



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**FACOLTA' DI INGEGNERIA**

---

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**VALUTAZIONE DEL DISPOSITION INDEX LINEARIZZATO COME STRUMENTO  
PREDITTIVO DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2 IN DONNE CON STORIA PREGRESSA DI  
DIABETE GESTAZIONALE**

**ASSESSMENT OF THE LINEARIZED DISPOSITION INDEX AS PREDICTIVE TOOL FOR  
TYPE 2 DIABETES IN WOMEN WITH PREVIOUS HISTORY OF GESTATIONAL DIABETES**

Relatore:

**Dott. Micaela Morettini**

Correlatori:

**Prof.ssa Laura Burattini**

**Dott. Andrea Tura**

Tesi di Laurea di:

**Sofia Yanovskaya**

**A.A. 2021 / 2022**

## **Abstract**

Il Disposition Index è la costante che regola il rapporto di proporzionalità inversa che sussiste tra secrezione di insulina e sensibilità dei tessuti ad essa e tale legame viene rappresentato graficamente, nell'individuo normoglicemico, tramite iperbole equilatera. Tale costante fornisce informazioni a livello fisiologico sul corretto funzionamento dei processi che conducono al metabolismo del glucosio, diventando così strumento atto ad evidenziare numerose condizioni, tra le quali figura principalmente il diabete. Il Disposition Index può passare attraverso un processo di linearizzazione effettuata tramite applicazione del logaritmo su entrambi i fattori coinvolti, trasformandosi graficamente da iperbole equilatera a retta con pendenza negativa.

Nel quadro delle varie tipologie di diabete mellito si configura il diabete mellito gestazionale, ovvero l'intolleranza al glucosio che avviene per la prima volta durante la gravidanza. Come avviene per i soggetti con diabete di tipo 1 o diabete di tipo 2, il Disposition Index viene ampiamente utilizzato nello studio di donne con diabete mellito gestazionale per monitorare i cambiamenti nel rapporto tra secrezione e sensibilità che avvengono durante la gravidanza, caratterizzata da un abbassamento della permeabilità dei tessuti all'insulina. L'affaticamento a carico metabolico che è associato ai nove mesi di gestazione causa numerose complicazioni sia alla madre che al feto, tra i quali rientra il diabete gestazionale, tra i quali effetti a lungo termine figura il diabete mellito di tipo due.

L'associazione tra diabete mellito gestazionale e Disposition Index linearizzato però non è mai stata considerata in letteratura. Lo scopo di questa tesi era evidenziare come implementando il Disposition Index linearizzato su un campione di 120 donne divise in tre gruppi, si potessero rivelare differenze significative tra donne sane e coloro che hanno poi sviluppato diabete di tipo 2 nei dati presi postparto. Per il calcolo del Disposition Index linearizzato sono state adoperate tre indici per la secrezione (AIR, AIRg e AUCins/gluc ricavato dall'area media sotto alla curva di insulina e glucosio) e risultati sono stati messi a confronto tramite rappresentazione grafica, permessa dall'applicazione della regressione lineare. Le rette ottenute sono state associate ai tre gruppi (CNT, PROG e NONPROG): il campione PROG (20 donne) ha rivelato differenze significative rispetto a CNT (42 donne) e NONPROG (58 donne), ovvero la popolazione di controllo e le donne con diabete mellito gestazionale che non hanno sviluppato diabete mellito di tipo due dopo la gravidanza. Avvalorato dai test statistici con cui i tre gruppi sono stati confrontati, i risultati hanno evidenziato differenze significative tra PROG, NONPROG e CNT (p-value <0,001) anche a tempo zero, ovvero anche alle prime misurazioni. Il Disposition Index linearizzato si è dimostrato dunque uno strumento efficace per denotare lo stato patologico anche senza disporre test negli anni successivi al parto, aprendo la

possibilità per una sua implementazione anche per studi futuri nell'individuazione di soggetti proni allo sviluppo di diabete mellito di tipo 2.

## **INDICE**

Introduzione	I
<b>CAPITOLO 1 – IL DISPOSITION INDEX E IL SUO RUOLO NELLA VALUTAZIONE DELLA TOLLERANZA AL GLUCOSIO</b>	
1.1 Fattori che determinano la tolleranza al glucosio	1
1.2 Il Disposition Index	2
1.2.1 <i>Indici di Sensibilità</i>	3
1.2.2 <i>Indici di Secrezione</i>	5
1.3 Linearizzazione	6
<b>CAPITOLO 2 – IL DIABETE</b>	
2.1 Regolazione glicemica e Diabete	8
2.2 Diabete di tipo 1	9
2.3 Diabete di tipo 2	9
2.4 Diabete gestazionale	11
2.5 Disposition Index e Diabete Mellito Gestazionale	14
<b>CAPITOLO 3 – VALUTAZIONE DEL DISPOSITION INDEX LINEARIZZATO COME STRUMENTO PREDITTIVO DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2 IN DONNE CON STORIA PREGRESSA DI DIABETE GESTAZIONALE</b>	
3.1 Dataset	19
3.2 Metodologie	19
3.2.1 <i>Indici utilizzati</i>	19
3.2.2 <i>Calcolo del Disposition Index</i>	20
3.2.3 <i>Linearizzazione e Regressione Lineare</i>	20
3.3 Analisi Statistica	21
3.4 Risultati	22
3.5 Discussione	28

Conclusione

II

Bibliografia

III

## Introduzione

Il diabete mellito gestazionale (GDM) è l'intolleranza al glucosio che si sviluppa per la prima volta durante la gravidanza e fa parte della moltitudine di complicazioni ad essa associate, caratterizzata dalla sensibilità decrescente dei tessuti dell'organismo all'azione regolatrice dell'insulina. Sono molteplici i fattori che conducono allo sviluppo del GDM, ma è di particolare interesse quantificare come i cambiamenti in atto durante la gravidanza modifichino il rapporto che sta alla base del metabolismo del glucosio. Tali cambiamenti, infatti, potrebbero spiegare la propensione di questa popolazione a sviluppare diabete di tipo 2 negli anni a seguire.

La secrezione di insulina e sensibilità dei tessuti alla sua azione, inversamente proporzionali, sono legati da una costante che prende il nome di Disposition Index (DI). Dalla sua prima definizione alla sua implementazione, si è rivelato uno strumento efficace nello studio delle differenze tra soggetti normoglicemici, prediabetici e diabetici, i cui processi metabolici sono evidenziati nell'alterazione del rapporto che sussiste alla base dell'assorbimento del glucosio da parte dei tessuti dell'organismo. Si dimostra quindi di fondamentale importanza comprendere nei soggetti considerati patologici o, comunque, potenzialmente tali, come questo indice vari rispetto a uno standard considerabile in un range di normalità. L'informazione che deriva dal DI è stata sfruttata per caratterizzare la situazione metabolica di donne che sono state affette da GDM e ne è stato dimostrato il suo potere predittivo sulla propensione a progredire verso il diabete di tipo 2. Il problema nell'utilizzo del DI però è insito nella natura matematica che lega questa costante ai due fattori presi in considerazione: la rappresentazione iperbolica di tale indice rende poco immediata la sua lettura, specie per il confronto tra due popolazioni, e poco utilizzata la sua implementazione.

Recentemente, è stata proposta da Mather et al., una versione linearizzata del Disposition Index, il cui scopo è quello di fornire chiarezza nella lettura si pone come indice immediato per la comprensione delle differenze di sensibilità e secrezione nelle popolazioni con diverso stato di tolleranza al glucosio o sottoposti a determinati tipi di trattamento.

Tramite l'utilizzo dei dati forniti dalla collaborazione con l'Istituto di Neuroscienze del CNR di Padova, il lavoro su cui si è focalizzata questa tesi è stato quello di osservare se l'implementazione del DI linearizzato potesse essere utile nella predizione del rischio di sviluppare diabete mellito di tipo 2 a partire dai dati ricavati immediatamente post-parto.

## **CAPITOLO 1 - IL DISPOSITION INDEX E IL SUO RUOLO NELLA VALUTAZIONE DELLA TOLLERANZA AL GLUCOSIO**

### **1.1 - Fattori che determinano la tolleranza al glucosio**

Per il corretto assorbimento del glucosio da parte dell'organismo è fondamentale l'azione dell'insulina, un ormone prodotto a livello pancreatico. Secreta dalle cellule  $\beta$  delle Isole di Langerhans del pancreas, l'azione dell'insulina è fondamentale per il metabolismo di vari componenti quali glucosio, grassi e proteine. La sua produzione e secrezione sono strettamente legati all'assunzione di nutrienti ad alto valore energetico e il suo livello aumenta notevolmente quando l'alimentazione dell'individuo ne è ricca.

L'insulina favorisce l'assorbimento e l'utilizzazione dei carboidrati da parte dei tessuti (grazie alla presenza di recettori insulinici sulla membrana cellulare) e la loro conservazione: i carboidrati vengono immagazzinati nei muscoli e nel fegato sotto forma di glicogeno (i due terzi del glucosio assorbito dal tratto digerente vengono immagazzinati nel fegato) e i restanti subiscono la conversione ad acidi grassi, costituendo dunque la riserva energetica dell'organismo. L'azione dell'insulina interessa anche gli acidi grassi e le proteine, in quanto promuove per i primi la conservazione nel tessuto adiposo, mentre stimola indirettamente la scissione proteina nelle loro componenti elementari, gli amminoacidi, per essere meglio assimilate dalle cellule.

Il compito fondamentale dell'insulina è però la regolazione continua della concentrazione plasmatica del glucosio. Le cellule  $\beta$  sono provviste di numerosi di *trasportatori di glucosio*, i quali fanno sì che l'entità dell'ingresso di quest'ultimo all'interno della cellula sia proporzionale alla glicemia.

Durante il digiuno l'insulina secreta è dell'ordine di 25 ng/ml su kg di peso corporeo e il livello di glicemia basale si dovrebbe aggirare tra i 70 e i 90 mg/dl. In concomitanza dell'assunzione di nutrienti e con l'innalzamento della glicemia sopra a 100 mg/dl, la secrezione di insulina subisce un aumento di 10-25 volte al livello basale e ugualmente rapido è il suo decadimento all'interno dell'organismo che avviene 3-5 minuti dopo del rientro della glicemia a livelli regolari. Questo è un meccanismo di *feedback* estremamente importante per la regolazione del livello glicemico nel sangue. L'aumento del glucosio provoca l'aumento della secrezione di insulina e quest'ultima favorisce il trasporto del glucosio nelle cellule del fegato, dei muscoli e di altri tessuti, facendo ritornare la glicemia a valori basali. Quando viene messa in circolo, l'insulina è per quasi la sua totalità slegata da molecole di trasporto e ha un'emivita di circa soli 6 min, per cui la maggior parte viene rimossa dal flusso sanguigno in un intervallo di 10-15 min. A livello cellulare, per iniziare ad agire sui tessuti interessati

l'insulina deve combinarsi con una proteina recettrice della membrana e attivarla. Dopo solo alcuni secondi dal legame dell'insulina con il recettore di membrana, le cellule diventano permeabili al glucosio che attraversa la membrana subendo fosforilazione ed essere utilizzato.

L'azione sinergica dell'insulina e di un altro prodotto pancreatico, il glucagone, favorisce il mantenimento costante del livello basale di glicemia. Il glucagone prodotto dalle cellule  $\alpha$  delle isole di Langerhans ha azione antagonista rispetto all'insulina: durante il digiuno favorisce la glicogenolisi epatica, ovvero il processo metabolico a cascata che riporta le riserve epatiche di glicogeno sotto forma di glucosio, così da rimetterle in circolo. Dunque, l'aumento del livello glicemico sopprime la produzione di glucagone, per via della natura antagonista di tale ormone. L'azione sinergica dei due ormoni e tutte le operazioni di bilanciamento del glucosio nel sangue prende il nome di *omeostasi*.

[1]

## **1.2 - Il Disposition Index**

Per valutare il corretto funzionamento delle cellule  $\beta$  è importante indagare il rapporto che intercorre tra la secrezione e la sensibilità da parte dei tessuti bersaglio all'insulina. Come precedentemente accennato, tra i due vi è una relazione di proporzionalità inversa: a una minore sensibilità è associata una maggior secrezione e dunque maggior carico a livello pancreatico.

