

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE**  
**XXVII CICLO**



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**DENSITA' MINERALE OSSEA, QUALITA' DELL'OSSO E**  
**RISCHIO DI FRATTURA NEL DIABETE MELLITO TIPO 2:**  
**RUOLO DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE E**  
**DELLA SENSIBILITA' AI GLUCOCORTICOIDI**

Settore scientifico disciplinare: MED 13

**TESI DI DOTTORATO DI**

**Dott.ssa Volha Zhukouskaya**

**MATRICOLA R09534**

**TUTOR: Dott. Andrea LANIA**

**COORDINATORE: Prof. Angelo POLETTI**

Anno accademico 2013 - 2014

## INDICE:

I.	INTRODUZIONE.....	2
1.	Diabete mellito: definizione, classificazione e complicanze.....	2
2.	Fisiologia del tessuto osseo.....	5
3.	Alterazioni scheletriche nel diabete mellito tipo 2.....	13
3.1.	Mineralizzazione ossea.....	13
3.2.	Geometria dell'osso.....	14
3.3.	Resistenza / Qualità ossea.....	16
3.4.	Rischio di frattura.....	18
3.5.	Aspetti fisio-patologici.....	18
3.6.	Fattori clinici associati al rischio di frattura.....	22
4.	Glucocorticosteroidi ed il loro ruolo nel diabete mellito tipo 2.....	24
4.1.	Asse ipotalamo-ipofisi-surrene.....	24
4.2.	Polimorfismi del recettore dei glucocorticosteroidi .....	25
4.3.	Alterazioni dell'asse HPA e 11 $\beta$ -idrossisteroidodeidrogenasi.....	26
5.	Descrizione dell'ipotesi in studio.....	28
II.	STUDIO.....	29
1.	Obiettivi.....	29
2.	Pazienti.....	29
3.	Metodi.....	30
4.	Risultati.....	34
III.	DISCUSSIONE.....	42
IV.	BIBLIOGRAFIA.....	48
V.	RINGRAZIAMENTI.....	57

## **I. INTRODUZIONE**

### **1. Diabete mellito: definizione, classificazione e complicanze**

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale Della Sanità (OMS), il diabete mellito (DM) comprende un gruppo di disordini metabolici a diversa eziologia, che influenza il metabolismo glucidico, lipidico e proteico ed è caratterizzato da iperglicemia cronica, per un difetto della secrezione dell'insulina o dell'azione dell'insulina, presenti in differente grado (1,2).

L'attuale classificazione dell'OMS e dell'American Diabetes Association (ADA) si basa sull'eziopatogenesi del DM. Così, si riconosce il diabete mellito di tipo 1, di tipo 2, il diabete gestazionale e altri tipi di DM (2) (tabella 1).

Il DM di tipo 2 (DM2) rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini caratterizzati, da una parte, da gradi variabili d'insulinoresistenza con l'iperinsulinismo (compensatorio all'iperglicemia), e d'altra parte, da alterata secrezione insulinica, che, in soggetti geneticamente predisposti, vengono slatentizzati da fattori ambientali, quali l'obesità, un elevato apporto calorico e la sedentarietà. Negli ultimi decenni si è assistito a un notevole aumento della prevalenza del DM in tutto il mondo. L'incremento della prevalenza e incidenza di obesità e la diminuzione dell'attività fisica inducono a ritenere che vi potrà essere un ulteriore incremento della prevalenza del DM2 in futuro. La prevalenza nel mondo di DM2 negli adulti di età maggiore di 20 anni è stata stimata del 4.5% nel 1995, ed è prevista in aumento fino al 5.4% entro il 2025, con un numero di pazienti pari a 135 milioni nel 1995 che potrebbe raggiungere la cifra di 366 milioni nel 2030. Si stima che la prevalenza di DM2 possa aumentare entro il 2025 del 42% nei paesi in via di sviluppo e del 170% nei paesi sviluppati (2).

Nel lungo termine il DM induce lo sviluppo progressivo di complicanze croniche a carico dell'apparato cardiovascolare e del sistema nervoso. Le complicanze cardiovascolari si suddividono in macro- e micro-vascolari: al primo gruppo appartengono la cardiopatia, la vasculopatia cerebrale e l'arteriopatia degli arti inferiori; al secondo gruppo, la retinopatia, la nefropatia e la neuropatia. La vasculopatia e neuropatia favoriscono le ulcere agli arti inferiori e l'artropatia di Charcot, e concorrono a sviluppare la complicanza piede diabetico (2).

Negli ultimi anni si è prestata molta attenzione a un'altra complicanza del diabete che coinvolge il tessuto scheletrico. Infatti, nei pazienti con DM2 si è documentato un aumentato rischio di frattura di qualsiasi tipo malgrado la presenza di normale o elevata massa ossea, verosimilmente dovuto ad una ridotta qualità del tessuto osseo (1,3).

Tabella 1 – Classificazione eziopatogenetica del diabete mellito (2)

<p>I. Diabete mellito tipo 1 (distruzione di cellule <math>\beta</math>, deficit assoluto di insulina)</p> <p>A. Immuno-mediato</p> <p>B. Idiopatico</p>
<p>II. Diabete mellito tipo 2 (può variare da insulinoresistenza con deficit relativo dell'insulina a prevalentemente deficit secretorio con insulinoresistenza)</p>
<p>III. Altri tipi di diabete mellito</p> <p>A. Deficit genetico della funzione di <math>\beta</math>-cellule</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cromosoma 12, HNF-1<math>\alpha</math> (MODY3)</li> <li>2. Cromosoma 7, glucokinase (MODY2)</li> <li>3. Cromosoma 20, HNF-4<math>\alpha</math> (MODY1)</li> <li>4. Cromosoma 13, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4)</li> <li>5. Cromosoma 17, HNF-1<math>\beta</math> (MODY5)</li> <li>6. Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY6)</li> <li>7. Mitocondriale DNA</li> </ol> <p>B. Deficit genetico dell'azione insulinica</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Insulinoresistenza tipo A</li> <li>2. Leprecaunismo</li> <li>3. Sindrome Rabson-Mendenhall</li> <li>4. Diabete lipoatrofico</li> </ol> <p>C. Malattia della parte esocrina del pancreas</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pancreatite</li> </ol>

2. Trauma/pancreasectomia
3. Neoplasia
4. Fibrosi cistica
5. Emocromatosi

D. Endocrinopatie

1. Acromegalia
2. Sindrome di Cushing
3. Glucagonoma
4. Feocromocitoma
5. Ipertiroidismo
6. Somatostatina
7. Aldosteronoma

E. Farmaco-indotto

1. Pentamidina
2. Acido Nicotinico
3. Glucocorticoidi
4. Ormone tiroideo
5. Diazossido
6.  $\beta$ -agonisti
7. Tiazidici
8.  $\gamma$ -Interferone

F. Infezione

1. Rosolia
2. Citomegalovirus

G. Altri sindromi genetici associate con diabete

1. Sindrome di Down
2. Sindrome di Klinefelter
3. Sindrome di Turner
4. Sindrome di Wolfram
5. Atassia di Friedreich
6. Corea di Huntington
7. Sindrome di Laurence-Moon-Biedl
8. Distrofia miotonica
9. Porfiria
10. Sindrome di Prader-Willi

#### IV. Diabete gestazionale

MODY – Maturity onset diabetes of the young (il diabete dei bambini dovuto a deficit genetico di beta-cellule);

HNF - hepatocyte nuclear factor.

## 2. Fisiologia del tessuto osseo

Il tessuto osseo è considerato, assieme alla cartilagine, come un tessuto connettivo di sostegno. Tale classificazione è comprovata dalla derivazione dal mesenchima, comune a tutti i connettivi, e dalla composizione in cellule inserite in un'abbondante matrice extracellulare ricca di fibre collagene, proteine non collageniche e proteoglicani. La matrice extracellulare organica del tessuto osseo è impregnata di sali minerali, in prevalenza cristalli di fosfato tricalcico idrato. L'abbondanza dei minerali e la peculiare distribuzione delle fibre collagene conferiscono al tessuto osseo proprietà meccaniche di durezza e resistenza alle forze di pressione, trazione e torsione, rendendo lo scheletro la struttura di sostegno dell'organismo. Inoltre, l'osso rappresenta un'importante riserva di ioni calcio e fosforo. La deposizione e la mobilizzazione di calcio e di fosfato sono accuratamente controllate a livello osseo e contribuiscono alla regolazione dei livelli di tali ioni nei liquidi circolanti.

Il tessuto osseo è organizzato in due diverse forme strutturali: l'osso compatto (corticale) e l'osso spugnoso (trabecolare). L'osso compatto costituisce la struttura delle ossa lunghe. Invece, l'osso spugnoso o trabecolare è distribuito principalmente all'interno alle ossa brevi, piatte e nell'estremità delle ossa lunghe, ed è così denominato perché costituito da trabecole ossee separate da ampie cavità, che conferiscono al tessuto l'aspetto di una spugna (4).

L'organizzazione microscopica dell'osso è rappresentata dalla matrice extracellulare (organica e inorganica) e dalle cellule immerse in questa matrice.

Le cellule dell'osso possono essere suddivise in due gruppi: le cellule della linea osteogenica (osteoblasti e osteociti) e le cellule-osteodemolitrici (osteoclasti).

Le cellule osteogeniche derivano da cellule staminali pluripotenti presenti nel mesenchima, o da cellule staminali della linea stromale del midollo osseo. Esse possono dare

origine a condroblasti, adipociti, osteoblasti e mioblasti, secondo le condizioni del microambiente e/o la presenza di fattori di regolazione locale (4-6).

**Gli osteoblasti**, rappresentano il 4-6% delle cellule residenti nell'osso, e, sintetizzando le varie proteine ed i cristalli di idrossiapatite, partecipano alla neoformazione della matrice ossea (5). Un altro ruolo fondamentale degli osteoblasti è il controllo degli osteoclasti che avviene attraverso la secrezione di diverse citochine tra cui il Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) che è in grado di stimolare la proliferazione e la differenziazione degli osteoclasti. Il secondo meccanismo attraverso il quale avviene l'interazione tra gli osteoblasti e gli osteoclasti è rappresentato dal sistema osteoprotegerina/RANKL/RANK. Gli osteoblasti rilasciano due proteine quali l'osteoprotegerina (OPG) e RANKL (Receptor-Activated Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand). La OPG appartiene alla famiglia dei recettori del Tumor Necrosis Factor (TNF) e viene espressa non solamente dagli osteoblasti, ma anche dagli vari organi, come il polmone, il cuore, il rene, la tiroide e l'endotelio. Anche RANKL appartiene alla famiglia dei recettori di TNF e viene rilasciato dagli preosteoblasti e dai T-linfociti. RANK (Receptor-Activated Nuclear Factor  $\kappa$ B) rappresenta una proteina transmembrana che si trova sulla superficie degli osteoclasti (5,6). Nelle situazioni fisiologiche OPG e RANKL vengono rilasciati dagli osteoblasti in concentrazioni equivalenti. OPG lega RANKL, impedendone il legame con il suo recettore RANK sugli osteoclasti. L'eccessiva produzione di RANKL può essere stimolata dal paratormone (PTH), glucocorticosteroidi (GC),  $1,25(\text{OH})_2$ vitaminaD<sub>3</sub>, interleukine (IL) 6 e 8, TNF $\alpha$ , che determina una diminuzione del rapporto OPG/RANKL con conseguente aumento del legame del RANKL al RANK sugli osteoclasti ed attivazione del riassorbimento osseo. Gli estrogeni, invece, aumentano la sintesi di OPG, inibendo così l'osteoclastogenesi e proteggendo l'osso dal riassorbimento (6).

Oltre al ruolo di regolazione paracrina a livello del tessuto osseo, gli osteoblasti sono in grado di svolgere un'azione endocrina tramite osteocalcina (guarda il testo dopo).

La differenziazione degli osteoblasti viene principalmente regolata dai due sistemi: (1) le proteine morfogeniche dell'osso (Bone Morphogenic Proteins (BMPs)); (2) la via canonica del segnale Wnt. (1) BMPs appartengono alla classe dei Transforming Growth Factors (TGF) e stimolano l'espressione genica dei principali fattori di trascrizione della differenziazione osteoblastica come Runx2 e osterix (Osx). L'attivazione del segnale Wnt avviene tramite le proteine Wnt che legandosi ai loro recettori Frizzled (FRZ) e LPR 5/6 promuovono una catena di segnali intracellulari, portando all'inibizione della fosforilazione di  $\beta$ -catenina. Quando  $\beta$ -catenina è defosforilata, è più stabile, ed in tal modo può migrare nel nucleo e attivare la trascrizione dei geni-bersaglio (Runx2 e Osx). Viceversa, se al recettore LRP 5/6 si legano molecole antagoniste del segnale Wnt come sclerostina (SOST), prodotta dagli osteociti, e Dickkopf-related protein 1 (DKK1), LRP5/6 viene distaccato da FRZ. Questo consente a livello intracellulare la fosforilazione di  $\beta$ -catenina e l'inibizione della trascrizione dei geni-bersaglio Runx2 e Osx (Figura 1).

Via via che la deposizione della matrice procede, altre cellule osteogeniche raggiungono la loro maturazione e iniziano a loro volta a deporre matrice, inglobando gli osteoblasti già maturi nella matrice. Si ritiene che dopo aver raggiunto una maturità completa, gli osteoblasti possano: (1) andare incontro ad apoptosi; (2); trasformarsi in lining-cells; (3) rimanere inglobati nella matrice ossea come osteociti (5) (Figura 2).

***Lining cells (le cellule di rivestimento)***, quiescenti e piatte, mantengono il controllo dello stato del tessuto osseo. Sono in grado di ricevere e mandare dei messaggi alle cellule circostanti, intervenendo, se è necessario, nel rimodellamento osseo; essi prevengono l'interazione tra gli osteoclasti e la matrice ossea dove non deve avvenire riassorbimento (4,5).



