito in provette con clot-activator ed EDTA e inviato ai laboratori specializzati. I dosaggi dei parametri lipidici di base e degli altri parametri metabolici “tradizionali” e osteo-metabolici sono stati effettuati presso i laboratori di analisi dell’Azienda Ospedaliera di Parma, che ha fornito preliminarmente una certificazione relativa al Controllo di Qualità in atto. L’analisi di lipidologia avanzata (frazioni delle LDL) è stata condotta presso il laboratorio dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara e pertanto un campione è stato sottoposto a processazione e congelamento per poi farlo pervenire in tal sede. Qui sono state effettuate le valutazioni delle dimensioni delle LDL tramite elettroforesi non denaturante su gel di poliacrilamide (LIPOPRINT®). Questo sistema permette la separazione delle frazioni e sottofrazioni delle lipoproteine secondo le dimensioni delle particelle e successivamente quantifica il loro contenuto in colesterolo, distinguendole pertanto in LDL numerate da 1 a 7 con un progressivo aumento della quantità di colesterolo e una progressiva riduzione delle dimensioni.

Il protocollo, in dettaglio, prevede di dispensare 25 µl di campione nel capillare contenente il gel di poliacrilamide, di aggiungere 200 µl di gel di caricamento in ciascun capillare, fotopolimerizzare i gel di caricamento con UV per 30’, inserire le provette nella camera elettroforetica e aggiungere il tampone di corsa, eseguire la corsa

elettroforetica per 60 min a 3mA per capillare. I capillari venivano poi sottoposti a scansione e tramite il software specifico veniva calcolata l'area relativa di ogni sottofrazione lipoproteica. La quantità di colesterolo presente in ciascuna banda lipoproteica veniva calcolata moltiplicando l'area relativa di ciascuna banda per il colesterolo totale presente nel campione. La metodica del LIPROPRINT rappresenta un sistema rapido e validato contro il gold standard per l'identificazione delle sottofrazioni delle LDL (ed anche delle HDL), rappresentato dall'ultracentrifugazione a gradiente.<sup>110</sup>

A partire dal valore assoluto di ciascuna sottofrazione di LDL, è stata poi calcolata la percentuale di ciascuna rispetto al totale di colesterolo. Come detto sopra le LDL vanno da 1 a 7, con progressivo incremento della densità e riduzione delle dimensioni. Parallelamente si ha un aumento dell'aterogenicità delle LDL stesse. Le LDL 1, 2 e 3 sono considerate le LDL large (LLDL), mentre dalla 4 alla 7 sono LDL piccole e dense (sdLDL).<sup>111</sup> Di seguito sono rappresentati un quadro elettroforetico tipico in un soggetto a basso rischio (in alto) e uno di un soggetto ad alto rischio (in basso).

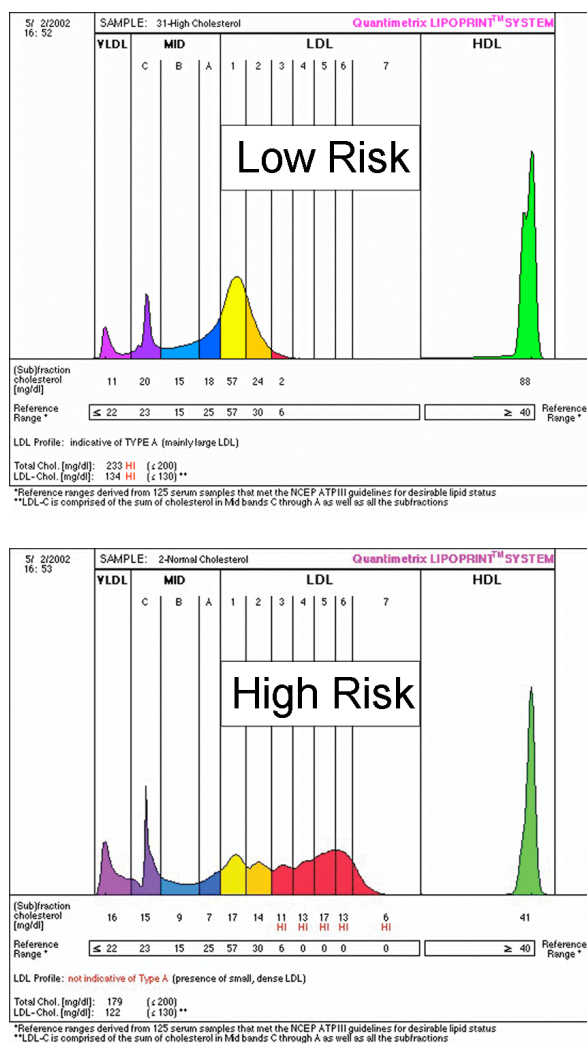


Figura 1: Elettroforesi con tecnica LIPOPRINT di un soggetto a basso rischio (in alto) e ad alto rischio (in basso)

**Esami strumentali: ecocolordoppler carotideo e misurazione dello spessore medio-intimale (IMT)**

Le arterie carotidi sono le principali arterie del collo. Originano direttamente dall'arco aortico a sinistra e dall'arteria anonima a destra e costituiscono i cosiddetti tronchi sovra-aortici. Le due arterie carotidi comuni (CC) si biforcano in arteria carotide interna (CI) ed arteria carotide esterna (CE), generalmente all'altezza della cartilagine tiroidea

della laringe, a cui rimangono entrambe leggermente posteriori. La biforcazione carotidea è caratterizzata da una dilatazione che in sezione trasversale presenta una forma ellittica ed in sezione longitudinale le pareti si presentano curve e non parallele tra loro ed alla cute. Normalmente le carotidi comuni non danno altre diramazioni. La CI è la naturale continuazione della CC e anch'essa nel decorso extracranico non ha rami collaterali. Il suo primo tratto subito dopo la biforcazione è chiamato bulbo della carotide interna ed è caratterizzato da una dilatazione rispetto al tratto successivo, detto post-bulbare. La CE invece dà diramazioni che vascolarizzano i tessuti e gli organi del collo. Il primo ramo della CE è l'arteria tiroidea superiore, la cui presenza, spesso ben evidente in quanto si distacca dalla CE prossimalmente, aiuta a distinguere la CI dalla CE. L'IMT è lo spessore combinato dei due strati, intima e media, che, insieme all'avventizia, costituiscono la parete del vaso. L'aumento di tale spessore è secondario alla progressione del processo aterosclerotico e la sua misurazione si è dimostrata in grado di identificare e quantificare il grado di aterosclerosi.

La misurazione viene effettuata a partire da immagini ecografiche e si tratta pertanto di una metodica non invasiva. Attualmente si ritiene che la misurazione dell'IMT sia particolarmente utile nel quantificare il grado di progressione dell'aterosclerosi, e quindi il rischio cardiovascolare, in soggetti considerati a rischio "moderato", in base ai classici parametri clinico-laboratoristici e che pertanto contribuisca a

identificare il miglior percorso diagnostico-terapeutico da applicare a tali soggetti.

Per una adeguata visualizzazione e registrazione dello spessore medio-intimale è necessario l'utilizzo di un ecografo che permetta acquisizione e stoccaggio in formato digitale dei filmati, dotato di sonda lineare multifrequenza compresa almeno tra 7 e 10 MHz e opportunamente configurato per le indagini vascolari periferiche. Per garantire una adeguata qualità dell'immagine, la registrazione deve essere ad una velocità minima di 25 frames al secondo (velocità di fissazione delle immagini retiniche). L'apparecchio deve essere dotato di un output digitale. In caso di assenza di questa caratteristica, lo sperimentatore deve assicurare comunque la possibilità di esportazione dei filmati in formato digitale comunemente leggibile (.avi). L'ecografo deve possedere un ingresso ECG e la possibilità di visualizzare il tracciato su schermo in tempo reale.