In condizioni di normalità fisiologica, la relazione è esprimibile tramite iperbole equilatera la cui costante di proporzionalità prende il nome di Disposition Index (DI) come teorizzato per la prima volta da Khan et al.<sup>[2]</sup>, che si può definire tramite la relazione matematica che segue:

$$DI = \text{Secrezione} \cdot \text{Sensibilità} \quad (1)$$

Quantificare questa costante, dunque, fornisce la possibilità di guardare in modo diretto al lavoro compiuto dal pancreas per compensare la crescente resistenza all'insulina (data, ad esempio, dalla gravidanza o dall'insorgenza di deterioramento della tolleranza al glucosio). La perdita di funzione delle cellule  $\beta$  è rintracciabile nel cambiamento della curva del grafico: se è ridotta l'abilità nel regolare il meccanismo di produzione e assorbimento, l'iperbole è più vicina all'origine rispetto a quella che corrisponde a un individuo sano.<sup>[2]</sup>

L'importanza del calcolo del DI risiede nella possibilità che esso possa essere d'aiuto per predire futuri casi di diabete mellito di tipo 2 (T2D), andando ad arginare sintomatologie più gravi che possono esordire con il manifestarsi del T2D o ritardandone la vera e propria comparsa, focalizzandosi nella modifica diretta su elementi come alimentazione e stile di vita.

### 1.2.1 - Indici di Sensibilità

Durante il primo studio atto a dimostrare la natura matematica della relazione tra sensibilità al glucosio fatto da Kahn et al.<sup>[2]</sup> per verificare la capacità dell'insulina a far fronte allo stimolo glicemico si è adoperato il **modello minimo** (*minimal model*) (eq. 2, eq. 4, eq. 6) per il calcolo della  $S_I$  (Insulin Sensitivity). Nel 1979 Bergman e Cobelli<sup>[3]</sup> hanno elaborato questo modello matematico per permettere, tramite l'utilizzo di due equazioni differenziali, la quantificazione dell'azione insulinica quanto concerne l'azione fisiologica di omeostasi, quindi al ritorno a un livello glicemico basale, permettendo dunque di stimare i valori di sensibilità all'insulina  $S_I$  (attraverso il rapporto degli indici  $p_2$  e  $p_3$ ) e la *glucose effectiveness*  $S_G$ , che quantifica la capacità di autoregolazione del glucosio stesso.

$$\frac{dX}{dt} = -p_2 \cdot X(t) + p_3 \cdot (I(t) - I_b) \quad (2)$$

$$X(0) = 0 \quad (3)$$

$$\frac{dG}{dt} = -\{S_g + X(t)\} \cdot G + S_G G_b \quad (4)$$

$$G(0) = G_0 \quad (5)$$

$$SI = p_3/p_2 \quad (6)$$

È stata presa in analisi l'insulina che dal plasma migra verso il liquido interstiziale per poi arrivare alle cellule bersaglio, definita da Bergman appunto come insulina interstiziale (ISF). La prima equazione fa appunto riferimento alla cinetica dell'insulina, in cui  $X(t)$  rappresenta la concentrazione periferica dell'insulina,  $I(t)$  è la concentrazione plasmatica dell'insulina e  $I_b$  è l'insulina basale. La dinamica del glucosio è descritta dalla eq.2, nei cui termini compare la *glucose effectiveness* e il glucosio basale.<sup>[4]</sup>

Nella pratica clinica, nonché negli studi presi in considerazione per l'analisi dell'utilizzo del Disposition Index, gli indici più utilizzati sono il *Matsuda Index* da *test da carico orale di glucosio* ( $ISI_{ogtt}$ ) e l'*Homeostasis Assessment Model* (HOMA), spesso posto in confronto diretto con lo stesso DI. Il Matsuda Index (eq. 7) si pone di stimare la sensibilità dell'insulina di tutto il corpo sia a livello epatico che dei tessuti periferici<sup>[5]</sup>. Vengono utilizzati i dati ricavati dal test a curva da carico del glucosio (OGTT) a due e tre ore e sia a digiuno, rappresentati da  $G_0$  (mg/dl) e  $I_0$  ( $\mu$ U/l) e  $G_{mean}$  e  $I_{mean}$ .

$$ISI_{(Matsuda)} = \frac{10000}{\sqrt{G_0 \cdot I_0 \cdot G_{mean} \cdot I_{mean}}} \quad (7)$$

L'indice così ricavato si avvale di due fattori correttivi: la radice al denominatore che permette il calcolo su una distribuzione di valori non-lineare, la costante al numeratore che stringe il range dei valori possibili tra zero e 12.

L'HOMA è un modello utilizzato nella stima dell'insulino resistenza (prendendo la notazione HOMA-IR o  $IR_{HOMA}$ ) e della funzionalità delle cellule- $\beta$ , tramite i valori di glicemia basale e la concentrazione a digiuno di insulina o c-peptide, fornendo uno strumento robusto e descrittivo tramite l'utilizzo di equazioni non lineari derivate. È un modello ampiamente utilizzato soprattutto a scopo clinico, ma anche epidemiologico per la stima dell'insulino resistenza per via della sua robustezza. L'equazione proposta da Matthews et al. per il calcolo dell' $IR_{HOMA}$  (eq.8) è la seguente, e i valori  $G_0$  (mmol/l) e  $I_0$  ( $\mu$ U/l) fanno riferimento alla glicemia e all'insulina basale entrambe divise per un fattore di normalizzazione, 22,5 che indica il valore del prodotto dei valori della concentrazione di insulina, 5  $\mu$ U/l, e di glucosio plasmatico, 4,5 mmol/l, in un individuo sano.<sup>[6]</sup>

$$IR_{HOMA} = (I_0 \cdot G_0)/22,5 \quad (8)$$

Lungamente utilizzato nella pratica clinica è stata la tecnica dell'*euglycemic insulin clamp*, che permette tramite la misurazione del livello dell'insulina allo stato stazionario mentre la concentrazione plasmatica del glucosio viene mantenuta in range normoglicemici, ricavando così la concentrazione insulinica allo stimolo glucidico ( $M$ ) e la sensibilità all'insulina ( $M/I$ , ove  $I$  rappresenta la concentrazione dell'insulina a livello stazionario)<sup>[5]</sup>. Questo metodo consente il calcolo simultaneo (come verrà di seguito riportato) della sensibilità di tutto il corpo all'insulina e al funzionamento delle  $\beta$  cellule. Dall'*hyperinsulinemic euglycemic clamp* (o curva HEC), approfondito maggiormente per quanto riguarda il funzionamento delle  $\beta$ -cellule, si ricava la misurazione della sensibilità all'insulina, essendo un metodo esaminativo dei processi che coprono l'intero metabolismo del glucosio ( $ISI_{HEC}$ ). L'  $ISI_{HEC}$  è ricavato nel seguente modo, visibile nell'eq. 9:

$$ISI_{HEC} = MCR/I_{MEAN} \quad (9)$$

$$MCR = M_{MEAN}/(G_{MEAN} \cdot 0,18) \quad (10)$$

In cui MCR indica il *metabolic clearance rate* (ml/kg/min) e rappresenta il rapporto tra il glucosio metabolizzato dall'organismo espresso come media allo stato stazionario ( $M_{MEAN}$ , mg/kg/min) e la concentrazione media di glucosio sanguigno allo stato stazionario ( $G_{MEAN}$ , mmol/l).  $I_{MEAN}$  ( $\mu$ U/ml) è la concentrazione media di insulina plasmatica allo stato stazionario.

### 1.2.2 - Indici di Secrezione

Nello studio di Kahn et al. [2] su un campione di 93 volontari, l'attività delle cellule beta è stata misurata tramite l'analisi dell'*Acute Insulin Response* (AIR) dopo uno stimolo glucidico (AIR<sub>glucose</sub>) e in risposta all'arginina (*AIR to Arg*). L'AIR<sub>glucose</sub> consiste nel calcolo dell'innalzamento medio della glicemia dal livello basale a 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 minuti dopo la somministrazione per via endovenosa di una quantità di glucosio pari a 300 mg per chilo di peso del paziente preso in esame. L'AIR segue le variazioni della secrezione insulinica immediatamente dopo lo stimolo: fisiologicamente all'assunzione di nutrienti ad alto contenuto glucidico comporta una rapida risposta da parte del pancreas dai 3 ai 5 minuti immediatamente successivi allo stimolo, decadendo poi dopo. Il secondo picco secretivo è a dieci minuti dopo fino ad assestarsi al raggiungimento del livello basale di glicemia, nonché tempo di registrazione utile per la misurazione dell'AIR.

Quello che è stato lungamente definito come golden-standard della quantificazione del funzionamento delle  $\beta$ -cellule è la curva HEC, che si basa sulla somministrazione di glucosio per via endovenosa in due distinti intervalli di tempo di due dosi di glucosio: la *priming dose* che serve ad innalzare la glicemia sino a raggiungere i 125 mg/dl e la *maintenance dose* ossia dosi di glucosio atte a mantenere costante il picco glicemico nel tempo, metodologia affine all'*euglycemic insulin clamp*. La ripetitività dello stimolo secretivo di insulina (o c-peptide) permette la quantificazione precisa della prima e della seconda risposta a essi.[7]

Il primo stimolo attiva immediatamente le beta-cellule, liberando delle l'insulina già prodotta. Si nota come la differenza nella risposta metabolica sia differente tra gli individui con glicemia basale poco al di sopra del livello glicemico raggiunto con la *priming dose* e totalmente assente in individui con T2D. La seconda fase dell'HEC test avviene in concomitanza alla prima, in cui si ha il graduale innalzamento del livello insulinico e di c-peptide. Nelle prime fasi del T2D la risposta è ancora evidente, ma viene persa con il progredire della perdita di funzione delle cellule beta.

È un metodo che si è abbandonato progressivamente per via del costo e della difficoltà di esecuzione, siccome necessita sia di iniezione intravenosa contemporaneamente al prelievo, nonché è fondamentale il mantenimento di un livello glicemico regolare durante tutta la durata del test (dalle due alle tre ore) e quindi la variazione della somministrazione glucidica da parte di personale competente [6].

### 1.3 - Linearizzazione

La relazione su cui si basa il DI non è lineare. Abbiamo inizialmente definito il rapporto come una semplice relazione di proporzionalità inversa ponendo il DI come costante tra i due termini, ma volendo dare un'interpretazione più accurata e più simile a ciò che viene ricavato dai valori misurati è possibile riscriverla come indicato nell'eq.11.

$$Secrezione = k \cdot Sensibilità^{-\alpha} \quad (11)$$

Dove  $k$  corrisponde al valore della costante DI e  $\alpha$  rappresenta la pendenza dell'iperbole, generalmente supposta pari a -1. [8]

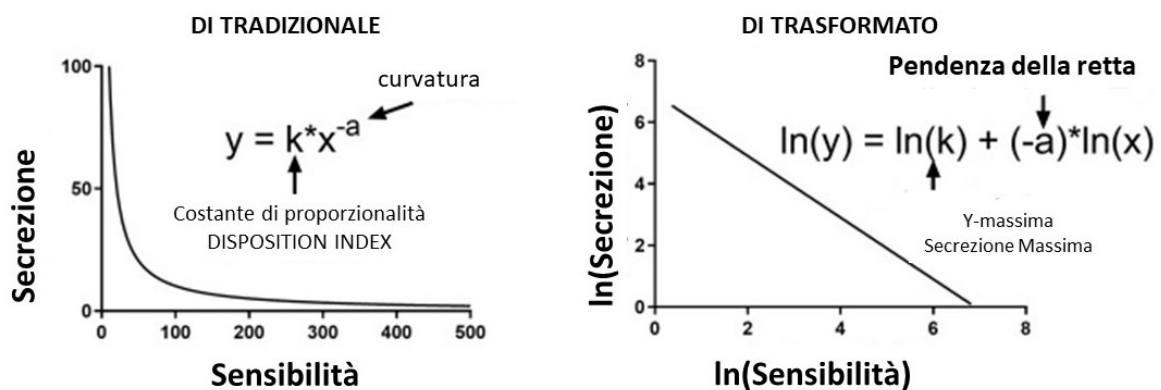
Pur esprimendo in forma grafica il rapporto che concorre tra i due, la forma esponenziale non è di interpretazione chiara per il confronto tra dati che sottolineano il diverso comportamento delle cellule  $\beta$  sottoposte a differenti condizioni.

