

Sezione II: Procedure

3. Procedure per la diagnostica biochimica

Roberto Castello, Romolo Dorizzi

3.a. Glucosio

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.a. a pag. 169)

Definizione

Il glucosio è un carboidrato (classe di composti che contiene approssimativamente una molecola di acqua per ogni molecola di carbonio) con 6 atomi di carbonio, che si può presentare in due stereo-isomeri, D ed L, a seconda della posizione del gruppo idrossile legato al carbonio prossimo all'ultimo gruppo CH_2OH . La maggior parte dei carboidrati presenti nel corpo umano presenta configurazione D.

Razionale

Diagnosi

Poiché l'alterato metabolismo dei carboidrati che sta alla base del diabete si manifesta con l'iperglicemia, la misurazione del glucosio nel plasma è l'unico criterio diagnostico. Questa strategia è indiretta, poiché l'iperglicemia riflette la conseguenza e non la causa dell'alterazione metabolica. Tuttavia, fino a quando non sarà conosciuta la fisiopatologia molecolare della malattia, la concentrazione del glucosio nel plasma rimarrà essenziale nella diagnostica.

Screening

Lo *screening* nella popolazione generale della concentrazione plasmatica di glucosio è raccomandato, anche se non vi è evidenza che produca benefici in termini di miglioramento dello stato di salute. È stato stimato che il DM-T2 inizi circa 4-7 anni prima della diagnosi clinica, ed evidenze epidemiologiche indicano che le complicanze possono cominciare molti anni prima della diagnosi clinica. Inoltre, un terzo dei soggetti con DM-T2 non è diagnosticato.

Fisiopatologia

I carboidrati complessi (polisaccaridi) provenienti dalla dieta sono convertiti nel tratto gastrointestinale a monosaccaridi (gli unici assorbiti). Il primo passaggio è la trasformazione in disaccaridi, ad opera prima dell'amilasi salivare e poi di quella pancreatico. I disaccaridi (maltosio, lattosio e saccarosio) sono idrolizzati a glucosio, galattosio e fruttosio da una disaccaridasi specifica (maltasi, lattasi, saccarasi). I monosaccaridi sono poi assorbiti attraverso la parete duodenale, mediante un processo di trasporto attivo, che richiede energia, e trasportati attraverso la vena porta al fegato, dove il loro metabolismo procede poi secondo le necessità dell'organismo.

L'insulina (cfr capitolo 4.a. a pag. 65) è il principale ormone che influenza la concentrazione del glucosio circolante. La sua azione è antagonizzata dagli ormoni controregolatori: glucagone, adrenalina, glucocorticoidi e GH (cfr capitolo 4.b. a pag. 67).

Uso clinico

La diagnosi di diabete si pone esclusivamente con la documentazione di iperglicemia (aumento della concentrazione di glucosio nel plasma). Nel 1997, i criteri diagnostici furono modificati per meglio identificare individui ad alto rischio di retinopatia e neuropatia. I criteri attuali comprendono:

- sintomi di diabete e glicemia plasmatica occasionale (vale a dire, indipendentemente dal tempo trascorso dal pasto precedente) ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL);
- glicemia plasmatica a digiuno (FPG) ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL);
- glicemia a 2 ore dall'assunzione di un carico orale di glucosio (OGTT, *cfr capitolo 6.a. a pag. 85*) ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL).

Se qualcuno di questi tre criteri è soddisfatto, per formulare la diagnosi è necessario riconfermare il dato con la ripetizione dell'esame in un giorno successivo, a meno che il paziente presenti un'iperglicemia inequivocabile con scompenso metabolico acuto.

L'ADA propone di misurare la FPG in tutte le persone oltre i 45 anni d'età. Se la concentrazione di glucosio risulta < 6.1 mmol/L (110 mg/dL), la determinazione deve essere ripetuta ad intervalli di 3 anni. Nei soggetti a maggior rischio di diabete lo *screening* deve essere preso in considerazione in età più giovane o effettuato più frequentemente. A causa dell'aumento della prevalenza del DM-T2 nei bambini, è stato recentemente proposto lo *screening* nei bambini sovrappeso e che hanno altri due fattori di rischio (ad esempio, familiarità, etnia, e sintomi di insulino-resistenza, quali obesità e sindrome dell'ovaio policistico).

Tabella 3.a.1.

Alterazioni delle concentrazioni di glucosio da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • aumentato consumo (digiuno, attività fisica, eccesso di insulina); • ridotta produzione endogena (insufficienza epatica, galattosemia); • glicosuria renale. 	<ul style="list-style-type: none"> • obesità; • stress (infarto del miocardio, danno cerebrale, convulsioni, trauma, anestesia generale); • sindrome di Cushing; • acromegalia; • feocromocitoma; • epatopatia cronica; • pancreatite; • ipertiroidismo.

Tabella 3.a.2.

Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni di glucosio

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • insulina; • salicilati; • chinina; • antitubercolari; • sulfaniluree. 	<ul style="list-style-type: none"> • tiazidi ed altri diuretici; • cortisonici; • glucagone.

Bibliografia

Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, MacLaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin Chem* 2002, 48: 436-72.

ADA. Standards of medical care in diabetes - 2007. *Diabetes Care* 2007, 30: S4-41.

3.b. Corpi Chetonici

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.b. a pag. 173)

Definizione

I corpi chetonici che interessano in diagnostica sono tre: l'acetoacetato (AcAc) e il β -idrossibutirrato (β -HBA) (presenti in forma ionizzata a pH fisiologico), e l'acetone, presente solo in piccole quantità, che deriva dalla decarbossilazione spontanea dell'AcAc. La determinazione dei chetoni è importante soprattutto nel DM-T1, dato che la loro presenza può indicare una chetoacidosi, situazione che richiede un'immediata valutazione medica.

Razionale

I corpi chetonici sono presenti nelle urine e nel sangue in concentrazione molto bassa (per esempio, la concentrazione dei chetoni totali nel siero è inferiore a 0.5 mmol/L). Un aumento della concentrazione dei corpi chetonici nei pazienti con diabete mellito già diagnosticato o in pazienti con iperglicemia suggerisce una chetoacidosi diabetica (DKA) imminente o in atto. I due principali meccanismi che provocano l'incremento dei corpi chetonici nei diabetici sono l'aumentata produzione a partire dai trigliceridi ed il diminuito utilizzo nel fegato; entrambi derivano da un deficit assoluto o relativo di insulina (cfr capitolo 4.a. a pag. 65) e dall'aumento degli ormoni controregolatori (cfr capitolo 4.b. a pag. 67).

I principali corpi chetonici, β -HBA e AcAc, sono generalmente presenti in quantità equimolecolari, ma il loro equilibrio è spostato verso la formazione di β -HBA in tutte le situazioni che alterano lo stato ossido-riduttivo dei mitocondri epatici, come ipossia, digiuno, disordini metabolici (inclusa DKA) e chetoacidosi alcolica. Quindi, i metodi di determinazione dei corpi chetonici che non comprendono la determinazione del β -HBA possono fornire informazioni fuorvianti, sottostimando la concentrazione dei corpi chetonici totali.

Fisiopatologia

I corpi chetonici derivano da alterazioni sia del tessuto adiposo che del fegato.

Gli acidi grassi liberi presenti nel tessuto adiposo costituiscono il principale substrato per la formazione dei corpi chetonici. Gli acidi grassi a catena libera circolanti sono assorbiti dal fegato, riesterificati a trigliceridi, immagazzinati nel fegato, incorporati nelle *Very-Low-Density Lipoproteins* (VLDL), e riportati al plasma. In assenza di glucosio, i corpi chetonici forniscono la maggior parte dell'energia necessaria all'organismo (dopo un digiuno di 3 giorni, ne forniscono il 30-40%). Nel diabete non controllato, la bassa concentrazione di insulina aumenta la lipolisi e diminuisce la riesterificazione, aumentando gli acidi grassi liberi plasmatici. L'aumento degli ormoni controregolatori aumenta la lipolisi nel tessuto adiposo e la chetogenesi nel fegato. L'aumentata produzione epatica di chetoni ed il diminuito metabolismo periferico portano ad un accumulo di AcAc nel sangue: una piccola frazione viene spontaneamente decarbossilata ad acetone, ma la maggioranza è convertita ad β -HBA. La loro concentrazione nel sangue è variabile, ma il β -HBA è quello presente in concentrazione maggiore su base molare (β -idrossibutirrato 78%, acetoacetato 20% e acetone 2%).

Uso clinico

La determinazione dei corpi chetonici nelle urine e nel sangue è largamente utilizzata nella diagnosi e nel monitoraggio della chetoacidosi diabetica. I corpi chetonici sono misurati sia in ambiente ospedaliero che domiciliare/ambulatoriale. Le raccomandazioni dell'ADA prevedono che la valutazione iniziale del paziente con diabete mellito comprenda anche la determinazione della chetonuria e che l'esame debba essere disponibile anche nell'ambulatorio medico, per consentirne l'esecuzione immediata in caso di necessità. L'ADA sottolinea inoltre come l'esame per la chetonuria sia parte importante del monitoraggio del paziente con diabete, soprattutto nei pazienti con DM-T1 (*cf* capitolo 2.a.1. a pag. 23), gravidanza con diabete pre-esistente e diabete gestazionale (GDM, *cf* capitolo 2.a.3. a pag. 31). La chetonuria deve poi essere misurata in tutti i diabetici durante malattie acute, stress, marcata iperglicemia persistente (> 16.7 mmol/L, 300 mg/dL), gravidanza o sintomi di DKA, come nausea, vomito o dolore addominale.

Tabella 3.b.1.
Alterazioni delle concentrazioni dei chetoni da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<i>Non applicabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> • digiuno; • stress; • gravidanza; • vomito persistente; • alcolismo; • malattia di von Gierke.

Tabella 3.b.2.
Modificazioni delle concentrazioni di chetoni farmaco-indotte e da cause varie

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • deterioramento dei reagenti per gli esami sulle urine per l'esposizione all'aria; • urine acide per presenza di acido ascorbico; • presenza di microbi. 	<ul style="list-style-type: none"> • intossicazione da alcool denaturato; • assunzione di alcool isopropilico; • intossicazione da salicilati; • urine fortemente colorate; • presenza di ACE-inibitori.

Tabella 3.b.3.
Diagnosi Differenziale della chetoacidosi diabetica

Esame	Chetoacidosi diabetica	Iperglicemia iperosmolare non chetoacidotica	Chetoacidosi alcolica	Acidosi lattica
Glucosio (mg/dL)	> 300	> 600	< 200	< 200
Glicosuria	+	+	-	-
Gap anionico	> 16	< 16	> 16	> 16
Corpi chetonici (urine/plasma)	+	+	+	-
Osmolalità (mOsm) plasmatica	< 320	> 330	< 320	< 320
Bicarbonato (mmol/L)	< 15	> 20	< 15	< 15
pH	< 7.35	7.35-7.45	< 7.35	< 7.25
pCO ₂ (mm Hg)	< 35	35-45	< 35	< 35
Lattato (mg/L)	< 35	< 35	< 35	> 45
Peptide-C (µg/L)	< 0.7	> 1.8	> 1.8	> 1.8

Bibliografia

Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, MacLaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin Chem* 2002, 48: 436-72.

ADA. Standards of medical care in diabetes - 2007. *Diabetes Care* 2007, 30: S4-41.

3.c. Emoglobina Glicata

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.c. a pag. 175)

Definizione

Le proteine glicate derivano da una reazione post-traduzionale non enzimatica tra il glucosio e i gruppi aminici delle proteine. Per quanto riguarda l'emoglobina, la quota di sintesi di emoglobina glicata (HbA_{1c}) è funzione principalmente della concentrazione di glucosio cui gli eritrociti sono esposti. Il valore di HbA_{1c} è un indice affidabile della concentrazione media del glucosio (cfr capitolo 3.a. a pag. 51) circolante nei precedenti 60-120 giorni (periodo che rappresenta la vita media degli eritrociti).

Anche le concentrazioni di altre proteine glicate circolanti (denominate convenzionalmente "fruttosamine") riflettono la glicemia, ma per un periodo più breve rispetto alla HbA_{1c} (15-30 giorni).

Razionale

In tutti i pazienti con diabete mellito deve essere misurata l'emoglobina glicata per documentarne il controllo glicemico. I trial "Diabetes Control and Complications Trial" (DCCT) e "United Kingdom Prospective Diabetes Study" (UKPDS) hanno ben documentato la relazione esistente tra il controllo glicemico, quantificato con determinazioni seriate dell' HbA_{1c} , ed il rischio di comparsa e progressione delle complicanze croniche del diabete.

Fisiopatologia

L'emoglobina glicata si forma per via non enzimatica, attraverso la glicazione dei residui aminici delle proteine in due tappe:

1. il gruppo aldeidico della molecola di glucosio reagisce con il gruppo aminico sulla molecola di emoglobina, producendo una base di Schiff attraverso una reazione reversibile;
2. la base di Schiff non è stabile, ma diventa una cheto-amina stabile attraverso una reazione irreversibile (riarrangiamento di Amadori).

Il prodotto di Amadori può essere ulteriormente degradato in deossiglucosoni, che reagiscono ancora con gruppi aminici liberi per formare altri prodotti, gli *Advanced Glycation End products* (AGE). Nei tessuti con ricambio meno rapido, come il connettivo e l'endotelio vascolare, gli AGE possono agire da importanti mediatori della patologia diabetica.

Il glucosio si muove liberamente attraverso la membrana del globulo rosso e la percentuale di glicazione della glico-emoglobina è proporzionale alla concentrazione media di glucosio circolante. I termini emoglobina glicata, glico-emoglobina, emoglobina glicosilata (che non deve essere usato), HbA_1 e HbA_{1c} sono stati tutti utilizzati per indicare l'emoglobina modificata con l'aggiunta di residui glucidici. Le emoglobine glicate comprendono HbA_1 e altre emoglobine con legati residui glucidici, mentre HbA_1 è data solo da HbA_{1a} , HbA_{1b} e HbA_{1c} . L' HbA_{1c} è la principale componente (circa 80%) dell' HbA_1 e la maggior parte dei dati relativi alle cor-

relazioni esistenti tra controllo metabolico e complicanze del diabete (basate su DCCT e UKPDS) è stata ottenuta con metodi di dosaggio che quantificano l'HbA_{1c}.

Uso clinico

La determinazione dell'HbA_{1c} fa parte della gestione clinica *routinaria* dei pazienti con diabete mellito. L'*American Diabetes Association* (ADA) ha raccomandato, soprattutto in base ai risultati del DCCT, che uno degli obiettivi terapeutici principali deve essere il mantenimento dell'HbA_{1c} < 7% e che i medici curanti devono rivalutare la terapia nei pazienti con valori di HbA_{1c} > 8%. Le più recenti indicazioni di letteratura indicherebbero inoltre che, anche in soggetti senza diabete, aumenti sia pure modesti dell'HbA_{1c} si associano ad un rischio crescente di patologie cardiovascolari. In particolare, è stato riportato che, in soggetti non diabetici con glicemia normale, un aumento di un punto percentuale nei livelli dell'HbA_{1c} è associato ad un aumento del 28% del rischio di morte per cause cardiovascolari, indipendentemente da età, pressione arteriosa, livelli di colesterolo, indice di massa corporea e fumo di sigaretta. L'ADA sconsiglia l'utilizzo dell'HbA_{1c} a fini diagnostici, perché i dati sono, per ora, contrastanti.

Tabella 3.c.1.
Obiettivi dei valori di HbA_{1c} nel monitoraggio dei pazienti diabetici

	Generale	Singolo paziente	Pazienti con anamnesi di ipoglicemia
HbA _{1c}	7%	6%	> 7%

Tabella 3.c.2.
Correlazione tra livello di HbA_{1c} e concentrazione media di glucosio (CMG) nei 2-3 mesi precedenti

HbA _{1c}	CMG (mg/dL)	CMG (mmol/L)
6	135	7.5
7	170	9.5
8	205	11.5
9	240	13.5
10	275	15.5
11	310	17.5
12	340	19.5

Tabella 3.c.3.
Alterazioni delle concentrazioni di HbA_{1c} da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • gravidanza; • insufficienza renale - uremia (alcuni metodi); • ogni condizione che aumenta il <i>turn-over</i> degli eritrociti ed arricchisce il <i>pool</i> con cellule più giovani: <ul style="list-style-type: none"> - anemia emolitica; - sferocitosi; - emorragia acuta. 	<ul style="list-style-type: none"> • ogni condizione che aumenta la sopravvivenza degli eritrociti: <ul style="list-style-type: none"> - anemia sideropenica; - sindrome post-splenectomia; • emoglobina F (HPLC, elettroforesi); • emoglobina S (HPLC, elettroforesi); • ipertrigliceridemia; • iperbilirubinemia; • uremia (alcuni metodi).

Tabella 3.c.4.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni di HbA_{1c}

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • assunzione di vitamina C o E (almeno 1 g/die). 	<ul style="list-style-type: none"> • acido acetil-salicilico (HPLC, elettroforesi); • alcool (HPLC, elettroforesi); • dipendenza da oppiacei.