Il protocollo di esecuzione del test prevede che il paziente si presenti al mattino a digiuno; si richiede che dalla sera prima eviti l'assunzione di bevande contenenti teina o caffeina, eviti attività fisica intensa e fumo di sigaretta, tutti fattori che potrebbero influenzare la frequenza cardiaca del soggetto stesso. Il paziente si accomoda nell'ambulatorio ecografico, è invitato a togliere eventuali catenine e collane e maglie o camicie, in modo da rimanere a dorso nudo. In seguito si sdraia supino sul lettino ed assume una posizione adeguatamente comoda e che possa essere

mantenuta per un tempo prolungato senza conseguente discomfort. Per facilitare la rotazione e l'iperestensione del collo, che sarà necessaria per l'esecuzione dell'esame, e per permettere la massima esplorazione del distretto carotideo, si consiglia di non utilizzare cuscini.

In seguito si posizionano gli elettrodi sul dorso del paziente per la registrazione elettrocardiografica. Questa è necessaria per garantire la registrazione ed acquisizione delle immagini in fase telediastolica.

L'operatore prende posizione, in maniera comoda e stabile, all'estremità del lettino dove il paziente ha posizionato la testa e si siede dietro al capo del paziente. Alla destra ed alla sinistra del collo è necessario sia disponibile uno spazio sufficiente così da permettere l'appoggio del gomito sia destro che sinistro dell'operatore stesso. L'ecografo deve essere a distanza raggiungibile e comoda per l'operatore stesso, senza che però invada lo spazio sopra al lettino, in modo da accedere facilmente alla tastiera.

L'esame ecografico inizia sempre analizzando il versante destro del collo, seguito da quello sinistro, secondo la successione: carotide comune distale, biforcazione, carotide interna.

Scansione iniziale: tale fase è finalizzata ad una visualizzazione generale della carotide comune e dei suoi due rami lungo tutto il decorso visualizzabile, a partire dall'origine della carotide comune fino alla carotide interna nel suo tratto più distale. La primissima scansione è generalmente effettuata in proiezione trasversale, che offre una visione

generale dei vasi, dello spessore delle pareti, di eventuali placche o occlusioni, ed anche dei tessuti e organi circostanti (tiroide, linfonodi, ecc). Tale fase può essere seguita, a discrezione dell'operatore, da un'analisi doppler per distinguere i due rami della carotide e identificare eventuali stenosi emodinamicamente significative o occlusioni.

Valutazione principale: dopo tale analisi si dispone la sonda in modo da ottenere una proiezione longitudinale e si visiona il distretto carotideo in toto, distinguendo la carotide interna e la carotide esterna e identificando eventuali placche, stenosi, occlusioni e quantificandone il grado e le caratteristiche flussimetriche. Per accertare la distinzione tra CI e CE, può essere utile a tale scopo utilizzare il segnale doppler, che è caratterizzato da un pattern di flusso a basse resistenze a livello della carotide interna, mentre a livello dell'esterna presenta un flusso tipico di un'arteria muscolare.

Valutazione dello spessore medio-intimale: dopo tali step si può procedere nella registrazione dell'IMT. I distretti coinvolti in tale valutazione sono tre: carotide comune distale, biforcazione carotidea, origine (bulbo) della carotide interna. La carotide comune distale è definita come un segmento di 1 cm subito prima della biforcazione, facilmente identificabile come il centimetro che precede il punto in cui le pareti dell'arteria si aprono a V e non sono più parallele. La biforcazione carotidea inizia da questo punto e termina nel punto in cui il vaso si divide (detto carena). Spesso i due rami non sono visualizzabili

sullo stesso piano ultrasonografico, ma è necessario basculare con la sonda per identificare prima l'uno poi l'altro. La CI prossimale, detta anche bulbo della carotide interna, corrisponde al tratto più prossimale della CI, dopo la biforcazione, della lunghezza di 1 cm. In tale tratto l'arteria non ha di solito le pareti parallele tra loro, ma è caratterizzata da una zona di "slargamento", che tende poi a rientrare più distalmente. Per la misurazione dell'IMT la CC è analizzata da tre proiezioni distinte, mentre la biforcazione e la CI da un singolo angolo, definito come l'angolo anatomico di riferimento. Tale angolo è identificato come quello con cui meglio si visualizzano in posizione orizzontale le pareti prossimale (near wall) e distale (far wall) della CC distale. Gli altri due angoli sono rispettivamente a  $-10^{\circ}$  rispetto alla linea orizzontale (angolo posteriore) e a  $+55^{\circ}$  (angolo anteriore). Tali proiezioni corrispondono approssimativamente a  $45^{\circ}$  anteriormente e  $45^{\circ}$  posteriormente rispetto alla proiezione secondo l'angolo di riferimento. In tale identificazione può essere utile, a discrezione dell'operatore, l'utilizzo di un arco di Meijer, graduato, in modo da standardizzare le tre proiezioni.

Le immagini da registrare devono puntare all'ottimizzazione nella visualizzazione, in senso longitudinale, definendo l'angolo di riferimento, delle interfacce media-avventizia e intima-lume, delle near e far wall.

Dopo aver identificato i segmenti da analizzare, l'angolo di riferimento e gli altri due angoli anteriore e posteriore, è possibile iniziare



l'acquisizione delle immagini. Si identifica una visualizzazione longitudinale della carotide comune distale, secondo l'angolo di riferimento. La profondità è mantenuta generalmente a 4 cm, ma può richiedere variazioni a seconda della conformazione e delle dimensioni del collo del paziente e a seconda della superficialità maggiore o minore della carotide stessa. Allo stesso modo il fuoco viene posizionato a livello del vaso e in particolare a livello della near o della far wall a seconda del punto su cui ci si focalizza. Il tratto di vaso di cui si identifica lo spessore deve essere di almeno un centimetro e deve essere ben evidente l'IMT lungo tutto il cm. Con minimi movimenti della sonda e una maggiore o minore compressione vengono visualizzati alternativamente la parete distale e prossimale della carotide comune distale. Queste, infatti sono raramente visualizzabili in maniera ottimale contemporaneamente. Analogamente, si focalizza poi la biforcazione carotidea e in seguito il bulbo della carotide interna. Infine si posiziona la sonda in proiezione anteriore e successivamente posteriore e si registra la carotide comune distale, cercando di mantenere le caratteristiche di qualità dell'immagine sopra descritte per la proiezione principale. Ogni volta che viene visualizzato correttamente un tratto di IMT che si ritenga adeguato alla successiva lettura, si procede con la registrazione del filmato, acquisendo le sole immagini in fase tele diastolica. Ogni tratto di IMT ritenuto ottimale deve essere mantenuto

stabile per la registrazione per una durata di almeno cinque cicli cardiaci consecutivi.

Al termine di tale processo, gli stessi passaggi devono essere ripetuti per il distretto carotideo sinistro.

### Definizioni operative

Carotide comune distale: segmento di 1 cm immediatamente prossimale alla biforcazione carotidea, identificabile come il punto in cui le pareti dell'arteria si aprono a V e non sono più parallele.

Biforcazione carotidea: segmento dal termine distale della carotide comune (identificabile come il punto in cui le pareti dell'arteria si aprono a V e non sono più parallele) al punto in cui il vaso si divide (detto carena).

Carotide interna (bulbo): tratto prossimale della carotide interna di circa 1 cm dall'origine. In tale tratto l'arteria non ha di solito le pareti parallele tra loro, ma è caratterizzata da una zona di "slargamento", che tende poi a rientrare più distalmente.

Carotide interna (distale): tratto a valle del bulbo, in cui le pareti del vaso tornano parallele.

Angolo di riferimento: tale angolo è identificato come quello con cui meglio si visualizzano in posizione orizzontale le pareti prossimale (near wall) e distale (far wall) della CC distale.

Proiezione anteriore: +55° rispetto alla linea orizzontale (approssimativamente a 45° anteriormente rispetto alla proiezione secondo l'angolo di riferimento).

Proiezione posteriore: -10° rispetto alla linea orizzontale (approssimativamente a 45° posteriormente rispetto alla proiezione secondo l'angolo di riferimento).

Near wall: parete del vaso più superficiale, vicina alla sonda. In genere è di più difficile visualizzazione. La riduzione della compressione cutanea esercitata dalla sonda può essere richiesta per visualizzarla al meglio.