Per espandere le conoscenze fisiologiche fornite dalla relazione tra secrezione e sensibilità, l'operazione di linearizzazione viene incontro alle esigenze di comprendere quanto le probabili mancanze dell'uno o dell'altro fenomeno contribuiscano alla diagnosi e al monitoraggio del diabete mellito di tipo due.

Applicando l'operatore logaritmo nell'eq. 12, si ottiene la seguente forma lineare:

$$\ln(y) = \ln(k) - \alpha \ln(x) \quad (12)$$

Ove  $\ln(k)$  rappresenta l'intercetta dell'asse delle ordinate, corrispondente al valore massimo di secrezione. La pendenza della retta ottenuta equivale a quella curva della prima relazione illustrata nella Figura 2, generalizzata con il termine  $\alpha$  (sempre diverso da zero nelle popolazioni con un normale rapporto tra secrezione e assorbimento), nel caso in cui l'iperbole non sia equilatera.



**Figura 1** Rappresentazione grafica della curva non linearizzata sensibilità-secrezione e la sua linearizzazione. (Linearization of the Disposition Index equation allows evaluation of secretion-sensitivity coupling slopes) [8]

Questa metodologia d'approccio si dimostrata efficace nell'evidenziare i cambiamenti dopo trattamenti farmacologici (Kile et al. <sup>[9]</sup>) estrapolati da un set di dati ricavati da test da carico orale di glucosio (OGTT). L'approccio standard per il calcolo del DI prevede la misura simultanea di secrezione e sensibilità, poste come due variabili separate e indipendenti. Per studiare gli effetti della cura farmacologica, è stata adottata un'analisi multivariata, con secrezione e sensibilità poste entrambe come variabili reciprocamente dipendenti, permettendo dunque di compiere uno studio simultaneo delle due variabili. La regressione multipla è stata utilizzata per verificare la relazione e il legame tra i due cambiamenti nel tempo. Ciò non è possibile se il DI non è linearizzato. L'importanza di questo approccio risiede nella possibilità di estrapolazione immediata della pendenza del DI linearizzato e dell'ottenimento del valore dell'intercetta con l'asse delle ordinate.

## CAPITOLO 2 - IL DIABETE

### 2.1 – Regolazione glicemica e Diabete

Mantenere costante il livello basale della glicemia è fondamentale per il corretto mantenimento delle regolari funzioni dell'organismo. Come già accennato nel capitolo precedente, l'insulina favorisce l'ingresso del glucosio e la sua utilizzazione nelle cellule, ad eccezione di quelle cerebrali. Difatti, i neuroni ne sono direttamente permeabili senza la necessità dell'azione intermedia di dell'insulina (che sulle cellule del sistema nervoso ha effetto pressoché nullo). È necessario, dunque, che il livello di glucosio nel sangue abbia valori che rientrino in precisi range così da assicurare il supporto continuo a strutture come il cervello (direttamente dipendente dal glucosio) e i tessuti della retina e quello germinativo delle gonadi. Se il valore dovesse essere troppo basso vi sarebbe il rischio che si possa verificare shock ipoglicemico. L'ipoglicemia si raggiunge quando il livello di glucosio nel sangue a digiuno scende sotto la soglia di 70 mg/dl o di 3,9 mmol/l. <sup>[10]</sup>

D'altra parte, una glicemia elevata comporta notevoli problemi, come la disidratazione cellulare provocata dalla maggior pressione osmotica dei liquidi extracellulari, perdita di glucosio attraverso le urine e conseguente perdita d'acqua per l'organismo per diuresi osmotica, che potrebbe provocare una riduzione del patrimonio elettrolitico dell'organismo e danneggiamento di vari tessuti, in particolare, dei vasi sanguigni. L'iperglicemia è contraddistinta da livelli di glucosio sanguigni superiori a 125 mg/dl a digiuno o 180 mg/dl due ore dopo un pasto <sup>[11]</sup>. Quando il normale rapporto di secrezione e assorbimento del glucosio non è più garantito o è compromesso, si parla di **diabete mellito**. I di due tipi di diabete mellito maggiormente discussi sono:

- Diabete di tipo 1 (*type one diabetes*, T1D o diabete *insulino-dipendente*)
- diabete di tipo 2 (*type 2 diabetes*, T2D o '*non insulino-dipendente*')

Il diabete è sovente preceduto da una fase preliminare detta **prediabete**, in cui i valori di glicemia nel sangue sono mediamente più elevati ma sotto la soglia del patologico (dai 100 mg/dl concentrazione della glicemia plasmatica ai 125 mg/dl a digiuno <sup>[12]</sup>). Il **diabete gestazionale** (gestational diabetes mellitus – GDM) rientra invece nelle tipologie di diabete e ha la sua prima comparsa durante la gravidanza: contraddistinto da uno scorretto funzionamento del meccanismo secrezione-assorbimento.

## **2.2 - Diabete di Tipo 1**

Il diabete di tipo 1 (*type one diabetes*, T1D o diabete *insulino-dipendente*) è causato dalla distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas, non più in grado di produrre insulina per attivare i processi metabolici di assorbimento di glucosio da parte delle cellule. Questo tipo colpisce circa il 5-10% dei pazienti diabetici.<sup>[1]</sup> Chiamato in precedenza *diabete giovanile* (poiché, generalmente, si sviluppa prima dei vent'anni), tale definizione appare ora superata, in quanto questa patologia non è definita unicamente dalla discriminante dell'età infantile e/o adolescenziale <sup>[1]</sup>.

Sono molteplici le cause che conducono all'insorgere del T1D: malattia cronica autoimmune, la predisposizione genetica è un elemento importante che concorre al suo sviluppo. Anche taluni fattori ambientali di rischio possono determinarne l'insorgenza, sebbene la loro natura sia ancora poco definita. Il T1D può, tuttavia, svilupparsi anche a seguito di infezioni virali o patologie che corrompono la regolare funzione delle beta-cellule pancreatiche.

Il T1D può manifestarsi all'improvviso, in un arco di tempo che va da qualche giorno a poche settimane e tale processo ha inizio in concomitanza del mancato assorbimento di glucosio da parte delle cellule. L'innalzamento della concentrazione plasmatica di glucosio raggiunge picchi di 300-1200 mg/100 ml e tale livello, se non propriamente monitorato, è alla base del danneggiamento di tessuti (soprattutto vascolari, cardiaci e nervosi) nonché disidratazione cellulare. <sup>[1]</sup>

Alla sua diagnosi concorre anche l'individuazione di auto-anticorpi (*Islet autoantibodies*, IAbs) <sup>[13][14]</sup>, importanti biomarcatori la cui presenza è indice della progressione della perdita di massa delle beta-cellule e che ci aiuta a stimare il rischio del paziente di sviluppare il T1D. La presenza degli IAbs lascia una finestra temporale piuttosto ampia al pieno sviluppo della malattia, in quanto l'aumento della loro concentrazione avviene persino anni prima di una vera e propria diagnosi.

## **2.3 - Diabete di Tipo 2**

Il diabete di tipo 2 (*type 2 diabetes*, T2D o diabete '*non insulino-dipendente*') è la forma più diffusa, in quanto costituisce il 90-95% dei casi di diabete mellito. Contrariamente al T1D (che è legato a una disfunzione diretta delle cellule- $\beta$ ), il T2D è caratterizzato dall'aumento dei livelli plasmatici dell'insulina (*iperinsulinemia*), che è dato dalla diminuzione della sensibilità dei tessuti bersaglio all'azione metabolica di quest'ultima. Il mancato assorbimento dell'insulina da parte delle cellule modifica i meccanismi di assorbimento e immagazzinamento dei glicidi, provocando dunque l'aumento della concentrazione di glucosio nel sangue, che viene compensato da una maggior secrezione di insulina da parte del pancreas.

L'obesità è un elemento chiave che concorre allo sviluppo della patologia.<sup>[15]</sup> I due fenomeni sono collegati dalla resistenza all'insulina, l'obesità difatti concorre ai meccanismi che rendono meno efficace l'assorbimento di tale ormone: la sensibilità all'insulina da parte dell'organismo varia nel corso della vita dell'individuo in concomitanza a cambiamenti dello stile di vita e della dieta, ma un altro fattore fondamentale per lo sviluppo dell'insulino-resistenza è l'aumento della quantità di tessuto adiposo (e quindi dell'indice della massa corporea o *BMI – body mass index*), soprattutto in area addominale.<sup>[15]</sup> Non è ancora chiaro il legame che sussiste tra l'aumento di peso, specie l'obesità, e il T2D, ma si ipotizza che nel paziente obeso vadano a diminuire i recettori dell'insulina, specialmente nel fegato, nel tessuto muscolare scheletrico e adiposo.

Molti pazienti sviluppano insulino-resistenza ma non il T2D, in quanto l'effetto compensatorio del pancreas riesce a impedire gravi alterazioni del metabolismo del glucosio, ma se tale fenomeno perdura l'insulina perde gradualmente i suoi effetti metabolici. La prima fase del T2D è caratterizzata da alti livelli glicemici (iperglicemia) dopo i pasti, mentre nella fase più avanzata della malattia le cellule  $\beta$  vengono gradualmente danneggiate e perdono la capacità di produrre quantità sufficienti di insulina per far fronte l'iperglicemia.

La resistenza all'insulina può migliorare grazie alla cura farmacologica, la diminuzione del peso e cambiamenti nello stile di vita, sebbene raramente torni a livelli equiparabili a quelli di un paziente sano. Altri fattori di rischio per lo sviluppo del T2D oltre all'obesità sono l'età, uno stile di vita sedentario e sregolato (come il consumo assiduo di alcol e il fumo)<sup>[15]</sup>. È più frequente nelle donne con diabete mellito gestazionale (GDM), pazienti con ipertensione o dislipidemia. Nelle donne con pregresso GDM l'affaticamento metabolico a carico delle cellule  $\beta$  durante la gravidanza ha ripercussioni sulla regolazione del livello glicemico anche dopo il parto, peggiorando sino a sfociare in diabete mellito di tipo 2.<sup>[17]</sup>

Prima di arrivare a sviluppare il diabete, può esistere una fase di transizione definita **prediabete**. È caratterizzata, come il diabete, da concentrazione plasmatica del glucosio sopra la norma ma sotto la soglia del patologico. Ogni anno, a circa il 5-10% dei pazienti prediabetici viene data una diagnosi di diabete. La stessa percentuale è legata agli individui che tornano ad avere livelli glicemici regolari. Il numero di coloro che hanno una diagnosi di prediabete cresce di anno in anno e si stima che entro il 2040 colpirà circa 642 milioni di persone.<sup>[18]</sup>

## 2.4 - Il Diabete Mellito Gestazionale

Il **Diabete Mellito Gestazionale (GDM)** è definito come la prima comparsa di iperglicemia durante la gravidanza, rappresentando una delle sue complicazioni più frequenti.