Bibliografia

Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, MacLaren NK, McDonald JM, Parrott M. *Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clin Chem* 2002, 48: 436-72.

ADA. *Standards of medical care in diabetes - 2007. Diabetes Care* 2007, 30: S4-41.

3.d. Microalbuminuria

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.d. a pag. 178)

Definizione

La microalbuminuria è definita come l'escrezione di piccole concentrazioni di albumina (30-300 mg di albumina/24 ore o 20-200 µg/min o 30-300 µg/mg di creatinina; cfr tabella 3.d.1.), rilevata in almeno due su tre raccolte eseguite ad intervalli di 3-6 mesi, dopo che sono state escluse le condizioni che riducono l'affidabilità dell'esame.

Razionale

La microalbuminuria costituisce un *marker* di aumentato rischio di morbilità e mortalità cardiovascolare (sia nel DM-T1 che nel DM-T2).

Fisiopatologia

Una delle prime alterazioni che si verifica nella nefropatia diabetica è la perdita del proteoglicano anionico eparan-solfato; di conseguenza, una maggior quantità di albumina (la proteina con la maggiore carica negativa) può attraversare la membrana basale glomerulare. Le dimensioni dell'albumina sono sufficientemente piccole da consentirle di attraversare tale membrana, ma sufficientemente grandi da impedirle di essere riassorbita dal tubulo renale. Il risultato finale è un'escrezione sproporzionata di albumina rispetto alle altre proteine (proteinuria selettiva).

Quando l'escrezione di albumina supera i 300 mg/die (definita quindi **macroalbuminuria**), la filtrazione glomerulare aumenta di circa 1 mL/min per mese. Con il progredire della nefropatia, la proteinuria diventa non selettiva e le proteine urinarie acquistano la stessa composizione e distribuzione di quelle del siero. La ricerca delle proteine urinarie con la striscia reattiva diventa positiva quando la concentrazione totale supera 550 mg/die e la malattia diventa difficilmente controllabile.

Uso clinico

L'ADA raccomanda il controllo periodico dell'albumina urinaria con metodi qualitativi (strisce reattive) negli adulti con diabete. La nefropatia diabetica progredisce lentamente e la microalbuminuria anticipa di 10-15 anni gli altri segni di malattia.

La positività dell'esame indica "albuminuria clinica" o "nefropatia conclamata" secondo le raccomandazioni dell'ADA, poiché corrisponde ad un'escrezione di proteine > 300 mg/24 ore (> 200 µg/min o > 300 µg/mg di creatinina; cfr tabella 3.d.1.). In questi pazienti la determinazione quantitativa delle proteine urinarie è impiegata nella valutazione della gravità e della progressione della proteinuria, per programmare la terapia e per determinarne l'efficacia. In caso di esami negativi per "proteinuria clinica" impiegando una striscia reattiva (escrezione di albumina < 300 mg/die), si deve eseguire un esame per microalbuminuria.

Tabella 3.d.1.
Cut-off per l'interpretazione dei valori di albuminuria

	mg/24 ore	µg/min	µg/mg creatinina
Normale	< 30	< 20	< 30
Microalbuminuria	30-300	20-200	30-300
Albuminuria clinica	> 300	> 200	> 300

Diagnosi/Screening

La determinazione della microalbuminuria è utile per la diagnosi precoce di nefropatia diabetica.

Gli esami quantitativi convenzionali per l'albuminuria, basati sulle strisce reattive, non rilevano i piccoli aumenti di escrezione dell'albumina urinaria degli stadi precoci della nefropatia. A questo scopo, sono impiegati esami quantitativi per la microalbuminuria.

Poiché la microalbuminuria compare di rado nel DM-T1 di recente insorgenza o prima della pubertà, la ricerca della microalbuminuria nei bambini con DM-T1 è raccomandata dopo la pubertà o a partire da 5 anni dopo la comparsa del diabete.

Per quanto riguarda il DM-T2, la difficoltà nella datazione precisa dell'insorgenza della malattia richiede l'esecuzione annuale dell'esame dopo aver posto la diagnosi. Nei pazienti più anziani (età > 75 anni o attesa di vita < 20 anni), gli anni di vita residua possono essere troppo pochi perché si sviluppi la patologia renale. In questi pazienti è quindi incerta la necessità dello *screening* della microalbuminuria.

Prognosi

La microalbuminuria ha un significato prognostico, poiché i pazienti con diabete (tipo 1 e 2) e microalbuminuria presentano un rischio aumentato di malattia cardiovascolare.

Nell'80% dei pazienti con DM-T1 e microalbuminuria, l'escrezione urinaria di albumina aumenta del 10-20% per anno, portando in 10-15 anni a proteinuria clinica (> 300 mg di albumina/die). Dopo lo sviluppo di proteinuria clinica, una percentuale di pazienti > 80% dimostra un quadro evolutivo e sviluppa una diminuzione del filtrato glomerulare e, successivamente, insufficienza renale.

Nel DM-T2, il 20-40% dei pazienti con microalbuminuria progredisce fino alla nefropatia conclamata, ma solo il 20% sviluppa insufficienza renale entro 20 anni.

Tabella 3.d.2.
Alterazioni delle concentrazioni di microalbuminuria da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate (transitoriamente) da
<i>Non applicabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> • iperglicemia transitoria; • esercizio fisico vigoroso; • gravidanza; • infezioni del tratto urinario; • ipertensione grave; • insufficienza cardiaca; • proteinuria posturale benigna; • malattia febbrile acuta.

Tabella 3.d.3.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni di microalbuminuria

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • ACE-inibitori; • sartani. 	<ul style="list-style-type: none"> • amikacina; • teofillina; • sulfametossazolo + trimetoprim; • venlafaxina; • paromomicina; • colimicina.

Bibliografia

Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, MacLaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clin Chem 2002, 48: 436-72.

ADA. Standards of medical care in diabetes - 2007. Diabetes Care 2007, 30: S4-41.

4. Procedure per la diagnostica ormonale

Roberto Castello, Romolo Dorizzi

4.a. Insulina, Pro-insulina, Peptide-C

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.e. a pag. 181)

Fisiologia

Le β -cellule pancreatiche sintetizzano nel reticolo endoplasmatico rugoso la pre-pro-insulina, una proteina del peso molecolare di 11.500 dalton. Da questa, per delezione enzimatica dal terminale aminico di circa venti aminoacidi subito dopo la sintesi, deriva la pro-insulina, proteina a catena semplice precursore immediato dell'insulina. La pro-insulina, composta da 86 aminoacidi, viene trasportata quindi all'apparato di Golgi in 12-30 minuti, con un processo che richiede energia. In quella sede viene scisso il peptide di connessione (Peptide-C), dando origine all'insulina. La pro-insulina contiene quattro aminoacidi che non sono presenti nell'insulina (che ha 51 aminoacidi) e nel peptide-C (che è composto da 31 aminoacidi). La pro-insulina viene in piccola parte secreta in circolo intatta, ma è biologicamente meno attiva dell'insulina. L'insulina è il principale ormone che influenza la concentrazione del glucosio circolante, attraverso:

- stimolazione di:
 - captazione di glucosio da parte del tessuto muscolare ed adiposo;
 - glicolisi;
 - glicogeno-sintesi;
 - sintesi proteica;
 - captazione cellulare di ioni come potassio e fosfato.
- inibizione di:
 - gluconeogenesi;
 - glicogenolisi;
 - lipolisi;
 - chetogenesi;
 - proteolisi.

L'azione dell'insulina è antagonizzata dagli ormoni controregolatori (cfr capitolo 4.b. a pag. 67): glucagone, adrenalina, glucocorticoidi e GH.

Fisiopatologia

La struttura primaria dell'insulina presenta due catene polipeptidiche, la catena A di 21 aminoacidi e quella B di 30 aminoacidi, legate da due ponti disolfuro (un terzo ponte disolfuro è presente anche all'interno della catena A). Si ritiene che nei granuli l'insulina si possa trovare sotto forma di monomero, dimero (due molecole legate tra loro) ed esamero (sei molecole legate tra loro) nel quale sono presenti anche due atomi di zinco, mentre la forma più presente in circolo è il monomero.

La β -cellula pancreatica ha recettori capaci di riconoscere e legare glucosio ed altri ormoni o substrati, la cui attivazione aumenta o diminuisce la secrezione di insulina. A differenza di quanto si verifica nella fase post-prandiale, il glucosio ha solo un ruolo permissivo nella secrezione basale di insulina, regolando la sensibilità della β -cellula ai diversi stimoli. La stimolazione del sistema parasimpatico aumenta la secrezione di insulina, attraverso la mediazione

di recettori muscarinici, mentre l'interruzione della via vagale la riduce. Anche se i recettori adrenergici hanno effetti opposti sulla secrezione di insulina (gli α la inibiscono ed i β la stimolano), l'effetto netto della somministrazione di adrenalina è inibitorio.

Tabella 4.a.1.
Alterazioni delle concentrazioni di insulina da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • DM-T1; • pancreasectomia; • pancreatite; • ipopituitarismo; • adrenalina; • noradrenalina. 	<ul style="list-style-type: none"> • gravidanza; • obesità; • DM-T2; • insulinoma; • glucagonoma; • ipercorticosurrenalismo; • ipertiroidismo; • acromegalia.

Tabella 4.a.2.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni di insulina

Diminuite da	Aumentate da
Levo-DOPA.	<ul style="list-style-type: none"> • sulfaniluree; • insulina; • steroidi.

Tabella 4.a.3.
Alterazioni delle concentrazioni di peptide-C da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
Pancreasectomia.	Insufficienza renale.

Tabella 4.a.4.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni di peptide-C

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • insulina; • orlistat. 	<ul style="list-style-type: none"> • sulfaniluree; • GH ricombinante; • exenatide.

Bibliografia

Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, MacLaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin Chem* 2002, 48: 436-72.

ADA. Standards of medical care in diabetes - 2007. *Diabetes Care* 2007, 30: S4-41.

Jacobs DS, Demott WR, Finley PR, Horvat RT, Kasten BL, Tilzer LL. *Laboratory test Handbook 3rd Ed Houston; Lexicomp* 1994.

Disordini Del Metabolismo Dei Carboidrati. Manuale Merck <http://www.msd-italia.it/altre/manuale/sez02/0130194.html>.

4.b. Ormoni Controregolatori

Generalità sulla controregolazione

Il sistema di controregolazione del glucosio è uno dei più importanti sistemi omeostatici per la sopravvivenza dell'uomo, poiché protegge continuamente il metabolismo e la funzione del cervello, prevenendo o limitando l'ipoglicemia insorta in condizioni fisiologiche (come nel digiuno prolungato) o patologiche (come l'insulinoma), o in corso di terapia ipoglicemizzante in pazienti con diabete mellito.

Gli ormoni controregolatori comprendono glucagone, adrenalina, noradrenalina, cortisolo, GH. La loro funzione è quella di mantenere la concentrazione di glucosio in un intervallo relativamente ristretto.

Il glucosio in circolo deriva da tre sorgenti: assorbimento intestinale, glicogenolisi e gluconeogenesi. A digiuno, il glucosio lascia il circolo ad una velocità costante ed è necessaria una produzione endogena per mantenerne costanti i livelli ematici. Il fegato rappresenta l'unica sede di questa produzione, poiché la gluconeogenesi renale interviene solo in condizioni di digiuno estremo. Infatti, anche se la maggior parte dei tessuti ha la capacità di idrolizzare il glicogeno, solo fegato e rene contengono la glucosio-6-fosfatasi, enzima necessario al rilascio in circolo del glucosio.

Glucagone ed adrenalina sono ormoni ad “**azione rapida**” e sono critici per la risposta controregolatoria nella prima fase dell'ipoglicemia. Un'adeguata risposta controregolatoria richiede l'azione di entrambi: la mancanza di uno di questi due ormoni non è compensata nemmeno da una risposta maggiore degli altri ormoni controregolatori. **GH e cortisolo** sono, invece, ormoni ad “**azione lenta**”, poiché la loro azione controregolatoria si manifesta non prima di due ore dall'insorgenza dell'ipoglicemia.

Glucagone

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.f. a pag. 184)

Il glucagone è un polipeptide di 29 aminoacidi secreto dalle α -cellule del pancreas.

Agisce soprattutto sul fegato, dove si lega a recettori specifici ed aumenta l'AMP ciclico ed il calcio intra-cellulari. Stimola la produzione di glucosio nel fegato attraverso la glicogenolisi e la gluconeogenesi e promuove la chetogenesi. Il glucagone ha un'azione minore sul tessuto adiposo, dove aumenta la lipolisi, mentre non sembra esercitare nessun effetto a livello renale.

La secrezione di glucagone è regolata soprattutto dal glucosio (rispettivamente stimolata ed inibita da concentrazioni basse e alte). Nel paziente affetto da molti anni da malattia diabetica la risposta del glucagone all'ipoglicemia è ridotta, aumentando il rischio di episodi ipoglicemici.

Tabella 4.b.1.
Alterazioni delle concentrazioni plasmatiche di glucagone da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • diabete (di lunga durata); • insulina; • amilina; • Glucagon-Like Peptide (GLP-1). 	<ul style="list-style-type: none"> • stress; • esercizio; • deficit insulina; • noradrenalina.

Tabella 4.b.2.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni plasmatiche di glucagone

Diminuite da	Aumentate da
Somatostatina.	Adrenalina.

Adrenalina e Noradrenalina

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.f. a pag. 184)

L'**adrenalina** è una catecolamina prodotta dalla midollare del surrene, che stimola la produzione di glucosio (attivando la glicogenolisi) e diminuisce il consumo periferico di glucosio, aumentando quindi la glicemia. Il ruolo dell'adrenalina nella controregolazione del glucosio è fondamentale soprattutto nelle condizioni di alterata secrezione di glucagone (come nel DM-T1). Lo stress fisico o psicologico aumenta la liberazione di adrenalina, procurando all'organismo glucosio. Il feocromocitoma determina una moderata iperglicemia, fintanto che nel fegato sono presenti depositi di glicogeno.

La **noradrenalina** è un neuro-trasmittitore del sistema nervoso simpatico post-gangliare, prodotta anche, in una percentuale minore (intorno al 20%), dalla midollare del surrene. La concentrazione della noradrenalina aumenta nell'ipoglicemia, anche se meno di quella dell'adrenalina.

Tabella 4.b.3.
Alterazioni delle concentrazioni plasmatiche e/o urinarie di adrenalina e noradrenalina da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • malattia di Parkinson; • patologie neurovegetative. 	<ul style="list-style-type: none"> • stress; • ipoglicemia; • freddo; • infarto del miocardio; • ictus; • angiografia; • intervento chirurgico; • bronco-pneumopatie ostruttive; • insufficienza renale cronica; • feocromocitoma/paraganglioma.

Tabella 4.b.4.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni plasmatiche e/o urinarie di adrenalina e noradrenalina

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • agonisti α_2-adrenergici; • calcio-antagonisti (somministrazione cronica); • ACE-inibitori. 	<ul style="list-style-type: none"> • stimolanti (caffaina, nicotina, teofillina); • nitroglicerina; • sodio nitroprussiato; • calcio-antagonisti (somministrazione acuta); • α-metil-DOPA; • simpaticomimetici; • cocaina; • antidepressivi triciclici; • α-bloccanti; • β-bloccanti; • vasodilatatori; • levo-DOPA, carbi-DOPA.

Cortisolo

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.f. a pag. 185)

Il cortisolo è prodotto dalle cellule della zona fascicolare del corticosurrene sotto stimolo dell'ACTH. La secrezione di cortisolo è episodica, riflette normalmente quella di ACTH, presenta un ritmo circadiano (che viene alterato nei pazienti con ipercortisolismo) con un picco mattutino. In circolo ha emivita di 80 minuti, è legato a proteine di trasporto (CBG) e solo la frazione libera (circa il 10%) è attiva dal punto di vista fisiologico e viene filtrata dal rene (e misurata come cortisolo libero urinario). L'azione avviene attraverso il legame a recettori nucleari, che attivano o inibiscono specifici geni negli organi bersaglio.

Il cortisolo stimola la gluconeogenesi ed aumenta la degradazione di proteine e grassi. I pazienti con sindrome di Cushing possono diventare iperglicemici, mentre quelli con malattia di Addison possono presentare ipoglicemia.

Tabella 4.b.5.
Alterazioni delle concentrazioni plasmatiche e/o urinarie di cortisolo da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • insufficienza surrenalica, primitiva e secondaria; • acromegalia; • diabete mellito. 	<ul style="list-style-type: none"> • gravidanza (per aumento di CBG); • malnutrizione (inibisce di più il metabolismo che la produzione); • obesità; • ipercortisolismo endogeno; • disfunzione epatica e renale (per ritardato metabolismo di CBG); • depressione (per aumento centrale, con dinamiche simili al Cushing); • deficit di GH.