Figura 1 – Segnale Wnt negli osteoblasti (Modificato da Capulli et al, 2014) (5)

A – attivazione del segnale Wnt attraverso le proteine Wnt;

B – inibizione del segnale Wnt attraverso le molecole sclerostina (SOST) e Dickkopf-related protein 1 (DKK1)

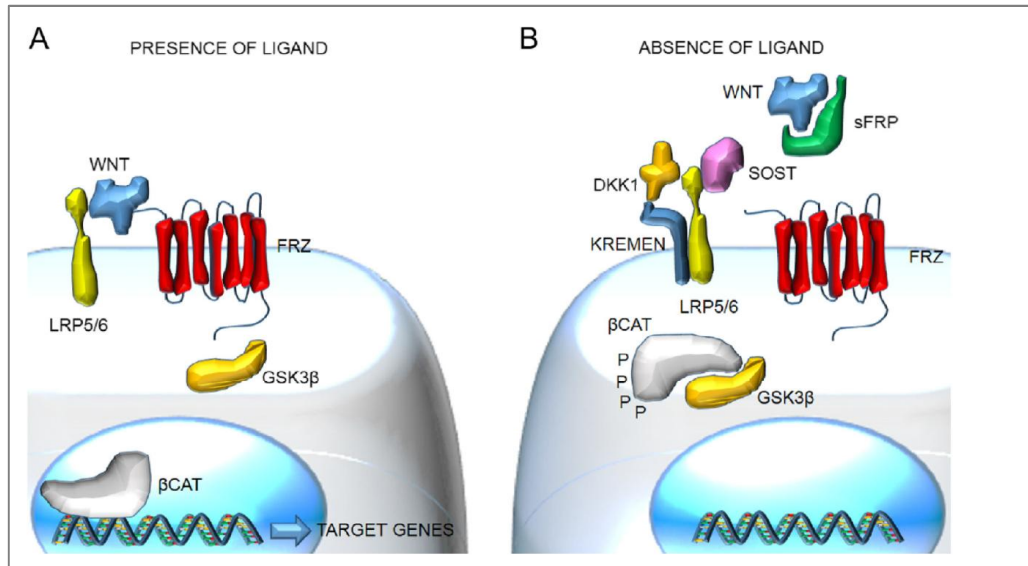
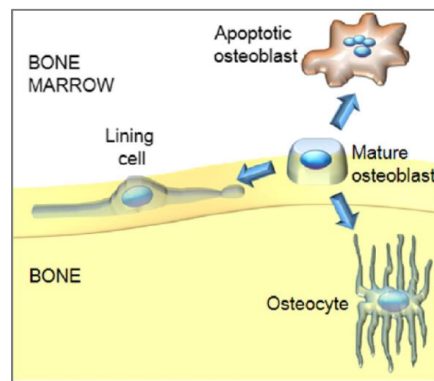


Figura 2 – Possibile destino degli osteoblasti maturi (modificato da Capulli et al, 2014) (5)



*Gli osteociti* rappresentano 90-95% delle cellule residenti del tessuto osseo e sono caratterizzati da numerosi (fino a 50) prolungamenti citoplasmatici (5). Inizialmente gli osteociti erano considerati solamente come meccanocettori, mentre attualmente vi è dimostrazione che essi abbiano un controllo non solo sulla differenziazione degli osteoblasti

ed osteoclasti ma anche sull'omeostasi minerale. Come mecanocettori, gli osteociti, in risposta ai diversi stimoli (compressione, stiramento), sono in grado di elaborare e mandare messaggi biochimici, che inducono adeguate risposte (deposizione o rimodellamento dell'osso) (4,5). Come regolatori della funzione osteoblastica, gli osteociti attraverso la sintesi di SOST antagonizzano il segnale Wnt inibendo in tal modo la differenziazione e proliferazione degli osteoblasti. Come regolatori della funzione osteoclastica, gli osteociti, in condizioni patologiche (ad esempio in presenza di microfrattura), vanno incontro ad apoptosi e rilasciano in elevata quantità dei fattori promuoventi l'osteolastogenesi come RANKL, TNF $\alpha$  e IL-6. Infine, come regolatori dell'omeostasi minerale, gli osteociti sintetizzano il Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) implicato nel metabolismo del fosforo (5).

**Gli osteoclasti** sono le cellule specializzate nel rimuovere la matrice ossea. Essi originano dai monociti circolanti nel sangue o presenti negli spazi midollari nell'osso spugnoso. I precursori mononucleati non ancora determinati si differenziano in osteoclasti maturi in presenza di M-CSF e RANKL, una proteina secreta dalla linea cellulare stromale, dagli osteoblasti e dai T linfociti. Gli osteoclasti non sono in senso stretto cellule residenti nel tessuto osseo. Si formano quando la matrice ossea deve essere rimossa, e scompaiono al termine del processo, per apoptosi. Gli osteoclasti hanno un'elevata attività di fosfatasi acida tartrato-resistente (marcatore di riconoscimento specifico) e di catepsina K, proteina fondamentale nella degradazione della matrice organica. Inoltre, presentano recettori per calcitonina, integrina e RANK (4,6).

La **Matrice organica** è composta di collagene di tipo 1 (90%) organizzato in fibre. Queste rendono il tessuto elastico e flessibile e sono disposte parallelamente fra loro nelle singole lamelle. Le fibre sono connesse tra di loro con i legami cosiddetti cross-links. La presenza nelle urine di residui contenenti cross-links specifici del tessuto osseo è considerata un parametro diagnostico dell'entità del rimodellamento osseo in corso (4).

Il rimanente 10% della matrice organica è rappresentata dalle proteine d'origine osteoblastica (proteoglicani, glicoproteine, glicoproteine adesive, proteine contenenti acido  $\gamma$ -carbossi-glutammico), le più importanti delle quali sono la fosfatasi alcalina e l'osteocalcina. La fosfatasi alcalina è una glicoproteina secreta dagli osteoblasti durante la neoformazione di matrice. La fosfatasi alcalina ossea è considerata un marker specifico dell'attività osteoblastica. I livelli ematici di fosfatasi alcalina totale dipendono tuttavia anche dalla secrezione epatica e intestinale. L'osteocalcina appartiene al gruppo delle proteine contenenti l'acido  $\gamma$ -carbossi-glutammico ed è l'unica proteina specifica del tessuto osseo. I livelli ematici dell'osteocalcina sono utilizzati come il parametro di valutazione quantitativa del turnover osseo (4).

L'osteocalcina esiste in due forme: carbossilata e non carbossilata. L'enzima  $\gamma$ -carbossilasi vitamina K-dipendente catalizza la carbossilazione dell'osteocalcina, rendendola più affine agli ioni di calcio nell'idrossiapatite. Mentre la forma carbossilata dell'osteocalcina risiede nella matrice organica dell'osso, la maggior parte di quella non carbossilata viene rilasciata nel sangue (4). L'osteocalcina ha delle diverse funzioni sia scheletriche che extrascheletriche. Come funzione scheletrica, l'osteocalcina, una volta rilasciata dagli osteoblasti, promuove il reclutamento e la differenziazione degli monociti circolanti e dei precursori degli osteoclasti ed avrebbe un ruolo nell'interazione tra gli osteoblasti ed osteoclasti e nel riassorbimento osseo (7). Per converso, nell'ultimo decennio è stata scoperta l'azione extrascheletrica dell'osteocalcina, in particolare endocrina. Si ritiene che l'osteocalcina, nella sua forma non carbossilata, partecipi nella regolazione del metabolismo glucidico/energetico. L'osteocalcina non carbossilata, rilasciata durante il riassorbimento osseo, stimola direttamente la produzione insulinica dalle  $\beta$ -cellule nel pancreas. Inoltre, l'osteocalcina non carbossilata agisce sugli adipociti incrementando la produzione dell'adiponectina che a sua volta, aumenta la sensibilità insulinica. L'incremento dei livelli insulinici determina una stimolazione del turnover scheletrico che assicura il rilascio nel

sangue dell'osteocalcina non carbossilata (7-9). Inoltre, dati recenti suggeriscono come l'osteocalcina agisca direttamente anche sulle cellule di Leydig aumentando la loro attività e la produzione di testosterone, che direttamente o aromatizzato in estrogeni svolge un effetto anabolico sul tessuto scheletrico (7) (Figura 3).

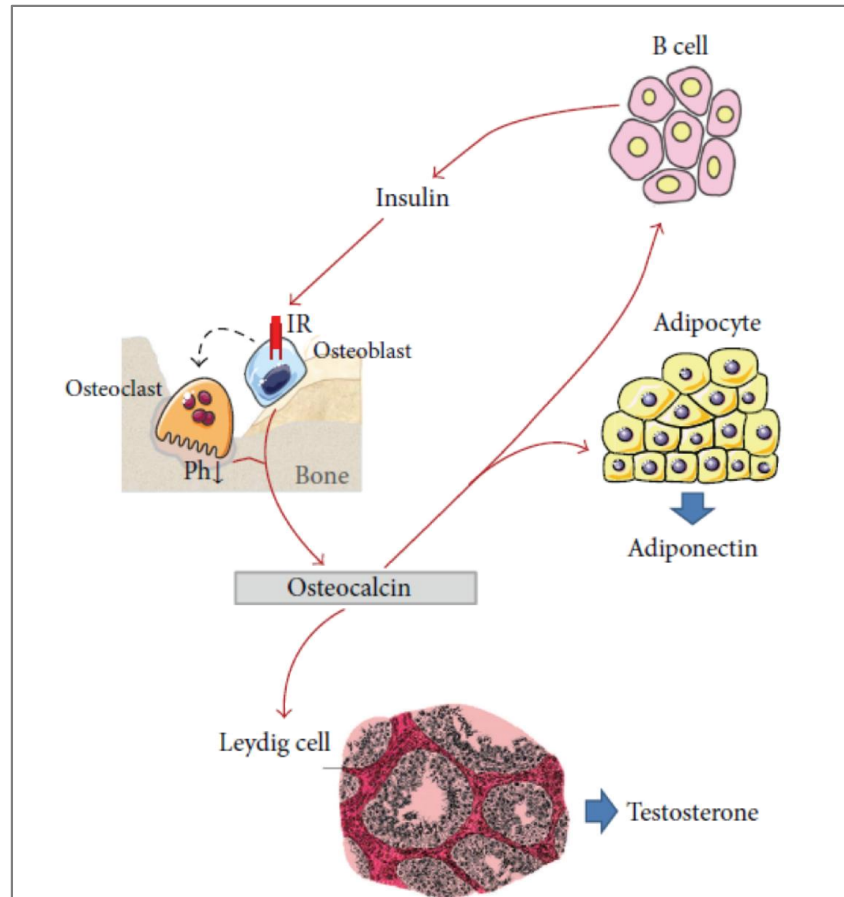
**La matrice inorganica o minerale** costituisce il 50-70% della matrice ossea ed è rappresentata da un analogo dell'idrossiapatite  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . Essa conferisce all'osso rigidità e resistenza al carico meccanico (4).

Il tessuto osseo subisce un continuo rinnovamento strutturale, detto *rimodellamento osseo*, che dura per tutta la vita dell'individuo. Il rimodellamento prevede la rimozione di osso "vecchio" e la sua sostituzione con quello "nuovo". Esso consiste in due fasi: il riassorbimento che viene effettuato dagli osteoclasti e la formazione che è compito degli osteoblasti. Annualmente, circa il 5-25% dell'osso subisce il rimodellamento, che consente la riparazione delle microfratture e gli scambi di calcio e del fosforo con il compartimento ematico. Il rimodellamento osseo procede secondo le esigenze meccaniche e le richieste metaboliche. I segmenti ossei più sollecitati meccanicamente sono più irrobustiti e modellati. Le forze meccaniche vengono percepite dai meccanosensori (osteociti), che trasmettono i messaggi biochimici alle cellule superficiali, lining cells. Queste richiamano i precursori degli osteoclasti. Gli osteoclasti già maturi aderiscono alla superficie ossea e iniziano a degradare la matrice organica. Al termine della fase di rimodellamento, attraverso segnali non ancora chiariti, inizia la sintesi di nuovo osso con la deposizione della matrice da parte dagli osteoblasti (4,6). Il rimodellamento osseo è regolato dai vari ormoni e citochine come l'insulina, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), PTH, gli ormoni tiroidei, GC, gli estrogeni, la vitamina D, IL-1, 6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (4).

L'accoppiamento di questi due processi rappresenta il momento cruciale nel mantenimento dell'integrità ossea. Se la funzione degli osteoblasti e/o osteoclasti per diversi motivi patologici è alterata, l'apposizione e il riassorbimento osseo risultano inefficienti di

riparare il vecchio osso. Ciò a sua volta, porta ad un accumulo di microfratture rendendo osso più vulnerabile ai diversi stimoli.

Figura 3 – Azione endocrina dell'osteocalcina ( modificato da Patti et al., 2013) (7)



### **3. Alterazioni scheletriche nel diabete mellito tipo 2**

#### **3.1. Mineralizzazione ossea**

La densità minerale ossea (bone mineral density, BMD) rappresenta un fattore assai importante per la resistenza ossea. La BMD è considerata uno dei fattori predittivi del rischio fratturativo. Nella pratica clinica di routine la BMD è facilmente misurabile mediante una metodica standard come la densitometria ossea a doppio raggio (Dual Energy X-ray Absorptiometry, DXA).

Il tessuto osseo nel DM2 si caratterizza apparentemente da una normale o elevata mineralizzazione e quindi da una normale o aumentata BMD. Più importanti studi di metanalisi dell'ultimo decennio (3, 10-14) hanno dimostrato che i pazienti affetti dal DM2 possono avere normali o aumentati livelli di BMD in tutti i principali siti scheletrici (collo femorale, femore totale, colonna vertebrale, polso) rispetto ai pazienti non diabetici. E' stato in realtà suggerito da alcuni autori, che, correggendo il BMD per l'indice di massa corporea (body mass index, BMI), in realtà la BMD è ridotta anche nel DM2 (10,14). Anche correggendo per BMD, tuttavia Petit e collaboratori (15), hanno documentato elevati o normali livelli della BMD corticale (tibia distale e polso) nei pazienti diabetici rispetto ai controlli non diabetici.

