

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA**

**Scuola di Dottorato in Medicina Sperimentale**

**XXIX ciclo**

**EFFETTI SULLA VARIABILITÀ GLICEMICA E SUL  
COMPENSO GLICO-METABOLICO DI  
METFORMINA, PIOGLITAZONE E SITAGLIPTIN  
IN PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE MELLITO DI  
TIPO 2**

Tutor:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Derosa

Tesi della Dott.ssa Pamela Maffioli

Matricola N. 424215

Anno Accademico 2015/2016

## **Indice**

Indice.....	2
Definizione di diabete mellito .....	3
Basi razionali della terapia.....	3
Dieta .....	3
Ipoglicemizzanti orali.....	4
Farmaci iniettivi .....	12
Variabilità glicemica: definizione e strumenti per rilevarla.....	14
Nostra esperienza in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2.....	17
Scopo dello studio.....	17
Materiali e metodi .....	17
Risultati .....	24
Discussione .....	33
Conclusioni .....	36
Bibliografia .....	37

## **Definizione di diabete mellito**

Il diabete mellito è un disordine metabolico caratterizzato da uno stato di iperglicemia cronica dipendente da una diminuzione della attività dell'insulina che è secondaria a totale assenza di questo ormone (diabete mellito di tipo 1) o ad un'abnorme secrezione dello stesso associata a una diminuita capacità dei tessuti periferici di rispondere alla sua secrezione (diabete mellito di tipo 2). In particolare, il diabete mellito di tipo 2 è una patologia cronica e progressiva dovuta a diversi meccanismi fisiopatologici tra i quali l'insulino-resistenza, una ridotta secrezione insulinica e un'aumentata produzione epatica di glucosio (1-3). L'iperglicemia deriva da un fallimento delle  $\beta$ -cellule nel contrastare l'insulino-resistenza dei tessuti periferici. All'iperglicemia, con il passare del tempo, tendono ad associarsi alcune complicanze peculiari: la macroangiopatia (ossia un'aterosclerosi particolarmente grave e precoce), la microangiopatia (ossia un'alterazione della microcircolazione che si rende particolarmente manifesta nella retina e nel rene) e la neuropatia (un'alterazione motoria e sensitiva a carico del sistema nervoso periferico e del sistema nervoso vegetativo). In accordo con le ultime linee guida della Società Americana di Diabetologia (ADA) (4), abbassare il valore di emoglobina glicata ( $HbA_{1c}$ ) intorno a 7% o  $<7.0\%$ , ha dimostrato di ridurre le complicanze microvascolari e neuropatiche del diabete e, se il controllo glicemico viene raggiunto subito dopo la diagnosi, è associato con una riduzione a lungo termine delle complicanze macrovascolari. Le modifiche dello stile di vita possono migliorare il controllo glicemico così come il peso corporeo, i valori pressori, l'insulino-resistenza e il profilo lipidico; tuttavia il progressivo declino della funzione beta-cellulare, ed il progressivo aumento dell'insulino-resistenza e la scarsa aderenza del paziente alle modifiche comportamentali, spesso costringono il medico ad utilizzare più farmaci per ottenere un adeguato compenso.

## **Basi razionali della terapia**

### **Dieta**

In tutte le forme di diabete è stata riconosciuta l'importanza di una corretta dieta (5). È stato dimostrato che il rapido assorbimento di carboidrati può incrementare la glicemia e la glicosuria e peggiorare i sintomi del diabete. È bene evitare gli zuccheri rapidamente assorbiti (per es. il saccarosio) e assumere carboidrati complessi in forme dietetiche tali da renderne lento l'assorbimento. Questo risultato è raggiunto facilmente se la dieta contiene alimenti ricchi di fibre, tra le quali le più utili sono quelle gelatinose presenti, per esempio, nei legumi. I diabetici devono assumere una dieta equilibrata, non troppo ricca di grassi, con circa il 50-55% dei nutrienti costituito da carboidrati. È opportuno che l'apporto calorico giornaliero venga mantenuto relativamente costante, pur con tutte le variazioni qualitative (tra alimenti considerati equivalenti) che sono necessarie per evitare che la dieta risulti monotona. Nei diabetici di tipo 2 obesi occorre ridurre le calorie perché la semplice perdita di peso può ristabilire la sensibilità dei tessuti all'insulina e far riguadagnare la normalità metabolica.

Nei diabetici non obesi, soprattutto se in trattamento con insulina, le calorie vanno calcolate sulla base del fabbisogno ideale, tenendo conto del tipo di vita condotto dal soggetto e degli aumenti dovuti per l'attività fisica abituale.

### **Ipoglicemizzanti orali**

Gli ipoglicemizzanti orali sono indicati nel diabete di tipo 2 nei casi in cui non si riesca a raggiungere il bilancio metabolico con la sola dieta e l'attività fisica (5); attualmente sono in commercio otto classi farmacologiche: secretagoghi dell'insulina (sulfoniluree e glinidi), biguanidi, tiazolidinedioni, inibitori dell'alfa glucosidasi, inibitori della dipeptidil peptidasi-4, inibitori del co-trasporto sodio-glucosio.

## *Sulfoniluree*

Hanno la proprietà di correggere i due principali difetti responsabili dell'iperglicemia nel diabetico di tipo 2, e cioè l'alterata funzione beta-cellulare e l'insulino-resistenza. L'azione primaria delle sulfoniluree consiste nel potenziare la secrezione insulinica, mentre il loro effetto extrapancreatico, che si manifesta con un incremento della insulino-sensibilità, è verosimilmente secondario alla riduzione dei livelli glicemici più che ad un effetto diretto del farmaco sui tessuti periferici. L'uso delle sulfoniluree è confinato ai diabetici con una residua funzione beta-cellulare.