Far wall: parete del vaso più profonda, lontana dalla sonda. In genere è di semplice visualizzazione.

### Metodica

1) Preparazione del paziente:

- Possibilmente, dalla sera precedente, astensione da teina, caffeina, attività fisica intensa e fumo di sigaretta (modificano la frequenza cardiaca e quindi la distensione tele-diastolica della parete vascolare).

2) Preparazione dell'ambiente e posizionamento del paziente:

- Togliere al paziente eventuali catenine e collane e maglie o camicie in modo da esporre in modo completo il collo e le spalle (possibilmente il paziente dovrebbe essere a torace scoperto);

- Posizionare il paziente sul lettino supino, senza cuscino, ma invitandolo ad assumere una posizione adeguatamente comoda e che possa essere mantenuta per un tempo prolungato senza discomfort;

- Posizionare sul torace gli elettrodi ECG per garantire la registrazione ed acquisizione delle immagini in fase telediastolica;
- Prendere posizione dietro la testiera del lettino. Alla destra ed alla sinistra del collo è necessario sia disponibile uno spazio sufficiente così da permettere l'appoggio del gomito sia destro che sinistro dell'operatore stesso;
- Assicurarci che l'ecografo sia a distanza raggiungibile e comoda (in particolare la tastiera e il tasto per avviare e fermare la registrazione);
- Indurre iper-estensione del collo del paziente per permettere la massima esplorazione del distretto carotideo.

3) Esame preliminare eco-color-doppler: tale fase è finalizzata ad una visualizzazione clinica generale della carotide comune e dei suoi due rami lungo tutto il decorso visualizzabile, a partire dall'origine della carotide comune fino alla carotide interna nel suo tratto più distale.

Iniziare sempre analizzando il versante destro del collo, seguito da quello sinistro, secondo la successione: carotide comune distale, biforcazione, carotide interna.

- Eseguire una scansione trasversale dalla base collo verso l'alto;
- Eseguire una scansione longitudinale con supporto di color, power e doppler PW per identificare:
  1. Carotide interna ed esterna (in modo da facilitare le registrazioni seguenti);

2. Eventuali rilievi patologici/ para-fisiologici, quali placche, stenosi, kinking, occlusioni, etc.

- Identificare le proiezioni (principale di riferimento, anteriore e posteriore).

4) Valutazione vascolare principale:

La valutazione vascolare principale viene eseguita se sono presenti rilievi patologici da segnalare (placche) identificati durante l'esame preliminare.

5) Valutazione IMT, sempre in proiezione longitudinale, con registrazione del filmato, per effettuare la misurazione off-line. Viene eseguito l'esame prima a destra e poi al termine, a livello del distretto carotideo sinistro.

La procedura operativa prevede l'identificazione della proiezione anatomica di riferimento, in cui visualizzare chiaramente la carotide comune distale (ultimo cm prima della biforcazione), con visualizzazione ottimale dello spessore medio-intimale su entrambe le pareti (far-wall e near-wall) per almeno 5 secondi consecutivi con attivo il trigger ECG; in seguito viene chiaramente identificata la biforcazione (tratto in cui le due pareti non sono più parallele), con visualizzazione dello spessore medio-intimale come a livello della carotide comune; viene infine identificato il bulbo della carotide interna e visualizzato il relativo spessore medio-intimale.

Si posiziona a questo punto la sonda in proiezione anteriore e in seguito posteriore e nelle due proiezioni si identificano chiaramente le pareti e lo spessore medio-intimale della carotide comune distale e si registra per almeno 5 secondi consecutivi con il trigger attivo, come sopra descritto.

La stessa procedura viene ripetuta poi sul lato sinistro del collo.

La lettura dei filmati è stata effettuata in cieco, al termine di tutti i rilevamenti, da un singolo operatore, con il supporto di un software semiautomatico (Carotid Analyzer; Medical Imagin Applications LLC, IO, USA), in cui l'operatore selezionava il frame dove l'immagine della near wall o della far wall per ciascun segmento risultasse ottimale e la misurazione veniva effettuata dal software.

Come variabili dello spessore medio-intimale (IMT) sono state poi utilizzate la media di tutte le misurazioni dell'IMT nelle diverse proiezioni e nelle diverse sedi, di ambo i lati (IMTmean) e il valore massimo tra tutte le misurazioni effettuate (IMTmax).

### **Analisi statistica**

L'analisi è stata condotta con l'ausilio del software SPSS 18.0, versione per Windows (SPSS inc, Illinois, US). La soglia di significatività è stata posta a  $p < 0.05$  con analisi a 2 code.

E' stata effettuata un'analisi descrittiva di tutti i parametri studiati con distribuzione continua: media e deviazione standard e test di normalità

di Kolmogorov-Smirnov; la prevalenza di fattori in variabili categoriche è stata definita come numeri assoluti e percentuali.

Come variabili dello spessore medio-intimale (IMT) sono stata utilizzate la media di tutte le misurazioni dell'IMT nelle diverse proiezioni e nelle diverse sedi, di ambo i lati (IMTmean) e il valore massimo tra tutte le misurazioni effettuate (IMTmax). Per valutare la relazione 25-OH-vitD e le principali variabili cliniche, la popolazione è stata suddivisa in quartili di livelli sierici di 25-OH-vitD. Considerando che la stragrande maggioranza della popolazione presentava carenza o insufficienza di vitD (vedi sotto), non è stato infatti possibile suddividerla in base ai cut off di sufficienza/insufficienza/carenza. Sono state poi condotte un'analisi della varianza ed un correlazione lineare con test di Pearson tra i quartili di 25-OH-vitD e le principali variabili cliniche continue ed un test Chi Quadro per le variabili categoriche. Per valutare la relazione indipendente tra 25-OH-vitD e sdLDL ed oxLDL sono stati condotti diversi modelli di regressioni lineari multiple, dove come variabili dipendenti sono state inserite prima le sdLDL e in seguito le oxLDL ossidate. Modelli simili sono stati condotti per valutare la relazione indipendente tra 25-OH-vitD, sdLDL ed oxLDL e lo spessore medio-intimale carotideo (prima l'IMTmean poi l'IMTmax).

## **RISULTATI**

Dei 150 pazienti sottoposti alle visite, è stato possibile includere nell'analisi 138 soggetti, in quanto 12 pazienti, per caratteristiche anatomiche sfavorevoli, presentavano misurazioni affidabili dello spessore medio-intimale in meno dell'80% dei siti.

La popolazione in studio è pertanto risultata di 138 soggetti, di entrambi i sessi (38 donne e 100 uomini) e di età compresa tra i 42 e gli 85 anni (età media  $65 \pm 9,6$  anni), affetti da DM2 e DD.

La tabella sottostante evidenzia come la prevalenza di ipovitaminosi D sia molto marcata nella nostra popolazione. Si osserva infatti che solo in 5 individui (3,6%) i valori erano "sufficienti" (al di sopra di 30 ng/mL).

Tabella 1: assetto osteometabolico della popolazione, distinto per sesso

<b>Livelli di 25-OH-vitD (ng/mL)</b>	<b>Donne</b>	<b>Uomini</b>
<b>Carenza grave (valori &lt; 10)</b>	27 (46,6%)	20 (25,0%)
<b>Carenza moderata (valori 10-19)</b>	20 (34,5%)	43 (53,8%)
<b>Insufficienza (valori 20-29)</b>	10 (17,2%)	13 (16,3%)
<b>Normalità (valori <math>\geq</math> 30)</b>	1 (1,7%)	4 (5,0%)

Legenda di tab. 1: 25-OH-vitD=25-idrossi-vitamina D; PTH=paratormone; Ca=calcemia; P=fosforemia. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le differenze sono valutate mediante test T.



Dividendo la popolazione in quartili di 25-OH-vitD, possiamo osservare quanto presentato nella tabella sottostante (tabella 2).