Anche se i pazienti con DM2 possono presentare una normale o elevata mineralizzazione ossea, nel DM2 il tasso di perdita di tessuto osseo è maggiore. Schwartz e collaboratori (12) hanno analizzato la BMD delle donne con DM2 al baseline ed a distanza di 10 anni, dimostrando che le pazienti diabetiche, nonostante una più alta BMD iniziale, hanno una velocità maggiore di perdita ossea al livello del femore, collo femorale, colonna vertebrale, calcagno, ma non nel polso, rispetto alle pazienti non diabetiche. Come spiegato dagli autori, queste differenze sito-specifiche della perdita ossea, possono essere in relazione

alla presenza o assenza di carico. Ovvero i siti scheletrici come il piede, il femore e la colonna vertebrale, subendo un maggior carico rispetto al polso possono perdere l'osso più velocemente in presenza di DM2.

### **3.2. Geometria dell'osso**

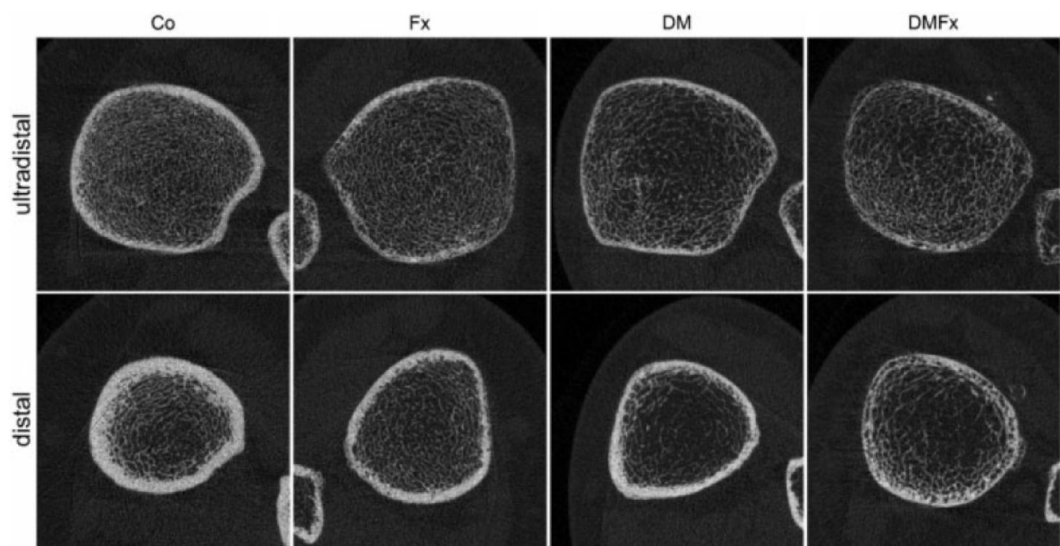
Le tecniche più innovative come l'analisi della struttura femorale (hip structural analysis) attraverso la DXA e la tomografia computerizzata periferica quantitativa convenzionale e ad alta risoluzione (pQCT e HR-pQCT, rispettivamente) danno la possibilità di trovare informazione aggiuntiva non evidenziabile con le tecniche standard. La HR-pQCT, infatti, permette di caratterizzare la densità minerale in maniera tridimensionale, la geometria, la micro architettura e la biomeccanica ossea.

Nel DM2, mentre la massa trabecolare appare intatta, anzi, talvolta aumentata, la densità minerale a livello corticale presenta le maggiori alterazioni. Oei e collaboratori (11) analizzando la geometria del collo femorale attraverso la DXA, hanno dimostrato che, malgrado una elevata BMD al livello femorale, i pazienti diabetici in non ottimale controllo glicemico (glycosilated hemoglobin, HbA1c  $\geq 7.5\%$ ) hanno un diametro minore a livello del collo femorale con tuttavia un maggior spessore corticale, rispetto ai pazienti diabetici in buon controllo glicemico (HbA1c  $< 7.5\%$ ), che, a loro volta, non differivano dai controlli non diabetici. Tuttavia, nonostante i parametri geometrici apparentemente migliori, i pazienti diabetici in non ottimale controllo glicemico presentavano il rischio di frattura nettamente aumentato rispetto ai diabetici in buon controllo glicemico ed ai controlli.

La presenza di un collo femorale di minori dimensioni può essere spiegata da una mancata espansione ossea (apposizione periostale) in presenza di DM2. Inoltre, lo stato di iperglicemia cronica può condurre ad un accumulo di microfratture e verosimilmente di porosità corticale. Di conseguenza, si avvia una reazione di apposizione ossea aumentata

mirata all'accumulo di microfratture. In effetti, tali cambiamenti geometrici ossei nel DM 2 sono stati confermati ulteriormente utilizzando pQCT / HR-pQCT. Non tutti (16,17) ma diversi ricercatori (15,18,19) hanno dimostrato che i pazienti con DM2 presentano: (1) un maggiore volume della densità ossea a causa di un'umentata densità trabecolare nella regione adiacente alla corteccia; (2) una riduzione del BMD soprattutto corticale; (3) un'umentata porosità corticale. Quest'ultimo aspetto è stato riscontrato prevalentemente nei pazienti diabetici con fratture da fragilità rispetto ai diabetici non fratturati (Figura 4) (18) suggerendo che proprio la porosità corticale potrebbe essere una delle possibili spiegazioni dell'umentato rischio fratturativo nel DM2.

Figura 4 – Porosità corticale al livello della tibia ultradistale (sopra) e distale (sotto) visualizzata mediante HR-pQCT nei seguenti gruppi dei pazienti: Co – controlli non affetti dal DM2, Fx – controlli non affetti dal DM2 con fratture; DM - pazienti affetti da DM2 senza fratture, DMFx – pazienti affetti da DM2 con fratture. Una maggiore porosità corticale può essere osservata nel gruppo DMFx (a destra) (18).





### 3.3. Resistenza / Qualità ossea

La resistenza ossea contribuisce in una maniera rilevante al rischio di frattura. La resistenza ossea può essere compromessa attraverso la riduzione della massa ossea, l'alterazione delle proprietà biomeccaniche del tessuto osseo e l'alterazione della morfologia ossea. Le proprietà biomeccaniche ossee come la forza, la fragilità, la durezza, rispecchiano la capacità dell'osso di resistere ai stimoli esterni, e possono essere misurate tramite diverse tecniche (tensile test, microindentation). Inoltre, dalla DXA e pQCT/HR-pQCT possono essere ottenuti dei parametri indiretti delle proprietà biomeccaniche ossee. Le informazioni sulla morfologia e qualità dell'osso possono essere ottenute tramite la micro-tomografia computerizzata (micro-computed tomography,  $\mu$ CT), HR-pQCT ed un'analisi istomorfometrica da materiale bioptico.

Dal momento che nel DM2 non si assiste ad una riduzione della massa ossea, sono state svolte diversi studi volti ad indagare le proprietà biomeccaniche e la qualità dell'osso per poter spiegare l'aumentato rischio di frattura nei pazienti diabetici, malgrado una BMD normale.

Analizzando la biomeccanica ossea attraverso DXA (20) i pazienti con DM2 mostrano parametri di resistenza ossea a livello femorale ridotti. Simili risultati sono stati dimostrati da Petit e collaboratori (15) studiando l'osso a livello tibiale e radiale tramite pQCT. Nei pazienti con DM2 non sono state riscontrate differenze nella resistenza dell'osso trabecolare, mentre l'osso corticale ha mostrato una ridotta resistenza ossea. Analogamente, gli studi che hanno valutato la microarchitettura dell'osso mediante HR-pQCT (18,19) hanno dimostrato un deficit biomeccanico (riduzione della resistenza ossea) a livello dell'osso corticale della tibia e polso nei pazienti diabetici, in particolare nei pazienti diabetici con storia di frattura. Infine, le indagini *in vivo* delle proprietà biomeccaniche ossee attraverso la tecnica di microindentation (17) ha confermato una riduzione della resistenza ossea nel DM2.

Per quanto riguarda la qualità dell'osso nel DM2, le tecniche di imaging attraverso HR-pQCT (17-19) non hanno evidenziato differenze nei parametri della morfologia ossea (numero, lo spessore, la separazione delle trabecole) tra i pazienti diabetici e controlli, suggerendo che questi parametri di qualità dell'osso potrebbero essere conservati nel DM2. Tuttavia, nell'unico studio istomorfometrico condotto ad oggi nel DM2, Manavalan e collaboratori (21) eseguendo un'analisi istomorfometrica materiale bioptico osseo sono riusciti a dimostrare una riduzione dell'area corticale, con conservazione dell'osso trabecolare

Purtroppo, tutt'oggi le tecniche di valutazione della resistenza ossea non sono disponibili nella pratica clinica di routine. Recentemente, il Trabecular Bone Score (TBS) è stato proposto come un nuovo indice surrogato della qualità ossea (22,23). Il TBS analizza le variazioni dei toni di grigio a livello della colonna lombare in proiezione 2D attraverso la DXA. Anche se il TBS correla significativamente con la micro architettura ossea, deve essere sottolineato che esso non misura direttamente la microstruttura ossea. (23). Tuttavia, diversi studi suggeriscono come il TBS sia in grado di predire il rischio fratturativo, soprattutto nelle forme di osteoporosi secondaria (24,25), in misura migliore rispetto al BMD misurato tramite DXA. Nei pazienti con DM2, alcuni studi hanno dimostrato una riduzione dei valori (26,27) ed una buona capacità del TBS (con un follow-up di 4.7 anni) (26) di predire il rischio fratturativo nelle persone diabetiche.

Concludendo, mentre numerosi studi suggeriscono un'alterazione delle proprietà biomeccaniche dell'osso nel DM2, la riduzione della qualità dell'osso nel DM2 è ancora discussa, nonostante le evidenze di un'alterazione della micro architettura ossea misurata attraverso indici indiretti. Sono necessari studi più ampi con utilizzo delle tecniche "gold standard" come la  $\mu$ CT e l'istomorfometria ossea per poter trarre conclusioni definitive riguardanti la qualità dell'osso nel DM2.

### **3.4. Rischio di frattura**

Come detto, nonostante una normale mineralizzazione, i pazienti con DM2 hanno un rischio di frattura, che appare 1.2-1.7 volte maggiore rispetto ai soggetti non diabetici (3,10). Diversi autori hanno descritto un aumento del rischio fratturativo nel DM2, indipendentemente dal sesso, specialmente a livello femorale (3,28,29), che varia da 1.4 a 2.8 volte rispetto al soggetto senza DM2. Inoltre, è stato evidenziato che nel DM2 vi è un aumento del rischio di frattura anche a livelli di altri altri siti scheletrici (30), come spalla (31), polso (3), arti inferiori (18,29,31), e vertebre (32-34). In ogni caso nel DM2 il rischio di frattura appare aumentato prevalentemente a carico dell'osso corticale.

### **3.5. Aspetti fisio-patologici**

Diversi studi hanno suggerito che il metabolismo osseo nel DM2 è caratterizzato da un basso turnover, ed in particolare da una bassa formazione ossea (10,21,35) dovuta alla riduzione dell'osteoblastogenesi, della differenziazione ed attività osteoblastica (bassi livelli di osteocalcina e ridotta deposizione minerale), del numero degli osteoblasti (riduzione della superficie degli osteoblasti ed osteoide) e ad un aumento della morte osteoblastica precoce (10,21). Il riassorbimento osseo (attività degli osteoclasti) appare ridotto o inalterato (10,21,35). Si ipotizza che proprio un'inibizione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina (36) e dell'attività di Runx2 (21), che giocano un ruolo fondamentale nel normale ciclo fisiologico degli osteoblasti e della formazione ossea, è responsabile del rallentamento del metabolismo osteoblastico. La causa primaria dell'inibizione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina rimane ancora da approfondire, tuttavia, si pensa che tra i fattori, che eventualmente portano al malfunzionamento degli osteoblasti nel DM2, ci siano l'iperglicemia, l'iperinsulinemia e l'insulinoresistenza, l'infiammazione sistemica, un'alterazione dell'equilibrio tra le varie

adipochine e gli ormoni come IGF-1, vitamina D, PTH. Inoltre, aumentati livelli di sclerostina (inibitore fisiologico del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina) potrebbero essere coinvolti nell'inibizione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina nel DM2 (36,37).

*Ruolo dell'iperglicemia: lo stress ossidativo e AGEs.*

L'iperglicemia di *per se*, indipendentemente dalla sua eziologia, ha un effetto dannoso sull'osso. L'iperglicemia ha un effetto tossico diretto sugli osteoblasti (38) e può portare ad un aumento dei prodotti reattivi dell'ossigeno, ad uno stato di iperosmolarità, allo stress ossidativo (21,38,39) e ad un aumento della glicosilazione non enzimatica del DNA e delle varie proteine (10). Il processo della glicosilazione non enzimatica durante l'iperglicemia cronica e lo stress ossidativo porta alla formazione e deposizione nei vari tessuti, incluso l'osso, dei così detti advanced glycation end products (AGEs). Gli AGEs, tra cui in particolare pentosidina, essendo un importante prodotto della glicosilazione nonenzimatica, si deposita prevalentemente nei siti scheletrici a basso turnover come l'osso corticale (40) compromettendo in questo modo la resistenza e la qualità ossea. Si pensa che questo processo sia uno dei meccanismi principali dell'aumentata fragilità ossea e fratture, soprattutto delle ossa corticali come il femore, nel DM2. Diversi autori (41,42) hanno riportato che nei pazienti con DM2 i livelli di pentosidina sono aumentati, ed indipendentemente associati alla presenza di frattura vertebrale.

*Ruolo dell'insulina e IGF-1.*

Da diversi decenni è stato supportato un ruolo anabolico dell'insulina e IGF-1 sulla formazione ossea. Un'espressione dei recettori dell'insulina e IGF-1 è stata riscontrata durante diversi passaggi della differenziazione osteoblastica, dai pre-osteoblasti agli osteoblasti maturi. Inoltre, l'insulina e IGF-1 rappresentano fattori importanti per la selezione della linea osteoblastica nel midollo osseo. Insulina e IGF-1 utilizzano le stesse vie di

signaling per raggiungere diversi bersagli cellulari e sono in grado di interagire con importanti vie pro-osteogeniche che regolano l'attività di Runx2, come il segnale Wnt/ $\beta$ -catenina e BMP (43).