Tra i farmaci di questa classe si ricordano glibenclamide, glimepiride, glipizide e gliclazide; essi sono in grado di stimolare la secrezione di insulina dal pancreas legandosi al recettore-1 per le sulfoniluree (SUR-1) localizzato sulla membrana cellulare della beta-cellula. Tale meccanismo blocca il canale del potassio ATP-dipendente, prevenendone la fuoriuscita e aumentandone il livello intracellulare; in questo modo si ha la depolarizzazione della cellula e l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, con conseguente ingresso di calcio, che stimola, a sua volta, il rilascio mediante esocitosi dei granuli di insulina dalla cellula. Le sulfoniluree permettono, pertanto, il rilascio di insulina a livelli glicemici inferiori al normale (6); è comprensibile che, nel corso della terapia, le concentrazioni circolanti di insulina siano aumentate (7). Si stima che la riduzione del valore di emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>) sia approssimativamente dell'1,5% (8). Le sulfoniluree hanno anche effetti che vanno oltre quello ipoglicemizzante, per esempio, l'effetto positivo sul profilo lipidico di glimepiride è stato indagato in due nostri studi del 2004 e del 2006. Nel primo studio, l'associazione glimepiride-pioglitazone ha mostrato un significativo miglioramento dei valori del profilo lipidico con riduzione di colesterolo totale (TC), colesterolo LDL (LDL-C) e trigliceridi (Tg) e aumento di colesterolo HDL (HDL-C) (9); nel secondo è stato dimostrato un miglioramento del profilo lipidico con riduzione di TC e LDL-C con l'associazione di glimepiride e metformina (10). Per quanto riguarda l'impatto di glimepiride sui fattori di rischio non convenzionali come la lipoproteina(a) [Lp(a)] e l'omocisteina, è stata dimostrata una riduzione di Lp(a) e omocisteina dopo sei e dodici mesi di trattamento con

glimepiride (11); in uno studio successivo del 2005, è stata riscontrata una riduzione dei livelli di Lp(a) del 30.5% e di omocisteina del 27.3% con l'associazione glimepiride-metformina (12). L'associazione di pioglitazone o rosiglitazone con glimepiride ha mostrato un miglioramento dei valori di omocisteina, mentre solo pioglitazone in associazione con glimepiride ha mostrato una riduzione dei livelli plasmatici di Lp(a), al contrario di rosiglitazone con il quale è stato riscontrato un aumento non significativo dello stesso parametro (13). Un trattamento a lungo termine con glimepiride ha mostrato una riduzione significativa dei valori di pressione arteriosa (14). Tra gli effetti collaterali delle sulfoniluree, si segnala innanzitutto l'ipoglicemia (strettamente legata al meccanismo d'azione) e l'aumento del peso corporeo e dell'indice di massa corporea (BMI) (13,15). Tali farmaci sono suggeriti come terapia di seconda o terza linea in combinazione con metformina, tiazolidinedioni e inibitori della dipeptidilpeptidasi-4 (DPP-4).

### *Glinidi*

Le glinidi (repaglinide e nateglinide) sono secretagoghi con una farmacodinamica più rapida rispetto alle sulfoniluree, in grado di stimolare più rapidamente la secrezione insulinica. La repaglinide ha un'efficacia almeno simile alle sulfoniluree, con un maggiore effetto sull'iperglicemia post-prandiale e un minore rischio di ipoglicemia. Ha eliminazione prevalentemente epatica ed è, pertanto, indicata in pazienti con insufficienza renale (16). Uno studio condotto dal nostro gruppo ha dimostrato la complementare azione di glinidi e biguanidi sul controllo glicemico nel paziente con diabete mellito di tipo 2 e, in particolare, ha stabilito la maggior efficacia dell'associazione di nateglinide + metformina rispetto a glibenclamide + metformina (17).

### *Biguanidi*

Il principale composto di questa classe di farmaci è la metformina. Questa sostanza ha un potere ipoglicemizzante pari a quello delle sulfoniluree, ma presenta un differente meccanismo di azione, non stimola la secrezione di insulina, ma agisce potenziandone gli effetti: riducendo la produzione di glucosio epatico, potenziando la captazione periferica del glucosio prevalentemente da parte del

muscolo e riducendone l'assorbimento intestinale. Metformina aumenta la sensibilità all'insulina aumentando l'ingresso di glucosio nel muscolo scheletrico mediante la stimolazione della traslocazione di GLUT-4 dai depositi intracellulari al sarcolemma, processo frequentemente alterato nel paziente affetto da diabete mellito di tipo 2 (18), riducendo in questo modo la glucotossicità. Metformina è da preferire nel diabetico di tipo 2 obeso o in sovrappeso, sia per la sua debole azione anoressizzante sia perché non produce ipoglicemie sia per la sua proprietà di ridurre l'insulino-resistenza, quasi sempre presente nel paziente obeso.

Rispetto al trattamento con sulfoniluree, la monoterapia con metformina si associa a riduzione o mancato aumento di peso e meno frequenti episodi di ipoglicemia (19-21). Tra i benefici non glicemici si annovera una riduzione dei livelli lipidici (LDL-C e Tg) (22,23) e dell'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1) (23,24); recentemente è stato dimostrato anche un miglioramento della funzione endoteliale (25). In studi del nostro gruppo, è stato dimostrato un miglioramento dei parametri di insulino-resistenza specie in associazione con pioglitazone (26) e un miglioramento significativo dei valori di pressione arteriosa in associazione con rosiglitazone (14).

#### *Tiazolidinedioni*

Sono una classe di ipoglicemizzanti che aumentano la sensibilità all'insulina nei tessuti bersaglio; due sono i farmaci disponibili in commercio: rosiglitazone e pioglitazone. I tiazolidinedioni sono ligandi farmacologici di un recettore nucleare noto come peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ). Quando attivato, il PPAR- $\gamma$  si lega agli elementi di risposta sul DNA alterando la trascrizione di una varietà di geni che regolano il metabolismo dei carboidrati e dei lipidi (27). I tiazolidinedioni, legandosi al recettore PPAR- $\gamma$ , fungono da agonisti e hanno l'effetto preminente di aumentare la captazione del glucosio insulino-stimolata da parte delle cellule del muscolo scheletrico, del tessuto adiposo e del fegato, riducendo così l'insulino-resistenza a livello dei tessuti periferici. Questi farmaci, inoltre, riducono la gluconeogenesi epatica ed esercitano effetti addizionali sul metabolismo lipidico.