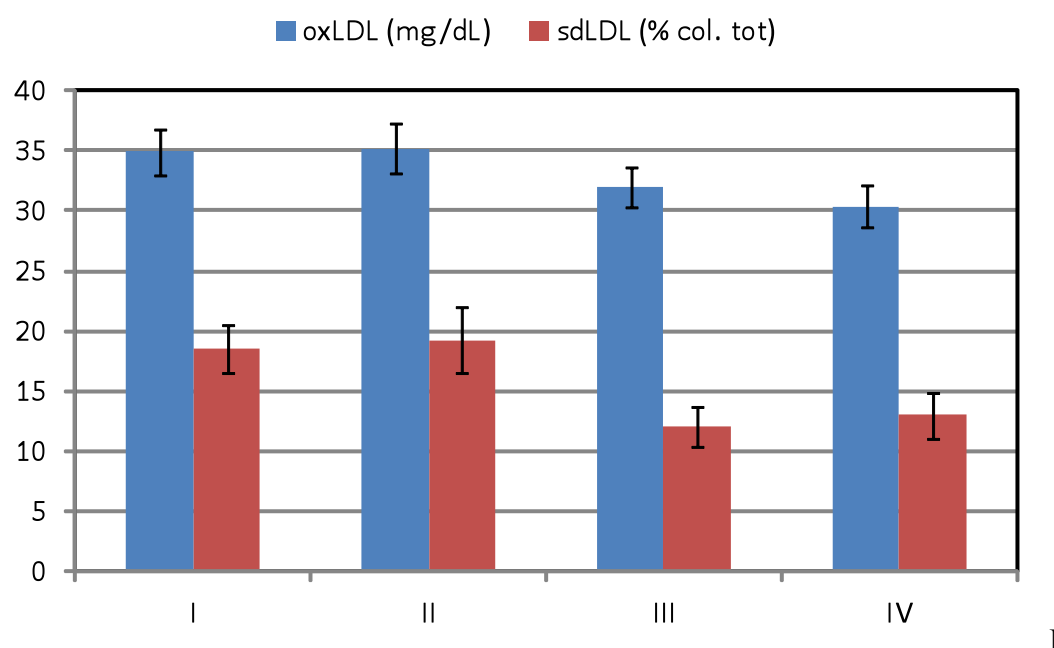
Tabella 2: caratteristiche della popolazione per quartili di 25-OH vitD

Variabili	Quartili di 25-OH-vitD				p per Trend/ Chi quadro	p (Corr. Pearson)
	I	II	III	IV		
25-OH-vitD (ng/mL)	6,8±1,2	10,8±1,3	15,7±1,7	25,6±5,7	-	-
<b>Età (anni)</b>	66,1±11,5	66,8±9,5	65,2±8,6	61,9±8,2	<b>0,050</b>	<b>0,050</b>
<b>Sesso [N (%) donne] *</b>	21 (36,2)	14 (24,1)	9 (15,5)	14 (24,1)	<b>0,025</b>	-
BMI (kg/m2)	32,1±3,8	30,8±3,9	31,1±3,9	31,3±5,1	0,517	0,515
Circ. vita (cm)	107,6±10,5	105,4±8,9	104,5±15,9	103,0±17,3	0,161	0,158
<b>PAS (mmHg)</b>	142,4±12,3	140,9±10,7	135,5±21,4	133,9±16,4	<b>0,012</b>	<b>0,012</b>
<b>PAD (mmHg)</b>	84,3±7,1	83,9±6,8	80,5±12,5	79,4±8,2	<b>0,010</b>	<b>0,009</b>
FC (batt/min)	68,1±8,8	72,1±10,0	68,2±11,0	69,2±10,0	0,949	0,946
Glic. bas. (mg/dL)	140,7±36,2	145,7±35,5	145,7±31,4	139,1±31,6	0,861	0,859
<b>Col. tot. (mg/dL)</b>	198,8±46,1	193,6±49,5	175,5±37,0	178,6±43,2	<b>0,024</b>	<b>0,023</b>
HDL (mg/dL)	37,3±8,0	35,7±10,0	34,1±8,2	34,1±8,6	0,104	0,101
TG (mg/dL)	204,8±87,8	214,9±128,8	208,9±79,5	178,0±84,9	0,258	0,256
LDL (mg/dL)	113,9±50,1	98,4±51,9	97,3±38,9	102,8±45,6	0,350	0,353
HbA1c (%)	7,4±1,8	6,6±2,1	7,5±1,0	6,9±1,7	0,613	0,642
<b>sdLDL (% di col. tot)</b>	18,5±11,5	19,3±16,3	12,1±10,0	13,1±11,2	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>
<b>ILDLD (% di col. tot)</b>	28,6±7,6	26,8±6,3	27,8±4,6	26,8±6,7	0,380	0,379
<b>oxLDL (U/L)</b>	34,9±11,0	35,2±12,5	32,0±9,6	30,4±10,2	<b>0,046</b>	<b>0,044</b>
<b>IMTmean (mm)</b>	1,027±0,290	1,083±0,298	1,045±0,234	0,934±0,168	0,101	0,103
<b>IMTmax (mm)</b>	2,017±1,011	2,160±1,013	1,926±0,764	1,603±0,622	<b>0,036</b>	<b>0,032</b>
Tratt. statina [N (%)]*	16 (21,3)	20 (26,7)	18 (24)	21 (28)	0,634	-

Legenda tabella 2: 25-OH-VitD: 25-idrossi-vitamina D; BMI=Body Mass Index; Circ vita= circonferenza vita; PAS=pressione arteriosa sistolica; PAD=pressione arteriosa diasolica; Glic bas=glicemia a digiuno; Col. tot=colesterolo totale; HDL=colesterolo HDL; TG=trigliceridi; LDL=colesterolo LDL; HbA1c=emoglobina glicata; sdLDL=LDL piccole e dense; oxLDL=LDL ossidate; IMTmean=spessore medio-intimale medio; IMTmax= spessore medio-intimale massimo. I valori sono espressi come media ± deviazione standard; \* i valori sono espressi con numero (%). Le differenze sono valutate mediante analisi della varianza o Chi quadro (\*) e con correlazione di Pearson.

Da tale analisi si è osservato che i soggetti appartenenti ai quartili più alti erano mediamente più giovani (età media 66 anni I quartile, vs 61 nel IV, p per trend 0.05), più frequentemente di sesso maschile (p per trend=0.025); presentavano valori pressori mediamente più bassi (p per trend 0.012 per la sistolica e 0.010 per la diastolica). Dall'analisi dei parametri lipidici emergeva che i pazienti dei quartili più bassi di 25-OH-vitD erano anche quelli con colesterolo totale più alto (p per trend 0.024), mentre non vi erano differenze significative in termini di colesterolo HDL, LDL e TG. Si osservava una più elevata % di sdLDL (18.5% rispetto al colesterolo totale nel I quartile e 13.1% nel IV quartile, p per trend=0.015) e una maggiore concentrazione di oxLDL (34.9 vs 30.4 U/L, p per trend=0.045). L'andamento delle sdLDL e delle oxLDL è presentato anche in figura 1.