Il DM2 si caratterizza da iperinsulinemia associata ad insulinoresistenza (così detta ipoinsulinemia parziale e relativa). E' stato ipotizzato che negli stadi iniziali di iperinsulinemia in presenza di minore insulino-resistenza si determini una condizione anabolica per il tessuto scheletrico che può portare ad un aumento della mineralizzazione ossea. Ciò spiegherebbe la presenza di un' aumentata BMD, soprattutto trabecolare, nel DM2. Negli stadi successivi della malattia diabetica si assiste ad una riduzione dei livelli insulinemici per il fenomeno del cosiddetto fallimento  $\beta$ -cellulare. In questa situazione, la riduzione del segnale insulinico sul tessuto scheletrico potrebbe portare alle alterazioni del funzionamento osteoblastico descritte sopra ed alla riduzione dell'apposizione scheletrica e del turnover osseo. La riduzione del turnover scheletrico, a sua volta, determina un minor rilascio di osteocalcina non carbossilata, che ha come conseguenza il peggioramento ulteriore dell'ipo-insulinemia e dell'insulinoresistenza.

Nel DM2 i livelli di IGF-1 sono stati riscontrati sia normali (35) che ridotti (45). Tuttavia, Kanazawa e collaboratori (45) hanno dimostrato un'associazione tra i livelli di IGF-1 e la presenza di fratture vertebrali nel DM2.

#### *Ruolo dell'infiammazione.*

Il DM2 è associato all'aumento della deposizione del tessuto adiposo che è in grado di produrre varie sostanze tra le quali adipochine e citochine pro-infiammatorie. Tali citochine come IL-6, 8 e TNF- $\alpha$  possono stimolare il riassorbimento e ridurre la formazione ossea attraverso una soppressione della differenziazione osteoblastica. Quindi, alcuni autori hanno ipotizzato che nel DM2 un stato di infiammazione cronica potrebbe portare un ulteriore contributo nelle alterazioni scheletriche nel DM2 (10).

### *Ruolo delle adipochine.*

Ultimamente, è stato descritto un possibile ruolo nel metabolismo osseo delle varie adipochine prodotte dal tessuto adiposo come leptina e adiponectina.

L'influenza della leptina sull'osso sembra dipendere dalla via attraverso la quale agisce. A livello ipotalamico (via centrale) la leptina sembra avere un effetto negativo sull'osso trabecolare e positivo sull'osso corticale. Invece, l'azione periferica della leptina diretta a livello del tessuto scheletrico sembra promuovere la formazione ossea attraverso la stimolazione degli osteoblasti e l'inibizione degli osteoclasti (46). Gli studi animali hanno suggerito che l'adiponectina legandosi al suo recettore sugli osteoblasti possa avere un effetto positivo sulla formazione ossea. Tuttavia, gli studi clinici hanno trovato una associazione negativa tra l'adiponectina e il BMD (46,47).

### *Ruolo degli ormoni-regolatori del metabolismo calcio-fosforo: vitamina D e PTH.*

Il PTH e la vitamina D sono riconosciuti di essere ormoni importanti nella regolazione del metabolismo calcio-fosforo e del metabolismo osseo.

La vitamina D nella sua forma attiva  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  interagisce con il suo recettore nucleare presente nelle cellule dell'intestino, reni e altri tessuti, stimolando il riassorbimento del calcio al livello intestinale e renale. Inoltre,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  legandosi al suo recettore sugli osteoblasti stimola la produzione del RANKL, che, a sua volta, interagendo con RANK, porta alla stimolazione degli osteoclasti. In questo modo si inizia il riassorbimento della matrice ossea con una successiva mobilizzazione del calcio. Il rachitismo nei bambini e l'osteomalacia negli adulti rappresentano le conseguenze cliniche del deficit della vitamina D (48). L'insufficienza/deficit di vitamina D è un riscontro assai comune nei pazienti con DM2 (49). L'ipovitaminosi D, da una parte, può essere attribuita all'obesità, cioè una maggiore deposizione della vitamina D (liposolubile) nel tessuto adiposo. Dall'altra parte, i modelli

animali hanno dimostrato che un' aumentata perdita urinaria della proteina-legante la vitamina D potrebbe contribuire alla riduzione dei livelli di vitamina D nel DM2 (49).

Il PTH legandosi al suo recettore sugli osteoblasti stimola direttamente la formazione ossea, e indirettamente, attraverso un aumento della sintesi di RANKL, il riassorbimento osseo (10). Quindi, sia bassi che alti livelli di PTH possono condurre ad alterazioni del tessuto scheletrico. I pazienti con DM2 presentano normali o bassi livelli di PTH per una possibile disfunzione delle paratiroidi che sembrano meno sensibili alle variazioni dei livelli di calcemia (10). Così, Yamamoto e collaboratori (50) hanno dimostrato come i pazienti con DM2, soprattutto quelli a basso turnover osseo, presentano ridotti livelli di PTH e allo stesso tempo un' aumentata prevalenza di fratture vertebrali.

In conclusione, quindi, la presenza di ipovitaminosi D associata a ridotti livelli di PTH potrebbe contribuire alle alterazioni scheletriche nel DM2.

### **3.6. Fattori clinici associati al rischio di frattura nel DM2**

Poichè i pazienti con DM2 presentano una BMD normale o aumentata, la predizione del rischio fratturativo diventa difficoltosa. Infatti, come è stato dimostrato dalla maggioranza dei studi, la BMD appare avere una scarsa sensibilità nel predire le fratture nei pazienti diabetici (32,33). Tuttavia, alcuni studi (30,34) hanno riportato che valori ridotti di BMD a livello sia della colonna vertebrale che al femore sono associati al rischio di frattura vertebrale e non vertebrale.

E' noto come l' iperglicemia cronica determini le complicanze diabetiche come retinopatia, nefropatia, e neuropatia (2) e come la stessa possa essere stimata mediante la determinazione della emoglobina glicosilata (HbA1c). Analogamente, alcuni autori hanno suggerito come la comparsa di frattura nel paziente diabetico possa essere associata allo scarso controllo glicemico ed alla presenza delle complicanze. Uno studio osservazionale (44)

ha evidenziato un'associazione tra fratture vertebrali e HbA1c  $\geq 9.0\%$  nei pazienti diabetici con obesità. Un altro studio longitudinale (11) ha dimostrato che i pazienti diabetici con scarso controllo glicemico (HbA1c  $\geq 7.5\%$ ) avevano un rischio fratturativo maggiore rispetto ai diabetici in buon controllo glicemico (HbA1c  $< 7.5\%$ ). Tuttavia, altri studi non hanno mostrato tale associazione (51-54). Inoltre, il miglioramento del controllo glicemico non sembra ridurre il rischio di frattura, come è stato recentemente suggerito in uno dei bracci dello studio ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) BONE (55). I pazienti diabetici randomizzati per terapia ipoglicemica intensiva con raggiungimento dei valori di HbA1c uguali a 6.4% in 4 anni, non hanno presentato una riduzione del rischio fratturativo, suggerendo che il miglioramento del controllo glicemico solo per pochi anni non appare sufficiente per poter ridurre il rischio di frattura.

Nel complesso, le complicanze croniche del diabete sembrano solo parzialmente responsabili dell'aumento del rischio di frattura nel DM2 (28,33). Tuttavia, Viegas e collaboratori (34) hanno suggerito un'associazione tra la retinopatia e le fratture vertebrali. Questa associazione potrebbe essere legata all'aumento del rischio di caduta nei pazienti con retinopatia diabetica, oppure essere espressione dell'associazione tra compenso glicemico ridotto (più frequente nei pazienti retinopatici) e rischio di frattura, come discusso precedentemente.

Per riassumere, tra i possibili fattori clinici associati all'aumentato rischio di frattura nel DM2 sono stati proposti gli aumentati livelli di pentosidina (41,42), i bassi livelli di IGF-1 (45) e i bassi livelli di PTH (50).



## 4. Glucocorticosteroidi ed il loro ruolo nel diabete mellito tipo 2

### 4.1. Asse ipotalamo-ipofisi-surrene

Il cortisolo è un ormone che viene sintetizzato nella corteccia surrenalica sotto il controllo ipofisario ed ipotalamico (asse ipotalamo-ipofisi-surrene, hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPA). In risposta a stimoli diversi, viene rilasciato CRH (corticotropin-releasing hormone) a livello ipotalamico, che stimola la secrezione di ACTH da parte dell'ipofisi anteriore, che, a sua volta, stimola la secrezione di cortisolo dal surrene. I livelli di cortisolo, attraverso un meccanismo di feedback negativo inibisce il rilascio di CRH e ACTH. Approssimativamente il 90% del cortisolo circolante nel sangue è legato alle proteine (corticosteroid-binding globulin, CBG), e solo il 4% del cortisolo rimane libero rappresentando la forma attiva dell'ormone. L'inattivazione del cortisolo avviene nei vari tessuti attraverso la conversione nella sua forma meno attiva, il cortisone, da parte dell'enzima 11 $\beta$ -idrossisteroiddeidrogenasi (11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 $\beta$ -HSD). Il cortisone rappresenta il reservoir del cortisolo nella forma inattiva che può essere attivato nelle certe condizioni (56).

L'enzima 11 $\beta$ -HSD nelle sue forme di tipo 1 e 2 regola la disponibilità del cortisolo a livello tissutale e possiede due attività, quella di reduttasi (principalmente nel fegato), convertendo il cortisone (inattivo) a cortisolo (attivo), e quella di deidrogenasi (nel rene, nella placenta e nel colon), inattivando il cortisolo a cortisone. L'enzima 11 $\beta$ -HSD2 funziona principalmente come deidrogenasi nel rene inattivando il cortisolo a cortisone e proteggendo in questo modo il recettore dei mineralocorticoidi del rene da una inappropriata attivazione da parte del cortisolo. Invece, l'enzima 11 $\beta$ -HSD1 svolge la sua attività principalmente come reduttasi attivando il cortisolo ed è maggiormente espresso a livello del fegato, tessuto adiposo, gonadi, cervello. Inoltre, la sua espressione è stata documentata anche nel tessuto

osseo, cuore e vasi sanguigni, occhio, tratto gastro-intestinale, rene, pelle, pancreas e placenta (56).

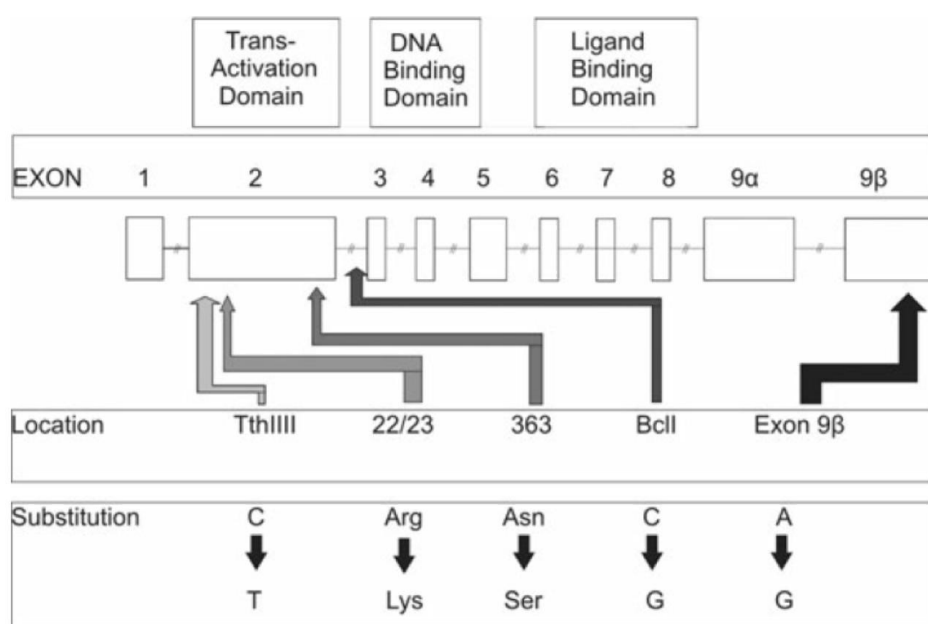
L'effetto biologico del cortisolo avviene mediante il legame con il suo recettore (glucocorticoid receptor, GR) il gene di cui si trova nel cromosoma 5. Il GR appartiene alla famiglia dei recettori nucleari. Il legame cortisolo-GR e la successiva traslocazione del complesso cortisolo-GR nel nucleo può avvenire con o senza dimerizzazione. Il complesso cortisolo-GR può determinare inattivazione o attivazione di diversi geni con inibizione o aumento della sintesi di proteine che hanno influenza sul metabolismo glucidico, lipidico, proteico, osseo, ed idroelettrolitico, sul sistema immunitario, sull'apparato cardio-vascolare, visivo, gastro-enterico e sul sistema neuro-psichico (57).

#### **4.2. Polimorfismi del recettore dei glucocorticosteroidi**

Recentemente sono stati descritti dei diversi polimorfismi del GR, i più importanti dei quali sono TthIII I, ER22/23EK, N363S, BclI e GR-9 $\beta$  (Figura 5). Essi possono sia aumentare che ridurre la sensibilità ai GC. L'aumentata sensibilità ai GC sembra aumentare il rischio di obesità, alterazioni del metabolismo lipidico, glucidico, osseo, del sistema immunitario e di disturbi neuro-psichici (57).

Si è visto che il polimorfismo BclI è associato ad aumento del rischio di obesità centrale, riduzione della BMD e massa muscolare di ipertensione arteriosa. Tuttavia, non è stata trovata alcuna associazione tra tale polimorfismo e diversi fattori cardio-vascolari (colesterolo LDL, trigliceridi, HbA1c) (57,58). Anche il polimorfismo N363S è stato descritto essere associato ad un aumentato BMI, colesterolo LDL ed ipertensione. Inoltre, in uno studio in soggetti con lieve eccesso di cortisolo endogeno, questo polimorfismo è risultato associato alla presenza di fratture vertebrali (57,59).

Figura 5 – Gene del GR e i suoi polimorfismi (57)



#### 4.3. Alterazioni dell'asse HPA e 11β-idrossisteroidodeidrogenasi

Fisiologicamente, il cortisolo aumenta la glicemia (attraverso l'attivazione della gluconeogenesi, l'inibizione dell'utilizzo del glucosio ed aumento dell'insulinoresistenza) e gli acidi grassi (attraverso l'attivazione della lipolisi). Nella sindrome di Cushing, caratterizzata da ipercortisolismo clinicamente evidente, ad esempio si può verificare obesità con accumulo di grasso viscerale, dislipidemia, aterosclerosi precoce, ipertensione arteriosa, insulinoresistenza ed iperinsulinemia e steatosi epatica (56). Queste condizioni patologiche sono tuttavia riscontrabili nella popolazione generale, e tipicamente nella sindrome metabolica. Recentemente, è stato ipotizzato da diversi ricercatori che un relativo aumento del cortisolo potrebbe contribuire allo sviluppo della sindrome metabolica con tutte le sue conseguenze, incluso il DM2 (56).