In un nostro studio condotto su quattro gruppi di 60 pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 monitorati con il clamp euglicemico iperinsulinemico, si conferma che il controllo terapeutico basato sull'associazione di pioglitazone e metformina si associa a rilevanti miglioramenti in termini quantitativi sui parametri di insulino-resistenza (26). L'attivazione del PPAR- $\gamma$  riduce la lipolisi e migliora il differenziamento adipocitario; è interessante notare che il recettore è altamente espresso negli adipociti, mentre la sua espressione nelle cellule muscolari è, in confronto, minore. Perciò, l'aumento dell'ingresso di glucosio nel muscolo può essere considerato per lo più un effetto indiretto mediato dall'interazione dei tiazolidinedioni con gli adipociti (28). Il tessuto adiposo è ormai considerato un organo endocrino in grado di secernere molti mediatori biologicamente attivi noti come adipocitochine (29) in grado di creare un ambiente infiammatorio; da due studi del nostro gruppo, si sono dimostrati i potenti effetti antinfiammatori di pioglitazone tali da giustificare un suo impiego come farmaco anti-aterosclerotico, oltre che come farmaco insulino-sensibilizzante (30). Pioglitazone a dose piena ha dimostrato di ridurre la risposta infiammatoria in risposta ad uno stimolo glicemico maggiormente rispetto ad acarbose in pazienti diabetici già trattati con sulfonilurea e metformina alla dose massima (31). Il miglior impatto di pioglitazone sulla riduzione dei parametri infiammatori è dovuta al fatto che il PPAR- $\gamma$ , come un fattore di trascrizione nucleare, può inibire l'espressione e l'attività delle MMP; inoltre, il PPAR- $\gamma$  può controllare l'espressione di alcuni geni presenti all'interno della parete arteriosa, modulando in questo modo la cascata di risposte nei monociti/macrofagi attivati da ligandi endogeni o sintetici (32). Come metformina, i tiazolidinedioni non stimolano la secrezione insulinica (33,34); essi migliorano la risposta e l'efficienza della beta-cellula presumibilmente riducendo i livelli di glucosio ed acidi grassi liberi, entrambi responsabili di effetti deleteri sulla secrezione di insulina. Alcuni studi suggeriscono anche che questi farmaci prolunghino la sopravvivenza della beta-cellula (35,36) e riducano il livello di microalbuminuria come manifestazione del loro effetto benefico sulla funzione endoteliale (37). L'abbassamento del valore di HbA<sub>1c</sub> che si ottiene è simile a quello ottenibile con metformina. L'associazione di

tiazolidinedioni e glimepiride nel trattamento di diabete mellito di tipo 2 è associata ad un significativo miglioramento dei valori di pressione arteriosa a lungo termine collegato ad una riduzione dell'insulino-resistenza (38), dato confermato in uno studio successivo valutando i valori di pressione arteriosa in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 in terapia con pioglitazone e metformina. Riguardo i benefici sul profilo lipidico, è stato dimostrato un significativo miglioramento in termini di riduzione di TC, LDL-C e Tg e aumento di HDL-C con pioglitazone (39). Gli effetti collaterali includono l'aumento ponderale, soprattutto a livello sottocutaneo, associato a riduzione dei depositi adiposi viscerali, ed edema, effetti ambedue più frequenti in soggetti che assumono insulina; soggetti con scompenso cardiaco congestizio e insufficienza epatica non dovrebbero assumere tali farmaci.

#### *Inibitori dell'alfa glucosidasi*

L'alfa glucosidasi è un enzima incaricato della digestione degli zuccheri nell'intestino, è localizzato a livello dell'orletto a spazzola della mucosa dell'intestino tenue e ha il compito di scindere i carboidrati complessi e i disaccaridi trasformandoli in monosaccaridi. Gli inibitori dell'alfa glucosidasi, inibendo questo enzima, agiscono ritardando l'assorbimento dei carboidrati (amido e destrina, in particolare) dal tratto gastro-intestinale riducendo, conseguentemente, le escursioni glicemiche post-prandiali sia nei soggetti diabetici che non diabetici. Il farmaco più importante di questa categoria è acarbose; con la sua azione acarbose previene il picco iperglicemico post-prandiale (40). Somministrato per bocca costituisce un adiuvante dietetico che, accanto agli altri farmaci, contribuisce a migliorare il controllo glicemico. Può essere utilizzato in pazienti con insufficienza epatica e con insufficienza renale sino ad un filtrato glomerulare renale stimato  $> 25 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 1.73 \text{ m}^{-2}$ .

#### *Inibitori della dipeptidil peptidasi-4*

Le incretine sono ormoni secreti dal tratto gastroenterico nella circolazione sistemica in risposta all'ingestione di nutrienti in grado di migliorare la secrezione insulinica glucosio-dipendente.

Il primo ormone incretinico ad essere identificato è stato isolato da estratti di intestino tenue di maiale ed è stato inizialmente chiamato polipeptide inibitorio gastrico (gastric inhibitory polypeptide, GIP), data la capacità di inibire la secrezione acida nei cani; studi successivi hanno mostrato che esso stimola anche la secrezione di insulina nell'animale e nell'uomo e perciò è stato rinominato polipeptide insulintropico glucosio-dipendente (glucose-dependent insulintropic polypeptide). GIP viene rilasciato dalle cellule K del piccolo intestino, in risposta all'ingestione di glucosio o grassi e potenzia la secrezione insulinica glucosio-dipendente; tuttavia GIP da solo non giustifica completamente l'effetto incretinico in vivo.