La progressiva perdita di sensibilità all'insulina è tipica della gestazione: inizia solitamente a metà gravidanza sino a giungere al terzo trimestre, in cui i valori della resistenza all'azione dell'insulina sono equiparabili a quelli di un paziente affetto da T2D. <sup>[19]</sup> Per contrastare questo fenomeno, il pancreas aumenta la secrezione di insulina per tornare ad avere livelli di assorbimento del glucosio regolari. I fattori che sono generalmente da imputare al mancato assorbimento del glucosio da parte dei tessuti sono:

- l'aumento del tessuto adiposo, soprattutto in area addominale (fattore che abbiamo già citato quanto riguarda il T2D)
- la secrezione di ormoni che inibiscono l'azione dell'insulina, tra i quali spicca l'*ormone lattogeno placentare*: di comportamento simile all'ormone della crescita, questo prodotto della placenta è responsabile dei cambi metabolici dell'organismo materno atti a supportare la crescita e il nutrimento del feto. Dopo il parto, la sensibilità all'insulina cresce e questo dimostra che i maggiori contribuenti siano appunto gli ormoni placentari. <sup>[20][21]</sup>

Il GDM, dunque, si inserisce nel quadro dei grandi cambiamenti metabolici che avvengono durante i nove mesi di gestazione. Quali sono quindi le principali differenze che contraddistinguono il fisiologico dal patologico? Coloro che soffrono di GDM hanno in base una resistenza cronica all'azione dell'insulina alla quale i fattori esterni (l'aumento di peso e gli ormoni placentari) rappresentano soltanto un'aggiunta a disfunzioni già presenti nelle cellule  $\beta$ , ma che favoriscono una sensibilità di gran lunga minore rispetto alle donne senza GDM. Non è quindi l'organismo incapace a far fronte al bisogno fisiologico di insulina, ma è il rapporto tra secrezione e assorbimento ad essere alterato. Come si può vedere, difatti, dalla Figura 2 le due curve presentano simile andamento ma la curva che delinea il GDM appare circa più bassa del 50% (ossia assorbe la metà dell'insulina per ogni grado di resistenza).<sup>[22]</sup>

Dopo la gravidanza, infatti, i valori di secrezione e assorbimento si assestano, anche se studi <sup>[23][17]</sup> sottolineano come, a differenza di pazienti non diabetiche, la relazione tra secrezione e assorbimento e, dunque, la conseguente resistenza all'insulina rimane fortemente alterata. Nel

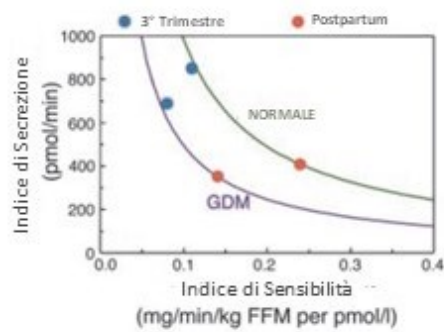
campione studiato da Xiang et al. <sup>[17]</sup>, ad esempio, le pazienti con GDM hanno subito una perdita all'incirca pari al 67% del potere del pancreas a contrastare l'insulino-resistenza dei tessuti dopo la gravidanza. Dal monitoraggio per il GDM si esclude un ristretto gruppo di persone che rientrano in queste categorie:

- età sotto i 25 anni
- normopeso prima della gravidanza (BMI-  $\leq 25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ )
- l'assenza di parentele dirette con pazienti recanti diabete mellito
- nessuna storia pregressa di iperglicemia o gravidanze particolarmente problematiche (aborti spontanei, nati morti, etc.) <sup>[24][25]</sup>

In tutti gli altri casi, è necessario procedere al monitoraggio delle pazienti durante la gravidanza e dopo specie se dinnanzi a pazienti obese, con storia pregressa di GDM o coloro che hanno partorito bambini con peso superiore ai quattro chilogrammi (*macrosomia infantile*).

Seppure la diagnosi sia tipica a partire, indicativamente, dal secondo trimestre in poi possono esserci presenti già indizi sullo sviluppo in atto del GDM: possono essere rilevati cambiamenti nelle concentrazioni di glucosio nel fluido amniotico dal primo trimestre e una crescita eccessiva del feto <sup>[24]</sup>. Anche l'individuare la presenza di opportuni marcatori e determinati analiti potrebbero rappresentare informazioni importanti per il suo successivo sviluppo.

Le **complicazioni** a cui vanno incontro le pazienti con GDM riguardano sia la madre che, soprattutto, il feto.



**Figura 2** rappresentazione grafica della curva secrezione-assorbimento (DI). In verde mostra il rapporto nel paziente sano, in viola quello con GDM (da tradurre). Gestational diabetes mellitus [22]

Lo sforzo metabolico a cui è sottoposto l'organismo materno coinvolge in particolar modo le cellule pancreatiche. Come già citato in precedenza, alla resistenza all'insulina è associata una secrezione maggiore dell'ormone per assicurarsi il corretto assorbimento del glucosio. Qualsiasi disfunzione di tale meccanismo si traduce in un'alterata concentrazione del suddetto nel sangue, che ha il suo culmine con il manifestarsi del GDM. Inserendosi dunque in un pregresso sovraccarico delle cellule  $\beta$ , il deterioramento può diventare cronico conducendo allo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 e il rapporto tra donne con GDM e coloro che svilupperanno il T2D appare del 50% dieci anni dopo il parto. L'*American Diabetes Association* suggerisce difatti monitoring costante (per la precisione, ogni tre anni) nelle donne con pregresso GDM, dopo l'OGTT a sei e dodici settimane dopo il parto. [24] I fattori da tenere in considerazione al suo sviluppo sono sia genetici (come parentele dirette con paziente con diabete), sia riguardano età, stile di vita e i valori assunti dagli indici glicemici durante la gravidanza. Anche disturbi a livello cardiovascolare sono comuni in donne con pregresso diabete gestazionale, correlato più o meno strettamente con lo sviluppo simultaneo di diabete mellito dopo la gravidanza. [24][25]

Nel feto le conseguenze dell'iperglicemia materna sono riscontrabili anzitutto nel peso alla nascita, maggiore di quello di bambini con madri con livelli glicemici nella norma: la sovrabbondanza di nutrienti a livello placentare è alla base della macrosomia infantile. Come esposto dallo studio *Exponing Perinatal Outcomes among Children* (EPOCH) [26], le conseguenze (aumento di circonferenza addominale, della diversa distribuzione del tessuto adiposo e di BMI) sono visibili sia alla nascita che durante l'età infantile e puberale. Complicazioni riguardanti allo sviluppo successivo o predisposizione al T2D sono indipendenti dal peso alla nascita, ma legati al periodo di contatto con il GDM. [25]

## **2.5 - Disposition Index e Diabete Mellito Gestazionale**

Il DI è uno strumento efficace del quale ci si avvale per il corretto controllo del funzionamento delle cellule  $\beta$  valido sia a scopo preventivo che nel monitoring durante e post gestazione di donne con probabile o progresso GDM. Il DI si rivela di fondamentale importanza nello studio della risposta pancreaticata mettendo in luce la perdita di funzione o a un difetto delle cellule  $\beta$ . La rappresentazione numerica tramite Disposition Index della resistenza all'azione dell'insulina rivela molte più informazioni riguardo la risposta pancreaticata, che una mera analisi sugli effetti compensatori dell'insulina sull'organismo.

Considerata, difatti, la natura di costante proporzionale del DI, per mantenerne, ad esempio, il valore pari a 800 un soggetto sano con un indice di sensibilità all'insulina pari a  $2.0 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1} \text{ per pmol/l}$  la secrezione insulinica dovrebbe essere all'incirca di 400 pmol/l, ma se la capacità di rispondere agli stimoli metabolici diminuisce dell'80% (come durante il terzo trimestre di gravidanza o con GDM) la secrezione dovrebbe aumentare cinque volte tanto per ottenere uno stesso DI, provando dunque che a parità di effetto il lavoro svolto a monte delle isole di Langerhans sia profondamente differente tra un soggetto sano e uno no. Un singolo parametro, dunque, può fornire l'adeguata risposta dell'organismo a qualsiasi stimolo glucidico a cui è sottoposto. <sup>[27]</sup>

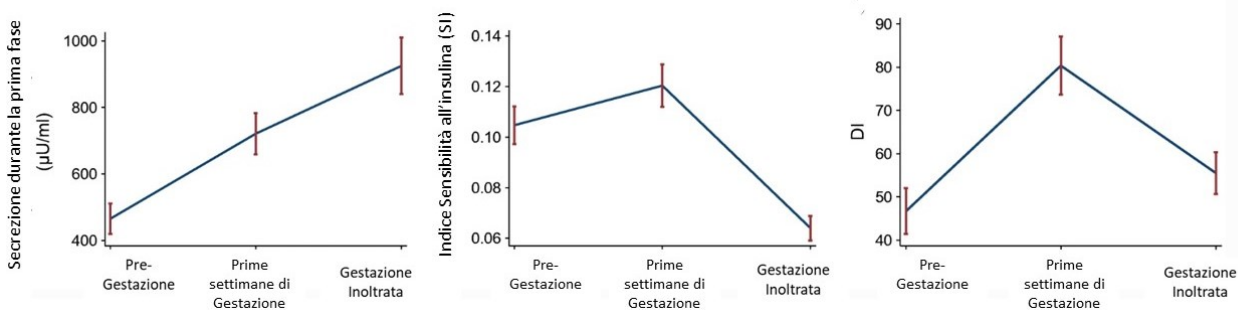
Per il calcolo del DI si fa solitamente riferimento ai risultati del *test di carico orale a curva di glucosio* (OGTT) o *il test da carico endovenoso di glucosio* (IVGTT).

Un esempio concreto su come vari il DI durante la gravidanza è fornito dallo studio condotto da Powe et al. <sup>[28]</sup> su un campione di 34 donne (19 con una normale tolleranza al glucosio prima e durante la gravidanza e 15 che hanno sviluppato GDM). Nel primo periodo di gestazione, si sono evidenziati cambiamenti per quanto riguarda la secrezione di insulina (tramite IVGTT) durante le prime settimane, tenendo conto della sensibilità (curva *hyperinsulinaemic-euglycaemic*, gold standard per l'analisi della sensibilità), tramite il confronto di tali valori, indipendentemente misurati, con quelli

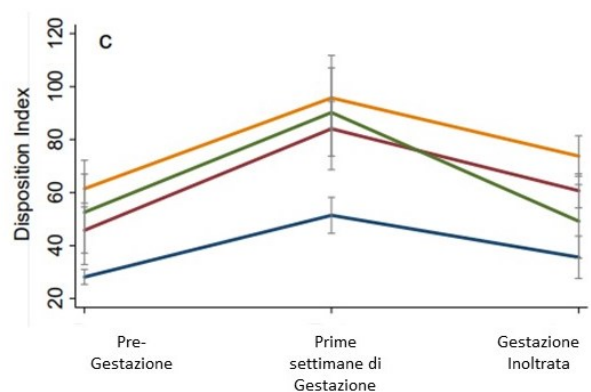
ricavati prima e a gravidanza inoltrata. Si è avvalso del Disposition Index per confronto dei cambiamenti analizzati nei tre stadi presi in considerazione.

Come visibile dalla Figura 3, all'aumento del livello di secrezione medio è accompagnato un significativo innalzamento del DI dalla prima della gravidanza alle prime settimane (46.7 a 80.4,  $p < 0.0001$ ), mentre ha subito una diminuzione fino allo stadio avanzato (da 80.4 a 55.5,  $p = 0.0001$ ), e andamento simile si ha con la sensibilità. Non vi sono differenze statistiche significative nell'analisi di donne con obesità e GDM, in quanto i grafici percorrono lo stesso andamento Figura 4 (con media, rispetto al valor medio, inferiore di 22.3,  $p = 0.007$ ).

L'aumento iniziale della secrezione dell'insulina legato all'innalzarsi del DI è originariamente disgiunto dalle variazioni della sensibilità tipiche della gravidanza già inoltrata, mentre è correlato alla presenza degli ormoni placentari (così come è stato precedentemente citato come fattore di interesse che concorre alle modificazioni metaboliche della gestazione) e alle citochine (in questo caso sono state considerate leptina, ormone prodotto dal tessuto adiposo, e  $TNF-\alpha$ ). La secrezione maggioritaria e il conseguente aggiustarsi del DI non rappresentano che, secondo Powe et al. [28], una normale risposta fisiologica delle modificazioni dell'organismo. Alla gravidanza concorre dunque



**Figura 3** variazioni medie dell'andamento sincrono di secrezione, sensibilità e DI prima e durante la gravidanza. [28]



**Figura 4** Il grafico mostra gli andamenti del GDM delle casistiche particolari prese in considerazione dallo studio (corredato da errore standard). In blu, l'andamento del DI in donne con GDM non obese, in verde le donne obese con GDM, in giallo donne normoglicemiche con obesità e in rosso donne normo-glicemiche non obese. [28]

un basale cambiamento fisiologico (come anche evidenziato dalle variazioni del DI), scollegato all'insorgenza o meno di GDM.

Contrariamente, fattori come ormone lattogeno placentare, adipochine e citochine nello studio su donne con GDM allo stadio finale della gravidanza eseguito da Waters et al.<sup>[29]</sup> ha sottolineato tramite l'analisi della variazione della sensibilità all'insulina IS<sub>OGTT</sub> (*Matsuda Insulin Sensitivity Index*) e del DI durante tre precisi segmenti temporali, la mancata correlazione tra i fattori tipicamente ormonali della gravidanza e dell'andamento dei due indici. Il DI è aumentato nel periodo immediatamente successivo al parto e diminuito nel periodo dalle 6 alle 12 settimane, evidenziando un peggioramento della sensibilità all'insulina.