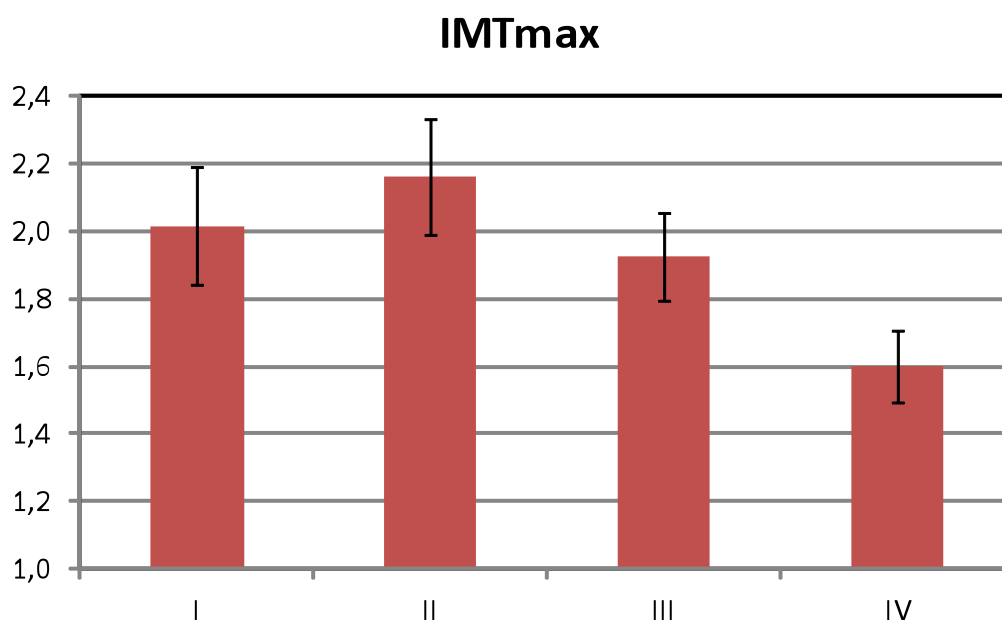
Figura 1: oxLDL e sdLDL per quartili di 25-idrossi-vitamina D



Legenda figura 1: oxLDL e sdLDL per quartili di 25-OH-vitD. Le colonne rappresentano la media e le barre di errore rappresentano l'errore standard (ES),

I soggetti appartenenti ai quartili più alti di 25-OH-vitD erano anche quelli con IMTmax più sottile (IV quartile vs I quartile 1.603 vs 2.017, p per trend=0.036). L'andamento dei valori di IMT è presentato anche in figura 2, da cui è evidente come i soggetti del IV quartile di 25-OH-vitD presentano un IMTmax marcatamente più sottile rispetto a quelli dei primi 3 quartili. Ricordando che la nostra popolazione è caratterizzata da valori decisamente al di sotto della norma, questo risultato fa supporre che solo i soggetti che si avvicinano maggiormente ai valori "normali" presentano un IMT significativamente migliore.

Figura 2: valori medi di IMTmax per quartili di 25-idrossi-vitamina D



Legenda figura 2: IMTmax per quartili di 25-OH-vitD. Le colonne rappresentano la media e le barre di errore rappresentano l'errore standard (ES),

Per valutare se vi fosse una relazione indipendente tra i livelli circolanti di 25-OH-vitD e i le oxLDL e sdLDL, espressione della dislipidemia aterogena nella nostra popolazione, è stata condotta un'analisi di regressione multipla, in cui come variabile dipendente è stata inserita prima la concentrazione di sdLDL poi di oxLDL e come variabili indipendenti l'età, il sesso e la terapia con statina. Come è possibile osservare nella tabella sottostante (tabella 3) le concentrazioni sieriche di 25-OH-vitD risultano inversamente correlati in maniera indipendente

alla percentuale di sdLDL ( $p=0.006$ ) e alla concentrazione di oxLDL ( $p=0.008$ ), dopo correzione per età, sesso e terapia con statine.

Tabella 3: regressione lineare multipla che valuta i predittori indipendenti dei livelli di oxLDL e di sdLDL

Variabili	oxLDL (U/L)		sdLDL (% di col. Tot)	
	beta	p	beta	p
Età (anni)	-0,167	<b>0,046</b>	-0,080	0,354
Sesso	-0,151	0,068	0,053	0,536
Tratt. Statina	-0,136	0,1	-0,080	0,350
<b>25-OH-vitD (ng/mL)</b>	-0,224	<b>0,008</b>	-0,242	<b>0,006</b>

Legenda tabella 3: variabili dipendenti: oxLDL (LDL ossidate) e sdLDL (LDL piccole e dense); variabili indipendenti: età; sesso; terapia con statina (tratt. statina) e 25-OH-vitD (25-idrossi-vitamina D)

Per valutare la relazione tra i livelli circolanti di 25-OH-vitD, sdLDL e oxLDL e lo spessore medio-intimale carotideo (IMTmean e IMTmax), sono stati condotti una serie di modelli di regressioni lineari multiple, presentati nelle tabelle 4 e 5, dove sono state introdotte come variabili dipendenti prima l'IMTmean poi l'IMTmax e come variabili indipendenti l'età, il sesso, la terapia con statine e, prima singolarmente (tabella 4), poi tutte e tre insieme le oxLDL, le sdLDL e i livelli di 25-OH-vitD (tabella 5). Come è possibile osservare da questa serie di analisi, i livelli circolanti di oxLDL predicono in maniera indipendente, insieme all'età ed al sesso, l'IMT (sia medio che massimo,  $p=0,024$  e  $p=0,041$ , rispettivamente). Un trend analogo, ma che non raggiunge la significatività statistica, si osserva per le sdLDL e soprattutto per i

livelli di 25-OH-vitD. Quando è stato elaborato un modello in cui le tre variabili citate sono state introdotte insieme, è emerso che, accanto all'età ed al sesso, le concentrazioni di oxLDL rimangono predittori indipendenti dell'IMTmean ( $p=0,033$ ) e i livelli di 25-OH-vitD mostrano un trend che non raggiunge la significatività ( $p=0,076$ ) per quanto riguarda l'IMTmax. Età, sesso ed oxLDL sono in grado di giustificare circa il 30% della variabilità dell'IMTmean ed età, sesso e 25-OH-vitD circa il 25% della variabilità dell'IMTmax.

Tabella 4: modelli di regressione lineare multipla che valutano i predittori indipendenti dei livelli di IMTmean e IMTmax

Tabella 4a: tra le variabili indipendenti sono inserite oxLDL

Variabili	IMTmean (mm)		IMTmax (mm)	
	B	p	B	p
Età (anni)	0,506	<b>0,000</b>	0,463	<b>0,000</b>
Sesso	0,254	<b>0,002</b>	0,220	<b>0,010</b>
<b>oxLDL (U/L)</b>	0,186	<b>0,024</b>	0,173	<b>0,041</b>
Tratt. statina	0,003	0,967	0,039	0,637

Tabella 4b: tra le variabili indipendenti sono inserite sdLDL

Variabili	IMTmean (mm)		IMTmax (mm)	
	B	p	B	p
Età (anni)	0,483	<b>0,000</b>	0,442	<b>0,000</b>
Sesso	0,209	<b>0,010</b>	0,177	<b>0,033</b>
Tratt. Statina	-0,011	0,887	0,027	0,742
<b>sdLDL (% col. tot)</b>	0,104	0,188	0,124	0,128

Tabella 4c: tra le variabili indipendenti sono inseriti i livelli di 25-OH-vitD

Variabili	IMTmean (mm)		IMTmax (mm)	
	B	p	B	p
Età (anni)	0,459	<b>0,000</b>	0,417	<b>0,000</b>
Sesso	0,223	<b>0,008</b>	0,190	<b>0,025</b>
Tratt. Statina	-0,015	0,859	0,032	0,707
<b>25-OH-vitD (ng/mL)</b>	-0,121	0,143	-0,150	<b>0,075</b>

Legenda tabella 4: variabili dipendenti: IMTmean (Spessore Medio-Intimale medio) e IMTmax (Spessore Medio-Intimale massimo); variabili indipendenti: età; sesso; terapia con statina (Tratt. statina); in alternativa oxLDL (LDL ossidate), sdLDL (LDL piccole e dense), 25-OH-vitD (25-idorssi-vitamina D)

Tabella 5: Regressione lineare multipla tipo “backward” che valuta i predittori indipendenti dell’IMT

Tabella 5a: come variabile dipendente è introdotto l’IMT mean

Variabili	B	B	B	B	p
<b>Età (anni)</b>	0,488	0,488	0,488	0,503	<b>0,000</b>
<b>Sesso</b>	0,255	0,256	0,255	0,249	<b>0,003</b>
<b>oxLDL (U/L)</b>	0,161	0,160	0,157	0,178	<b>0,033</b>
25-OH-vitD (ng/mL)	-0,083	-0,083	-0,083	-	-
sdLDL (% col. tot)	-0,006	-0,006	-	-	-
Tratt. Statina	0,003	-	-	-	-
R quadro	0,296	0,296	0,296	0,290	