La scoperta del secondo ormone incretinico, il peptide-1 glucagone-simile (glucagon-like peptide-1, GLP-1), è seguita alla clonazione e al sequenziamento dei geni del proglucagone. Oltre al glucagone, infatti, il gene del proglucagone codifica per due peptidi che sono omologhi quasi al 50% al glucagone e perciò sono stati chiamati peptide-1 glucagone-simile (glucagon-like peptide-1) e peptide-2 glucagone-simile (glucagon-like peptide-2); nonostante entrambi siano stati valutati per la loro attività insulintropica, solo GLP-1 è capace di stimolare la secrezione insulinica. GLP-1 è un prodotto proteolitico post-traduzionale tessuto specifico del gene del proglucagone che viene rilasciato dalle cellule enteriche L in risposta all'ingestione di cibo e migliora la secrezione insulinica glucosio-dipendente (41,42).

L'inattivazione delle incretine è mediata dalla dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4), una serinproteasi che elimina dipeptidi dall'estremità amminoterminale di oligopeptidi o proteine contenenti residui di alanina o prolina in posizione 2, modificandone l'attività. Gli inibitori della DPP-4 agiscono inibendo la degradazione delle incretine nell'organismo. Aumentando il livello delle incretine nel sangue, gli inibitori della DPP-4 stimolano il pancreas a produrre più insulina quando il tasso glicemico è alto. Sitagliptin è stato il primo inibitore della DPP-4 ad essere commercializzato seguito, poi da vildagliptin, saxagliptin, linagliptin, alogliptin. Questi farmaci sono indicati nel trattamento del diabete di tipo 2 associati alla terapia con altri farmaci antidiabetici quali metformina o

tiazolidinedioni o sulfoniluree in pazienti che non abbiano raggiunto un adeguato controllo glicemico con la dose massima tollerata di queste terapie. Questi farmaci non funzionano quando la concentrazione di glucosio nel sangue è bassa; essi, inoltre, riducono la quantità di zuccheri prodotti dal fegato accrescendo i livelli di insulina e diminuendo i livelli dell'ormone glucagone. La combinazione di questi processi riduce il tasso di glucosio nel sangue e contribuisce al controllo del diabete di tipo 2.

Focalizzando l'attenzione su sitagliptin, il capostipite di questa famiglia di farmaci, dopo somministrazione orale di una dose di 100 mg a persone sane, sitagliptin è rapidamente assorbito (43); le concentrazioni plasmatiche di picco sono raggiunte da 1 a 4 ore dopo la somministrazione della dose (43) e la biodisponibilità assoluta del farmaco è di circa l'87%. Sitagliptin può essere somministrato indipendentemente dai pasti. Sitagliptin viene eliminato, immodificato, principalmente per via urinaria e il metabolismo rappresenta una via metabolica minore. Circa il 79% del farmaco è escreto immodificato nelle urine. Dopo la somministrazione di una dose di (14C) sitagliptin per via orale a soggetti sani, circa il 100% della radioattività somministrata è stata eliminata nelle feci (13%) o nelle urine (87%) entro una settimana dalla somministrazione. Sitagliptin è un inibitore dell'enzima DPP-4 potente ed altamente selettivo. In uno studio con dose multipla, la somministrazione di sitagliptin per via orale a soggetti sani ha determinato, per dosi  $\geq 50$  mg al giorno, un'inibizione  $\geq 80\%$  rispetto al placebo dell'attività della DPP-4 nelle 24 ore ed ha determinato un incremento dei livelli post-prandiali di GLP-1 attivo di circa 2-3 volte rispetto al placebo (43).

#### *Inibitori del co-trasporto sodio-glucosio*

Gli inibitori del co-trasporto sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT2) sono gli ultimi ipoglicemizzanti orali, in ordine cronologico, ad essere stati commercializzati, comprendono, al momento, dapagliflozin, canagliflozin ed empagliflozin. Sono farmaci anti-iperglicemici la cui capacità di ridurre la glicemia è direttamente proporzionale al filtrato glomerulare renale, motivo per cui la loro efficacia terapeutica è ridotta nei soggetti affetti da malattia renale cronica. Essi agiscono inibendo il co-trasporto sodio

glucosio presente a livello renale, aumentando, quindi, l'eliminazione urinaria di glucosio. Il meccanismo d'azione degli inibitori del SGLT2 è indipendente dall'azione dell'insulina o dalla funzione delle beta cellule pancreatiche. Gli inibitori del SGLT2 sembrano anche essere capaci di ridurre significativamente l'iperfiltrazione glomerulare, la pressione di filtrazione glomerulare, la pressione arteriosa sistemica ed i livelli di iperuricemia, con potenziali effetti benefici sulla progressione del danno renale e sul rischio cardiovascolare, come dimostrato da empagliflozin nello studio EMPA-REG (44).

## **Farmaci iniettivi**

### *Incretino-mimetici*

Il meccanismo d'azione di questa classe consiste nel mimare gli effetti prodotti nel corpo dalle incretine (45). I pazienti che fanno uso di questi farmaci devono continuare il loro programma dietetico e di esercizio fisico. Il capostipite di questa classe di farmaci è exenatide, dapprima disponibile solo nella formulazione a rilascio immediato, e poi venduto nella formulazione a rilascio ritardato (Long Acting Release), a somministrazione settimanale. Dopo exenatide sono stati commercializzati, in ordine cronologico, liraglutide, lixisenatide e dulaglutide. Sono farmaci indicati nel trattamento del diabete di tipo 2 associato alla terapia con altri farmaci antidiabetici quali metformina e/o sulfoniluree in pazienti che non abbiano raggiunto un adeguato controllo glicemico con la dose massima tollerata di queste terapie. Questi farmaci devono essere somministrati mediante iniezione sottocutanea nella coscia, nell'addome o nella parte alta delle braccia, utilizzando la penna preriempita di soluzione iniettabile. È necessaria una particolare attenzione quando gli incretino-mimetici vengono aggiunti alla terapia con una sulfonilurea, in quanto esiste il rischio di ipoglicemia; tale rischio non è previsto quando l'incetino-mimetico viene aggiunto alla terapia con metformina. Il farmaco è sconsigliato nei pazienti con grave insufficienza renale.