Nei pazienti affetti da sindrome metabolica è stata descritta un'attivazione dell'asse HPA ed in particolare: 1) una maggiore escrezione di cortisolo libero con le urine (CLU); 2)

un'aumentata risposta del cortisolo dopo somministrazione di ACTH; 3) una riduzione della sensibilità al feedback negativo, valutabile come minore risposta al test di soppressione con 1 mg di desametasone (1mgDST); 4) un'aumentata frequenza della secrezione di ACTH (56). I modelli animali in cui è stato iperespresso l'enzima 11 $\beta$ -HSD1 sia a livello epatico sia nel tessuto adiposo/muscolare hanno documentato un fenotipo metabolico caratterizzato da obesità viscerale, ipertensione arteriosa, dislipidemia, insulinoresistenza, ed iperinsulinemia. L'iperespressione del 11 $\beta$ -HSD1 nel pancreas sembra portare a disfunzione  $\beta$ -cellulare (56).

Una maggiore biodisponibilità del cortisolo tramite un'attivazione sia dell'asse HPA sia del 11 $\beta$ -HSD1 (uno stato di "Cushing intracellulare") potrebbero portare alla comparsa della sindrome metabolica ed eventualmente al DM2. In effetti, alcuni dati suggeriscono la presenza di un'attivazione dell'asse HPA nel DM2. Chiodini e collaboratori (60) hanno dimostrato i pazienti diabetici scompensati hanno livelli di CLU , cortisolo sierico ore 24 e cortisolo dopo 1mgDST aumentati, rispetto ai controlli ed ai pazienti diabetici compensati. Inoltre, l'attività dell'asse HPA era direttamente associata ad un maggior numero di complicanze croniche nel DM2. In accordo con questa ipotesi di un relativo ipercortisolismo nel DM2, alcuni dati suggeriscono come l'inibizione dell'attività del 11 $\beta$ -HSD1 porti ad un notevole miglioramento del controllo glicemico nei pazienti diabetici scompensati (61).

## 5. Descrizione dell'ipotesi

E' noto che l'eccesso di cortisolo determina inibizione dell'osteoblastogenesi e dell'attività degli osteoblasti attraverso l'inibizione di RunX2 e della via Wnt/ $\beta$ -catenina. Inoltre, l'eccesso di cortisolo, almeno inizialmente, determina aumento dell'espressione di RANKL e riduzione della sintesi di OPG portando in tal modo all'attivazione degli osteoclasti ed an aumento del riassorbimento osseo (62). Nell'osteoporosi da eccesso di glucocorticoidi, tuttavia, il quadro è di un turnover scheletrico ridotto con particolare inibizione dell'apposizione. L'esposizione al cortisolo è regolata anche a livello osteoblastico dall'attività dell'enzima 11 $\beta$ -HSD1 (56). Inoltre, l'eccesso anche lieve di cortisolo, che non determina sintomi clinici tipici dell'ipercortisolismo (cosidetto ipercortisolismo subclinico), sembra essere associato ad un aumento del rischio fratturativo, indipendente dal BMD che può essere normale o lievemente ridotto (63,64). Peraltro, è stato recentemente dimostrato come nei pazienti con osteoporosi primitiva il BMD si associ negativamente ad un maggiore biodisponibilità del cortisolo (65) e che in modelli animali un'inibizione dell'attività del 11 $\beta$ -HSD1 porti ad un miglioramento della funzione osteoblastica ed osteoclastica (66).

Poiché, da quanto detto, le alterazioni scheletriche nel DM2 appaiono analoghe a quelle dei pazienti con ipercortisolismo subclinico (basso turnover, bassa apposizione ossea ed aumentato rischio di frattura in presenza di un BMD normale o lievemente ridotto) e vi sono evidenze di una maggiore disponibilità di cortisolo nel DM2, è stato ipotizzato che nei pazienti con DM2 una maggiore disponibilità del cortisolo dovuta ad un'attivazione dell'asse HPA e/o ad un'aumentata sensibilità del cortisolo al GR e/o all'attivazione dell'enzima 11 $\beta$ -HSD1, potrebbe costituire un meccanismo patogenetico ulteriore del danno osseo nel DM2.

## **II. STUDIO**

### **1. Obiettivi**

Sulla base delle premesse riassunte precedentemente, il presente studio è stato disegnato con i seguenti scopi:

1) Valutare la BMD, la prevalenza e l'incidenza di fratture vertebrali morfometriche (VFX), la qualità dell'osso, valutata mediante TBS, in un gruppo omogeneo di donne in post-menopausa affette da DM2 non complicato ed in un gruppo di soggetti di controllo paragonabili per età e BMI;

2) Valutare l'associazione tra attività dell'asse HPA e/o dei polimorfismi dei geni GR N363S, BclI con la BMD, la prevalenza di VFX e la qualità dell'osso in un gruppo di donne in post-menopausa affette da DM2 non complicato ed in un gruppo di soggetti di controllo paragonabili per età e BMI.

### **2. Pazienti**

Sono state reclutate 100 donne affette da DM2 afferenti agli ambulatori della UO Endocrinologia e Malattie Metaboliche della Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Policlinico Maggiore, in base ai seguenti criteri d'inclusione: età  $\geq 50$  anni  $\leq 85$  anni; stato post-menopausale; diagnosi di DM2 dopo i 30 anni; BMI  $\geq 19$  kg/m<sup>2</sup>  $\leq 40$  kg/m<sup>2</sup>; assenza di insulino terapia nei primi 2 anni dalla diagnosi; HbA1c  $\leq 8.0\%$ . I criteri di esclusione sono stati seguenti: segni e sintomi di ipercortisolismo (facies lunare, le strie, ipertricosi, atrofia cutanea, gobbo); storia di chetoacidosi; ipoglicemia negli ultimi 6 mesi prima di reclutamento; terapia in atto o nel passato con glitazonici, glucocorticoidi, antidepressivi, bisfosfonati, ranelato di stronzio, PTH (1-34 e 1-84), anticonvulsivanti; presenza di artrite reumatoide, sclerosi

multipla, malassorbimento, neoplasia, iperandrogenismo, alcolismo, depressione, insufficienza renale cronica, alterazione del ritmo sonno-veglia; presenza di retinopatia proliferativa o laser-trattata, nefropatia con macroalbuminuria >300 mg/24 ore e macroangiopatia diabetica grave. Cento donne senza DM2 paragonabili per età e BMI seguite nel nostro ambulatorio per altre malattie non influenzanti il metabolismo e la massa ossea (gozzo nodulare eutiroideo o tiroidite cronica linfocitica eutiroidea) sono state reclutate come gruppo di controllo, con i medesimi criteri d'inclusione e di esclusione utilizzati nelle pazienti diabetiche. Dopo il reclutamento, 8 pazienti con DM2 e 8 pazienti senza DM2 sono state escluse per non aver completato lo studio. Lo studio è stato quindi effettuato su 92 pazienti diabetiche e 92 controlli.

Tutti i soggetti sono stati informati delle modalità e delle finalità dello studio e hanno firmato un modulo di consenso informato. Lo studio ha ottenuto l'approvazione del Comitato Etico-Scientifico del nostro Ospedale.

### **3. Metodi**

In tutti i soggetti all'arruolamento è stata raccolta l'anamnesi personale e familiare e ottenute informazioni sulla propensione alle cadute e consumo di calcio mediante questionari dedicati.

In tutti i soggetti, sono stati misurati i seguenti parametri: emocromo, creatinina sierica, proteine totali, elettroforesi siero-proteica, transaminasi, glicemia a digiuno, HbA1c, calcio corretto per albumina (calcio totale + (4.0 - albumina mg/dl) x 0.8), 25OHvitaminaD, ACTH. Sulle urine delle 24 ore sono stati misurati: calciuria, clearance creatinina, cortisolo libero urinario (CLU), cortisone libero urinario (CoLU), rapporto CLU/CoLU (indice indiretto dell'attività del 11 $\beta$ HSD2). Nel giorno successivo in tutte le pazienti sono stati misurati i livelli di cortisolo alle ore 9.00 dopo aver assunto alla sera precedente alle ore

23.00 1 mg di desametasone (1mgDST). Il protocollo prevedeva che le pazienti con anche un solo parametro alterato di attività dell'asse HPA venissero escluse dallo studio. I campioni di sangue e di urine sono stati tenuti a  $-20^{\circ}\text{C}$  di temperatura fino all'analisi.

I livelli di ACTH (3 misurazioni ad intervallo di 20 minuti) sono stati misurati mediante IRMA (BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin, Germany). Il cortisolo sierico è stato misurato con immunofluorometria (TDX-FLX Abbott, GmbH, Diagnostika kits). La determinazione di cortisolo e cortisone via cromatografia liquida con uno spettrometro di massa (LC-MS/MS) è stata effettuata, in presenza di cortisolo-d4 e cortisone-d7 come standard interno deuterato, dopo una purificazione on-line con un sistema TurboFlow (Thermo Scientific, Rodano, Italia), utilizzando una colonna Cyclone (50 mm di lunghezza, 0.5 mm di diametro interno, Thermo Scientific, Rodano, Italia). Cortisolo e cortisone sono stati separati in cromatografia liquida con una colonna in fase inversa C18 (Hypersil Gold, 50 mm di lunghezza, 3 mm di diametro interno, 3  $\mu$  diametro interno delle particelle, Thermo Scientific, Rodano, Italia), a temperatura ambiente, utilizzando un gradiente di ammonio formiato (5 mM) in acqua con lo 0,1% di acido formico e metanolo come eluente, con un flusso a 0,7 ml/min. L'identificazione e la quantificazione sono state eseguite con uno spettrometro di massa triplo quadrupolo (TSQ Quantum Access, Thermo Scientific, Rodano, Italia) equipaggiato con una heated-electro spray ionization source (H-ESI), che opera in modalità a ioni positivi. I parametri della sorgente di ionizzazione sono: spray voltage 4500 V, temperatura ion transfer tube  $220^{\circ}\text{C}$ , temperatura di vaporizzazione  $202^{\circ}\text{C}$ , azoto come sheath gas e auxiliary gas alla pressione di 40 e 20 unità (scala arbitraria), tube lens offset 94 V. È stato utilizzato Argon come gas di collisione ad una pressione di 1,5 mTorr. La quantificazione è basata sul selective reaction monitoring (SRM) seguendo le transizioni  $m/z$  363  $\rightarrow$  121 (CE 24 eV) e  $m/z$  367  $\rightarrow$  121 (CE 25 eV) per il cortisolo e cortisolo-d4, rispettivamente, e  $m/z$  361  $\rightarrow$  163 (CE 21 eV) e  $m/z$  368  $\rightarrow$  168 (CE 20 eV) per cortisone e cortisone-d7, rispettivamente. Il metodo ha una precisione, valutata come coefficiente di



variazione percentuale, inferiore al 10%, una accuratezza tra 98 e 107% ed un limite di quantificazione (LOQ) di 1 mg/L sia per il cortisolo che per il cortisone. Il throughput è di circa 100 campioni al giorno.

Il DNA genomico dei soggetti è stato estratto da campioni di sangue periferico utilizzando il kit illustra DNA Extraction BACC2 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). La genotipizzazione dei polimorfismi BclI, N363S e ER22/23EK è stata eseguita mediante polymerase chain reaction (PCR), utilizzando Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in un volume finale di 25  $\mu$ L. Per le reazioni di PCR è stato usato un 2720 Thermal Cycler (Life Technologies). Dopo un ciclo iniziale di denaturazione di 2 min a 94°, sono stati eseguiti 35 cicli a 94° per 30 sec, 55° per 30 sec e 72° per 35 sec, seguiti da un ciclo finale di estensione di 72° per 5 min. Per il polimorfismo intronico BclI, sono stati utilizzati un primer reverse interno specifico per l'allele wild-type (WR;5'-CAATCCTCTCTTAAAGAGATTG-3') e un primer forward interno specifico per l'allele mutato (MF; 5'-GACAAGTTATGTCTGCTGATG-3'), insieme a un primer esterno forward (F; 5'-AGAGCCCTATTCTTCAAAC-3') e a un primer esterno reverse (R;5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC-3'). I prodotti di amplificazione sono stati separati su un gel di agarosio al 2% e visualizzati con etidio bromuro su un UV Transilluminator 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). I primer esterni F e R danno origine a una banda di 418 bp; i primer F e WR generano una banda di 177 bp, che indica la presenza dell'allele wild-type C; i primer MF e R originano una banda di 284 bp, che indica la presenza dell'allele mutato G. Per il polimorfismo N363S sono stati utilizzati i primer GR 2/4F (5'-CCAGTAATGTAACTGCCCC-3') e GR 2/4R (5'-TTCGACCAGGGAAGTTCAGA-3'), che danno origine a una banda di 355 bp. Il prodotto di PCR è stato successivamente sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *Mlu*CI (New England Biolabs, Beverly, USA) a 37° per 2 ore e i prodotti della digestione separati su gel d'agarosio al 3.5%. L'allele wild-type (N363) produce frammenti di 135, 73,70, 60 e 19 bp, l'allele mutato (S363)

genera frammenti di 135, 92, 70 e 60 bp; a causa della piccola differenza di taglia dei frammenti di 73, 70 e 60 bp, questi vengono visualizzati come un'unica banda.

