

PROGETTO DI RICERCA

METABOLIC MEMORY E SINDROME DEL PIEDE DIABETICO (*DIABETIC FOOT SYNDROME: DFS*): ANALISI DELLE RELAZIONE TRA MODIFICHE EPIGENETICHE, ESPRESSIONE DI MICRO-RNA (MIRNA126, 503, 217) E POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SNP rs1800795 del gene IL-6 -G174C, SNP rs1800629 del gene TNF- α -G308A, SNP rs699947 del gene VEGF-C2578A, SNP rs3025039 del gene VEGF C936T, SNP rs1799983 del gene ENOS-G894T, SNP rs11549465 del gene HIF-1alpha C1772T) E LA PRESENZA DI PIEDE DIABETICO IN UNA COORTE DI PAZIENTI CON DIABETE MELLITO DI TIPO 2 E DELLA RELAZIONE CON GLI INDICI DI DISFUNZIONE ENDOTELIALE E I MARKERS SIEROLOGICI DI DISFUNZIONE ADIPO-INFAMMATORIA E VASCOLARE.

- **Tiziana di Chiara, MD:** Ricercatore confermato del SSD Medicina Interna, U.O.C di Medicina Interna con Stroke Care
- **Alessandro Del Cuore:** Assistente in formazione del quarto anno della Scuola di Specializzazione in Medicina Interna, U.O.C di Medicina Interna con Stroke Care
- **Mario Daidone, MD:** Assistente in formazione del quarto anno della Scuola di Specializzazione in Medicina Interna, U.O.C di Medicina Interna con Stroke Care
- **Carlo Domenico Maida, MD:** Dottorando di ricerca del terzo anno del Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare e Clinica , Università degli Studi di Palermo
- **Rosario Luca Norrito :** Assistente in formazione del II anno della Scuola di Specializzazione in Medicina Interna dell'Università degli Studi di Palermo U.O.C di Medicina Interna con Stroke Care
- **Rosaria Maria Pipitone,** Ricercatore del SSD BIO/13, Laboratorio Patologia Molecolare Promise
- **Stefania Grimaudo, PhD,** Professore Associato del SSD BIO/13, Laboratorio Patologia Molecolare Promise
- **Antonino Tuttolomondo, MD, PhD, MSCs,** Professore Ordinario del SSD: Medicina Interna (MED/09), U.O.C di Medicina Interna con Stroke Care
-

INTRODUZIONE

Tra le complicate angiopatiche del diabete mellito, le ulcere a carico del piede con le loro conseguenze anche a carattere sistematico rappresentano la prima causa di ospedalizzazione nei diabetici concretizzandosi nella cosiddetta sindrome del piede diabetico (DFS).

Le modifiche epigenetiche conseguenti alla iperglicemia cronica prendono il nome di “metabolic memory” e si esplicano su svariati geni. Inoltre, è noto che polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) ed espressione di alcuni miRNA sono implicati in quattro diverse fasi patogenetiche dell’ulcera diabetica (5-7).

A nostra conoscenza, non esistono in letteratura, studi che abbiano correlato le modifiche epigenetiche indotte sui miRNA 126, 305 e 217, la loro espressione e il ruolo dei polimorfismi a singolo nucleotide su geni che codificano per citochine infiammatorie e per molecole proangiogeniche, come ENOS, VEGF e HIF1alpha, con la disfunzione endoteliale e con i livelli di adipochine.

Key words: DFS , piede diabetico, diabete, micro-RNA, SNP, disfunzione endoteliale

OBBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli obiettivi principali sono:

analizzare l'espressione dei miRNA selezionati e correlarla ad eventuali modifiche epigenetiche; valutare i polimorfismi a singolo nucleotide sui geni che codificano per molecole infiammatorie e proangiogeniche in soggetti diabetici con e senza piede diabetico allo scopo di caratterizzare la presenza di una eventuale "profilo genetico ed epigenetico" associato alla predisposizione allo sviluppo della sindrome del piede diabetico (DFS)

In una coorte di pazienti diabetici con e senza complicanze del piede rispetto ad una coorte di soggetti sani di controllo verranno quindi analizzate l'espressione e le modifiche epigenetiche sui seguenti miRNA :

- miRNA 126,
- miRNA 503
- miRNA 217

e i seguenti polimorfismi:

- *SNP rs1800795 del gene IL-6 -G174C*
- *SNP rs1800629 del gene TNF-α -G308A*
- *SNP rs699947 del gene VEGF-C2578A*
- *SNP rs3025039 del gene VEGF C936T*
- *SNP rs1799983 del gene ENOS-G894T*
- *SNP rs11549465 del gene HIF-1alpha C1772T*

Ulteriore obiettivo sarà quello di valutare eventuali correlazioni tra il profilo genetico ed epigenetico e i markers sierologici di infiammazione e disfunzione vascolare (IL-6; TNFalfa, VEGF,

HIF-1 alpha), i livelli sierici di adipochine infiammatorie (gremlina 1, resistina, adiponectina) e gli indici strumentali di disfunzione endoteliale (RHI, PWV, AIx) nella popolazione di pazienti in studio.