### *Insulina*

Sebbene sia stata sviluppata principalmente per il diabete mellito di tipo 1, essa viene comunemente somministrata anche in pazienti con diabete mellito di tipo 2 quando i livelli di insulinemia basale sono ridotti al minimo e non permettono il controllo della glicemia. L'insulina può essere utilizzata in monoterapia e in combinazione con metformina, con i tiazolidinedioni, con gli inibitori dell' $\alpha$ -glucosidasi o con gli inibitori della DPP-4 e con i GLP-1 agonisti. Rispetto agli altri farmaci, la sua abilità nel ridurre il livello di HbA<sub>1c</sub> è maggiore, assestandosi in un intervallo compreso tra 1,2% e 2,5%. I dosaggi devono essere modificati per ciascun paziente al fine di raggiungere un adeguato compenso, con maggiori incrementi laddove è maggiore l'insulino-resistenza. Il principale effetto collaterale è l'ipoglicemia, che può essere causata da errori terapeutici o di somministrazione. Esistono molti tipi di insulina, comunemente suddivisi in insuline ad azione ultrarapida, rapida, intermedia e a lunga durata d'azione.

## Variabilità glicemica: definizione e strumenti per rilevarla

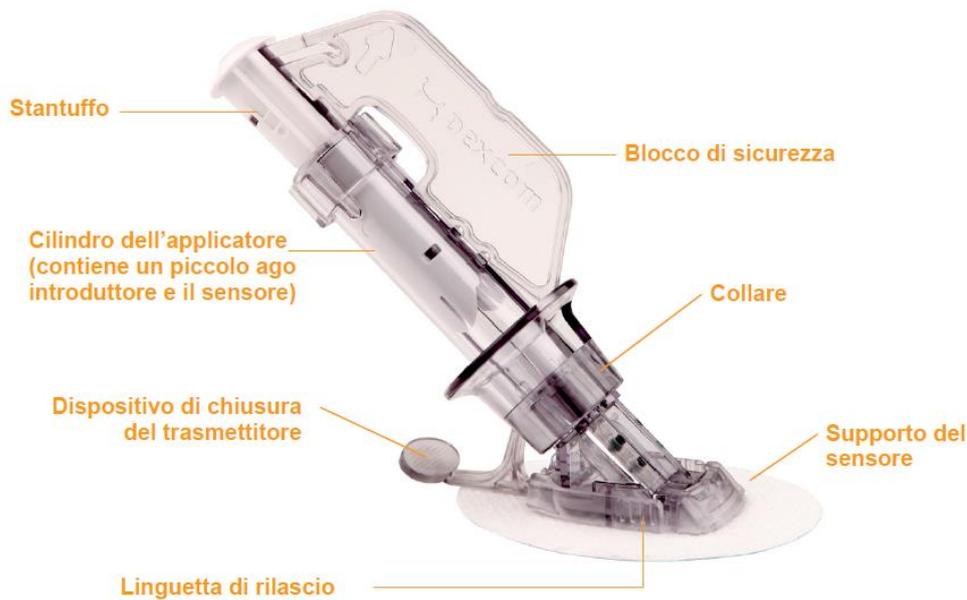
Oltre al valore di HbA<sub>1c</sub>, primo dato che ci consente di rilevare il grado di compenso glicemico del paziente, sta acquistando sempre più importanza, negli ultimi anni, il concetto di variabilità glicemica. Ci sono studi, infatti, che dimostrano come la variabilità glicemica sia un fenomeno complesso, più fluttuazioni della glicemia nello stesso individuo possono essere più dannose di un semplice episodio di iperglicemia acuta o, addirittura, di un'iperglicemia cronica stabile (46). Proprio per questo, al fine di rilevare al meglio la variabilità glicemica in un individuo, è stato progettato il sistema di monitoraggio in continuo della glicemia (CGMS): esso ha dimostrato di essere un metodo affidabile per valutare le escursioni glicemiche rispetto al classico sistema di monitoraggio della glicemia capillare con il refllettometro (47).

Il CGMS è un sistema costituito da un sensore, da un registratore e da un ricevitore che consente di monitorare costantemente i livelli di zucchero nel liquido interstiziale sottocutaneo del paziente (Figura 1). Il sensore viene posizionato sull'addome del paziente, con una cannula che va a posizionarsi nel tessuto sottocutaneo addominale del paziente tramite l'aiuto di un applicatore (Figure 2 e 3).

**Figura 1:** sensore, registratore e ricevitore



**Figura 2:** applicatore del sensore



**Figura 3:** sensore posizionato a livello addominale



L'inserimento del sensore glicemico e il collegamento al ricevitore glicemico richiedono solo pochi minuti e l'avvio del monitoraggio non richiede l'uso del computer. Per funzionare il sensore deve essere "calibrato": questo richiede che il paziente inserisca, ad intervalli precisi, la propria glicemia rilevata su sangue capillare all'interno del ricevitore in modo che possa avvenire la calibrazione. La calibrazione è necessaria affinché avvenga la conversione della glicemia rilevata nel liquido

sottocutaneo interstiziale in glicemia capillare espressa in mg/dl. Quello che compare al paziente sul ricevitore è un grafico con l'andamento della propria glicemia; il sistema è dotato, inoltre, di allarmi che segnalano al paziente quando la sua glicemia è in rapida discesa o ascesa in modo che il soggetto possa intervenire ed intraprendere le azioni necessarie. Una volta terminato il monitoraggio, l'operazione di scarico dei dati registrati risulta molto agevole grazie alla connessione USB di cui dispone il sensore ed al sistema di accesso dati on-line.