Tra le conseguenze a lungo termine del GDM vi rientrano il probabile sviluppo di T2D, causato dalla compromissione del funzionamento delle beta cellule. La letteratura scientifica si è focalizzata sia sulle disfunzioni a monte cellulare sia sulle conseguenze che esse hanno nell'immediato e nelle settimane o anni che seguono la gravidanza, nonché sulla correlazione tra differente background etnico e conseguenze sui figli nati da gravidanze caratterizzate da GDM.<sup>[30][31]</sup>

Nello studio diretto delle disfunzioni a carico delle cellule  $\beta$ , prendiamo in analisi quello condotto da Shaisho et al.<sup>[32]</sup> e da Genova et al.<sup>[33]</sup>: entrambi svolti su un campione di donne con GDM assieme a uno di controllo.

Il DI è stato ricavato moltiplicando l' $AUC_{glu/ins}$  (il rapporto tra le aree sottese alla curva dell'insulina e quella del glucosio) e l'IS da OGTT (con somministrazione di 75g di glucosio e il controllo del livello di glicemia dopo due ore)<sup>[32]</sup>, con lo scopo di evidenziare le disfunzioni a carico delle  $\beta$ -cellule similmente quanto svolto da Genova et al.<sup>[33]</sup>, che si è avvalso sia del DI che del HOMA-B (*homeostatic model assessment*, che è un metodo utilizzato anch'esso per quantificare la resistenza all'insulina e il funzionamento delle cellule  $\beta$ ). Entrambi gli studi si sono avvalsi del DI come fattore predittivo, sottolineandone l'efficacia per prevedere intolleranza al glucosio che sfocia in GDM. Genova et al. hanno posto in luce come il confronto del DI tra donne sane e coloro con GDM abbia un *odds ratio* (OR) pari a 0,989 (p-value = 0,013). Nei due casi considerati, le differenze tra gli indici che studiano l'efficacia della risposta metabolica tra i gruppi presi in considerazione evidenzia una disfunzione a carico delle cellule.

Uno studio più approfondito deve condotto nelle settimane dopo la gravidanza successive alla sesta, in quanto, storicamente, dalle sei alle otto settimane l'organismo risente ancora delle alterazioni dei

fattori specifici legati per l'appunto alla gravidanza (come l'aumentato BMI o l'ormone lattogeno placentare).

Sia Masuko et al. [34] che Kojima et al. [35], tramite il modello di regressione logistica, monovariata e multivariata, hanno individuato dodici settimane dopo il parto correlazioni tra un basso DI e l'intolleranza al glucosio (GI), suggerendo l'esecuzione di un OGTT anteparto come esame significativo per la diagnosi di GI postparto (il p-value in entrambi gli studi era inferiore a 0,05, rendendo di fatto l'analisi operata significativa).

Il monitoraggio post partum è fondamentale per stabilire in che misura il GDM impatti nella vita delle pazienti. La problematica principale, già citata parlando di GDM, è la suscettibilità delle pazienti al T2D. Su uno studio condotto su un campione di 34 donne europee normoglicemiche ma con pregresso GDM (Kousta et al.[36]) confrontato con una popolazione campione, tramite somministrazione ripetuta di glucosio e successive iniezioni di insulina (*Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test*, FSIVGTT) si sono stimate la sensibilità e l'efficienza dell'assorbimento del glucosio, dimostrando dunque una minor sensibilità all'insulina nelle pazienti con precedente GDM ( $0,6 \times 10^{-4}/\text{min}/\text{pmol}/\text{l}$  [ $\pm 0,45 \times 10^{-4}/\text{min}/\text{pmol}/\text{l}$ ] a differenza del controllo  $1,5 \times 10^{-4}/\text{min}/\text{pmol}/\text{l}$  [ $\pm 0,3 \times 10^{-4}/\text{min}/\text{pmol}/\text{l}$ ],  $P = 0,01$ ). Le donne con pregresso GDM apparivano non solo con BMI mediamente maggiore ( $25,3 \text{ kg}/\text{m}^2$  [ $\pm 1,7 \text{ kg}/\text{m}^2$ ], mentre il gruppo di controllo  $23,1 \text{ kg}/\text{m}^2$  [ $\pm 1,2 \text{ kg}/\text{m}^2$ ]), caratteristica ricorrente sottolineata anche dagli studi condotti in materia presi in considerazione [37] [38] [39].

Il DI è stato ricavato dal prodotto dell'*Acute Insuline Response* (AIRg), calcolata come area sottesa alla curva compresa tra 2 e i 10 minuti di FSIVGTT, e  $S_i$  (*sensitivity index*) ed è risultato minore nelle donne ex GDM rispetto al controllo ( $0,05/\text{min}$  [ $0,02-0,10/\text{min}$ ] vs.  $0,11/\text{min}$  [ $0,09-0,14/\text{min}$ ],  $P =$

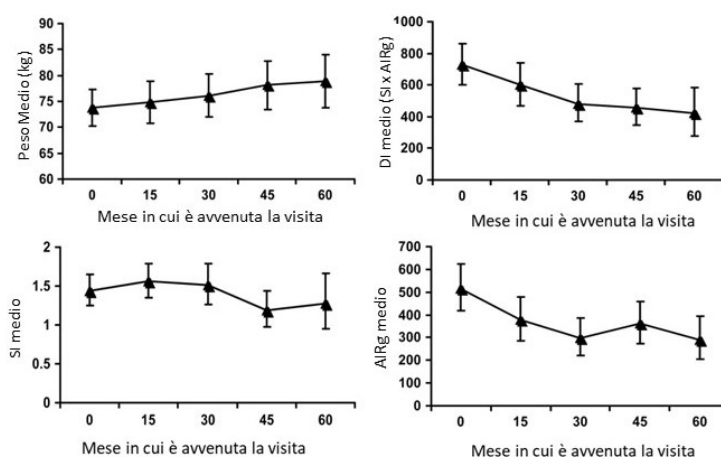


Figura 5 I quattro grafici percorrono i 52 mesi presi in esame da Xiang et al.[37]

0,02). È stato rilevato un pattern di disfunzioni metaboliche nelle donne con pregresso GDM: la presenza di elementi attribuibili alla sindrome metabolica, obesità in area addominale, dislipidemia e resistenza all'insulina individuata grazie al *Feasibility of Intravenous Glucose Tolerance Test* (FSIVGTT) e al test HOMA. L'implemento del DI ha permesso dunque di correlare i dati forniti dagli esami utilizzati e stabilire con certezza, grazie ai valori riportati, la perdita di funzionalità delle cellule  $\beta$ . I fattori evidenziati pongono un fondamento sullo sviluppo futuro di T2D.

Similmente, l'associazione tra fattori metabolici è analizzata anche da Xiang et al.<sup>[37]</sup> per lo studio dell'abbassamento progressivo del DI (Figura 5) e innalzamento della sensibilità all'insulina in donne con GDM pregresso in un periodo lungo sino a cinquantadue mesi post-parto. L'associazione più forte con l'abbassamento del DI è stato l'aumento della percentuale di massa grassa (il 75% dell'aumento di peso registrato nello studio è stato di massa grassa), legato sia all'aumento di adiponectina e proteine C reattive (prodotte rispettivamente dal tessuto adiposo e dal fegato) che dall'innalzamento della resistenza all'insulina, con una correlazione tra i due fenomeni di circa il 40%. Delle 60 donne prese in esame, a 14 è stato diagnosticato diabete mellito di tipo 2.

All'incidenza dello sviluppo di patologie post gestazionali, un fattore da considerare è l'etnia. Come riportato da Shaisho et al.<sup>[32]</sup>, rispetto alla controparte occidentale le donne del Sud Est asiatico tendono a sviluppare maggiormente diabete mellito di tipo 2. L'analisi condotta da Sharma et al.<sup>[40]</sup> su un campione composto da 179 donne del sud-est asiatico e 108 donne nordiche presentanti pregresso GDM, circa 17 mesi dopo il parto ha evidenziato come il primo gruppo, abbia maggiori AUC riguardanti il glucosio, insulina preepatica e periferica e sensibilità minore all'insulina. L'insulina periferica dona informazioni sull'azione metabolica del fegato e la sua concentrazione è correlata a un minor DI (*Indice Insulinogenico* (IGI)  $\times$   $IS_{OGTT}$ ), minore del 32% nelle donne asiatiche. Nel caso di Ignell et al.<sup>[41]</sup>, su 456 che hanno avuto GDM (362 europee, 43 donne asiatiche e 41 donne arabe) e 133 di controllo, il campione con GDM aveva mediamente DI (utilizzato per calcolare la secrezione di insulina, tramite l'indice insulinogenico e l'HOMA-IR) più basso a prescindere dalla tolleranza al glucosio. I risultati finali dello studio rivelano non solo che le donne non-europee siano più a rischio di T2D (il 17% contro il 4%), ma anche un DI più basso (8.8 [range: 7.9–9.7] vs. 6.8 [range: 5.5–8.4]  $P=0.027$ , valori trasformati logaritmicamente).

## CAPITOLO 3 – VALUTAZIONE DEL DISPOSITION INDEX LINEARIZZATO COME STRUMENTO PREDITTIVO DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2 IN DONNE CON STORIA PREGRESSA DI DIABETE GESTAZIONALE

### 3.1 - Dataset

Il dataset utilizzato nel presente studio è stato fornito grazie alla collaborazione con l'Istituto di Neuroscienze del CNR di Padova ed è stato analizzato presso il DIABETES LAB, nel Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università Politecnica delle Marche. Si è preso in analisi un campione totale di 120 donne, di cui si sono considerate solamente 78 donne con diagnosi di diabete mellito gestazionale, le quali presentavano informazioni sullo sviluppo o meno del T2D (indicate come PROG e NONPROG), e 42 appartenenti alla popolazione di controllo (indicate, nel nostro caso, come CNT). Lo studio del dataset è stato inizialmente suddiviso in due parti: analisi del Disposition Index a un tempo definito come *year 0 (early postpartum)* della popolazione di controllo e delle donne con GDM; lo studio si è poi affinato considerando unicamente le donne presentanti la label PROG e NONPROG. Le caratteristiche dei soggetti analizzati sono riportate in **Tabella 1**.

**Tabella 1** Caratteristiche medie delle tre popolazioni presa in esame. ‡ P-value tra PROG e NON PROG <0,001, † P-value tra PROG e NON PROG <0,05.

(MEDIA ± SD)	CNT (n=42)	PROG (n=20)	NONPROG (n=58)
Età (anni)	32,8 ± 5,7	36,6 ± 4,6	33,2 ± 4,1
Peso (kg)	67,0 ± 11,1	82,7 ± 19,8	69,8 ± 13,2
Altezza (cm)	166,4 ± 5,3	162,3 ± 8,7	165,3 ± 7,6
BMI (kg·m <sup>2</sup> )	24,3 ± 4,4	31,3 ± 6,6	25,4 ± 3,9
SI (10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup> /(μU/ml))	6,3 ± 4,2	3,2 ± 2,9 <sup>†</sup>	4,5 ± 2,6 <sup>†</sup>
AIR (pmol/l)	346,6 ± 245,0	164,8 ± 193,5 <sup>‡</sup>	273,9 ± 187,9 <sup>‡</sup>
AIR <sub>g</sub> (pmol/l)	375,5 ± 271,0	186,9 ± 220,2 <sup>†</sup>	300,8 ± 209,5 <sup>†</sup>
I <sub>mean</sub> /G <sub>mean</sub> (μU/ml/mg/dl)	57,7 ± 28,7	59,0 ± 27,2	66,2 ± 34,9

### 3.2 - Metodologia

#### 3.2.1: Indici utilizzati

La scelta degli indici di secrezione e sensibilità si è basata sugli studi condotti sull'implementazione del DI nella versione di Kahn et al. <sup>[2]</sup> e di quello linearizzato nella versione di Mather et al. <sup>[8]</sup> Nel

calcolo del DI sono stati dunque considerati l'insulin sensitivity  $S_I$  ( $10^{-4}\text{min}^{-1}/(\mu\text{U/ml})$ ), ricavata tramite il modello minimo della cinetica del glucosio, e l'acute insuline response (AIR) (pmol/l) [2], ovvero la differenza di insulina basale ricavata a 3 minuti immediatamente dopo il primo stimolo glucidico (300 mg/kg) e a 8 minuti. Come confronto è stato scelto anche l'AIR<sub>G</sub>, ovvero l'acute insuline response calcolata tramite la differenza tra l'insulina basale a 3 e a 10 minuti, in corrispondenza del secondo picco secretivo.