RISULTATI ATTESI

I risultati attesi dallo studio saranno relativi alla individuazione di possibili modificazioni a livello dell'espressione di miRNA 126, 503 e 217 e di una diversa distribuzione allelica in termini di SNP (rs1800795 del gene IL-6 -G174C, SNP rs1800629 del gene TNF- α -G308A, SNP rs699947 del gene VEGF-C2578A, SNP rs3025039 del gene VEGF C936T, SNP rs1799983 del gene ENOS-G894T, SNP rs11549465 del gene HIF-1alpha C1772T), volti a individuare possibili predisposizioni geniche a sviluppare la complicanza ulcerativa dell'arto inferiore in soggetti diabetici. Tali predisposizioni potrebbero permettere una diagnosi precoce e potrebbero supportare con un approccio di tipo traslazionale la identificazione di nuovi possibili "target" terapeutici. Inoltre ulteriore risultato atteso è la possibile correlazione con un pathway di tipo adipo-infiammatorio e con un maggior grado di disfunzione endoteliale.

Cronoprogramma

Fase 1

Arruolamento pazienti con diabete mellito di tipo 2 con complicanza da ulcera diabetica del piede afferenti presso la nostra UOC di Medicina Interna con Stroke Care e pazienti consecutivi con diabete mellito di tipo 2 senza menzione di complicanza ulcerativa dell'arto inferiore. Saranno altresì reclutati anche pazienti senza diabete mellito afferenti presso il nostro reparto per altre cause esclusi il diabete mellito e gli eventi cardiovascolari acuti.

FASE 2

Raccolta anamnestica, valutazione dell'emoglobina glicata, somministrazione del mini mental State examination (MMSE) (come marker di decadimento cognitivo espressione di malattia cerebrovascolare precoce), raccolta di campioni ematici per analisi genetica e biochimica

FASE 3

Analisi della funzione endoteliale

La valutazione della funzione endoteliale verrà analizzata tramite il device Endopat2000:

I dati dell'RH-PAT verranno analizzati in maniera digitale tramite il dispositivo Endo-PAT2000 software version 3.0.4. con valutazione del RHI (reactive hyperaemia index)

Analisi genetica dei polimorfismi

- Genotipizzazione mediante saggio di discriminazione allelica in real time PCR
Verranno utilizzati assays specifici per:
 - SNP rs1800795 del gene IL-6 -174, G>C ; SNP rs1800629 del gene TNF- α -308, G>A ;
 - SNP rs699947 del gene VEGF:-2578, C>A ; SNP rs11549465 del gene HIF-1alpha-1772, C>T

Analisi dei micro RNA

- Isolamento del RNA totale da sangue periferico: ; Amplificazione tramite Quantitative Real-Time PCR: Un quantitativo di 10 ng di RNA totale verrà trascritto inversamente con il kit Taqman microRNA RT (Invitrogen). L'analisi Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

verra eseguita utilizzando il Sistema 7300 PCR System (Thermo Fisher Scientific).

- **ANALISI BIOCHIMICA**

Le concentrazioni sieriche di Gremilina 1, TNFalpha, VEGF, HIFalpha, IL-6 verranno misurate mediante i rispettivi kit ELISA.

REFERENCES

1. R. D. Abbott, F. N. Brand, and W. B. Kannel, "Epidemiology of some peripheral arterial findings in diabetic men and women: experiences from the Framingham Study," *The American Journal of Medicine*, vol. 88, no. 4, pp. 376–381, 1990.
2. A. Pinto, A. Tuttolomondo, D. Di Raimondo et al., "Cardiovascular risk profile and morbidity in subjects affected by type 2 diabetes mellitus with and without diabetic foot," *Metabolism*, vol. 57, no. 5, pp. 676–682, 2008.
3. A. Tuttolomondo, S. La Placa, D. Di Raimondo et al., "Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular co-morbidity," *Cardiovascular Diabetology*, vol. 9, article 50, 2010.
4. Tuttolomondo A, Casuccio A, Guercio G, Maida C, Del Cuore A, Di Raimondo D, Simonetta I, Di Bona D, Pecoraro R, Della Corte V, Gulotta E, Gulotta G, Pinto A. Arterial stiffness, endothelial and cognitive function in subjects with type 2 diabetes in accordance with absence or presence of diabetic foot syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Jan 6;16(1):2. doi: 10.1186/s12933-016-0483-5.
5. Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. *J Tissue Viability*. 2016 Nov;25(4):229-236. doi: 10.1016/j.jtv.2016.06.005. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27372176.
6. Davis FM, Kimball A, Boniakowski A, Gallagher K. Dysfunctional Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers: New Crossroads. *Curr Diab Rep*. 2018 Jan 23;18(1):2. doi: 10.1007/s11892-018-0970-z. PMID: 29362914.