Il BMD è stato misurato all'arruolamento con metodica di DXA (Hologic Discovery, Software version 13.3:3, Bedford MA, USA) alla colonna lombare (LS, precisione 1.0%), al femore totale (FT, precisione 1.7%) e al collo femorale (FN, precisione 1.8%). Le vertebre fratturate sono state escluse dalla misurazione. Il BMD è stato espresso come Z-score. Inoltre, la metodica DXA è stata utilizzata per ottenere il valore di TBS (espresso come Z-score). All'arruolamento in tutti i soggetti è stata eseguita una radiografia laterale dorso-lombare (T4-L4) per la morfometria vertebrale. I radiogrammi sono stati analizzati da due esperti radiologi, in cieco rispetto alla BMD ed ai parametri ormonali. Le fratture vertebrali sono state diagnosticate usando la metodica semiquantitativa (SQ) descritta da Genant e collaboratori (67). Secondo questa metodica, una VFx è definita come una riduzione dell'altezza vertebrale anteriore, centrale o posteriore  $\geq 20\%$ . Quindi, la vertebra può essere considerata intatta, in assenza di VFx (SQ grado 0) o con frattura di grado lieve (riduzione dell'altezza  $\geq 20$  e  $< 25\%$ ), grado moderato (riduzione dell'altezza  $\geq 25$  e  $< 40\%$ ), grado severo (riduzione dell'altezza  $\geq 40\%$ ) (SQ I, II, III grado, rispettivamente). Per ogni paziente è stato calcolato lo Spinal deformity Index (SDI) sommando tutti i gradi SQ delle 13 vertebre da T4 a L4 ( $SDI = SQ_{T4} + \dots + SQ_{T12} + \dots + SQ_{L1} + \dots + SQ_{L4}$ ) (68,69).

L'analisi statistica è stata effettuata con il programma SPSS, versione 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). I risultati sono stati espressi come  $media \pm SD$  (range). È stata usata l'analisi della varianza ad una via (one way ANOVA) per paragonare le variabili continue tra i diversi gruppi; le analisi post-hoc sono state effettuate mediante il test di Bonferroni. Il test  $\chi^2$  è stato utilizzato per confrontare le variabili categoriche. Per valutare le associazioni tra due variabili sono state usate le correlazioni di Pearson o Spearman a seconda della normalità di distribuzione del campione. L'analisi di regressione logistica è stata utilizzata per valutare l'associazione tra la presenza di frattura vertebrale morfometrica (variabile dipendente,

espressa come variabile categorica) e i diversi possibili fattori di rischio (variabili indipendenti). Il valore P è stato considerato significativo se inferiore a 0.05.

#### **4. Risultati**

La caratteristica generale delle pazienti con DM2 e dei controlli è riportata nella tabella 2. Le pazienti diabetiche ed controlli sono risultate paragonabili per età, BMI e anni dalla menopausa. Rispetto ai controlli, le pazienti affette da DM2 presentavano una maggiore prevalenza di ipertensione arteriosa e dislipidemia. I soggetti diabetici hanno mostrato una maggiore BMD a livello di tutti siti scheletrici studiati ma una maggiore prevalenza di VFx sia di storia di frattura, rispetto ai soggetti senza DM. Non sono state riscontrate differenze tra i soggetti con e senza DM2 per ciò che concerne la storia di cadute, l'intake di calcio con la dieta, TBS, SDI, parametri di secrezione di cortisolo, attività dell'enzima  $11\beta$ HSD2 e prevalenza dei polimorfismi del GR.

La caratteristiche generali dei soggetti diabetici e dei controlli con e senza VFx è riportata nella tabella 3. I soggetti diabetici con VFx, rispetto ai quelli senza VFx, avevano più bassi livelli di BMD al FN e FT e di TBS, ed una maggiore prevalenza di retinopatia e del polimorfismo N363S in eterozigosi. Non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda la durata del diabete, il compenso glico-metabolico (HbA1c), la secrezione di cortisolo, l'attività del  $11\beta$ HSD2, la prevalenza del polimorfismo del BclI, tra i soggetti diabetici con e senza VFx e tra i soggetti di controllo con VFx e senza VFx. A differenza dai soggetti diabetici, nel gruppo dei controlli, tra i soggetti con VFx è risultata una maggiore prevalenza di fumatori, rispetto ai controlli senza VFx. È interessante notare, che non sono state riscontrate differenze nei parametri di BMD a livello della colonna e del femore tra i controlli con e senza VFx e tra i controlli fratturati e soggetti diabetici fratturati.

L'analisi di regressione logistica (tabella 4) eseguita su tutti i soggetti, ha mostrato come la presenza di Vfx sia associata significativamente alla presenza di DM2 ed al polimorfismo del N363S in eterozigosi, indipendentemente dalla presenza di variabili potenzialmente influenzanti come età, BMI, BMD alla colonna, fumo e storia anamnestica di fratture da fragilità. Analizzando i soggetti diabetici e controlli separatamente, in entrambi i gruppi la presenza di Vfx è risultata associata al polimorfismo N363S in eterozigosi indipendentemente dalla presenza di variabili potenzialmente influenzanti come età, BMI, BMD lombare, presenza di fratture da fragilità, fumo (nel gruppo di controllo) e presenza di retinopatia (nel gruppo del DM2).

Tabella 2 – Caratteristica generale dei soggetti con DM2 e controlli.

<b>Parametri</b>	<b>Soggetti con DM2 Media±SD (Min – Max) (n=92)</b>	<b>Controlli Media±SD (Min –Max) (n=92)</b>	<b>p</b>
Età, anni	65.5±7.5 (52-80)	64.8±8.9 (50-80)	0.52
BMI, kg/m <sup>2</sup>	29.5±4.9 (21-40)	28.9±4.9 (19.9-39.8)	0.37
Anni dalla menopausa, anni	13.9±8.3 (1-33)	11.6±7.3 (1-29)	0.05
Fumo, % (n)	14.1 (13)	26.1 (24)	0.065
Ipertensione arteriosa, % (n)	64.1 (59)	42.9 (39)	0.005
Dislipidemia, % (n)	45.7 (42)	26.1 (24)	0.009
Durata del DM2, anni	9.5±5.7 (1-25)	-	-
HbA1c, %	6.8±0.8 (5.3-8.0)	5.4±0.5 (4-6)	0.000
Ca, mg/dl	9.3±0.4 (8.5-10)	9.2±0.3 (8.6-10)	0.059
25OHD, ng/ml	18.1±11.7 (4.7-61.4)	17.9±9.1 (4-35)	0.93
ALP, U/l	71.3±16.9 (37-105)	70.8±15.9 (45-105)	0.85
ACTH, pg/ml	16.3±10.7 (3.3-54.2)	16.1±8.7 (5-51.4)	0.91
1mgDST, mg/dl	1.22±0.45 (0.4-1.8)	1.10±0.43 (0.1-1.8)	0.072
CLU, mcg/24h	19.9±17.3 (4.7-154.7)	20.4±9.9 (4.2-46.3)	0.81

CoLU, mcg/24h	88.2±31.1 (33.7-262.1)	95.7±18.5 (35-121)	0.12
CLU/CoLU	0.22±0.11 (0.059-0.59)	0.20±0.10 (0.08-0.49)	0.22
BMD LS, Z-score	0.81±1.45 (-3.6-4.0)	0.17±1.32 (-2.2-4.3)	0.002
BMD FT, Z-score	0.62±0.99 (-1.6-3.1)	0.04±0.94 (-2.0-2.1)	0.000
BMD FN, Z-score	0.35±0.95 (-1.8-2.6)	-0.04±0.89 (-1.8-2.7)	0.004
TBS, Z-score	-2.39±2.23 (-7.2-2.2)	-2.15±2.39 (-8.0-1.57)	0.49
Fx, % (n)	15.2 (14)	4.3 (4)	0.023
VFx, % (n)	34.8 (32)	19.6 (18)	0.031
SDI	0.65±1.2 (0-6)	0.41±1.1 (0-6)	0.16
BclI, % (n)			
WT	58.7 (54)	52.2 (48)	
Eterozigosi	35.9 (33)	44.6 (41)	0.42
Omozigosi	5.4 (5)	3.3 (3)	
N363S, % (n)			
WT	92.4 (85)	93.5 (86)	
Eterozigosi	7.6 (7)	6.5 (6)	1.0
Omozigosi	0	0	
Retinopatia, % (n)	5.4 (5)	-	-
Nefropatia, % (n)	4.5 (4)	-	-
Neuropatia, % (n)	3.3 (3)	-	-

Tabella 3 – Caratteristica dei soggetti affetti da DM2 con VFx e senza VFx e dei controlli con VFx e senza VFx.

<b>Parametri</b>	<b>DM2 con VFx Media±SD (Min – Max) (n=32)</b>	<b>DM2 senza VFx Media±SD (Min – Max) (n=60)</b>	<b>p</b>	<b>Controlli con VFx Media±SD (Min – Max) (n=18)</b>	<b>Controlli senza VFx Media±SD (Min – Max) (n=74)</b>	<b>p</b>
Età, anni	66.3±7.9 (52-78)	65.1±7.2 (52-80)	0.47	65.4±9.7 (50-80)	64.6±8.9 (50-78)	0.74
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28.9±4.1 (21-35.3)	29.9±5.2 (21.8-40)	0.32	28.5±5.7 (21.6-37.6)	28.9±4.7 (19.9-39.8)	0.74
Anni dalla menopausa, anni	15.3±7.8 (1-29)	13.3±8.6 (1-33)	0.31	13.7±7.7 (1-23)	11.1±7.1 (1-29)	0.19
Fumo, % (n)	9.4 (3)	16.7 (10)	0.53	44.4 (8)	21.6 (16)	0.07
Ipertensione arteriosa, % (n)	68.8 (22)	61.7 (37)	0.65	38.9 (7)	43.8 (32)	0.79
Dislipidemia, % (n)	37.5 (12)	50 (30)	0.28	33.3 (6)	24.3 (18)	0.55
Durata del DM2, anni	11.3±6.7 (1-25)	8.7±5.0 (1-25)	0.10	-	-	-
HbA1c, %	6.7±0.7 (5.3-8.0)	6.8±0.7 (5.3-8.0)	0.16	-	-	-
Ca, mg/dl	9.3±0.4 (8.5-10.0)	9.3±0.4 (8.5-10.0)	0.75	9.3±0.4 (8.6-9.7)	9.2±0.3 (8.6-10.0)	0.50
25OHD, ng/ml	19.8±13.5 (4.7-55.5)	17.3±10.8 (2.7-61.4)	0.42	18.2±7.9 (4.2-29.9)	17.8±9.5 (4-35)	0.89
ALP, U/l	72.3±18.6 (46-105)	70.8±16.2 (37-105)	0.72	70.3±19.1 (47-105)	70.9±15.2 (45-105)	0.89
ACTH, pg/ml	18.0±12.6 (5-54.2)	15.3±9.5 (3.3-53.9)	0.26	13.1±7.1 (5-32)	16.8±8.9 (5-51.4)	0.09
1mgDST, mg/dl	1.29±0.46 (0.4-1.8)	1.18±0.44 (0.4-1.8)	0.30	1.13±0.41 (0.6-1.8)	1.09±0.44 (0.1-1.8)	0.78
CLU, mcg/24h	19.6±7.8 (10.1-43)	20.9±9.0 (10-43)	0.49	21.2±9.8 (7-43)	19.4±8.6 (9-43)	0.44
CoLU, mcg/24h	85.3±18.9 (42.2-111.1)	89.7±35.9 (33.7-262.1)	0.58	97.4±18.6 (53.5-120.4)	95.1±18.7 (35-121)	0.69

CLU/CoLU	0.22±0.11 (0.11-0.49)	0.22±0.11 (0.06-0.59)	0.78	0.23±0.11 (0.09-0.49)	0.19±0.09 (0.08-0.40)	0.14
BMD LS, Z-score	0.47±1.62 (-3.6-4.0)	0.99±1.35 (-1.4-3.9)	0.10	0.17±1.25 (-2.2-2.7)	0.17±1.34 (-2.1-4.3)	0.99
BMD FT, Z-score	0.26±1.07 (-1.6-3.1)	0.82±0.89 (-0.6-3.0)	0.008	0.07±1.00 (-2.2-2.7)	0.03±0.92 (-2.0-2.1)	0.86
BMD FN, Z-score	0.08±1.03 (-1.8-2.6)	0.91±0.12 (-0.9-2.1)	0.046	-0.31±0.88 (-1.8-1.9)	0.02±0.89 (-1.3-2.7)	0.16
TBS, Z-score	-3.1±2.5 (-6.9-2.2)	-2.0±2.0 (-7.3-2.0)	0.035	-3.9±2.8 (-8.0-1.6)	-1.7±2.1 (-7.9-1.1)	0.000
BcII, % (n)						
WT	59.4 (19)	58.3 (35)	0.95	38.9 (7)	55.4 (41)	0.42
Eterozigosi	34.4 (11)	36.7 (22)		55.6 (10)	41.9 (31)	
Omozigosi	6.3 (2)	5.0 (3)		5.6 (1)	2.7 (2)	
N363S, % (n)						
WT	84.4 (27)	96.7 (58)	0.047	77.8 (14)	97.3 (72)	0.013
Eterozigosi	15.6 (5)	3.3 (2)		22.2 (4)	2.7 (2)	
Omozigosi	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
Retinopatia, % (n)	12.5 (4)	1.7 (1)	0.048	-	-	-
Nefropatia, % (n)	9.4 (3)	1.7 (1)	0.12	-	-	-
Neuropatia, % (n)	3.1 (1)	3.3 (2)	1.0	-	-	-
Almeno 1 complicità, % (n)	12.5 (4)	6.7 (4)	0.44	-	-	-



Tabella 4 – Analisi della regressione logistica per l’associazione tra le VFx e gli altri fattori.