Tabella 5b: come variabile dipendente è introdotto l'IMT max

<b>Variabili</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>p</b>
<b>Età (anni)</b>	0,439	0,441	0,445	0,421	<b>0,000</b>
<b>Sesso</b>	0,210	0,215	0,222	0,195	<b>0,019</b>
<b>25-OH-vitD (ng/mL)</b>	-0,116	-0,119	-0,119	-0,149	<b>0,076</b>
oxLDL (U/L)	0,109	0,128	0,122	-	-
sdLDL (% col. tot)	0,029	0,046	-	-	-
Tratt. Statina	0,044	-	-	-	-
<b>R quadro</b>	<b>0,258</b>	<b>0,257</b>	<b>0,255</b>	<b>0,243</b>	

Legenda tabella 5: variabili dipendenti: IMTmean (Spessore Medio-Intimale medio) (tab 5a) e IMTmax (Spessore Medio-Intimale massimo) (tab 5b); variabili indipendenti: età; sesso; terapia con statina (Tratt. statina); oxLDL (LDL ossidate); sdLDL (LDL piccole e dense); 25-OH-vitD (25-idorssi-vitamina D).

Come è possibile osservare da questa serie di regressioni lineari multiple, i livelli circolanti di oxLDL risultano essere predire in maniera indipendente, insieme all'età ed al sesso, l'IMT (sia medio che massimo). Un trend analogo, ma che non raggiunge la significatività statistica, si osserva per le sdLDL e soprattutto per i livelli di 25-OH-vitD. Quando è stato elaborato un modello in cui le tre variabili citate sono state introdotte insieme, è emerso che, accanto all'età ed al sesso, le concentrazioni di oxLDL rimangono predittori indipendenti



dell'IMTmean e i livelli di 25-OH-vitD mostrano un trend che non raggiunge la significatività per quanto riguarda l'IMTmax.

## **CONCLUSIONI**

E' ben noto come le malattie cardiovascolari rappresentino la prima causa di morte ed una delle prime cause di invalidità nei paesi industrializzati. Una grande parte di tali eventi, specie quelli che usualmente avvengono nelle fasce di età non estreme, potrebbe essere prevenuta in modo efficace se si riconoscessero in tempo i soggetti realmente esposti ad un rischio aumentato di malattia cardiovascolare.

Per quanto le conoscenze scientifiche in merito siano significativamente aumentate negli ultimi decenni, gli attuali metodi di predizione degli eventi utilizzati nella pratica clinica, seppure validi, non sono tuttavia sufficienti a riconoscere chiaramente tutti i soggetti che svilupperanno un evento rispetto a coloro che non lo svilupperanno. In particolare, la popolazione diabetica è considerata, in quanto tale, ad elevato rischio cardiovascolare.<sup>112</sup>

Peraltro è noto ed evidente nella pratica clinica come vi sia una notevole eterogeneità all'interno della categoria nell'incidenza di eventi cardiovascolari e la ricerca scientifica guarda con sempre maggiore attenzione al cosiddetto "rischio residuo", quella quota cioè di rischio cardiovascolare che rimane dopo aver corretto tutti i fattori di rischio "tradizionali". Fra i fattori di maggiore confondimento nella reale e precisa definizione del rischio cardiovascolare ruolo preminente lo svolge certamente la dislipidemia diabetica, che rappresenta un'entità

nosologica estremamente complessa sia da un punto di vista fenotipico, sia per la difficoltà di approccio terapeutico. In tale ambito emerge che una più approfondita definizione della dislipidemia, non solo da un punto di vista quantitativo, ma anche su base qualitativa potrebbe consentire un ulteriore miglioramento della situazione attuale.

La lipidologia “classica” basata sul dosaggio plasmatico di colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi, chiaramente non consente di stratificare precisamente il rischio aterogeno di un paziente, in quanto porta solo una delle informazioni di rilievo, e cioè la quantità delle lipoproteine circolanti, ma non fornisce altri dati sulle singole frazioni delle lipoproteine e sulla qualità delle stesse.

Il presente studio dimostra come in una popolazione di soggetti affetti da diabete tipo 2 e dislipidemia diabetica, senza pregressi eventi cardiovascolari e senza franche placche aterosclerotiche carotidee, si riscontri un’elevata prevalenza di grave ipovitaminosi D, con solo il 3,6% di individui con livelli superiori ai limiti della norma. I soggetti con livelli più bassi di 25-OH-vitamina D sono tendenzialmente più anziani, più frequentemente donne e presentano valori pressori maggiori. Relativamente all’assetto lipidico la percentuale di LDL piccole e dense rispetto al colesterolo totale e i livelli di LDL ossidate sono significativamente aumentati nei soggetti con concentrazioni sieriche più basse di 25-OH-vitD, senza una differenza significativa nei livelli totali di LDL e nel restante profilo lipidico (HDL e trigliceridi). Le

concentrazioni sieriche di 25-OH-vitD risultano essere predittori indipendenti dei livelli di sdLDL e di oxLDL. I livelli di oxLDL risultano a loro volta essere il principale predittore indipendente, insieme ad età e sesso, di uno spessore medio-intimale carotideo aumentato.

Benchè si tratti di uno studio osservazionale, che non permette pertanto di dimostrare alcuna relazione di tipo causale, tali risultati supportano l'ipotesi che in soggetti diabetici con dislipidemia diabetica bassi livelli di vitamina D si associno ad un profilo lipidico pro-aterogeno, non caratterizzato da una più elevata concentrazione di LDL totali, ma da una maggiore prevalenza di LDL piccole dense e di LDL ossidate. I livelli di LDL ossidate a loro volta si accompagnano in maniera indipendente ad uno spessore medio-intimale carotideo aumentato. L'impatto delle basse concentrazioni sieriche di vitamina D sullo spessore medio intinale carotideo sembra pertanto "mediato" da un incremento nei livelli di LDL ossidate circolanti.

Questi risultati potrebbero contribuire a spiegare la stretta associazione tra ipovitaminosi D e patologia cardiovascolare in una popolazione ad elevato rischio come quella diabetica affetta da dislipidemia aterogena. A nostra conoscenza questo è il primo studio che nella stessa popolazione valuta, in una popolazione di soggetti diabetici affetti da dislipidemia diabetica, il grado di ipovitaminosi D, la sua relazione con il profilo lipidico, non solo "tradizionale" ma anche nelle sue

sfaccettature di maggiore rilevanza in termini di aterogenicità e la sua relazione con lo spessore medio-intimale carotideo, indicatore “diretto” di danno aterosclerotico precoce

Lo studio presenta ovviamente numerose limitazioni.

Innanzitutto non è stato possibile analizzare un possibile fattore confondente, l’abitudine al fumo, dato a disposizione ma non ancora analizzabile al momento della stesura della presente tesi.

Altre informazioni relative alle altre lipoproteine circolanti (IDL, VLDL, ecc) non sono al momento disponibili ma lo saranno in futuro e permetteranno anch’esse di completare la visione del quadro della dislipidemia diabetica.

Per sua natura, essendo uno studio osservazionale trasversale, i risultati non permettono di fornire risposte di tipo fisiopatologico, ma solo di dimostrare delle associazioni. Solo studi longitudinali e di intervento potranno confermare la relazione causale tra le caratteristiche dell’assetto lipidico descritte nella nostra popolazione e il danno aterosclerotico.