Similmente a quanto utilizzato da Mather et al. [8], come indice della secrezione si sono adoperati  $G_{\text{mean}}$  (mmol/l) e  $I_{\text{mean}}$  (pmol/l), ossia le aree medie sottese dalla curva di glucosio e insulina nel segmento temporale preso in considerazione. Il rapporto tra i due indici è stato moltiplicato per tutta la durata dell'esame condotto sulle pazienti (180 minuti).

### 3.2.2 - Calcolo del Disposition Index

Il Disposition Index è stato calcolato tramite la moltiplicazione dei fattori presi in considerazione, così come indicato nel capitolo precedente. I valori ottenuti sono stati confrontati con i risultati raggiunti da Mather et al. [8], operando le trasformazioni opportune per raggiungere conformità con le unità di misura riportate.

Abbiamo dunque ottenuto DI1 (eq. 13), DI2 (eq. 14), DI3 (eq. 15), ciascuno dei quali con una differente feature utilizzata per esprimere la secrezione:

$$DI1 = S_I \times AIR \quad (13)$$

$$DI2 = S_I \times AIR_G \quad (14)$$

$$DI3 = S_I \times \left( I_{\text{mean}} / G_{\text{mean}} \right) \cdot 180 \quad (15)$$

Lo scopo di queste scelte è stato, non solo quello di ottenere misurazioni multiple del DI, ma anche di affinarne il calcolo, verificando quale di questi indici presi in considerazione dia una stima più accurata delle funzioni metaboliche del glucosio e fornisca uno strumento efficace nel riconoscimento di pazienti con futuro diabete mellito di tipo due utilizzando il DI e il DI linearizzato.

### 3.2.3: Linearizzazione e Regressione lineare

È stato necessario attuare un procedimento di normalizzazione atto a porre i valori pari o uguali a zero di AIR e AIR<sub>G</sub> non trasformabili tramite il logaritmo uguali a uno, per permettere l'operazione eseguita nell'eq. 16. Presupponendo un  $\alpha$  pari a uno (divenuto coefficiente per trasformazione logaritmica), dunque, il disposition index linearizzato è stato calcolato nel modo seguente:

$$DI \text{ linearizzato} = \ln(S_I) + \ln(\text{Secrezione}) \quad (16)$$

in cui  $\ln(\text{Secrezione})$  indica i valori normalizzati di AIR e AIR<sub>g</sub> e I<sub>mean</sub>/G<sub>mean</sub> trasformati logaritmicamente.

Sono stati presi separatamente i tre valori dei gruppi CNT e PROG e NONPROG. Con i valori ottenuti si è preceduto alla stima della regressione lineare delle tre popolazioni prese in esame per il confronto di  $\alpha$  (pendenza) e del regressore dei tre gruppi. Grazie alla regressione lineare è stato possibile poi effettuare un ulteriore calcolo del DI linearizzato: posto  $\ln(S_I)$  come variabile indipendente e disponendo già della retta interpolante i punti ottenuti, è stata ricavata la secrezione linearizzata (variabile dipendente). Similmente a quanto indicato dall'eq. 16, il DI linearizzato definito, in questo caso come *DI linearizzato predetto*, è stato calcolato nel seguente modo (eq. 17):

$$DI \text{ linearizzato predetto} = \ln(S_I) + \text{Secrezione Predetta linearizzata} \quad (17)$$

Lo scopo dell'utilizzo di questo modo per esprimere il DI linearizzato è stato quello di stimare, disponendo dei valori di  $S_I$ , il DI linearizzato non presupponendo che  $\alpha$  fosse uguale a 1.

### **3.3 - Analisi statistica**

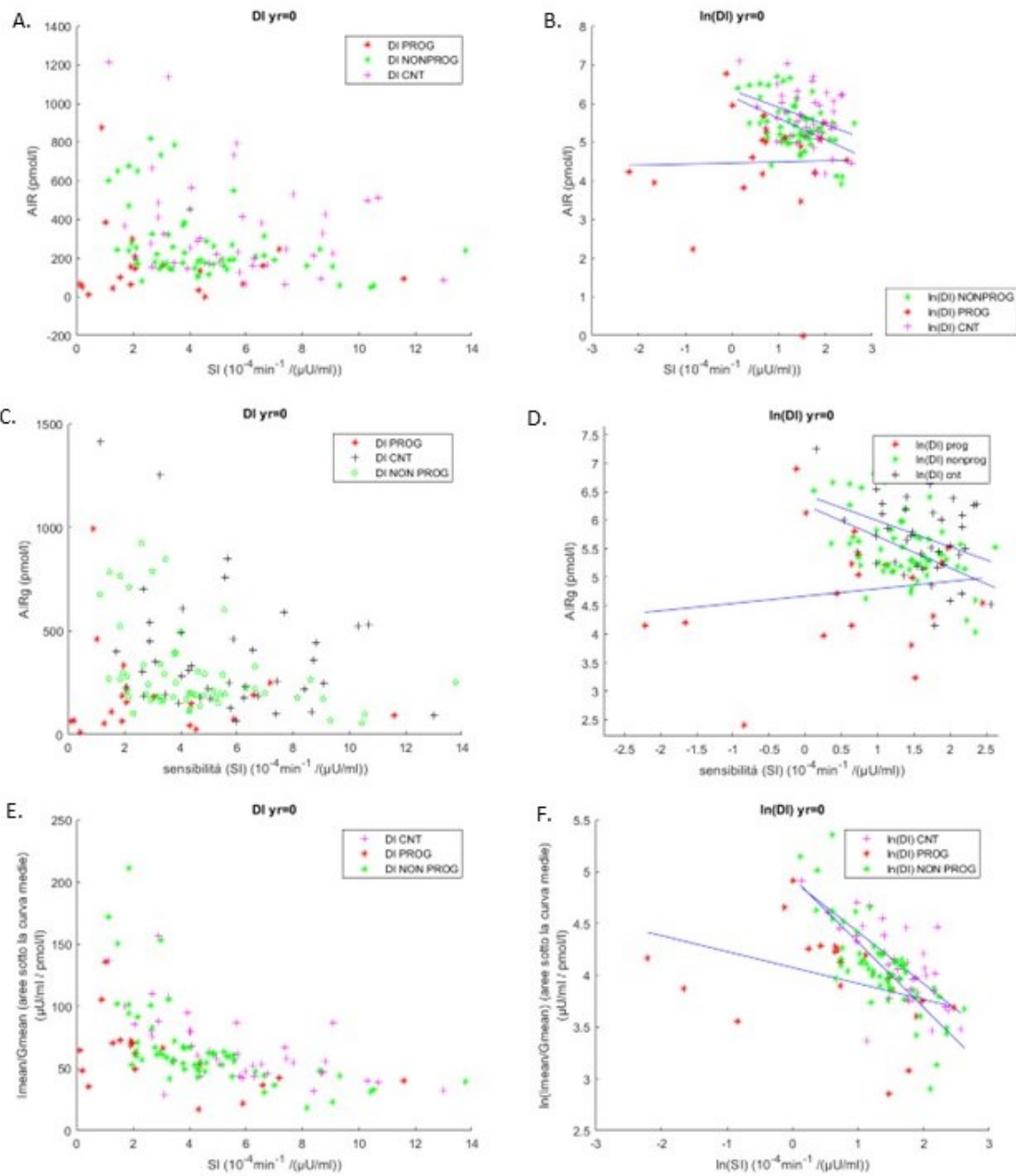
I procedimenti atti al calcolo del DI e del DI linearizzato sono stati i medesimi. Nel controllo della tipologia della distribuzione dei dati è stato eseguito il Lilliefors test su ogni gruppo: per le distribuzioni normali sono state messe a confronto per ciascun gruppo media e deviazione standard [media  $\pm$  sd] o mediana e range interquartili [mediana  $\pm$  iqr]. Si sono confrontati i valori ottenuti con la trasformazione logaritmica a quelli predetti, utilizzando il Kruskal-Wallis test (o l'ANOVA test in caso di distribuzione normale) per il calcolo del p-value tra i tre gruppi (CNT, PROG e NON PROG) a tempo zero.

Il Kruskal-Wallis test è stato eseguito per il confronto tra del disposition index linearizzato e del disposition index classico dei tre gruppi, con lo scopo di verificare che la differenza tra le mediane fosse significativa per ciascuna popolazione presa in considerazione. Nel caso di confronto durante il monitoring è stato adoperato il test dei ranghi di Wilcoxon per stimare i p-value. Per confrontare i risultati ottenuti durante i monitoring successivi. Il livello di significatività è stato fissato al 5%.

### **3.4 - Risultati**

Nella Figura 6 sono visibili le rappresentazioni grafiche del DI e del DI linearizzato, ciascuna riportata con i tre gruppi in cui sono state divise le 120 donne: nella colonna a sinistra sono presenti i valori del DI (DI1, DI2, DI3) mentre nella colonna destra vi è il DI linearizzato (DI1, DI2, DI3 trasformate come quanto indicato dall'eq. 16). Nei grafici riguardanti i DI Linearizzati sono presenti le rette interpolanti i punti ricavati dall'applicazione della regressione lineare, ognuna per ogni gruppo, distinguibile dall'apposizione della legenda. La **Tabella 2** riporta i valori della mediana e degli indici interquartili del DI (ricavato da eq. 11, eq. 12, eq. 13). Ciò che è stato ottenuto è stato confrontato tramite Wilcoxon test, necessario per verificare vi fossero differenze significative tra i tre gruppi anche prima della linearizzazione. Ciascun gruppo preso in esame si è rilevato sotto la soglia di significatività. La **Tabella 3** e la **Tabella 4** riportano i valori estratti dalla regressione lineare, in particolare riguardo il regressore ( $x_1$ ) e l'intercetta con l'asse delle  $y$  (ovvero il valore medio della secrezione a sensibilità nulla). Le tabelle presentano i valori d'errore standard (SE), degli intervalli di confidenza e i p-value. Sono stati considerati significativi solo i p-value inferiori alla soglia di fissata al 5% e indicata con †. Per valori inferiori a 0,001 la notazione scelta è stata la seguente ‡. Ad esclusione del gruppo PROG, i p-value riportati dalla **Tabella 3** sono inferiori alla soglia fissata come significativa.

La **Tabella 5** prende in analisi i valori ottenuti dalla formula dell'eq. 16 e dalla formula dell'eq. 17, ovvero il DI linearizzato e il DI linearizzato predetto. Sono state poste a confronto medie e/o mediane, assieme alle corrispettive deviazioni standard/indici interquartili. I valori dei tre gruppi sono stati messi a confronto tramite il Kruskal-Wallis test (per il DI linearizzato) o l'Anova test (per il DI linearizzato predetto) per il calcolo dei p-value. Ciascuno dei tre gruppi (CNT, PROG, NONPROG) presenta medie statisticamente differenti, sia se considerati assieme che presi in coppia. Il DI linearizzato e il DI linearizzato predetto, infine, per ciascun gruppo studiato, sono stati confrontati tramite test Wilcoxon, rivelando p-value non statisticamente differenti tra le popolazioni ricavate considerando  $\alpha$  pari a -1 che quelle in cui uno dei valori è stato calcolato conoscendo la variabile indipendente e la regressione lineare.



**Figura 6** Grafici cartesiani Secrezione-Sensibilit  dei tre gruppi. Nella colonna sinistra (A, C, E) sono presenti i valori del DI classico, nella colonna a destra (B, D, E) del DI normalizzato. Ogni riga corrisponde a un differente indice utilizzato per misurare la secrezione. A-B. AIR, C-D AIRg, E-F  $I_{\text{mean}}/G_{\text{mean}}$  ( $AUC_{\text{ins}/\text{gluc}}$  medio).

**Tabella 2** Confronto tra le mediane del DI calcolato tramite secrezione x sensibilità a yr=0 e yr>0. † p-value <0,05 (livello di significatività raggiunto). ‡ p-value <0,001. CNT=controlli, GDMPROG= diabete mellito gestazionale con successivo T2D, GDMNONPROG= diabete mellito gestazionale senza successivo T2D, GDM= diagnosi di diabete mellito gestazionale.