<b>Parametri</b>	<b>OR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>P</b>
<b>Tutti i soggetti (DM2 + controlli)</b>			
Età , (1 anno aumenta)	1.04	0.99 – 1.10	0.12
BMI, (1 kg/ m <sup>2</sup> diminuisce)	1.04	0.96 - 1.12	0.33
BMD LS, (1 SD Z-score diminuisce)	1.22	0.93 – 1.61	0.16
Presenza di fratture da fragilità	2.12	0.72 – 6.24	0.17
Presenza di fumo	1.58	0.67 – 3.76	0.30
Presenza del DM2	2.58	1.20 – 5.52	0.015
Presenza di N363S in eterozigosi	8.49	2.32 – 31.12	0.001
<b>Soggetti con DM2</b>			
Età, (1 anno aumenta)	1.05	0.98 – 1.14	0.19
BMI, (1 kg/ m <sup>2</sup> diminuisce)	1.04	0.93 – 1.16	0.50
BMD LS, (1 SD Z-score diminuisce)	1.30	0.85 – 2.0	0.22
Assenza di fratture da fragilità	2.0	0.42 – 10.0	0.38
Presenza di N363S in eterozigosi	9.34	1.28 – 68.21	0.028
Presenza di retinopatia	10.94	0.91 – 131.27	0.059
<b>Controlli</b>			

Età, (1 anno aumenta)	1.04	0.97 – 1.12	0.30
BMI, (1 kg/ m <sup>2</sup> diminuisce)	1.02	0.89 – 1.16	0.80
BMD LS, (1 SD Z-score aumenta)	1.14	0.69 – 1.89	0.61
Presenza di fratture da fragilità	17.45	1.58 – 192.85	0.02
Presenza di fumo	3.45	0.92 – 12.90	0.066
Presenza di N363S in eterozigosi	17.5	2.23 – 137.19	0.006

### III. DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo valutato parametri ossei come la BMD, la qualità dell'osso mediante TBS, la storia di Fx da fragilità in tutti i siti scheletrici, la presenza di deformazioni asintomatiche vertebrali, ed il ruolo dell'asse HPA e dei polimorfismi del GR nel determinare le alterazioni scheletriche in un gruppo omogeneo delle donne in post-menopausa affette da DM2. Abbiamo riscontrato che nonostante un'aumentata BMD al livello sia lombare sia femorale, i soggetti diabetici hanno una maggiore prevalenza di Fx da fragilità, ed in particolare di fratture vertebrali. Anche se i livelli di cortisolo dopo 1mgDST tendevano ad essere maggiori nei pazienti diabetici rispetto ai controlli, sfiorando la significatività statistica, dal presente studio non si è evidenziata una chiara aumentata attività dell'asse HPA nei pazienti con DM2. Questo è in apparente contrasto con un precedente studio che aveva suggerito la presenza di aumentati livelli di cortisolo e ACTH in pazienti diabetici ricoverati, in particolare in quelli affetti dalle complicanze croniche della malattia diabetica (60). Tuttavia, i pazienti coinvolti nel presente lavoro sono stati tutti reclutati in regime ambulatoriale e presentavano una bassa prevalenza di complicanze (retinopatia 5.4%, neuropatia 4.5% e nefropatia 3.3%) rispetto ai soggetti inclusi nello studio precedente (retinopatia 29.4%, neuropatia 40.6% e nefropatia 25.8%) (60). Inoltre, i pazienti inclusi nell'attuale studio presentavano un grado di compenso glicometabolico nettamente migliore rispetto ai quelli dello studio precedente (HbA1c rispettivamente 6.7% e 9.9%). Questa differenza nella selezione dei pazienti è probabilmente alla base della differenza di secrezione di cortisolo tra i pazienti inclusi nella precedente casistica. Anche se nel presente studio non vi sia evidenza di un'iperattivazione dell'asse HPA, i presenti risultati suggeriscono che, un'aumentata sensibilità ai GC dovuta alla presenza del polimorfismo sensibilizzante del GR N363S è associata alla presenza di VFx nel DM2. Il dato interessante, e mai descritto in precedenza, è anche che questo comportamento si rileva anche nella popolazione generale.

Il dato di un aumento del rischio fratturativo malgrado un'umentata BMD sia lombare che femorale nel DM2 coincide con i dati delle recenti metanalisi (3, 10-14) che dimostrano normali o aumentati livelli di massa ossea in tutti i siti scheletrici nei soggetti diabetici. Nonostante l'aumento della BMD, i soggetti diabetici possono avere un elevato tasso di perdita osseo nei siti scheletrici sottoposti a carico (piede, femore e colonna vertebrale), come è stato recentemente descritto da Schwartz e collaboratori (12). Questo ultimo dato potrebbe spiegare il fatto che nel presente studio i pazienti diabetici con VFx presentavano valori di BMD inferiori rispetto ai pazienti diabetici ma senza VFx (Tabella 3). Questo dato è comunque in linea con alcuni studi precedenti (30,34) che hanno mostrato come i soggetti diabetici con VFx presentino i valori di BMD femorale inferiori rispetto ai diabetici senza VFx (Tabella 3), ma comunque superiori rispetto ai controlli.

Malgrado un'umentata mineralizzazione ossea, i soggetti diabetici presentano un'elevata prevalenza di Fx da fragilità, ed in particolare di fratture vertebrali asintomatiche (Tabella 2), come già descritto da altri ricercatori (3, 10, 28, 29, 30, 32-34). I meccanismi fisiopatologici alla base dell'aumento del rischio fratturativo nel DM2 sembra legato non tanto al grado di mineralizzazione ossea, quanto alle alterazioni nei parametri geometrici prevalentemente a carico dell'osso corticale. Infatti, nel DM2 i pazienti mostrano una diminuzione dell'apposizione periostale ed un incremento della porosità corticale (11,15, 18,19) con conseguente peggioramento dei parametri biomeccanici cui consegue una ridotta resistenza (17-19). La qualità del tessuto scheletrico nel DM2 appare ridotta a causa del malfunzionamento degli osteoblasti. Questo difetto di azione osteoblastica è comune anche all'osteoporosi da glucocorticoidi (63,64). Il riscontro, nel presente studi, di un'umentata sensibilità ai GC nei pazienti diabetici e non diabetici fratturati suggerisce come una relativa ipersensibilità ai GC possa aver un ruolo nel ridurre l'attività osteoblastica e quindi la qualità dell'osso. In aggiunta rispetto al soggetto senza DM2, nel soggetto diabetico vi sono fenomeni come la glicazione del collagene, dovuta all'iperglicemia cronica con formazione di AGEs

(41,42), l'insulinoresistenza (10,43), l'infiammazione sistemica (10) e le alterazioni di varie adipochine (46) e di ormoni come IGF-1 (45), vitamina D (49) e PTH (50) che possono ulteriormente contribuire alla riduzione della qualità dell'osso.

Un problema clinico rilevante per i pazienti con DM2 è quello di trovare dei parametri che possano dare informazioni sul di rischio fratturativo, poiché la BMD è poco informativa. Anche nel presente lavoro, infatti, la BMD appare di avere uno scarso valore predittivo di frattura (Tabella 4), come è stato già riportato da altri ricercatori (28,32,33). A questo proposito, nel presente studio non sono state riscontrate differenze in termini di HbA1c e di durata della malattia tra i soggetti diabetici con e senza VFX (Tabella 3), in accordo con precedenti studi che hanno dimostrato come la presenza di fratture da fragilità, comprese le VFX, nel DM2 in alcuni studi non sembra di essere dipendente né dalla durata della malattia (28) né dal compenso glico-metabolico (51-54). Tuttavia, nello studio longitudinale di Oei e collaboratori (11) i pazienti diabetici con scarso controllo glicemico ( $HbA1c \geq 7.5\%$ ) avevano un rischio fratturativo maggiore rispetto ai diabetici in buon controllo glicemico ( $HbA1c < 7.5\%$ ).

Il mancato riscontro di associazione tra frattura e compenso glico-metabolico nel presente studio può dipendere da due fattori. Innanzitutto, i valori di HbA1c rispecchiano il compenso glico-metabolico solo degli ultimi 3 mesi che può non rappresentare la situazione dei mesi precedenti. Inoltre, come già evidenziato in precedenza, il disegno dello studio prevedeva che fossero inclusi solo i soggetti diabetici con valori  $HbA1c < 8.5\%$ , mentre i soggetti diabetici gravemente scompensati venissero esclusi.

La presenza delle complicanze croniche del diabete, pur essendo un'espressione clinica di uno scarso controllo glicemico di lunga durata, in alcuni studi non è risultata importante nel predire il rischio fratturativo nel DM2 (28,33). Tuttavia, Viegas e collaboratori (34) hanno trovato un'associazione tra retinopatia e frattura vertebrale. Nel presente studio, anche se i pazienti diabetici con VFX avevano una maggiore prevalenza di retinopatia (Tabella

3), le VFX non erano associate con la presenza di retinopatia nella regressione logistica eseguita nel gruppo dei soggetti con DM2 (Tabella 4). Probabilmente, il fatto che nello studio i pazienti con retinopatia proliferativa o laser-trattata, nefropatia con macroalbuminuria e macroangiopatia diabetica grave siano stati esclusi, potrebbe aver limitato il potere dello studio nel valutare la relazione tra retinopatia e rischio fratturativo.

Recentemente, alcuni studi hanno mostrato come il TBS, indice surrogato della qualità ossea (22,23), sia ridotto nei pazienti con DM2 rispetto ai quelli senza DM2 (26,27), e possa essere un predittore di rischio fratturativo nelle persone diabetiche migliore del BMD (26). Nel presente studio a differenza dalla ricerca svolta in questo campo non abbiamo riscontrato una riduzione del TBS nei soggetti diabetici rispetto ai controlli. Tuttavia, i pazienti con DM2 e VFX mostravano valori di TBS più bassi rispetto ai quelli senza VFX, analogamente a quanto emerso dal confronto tra soggetti di controllo con e senza VFX (Tabella 3). La mancanza di tale associazione può dipendere, da una parte, dal fatto che il TBS non misura direttamente la microstruttura ossea, e dall'altra parte, che in una popolazione dei soggetti diabetici in buon compenso glico-metabolico, quella inclusa nel presente studio, la qualità ossea potrebbe essere non gravemente compromessa rispetto ai soggetti diabetici scompensati. In effetti, Dhaliwal e collaboratori (27) hanno dimostrato come ridotti valori di TBS siano presenti in particolare nei pazienti diabetici con compenso glico-metabolico insoddisfacente.

Poiché le alterazioni scheletriche nel DM2 trovano qualche somiglianza con le alterazioni ossee nei pazienti con ipercortisolismo (un'aumentata fragilità ossea indipendente dalla densità minerale e un turnover scheletrico ridotto, in particolare per ciò che riguarda la fase di apposizione) (63,64), e alcuni hanno suggerito un'aumentata secrezione di cortisolo nel DM2 (60), nei pazienti con DM2 l'aumentata secrezione di cortisolo e/o l'aumentata sensibilità del cortisolo al GR (legata ai diversi polimorfismi del GR) e/o la maggiore disponibilità di cortisolo dovuta ad una minore attività dell'enzima 11 $\beta$ -HSD2 (valutata

mediante il rapporto CLU/CoLU) , potrebbero costituire dei meccanismi patogenetici ulteriori del danno osseo nel DM2.

Nel presente studio, tuttavia, a parte il possibile ruolo (già discusso in precedenza) dei polimorfismi del GR nel rischio fratturativo, non vi abbiamo riscontrato differenze nei parametri dell'asse HPA (valori di ACTH, del cortisolo dopo 1mgDST, del CLU, rapporto CLU/CoLU) sia tra i soggetti diabetici e controlli sia tra i soggetti diabetici con e senza VFX. Di conseguenza, almeno nei soggetti diabetici in buon compenso e scarsamente complicati, la secrezione di cortisolo e l'attività dell'enzima 11 $\beta$ -HSD2 non sembrano avere un ruolo nel rischio fratturativo connesso al DM2. Tuttavia, nonostante una normale funzione dell'asse HPA e buon compenso glico-metabolico, i pazienti diabetici presentano una maggiore prevalenza di fratture da fragilità dovuta verosimilmente ad altre cause, data l'origine multifattoriale delle alterazioni scheletriche nel DM2. D'altra parte, una normale funzione dell'asse HPA e dell'enzima 11 $\beta$ -HSD2 non esclude la presenza di un'attivazione enzimatica di 11 $\beta$ -HSD1 al livello cellulare (ipercortisolismo intracellulare) che potrebbe avere un'ulteriore influenza negativa sul metabolismo osseo, insieme agli altri fattori patogenetici nel DM2. Infatti, recentemente, inibitori dell'enzima 11 $\beta$ -HSD1 sono in fase di valutazione come possibili agenti ipoglicemizzanti nel diabete (61). Se si dovesse confermare in studi più ampi, il possibile ruolo di un'aumentata sensibilità ai GC, l'utilizzo di queste molecole nel paziente diabetico potrebbe consentire di ottenere, oltre a controllo glicometabolico, un miglioramento delle complicanze scheletriche. A questo proposito, l'associazione del polimorfismo sensibilizzante del GR N363S con le VFX (Tabella 4), indipendentemente dagli altri fattori confondenti, sottolinea l'importanza del segnale del cortisolo per il metabolismo osseo non solo nella popolazione affetta da DM2, ma anche nella popolazione generale. È la prima volta che questo dato viene descritto in letteratura in soggetti diabetici e non diabetici, ed è in accordo con un precedente studio di Morelli e collaboratori (63) che hanno dimostrato, in una popolazione di soggetti con incidentaloma surrenalico, un'associazione tra le VFX ed

un aplotipo sensibilizzante ai GC costituito dall'associazione dei polimorfismi del GR N363S in eterozigosi e di BclI in omozigosi, indipendentemente dalla presenza di ipercortisolismo subclinico. Quindi, anche in presenza di una normale funzione dell'asse HPA, la presenza di un polimorfismo sensibilizzante del GR N363S, potrebbe determinare una maggiore sensibilità al cortisolo, che a livello del tessuto osseo si potrebbe esprimere come un difetto dell'attività osteoblastica, una riduzione dell'apposizione ed un ridotto turnover scheletrico, che conducono, in ultima analisi all'aumentato rischio di frattura.

Il presente studio, tuttavia, ha alcune limitazioni. La prima di queste è il suo disegno trasversale che non permette di indagare il rapporto causa-effetto. Inoltre, non abbiamo analizzato il metabolismo osseo (la formazione ossea tramite i livelli di osteocalcina e il riassorbimento osseo tramite i livelli di CTX) nè nei soggetti diabetici nè nei controlli. Quindi, non è stato possibile dimostrare anche nei nostri pazienti la presenza di un basso turnover osseo nel DM2 e la sua possibile associazione con le Fx da fragilità. Infine, abbiamo valutato il compenso glico-metabolico (mediante HbA1c) solo al reclutamento, avendo così un'immagine del compenso glicemico relativa solo agli ultimi 3 mesi. Quindi, non si può escludere che lo stato glico-metabolico dei soggetti reclutati fosse diverso negli anni precedenti lo studio. D'altra parte, il fatto che siano stati reclutati pazienti diabetici con un basso tasso di complicanze croniche, ci permette di ipotizzare che il compenso glico-metabolico sia stato soddisfacente anche negli anni precedenti.