Tabella 4.b.6.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni plasmatiche di cortisolo

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • androgeni; • ormoni tiroidei; • aminoglutetimide; • mitotane; • rifampicina; • fenobarbital; • carbamazepina; • GH; • insulina. 	<ul style="list-style-type: none"> • alcool; • terapia estrogenica (per aumento di CBG).

Ormone della crescita (GH)

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.f. a pag. 187)

Prodotto in modo pulsatile dalle cellule somatotrope dell'ipofisi, con un ritmo circadiano con picchi notturni (che compaiono un'ora dopo l'insorgenza del sonno), di frequenza e ampiezza diversi nelle diverse età, ma con livelli indosabili tra i picchi.

Ha emivita di circa 20 minuti e circola in diverse isoforme, di cui quella a 22 KD ha la maggiore importanza fisiologica. Si lega ad uno specifico recettore di membrana (parte del quale circola come proteina di legame che ne lega circa il 45%) negli organi bersaglio, dove esercita alcune azioni dirette, ma soprattutto stimola la secrezione di IGF-I. È stimolato dal GHRH ipotalamico e inibito dalla somatostatina e dal *feed-back* negativo dell'IGF-I.

Stimola la gluconeogenesi, aumenta la lipolisi, aumenta i livelli di acidi grassi liberi e di glicero (che partecipano alla risposta controregolatoria, stimolando la gluconeogenesi e sopprimendo l'ossidazione periferica del glucosio ed il suo utilizzo) e antagonizza la captazione di glucosio stimolata dall'insulina.

Il ruolo del GH nella risposta controregolatoria è stato confermato nei soggetti con ipopituitarismo, in cui la ripresa dall'ipoglicemia è ritardata.

Tabella 4.b.7.
Alterazioni delle concentrazioni plasmatiche di GH da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • età avanzata; • obesità; • deficit selettivo e ipopituitarismo. 	<ul style="list-style-type: none"> • esercizio fisico; • sonno; • pubertà; • acromegalia; • ipertiroidismo; • DM-T1; • cirrosi epatica; • disturbi dell'alimentazione (malnutrizione/anorexia nervosa); • insufficienza renale cronica; • depressione; • sepsi.

Tabella 4.b.8.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni plasmatiche di GH

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • glucosio; • acidi grassi; • somatostatina; • β-agonisti; • atropina; • antimuscarinici (pirenzepina); • glucocorticoidi ad alte dosi. 	<ul style="list-style-type: none"> • aminoacidi; • dopamina; • α-agonisti; • clonidina; • glucagone; • β-bloccanti; • teofillina; • anticolinesterasici (piridostigmina); • glucocorticoidi a basse dosi.

IGF-I

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.f. a pag. 188)

Prodotto ubiquitariamente, la quota circolante maggiore è prodotta a livello epatico sotto stimolazione del GH.

Ha livelli costanti con emivita di 8-10 ore, ma risente molto dello stato nutrizionale.

Circola legato a diverse proteine di trasporto (*IGF-binding proteins*): la quota più rilevante circola come complesso ternario con IGF-BP₃ e ALS. Solo la quota libera (pari all'1%) è metabolicamente attiva e capace di legarsi a specifici recettori trans-membrana.

Tabella 4.b.9.
Alterazioni delle concentrazioni di IGF-I da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Aumentate da
<ul style="list-style-type: none"> • età; • deficit selettivo di GH e ipopituitarismo; • disturbi dell'alimentazione (malnutrizione/anorexia nervosa); • DM-T1; • cirrosi epatica; • insufficienza renale cronica; • ipotiroidismo. 	<ul style="list-style-type: none"> • pubertà; • acromegalia; • ipertiroidismo; • obesità.

Tabella 4.b.10.
Modificazioni farmaco-indotte delle concentrazioni plasmatiche di IGF-I

Diminuite da	Aumentate da
Estrogeni (orali ma non transdermici).	GH.

Bibliografia

Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 1998, 19: 717-97.

5. Procedure per la diagnostica immunologica

Valerio Chiarini, Alessandra Sforza

5.a. Anticorpi Anti-Insula

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.g. a pag. 190)

Premessa fisiopatologica

La distruzione della β -cellula pancreatica, mediata dai T-linfociti, è responsabile del diabete mellito di tipo 1a o immuno-mediato (classificazione ADA – 1997) e del diabete autoimmune latente dell'adulto o LADA (attualmente considerato come un diabete di tipo 1) (cfr capitolo 2.a.1. a pag. 25).

Tale distruzione si accompagna alla comparsa di anticorpi anti-insula pancreatica, che rappresentano i marcatori del processo di distruzione autoimmune e si possono identificare nel siero del paziente anni prima dell'esordio clinico della malattia.

I primi autoanticorpi isolati, diretti contro il citoplasma delle cellule insulari (**ICA**), rappresentano a tutt'oggi i *marker* più sensibili e specifici nella diagnosi di DM-T1, ma, a causa della loro difficile determinazione e standardizzazione, si ricorre, nell'uso clinico alla ricerca dei cosiddetti “**Anticorpi biochimici**”, anticorpi antigene-specifici misurabili con tecniche radioimmunologiche (e recentemente anche immuno-enzimatiche in alcuni casi), diretti contro 3 principali antigeni insulari, rappresentati da:

- insulina nativa (anticorpi anti-insulina o IAA);
- decarbossilasi dell'acido glutammico (anticorpi anti-GAD65 o GADA);
- due tirosin-fosfatasi, la IA-2A e la IA-2b (anticorpi IA-2A e IA-2b).

Lo sviluppo dell'autoimmunità insulare è influenzato da **fattori genetici** (gli aplotipi di suscettibilità HLA-DR3-DQ2 e DR4-DQ8, trovati nel 20-30% dei pazienti con DM-T1 e nel 50% dei soggetti diagnosticati precocemente durante l'infanzia), e da **fattori ambientali** soprattutto di tipo dietetico (precoce introduzione nella dieta delle proteine del latte di mucca e del glutine) e virale (virus della rosolia ed enterovirus).

Campi di applicazione del dosaggio degli anticorpi anti-insulari

- Identificazione di soggetti che richiedono un precoce trattamento insulinico (LADA)
- Ausilio nella classificazione del diabete
- Identificazione di soggetti ad aumentato rischio di sviluppare DM-T1
- Studio della storia naturale del diabete
- Valutazione dell'efficacia dei *trial* di intervento

Uso clinico

Diagnosi

La presenza di autoanticorpi anti-insulari indica che la patogenesi dell'iperglicemia è da ricondurre ad un processo autoimmune e che l'opzione terapeutica più appropriata è quella insulinica.

Anticorpi anti-insulari si riscontrano nell'85-90% dei pazienti con DM-T1 all'esordio clinico dell'iperglicemia, e sono presenti nel 5-30% degli adulti (7% nella popolazione italiana)

con diabete mellito esordito fenotipicamente come tipo 2, ma che evolve rapidamente verso l'insulino-dipendenza (LADA).

Tabella 5.a.1.

Alla diagnosi di DM-T1	% positività
IAA	85-90
ICA	75-85
GADA	70-80
IA-2A	40
IA-2b	20

Gli IAA sono positivi in oltre il 90% dei bambini con diabete esordito prima dei 5 anni, ma in meno del 40% dei soggetti che sviluppano diabete dopo i 12 anni.

Circa il 20% dei soggetti diabetici esprime alla diagnosi un solo autoanticorpo positivo.

Nel LADA prevalgono i GAD₆₅A.

Il dosaggio degli autoanticorpi, sebbene non serva alla diagnosi di diabete, **può consentire una precisa classificazione eziologica del diabete e soprattutto l'identificazione precoce di quella sottopopolazione di diabetici tipo 2 affetta da LADA**, nei quali l'uso precoce di insulina può preservare la funzione β -cellulare e garantire l'ottimizzazione metabolica.

I pazienti con DM-T1 hanno un **aumentato rischio di altre patologie autoimmunitarie**, quali malattia celiaca, morbo di Basedow, tiroidite, morbo di Addison, anemia perniziosa, vitiligo, epatiti autoimmuni e *miastenia gravis*. **Nei bambini vanno ricercati e monitorati gli anticorpi anti-transglutaminasi o anti-endomisio** (raccomandazione ADA - *livello di evidenza E*).

Raccomandazione ADA (livello di evidenza E)

☞ Il dosaggio degli anticorpi anti-insulari non è raccomandato nella diagnosi di *routine* del diabete mellito, in quanto la terapia insulinica deve essere instaurata sulla base del controllo glicemico.

Screening

Il rischio di sviluppare diabete nei familiari di 1° grado dei pazienti con DM-T1 è del 5% (15 volte superiore a quello della popolazione generale). La presenza di anticorpi insulari conferisce a questi soggetti un rischio più elevato di sviluppare la malattia, rischio che aumenta con il numero di anticorpi presenti (IAA, GADA e IA-2A/IA-2b), con il loro titolo, la loro affinità e il tipo.

La presenza di due anticorpi ha un valore predittivo positivo del 68% per lo sviluppo di diabete a 5 anni, mentre la presenza di tutti e tre gli anticorpi ha un valore predittivo positivo del 100%.

Più precoce è lo sviluppo di autoanticorpi insulari (entro i primi 2 anni di vita), più frequente è la progressione verso il diabete (circa il 90% *vs.* il 30% dei bambini che sviluppano autoanticorpi a 5 o 8 anni).

Esiste in genere una **cronologia di comparsa** degli autoanticorpi: i primi sierologicamente identificabili sono gli IAA ad alta affinità, seguiti a breve dagli anticorpi anti-GAD e quindi dagli IA-2A e IA-2b.

Nei **figli di madre con DM-T1** la presenza di autoanticorpi può essere transitoria, perché

di origine materna. Pertanto, nel caso dell'identificazione di autoanticorpi insulari nei primi mesi di vita, è importante distinguere se si tratti di autoanticorpi *de novo* del bambino o di autoanticorpi acquisiti dalla madre, ricorrendo alla valutazione delle sottoclassi di immunoglobuline.

Lo *screening* sistematico dei parenti di pazienti con DM-T1 non è raccomandato al di fuori dei protocolli di ricerca:

- per la mancanza di strategie di *screening* con buon rapporto costo/efficacia per i bambini;
- per l'assenza di protocolli terapeutici efficaci nella prevenzione della malattia;
- perché per alcuni dei *marker* anticorpali non sono stati ancora completamente stabiliti i *cut-off* in un contesto clinico;
- perché gli aplotipi HLA protettivi verso lo sviluppo clinico del DM-T1 (DQB1 *0602/*0603/ *0301) non proteggono dalla comparsa di anticorpi anti-insulari.

Raccomandazione ADA (livello di evidenza E)

- ☞ Lo *screening* per anticorpi anti-insulari dei parenti di 1° grado dei pazienti con DM-T1 o della popolazione generale non è, al momento, raccomandato al di fuori dei protocolli di ricerca.
- ☞ La determinazione degli anticorpi anti-insulari è raccomandata per lo *screening* dei familiari non diabetici che desiderano donare una parte del loro pancreas ad un parente con diabete mellito di tipo 1a terminale.

Follow-up e prognosi

In assenza di terapie efficaci nel prolungare la sopravvivenza delle cellule insulari dopo la diagnosi di DM-T1, **il monitoraggio degli autoanticorpi insulari non è clinicamente utile.**

Nei trapianti di cellule insulari o di pancreas, la presenza o meno di autoanticorpi anti-insula può chiarire se il fallimento di un trapianto di insule sia da attribuire a recidiva di malattia autoimmune o a rigetto.

Se il trapianto è stato effettuato da gemello identico o da fratello HLA identico, la comparsa di anticorpi anti-insula può suggerire la possibilità di utilizzare farmaci immuno-soppressori per arrestare la recidiva di diabete.

Raccomandazione ADA (livello di evidenza E)

- ☞ La determinazione degli autoanticorpi anti-insula non ha alcun ruolo nel monitoraggio dei pazienti nella pratica clinica (vengono misurati come *end-point* surrogati nei protocolli di ricerca e in alcuni *trial* clinici)

5.b. Anticorpi anti-GAD (GADA)

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.g. a pag. 191)

La decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD), enzima limitante nella conversione dell'acido glutammico ad acido gamma-amino-butyrico (GABA), espressa in vari tessuti oltre che nell'insula pancreatica, esiste in 2 isoforme. Nella β -cellula pancreatica è espresso solo GAD₆₅, che, dopo modificazione lipidica, viene ancorato alla superficie citolitica delle micro-vescicole sinapto-simili che immagazzinano e secernono GABA.

Gli anti-GAD sono più frequenti in soggetti HLA DR3-DQ2.

Nei figli di madre con DM-T1, i GADA possono avere origine materna e persistere per oltre 18 mesi dalla nascita.

La presenza alla nascita di GADA materni (come quella di anti-IA-2, *vedi oltre*) **riduce il rischio di sviluppare diabete**, in accordo con la minor prevalenza di DM-T1 nei figli di madre con DM-T1, rispetto ai figli di padre con DM-T1 e madre non diabetica.

Significato clinico

- Sono presenti nel 70-80% dei soggetti con DM-T1 all'esordio clinico.
- Sono meno frequenti nei bambini che sviluppano DM-T1 prima dell'età di 10 anni.
- Rappresentano i *marker* più sensibili per la diagnosi di LADA, talora gli unici autoanticorpi identificabili.
- Prevalgono (a titolo più elevato) nei diabetici con altre patologie autoimmunitarie associate (es. tiroidite).
- Sono il *marker* più sensibile per definire una positività multipla ad anticorpi anti-insulari.

5.c. Anticorpi anti-insulina (IAA)

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.g. a pag. 192)

Gli anticorpi anti-insulina sono diretti contro la molecola matura.

Poiché nel tessuto pancreatico non fissato, utilizzato nei test di immuno-fluorescenza, l'insulina va incontro a degradazione, gli IAA non contribuiscono alla positività per ICA.

Sono in genere i primi autoanticorpi insulari a comparire nel bambino, ma sono anche quelli meno persistenti.

Nel DM-T1 durante la gravidanza possono essere trasferiti dalla madre al feto, persistendo nel plasma del bambino per oltre 1 anno dalla nascita. **La presenza di IAA materni non influenza il rischio di sviluppare diabete del bambino.**

Gli IAA si riscontrano preferenzialmente in soggetti HLA DR4-DQ8.

Presentano una correlazione inversa sia con l'età che con la durata della fase pre-clinica: più elevati sono i livelli di IAA, più rapida sembra essere la progressione verso la malattia.

La loro diversa affinità condiziona il rischio di sviluppare diabete: i soggetti con IAA ad alta affinità (di classe IgG₂, IgG₃ e/o IgG₄, con Kd > 10⁹ l/mol, che legano facilmente pro-insulina) hanno un rischio del 50% di sviluppare diabete entro 6 anni, mentre quelli con IAA a bassa affinità (IgM, che non legano pro-insulina) raramente progrediscono verso il diabete.

Significato clinico

- Sono più caratteristici del diabete infantile, con la maggiore sensibilità diagnostica (50-60%) al di sotto dell'età di 10 anni.
- Nei soggetti di età > 10 anni la sensibilità diagnostica è < 10%.
- Non hanno utilità clinica nella diagnosi di LADA (presenti in meno dell'1% dei soggetti).

5.d. Anticorpi anti IA-2

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.g. a pag. 192)

La IA-2 è un frammento di 40 Kda, rappresentato dagli aminoacidi 653-979 della proteina 2 associata all'insulinoma, che è un membro della famiglia delle tirosin-fosfatasi (è l'antigene β -insulare precedentemente definito come ICA512). È localizzata sulla membrana dei granuli secretori insulinici.

Un'isoforma della IA-2 è la fognina, o proteina 2b (IA-2b), frammento di 37 KDa, che condivide un'omologia del 74% con la IA-2.

Gli anticorpi sono diretti esclusivamente contro la porzione citoplasmatica della IA-2 (Ab-IA-2) e della sua isoforma (IA-2b).

Gli IA-2A si riscontrano preferenzialmente in soggetti HLA DR4-DQ8.

Nei figli di madre con DM-T1 la presenza alla nascita di IA-2A materni (come quella di Ab anti-GAD) riduce il rischio di sviluppare diabete.

Significato clinico

- Sono presenti nel 32-75% dei soggetti con DM-T1 all'esordio clinico (gli IA-2b nel 20%).
- La loro frequenza si riduce all'aumentare dell'età di esordio del DM-T1.
- Hanno scarso valore per la diagnosi di LADA, in quanto la loro presenza è quasi sempre associata a quella dei GADA.
- Sono altamente predittivi di futura comparsa della malattia in parenti di 1° grado di soggetti con DM-T1.

5.e. Altri autoanticorpi

(per informazioni sul dosaggio, cfr capitolo 15.g. a pag. 192)

ICA (Islet cell antibodies)

Gli ICA, o anticorpi citoplasmatici contro la cellula insulare pancreatica, sono stati i primi autoanticorpi identificati nel 1974 nei pazienti con DM-T1 e standardizzati nel 1985. Misurano il grado di legame delle immuno-globuline alle insule. Possono rappresentare sia i GADA che gli IA-2A (ma non gli IAA).