## **Nostra esperienza in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2**

Come si evince da quanto detto sopra, i farmaci per la gestione del diabete mellito di tipo 2 sono veramente molti, le stesse linee guida lasciano ampia libertà al diabetologo al fine di scegliere il farmaco adeguato (4). La tendenza degli ultimi anni è quella di fenitopizzare il paziente e scegliere per lui la terapia più opportuna. In particolare le linee guida indicano metformina come farmaco di prima scelta, dopodichè lasciano ampio spazio alla scelta del diabetologo. Quello che si richiede ad un ipoglicemizzante orale, oltre, ovviamente di ridurre il valore di HbA<sub>1c</sub>, è quello di ridurre la variabilità glicemica, spesso sottovalutata. Abbiamo già valutato in un nostro precedente studio come la combinazione di metformina, pioglitazone e sitagliptin, abbia un effetto migliore rispetto a metformina, pioglitazone e glibenclamide nel mantenere un controllo glicemico a lungo termine (48), tuttavia gli effetti sulla variabilità glicemica non sono stati analizzati.

### **Scopo dello studio**

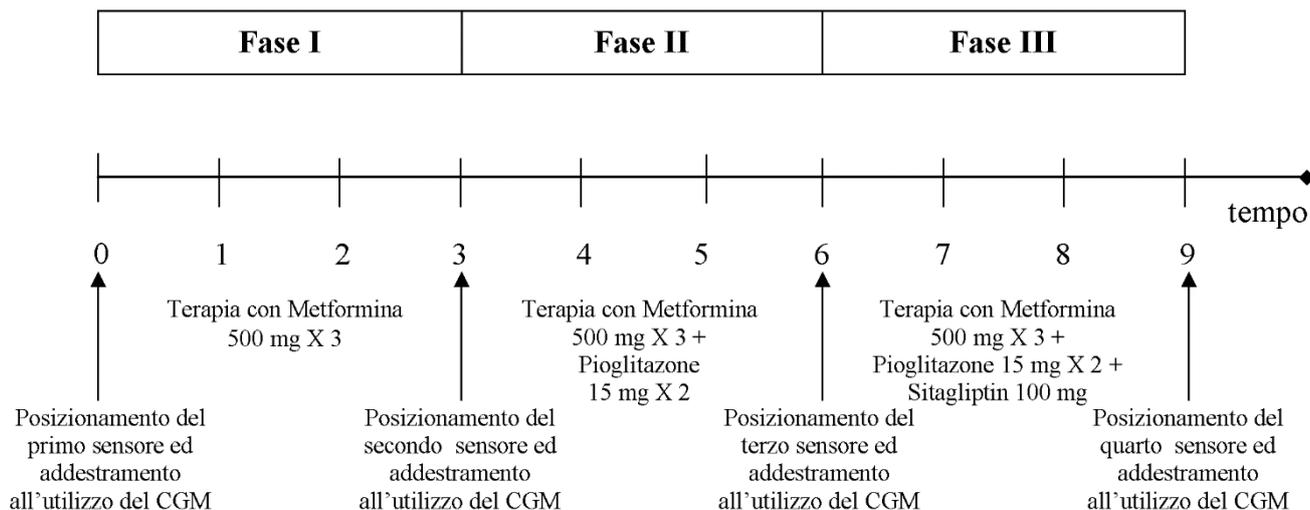
Lo studio ha lo scopo di valutare la variazione del compenso glicemico e della variabilità glicemica dopo l'aggiunta di metformina, pioglitazone e sitagliptin alla terapia dietetica precedentemente in atto in pazienti diabetici di tipo 2 non adeguatamente controllati. Obiettivo secondario è valutare gli effetti di questi farmaci su alcuni marcatori infiammatori e di danno endoteliale.

### **Materiali e metodi**

#### *Disegno dello studio*

Questo studio osservazionale, longitudinale, prospettico, è stato condotto presso gli Ambulatori di Diabetologia e Malattie Metaboliche del Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica della Clinica Medica II dell'Università degli Studi di Pavia presso l'IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Ai pazienti è stata prescritta, in aggiunta alla dieta precedentemente seguita, metformina 500 mg tre volte al giorno per i primi tre mesi, dopodiché è stato introdotto pioglitazone 15 mg due volte al giorno per altri tre mesi e, infine, è stato aggiunto, alla combinazione di metformina e pioglitazone, sitagliptin, 100 mg 1 volta al giorno, per altri tre mesi (Figura 4).

**Figura 4:** disegno dello studio



Il disegno dello studio prevedeva che, in qualsiasi fase dello studio, qualora il valore di HbA<sub>1c</sub> avesse raggiunto l'obiettivo desiderato (HbA<sub>1c</sub> < 6,5%), la partecipazione allo studio sarebbe stata interrotta ed il paziente non avrebbe dovuto sottoporsi ad ulteriori adeguamenti della terapia ipoglicemizzante né ad ulteriori monitoraggi glicemici in continuo. Allo stesso modo, qualora, in qualsiasi fase dello studio, il valore di HbA<sub>1c</sub> avesse evidenziato una condizione di grave scompenso glicemico (HbA<sub>1c</sub> > 9,0%), la partecipazione allo studio sarebbe stata ugualmente interrotta ed il paziente sarebbe stato posto in trattamento insulinico secondo le norme di buona pratica clinica e comunque a giudizio del Medico Curante.

Lo studio è stato condotto in accordo con la dichiarazione di Helsinki e dei suoi emendamenti e secondo le linee guida di buona pratica clinica. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Struttura e tutti i pazienti hanno dato il consenso per iscritto alla partecipazione allo studio, dopo essere stati adeguatamente informati. Lo studio è stato regolarmente registrato sul sito ClinicalTrials.gov con il seguente numero: NCT01895569.