SecrezionexSensibilità	yr=0	DI			p-value
		CNT	PROG GDM	NONPROG GDM	
AIRxSI  Pmol/l X 10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup> /(μU/ml)	mediana	1241,40	346,81	855,71	<0,001 (abc)‡ <0,001 (ab)‡
	iqr	1498,3	494,1	793,5	0,02 (ac)† <0,001 (bc)‡
AIRgxSI  Pmol/l X 10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup> /(μU/ml)	mediana	1418,40	399,80	944,16	<0,001 (abc)‡ <0,001 (ab)‡
	iqr	1641,7	535,3	866,8	0,02 (ac)† <0,001 (bc)‡
AUCins/AUCglucxSI  (μU/ml / pmol/l) X 10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup> /(μU/ml)	mediana	309,50	130,35	221,34	<0,001 (abc)‡ 0,009 (ab)†
	iqr	158,7	117,1	113,3	<0,001 (ac)‡ <0,001 (bc)‡

**Tabella 3** Confronto del regressore durante la prima misurazione (yr=0) dei risultati riportati dalla regressione lineare compiuta sul disposition index linearizzato per i tre metodi di calcolo utilizzati. CNT=controlli, GDM= diabete mellito gestazionale.. † p-value <0,05 (livello di significatività raggiunto) ‡ p-value <0,001.

DI LINEARIZZATO			CNT	GDM	
Secrezione	Sensibilità			NONPROG	PROG
AIR (pmmol/l)	SI $10^{-4}\text{min}^{-1}/(\mu\text{U/ml})$	Slope (SE)	-0,44 (0,20)	-0,55 (0,17)	0,03 (0,28)
		Intervallo di confidenza	[-0,85 - -0,04]	[-0,825 - -0,281]	[-0,57 - 0,63]
		P-VALUE	0,03†	<0,001‡	<b>0,92</b>
AIRg (pmmol/l)		Slope (SE)	-0,46 (0,19)	-0,55 (0,13)	0,13 (0,20)
		Intervallo di confidenza	[-0,856 - -0,059]	[-0,815 - -0,289]	[-0,293 - 0,550]
		P-VALUE	0,03†	<0,001‡	<b>0,53</b>
AUCins/AUCgluc ( $\mu\text{U/ml}$ / ppmol/l)		Slope (SE)	-0,50 (0,09)	-0,63 (0,07)	-0,15 (0,09)
		Intervallo di confidenza	[-0,68 - -0,32]	[-0,77 - -0,49]	[-0,34 - 0,03]
		P-VALUE	<0,001‡	<0,001‡	<b>0,10</b>

**Tabella 4** Confronto dell'Intercetta durante la prima misurazione (yr=0) dei risultati riportati dalla regressione lineare compiuta sul disposition index linearizzato per i tre metodi di calcolo utilizzati. CNT=controlli, GDM= diabete mellito gestazionale. † p-value <0,05 (livello di significatività raggiunto) ‡ p-value <0,001.

DI LINEARIZZATO			CNT	GDM	
Secrezione	Sensibilità			NONPROG	PROG
AIR (pmmol/l)	SI $10^{-4}\text{min}^{-1}/(\mu\text{U/ml})$	Intercetta (SE)	6,34 (0,34)	6,17 (0,20)	4,46 (0,38)
		Intervallo di confidenza	[5,66 – 7,02]	[5,77 – 6,57]	[3,67 – 5,25]
		P-VALUE	<0,001‡	<0,001‡	<0,001‡
AIRg (pmmol/l)		Intercetta (SE)	6,45 (0,33)	6,27 (0,19)	4,67 (0,27)
		Intervallo di confidenza	[5,77 – 7,11]	[5,88 – 6,64]	[4,11 – 5,22]
		P-VALUE	<0,001‡	<0,001‡	<0,001‡
AUCins/AUCgluc ( $\mu\text{U/ml}$ / ppmol/l)		Intercetta (SE)	4,92 (0,15)	4,94 (0,10)	4,07 (0,11)
		Intervallo di confidenza	[4,62 – 5,21]	[4,74 - 5,15]	[3,83 - 4.32]
		P-VALUE	<0,001‡	<0,001‡	<0,001‡

**Tabella 5** In questa tabella è preso in analisi il DI linearizzato ricavato dal calcolo logaritmico e il DI linearizzato predetto tramite regressione lineare a tempo zero ( $yr=0$ ). **CNT**: controlli, **GDMPROG**: diabete mellito gestazionale con successivo T2D, **GDMNONPROG**: diabete mellito gestazionale senza successivo T2D. † p-value <0,05 (livello di significatività raggiunto) ‡ p-value <0,001. //: p-value pari a 0. **abc**: p-value dei tre gruppi (Kruskal-Wallis), **ab**: CNT vs. GDMPROG, **ac**: CNT vs. GDMNONPROG, **bc**: GDMPROG vs. GDMNONPROG (Kruskal-Wallis). \*: utilizzato ANOVA test per via della distribuzione normale (Lilliefors test=0).

yr=0		DI LINEARIZZATO			p-value	DI LINEARIZZATO PREDETTO			p-value	p-value confronto tra calcolato e predetto
		CNT	GDM PROG	GDM NONPROG		CNT	GDM PROG	GDM NONPROG		
DI1  AIRxSI  Pmol/l X 10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup> / (μU/ml)	mediana/media ± iqr/sd	7,1±1,0	5,8±1,9	6,8±0,9	<0,001 (abc)‡	7,2±0,3	5,1±1,2	6,8±0,2	<0,001 (abc)*‡	0,65 CNT vs. predCNT
					<0,001 (ab)‡				<0,001 (ab)*	0,58 Prog vs. predProg
					0,02 (ac)†				<0,001 (ac)*‡	0,77 NonProg vs. predNonProg
					<0,001(bc)‡				<0,001 (bc)*	
DI2  AIRgxSI  Pmol/l X 10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup> / (μU/ml)	mediana/media ± iqr/sd	7,3±0,7	5,40±1,7	6,9±0,6	<0,001 (abc)*‡	7,3±0,3	5,4±1,4	6,9±0,2	<0,001 (abc)*‡	0,65 CNT vs. predCNT
					<0,001 (ab)*‡				0,001 (ab)*†	0,76 Prog vs. predProg
					0,04(ac)*†				<0,001 (ac)*‡	0,78 NonProg vs. predNonProg
					<0,001(bc)				<0,001 (bc)*‡	
DI3  AUCins/AUCgluc x SI  (μU/ml / pmol/l) X 10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup> / (μU/ml)	mediana/media ± iqr/sd	5,7±0,5	4,9±0,8	5,7±0,5	<0,001 (abc)‡	5,7±0,3	4,6±1,0	5,5±0,2	<0,001 (abc)*‡	0,86 CNT vs. predCNT
					<0,001 (ab)‡				//	0,72 Prog vs. predProg
					0,004 (ac)†				<0,001 (ac)*‡	
					0,002 (bc)†				//	0,95 NonProg vs. predNonProg

### 3.5 - Discussione

Il primo passo dello studio del DI e nelle sue diverse tipologie di calcolo è stato anzitutto rintracciare l'andamento iperbolico di ciascun metodo adoperato, per assicurare che il rapporto di proporzionalità inversa sia mantenuto (Figura 6: A, C, E). Trovata una corrispondenza con gli esempi proposti dalla letteratura in merito, il processo di linearizzazione dei dati forniti è stato lo step successivo per l'evidenziare le differenze tra le tre popolazioni prese in esame.

Nella visualizzazione dei grafici riportanti le misure di secrezione e sensibilità linearizzate, considerando la retta interpolante i punti ricavati, si può notare subito la differenza di pendenza di quest'ultima. Per ogni singola feature utilizzata come indice della secrezione insulinica la pendenza del gruppo PROG è l'unica con valori prossimi allo zero rispetto a CNT e NONPROG (Figura 6: B, D, F), evidenziato dalla **Tabella 3**: la pendenza della retta di regressione (*slope*) confrontabile tra NONPROG e CNT, assume valori prossimi allo zero nelle donne che hanno poi sviluppato T2D dopo la gravidanza.

Per ogni indice utilizzato si sono riscontrati p-value del calcolo del regressore statisticamente sopra alla soglia di significatività fissata al 5%, nonché intervalli di confidenza caratterizzati sia da valori positivi che negativi tutti riguardanti la popolazione PROG (**Tabella 3**). Nel confronto tra le rette difatti, come già accennato, si può subito notare come l'andamento della popolazione CNT sia paragonabile al gruppo NONPROG, ovvero le donne che, avuto diabete mellito gestazionale, non hanno sviluppato diabete di tipo due, come dimostrano anche i valori paragonabili dell'intercetta presenti nella **Tabella 4**. Confrontando dunque le analisi condotte sui valori ottenuti dalla regressione lineare possiamo osservare come essi siano, anzitutto, statisticamente significativi (p-value <5%). La regressione lineare ha permesso il calcolo del *DI linearizzato predetto* tramite l'utilizzo dei valori di sensibilità (variabile indipendente) e la secrezione (variabile dipendente). I confronti statistici hanno evidenziato p-value tra lo stesso indice calcolato e quello predetto oltre alla soglia del 5% fissata come significativa al fine della rilevazione di differenze statistiche significative tra i tre gruppi confrontati reciprocamente tra loro. L'utilizzo dei valori predetti (**Tabella 5**) è stato anzitutto implementato come metodo di confronto con i valori ottenuti dalla formula inversa riportata dall'eq. 16, considerando soprattutto media e/o mediana dei due metodi di calcolo. L'eq. 16 utilizza la supposizione che la relazione che legghi sensibilità e secrezione venga rappresentata da un'iperbole equilatera, con pendenza ( $\alpha$ ) pari a -1. Il confronto dei due gruppi (calcolato e predetto) è stato dunque fatto per comprendere se gli  $\alpha$  adottati in fase di calcolo si avvicinasse a quello predetto attraverso alla regressione lineare, come poi rivelato dal confronto statistico (tramite Wilcoxon test). Nei soggetti con relazione di secrezione e sensibilità inalterata la pendenza della curva si aggira

attorno a valori differenti dallo zero per garantire la corretta rappresentazione iperbolica del DI, ma nelle popolazioni in cui questo legame tra funzionamento delle cellule- $\beta$  e permeabilità dell'insulina nei tessuti non è mantenuto la curvatura dell'iperbole subisce delle modificazioni avvicinandosi o meno allo zero <sup>[8]</sup>. Trasformando i valori attraverso la linearizzazione dei due termini coinvolti, si provvede, dunque, a far chiarezza su quanto la pendenza o meno della retta ottenuta sia sintomo del progredire verso condizioni patologiche dopo il GDM.

Analizzando dunque i valori ottenuti tramite il calcolo (**Tabella 5**) diretto del DI linearizzato, i risultati del Kruskal-Wallis test condotti sui tre gruppi hanno dimostrato che per ciascun campione e ciascun metodo di misurazione utilizzato al fine del calcolo della nostra variabile d'interesse le mediane si sono rilevate statisticamente differenti per ciascun gruppo considerati. Sia nello studio del DI linearizzato e del DI classico (**Tabella 1**) è stato evidenziato come il p-value fosse al di sotto della soglia considerata come significativa (seppure con differenze tra i vari gruppi), sia globalmente che in modo reciproco tra le label considerate.

Lo scopo principale di queste analisi statistiche è stato quello di evidenziare non solo la differenza tra CNT, PROG e NONPROG ma, conoscendo la diagnosi della paziente e disponendo del necessario per il calcolo del DI, per constatare se tra il PROG e NONPROG le differenze statistiche fossero abbastanza significative per l'implemento del Disposition Index linearizzato come criterio, oltre che diagnostico del GDM, predittivo per lo sviluppo del diabete dopo la gravidanza, ovvero una delle complicazioni principali della condizione analizzata. Seppure il DI sia un mezzo largamente utilizzato in letteratura quando si parla di GDM e della diagnosi della malattia e del suo progredire durante e dopo la gravidanza, il DI linearizzato rimane uno strumento ancora non adoperato quando si studia il diabete mellito gestazionale.