Significato clinico

- Sono presenti in oltre il 90% dei pazienti con DM-T1 all'esordio clinico.
- Il 50% dei parenti di 1° grado di pazienti con DM-T1 in cui vengono identificati gli ICA, sviluppa diabete entro 9 anni (il loro valore predittivo aumenta al 63% se coesiste una positività per IAA).
- Rappresentano a tutt'oggi il singolo test con la maggior sensibilità diagnostica.

Combinazione di più test anticorpali (GADA, IA-2A e IAA)

L'uso di varie combinazioni di test per autoanticorpi insulari fornisce un'eccellente discriminazione fra sieri di diabetici e sieri di controllo (sensibilità 80%, specificità 100%). Nella predizione dell'insorgenza di DM-T1 in soggetti a rischio è stato proposto un pannello di *screening* anticorpale, che prevede il dosaggio di GADA e IA-2A nello *screening* iniziale (aggiungendo il dosaggio di IAA nei soggetti più giovani); qualora un solo *marker* risulti positivo, dovrebbero essere determinati gli ICA.

Bibliografia

- Genovese S et al. *Clinical phenotype and beta-cell autoimmunity in Italian patients with adult onset diabetes. Eur J Endocrinol* 2006, 154: 441-7.
- Verge CF et al. *Third Combinatorial Islet autoantibody workshop. Diabetes* 1998, 47: 1857-66.
- Pihoker C et al. *Autoantibodies in diabetes. Diabetes* 2005, 54 Suppl 2: S52-S61.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS. *Type 1 diabetes: new perspective on disease pathogenesis and treatment. Lancet* 2001, 358: 221-9.
- ADA. *Clinical Practical Recommendation. Diabetes Care* 2007, 30 Suppl 1.

6. Test dinamici di tolleranza al glucosio

Valerio Chiarini, Alessandra Sforza

I test dinamici di tolleranza al glucosio valutano la capacità di metabolizzare il glucosio, che dipende sia dalla secrezione insulinica che dalla sensibilità tissutale all'azione dell'insulina, misurando la velocità e l'entità dell'eliminazione di un carico glucidico somministrato per via orale o endovenosa.

Poiché la sola alterazione evidenziabile nella fase pre-clinica del diabete (prima della comparsa dell'iperglicemia a digiuno) e nelle condizioni pre-diabetiche è la diminuita capacità di utilizzare normalmente un carico glucidico, questi test hanno un significato diagnostico e di *screening*.

6.a. OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) classico

Definizione

Il test di tolleranza al carico orale di glucosio è il metodo più utilizzato in clinica, per classificare le diverse condizioni di tolleranza glucidica.

Poiché le risposte glicemiche e insulinemiche al carico orale di glucosio riflettono sia la capacità della β -cellula di secernere insulina, che la sensibilità tissutale all'insulina, l'OGTT può essere utilizzato soprattutto negli studi epidemiologici, anche nella valutazione della funzione β -cellulare e della resistenza insulinica.

Razionale

Dopo ingestione di glucosio, l'aumento della glicemia plasmatica stimola la secrezione di insulina. La combinazione di iperglicemia e iperinsulinemia sopprime la produzione epatica di glucosio e stimola la captazione di glucosio da parte dei tessuti splancnici e periferici (soprattutto muscolo), al fine di utilizzare il glucosio ingerito e di ripristinare la normoglicemia.

La **via di ingresso del glucosio** nell'organismo è importante nel mantenimento della normale tolleranza glucidica e nella distribuzione tissutale del glucosio somministrato.

- Somministrazione **orale**: captazione epatica di glucosio pari a circa il 30-40% del glucosio ingerito, eliminazione nei tessuti periferici (muscolo) pari a circa il 60-70% del glucosio ingerito; maggior incremento della secrezione di insulina;
- somministrazione **endovenosa**: captazione epatica di glucosio pari al 10-15% del glucosio infuso; minor incremento della secrezione di insulina.

La maggiore secrezione di insulina indotta dalla somministrazione orale di glucosio rispetto alla via endovenosa è dovuta al cosiddetto "**effetto incretinico**", ovvero alla liberazione da parte delle cellule entero-endocrine intestinali del *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) e del peptide insulinotropo glucosio-dipendente (GIP), ormoni stimolatori la secrezione di insulina.

Nel soggetto con DM-T2, la risposta del GLP-1 al carico orale di glucosio è ridotta: questo diminuisce la risposta insulinica al glucosio somministrato per via orale, ma non quella al carico ev.

La capacità di metabolizzare il carico di glucosio è influenzata da vari **fattori che vanno considerati** al momento dell'effettuazione del test: età, dieta, grado di attività fisica, farmaci, malattie intercorrenti.

Tabella 6.a.
OGTT classico

<p>Scopo e meccanismo d'azione</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Valutazione della tolleranza glucidica dopo un carico orale di glucosio che dipende dalla: <ul style="list-style-type: none"> -secrezione insulinica; -sensibilità tissutale periferica all'azione dell'insulina.
---	--

Indicazioni	Diagnosi e <i>screening</i> di DM e IGT.
Controindicazioni	Nell'uso clinico: <ul style="list-style-type: none"> • glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dL; • glicemia occasionale ≥ 200 mg/dL.
Precauzioni	Non assumere farmaci interferenti con metabolismo glucidico (steroidi, ecc.) nelle 3-4 settimane antecedenti il test. Escludere malattie acute intercorrenti in atto (infezioni, malattie virali, IMA, ictus, ecc.).
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Adulto: 75 g di glucosio. Bambino: 1.75 g di glucosio pro kg di peso corporeo (fino ad un massimo di 75 g). Gravida: 100 g di glucosio secondo IV <i>International Conference</i> 1998, ADA 2004, SID 2000, o 75 g secondo WHO (<i>cfr OGTT in gravidanza a pag. 89</i>).
Condizioni preliminari	Eseguire al mattino, dopo 3 giorni di dieta non ristretta (> 150 g/die di glucidi) a digiuno da 8-14 ore. Il paziente deve rimanere seduto durante il test, non ingerire caffè o fumare né prima né durante il test. È preferibile effettuare il test su paziente non allattato, in quanto l'inattività fisica diminuisce la tolleranza glucidica.
Esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. si effettua prelievo basale (0); 2. si somministra glucosio per os in 5-10 minuti; 3. si effettuano prelievi ematici (riducendo al massimo la stasi) dopo 30, 60, 90, 120 min dall'ingestione del primo sorso di glucosio (anche 150, 180, 210 e 240 min nel caso di sospetto di ipoglicemia reattiva).
Possibili effetti collaterali	Nausea e vomito.
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.h. a pag. 160.</i>
Valutazione dei risultati	Il glucosio viene misurato su plasma o siero con metodi enzimatici glucosio-specifici. Negli studi clinici e nella valutazione delle condizioni di ipoglicemia viene dosata anche l'insulina plasmatica. Soggetto con normale tolleranza <ul style="list-style-type: none"> • glicemia 0: < 110 mg/dL (WHO); < 100 mg/dL (ADA); • glicemia dopo 120 min: < 140 mg/dL.
Interpretazione	IGT: dopo 120 min glicemia $140 \div 199$ mg/dL. Diabete mellito: dopo 120 min glicemia ≥ 200 mg/dL.
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Più sensibile e specifica ma meno riproducibile, rispetto a glicemia a digiuno nella diagnosi di DM. Riproducibilità (50-66%) condizionata da: <ul style="list-style-type: none"> • variabilità biologica della glicemia; • effetti di una soluzione iperosmolare sullo svuotamento gastrico; • effetti della temperatura ambientale.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Non è raccomandato dall'ADA nella diagnosi <i>routinaria</i> di DM, mentre è raccomandato dalla WHO. È raccomandato da ADA per identificare IGT o DM nei soggetti con IFG o con glicemia a digiuno normale, ma fattori di rischio per DM. È raccomandato da ADA nella valutazione <i>post-partum</i> (6 settimane dopo) delle donne con diabete gestazionale (da ripetere ogni 3 anni se negativo) (evidenza E).

Interpretazione

La tabella 6a.1 riporta i criteri interpretativi dell'OGTT secondo il WHO (revisione 2006). Tali criteri sono condivisi dall'ADA, ad eccezione dei valori di glicemia basale per la diagnosi di IFG, ridotti a < 100 mg/dL dal 2005.

Tabella 6.a.1.
Interpretazione OGTT secondo WHO (2006)

	Glicemia a digiuno	Glicemia a 120' di OGTT
IFG	110 ÷ 125 mg/dL	< 140 mg/dL
IGT	< 126 mg/dL	140 ÷ 199 mg/dL
Diabete mellito	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL

Attraverso formule matematiche, i livelli glicemici e insulinemici misurati durante OGTT (espressi rispettivamente in pmol/L e mmol/L) possono essere utilizzati per ricavare **indici di secrezione β -cellulare** (indice insulinogenico della 1° fase di secrezione di Selzter e indici della 1° e 2° fase di secrezione insulinica di Stumvoll, *cfr capitolo 9.b. a pag. 120*), e **indici di sensibilità insulinica**, in particolare l'indice composito di sensibilità insulinica di Matsuda (*cfr capitolo 7.f. a pag. 109*).

Uso clinico

Uso nello *screening* (raccomandazioni ADA – 2006)

- Lo *screening* finalizzato alla ricerca del pre-diabete (IFG o IGT) e del DM-T2 deve essere preso in considerazione:
 - per i soggetti con età ≥ 45 anni, in particolare in presenza di BMI ≥ 25 kg/m²;
 - nei soggetti con età < 45 anni in sovrappeso, qualora sia presente un altro fattore di rischio per il diabete (*cfr tabella 6.a.2.*);
 - in caso di negatività, il test deve essere ripetuto ogni 3 anni (**evidenza E**).
- Per lo *screening*, sono da considerarsi adeguati sia la glicemia plasmatica a digiuno, sia il prelievo a 2 ore dopo OGTT (75 g) (**evidenza B**). I due test identificano popolazioni ad elevato rischio di sviluppare diabete (se IFG) e malattie cardiovascolari (se IGT), con diversi meccanismi patogenetici.

Tabella 6.a.2.
Fattori di rischio per DM nell'adulto

- Sedentarietà
- Familiarità di 1° grado per DM
- Appartenenza ad etnie ad alto rischio
- Pregresso diabete gestazionale
- Pregresso parto di bambino macrosomico
- Presenza di ipertensione arteriosa (> 140/90 mm Hg)
- Presenza di ipocolesterolemia HDL (< 35 mg/dL) e/o ipertrigliceridemia (> 250 mg/dL)
- Presenza di ovaio policistico
- Presenza di IFG o IGT in precedenti valutazioni
- Presenza di condizioni associate ad insulino-resistenza (*achantosis nigricans*)
- Anamnesi positiva per patologie vascolari

Uso diagnostico

Anche se, rispetto alla glicemia plasmatica a digiuno (FPG), il carico orale di 75 g di glucosio (OGTT) è una modalità più sensibile e lievemente più specifica per la diagnosi di diabete, è poco riproducibile e meno utilizzato nella pratica clinica.

- **L'ADA non raccomanda l'OGTT per la diagnosi di diabete** nell'uso clinico *routinario*, indicando la glicemia a digiuno come esame diagnostico di prima scelta per la diagnosi di diabete nei bambini e negli adulti non in gravidanza (**raccomandazione ADA - evidenza E**).
- Al contrario, la **WHO** continua a **raccomandare l'OGTT nella diagnostica del diabete**, per due motivi:
 - poiché identifica circa il 30% in più di soggetti con diabete rispetto alla FPG, secondo i dati degli studi DECODE e NHANES III;
 - perché i diabetici diagnosticati sulla base dell'OGTT hanno una prognosi peggiore in termini di mortalità e di retinopatia rispetto a quelli diagnosticati sulla base della FPG.
- **L'OGTT è raccomandato nella valutazione** dei pazienti con **alterata glicemia a digiuno (IFG) o nei soggetti** con glicemia a digiuno normale (< 100 mg/dL) **con fattori di rischio**, per identificare un'intolleranza glucidica (IGT) (**raccomandazione sia ADA che WHO - evidenza E**).
- **L'OGTT è raccomandato nella valutazione post-partum delle donne con diabete gestazionale** e, se negativo, va ripetuto ogni 3 anni.

Bibliografia

- WHO. *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia - Report of a WHO/IDF Consultation*. 2006 <http://www.who.int/diabetes/publications/en/>
- American Diabetes Association. *Standard of medical care in diabetes*. *Diabetes Care* 2006, 29: Suppl 1.
- Matsuda M, De Fronzo RA. *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. Comparison with the euglycemic insulin clamp*. *Diabetes Care* 1999, 22: 1462-70.
- Stumvoll M, et al. *Use of the Oral Glucose Tolerance Test to Assess Insulin Release and Insulin Sensitivity*. *Diabetes Care* 2000, 23: 295-301.
- Abdul-Ghani MA et al. *Contribution of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose*. *Diabetes Care* 2006, 29: 1130-9.

6.b. OGTT in gravidanza

Il carico orale di glucosio viene utilizzato in gravidanza per la diagnosi di diabete gestazionale (GDM, *cfr capitolo 2.a.3. a pag. 31*), condizione di intolleranza glucidica che insorge o viene diagnosticata per la prima volta in gravidanza e si associa ad esiti sfavorevoli materno-fetali, in primo luogo allo sviluppo di macrosomia fetale.

Lo *screening* per GDM viene effettuato in assenza di valori glicemici già diagnostici per diabete mellito (a digiuno ≥ 126 mg/dL, o occasionali > 200 mg/dL), in base ai fattori di rischio individuati alla prima visita pre-natale (*cfr tabella 6.b.1.*)

Tabella 6.b.1.
Classi di rischio individuate alla prima visita pre-natale

Basso rischio (tutti i fattori devono essere presenti)	Medio rischio	Alto rischio (è sufficiente un solo fattore positivo)
<ul style="list-style-type: none"> età < 25 anni; normopeso (BMI < 25 Kg/m²); non familiarità di 1° grado per DM; non precedente storia di alterato metabolismo glucidico; assenza di esiti ostetrici sfavorevoli; etnia a bassa prevalenza di DM. 	Non comprese nel basso o nell'alto rischio.	<ul style="list-style-type: none"> obesità (BMI > 30 Kg/m²); familiarità di 1° grado per DM; precedente storia di alterato metabolismo glucidico; precedente figlio macrosomico; glicosuria in 2 o più occasioni; etnia ad alta prevalenza di DM.

Il rapporto costo/beneficio non raccomanda al momento uno *screening* universale del diabete gestazionale nelle donne a basso rischio, mentre lo *screening* va effettuato il più presto possibile (ed eventualmente ripetuto) nelle donne ad alto rischio.

Tabella 6.b.2.

Rischio	Screening
Basso	No.
Medio	fra la 24° e la 28° settimana di gestazione.
Alto	<ul style="list-style-type: none"> prima possibile, meglio alla prima visita pre-natale o al max alla 16° settimana di gestazione; se negativo, ritestare alla 24°-28° settimana.

Metodologia dello screening

Lo *screening*, può essere effettuato con due diversi approcci.

- **Approccio con test singolo (one step):** esecuzione diretta dell'OGTT con 100 g di glu-

cosio, senza precedente *screening* con mini-carico di glucosio (*Challenge-test*). Può risultare indicata, per rapporto costo-beneficio, in pazienti ad alto rischio o in gruppi etnici ad alta prevalenza di DM.

- **Approccio con due test (*two-step*):**
 1. esecuzione del mini-carico orale di glucosio (GCT);
 2. esecuzione dell'OGTT (con 100 g di glucosio) se la glicemia a 1 ora dal GCT è > 140 mg/dL.

Tabella 6.b.3.
GCT (Glucose challenge test)

Scopo e meccanismo d'azione	Valutazione, attraverso un carico orale di glucosio, della tolleranza glucidica in gravidanza, condizione di insulino-resistenza che aumenta con il progredire dell'epoca gestazionale.
Indicazioni	<i>Screening</i> di GDM.
Controindicazioni	Diabete pre-gravidico (Tipo 1 e Tipo 2). Glicemia a digiuno \geq 126 mg/dL. Glicemia occasionale \geq 200 mg/dL.
Precauzioni	Nessuna.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Gravide ad alto rischio: prima possibile, meglio alla prima visita pre-natale o al max alla 16° settimana di gestazione. Gravide a medio rischio: fra la 24° e la 28° settimana.
Condizioni preliminari	Può essere eseguito in qualsiasi momento della giornata. Non occorre il digiuno (anche se ne aumenta la sensibilità). Paziente seduta su poltrona reclinabile o sdraiata su letto.
Esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. si effettua prelievo basale (0) e quindi si somministra glucosio 50 g per os in 5-10 minuti; 2. si effettua un prelievo ematico dopo 60 min dall'ingestione del primo sorso di glucosio.
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.b. a pag. 160.</i>
Possibili effetti collaterali	Nausea e vomito.
Valutazione dei risultati	Sospetto GDM = glicemia dopo 60 min > 140 mg/dL. GDM = glicemia dopo 60 min > 198 mg/dL.
Interpretazione	Se sospetto GDM confermare con OGTT.
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Glicemia dopo 60 min > 140 mg/dL = sensibilità 80%. Glicemia dopo 60 min > 130 mg/dL = sensibilità 90%.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	L'approccio a due <i>step</i> con GCT come test di <i>screening</i> è efficace nelle donne a medio rischio. L' OGTT conferma la diagnosi di GDM in circa il 20% delle donne con GCT positivo.