#### *Partecipanti e criteri di arruolamento*

Nello spazio temporale di tre anni sono stati arruolati 66 pazienti, di età  $\geq 18$  anni, affetti da diabete mellito di tipo 2 secondo i criteri delle linee guida dell'ESC (European Society of Cardiology) e

dell'EASD (European Association for the Study of Diabetes) (49). L'età media dei partecipanti è risultata essere  $55.8 \pm 9.2$  anni. I pazienti, identificati attraverso la revisione delle cartelle cliniche e dei registri computerizzati, sono stati contattati dagli sperimentatori per telefono o di persona, al momento della visita ambulatoriale programmata.

Per essere reclutati nello studio, i pazienti dovevano soddisfare i seguenti criteri di eleggibilità:

- età compresa tra 18 e 75 anni
- entrambi i sessi
- presenza di diabete mellito tipo 2
- in terapia dietetica
- $HbA_{1c} > 6,5\%$  ma  $< 9\%$

Non sono stati inclusi pazienti con una storia di chetoacidosi o con una retinopatia, neuropatia o nefropatia instabile o rapidamente progressiva; i soggetti con alterata funzionalità epatica (definita come valori di transaminasi superiori a tre volte i limiti massimi di laboratorio) o renale (definita come valori di creatinina superiori a 1.3 mg/dl nella donna e 1.4 mg/dl nell'uomo).

Sono stati esclusi i soggetti portatori di patologie quali neoplasie, patologie infiammatorie croniche (reumatologiche ed infettive), malattie psichiatriche, pregresse pancreatiti acute o croniche, edema polmonare acuto, infarto acuto del miocardio, pazienti affetti da scompenso cardiaco in classe NYHA II-IV, che abbiano subito un trapianto d'organo o siano trattati con corticosteroidi o antinfiammatori non steroidei.

#### *Dieta ed esercizio fisico*

I soggetti stavano già seguendo una dieta equilibrata basata sulle raccomandazioni dell'American Heart Association (AHA) (50) che include il 50% delle calorie derivante dai carboidrati, il 30% dai grassi (6% saturi), e il 20% dalle proteine, con un contenuto massimo di 300 mg di colesterolo/giorno e 35 g/giorno di fibre. I soggetti non sono stati trattati con vitamine o preparati minerali durante lo studio.

I consigli sulla dieta da seguire sono stati dati da un dietista e/o un medico specialista. I soggetti sono stati anche incoraggiati ad aumentare la propria attività fisica camminando a passo svelto o andando in bicicletta per 20 a 30 minuti, 3-5 volte alla settimana.

#### *Parametri valutati*

Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti ad una visita di screening per valutare le condizioni cliniche. Durante la prima visita è stato registrato un ECG a 12 derivazioni per escludere una patologia ischemica in atto, è stata compilata una cartella clinica informatizzata e vengono registrati i seguenti dati: circonferenza vita (CV), circonferenza addome (CA), circonferenza fianchi (CF), peso, altezza, indice di massa corporea (BMI), valore di HbA<sub>1c</sub>, glicemia a digiuno (FPG), glicemia post-prandiale (PPG), insulinemia basale (FPI), indice HOMA di resistenza all'insulina (HOMA-IR), proteina C reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP), profilo lipidico [TC, LDL-C, HDL-C, Tg, Lp(a)], molecola di adesione intercellulare-1 (sICAM-1), molecola di adesione cellulare vascolare-1 (sVCAM-1), sE-selectina, metalloproteinasi-2, metalloproteinasi-9, adiponectina (ADN). Questi parametri sono stati registrati al basale e a 3, 6, 9 mesi dall'inizio del trattamento.

Inoltre, al basale, a 3, 6, e 9 mesi è stato posizionato un monitoraggio glicemico in continuo (CGM) per 6 giorni (DexCom Seven Plus Roche). Prima del posizionamento il paziente ha ricevuto un foglio informativo per il posizionamento del CGM, ha firmato il consenso informato al posizionamento dello strumento, ha ricevuto un glucometro da utilizzarsi per la durata della valutazione ed è stato educato al suo utilizzo. Durante la prima visita è stato posizionato il primo sensore ed inizializzata la registrazione. Allo scadere dei 6 giorni il paziente ha riportato il sensore ed è stato eseguito lo scarico dei dati con l'apposito programma fornito in dotazione con lo strumento.

#### *Determinazione dei vari parametri*

Il controllo glicemico è stato stimato tramite i valori della glicemia media (MBG), l'area sotto la curva del glucosio sopra 70 mg/dl (AUC > 70) o 180 mg/dl (AUC > 180), e la percentuale di tempo trascorso con glicemia superiore a 70 mg/dl ( $t > 70$ ) o 180 mg/dl ( $t > 180$ ). La variabilità glicemica

all'interno della stessa giornata è stata valutata come la deviazione standard (SD), il valore M e la media di ampiezza delle escursioni glicemiche (MAGE). La variabilità glicemica tra diverse giornate è stata valutata come la media delle differenze giornaliere (MODD).