Sono stati anche posti a confronto gli elementi utilizzati ai fini del calcolo del DI (**Tabella 1**) tra i soggetti PROG e NONPROG, per evidenziare se, anche prima di ottenere il DI, si evidenziasse differenze significative tra gli indici utilizzati. I p-value ottenuti si sono rivelati sotto la soglia di significatività ad eccezione della feature  $I_{mean}/G_{mean}$ , che prese singolarmente hanno rivelato una differenza significativa tra PROG e NONPROG unicamente riguardo all'area sotto la curva media del glucosio (p-value PROG-NONPROG <0,001) mentre considerando il corrispettivo riguardante la secrezione insulinica i dati forniti non si sono dimostrati abbastanza significativi per produrre ipotesi abbastanza forti per essere considerabili come indici discriminanti per lo sviluppo successivo del T2D. Sebbene i risultati ottenuti abbiano fornito caratteristiche desiderabili per lo scopo con cui si è mossa

l'analisi dei dati forniti e per soglie imposte a priori, la presenza di un ristretto numero di campioni PROG e NONPROG in confronto a CNT può rappresentare una limitazione per gli studi condotti, poiché questa asimmetria nel campionamento fornisce risultati meno accurati e forse meno significativi rispetto alla stessa analisi condotta su un campione più ampio. Anche se la scelta degli indici utilizzati ha fornito risultati che hanno evidenziato differenze definibili come significative nelle tre popolazioni prese in esame, vi sono differenze nei risultati se paragoniamo l'utilizzo di AIR e AIRg per indicare la secrezione e  $I_{\text{mean}}/G_{\text{mean}}$  considerata la differente unità di misura in cui essi sono espressi e la natura dell'ultimo indice, che rappresentando una media e non essendo significativo se preso singolarmente (**Tabella 1**), appare diverso anche nella rappresentazione grafica del DI linearizzato (Figura 6: F).

Nonostante le limitazioni riscontrate, però, i risultati ottenuti potrebbero rendere possibile l'implementazione di questa metodologia in algoritmi di *machine learning* per l'individuazione dei soggetti con futuro sviluppo di T2D a partire dalle informazioni raccolte direttamente post-parto, facilitando di fatto una possibile diagnosi e favorendo il monitoring delle madri prima dello sviluppo di condizioni cliniche più avverse.

## Conclusione

L'implementazione del DI linearizzato per lo studio di soggetti con GDM è ancora un argomento non pienamente affrontato in letteratura. Si hanno numerosi esempi di come il DI sia stato adoperato nell'ambito del diabete mellito gestazionale per il confronto tra soggetti provenienti da diverse popolazioni o durante e dopo la gravidanza. Lo scopo che questa tesi si è posta è stato quindi quello di dimostrare come la linearizzazione del DI possa venire applicata in ambiti ancora non esplorati ma, soprattutto, avvalorarne l'efficacia nel sottolineare le differenze tra la popolazione sana e quella patologica, in questo caso donne con GDM e futuro diabete di tipo 2.

Le differenze nei tre DI linearizzati riscontrate nei grafici ottenuti, seppure con i limiti sopraindicati, si sono dimostrate significative nel favorire una visione globale immediata delle peculiarità metabolismo del glucosio delle pazienti prese in esame molto più rispetto agli indici presi singolarmente e al DI ottenuto tramite il loro prodotto. La pendenza delle rette ricavate tramite regressione lineare è il primo dei risultati lampanti visibili solamente dall'osservazione dei grafici riguardanti i tre gruppi presi in considerazione. Tali risultati visivi sono stati avvalorati dai test statistici condotti su di essi.

Inizialmente, dello studio condotto sul dataset era quello di osservare come il DI linearizzato variasse tra due popolazioni, CNT e GDM, senza informazioni su come la patologia si sarebbe evoluta dopo la gravidanza. L'utilizzo dei due indicatori (PROG e NONPROG) ha permesso, anzitutto, di aumentarne la specificità dei test eseguiti ma anche di osservare come, in un gruppo vasto come le donne con GDM, si presentassero condizioni tra loro differenti come differenti erano le condizioni metaboliche durante e, soprattutto, dopo il periodo di gestazione.

La linearizzazione del DI ottenuto dai tre gruppi presi in esame (CNT, PROG, NONPROG) si pone con scopo di diventare, in futuro, un forte aiuto alla diagnosi non solo del diabete mellito gestazionale ma dello stesso T2D dopo la gravidanza a partire anche solo dalle primissime analisi condotte immediatamente dopo il parto.

## **Bibliografia:**

- [1] A. C. Guyton, J. E. Hall. *Fisiologia Medica*. Edra, 2017, XIII edizione.
- [2] S.E. Kahn, R. L. Prigeon, D. K. McCulloch, E. J. Boyko, R.N. Bergman et al. Quantification of the Relationship Between Insulin Sensitivity and  $\beta$ -Cell Function in Human Subjects: Evidence for a Hyperbolic Function (1993); 42 (11): 1663–1672.
- [3] R. N. Bergman. Origins and History of the Minimal Model of Glucose Regulation. *Frontiers in Endocrinology* (2021); 1.
- [4] C. McDonald, A. Dunaif, D. T. Finegood. Minimal-Model Estimates of Insulin Sensitivity Are Insensitive to Errors in Glucose Effectiveness. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2000); 85 (9): 2504–2508.
- [5] T.S. Hannon, S.E. Kahn, K.M. Utzschneider, T.A. Buchanan et al.; RISE Consortium. Review of methods for measuring  $\beta$ -cell function: Design considerations from the Restoring Insulin Secretion (RISE) Consortium. *Diabetes Obes Metab.* (2018); 20 (1): 14-24.
- [6] M. Gutch, S. Kumar, S.M. Razi, K.K. Gupta, A. Gupta. Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian J Endocrinol Metab.* (2015); 19(1): 160-164.
- [7] R.A. DeFronzo, J.D. Tobin, R. Andres. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* (1979); 237 (3): E214-E223.
- [8] K.J. Mather, M. Chen, T.S. Hannon. Linearization of the Disposition Index equation allows evaluation of secretion-sensitivity coupling slopes; *Journal of Diabetes and its Complications* (2020); 34 (7).
- [9] A.J. Kile, C. Hanna, T.S. Hannon, M.S. Kirkman, R.V. Considine, Y. Patel, and K.J. Mather. The linearized Disposition Index augments understanding of treatment effects in diabetes; *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* (2021); 320(1): E169-E177.
- [10] [www.diabetes.org](http://www.diabetes.org)
- [11] M.I. Mouri, M. Badireddy. *Hyperglycemia*. StatPearls Publishing, 2022.
- [12] [www.mayoclinic.org](http://www.mayoclinic.org)
- [13] [www.bristol.ac.uk](http://www.bristol.ac.uk)

- [14] J. Xiaofan, G. Yong, H. High, L. Yu. Islet autoantibodies in disease prediction and pathogenesis; *Diabetol Int* (2019); 11 (1): 6-10.
- [15] A.S. Al-Goblan, M.A. Al-Alfi, M.Z. Khan. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obesity* (2014); 7: 587-591.
- [16] R.M.M. Khan, Z.J.Y. Chua, J.C. Tan, Y. Yang, Z. Liao, Y. Zhao. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research (2019); 55 (9): 546.
- [17] A.H. Xiang, R.K. Peters, E. Trigo, S.L. Kjos, W.P. Lee, T.A. Buchanan. Multiple metabolic defects during late pregnancy in women at high risk for type 2 diabetes (1999); 48(4): 848-854.
- [18] A. K. Khetan, S. Rajagopalan. *Prediabetes* (2018); 34 (5): 615-623.
- [19] T.A. Buchanan, A. Xiang, S.L. Kjos, R. Watanabe. What Is Gestational Diabetes? ; *Diabetes Care* (2007); 30: S105–S111.
- [20] B.S.Q. Rodriguez, H. Mahdy. *Gestational Diabetes*. StatPearls Publishing, 2022.
- [21] American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* (2003); 26 (1): s103–s105.
- [22] T.A. Buchanan, A. H. Xiang. Gestational diabetes mellitus (2005); 115 (3): 485-491.
- [23] C. Homko, E. Sivan, X. Chen, E.A. Reece, G. Boden. Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus (2001); 86 (2): 568-573.
- [24] J.H. Moon, H.C. Jang. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications (2022); 46 (1): 3-14.
- [25] B. Wicklow, R. Retnakaran. Gestational Diabetes Mellitus and Its Implications across the Life Span; *Diabetes and Metabolism Journal* (2022).
- [26] C.W. Hockett, K.K. Harrall, B.F. Moore, A.P. Starling, A. Bellatorre et al. Persistent effects of in utero overnutrition on offspring adiposity: the Exploring Perinatal Outcomes among Children (EPOCH) study. *Diabetologia* (2019); 62 (11): 2017-2024.
- [27] R.N. Bergman, M. Ader, K. Huecking, G. Van Citters. Accurate Assessment of  $\beta$ -Cell Function: The Hyperbolic Correction. *Diabetes* (2002); 51: S212–S220.

- [28] C.E. Powe, L.P. Huston Presley, J.J. Locascio et al; Augmented insulin secretory response in early pregnancy. *Diabetologia* (2019); 62: 1445–1452
- [29] T.P. Waters, S.Y. Kim, A.J. Sharma et al. Longitudinal changes in glucose metabolism in women with gestational diabetes, from late pregnancy to the postpartum period. *Diabetologia* (2020); 63: 385–394.
- [30] C. Ignell, N. Shaat, M. Ekelund, K. Berntorp. The impact of ethnicity on glucose homeostasis after gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetologica* (2013); 50 (6): 927- 934.
- [31] A. Sharma, S. Lee-ødegård, E. Qvigstad, C. Sommer, N. Sattar, Gill J.M.R. et al.  $\beta$ -Cell Function, Hepatic Insulin Clearance, and Insulin Sensitivity in South Asian and Nordic Women After Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* (2022), 71 (12): 2530-2538.
- [32] Y. Saisho, K. Miyakoshi, M. Tanaka, A. Shimada, S. Ikenoue, I. Kadohira, Y. Yoshimura, H. Itoh, Beta cell dysfunction and its clinical significance in gestational diabetes. *Endocrine Journal* (2010); 57 (11): 973-980.
- [33] M. P. Genova, K. Todorova-Ananieva, B. Atanasova, K. Tzatchev; Assessment of Beta-Cell Function During Pregnancy and after Delivery. *Acta Medica Bulgarica* (2014); 41 (1): 5-12.
- [34] N. Masuko, K. Tanimura, N. Kojima, H. Imafuku, M. Deguchi, Y. Okada, Y. Hirota, W. Ogawa, H. Yamada. Predictive factors for postpartum glucose intolerance in women with gestational diabetes mellitus (2022); 48 (3): 640-646.
- [35] N. Kojima, K. Tanimura, M. Deguchi, M. Morizane, Y. Hirota, W. Ogawa, H. Yamada. Risk factors for postpartum glucose intolerance in women with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol* (2016); 32 (10): 803-806.
- [36] E. Kousta, N.J. Lawrence, I.F. Godsland et al. Insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction in normoglycaemic European women with a history of gestational diabetes. *Clinical Endocrinology* (2003); 59: 289-297.
- [37] A.H. Xiang, M. Kawakubo, E. Trigo, S.L. Kjos, T.A. Buchanan. Declining  $\beta$ -Cell Compensation for Insulin Resistance in Hispanic Women with Recent Gestational Diabetes Mellitus: Association with changes in weight, adiponectin, and C-reactive protein; *Diabetes Care* (2010); 33 (2): 396–401

- [38] T.A. Buchanan, A.H. Xiang, R.K. Peters, S.L. Kjos, K. Berkowitz, A. Marroquin, J. Goico, C. Ochoa, S.P. Azen. Response of pancreatic beta-cells to improved insulin sensitivity in women at high risk for type 2 diabetes; *Diabetes* (2000); 49 (5): 782–788.
- [39] H. Huopio, H. Hakkarainen, M. Pääkkönen et al. Long-term changes in glucose metabolism after gestational diabetes: a double cohort study; *BMC Pregnancy Childbirth* (2014); 14: 296
- [40] A. Sharma, S. Lee-Ødegård, E. Qvigstad, C. Sommer, N. Sattar et al.  $\beta$ -Cell Function, Hepatic Insulin Clearance, and Insulin Sensitivity in South Asian and Nordic Women After Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* (2022); 71 (12): 2530–2538.
- [41] C. Ignell, N. Shaat, M. Ekelund et al. The impact of ethnicity on glucose homeostasis after gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol* (2013); 50: 927–934.