**Tabella 6.b.4.
OGTT**

Scopo e meccanismo d'azione	Valutazione attraverso un carico orale di glucosio, della tolleranza glucidica in gravidanza, condizione di insulino-resistenza che aumenta con il progredire dell'epoca gestazionale.
Indicazioni	Diagnosi di Diabete Gestazionale (GDM).
Controindicazioni	Diabete pre-gravidico (Tipo 1 e Tipo 2). Glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dL. Glicemia occasionale ≥ 200 mg/dL.
Precauzioni	Nessuna.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Gravide ad alto rischio: prima possibile, meglio alla prima visita pre-natale o al max alla 16° settimana di gestazione; se negativo, ripetere alla 24°-28° settimana. Gravide a medio rischio: fra la 24° e la 28° settimana; se negativo, ripetere eventualmente fra la 32° e la 34° settimana.
Condizioni preliminari	Eseguire al mattino, dopo 3 giorni di dieta non ristretta (> 150 g/die di glucidi) a digiuno da 8-14 ore. Paziente seduta su poltrona reclinabile o sdraiata su letto.
Esecuzione	1. si effettua prelievo basale (0) e quindi si somministra glucosio per os in 5-10 minuti (100 g secondo IV <i>International Conference</i> 1998, ADA 2004, SID 2000, o 75 g secondo WHO). 2. si effettuano prelievi ematici dopo 60, 120 e 180 min. dall'ingestione del primo sorso di glucosio.
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.h. a pag. 160.</i>
Possibili effetti collaterali	Nausea e vomito.
Valutazione dei risultati	Cut-off glicemici per GDM <ul style="list-style-type: none"> • 0 = 95 mg/dL; • 60 min = 180 mg/dL; • 120 min = 155 mg/dL; • 180 min = 140 mg/dL.
Interpretazione	GDM = necessari due valori patologici. OAV (o intolleranza glucidica in gravidanza) = sufficiente un valore patologico.
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Riproducibilità 50-66%.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Non è raccomandato lo <i>screening</i> universale delle donne in gravidanza, ma il GDM va ricercato alla prima visita pre-natale, utilizzando l'analisi dei fattori di rischio, e confermato con OGTT nelle donne ad alto e medio rischio.

Secondo la IV *International Conference* del '98, le raccomandazioni ADA del 2004 e le linee guida della SID del 2000, nella diagnosi di diabete gestazionale (GDM) **il test di riferimento è l'OGTT con 100 g di glucosio** proposto da Carpenter nel 1982.

Dal 2004 l'ADA ha introdotto la possibilità di utilizzare anche l'OGTT con 75 g di glucosio, pur sottolineando che per quanto riguarda il rischio materno-fetale tale test non è ancora validato come il carico con 100 g di glucosio.

Secondo la WHO, la diagnosi di GDM si basa sull'OGTT con 75 g di glucosio, utilizzando solo i valori a 0 e 120 min dal carico (*cfr tabella 6.b.5.*).

È attualmente in corso uno studio multicentrico internazionale, i cui risultati sono previsti per la fine del 2007 (HAPO-study), su circa 22.000 gravidanze testate con un OGTT con 75 g di glucosio, che ha come obiettivo, fra gli altri, quello di validare tale test nella diagnosi di GDM e di verificare i *cut-off* diagnostici con 75 g.

Tabella 6.b.5.
Criteri diagnostici di GDM con OGTT (valori glicemici in mg/dL)

Carico orale di glucosio	100 g IV Int. Workshop 1998, ADA 2004, SID 2000, Carpenter 1982	75 g	
		ADA 2004	WHO
0	95	95	≥ 126
60 min	180	180	-
120 min	155	155	≥ 140
180 min	140	-	-

Interpretazione (cfr tabella 6.b.5.)

Secondo la IV *International Conference* del '98, le raccomandazioni ADA del 2004 e le linee guida della SID del 2000, il GDM viene diagnosticato **in presenza di 2 valori patologici all'OGTT** con 100 g.

La presenza di un solo valore patologico porta alla diagnosi di **OAV** (*one abnormal value*) o **intolleranza glucidica in gravidanza**, che attualmente viene considerata come una condizione di aumentato rischio di complicanze materno-fetali.

Secondo le **raccomandazioni ADA del 2004**, utilizzando il carico orale di glucosio da 75 g, si devono impiegare gli stessi *cut-off* dell'OGTT con 100 g e per fare diagnosi di GDM occorrono sempre 2 valori patologici.

Secondo i **criteri WHO**, per fare diagnosi di GDM è sufficiente un solo valore glicemico patologico. Uno studio che ha confrontato i criteri ADA e quelli WHO in 5000 donne gravide sottoposte a carico orale di glucosio da 75 g, ha evidenziato che utilizzando i criteri WHO la prevalenza del GDM aumenta da 2.4% a 7.2%.

Raccomandazioni ADA 2006 per la diagnosi di GDM

- ☞ Il diabete in gravidanza va ricercato alla prima visita pre-natale, utilizzando l'analisi dei fattori di rischio e, se indicato, effettuando l'OGTT (evidenza C).
- ☞ Le donne con diabete gestazionale devono essere sottoposte allo *screening* per il diabete 6 settimane dopo il parto e devono essere seguite nel tempo con successivi *screening* per pre-diabete e diabete (evidenza E).

Bibliografia

- Proceedings of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1998, 21 Suppl 2.*
- American Diabetes Association. Standard of medical care in diabetes. Diabetes Care 2006, 29 Suppl 1.*
- SID, Gruppo di studio Diabete e Gravidanza (Coordinatrice: A LaPolla). Diabete gestazionale: aspetti critici dello screening e della diagnosi. Il Diabete 2000.*

6.c. IVGTT (classico e FSIVGTT)

Con questi test si valuta la risposta insulinemica (quindi la riserva β -cellulare) e l'utilizzazione del glucosio dopo la somministrazione di un carico di glucosio per via endovenosa.

Le concentrazioni di glucosio, dopo carico ev, sono funzione:

- della secrezione insulinica;
- della sensibilità tissutale epatica e periferica (muscolare) all'azione dell'insulina;
- della capacità del glucosio stesso di influenzare la propria scomparsa dal plasma (effetto massa del glucosio).

Secrezione insulinica

Dopo carico endovenoso di glucosio l'insulina è liberata in modo bifasico.

- La **prima fase acuta** di risposta insulinica (*First Phase Insulin Response*, FPIR) inizia entro 1 minuto dal bolo ev di glucosio, raggiunge il picco fra 3 e 5 minuti e dura fino a 10 minuti. In vivo questa fase è indipendente dal livello di glicemia pre-stimolo. La FPIR viene calcolata dalla somma dei valori di insulina a + 1 e + 3 minuti (o dalla somma di tutti i valori dell'insulinemia fino a +10 min, o dall'area integrata sottesa alla curva insulinemica fra 0 e +10 min);
- la **seconda fase** diventa evidente solo 10 minuti più tardi, aumenta lentamente e dura finché persiste l'iperglicemia.

La perdita della FPIR è un *marker* precoce e sensibile di alterazione della secrezione insulinica, che si osserva in soggetti pre-diabetici (sia di tipo 1 che di tipo 2) e anche nella fase conclamata dei soggetti con DM-T2.

Se la FPIR è compromessa, il rischio di sviluppare DM-T1 è di circa il 100% nei successivi 5 anni (linee guida ISPAD – 2000). Il valore predittivo del test è alto, soprattutto nei soggetti di età fra 8 e 20 anni e in presenza di uno o più autoanticorpi insulari (*cfr capitolo 5 pag. 73*). In questi soggetti il test rappresenta uno strumento ottimale per predire il rischio di sviluppare DM-T1.

Le alterazioni della secrezione insulinica osservate con l'IVGTT precedono quelle riscontrate con l'OGTT.

Curva di scomparsa del glucosio dal circolo

La somministrazione di glucosio in bolo ev determina un picco rapido di glicemia, fra i 2 e i 4 minuti, seguito da una discesa della glicemia più lenta, quasi esponenziale. La velocità di caduta del glucosio nei primi 10 minuti dipende dal mescolamento e dalla distribuzione del glucosio. Il logaritmo naturale della velocità di caduta fra i 10 e i 30 minuti può essere usato per calcolare la **costante di scomparsa del glucosio** (K_G di Conrad), che è correlata alla captazione tissutale del glucosio ed è un indice di tolleranza glucidica.

La **velocità di scomparsa del glucosio** è logaritmica e risponde all'equazione:

$$G_t = G_0 e^{-kt}$$

dove G_t è la concentrazione di glucosio al tempo t , G_0 è la concentrazione di glucosio al tempo 0 e K è la costante di Conrad, cioè la velocità di riduzione della concentrazione di glucosio in percentuale/minuto (ovvero la pendenza della curva di scomparsa del glucosio).

La K_G di Conrad si ottiene dalla formula:

$$K_G = \frac{0.693}{t_{1/2}} * 100$$

dove $t_{1/2}$ è il tempo (in minuti) necessario affinché la concentrazione di glucosio si dimezzi. La K_G è influenzata dai tempi e dall'entità della risposta insulinica, dalla sensibilità tissutale all'insulina e dall'effetto massa del glucosio.

Nella pratica clinica questi test **non sono utilizzati a scopo diagnostico di routine**, ma vengono riservati:

- allo *screening* del DM-T1 (familiari di 1° grado e soggetti a rischio), per valutare la funzione β -cellulare e il rischio di sviluppare DM-T1;
- ai protocolli di ricerca;
- ai soggetti con disturbi gastrointestinali che interferiscono con l'assorbimento di glucosio per via orale;
- alla valutazione della sensibilità tissutale all'insulina.

Vantaggi del test di tolleranza al carico ev di glucosio rispetto all'OGTT:

- evita la variabilità legata all'assorbimento gastrointestinale di glucosio;
- permette una valutazione della tolleranza mediante un singolo valore (K);
- evita la nausea;
- non stimola la secrezione delle incretine (ormoni insulino-mimetici) intestinali.

Tabella 6.c.1.
IVGTT classico

Scopo e meccanismo d'azione	Valutazione della tolleranza glucidica dopo una carico ev di glucosio che dipende da: <ul style="list-style-type: none"> • secrezione insulinica; • sensibilità tissutale periferica all'azione dell'insulina.
Indicazioni	<i>Screening</i> del DM-T1 nei familiari di 1° grado e soggetti a rischio per DM-T1. Protocolli di ricerca.
Controindicazioni	Glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dL. Glicemia occasionale ≥ 200 mg/dL.
Precauzioni	Non assumere farmaci interferenti con il metabolismo glucidico (steroidi, ecc.) nelle 3-4 settimane antecedenti il test. Escludere malattie acute intercorrenti in atto (infezioni, malattie virali, IMA, ictus, ecc.).
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	0.5 g/kg di peso, fino ad un massimo di 35 g (protocollo usato nell' <i>Islet Cell Antibody Register of User Study</i> – ICARUS).
Esecuzione	1. Si effettuano 3 prelievi basali (-10, -4 e 0 min); 2. si somministra glucosio 50% ev in 3 minuti; 3. si effettuano prelievi ematici dopo 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min.
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.f. a pag. 156.</i>
Possibili effetti collaterali	No.

Valutazione dei risultati	<p>FPiR (prima fase secrezione insulinica) = somma dei valori di insulina a + 1 e + 3 minuti dal carico (o somma di tutti i valori dell'insulinemia fino a +10 min, o area integrata sottesa alla curva insulinemica fra 0 e +10 min).</p> <p>Tolleranza glucidica (velocità di scomparsa del glucosio) = K_G di Conrad ($K = (0.693 / t_{1/2}) * 100$), dove $t_{1/2}$ è il tempo (in minuti) necessario affinché la concentrazione di glucosio si dimezzi</p>
Interpretazione	<p>FPiR Patologica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • < 100 mU/L nei soggetti > 8 anni; • < 60 mU/L nei soggetti < 8 anni e nei genitori di probandi con DM-T1. <p>K Conrad</p> <ul style="list-style-type: none"> • > 1.7% della dose iniettata = secrezione e sensibilità normali; • 1-1.7% = secrezione o sensibilità alterati; • < 1% = diagnosi di diabete (secrezione insulinica ridotta).
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	<p>Nello <i>screening</i> del DM-T1, il valore predittivo del test è alto, soprattutto nei soggetti di età fra 8 e 20 anni e in presenza di uno o più autoanticorpi insulari (<i>cf. capitolo 5 a pag. 73</i>).</p> <p>Se la FPiR è compromessa, il rischio di sviluppare diabete di tipo 1 è di circa il 100% nei successivi 5 anni (linee guida ISPAV – 2000).</p>
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	<p>Non indicato per l'uso diagnostico di <i>routine</i>. Permette una valutazione della tolleranza glucidica mediante un singolo valore (K).</p>

FSIVGTT (test al carico ev di glucosio con prelievi frequenti)

Premesse e fisiopatologia

L'FSIVGTT fu sviluppato nel 1979 da Bergman per ovviare ai principali limiti dell'IVGTT classico, ovvero l'impossibilità di separare la cinetica del glucosio da quella dell'insulina e lo scarso numero dei prelievi che impedisce una analisi dettagliata. Esso quindi differisce dall'IVGTT tradizionale per il maggior numero di prelievi (30 nel test originale), la maggior durata (180 min) e il fatto di essere basato sul "modello minimo" della cinetica del glucosio e dell'insulina, che rappresenta una descrizione matematica di una realtà fisiologica.

Analizzando attraverso il modello minimo le risposte insulinemica e glicemica ad un bolo ev di glucosio, si ottengono accurate informazioni:

- sulla prima e seconda fase di secrezione insulinica;
- sulla *clearance* dell'insulina;
- sulla sensibilità tissutale all'insulina (S_I), ovvero la scomparsa frazionata del glucosio per unità di concentrazione insulinica nel tempo (espressa in $\text{min}^{-1}/\text{mU/L}$);
- sulla captazione periferica insulino-indipendente del glucosio (glucosio-efficacia, S_G = capacità del glucosio di promuovere la propria scomparsa).

Dopo la somministrazione ev, il glucosio subisce un mescolamento nel circolo (nei primi 7-10 minuti), stimola la secrezione di insulina e inibisce la produzione epatica di glucosio. Successivamente (fino a 20 minuti dopo la sua somministrazione), l'eliminazione del glucosio dal circolo è quasi interamente legata al glucosio stesso (glucosio-efficacia). Infine, l'ulteriore eliminazione del glucosio diventa insulino-mediata e dipende dalla sensibilità insulinica (S_I).

Attraverso questo modello possono essere valutate anche la risposta acuta dell'insulina al glucosio (AIRg – prima fase di secrezione insulinica) e un indice di disposizione (*disposition index*, DI, che rappresenta il prodotto della AIRg*SI), che riflette l'adeguatezza sia della secrezione che dell'azione insulinica.

Il test può essere modificato con la somministrazione, dopo 20 minuti dal bolo di glucosio, di insulina o tolbutamide:

- l'insulina (IM-FSIVGTT) è necessaria per utilizzare il test nei soggetti con DM-T1 (assente secrezione endogena di insulina);
- la tolbutamide è stata utilizzata per aumentare la secrezione insulinica nei soggetti con DM-T2 o nei soggetti normali.

È stato recentemente osservato come l'applicazione di un protocollo IM-FSIVGTT (insulino-modificato) nello studio di soggetti con normale secrezione e sensibilità insuliniche può ridurre la stima della S_1 attraverso l'attivazione della controregolazione gluco-metabolica.

Tale test non ha indicazioni nella diagnosi di diabete, ma è ampiamente utilizzato per studiare il metabolismo glucidico in vivo in condizioni fisiologiche, patologiche e in studi epidemiologici.

Per ulteriori dettagli *cfr capitolo 7.c. a pag. 104.*

Bibliografia

- Bingley PJ, et al. Standardization of IVGTT to predict IDDM. *Diabetes Care* 1992, 15: 1313-6.
- McCulloch DK, et al. Comparison of bolus and infusion protocols for determining acute insulin response to intravenous glucose in normal humans. The ICARUS Group. Islet Cell Antibody Register User's Study. *Diabetes Care* 1993, 16: 911-5.
- Bergman RN, et al. Equivalence of the Insulin Sensitivity Index in Man Derived by the Minimal Model Method and the Euglycemic Glucose Clamp. *J Clin Invest* 1987, 79: 790-800.
- Trout KK, et al. Methods of measuring insulin sensitivity. *Biol Res Nurs* 2007, 8: 305-18.
- Brehm A, et al. The Role of Endocrine Counterregulation for Estimating Insulin Sensitivity from Intravenous Glucose Tolerance Tests. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 2272-8.
- Diabetes Prevention Trial – Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 2002, 346: 1685-91.