## **BIBLIOGRAFIA**

- <sup>1</sup> Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *JAMA* 2002;287:2570-81.
- <sup>2</sup> Laasko M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48:937-42.
- <sup>3</sup> Kahn R. Metabolic syndrome: is it a syndrome? *Circulation* 2007; 115:1806-1810.
- <sup>4</sup> Khamaisi M, Wexler ID, Skrha J, Strojek K, Raz I, Milicevic Z. Cardiovascular disease in type 2 diabetics: epidemiology, risk factors and therapeutic modalities. *Isr Med Assoc J* 2003 Nov; 5(11):801-6.
- <sup>5</sup> Pyörälä K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Diabetes Care* 1997; 20:614-20.
- <sup>6</sup> Vaccaro O, Stamler J, Neaton JD. Sixteen-year coronary mortality in black and white men with diabetes screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Int J Epidemiol* 1998; 27:636-41.
- <sup>7</sup> Hachem SB, Mooradian AD (2006) Familial dyslipidemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. *Drugs* 66:1949-1969.
- <sup>8</sup> Taskinen MR (2003) Diabetic dyslipidemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 46: 733-749.
- <sup>9</sup> Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34: 1-25.
- <sup>10</sup> Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from Framingham Study. *Am Heart J* 110: 1100-1107.
- <sup>11</sup> Frayn KN. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc* 60: 375-380.
- <sup>12</sup> Mooradian AD et al. Obesity-related changes in high density lipoprotein metabolism. *Obesity* 16: 1152-1160.
- <sup>13</sup> Beers A et al. Inhibition of apolipoprotein AI gene expression by tumor necrosis factor  $\alpha$ : Roles for MEK/ERK and JNK signalling. *Biochemistry* 45: 2408-2413.
- <sup>14</sup> Durrington PN, Sniderman A. *Hyperlipidaemia*. Oxford: Health Press, 2002.
- <sup>15</sup> Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfraction with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem* 2001; 47:266-74.

- <sup>16</sup> Krauss RM. Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Curr Opin lipidol.* 5: 339-349.
- <sup>17</sup> Rudel LL, Bond MG, Bullock BC. LDL heterogeneity and atherosclerosis in nonhuman primates. *Ann NY Acad Sci.* 454: 248-253.
- <sup>18</sup> Vergès B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2005; 31:429-439.
- <sup>19</sup> Tozer EC, Carew TE. Residence time of low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circ Res* 1997; 80:208-218.
- <sup>20</sup> Duvillard L, Florentin E, Lizard G et al. Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care* 2003; 26:1540-1544.
- <sup>21</sup> Witzum JL, Mahoney EM, Bronks MJ et al. Non enzymatic glycosylation of low density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 1982; 31:283-291.
- <sup>22</sup> Makariou S, Liberopoulos E, Florentin M, Lagos K, Gazi I, Challa A, Elisaf M, The relationship of vitamin D with non-traditional risk factors for cardiovascular disease in subjects with metabolic syndrome, *Arch Med Sci* 2012; 8, 3: 437-443
- <sup>23</sup> Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype: a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82:495-506.
- <sup>24</sup> Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* 1998; 19(Suppl A) A24-A30.
- <sup>25</sup> Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 1992; 93:189-199.
- <sup>26</sup> Cominacini L, Garbin U, Pastorino AM et al. Increased susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res* 1994; 26:173-184.
- <sup>27</sup> Galland F, Duvillard L, Petit JM et al. Effect of insulin treatment on plasma oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2006; 32:625-631.
- <sup>28</sup> Lyons TJ, Jenkins AJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:174-180.
- <sup>29</sup> Steinbrecher UP, Witzum JL. Glycosylation of low density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 1984; 33: 130-134.

- <sup>30</sup> Holick MF, McLaughlin JA, Clark MB, Doppelt SH. Factors that influence the cutaneous photosynthesis of previtamin D3. *Science* 1981; 211:590-593.
- <sup>31</sup> Thomas MK, Demay MB. Vitamin D deficiency and disorders of vitamin D metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 611: 29-35.
- <sup>32</sup> Bell NH, Greene A, Epstein S, Oexmann MJ, Shaw S, Shary J. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks. *J Clin Invest* 1985; 76:470-473.
- <sup>33</sup> Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:373-378.
- <sup>34</sup> Matsuoka LY, Wortsman J, Dannenberg MJ, Hollis BW, Lu Z, Holick MF. Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D3. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1099-1103.
- <sup>35</sup> Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:1165-1168.
- <sup>36</sup> Holick MF. *Am Soc Bone and Mineral Research*. 2006:129-37
- <sup>37</sup> Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16/e.
- <sup>38</sup> Montani V, Monaco F. Malattie delle paratiroidi e metabolismo del calcio-fosforo e dell'osso, in *Linee Guida per la diagnosi, la terapia e il controllo delle malattie endocrine e metaboliche*. 2007.
- <sup>39</sup> Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:3294-3298.
- <sup>40</sup> Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras D The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* 2000; 5:173-179.
- <sup>41</sup> Malloy PJ, Feldman D, Xu R, Cattani A, Reyes ML. A Unique Insertion/Substitution in Helix H1 of the Vitamin D Receptor Ligand Binding Domain in a Patient With Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D-Resistant Rickets. *JBMR* 2004;6:18-32.
- <sup>42</sup> Norman AW. Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormonemediated adaptive response. *Am J Clin Nutr* 1990;51:290-300.
- <sup>43</sup> Schachter D, Rosen S Active transport of Ca<sup>45</sup> by the small intestine and its dependence on vitamin D. *Am J Physiol* 1959; 196:357-362.
- <sup>44</sup> Wasserman RH, Kallfelz FA, Comar CL. Active transport of calcium by rat duodenum in vivo. *Science* 1961; 133:883-884.
- <sup>45</sup> Harrison HE, Harrison HC Intestinal transport of phosphate: Action of vitamin D, calcium, and potassium. *Am J Physiol* 1961; 201:1007-1012.



- <sup>46</sup> Xu H, Bai L, Collins JF, Ghishan FK. Molecular cloning, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal localization of a human, small intestinal sodium-phosphate (Na<sup>+</sup>-Pi) transporter (SLC34A2). *Genomics* 1999; 62:281-284.
- <sup>47</sup> Xu H, Bai L, Collins JF, Ghishan FK. Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D(3). *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C487-493.
- <sup>48</sup> Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 1995; 75:429-471.
- <sup>49</sup> Winaver J, Sylk DB, Robertson JS, Chen TC, Puschett JB. Micropuncture study of the acute renal tubular transport effects of 25-hydroxyvitamin D3 in the dog. *Miner Electrolyte Metab* 1980; 4:178-188.
- <sup>50</sup> Tenenhouse HS. Cellular and molecular mechanisms of renal phosphate transport. *J Bone Miner Res* 1997; 12:159-164.
- <sup>51</sup> Fuchs R, Peterlik M. Vitamin D-induced transepithelial phosphate and calcium transport by chick jejunum. Effect of microfilamentous and microtubular inhibitors. *FEBS Lett* 1979; 100:357-359.
- <sup>52</sup> Narbaitz R, Stumpf WE, Sar M, Huang S, DeLuca HF. Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25- dihydroxyvitamin D3 in bones from fetal rats. *Calcif Tissue Int* 1983; 35:177-182.
- <sup>53</sup> Boivin G, Mesguich P, Pike JW, Bouillon R, Meunier PJ, Haussler MR, Dubois PM, Morel G. Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25- dihydroxyvitamin D3 and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal mouse and rat calvaria. *Bone Miner* 1987; 3:125-136.
- <sup>54</sup> Silver J, Russell J, Sherwood LM. Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for parathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:4270-4273.
- <sup>55</sup> Cantley LK, Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses parathyroid hormone secretion from bovine parathyroid cells in tissue culture. *Endocrinology* 1985; 117:2114-2119.
- <sup>56</sup> Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2017-2029.
- <sup>57</sup> Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, Moseley JM. 1,25-dihydroxyvitamin-D-receptor in breast cancer cells. *Lancet* 1979; 2:1335-1336.
- <sup>58</sup> Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nature clinical practice* 2008; 4:404-412.
- <sup>59</sup> Weishaar RE, Kim SN, Saunders DE, Simpson RU. Involvement of vitamin D3 with cardiovascular function. III. Effects on physical and morphological properties. *Am J Physiol* 1990; 258:E134-142.
- <sup>60</sup> Walters MR, Ilenchuk TT, Claycomb WC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates 45Ca<sup>2+</sup> uptake by cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262:2536-2541.
- <sup>61</sup> Selles J, Boland R. Rapid stimulation of calcium uptake and protein phosphorylation in isolated cardiac muscle by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 77:67-73.