7. Lin CJ, Lan YM, Ou MQ, Ji LQ, Lin SD. Expression of miR-217 and HIF-1 α /VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats. *J Endocrinol Invest*. 2019 Nov;42(11):1307-1317. doi: 10.1007/s40618-019-01053-2. Epub 2019 May 11. PMID: 31079353.
8. Dhamodharan U, Viswanathan V, Krishnamoorthy E, Rajaram R, Aravindhan V. Genetic association of IL-6, TNF- α and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. *Gene*. 2015 Jul 1;565(1):62 doi:10.1016/j.gene.2015.03.063. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25839939.
9. Viswanathan V, Dhamodharan U, Srinivasan V, Rajaram R, Aravindhan V. Single nucleotide polymorphisms in cytokine/chemokine genes are associated with severe infection, ulcer grade and amputation in diabetic foot ulcer. *Int J Biol Macromol*. 2018 Oct 15;118(Pt B):1995-2000. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.083. Epub 2018 Jul 14. PMID: 30009916.
10. Erdogan M, Kulaksizoglu M, Solmaz S, Berdeli A. The relationship of Interleukin-6-174 G>C gene polymorphism in type 2 diabetic patients with and without diabetic foot ulcers in Turkish population. *Foot (Edinb)*. 2017 Mar;30:27-31. doi: 10.1016/j.foot.2017.02.001. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28257947.
11. Corapcioglu D, Sahin M, Emral R, Celebi ZK, Sener O, Gedik VT. Association of the G894T polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with diabetic foot syndrome foot ulcer, diabetic complications, and comorbid vascular diseases: a Turkish case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Aug;14(4):483-8. doi: 10.1089/gtmb.2010.0023. PMID: 20642368.
12. Li X, Lu Y, Wei P. Association between VEGF genetic variants and diabetic foot ulcer in Chinese Han population: A case-control study. *Medicine (Baltimore)*. 2018 May;97(20):e10672. doi: 10.1097/MD.000000000010672. PMID: 29768333; PMCID: PMC5976339.
13. Amoli MM, Hasani-Ranjbar S, Roohipour N, Sayahpour FA, Amiri P, Zahedi P, Mehrab-Mohseni M, Heshmat R, Larijani B, Tavakkoly-Bazzaz J. VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93(2):215-219. doi: 10.1016/j.diabres.2011.04.016. Epub 2011 May 18. PMID: 21596454.
14. Erdogan M, Kulaksizoglu M, Tetik A, Solmaz S, Kucukaslan AS, Eroglu Z. The relationship of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphism in Turkish type 2 diabetic patients with and without diabetic foot ulcers. *Foot (Edinb)*. 2018 Dec;37:5-10. doi: 10.1016/j.foot.2018.06.006. Epub 2018 Jun 26. PMID: 30321858.

15. Pichu S, Sathiyamoorthy J, Krishnamoorthy E, Umapathy D, Viswanathan V. Impact of the hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) pro582ser polymorphism and its gene expression on diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015 Sep;109(3):533-40. doi: 10.1016/j.diabres.2015.05.014. Epub 2015 May 22. PMID: 26113285.
16. Pichu S, Vimalraj S, Sathiyamoorthy J, Viswanathan V. Association of hypoxia inducible factor-1 alpha exon 12 mutation in diabetic patients with and without diabetic foot ulcer. *Int J Biol Macromol.* 2018 Nov;119:833-837. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.011. Epub 2018 Aug 4. PMID: 30086330.
17. Hedjazifar, S.; Khatib Shahidi, R.; Hammarstedt, A.; Bonnet, L.; Church, C.; Boucher, J.; Blüher, M.; Smith, U. The Novel Adipokine Gremlin 1 Antagonizes Insulin Action and Is Increased in Type 2 Diabetes and NAFLD/NASH. *Diabetes* 2020, 69, 331–341, doi:10.2337/db19-0701.