7. Test di valutazione della sensibilità dell'insulina

Roberto Castello, Paolo Moghetti

7.a. Generalità sulla sensibilità insulinica

Definizione

Per sensibilità insulinica si intende l'efficacia dell'insulina nell'esercitare i suoi effetti biologici. In vivo viene tradizionalmente intesa e misurata (o stimata) come capacità di stimolare la metabolizzazione del glucosio.

Razionale

Una riduzione dell'efficacia biologica dell'insulina (insulino-resistenza) è un fenomeno assai comune, a cui viene attribuita grande importanza nella fisiopatologia del DM-T2 e della sindrome metabolica. L'insulino-resistenza si associa a molti fattori di rischio cardiovascolare. Costituisce un bersaglio per diversi farmaci utilizzati nella terapia di queste condizioni.

Fisiopatologia

Il mantenimento della glicemia entro limiti ristretti è un fenomeno strettamente controllato nell'organismo da un complesso sistema di regolazione. L'insulina svolge un ruolo fondamentale in tale regolazione, controllando diversi aspetti del metabolismo del glucosio: inibisce la neosintesi e la liberazione in circolo di glucosio da parte del fegato e incrementa il trasporto di questo substrato attraverso la membrana plasmatica di diversi tessuti "insulino-sensibili", quali il muscolo e il tessuto adiposo. Una ridotta efficacia dell'insulina è un fenomeno comune, legato a meccanismi in gran parte ancora sconosciuti, cui sembrano contribuire fattori genetici e ambientali.

A parità di livelli ormonali, l'insulino-resistenza comporta un ridotto effetto ipoglicemizzante di questo ormone: incrementi anche lievi della glicemia evocano un rapido aumento della secrezione di insulina. Nelle condizioni di **insulino-resistenza** vi è quindi un **aumento adattativo delle concentrazioni circolanti di insulina**:

- se questo aumento non è adeguato a contrastare la ridotta azione insulinica sul metabolismo glucidico, compaiono le alterazioni della tolleranza ai carboidrati;
- se l'aumento è invece adeguato, la glicemia rimane normale, ma a spese di un eccesso degli altri effetti biologici dell'insulina, che porta direttamente o indirettamente ad una serie di effetti negativi su vari aspetti metabolici e non solo metabolici (dislipidemia, steatosi epatica e steato-epatite non alcolica, ipertensione arteriosa, iperandrogenismo e sindrome dell'ovaio policistico, ecc.).

L'insulino-resistenza si associa spesso a obesità viscerale.

Uso clinico

È ancora controverso, anche per la difficoltà di misurare questo aspetto. Data la complessità della misurazione diretta dell'azione biologica dell'insulina, sono stati proposti diversi **indi-**

ci surrogati, basati soprattutto sul dosaggio di glicemia e insulinemia. In alternativa, è stato proposto di identificare i soggetti con verosimile insulino-resistenza attraverso l'**individuazione delle conseguenze** di tale disturbo metabolico. Tale approccio, che si è concretizzato nei criteri di sindrome metabolica proposti dall'ATP-III e nelle successive varianti, ha incontrato grande favore per la sua semplicità clinica, anche se è poco accurato. Il rilevante significato biologico dell'insulino-resistenza, in relazione al rischio di sviluppare patologie metaboliche e complicanze cardiovascolari, suggerisce tuttavia che la sua identificazione precoce possa costituire un obiettivo prioritario se si vuole contrastare l'elevata prevalenza di tali problematiche cliniche e può rappresentare anche un elemento utile nella scelta degli strumenti terapeutici da utilizzare nella cura del DM-T2 e più in generale delle patologie che riconoscono un ruolo patogenetico all'insulino-resistenza e all'associata iperinsulinemia. Tale prospettiva richiede tuttavia delle conferme prima di poter trovare applicazione nella pratica clinica.

7.b. Clamp gluco-insulinemico

Definizione

Termine originato dall'inglese "to clamp", che significa "tenere fermo", sta ad indicare una metodica in cui si mantiene costante la glicemia a fronte di alcune perturbazioni apportate all'omeostasi del sistema.

Razionale

La metodica più frequentemente utilizzata è quella del **clamp euglicemico iperinsulinemico**, considerato il *gold standard* per misurare la sensibilità insulinica in vivo. L'insulinemia viene innalzata attraverso un'infusione dell'ormone a velocità costante pre-determinata e contemporaneamente, per evitare scostamenti della glicemia dal valore basale normale, viene infuso glucosio in quantità variabili, aggiustate nel singolo soggetto attraverso il controllo frequente della glicemia. **Le quantità di glucosio infuse sono espressione della risposta tissutale del singolo individuo all'ormone.**

Nel **clamp iperglicemico** la glicemia viene invece innalzata e mantenuta stabile a livelli superiori al fisiologico, anche in questo caso infondendo quantità variabili di glucosio, condizionate dalla risposta secretoria della β -cellula oltre che dalla sensibilità tissutale all'insulina. Questo test **esplora** quindi in primo luogo **la funzione β -cellulare**.

Metodologia

La metodica prevede di predisporre un duplice accesso vascolare (*cf. scheda infermieristica al capitolo 14.b. a pag. 147*), uno per l'infusione di insulina e glucosio e l'altro per il prelievo dei campioni di sangue su cui effettuare i dosaggi della glicemia e degli altri parametri che si vogliono misurare. L'ottenimento di risultati accurati richiede il rispetto di alcune condizioni.

1. Il **mantenimento della glicemia in un range molto ristretto** (nel *clamp* euglicemico non deve scostarsi sostanzialmente dai 5 mmol/L = 90 mg/dL), in particolare evitando ipoglicemie anche lievi che altererebbero i livelli degli ormoni controregolatori (*cf. cap. 4.b. a pag. 67*). È quindi necessario ottenere misurazioni della glicemia frequenti, precise e in tempo reale.
2. Effettuare le **misure della glicemia su** campioni di **sangue** arterioso o, alternativa abitualmente utilizzata, **venoso arterializzato** (risultato che può essere ottenuto riscaldando e quindi vasodilatando l'arto su cui si effettuano i prelievi), in modo da evitare un errore di misura legato all'aumentata captazione tissutale di glucosio indotta dalla procedura (che è variabile in funzione della sensibilità individuale all'insulina).
3. Protrarre il test per un **tempo sufficiente al raggiungimento** di un pieno effetto dell'insulina e quindi **di un equilibrio nel sistema** ("*steady-state*"), abitualmente non meno di 2-3 ore.
4. Tenere conto che **il fegato immette in circolo glucosio**, che si aggiunge a quello infuso. Se si vuole misurare accuratamente la sensibilità dei tessuti periferici all'insulina è quindi

necessario avere una misura di questa produzione epatica attraverso l'uso di traccianti (glucosio marcato con isotopi, radioattivi o non radioattivi), ovvero creare condizioni che sopprimano e rendano trascurabile questa produzione, utilizzando velocità di infusione insulinica relativamente elevate.

Il **clamp euglicemico classico** prevede una velocità di infusione insulinica di 40 mU/m² superficie corporea (circa 1 mU/kg) per minuto, che porta l'insulinemia a valori intorno a 100 mU/L. A seconda dell'obiettivo, tale velocità di infusione può essere comunque ampiamente diversificata e si possono anche effettuare *clamp* a più livelli di velocità di infusione insulinica. Quando si utilizzano velocità elevate, va attentamente monitorata anche la potassiemia, eventualmente predisponendo una contemporanea appropriata infusione di potassio, dato l'effetto ipokaliemizzante dell'insulina.

È anche possibile valutare gli **effetti dell'iperinsulinemia su singoli distretti corporei**, ad esempio un arto, incannulando selettivamente arterie e vene della sede che si vuole indagare.

Nel **clamp iperglicemico** la glicemia viene in genere innalzata a 11 mmol/L (circa 200 mg/dL) e questo provoca un aumento progressivo nella risposta secretoria β-cellulare. Non si raggiunge quindi mai un vero *steady-state* nelle concentrazioni circolanti di insulina.

Esiste anche la possibilità di effettuare **clamp ipoglicemici**, quando si vogliono testare determinate risposte a bassi valori glicemici. Questa modalità di *clamp* richiede ovviamente particolare attenzione ed esperienza per i potenziali rischi che comporta.

Interpretazione dei risultati

La misura di sensibilità insulinica fornita dal **clamp euglicemico** è data dalla quantità di glucosio infusa nell'unità di tempo, durante lo *steady-state*, per mantenere l'euglicemia (il cosiddetto "M", che sta per glucosio metabolizzato). Se nel corso dello *steady-state* si verificano scostamenti della glicemia, vanno apportate appropriate correzioni a tale quantità per stimare il valore di M.

I **valori normali** di M in una popolazione di giovani adulti sani normopeso sono dell'ordine di 4.5-9.0 mg/min per Kg di peso. Dato che il muscolo contribuisce in gran parte all'utilizzo periferico del glucosio indotto dall'iperinsulinemia, è preferibile normalizzare i dati per una misura di massa magra, che può essere ottenuta con la bio-impedenzometria o con altre metodiche più sofisticate. Quando le concentrazioni di insulinemia raggiunte nel *clamp* non sono confrontabili con quelle della popolazione di riferimento, si utilizza anche il rapporto fra M e le concentrazioni raggiunte (rapporto M/I). Se condotto appropriatamente, il *clamp* è una procedura che fornisce misure ben riproducibili della sensibilità insulinica, con coefficienti di variazione di poco superiori al 5%.

Il **clamp può essere combinato con altre procedure**, ad esempio l'infusione di traccianti per indagare varie vie metaboliche, o la calorimetria indiretta che permette di ottenere misure sull'ossidazione dei substrati.

Nel **clamp iperglicemico** i livelli di insulina o peptide-C raggiunti costituiscono una misura della risposta secretoria β-cellulare. Tale metodica viene comunque utilizzata molto raramente a tale scopo, mentre può essere anche usata per indagare aspetti di fisiopatologia in condizioni standardizzate di iperglicemia.

Uso clinico

La complessità della metodica limita l'applicazione del *clamp* ad ambiti di ricerca. Peraltro il *clamp* ed il "minimal model" applicato all'IVGTT (cfr capitolo 7.c. a pag. 104) vengono con-

siderate le sole metodiche oggi disponibili in grado di fornire misure adeguate della sensibilità insulinica.

Vantaggi e svantaggi

Fra i vantaggi del *clamp* euglicemico come misura di sensibilità insulinica vi sono il fatto che fornisce una misura quantitativa e diretta dell'utilizzo insulino-indotto del glucosio, la possibilità (in combinazione con l'uso di traccianti) di discriminare fra effetti epatici e periferici dell'insulina, la possibilità di evitare i rischi e gli effetti interferenti legati all'ipoglicemia. Inoltre, il *clamp* è una metodica che può essere utilizzata per testare in vivo le conseguenze dell'iperinsulinemia su innumerevoli aspetti fisiopatologici.

D'altra parte il *clamp* è una metodica invasiva, richiede personale molto esperto e comporta un significativo consumo di tempo e risorse. Inoltre, l'iperinsulinemia stabile realizza condizioni non fisiologiche. Va anche ricordato che la M misura selettivamente l'azione insulinica sul metabolismo glucidico e che può risentire di variazioni nell'utilizzo del glucosio non insulino-mediato.

7.c. FSIVGTT e Minimal Model

Definizione

Il FSIVGT (*Frequently Sampled IntraVenous Glucose Tolerance Test*) è una tecnica derivata dal tradizionale test di tolleranza al glucosio ev, con l'introduzione di un campionamento di sangue assai frequente e la misura della sensibilità insulinica basata sull'applicazione di un modello matematico ai dati di glicemia, insulinemia e in genere anche di peptide-C.

Razionale

L'infusione rapida endovenosa di un bolo di glucosio provoca una brusca salita della glicemia ed una conseguente risposta β -cellulare rapida. Il campionamento molto frequente è necessario per definire con precisione le cinetiche di glucosio, insulina ed eventualmente peptide-C dopo la perturbazione del sistema. Il modello matematico considera le reciproche influenze fra glicemia e insulinemia ed interpreta le misure ottenute in termini di azione dell'insulina sulla glicemia (sensibilità insulinica) e di risposta β -cellulare allo stimolo glucidico. Viene considerato una tecnica di riferimento, accanto a quella del *clamp*, per valutare la sensibilità insulinica e consente di ottenere anche informazioni sulla funzione secretoria β -cellulare.

Metodologia

Indicazioni	<ul style="list-style-type: none"> • studio della prima e seconda fase di secrezione insulinica; • studio della sensibilità tissutale all'insulina (S_p), ovvero la scomparsa frazionata del glucosio per unità di concentrazione insulinica nel tempo (espressa in $\text{min}^{-1}/\text{mU/L}$); • studio della captazione periferica insulino-indipendente del glucosio (glucosio-efficacia S_c = capacità del glucosio di promuovere la propria scomparsa).
Controindicazioni	Marcato deficit secretorio di insulina.
Precauzioni	Non assumere farmaci interferenti con il metabolismo glucidico (steroidi, ecc.) nelle 3-4 settimane antecedenti il test. Escludere malattie acute intercorrenti in atto (infezioni, malattie virali, IMA, <i>ictus</i> , ecc.).
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	<i>Standard:</i> <ul style="list-style-type: none"> • glucosio 0.3 g/kg di peso corporeo. Opzionali (test modificato): <ul style="list-style-type: none"> • insulina regolare: 0.03 UI/Kg; • tolbutamide: 300 mg se BMI < 30 Kg/m²; 500 mg se BMI > 30 kg/m².
Esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. si effettuano 4 prelievi basali (-15, -10, -5 e 0 min); 2. si somministra glucosio ev in 1 minuto; 3. si effettuano prelievi ematici dopo 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 210, 240 min. 4. se modificato, dopo 20 minuti dalla somministrazione di glucosio si iniettano insulina (in 30 secondi) o tolbutamide (in 20 secondi),

Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.g. a pag. 158.</i>
Possibili effetti collaterali	Flebite chimica (da glucosata ipertonica). Marcata e protratta iperglicemia in caso di grave deficit secretorio insulinico.
Valutazione dei risultati	Mediante specifici <i>software</i> : <ul style="list-style-type: none"> • MINMOD (Inc. Los Angeles, CA); • SAAM II scaricabile dal sito: http://depts.washington.edu/saam2/
Interpretazione	Prima fase di secrezione insulinica: <ul style="list-style-type: none"> • valore integrato medio dell'incremento dell'insulina nei prelievi fra 0 e + 10 minuti = 0.84 ± 0.13 mU/L/min. Seconda fase di secrezione (test con tolbutamide): <ul style="list-style-type: none"> • valore integrato medio dell'insulina nei prelievi fra +22 e +180 minuti = 4.38 ± 1.44 mU/L/min. Sensibilità insulinica: <ul style="list-style-type: none"> • $(S_i) = 5.1 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}/\text{mU/L}$ (range 1.8 – 9.6).
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Buona correlazione con il <i>clamp</i> euglicemico, in particolare in soggetti normali (r di Pearson = 0.72-0.89; nei protocolli senza insulina o tolbutamide r = 0.54). Discreta riproducibilità.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Non indicato per uso diagnostico di <i>routine</i> . Più semplice e meno costoso del <i>clamp</i> euglicemico (<i>cfr capitolo 7.b. a pag. 101</i>). Permette valutazione della secrezione e della sensibilità insulinica.

Vantaggi e svantaggi

Le misure di sensibilità insulinica ottenute con questa metodica sono risultate correlare abbastanza bene con quelle del *clamp* in numerose condizioni sperimentali, anche se con talune eccezioni e limiti (ad esempio la procedura non è utilizzabile nei soggetti con grave decurtazione della capacità secretoria β -cellulare). Il coefficiente di variazione delle misure ottenute è maggiore che nel *clamp*. Questa metodica richiede inoltre tempo, un gran numero di prelievi di sangue e due operatori, almeno nella fase iniziale, ma, d'altra parte, non necessita di personale esperto, di pompe di infusione ben calibrate e di accurate misure in tempo reale della glicemia come avviene nel *clamp*. Fra gli svantaggi vi sono anche il carattere non fisiologico dello stimolo, le numerose assunzioni su cui si basa l'analisi dei dati e la necessità che tale analisi sia effettuata da un esperto del modello matematico.