- <sup>62</sup> Wu J, Garami M, Cao L, Li Q, Gardner DG. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> suppresses expression and secretion of atrial natriuretic peptide from cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1995; 268:E1108-1113.
- <sup>63</sup> Boland R. Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr Rev* 1986; 7:434-448.
- <sup>64</sup> DeLuca H. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6, suppl):1689S-1696S.
- <sup>65</sup> Slattery ML, Neuhausen SL, Hoffman M, et al. Dietary calcium, vitamin D, VDR genotypes and colorectal cancer [published correction appears in *Int J Cancer*. 2004;111:983]. *Int J Cancer*. 2004;111:750-756.
- <sup>66</sup> McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, et al. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians *Diabetologia*. 1997;40:971-975.
- <sup>67</sup> Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, et al. 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet* . 2001;357:1673-1674.
- <sup>68</sup> Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science*. 1979;206:1188-1190.
- <sup>69</sup> Holick MF. *Mayo Clin Proc* 2006;81(3): 353-373.
- <sup>70</sup> Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007;49:1063–1069
- <sup>71</sup> Knekt P, Laaksonen M, Mattila C, Harkanen T, Marniemi J, Heliovaara M, Rissanen H, Montonen J, Reunanen A. Serum vitamin D and subsequent occurrence of type 2 diabetes. *Epidemiology* 2008;19:666–671.
- <sup>72</sup> Melamed ML, Muntner P, Michos ED, Uribarri J, Weber C, Sharma J, Raggi P. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease: results from NHANES 2001 to 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1179–1185.
- <sup>73</sup> Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168:1174–1180
- <sup>74</sup> Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M, Vasan RS. Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2008
- <sup>75</sup> Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, Arcaro G. Serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:593–597
- <sup>76</sup> Krause R, Buhning M, Hopfenmuller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure [letter]. *Lancet*. 1998;352:709-710.
- <sup>77</sup> Rostand SG. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertension*. 1997;30(2, pt 1):150-156.
- <sup>78</sup> Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem*. 2003;88:327-331.

- <sup>79</sup> Rostand SG. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertension*. 1997;30(2, pt 1):150-156.
- <sup>80</sup> Fahrleitner A, Dobnig H, Obernosterer A, et al. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism are common complications in patients with peripheral arterial disease. *J Gen Intern Med*. 2002;17:663-669.
- <sup>81</sup> X. Palomer, J.M. Gonzalez-Clemente and F. Blanco-Vaca et al., Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Obes Metab* 10 (3) (2008), pp. 185–197.
- <sup>82</sup> A. Zittermann, Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence?, *Br J Nutr* 89 (5) (2003), pp. 552–572.
- <sup>83</sup> R. Scragg, Vitamin D and type 2 diabetes: are we ready for a prevention trial?, *Diabetes* 57 (10) (2008), pp. 2565–2566.
- <sup>84</sup> R. Scragg, M. Sowers and C. Bell, Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the third national health and nutrition examination survey, *Diabetes care* 27 (12) (2004), pp. 2813–2818.
- <sup>85</sup> K.C. Chiu, A. Chu and V.L. Go et al., Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction, *Am J Clin Nutr* 79 (5) (2004), pp. 820–825.
- <sup>86</sup> E.S. Ford, U.A. Ajani and L.C. McGuire et al., Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults, *Diabetes Care* 28 (5) (2005), pp. 1228–1230.
- <sup>87</sup> N.G. Forouhi, J. Luan and S. Hennings et al., Incidence of Type 2 diabetes in England and its association with baseline impaired fasting glucose: the Ely study 1990–2000, *Diabet Med* 24 (2) (2007), pp. 200–207.
- <sup>88</sup> S.A. Clark, W.E. Stumpf and M. Sar, Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on insulin secretion, *Diabetes* 30 (5) (1981), pp. 382–386.
- <sup>89</sup> B.J. Boucher, Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome ‘X’?, *Br J Nutr* 79 (4) (1998), pp. 315–327.
- <sup>90</sup> M. Cigolini, M.P. Iagulli and V. Miconi et al. Serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients, *Diabetes care* 29 (3) (2006), pp. 722–724.
- <sup>91</sup> A. Giulietti, E. van Etten and L. Overbergh et al., Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory, *Diabetes Res Clin Pract* 77 (1) (2007), pp. 47–57.
- <sup>92</sup> Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus (2004–2006). *Cerebrovasc Dis* 2007;23:75-80.
- <sup>93</sup> Giroud D, Li JM, Urban P, et al. Relation of the site of acute myocardial infarction to the most severe coronary arterial stenosis at prior angiography. *Am J Cardiol* 1992; 69: 729-32.
- <sup>94</sup> Glaser R, Selzer F, Faxon DP et al. Clinical progression of incidental, asymptomatic lesions discovered during culprit vessel coronary intervention. *Circulation* 2005; 111: 143-9.

- <sup>95</sup> Lorenz MW et al. Intima Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation* 2007; 115: 459-67.
- <sup>96</sup> Todd Hurst R. et al. Clinical Use of Carotid Intima-Media Thickness: Review of the Literature. *J Am Soc Echocardiogr* 2007;20:907-14.
- <sup>97</sup> Tahmasebpour HR et al. Sonographic Examination of the Carotid Arteries. *RadioGraphics* 2005; 25:1561-75.
- <sup>98</sup> O'Leary DH, Bots M. Imaging of atherosclerosis: carotid intima-media thickness. *Eur Heart J* 2010; 31: 1682-1689.
- <sup>99</sup> Nair SB, Malik R, Khattar RS. Carotid intima-media thickness: ultrasound measurement, prognostic value and role in clinical practice. *Postgrad Med J* 2012 .
- <sup>100</sup> Bots ML, Hoes AW et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96:1432-7.
- <sup>101</sup> Romana MJ et al. American Society of Echocardiography Report. Clinical application of noninvasive vascular ultrasound in cardiovascular risk stratification: a report from the American Society of Echocardiography and the Society for Vascular Medicine and Biology. *Vascular Medicine* 2006;11:201-1.
- <sup>102</sup> Baldassarre D, Amato M, Pustina L et al. Measurement of carotid artery intima-media thickness in dyslipidemic patients increases the power of traditional risk factors to predict cardiovascular events. *Atherosclerosis* 2007; 191: 403-8.
- <sup>103</sup> Chambless LE, Heiss G, Folsom AR et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the atherosclerosis risk communities (ARIC) study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 483-94.
- <sup>104</sup> Handa N, Matsumoto M, Maeda H et al. Ultrasonic evaluation of early carotid atherosclerosis. *Stroke* 1990; 21: 1567-72.
- <sup>105</sup> Bots ML, Hofman A, de Bruyn AM, et al. Isolated systolic hypertension and vessel wall thickness of the carotid artery. The Rotterdam Elderly Study. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 64-9.
- <sup>106</sup> Kanters SDJM, Algra A, van Leeuwen MS et al. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. *Stroke* 1997; 28: 665-71.
- <sup>107</sup> Standards of Medical Care in Diabetes – 2010. *Diabetes Care* 2010; 33 (Suppl 1):S11-S61.
- <sup>108</sup> U.S. Department of Health and Human Services, PHS. NHANES III Anthropometric Procedures Video. U.S. Government Printing Office Stock Number 017-022-01335-5. Washington, D.C.: U.S. GPO, Public Health Service; 1996
- <sup>109</sup> Parati GF per il Gruppo di Studio sul Monitoraggio Pressorio della Società Italiana dell'Ipertensione Arteriosa. Linee guida della società italiana

dell'ipertensione arteriosa sulla misurazione convenzionale e automatica della pressione arteriosa nello studio medico, a domicilio e nelle 24 ore. *Ipert Prev Cardiovasc* 2008; 6: 63-94.

<sup>110</sup> Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem* 2001; 47:266-74.

<sup>111</sup> Campos H et al, LDL particle size. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 12:1410-1419.

<sup>112</sup> Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in non-diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339:229-34.