In conclusione, il presente studio ha confermato che vi è un aumentato rischio di frattura nei soggetti affetti da DM2. Il dato nuovo che emerge dallo studio è che la presenza delle VFx si è associata indipendentemente alla presenza di diabete e al polimorfismo N363S del GR .



#### IV. BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Position Statements. *Diabetes Care*. 2014;37(S1):S14-S80
2. Faglia G, Beck-Peccoz P, Spada A. *Malattie del sistema endocrino e del metabolismo*. 5<sup>a</sup> Edizione. The McGraw-Hill Companies, Srl Publishing Group Italia. Milano, 2013
3. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18:427–444
4. Albanese CV, Passariello R. *Osteoporosi e malattie metaboliche dell'osso*. UTET SpA Divisione Scienze Mediche. Milano, 2006
5. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>
6. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143:31–48
7. Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine action of osteocalcin. *Int J Endocrinol*. 2013, 2013:846480. doi: 10.1155/2013/846480. Epub 2013 Apr 30
8. Motyl KJ, McCabe LR, Schwartz AV. Bone and glucose metabolism: A two-way street. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010;503:2–10
9. Yu-Sik Kim, Il-Young Paik, Young-Jun Rhie, Sang-Hoon Suh. Integrative Physiology: Defined Novel Metabolic Roles of Osteocalcin. *J Korean Med Sci* 2010;25:985-991
10. McCabe LR, Zhang J, Raetz S. Understanding the skeletal pathology of type 1 and 2 diabetes mellitus. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2011;21(2):187-206

11. Oei L, Zillikens MC, Dehghan A, Buitendijk GHS, Castaño-Betancourt MC, Estrada K, Stolk L, Oei EHG, Van Meurs JBJ, Janssen JAMJL, Hofman A, van Leeuwen JPTM, Witteman JCM, Pols HAP, Uitterlinden AG, Klaver CCW, Franco OH, Rivadeneira F. High bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes as skeletal complications of inadequate glucose control. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1619-1628
12. Schwartz AV, Ewing SK, Porzig AM, McCulloch CE, Resnick HE, Hillier TA, Ensrud KE, Black DM, Nevitt MC, Cummings SR, Sellmeyer DE. Diabetes and change in bone mineral density at the hip, calcaneus, spine, and radius in older women. *Front Endocrinol*. 2013;4(62):1-9
13. Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, Yu Q, Zillikens MC, Gao X, Rivadeneira F. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Epidemiol*. 2012;27(5):319-32
14. Abdulameer SA, Sulaiman SAS, Hassali MAA, Subramaniam K, Sahib MN. Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? *Patient Preference and Adherence*. 2012;6:435–448
15. Petit MA, Paudel ML, Taylor BC, Hughes JM, Strotmeyer ES, Schwartz AV, Cauley JA, Zmuda JM, Hoffman AR, Ensrud KE. Bone mass and strength in older men with type 2 diabetes: the osteoporotic fractures in men study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(2):285–291
16. Shu A, Yin MT, Stein E, Cremers S, Dworakowski E, Ives R, Rubin MR. Bone structure and turnover in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2012;23:635–641
17. Farr JN, Drake MT, Amin S, Melton III LJ, McCready LK, Khosla S. In vivo assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res*. 2014;29(4):784–786.

18. Patsch JM, Burghardt AJ, Yap SP, Baum T, Schwartz AV, Joseph GB, Link TM. Increased cortical porosity in type 2 diabetic postmenopausal women with fragility fractures *journal of bone and mineral research*. 2013;28(2):313–324
19. Burghardt AJ, Issever AS, Schwartz AV, Davis KA, Masharani U, Majumdar S, Link TM. High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):5045–5055
20. Garg R, Chen Z, Beck T, Cauley JA, Wu G, Nelson D, Lewis B, LaCroix A, LeBoff MS Hip geometry in diabetic women: Implications for fracture risk. *Metabolism clinical and experimental*. 2012;6:1756-1762
21. Manavalan JS, Cremers S, Dempster DW, Zhou H, Dworakowski E, Kode A, Kousteni S, Rubin MR. Circulating osteogenic precursor cells in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:3240–3250.
22. Hans D, Barthe N, Boutroy S, Pothuaud L, Winzenrieth R, Krieg MA. Correlations between trabecular bone score, measured using anteroposterior dual X-ray absorptiometry acquisition, and 3-dimensional parameters of bone microarchitecture: an experimental study on human cadaver vertebrae. *J Clin Densitom*. 2011;14:302–12.
23. Bousson V, Bergot C, Sutter B, Levitz P, Cortet B, the Scientific Committee of the GRIO (Groupe de Recherche et d'Information sur les Ostéoporoses) Trabecular bone score (TBS): available knowledge, clinical relevance, and future prospects. *Osteoporos Int*. 2012;23:1489–1501
24. Eller-Vainicher C, Morelli V, Ulivieri FM, Palmieri S, Zhukouskaya VV, Cairoli E, Pino R, Naccarato A, Scillitani A, Beck-Peccoz P, Chiodini I. Bone quality, as measured by trabecular bone score (TBS), in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism. *J Bone Miner Res*. 2012;27(10):2223-2230

25. Eller-Vainicher C, Filopanti M, Palmieri S, Olivieri FM, Morelli V, Zhukouskaya VV, Cairoli E, Pino R, Naccarato A, Verga U, Scillitani A, Beck-Peccoz P, Chiodini I. Bone quality, as measured by trabecular bone score, in patients with primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology*. 2013;169:155–162
26. Leslie WD, Aubry-Rozier B, Lamy O, Hans D. TBS (Trabecular Bone Score) and Diabetes-Related Fracture Risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):602–609.
27. Dhaliwal R, Cibula D, Ghosh C, Weinstock RS, Moses AM. Bone quality assessment in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2014;25:1969–1973.
28. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcif Tissue Int*. 2009;84:45–55
29. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*. 2007;166:495–505
30. Napoli N, Strotmeyer ES, Ensrud KE, Sellmeyer DE, Bauer DC, Hoffman AR, Dam TL, Barrett-Connor E, Palermo L, Orwoll E, Cummings SR, Black DM, Schwartz AV. Fracture risk in diabetic elderly men: the MrOS study. *Diabetologia*. 2014; DOI 10.1007/s00125-014-3289-6
31. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, Schreiner PJ, Jamal SA, Black DM, Cummings SR. Older Women with Diabetes Have an Increased Risk of Fracture: A Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86: 32–38
32. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Bone mineral density is not sensitive enough to assess the risk of vertebral fractures in type 2 diabetic women. *Calcif Tissue Int*. 2007;80:353–358
33. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic patients have increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications. *JBMR*. 2009;24:702-709

34. Viégas M, Costa C, Lopes A, Griz L, Medeiro MA, Bandeira F. Prevalence of osteoporosis and vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus and their relationship with duration of the disease and chronic complications. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2011;25:216–221
35. Starup-Linde J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control and bone. *Frontiers in Endocrinology* 2013;4(21):1-17
36. Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, Torrisi V, Sidoti MH, Pulvirenti I, Canzonieri E, Tringali G, Fiore CE. Sclerostin levels associated with inhibition of the wnt/b-catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:3744–3750.
37. Gennari L, Merlotti D, Valenti R, Ceccarelli E, Ruvio M, Pietrini MG, Capodarca C, Franci MB, Campagna MS, Calabro` A, Cataldo D, Stolakis K, Dotta F, Nuti R. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(5):1737-1744
38. Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem* 2006;99:411–424
39. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: A possible role of oxidative stress. *Bone*. 2007;40:1408–1414
40. Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Cirnigliaro M, Federici M, et al. Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:710–717.
41. Schwartz AV, Margolis KL, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, Ambrosius WT, Bonds DE, Josse RG, Schnall AM, Simmons DL, Hue TF, Palermo L, Hamilton BP, Green JB, Atkinson HH, O’connor PJ, Force RW, Bauer DC. Intensive glycemic control is not

- associated with fractures or falls in the accord randomized trial. *Diabetes Care*. 2012; 35:1525–1531.
42. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. Serum pentosidine levels are positively associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93: 1013–1019
43. Fowlkes JL, Bunn RC, Thrailkill KM. Contribution of insulin/insulin-like growth factor-1 axis to diabetic osteopathy. *J Diabetes Metab*. 2011;S1:003:1-7.
44. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Yan S, Sugimoto T. Combination of obesity with hyperglycemia is a risk factor for the presence of vertebral fractures in type 2 diabetic men. *Calcif Tissue Int*.2008;83:324–331
45. Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T. Serum insulin-like growth factor-I is a marker for assessing the severity of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*.2011;22:1191–1198
46. Khor EC, Wee NK, Baldock PA. Influence of hormonal appetite and energy regulators on bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(3):194-202
47. Biver E, Salliot C, Combescure C, Gossec L, Hardouin P, Legroux-Gerot I, Cortet B. Influence of adipokines and ghrelin on bone mineral density and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:2703–2713
48. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7): 1-20
49. Thrailkill KM, Fowlkes JL. The role of vitamin D in the metabolic homeostasis of diabetic bone. *Clinic Rev Bone Miner Metab*. 2013;11:28-37.

50. Yamamoto M, Yamaguchi T, Nawata K, Yamauchi M, Sugimoto T. Decreased PTH levels accompanied by low bone formation are associated with vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.*2012;97(4):1277-1284
51. Forsén L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trøndelag Health Survey. *Diabetologia.*1999;42:920–925
52. Strotmeyer ES, Cauley JA, Schwartz AV, et al. Nontraumatic fracture risk with diabetes mellitus and impaired fasting glucose in older white and black adults: the health, aging, and body composition study. *Arch InternMed.* 2005;165:1612–1617
53. Melton LJ 3rd, Leibson CL, Achenbach SJ, Therneau TM, Khosla S. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res.* 2008;23:1334–1342
54. Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, Peduto AJ; Blue Mountains Eye Study. Diabetes and risk of fracture: The Blue Mountains Eye Study. *Diabetes Care.* 2001;24:1198–1203
55. Schwartz AV, Garnero P, Hillier TA, Sellmeyer DE, Strotmeyer ES, Feingold KR, Resnick HE, Tylavsky FA, Black DM, Cummings SR, Harris TB, Bauer DC, for the Health, Aging, and Body Composition Study. Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.*2009;94:2380–2386
56. Gathercole LL, Lavery GG, Morgan SA, Cooper MS, Sinclair AJ, Tomlinson JW, and Stewart PM. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1: translational and therapeutic aspects. *Endocrine Reviews.* 2013;34(4):525–555

57. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1179:179-98
58. Szappanos A, Patocs A, Toke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Liko I, Racz K, Toth M. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clinical Endocrinology.* 2009;71:636–643
59. Morelli V, Donadio F, Eller-Vainicher C, Cirello V, Olgiati L, Savoca C, Cairoli E, Salcuni AS, Beck-Peccoz P, Chiodini I. Role of glucocorticoid receptor polymorphism in adrenal incidentalomas. *Eur J Clin Invest* 2010;40 (9):803–811
60. Chiodini I, Adda G, Scillitani A, Coletti F, Morelli V, Di Lembo S, Epaminonda P, Masserini B, Beck-Peccoz P, Orsi E, Ambrosi B, Arosio M. Cortisol secretion in patients with type 2 diabetes: relationship with chronic complications. *Diabetes Care.* 2007;30(1):83-88.
61. Rosenstock J, Banarer S, Fonseca VA, Inzucchi SE, Sun W, Yao W, Hollis G, Flores R, Levy R, Williams WV, Seckl JR, Huber R. The 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor INCB13739 improves hyperglycemia in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by metformin monotherapy. *Diabetes Care.* 2010;33(7):1516-1522
62. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology.* 1999;140(10):4382-9.
63. Morelli V, Eller-Vainicher C, Salcuni AS, Coletti F, Iorio L, Muscogiuri G, Della Casa S, Arosio M, Ambrosi B, Beck-Peccoz P, Chiodini I. Risk of new vertebral fractures in patients with adrenal incidentaloma with and without subclinical



- hypercortisolism: a multicenter longitudinal study. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1816-21
64. Chiodini I, Morelli V, Masserini B, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Viti R, Coletti F, Guglielmi G, Battista C, Carnevale V, Iorio L, Beck-Peccoz P, Arosio M, Ambrosi B, Scillitani . A bone mineral density, prevalence of vertebral fractures, and bone quality in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism: an Italian multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3207–3214.
65. Arampatzis S, Pasch A, Lippuner K, Mohaupt M. Primary male osteoporosis is associated with enhanced glucocorticoid availability. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(11):1983-91
66. Park JS, Bae SJ, Choi SW, Son YH, Park SB, Rhee SD, Kim HY, Jung WH, Kang SK, Ahn JH, Kim SH, Kim KY. A novel 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor improves diabetes and osteoblast differentiation. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(2):191-202
67. Genant HK, Wu CY, van Knijk C, Nevitt M. Vertebral fracture assessment using a semi-quantitative technique. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1993;8:1137–1148
68. Genant HK, Delmas PD, Chen P, Jiang Y, Eriksen EF, Dalsky GP, Marcus R, san Martin J. Severity of vertebral fracture reflects deterioration of bone microarchitecture. *Osteoporos Int.* 2007;18:69-76.
69. Crans GG, Genant HK, Krege JH. Prognostic utility of a semiquantitative spinal deformity index. *Bone.* 2005;37:175-179.

## V. RINGRAZIAMENTI

- Prof. Paolo Beck-Peccoz
- Prof.ssa Anna Spada
- Dott. Iacopo Chiodini
- Dott.ssa Cristina Eller-Vainicher
- Prof. Carmelo Erio Fiore
- Dott. Agostino Gaudio
- Dott.ssa Emanuela Orsi
- Dott.ssa Benedetta Masserini
- Dott.ssa Elisa Cairoli
- Dott.ssa Serena Palmieri
- Dott.ssa Valentina Morelli
- Dott.ssa Anna Maria Barbieri
- Dott. Fabio Massimo Uliveri
- Dott. Andrea Lania
- Prof.ssa Silvia Fustinoni
- Dott.ssa Elisa Poledri