7.d. Short ITT

Tabella 7.d.
Short Insulin Tolerance Test (ITT)

Scopo e meccanismo d'azione	Stima l'efficacia biologica dell'insulina in vivo, attraverso l'entità della caduta della glicemia indotta dalla somministrazione endovenosa di una quantità <i>standard</i> dell'ormone.
Indicazioni	Stimare la sensibilità all'insulina.
Controindicazioni	Epilessia, cardiopatia ischemica, malattia cerebro-vascolare.
Precauzioni	Necessità di supervisione <i>continua ed attenta</i> da parte di personale infermieristico e medico specializzato.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Insulina pronta 0.1 U/kg.
Esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. si eseguono 2 prelievi basali; 2. si somministra insulina in bolo ev; 3. si effettuano prelievi per glicemia ogni 3 minuti fino a 15 minuti; 4. si somministra glucosata.
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.e. a pag. 154.</i>
Possibili effetti collaterali	Quelli dell'ipoglicemia.
Valutazione	La sensibilità insulinica viene espressa dalla pendenza della curva di caduta della glicemia ($K_{itt} = 0.693/t_{1/2}$), che nella prima fase del test ha un andamento rettilineo.
Interpretazione	I dati relativi ai soggetti sani sono quantitativamente limitati. Si possono comunque considerare normali valori superiori a 4.5-5%/min.
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	La misura di sensibilità insulinica ottenuta con questa metodica è risultata ben correlata con la M del <i>clamp</i> .
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	<p>Metodica semplice e facilmente applicabile.</p> <p>Non consente di discriminare la sede dell'eventuale insulino-resistenza e comporta i rischi dell'ipoglicemia, di molto attenuati dalla procedura breve con successiva infusione di glucosio.</p> <p>È stato in larga parte soppiantato da altre metodiche, per i rischi potenziali dell'ipoglicemia e per le interferenze legate alla risposta controregolatoria evocata dalla caduta glicemica.</p>

7.e. Indici basati su misure a digiuno

Definizione

L'**HOMA** (*Homeostasis Model Assessment*) è un indice che si basa sul prodotto insulina * glicemia a digiuno, diviso per una costante.

Il **QUICKI** (*Quantitative Insulin sensitivity ChecK Index*) utilizza i medesimi parametri dopo trasformazione logaritmica.

Razionale

Questi indici surrogati di sensibilità insulinica partono dal presupposto che l'insulinemia a digiuno è inversamente correlata alla sensibilità insulinica, ma che questa relazione è alterata nel soggetto diabetico. L'introduzione della glicemia ha lo scopo di tenere conto di questa interferenza e di rendere confrontabili soggetti con glicemia normale e alterata.

Metodologia

Tutti questi indici si basano su misure a digiuno.

La formula per il calcolo dell'HOMA è: **HOMA** = Glicemia*Insulinemia/22.5
misurando la glicemia in mmol/L e l'insulinemia in mU/L.

La formula per il calcolo del QUICKI è: **QUICKI** = 1/(log Glicemia + log Insulinemia)
misurando la glicemia in mmol/L e l'insulinemia in mU/L.

Un altro indice simile è il semplice rapporto fra glicemia e insulinemia. Vi sono poi altri indici, meno comunemente utilizzati, che comprendono anche livelli di acidi grassi liberi o trigliceridi fra i parametri utilizzati nel calcolo.

Interpretazione dei risultati

Poiché questi indici dipendono tutti fortemente dal dosaggio dell'insulinemia (*cfr capitolo 15.e. a pag. 181*), che non è standardizzato, non sono facilmente confrontabili i risultati di studi diversi. I valori di riferimento utilizzati devono quindi tener conto di questo aspetto. Inoltre, piccoli errori assoluti nel dosaggio dell'insulina possono avere considerevoli ripercussioni sulle misure ottenute. Per limitare questo problema, tenendo anche conto del carattere pulsatile della secrezione dell'insulina, viene raccomandato di effettuare più misure di questo parametro e di utilizzare nel calcolo il valore medio.

La definizione di un intervallo di riferimento non può prescindere dalla metodica di dosaggio dell'insulina utilizzata ed è pertanto necessario che il singolo laboratorio individui tali valori.

Vantaggi e svantaggi

I vantaggi di queste misure sono rappresentati dalla loro semplicità ed economicità, che le rendono utilizzabili in ampi studi epidemiologici che comprendono soggetti con diversi gradi di tolleranza ai carboidrati. I medesimi semplici parametri sono utilizzabili anche per stimare indici di funzione β -cellulare.

Gli svantaggi sono insiti nei limiti di queste stime, che hanno spesso mostrato insoddisfacenti correlazioni con le misure del *clamp*, soprattutto nei soggetti diabetici ed obesi (coefficienti di correlazione abitualmente inferiori a 0.5), e che presentano coefficienti di variazione piuttosto elevati. Particolarmente criticabile, quando si esaminano soggetti iperglicemici, è l'utilizzo del rapporto glicemia/insulinemia, perchè un aumento percentualmente simile dei due parametri dà luogo a risultati "normali".

7.f. Indici basati sull'OGTT

Definizione

Fra i molti indici che stimano la sensibilità insulinica basandosi sui valori di glicemia e insulinemia a digiuno e dopo OGTT, l'ISIcomp (*Insulin Sensitivity Index composite*) o indice di Matsuda è quello più utilizzato oggi.

Razionale

L'OGTT è un test semplice e ampiamente utilizzato (*cf. capitolo 6.a. a pag. 85*), che prevede la somministrazione di un carico *standard* di glucosio e la misura della risposta glicemica e insulinica a questa perturbazione. Queste misure sono in relazione con la funzione β -cellulare e con la capacità dell'insulina di determinare l'ingresso del glucosio nelle cellule. Già in passato, per questo motivo, l'area sottesa alla curva dell'insulinemia o il rapporto fra questa e l'area della glicemia sono state utilizzate come parametro empirico di sensibilità insulinica. Più recentemente sono state utilizzate analisi più complesse, anche con l'uso di modelli matematici.

Metodologia

L'indice di Matsuda viene calcolato dalla formula:

$$\text{ISIcomp} = 10000 / \sqrt{G_0 * I_0 * G_m * I_m}$$

dove G_0 e I_0 sono rispettivamente glicemia e insulinemia a digiuno e G_m e I_m sono i corrispondenti valori medi misurati ai tempi 30, 60, 90 e 120 minuti durante un OGTT con 75 g di glucosio (glicemie in mg/dL e insulinemie in mU/L). *Range* di normalità: 0-12.

È stato validato in soggetti con normale tolleranza glucidica, IGT e diabete. Rappresenta gli effetti combinati dell'insulina, in condizioni basali e dopo ingestione di glucosio, sulla stimolazione della captazione periferica di glucosio e sulla soppressione della produzione epatica di glucosio. In condizioni sperimentali, è stata riportata una correlazione con il *clamp* euglicemico superiore a quella della tecnica del modello minimo ($r = 0.739$, $p < 0.0001$).

Fra le altre stime basate sull'OGTT, l'indice di sensibilità insulinica proposto da Belfiore viene calcolato dalla formula:

$$\text{Indice di Belfiore} = \frac{2}{(\text{areainsulina} * \text{areaglicemia}) + 1}$$

Stumvoll et al hanno introdotto nel calcolo del loro "*Metabolic Clearance Rate estimate*", oltre all'insulinemia (in pmol/L) a 120 minuti e la glicemia (in mmol/L) a 90 minuti, anche il BMI, con la formula:

$$\text{Indice di Stumvoll} = 18.8 - 0.271 * \text{BMI} - 0.0052 * I_{120} - 0.27 * G_{90}$$

Interpretazione dei risultati

L'ISIcomp, come l'HOMA, si basa sul concetto che tanto più alti sono i livelli di glucosio e insulina, tanto minore è la sensibilità insulinica.

Vantaggi e svantaggi

Il vantaggio di queste stime è rappresentato dalla semplicità e dall'ampio uso dell'OGTT. Rispetto ai valori a digiuno, sembrano correlare meglio con le misure del *clamp*. Tuttavia questi metodi si basano tutti su assunzioni, empiriche o meno, e risentono degli effetti delle incretine. Inoltre restano i problemi legati al dosaggio dell'insulinemia.

Bibliografia generale del capitolo 7

- DeFronzo RA, Tobin JD, Andrei R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979, 237: E214-23.
- Pacini G, Mari A. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003, 17: 305-22.
- Monzillo LU, Hamdy O. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr Rev* 2003, 61: 397-412.
- Ruige JB, Mertens IL, Bartholomeeusen E, Dirinck E, Ferrannini E, Van Gaal LF. Fasting-based estimates of insulin sensitivity in overweight and obesity: a critical appraisal. *Obesity* 2006, 14: 1250-6.
- Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, Corbelli C. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1979, 236: E667-77.
- Saad MF, Steil GM, Kades WW, et al. Differences between the tolbutamide-boosted and the insulin-modified minimal models protocols. *Diabetes* 1997, 46: 1167-71.
- Horgaard A, Thyssen THE. Clinical investigation into the effect of the intravenous injection of insulin. *Acta Med Scand* 1929, 72: 92-5.
- Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance test with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989, 68: 374-8.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis Model Assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985, 28: 412-9.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, et al. Quantitative insulin sensitivity Check index: a simple accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 2402-10.
- Matsuda M, De Fronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999, 22: 1462-70.
- Belfiore F, Iannello S, Camuto M, et al. Insulin sensitivity of blood glucose versus insulin sensitivity of blood free fatty acids in normal, obese, and obese diabetic subjects. *Metabolism* 2001, 50: 573-82.
- Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, et al. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000, 23: 295-301.
- Cretti A, Lehtovirta M, Bonora E, et al. Assessment of beta-cell function during the oral glucose tolerance test by a minimal model of insulin secretion. *Eur J Clin Invest* 2001, 31: 405-16.

8. Test dinamici di valutazione della riserva funzionale “ β -cellulare”

Francesco Tassone, Anna Maria Dalmaso

8.a. Test di stimolo con glucagone

Per esaminare la riserva secretoria insulinica sono stati usati i livelli ematici di peptide-C (*cf* capitolo 4.a. a pag. 65), basali o in risposta a stimoli. Tale peptide viene rimosso durante l'assemblaggio della molecola insulinica nelle β -cellule pancreatiche, secreto nella vena porta ed escreto dal rene. I livelli venosi di peptide-C riflettono pertanto la secrezione insulinica endogena, e nell'insufficienza renale risultano incrementati.

Nel DM-T1 i livelli di peptide-C diminuiscono progressivamente in rapporto alla distruzione delle β -cellule pancreatiche, fino a livelli molto bassi o addirittura indeterminabili. Anche nel DM-T2 c'è una progressiva riduzione della funzione β -cellulare negli anni, con conseguente riduzione dell'insulino-secrezione e dei livelli di peptide-C.

I livelli di peptide-C dopo stimolo con glucagone sono stati usati per differenziare tra DM-T1 e DM-T2 (per altro con scarso potere predittivo) e per determinare la necessità di trattamento insulinico nel DM-T2. Alcuni autori (soprattutto del Nord-Europa) hanno rilevato come i pazienti che allo stimolo con glucagone rispondevano con livelli di peptide-C maggiori di 1 nmol/L (pari a 3 ng/mL in unità convenzionali) potevano essere trattati senza insulina.

Nel *Diabetes Control and Complications Trial* la presenza di DM-T1 al momento dell'arruolamento nello studio era determinata da livelli basali di peptide-C < 0.2 nmol/L (< 0.6 ng/mL) e < 0.5 nmol/L (< 1.5 ng/mL) dopo stimolo.

Tabella 8.a.
Test con glucagone

Scopo e meccanismo d'azione	Valutare la capacità secretoria della β -cellula pancreatica.
Indicazioni	Esaminare la riserva secretoria insulinica. È anche uno strumento diagnostico di aiuto nella diagnosi differenziale dell'eziologia del Diabete Mellito.
Controindicazioni	No.
Precauzioni	No.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	0.03 mg/kg di glucagone nei pazienti < 34 kg, 1 mg in tutti gli altri.
Esecuzione	Si effettuano i prelievi basali, poi si inietta il glucagone in bolo lento ev e si prelevano campioni ematici dopo 6 e 10 minuti.
Scheda infermieristica	<i>Cfr</i> capitolo 14.d. a pag. 152.
Possibili effetti collaterali	Nausea, vomito, tachicardia.
Valutazione dei risultati	Nel soggetto normale: picco di peptide-C di circa il 150-300% (ovvero incremento del 50-200%) rispetto ai valori basali.
Interpretazione	DM-T1: livelli basali di peptide-C < 0.2 nmol/L (< 0.6 ng/mL) e dopo stimolo < 0.5 nmol/L (< 1.5 ng/mL). Nei diabetici: una risposta > 1 nmol/L (> 3 ng/mL) definirebbe l'insulino-indipendenza.

Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Non disponibili dati al riguardo in letteratura.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Utile clinicamente soprattutto per scelte terapeutiche.

Bibliografia

Weinstock RS, Zygmunt SV. Pancreatic islet function tests. *www.endotext.com Chapter 5.*

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993, 329: 977-86.

8.b. Test di stimolo con arginina (glucosio-dipendente)

L'arginina è un aminoacido, noto secretagogo dell'insulina (oltrechè del glucagone). Tale azione di stimolo sulla secrezione insulinica è dipendente dalle concentrazioni plasmatiche di glucosio (la relazione sarebbe di tipo iperbolico, con la massima secrezione insulinica in risposta all'arginina dimostrata per valori di glicemia > 450 mg/dL).

Tabella 8.b.
Test con arginina

Scopo e meccanismo d'azione	Valutare la capacità secretoria della β -cellula pancreatica, sfruttando l'azione secretagoga dell'arginina sull'insulina.
Indicazioni	Esaminare la capacità secretoria insulinica in soggetti con sospetto deficit di secrezione insulinica.
Controindicazioni	Nessuna.
Precauzioni	Nessuna.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Nessuna.
Esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. Si effettuano 2 prelievi basali, poi si iniettano ev in 45 secondi 5 grammi di arginina (dose stimolante massimale) e, a partire dalla fine dell'iniezione, si prelevano campioni ematici ogni minuto fino a 5 minuti; 2. si infonde quindi glucosio 20% ev con una pompa, fino a raggiungere glicemia di circa 250 mg/dL entro 20-25 minuti; 3. mantenendo costante la glicemia, dopo 30 minuti si effettuano 2 prelievi basali, poi si iniettano nuovamente ev 5 grammi di arginina e, a partire dalla fine dell'iniezione, si prelevano campioni ematici ogni minuto fino a 5 minuti; 4. periodo di riposo di circa 2 ore e mezza (senza infusione di glucosio per evitare l'effetto <i>priming</i> del glucosio); 5. si effettuano nuovamente i prelievi basali, si inizia infusione di glucosata al 20% ad alta velocità (900 mL/h), per innalzare la glicemia a circa 450-500 mg/dL in 20-25 minuti; 6. mantenendo costante la glicemia, dopo 30 minuti si effettuano 2 prelievi basali, poi si iniettano nuovamente ev 5 grammi di arginina e, a partire dalla fine dell'iniezione, si prelevano campioni ematici ogni minuto fino a 5 minuti.
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.a. a pag. 105.</i>
Possibili effetti collaterali	Nausea, vomito.
Valutazione dei risultati	<p>Si calcolano</p> <ul style="list-style-type: none"> • risposta insulinica acuta all'arginina (AIR), calcolata come media dei valori di insulinemia (ai tempi +2, +3, +4, +5) a cui si devono sottrarre i valori insulinemici pre-arginina (media dei 2 basali), durante le prime due fasi del test. Si ottengono quindi 3 valori di AIR: AIR₁, AIR₂, AIR₃, rispettivamente per glicemia 'normale', 250 mg/dL e 450 mg/dL;

Valutazione dei risultati	<ul style="list-style-type: none"> risposta massima insulinica acuta all'arginina (AIR max), calcolata come media dei valori di insulinemia (ai tempi +2, +3, +4, +5) dopo l'ultima infusione di glucosata (cioè per valori di glicemia > 450 mg/dL), a cui si devono sottrarre i valori insulinemici pre-arginina. Tale valore rappresenterebbe la massima capacità secretoria β-cellulare; pendenza di secrezione insulinica (slope AIR) tra i valori ottenuti durante glicemia basale e durante glicemia di circa 250 mg/dL. Esprime il potenziamento glicemico della secrezione insulinica da parte del glucosio; BG50 è il livello glicemico a cui è ottenuto il 50% della secrezione insulinica massima ed è calcolata a partire da AIRmax e da slope AIR (ad esempio, l'AIR max è di 400 μU/mL, la BG50 è il punto sulla curva corrispondente alla metà di tale AIR Max, cioè a 200 μU/mL). Rappresenta una misura di sensibilità β-cellulare.
Interpretazione	<p>Soggetti normali (media\pmSEM): AIR max 450\pm93 μU/mL BG₅₀ 197\pm20 mg/dL</p> <p>Pazienti diabetici: AIR max 83\pm21 μU/mL BG₅₀ 234\pm28 mg/dL</p>
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	<p>Buona riproducibilità dei risultati.</p> <ul style="list-style-type: none"> AIR: CV intra-individuale 16-19%; Slope AIR: CV circa 24%.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	<p>Test indaginoso, di limitata applicazione nella pratica clinica.</p>

Bibliografia

Ward WK, Beard JC, Halter JB, Porte D Jr. Pathophysiology of insulin secretion in diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol* 1985, 189: 137-58.

Larsson H, Ahren B. Glucose-dependent arginine stimulation test for characterization of islet function: studies on reproducibility and priming effect of arginine. *Diabetologia* 1998, 41: 772-7.

9. Test dinamici di valutazione qualitativa della secrezione insulinica

Francesco Tassone, Anna Maria Dalmaso

9.a. FSIVGTT

Il test di tolleranza al glucosio endovena è utilizzato per valutare la capacità secretoria insulinica. Non ha grande utilità diagnostica per la diagnosi di diabete mellito rispetto all'OGTT, ma, analizzando la cinetica dell'andamento glicemico durante il test, può dare informazioni qualitative sulla secrezione insulinica in termini di prima fase (selettivamente compromessa nel diabete mellito ed anche nell'IGT) e seconda fase di secrezione insulinica.

Il "modello minimo" classico di analisi della cinetica glicemica può essere applicato ai dati ottenuti con il FSIVGTT per studiare il metabolismo glucidico, sia in studi in vivo in situazioni fisiologiche e patologiche, sia in studi epidemiologici.

I soggetti/pazienti devono aver consumato almeno 150 g di carboidrati nei 3 giorni precedenti il test. Dopo 12 ore di digiuno si incannula il soggetto e si mantiene pervio l'accesso venoso con soluzione fisiologica. Si effettuano tre prelievi basali (a -13, -8 e -3 minuti), dopodichè si inietta il glucosio (300 mg/kg in circa 60 secondi). Vengono quindi effettuati prelievi per glicemia ed insulinemia ai tempi 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 210, 240 minuti.

Oltre a vari parametri (calcolabili con diversi *software*, quali MINMOD, MLAB) relativi alla sensibilità insulinica ed all'efficienza del glucosio (intesa come capacità del glucosio di inibire la propria produzione endogena e di incrementare la propria utilizzazione da parte dei tessuti in rapporto alla sua concentrazione plasmatica), si può anche ottenere una stima di parametri legati alla secrezione insulinica, in particolare:

- $\Phi 1$ = "first phase pancreatic responsivity": misura dell'entità della prima fase di secrezione insulinica in risposta all'iniezione di glucosio ev;
- $\Phi 2$ = "second phase pancreatic responsivity": misura dell'entità della seconda fase di secrezione insulinica.

Esistono varianti a questo schema classico che presuppongono l'infusione di tolbutamide o insulina dopo 20-25 minuti dal carico di glucosio e permettono di ottenere informazioni aggiuntive, soprattutto in termini di sensibilità insulinica.

Nel *Diabetes Prevention Trial – Type 1* è stato impiegato un IVGTT modificato (0.5 g/kg di glucosio ev fino ad un massimo di 35 g, iniettato in 3 minuti circa), utilizzando la somma dei livelli di insulinemia ai tempi +1 e +3 per stimare la secrezione insulinica. La risposta insulinica veniva arbitrariamente definita "ridotta" quando non raggiungeva 100 $\mu\text{U}/\text{mL}$.

Bibliografia

- Bergman RN, Finnegood DT, Ader M. *Assessment of insulin sensitivity in vivo*. *Endocr Rev* 1985, 6: 45-86.
- Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. *Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man*. *J Clin Invest* 1981, 68: 1456-67.
- Saad MF, Anderson RL, Laws A, et al. *A Comparison Between the Minimal Model and the Glucose Clamp in the Assessment of Insulin Sensitivity Across the Spectrum of Glucose Tolerance*. *Diabetes* 1994, 43: 1114-21.
- Diabetes Prevention Trial–Type 1 Diabetes Study Group*. *Effects of Insulin in Relatives of Patients with Type 1 Diabetes Mellitus*. *N Engl J Med* 2002, 346: 1685-91.

9.b. Altri test derivati da OGTT

Recentemente sono state proposte equazioni matematiche basate sui dati ottenibili con il carico orale di glucosio, allo scopo di ottenere informazioni qualitative sulla secrezione insulinica senza dover ricorrere ai complessi test (che peraltro rimangono i *gold standard*) prima analizzati (FSI-VGTT, *cfr* capitolo 9.a. a pag. 119, *clamp* iperglicemico, *cfr* capitolo 7.b. a pag. 101).

Indice insulinogenico (*Insulinogenic Index, II*).

Con l'insulinemia misurata in pmol/L e la glicemia in mmol/L sono state ricavate diverse equazioni.

II di Selzer

$$II_{\text{Selzer}} = [(insulinemia\ 30' - insulinemia\ 0')]/[(glicemia\ 30' - glicemia\ 0')]$$

È stato rilevato che, parallelamente ai dati ottenuti con IVGTT, la risposta insulinica allo stimolo glucidico è maggiore nei soggetti normali rispetto a pazienti diabetici (sia normopeso, sia obesi).

Tale indice è stato frequentemente usato in letteratura come surrogato di insulino-secrezione in studi epidemiologici.

II di Phillips

$$II_{\text{Phillips}} = [(insulinemia\ 30' - insulinemia\ 0')]/[(glicemia\ 30')]$$

Sembra essere un miglior indicatore di secrezione insulinica.

Equazioni di Stumvoll

Con l'insulinemia misurata in pmol/L e la glicemia in mmol/L sono state ricavate queste equazioni, validate in popolazioni caucasiche adulte (21-68 anni) con BMI fra 19.7 e 45.8 Kg/m², paragonandoli ad un *clamp* iperglicemico, che servono per stimare la prima e la seconda fase insulinica dai dati dell'OGTT.

$$1^{\circ}\text{ fase di secrezione} = 1283 + 1.829 * Ins_{30} - 138.7 * Gluc_{30} + 3.772 * Ins_0 \\ (r = 0.78, P < 0.00005)$$

$$2^{\circ}\text{ fase di secrezione} = 287 + 0.4164 * Ins_{30} - 26.07 * Gluc_{30} + 0.9226 * Ins_0 \\ (r = 0.79, P < 0.00005)$$

Tali equazioni avevano sostanzialmente la stessa potenza predittiva sia in soggetti con norma-

le tolleranza al glucosio che in pazienti con intolleranza al glucosio, ed i coefficienti di correlazione lineare erano migliori rispetto ad altri parametri surrogati di funzione β -cellulare (HOMA β -cell function, cfr capitolo 7.e. a pag. 107, insulinogenic index, vedi sopra).

Gli stessi autori hanno poi proposto a partire dai dati dell'OGTT due equazioni simili, validate sempre per stimare la 1° e la 2° fase di secrezione insulinica in pazienti caucasici affetti da DM-T2:

$$\text{first phase predicted} = -59 + 24.1 \cdot \text{AUC}_{\text{Ins}} / \text{AUC}_{\text{Gluc}} - 0.98 \cdot \text{Ins}_{90} \quad (r = 0.81; P < 0.001)$$

$$\text{second phase predicted} = -0.41 + 8.1 \cdot \text{AUC}_{\text{Ins}} / \text{AUC}_{\text{Gluc}} - 0.27 \cdot \text{Ins}_{90} \quad (r = 0.78; P < 0.001).$$

Anche in questo caso tali equazioni dimostravano coefficienti di correlazione migliori rispetto ad altri indici surrogati di funzione β -cellulare.

Bibliografia

- Seltzer HS, Allen EW, Herron AL Jr, Brennan MT. Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1967, 46: 323-35.
- Phillips DI, Clark PM, Hales CN, Osmond C. Understanding oral glucose tolerance: comparison of glucose or insulin measurements during the oral glucose tolerance test with specific measurements of insulin resistance and insulin secretion. *Diabet Med* 1994, 11: 286-92. (Comment in: *Diabet Med* 1995, 12: 931.)
- Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, et al. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000, 23: 295-301.
- Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, et al. Assessment of Insulin Secretion From the Oral Glucose Tolerance Test in White Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2000, 23: 1440-1.
- Haffner SM, Miettinen H, Gaskill SP, Stern MP. Decreased insulin secretion and increased insulin resistance are independently related to the 7-year risk of NIDDM in Mexican-Americans. *Diabetes* 1995, 44: 1386-91.

10. Test dinamici per lo studio delle sindromi ipoglicemiche

Rinaldo Guglielmi, Laura Bonomo

10.a. Test del digiuno

Scopo e meccanismo d'azione	Il digiuno fisiologicamente induce soppressione della secrezione di insulina, per mantenere l'euglicemia, con attivazione degli ormoni controregolatori, attivazione della glicogenolisi, gluconeogenesi e chetogenesi. Il dosaggio contemporaneo di insulinemia e peptide-C (e della pro-insulina, se disponibile) consente di differenziare le cause endogene ed esogene di iperinsulinismo.
Indicazioni	Diagnosi differenziale delle cause di ipoglicemia.
Controindicazioni	Non eseguire il test in pazienti in stato di gravidanza per i possibili effetti collaterali relativi ad un eventuale episodio di ipoglicemia.
Precauzioni	Stretta sorveglianza del paziente: è necessario il ricovero ospedaliero.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Le donne sono in grado di tollerare senza sintomi glicemie più basse (vedi interruzione del test) mentre non ci sono differenze tra soggetti di età diverse. Differenze con l'età sono state riportate circa i sintomi e segni (prevalenza di quelli adrenergici nei soggetti giovani e neuro-glucopenici in soggetti di età più avanzata).
Condizioni preliminari	Sospendere temporaneamente tutti i farmaci non strettamente necessari.
Esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. Considerare come inizio del digiuno il momento in cui è avvenuto l'ultimo pasto del paziente; 2. permettere al paziente di assumere liquidi o bevande prive di calorie; 3. programmare dosaggio di glicemia, insulina, peptide-C e pro-insulina (ove disponibile) ogni 6 ore. Quando il valore della glicemia plasmatica scende al di sotto di 60 mg/dL, intensificare i controlli (ogni 2 ore); 4. il test va interrotto quando sono trascorse 72 h dal suo inizio, oppure in caso di glicemia < 50 mg/dL negli uomini e < 35 mg/dL nelle donne, associata a sintomi suggestivi di ipoglicemia; 5. al termine del test, alcuni autori suggeriscono uno stimolo con glucagone (iniezione in bolo di 1 mg di glucagone ev) per testare la persistenza di riserve di glicogeno a livello epatico, indice di secrezione insulinica persistente durante il digiuno.
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.c. a pag. 150.</i>
Possibili effetti collaterali	Quelli derivanti dall'ipoglicemia.
Interpretazione	<ul style="list-style-type: none"> • Insulina: $\geq 3 \mu\text{U/mL}$ (metodica ICMA) o $> 6 \mu\text{U/mL}$ (con metodica IRMA) in presenza di glicemia < 55 mg/dL è indicativo di inappropriata secrezione di insulina ed è suggestivo di insulinoma o altro iperinsulinismo endogeno. • Rapporto insulina/glucosio: > 0.3 (in presenza di ipoglicemia) nella quasi totalità dei pazienti con insulinoma o con altre forme di iperinsulinismo organico. • Peptide-C: consente la differenziazione delle forme di iperinsulinismo esogeno (comprese quelle da somministrazione <i>factitia</i>) dalle endogene. Nei soggetti ipoglicemici senza insulinoma, allorchè il valore della glicemia scende < 45 mg/dL, il valore di peptide-C è sempre < 0.6 ng/mL (0.2 nmol/L).

<p>Interpretazione (segue)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pro-insulina: valori diagnostici per insulinoma se > 5 pmol/L in associazione a valori di glicemia < 45 mg/dL. Vista la scarsa diffusione di tale determinazione, tuttavia, è necessario precisare che la predittività del test al digiuno non è ridotta dal suo mancato dosaggio. • Risposta al glucagone: i soggetti normali dopo un periodo di digiuno presentano deplezione delle riserve di glicogeno epatico. Nell'insulinoma, a causa dell'effetto della protratta iperinsulinemia, al termine del digiuno il paziente è ancora responsivo al test con glucagone (con immissione di glucosio dal fegato e rialzo della glicemia). Il test è positivo per insulinoma se l'incremento della glicemia è > 25 mg/dL nei 20-30 minuti successivi all'iniezione in bolo di glucagone. • β-idrossibutirrato: costantemente elevato nei soggetti normali sottoposti a digiuno protratto, il valore di questo analita rimane basso nei pazienti con insulinoma a causa dell'effetto anti-chetogenico della persistente secrezione insulinica. Nel corso del test, valori < 2.7 mmol/L sono pertanto suggestivi per insulinoma. Nei centri in cui tale dosaggio non è disponibile, può essere di aiuto la valutazione semi-quantitativa dei chetoni urinari mediante strisce reattive. • Valori elevati di insulina in associazione a valori soppressi di peptide-C in corso di ipoglicemia sono suggestivi di ipoglicemia insulino-indotta (somministrazione esogena). • L'associazione di ipoglicemia con valori bassi di insulina e di peptide-C è suggestiva di ipoglicemia indotta da neoplasia non insulare. In questi casi eseguire il dosaggio dell'IGF-II ed uno studio di diagnostica per immagini. Deve inoltre essere escluso il deficit di ormoni controregolatori (cortisolo e GH) o l'ipopituitarismo.
<p>Attendibilità e ripetibilità dei risultati</p>	<p>In presenza di un insulinoma, il 43% dei pazienti presenta un episodio di ipoglicemia diagnostico nelle prime 12 h e circa il 90% nelle prime 48 h.</p>
<p>Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia</p>	<p>Il test del digiuno protratto deve essere considerato l'indagine dirimente ai fini della diagnosi di iperinsulinismo endogeno. Il costo è molto basso, ma l'unico inconveniente è rappresentato dalla necessità di ricoverare il paziente.</p>

10.b. Angiografia selettiva e stimolazione intra-arteriosa con calcio gluconato

Scopo e meccanismo d'azione	L'infusione arteriosa di calcio gluconato è uno stimolo potente per la secrezione di insulina da parte delle insule presenti nel territorio di distribuzione dell'arteria interessata.
Indicazioni	<ol style="list-style-type: none"> 1. Localizzazione pre-operatoria dell'insulinoma se mancata visualizzazione alle indagini non invasive di diagnostica per immagini; 2. in caso di pregressa esplorazione chirurgica negativa e ripresa di sintomatologia specifica dopo rimozione di un tumore insulare del pancreas.
Controindicazioni	Allergia a mezzo di contrasto. Malattie internistiche a rischio emorragico.
Precauzioni	Esclusione di diatesi emorragica, valutazione assetto calcio-fosforico e funzione renale.
Necessari	Sala angiografica. Radiologo esperto nella neuroradiologia interventistica.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	1 mg/kg peso corporeo di calcio gluconato (per ogni bolo). Il test può essere eseguito anche in pazienti in età pediatrica.
Esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incannulazione della vena epatica destra per i prelievi (non è necessario incannularle entrambe, perché non è dimostrato un gradiente tra le due vene e perché tecnicamente è più difficile incannulare la vena epatica di sinistra); 2. incannulazione dell'arteria gastroduodenale (perfusione testa e processo uncinato); 3. iniezione intra-arteriosa di calcio 1 mg/kg in bolo lento (30 secondi); 4. prelievo del sangue refluo dalla vena epatica di destra ogni 30 secondi per tre minuti; 5. riposo di 15 minuti; 6. ripetere le fasi da 2 a 5, incannulando successivamente le arterie: <ul style="list-style-type: none"> • pancreatico-duodenale inferiore (perfusione testa e processo uncinato); • mesenterica superiore (perfusione testa e processo uncinato); • splenica (perfusione corpo e coda); • epatica (perfusione fegato).
Scheda infermieristica	<i>Cfr capitolo 14.i. a pag. 162.</i>
Possibili effetti collaterali	Trombosi delle arterie incannulate. Trombosi venosa profonda. Sanguinamenti post-manovra soprattutto a livello femorale, sede usuale di ingresso del catetere.
Interpretazione	Un aumento del valore dell'insulina plasmatica superiore di due volte rispetto al valore basale deve essere interpretato come risposta probante per la presenza di insulinoma nel territorio di distribuzione dell'arteria stimolata. La diagnosi è molto probabile se il rapporto insulina stimolata/insulina basale è > 3.5. Alcuni autori preferiscono utilizzare il valore della insulina stimolata, ritenendo suggestiva la diagnosi di sede dell'insulinoma se il valore è > 100 μ UI/mL ed altamente probabile se il valore è > 200 μ UI/mL.

Attendibilità e ripetibilità dei risultati	L'accuratezza del test dipende dall'esperienza dei radiologi interventisti e dalla possibile presenza di varianti anatomiche con conseguente distribuzione anomala dei vasi arteriosi incannulati. Sensibilità riportata del test superiore al 90%. Risultati non omogenei se presenza di nesidioblastosi o iperplasia diffusa.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Test invasivo, costoso, con organizzazione complessa, da eseguire solo in centri di riferimento con ampia esperienza. Da considerare solo se, in caso di positività del test al digiuno e paziente sintomatico, si ha negatività di TC, RMN, scintigrafia con octreotide marcata ed ecografia endoscopica.