La media delle differenze giornaliere (MODD) è stata calcolata dalla differenza assoluta tra i valori rilevati al CGMS appaiati nel corso di due successivi periodi di 24 ore ed è stato utilizzato per valutare la variabilità glicemica (51). L'ampiezza media delle escursioni glicemiche (MAGE), è stato calcolato come media aritmetica delle differenze tra picchi glicemici consecutivi e nadir (52,53). Il valore M è una trasformazione logaritmica di una deviazione della glicemia da un arbitrario valore glicemico ideale (54). Tutti questi parametri sono stati valutati tra il terzo e il quarto giorno di monitoraggio, periodo durante il quale il sensore è più affidabile, per garantire l'affidabilità dei dati. Per quanto riguarda i parametri di laboratorio, tutti i parametri sono stati determinati dopo 12 ore di digiuno. I campioni di sangue venoso sono stati prelevati per tutti i pazienti tra le 08.00 e le 09.00. Abbiamo utilizzato plasma ottenuto mediante aggiunta di Na<sub>2</sub>-EDTA, 1 mg/ml e centrifugato a 3000 g per 15 minuti a 4° C. Immediatamente dopo la centrifugazione, i campioni di plasma sono stati congelati e conservati a -80° C per non più di 3 mesi. Tutte le misurazioni sono state effettuate in un laboratorio centrale. Tutti i parametri sono stati determinati dopo 12 ore di digiuno con l'eccezione della glicemia capillare post-prandiale determinata dopo due ore da un pasto standardizzato. I prelievi di sangue venoso sono stati raccolti tra le 8 e le 9 del mattino. Abbiamo utilizzato provette con l'aggiunta di Na<sub>2</sub>-EDTA, 1 mg/ml, e i prelievi sono stati centrifugati a 3000 g per 15 minuti a 4°C. Immediatamente dopo la centrifugazione, i prelievi sono stati congelati a -80°C per non più di 3 mesi. Tutte le misurazioni sono state eseguite in un laboratorio centralizzato.

L'indice di massa corporea è stato calcolato dagli sperimentatori come peso espresso in chilogrammi diviso l'altezza al quadrato espressa in metri.

Il valore di HbA<sub>1c</sub> è stata misurata mediante un metodo di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) (DIAMAT, Bio-Rad, USA; valori normali 4,2-6,2%), con coefficiente di variazione intra ed

interassay < 2% (55). La glicemia plasmatica è stata analizzata con il metodo della glucosio-ossidasi (GOD/PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) con coefficiente di variazione intra ed interassay < 2% (56).

Il valore di glicemia capillare, necessaria per calibrare il sensore, è stato determinato utilizzando il glucometro fornito ai pazienti all'inizio dello studio (One Touch Verio® Blood Glucose Monitoring System).

L'insulinemia plasmatica è stata rilevata con un dosaggio radioimmunologico (Pharmacia, Uppsala, Svezia) usando un secondo anticorpo per separare l'insulina libera da quella legata all'anticorpo 125 I (coefficiente di variazione intra- and interassay 4,6 and 7,3%, rispettivamente) (57).

L'indice HOMA-IR è stato calcolato come prodotto della glicemia basale (mmol/l) e i livelli di insulinemia ( $\mu\text{U/ml}$ ) diviso 22,5 (58,59).

Il TC ed i Tg sono stati determinati usando una tecnica enzimatica (60,61) su un analizzatore clinico (HITACHI 737; Hitachi, Tokyo, Giappone) con coefficienti di variazione intra ed interassay rispettivamente di 1,0 e 2,1% per il valore di TC e 0,9 e 2,4% per il valore di Tg. I livelli di HDL-C sono stati misurati dopo precipitazione con acido fosfotungstenico delle lipoproteine plasmatiche contenenti Apo B (62) con coefficienti di variazione intra ed interassay rispettivamente di 1,0 e 1,9%.

I valori di LDL-C sono stati calcolati mediante la formula di Friedewald (63).

I livelli di Lp(a) sono stati misurati con un metodo immunoenzimatico legato ad un enzima (ELISA), insensibile alla presenza di plasminogeno, utilizzando il kit commerciale Macra-Lp(a) (SDI, Newark, Delaware, USA); i coefficienti di variazione intra- and interassay sono 5% e 9%, rispettivamente (64,65).

I valori di ADN sono stati determinati con un kit ELISA (BBridge International, Sunnyvale, CA). I coefficienti di variazione intraassay sono 3,6% per i campioni a basse concentrazioni e 3,3% per i campioni di controllo ad alte concentrazioni, mentre i coefficienti di variabilità interassay sono

rispettivamente 3,2% per i campioni a basse concentrazioni e 7,3% per i campioni di controllo ad alte concentrazioni (66).

I livelli di sICAM-1 sono stati misurati utilizzando un test ELISA in accordo con le istruzioni dei produttori (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). I coefficienti di variabilità intra- and interassay sono < 10% (67).

I livelli di sVCAM-1 sono stati valutati con un test ELISA in accordo con le istruzioni dei produttori (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). I coefficienti di variabilità intra- and interassay sono < 10% (68).

I livelli di MMP-2 e MMP-9 sono stati misurati con un metodo ELISA a due siti usando reagenti commerciali (Amersham Biosciences, Uppsala, Svezia) con coefficienti di variazione intra- e inter-assay di 5,4% e 8,3% per le MMP-2 (69) e di 4,9% e 8,6% per le MMP-9 (70).

La hs-CRP è stata misurata con metodo immunonefelometrico in completa automazione su nefelometro BN II (Dade Behring, Newark, DE). I coefficienti di variabilità intra- ed interassay sono, rispettivamente, 5,7% e 1,3% (71).

I livelli di sE-selectina sono stati determinati con metodo ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). I coefficienti di variabilità intra- ed interassay sono, rispettivamente, 4,7% e 7,4%, rispettivamente (72).

#### *Analisi statistica*

La dimensione del campione è stata determinata sulla base del presupposto che un cambiamento atteso dell'AUC  $\geq 270$  mg/dl fosse  $270 \pm 743$  mg/dl. Sulla base di questo presupposto, è stato stimato che l'arruolamento di 60 soggetti fosse sufficiente a rifiutare l'ipotesi di nessun cambiamento del controllo glicemico con una potenza dell'80%. Le caratteristiche basali dei pazienti sono state analizzate con una statistica descrittiva. Le variabili distribuite normalmente sono state testate con test parametrici (t-test appaiati) e le variabili non normalmente distribuite con test non parametrici (test di Wilcoxon). Per tutti i test statistici e gli intervalli di confidenza, il livello di significatività è

stato fissato a  $p < 0.05$  (73). La variabile primaria è stata misurata tramite CGMS e valutata mediante AUC. È stata anche valutata la percentuale di tempo trascorso (in base alla registrazione con il CGMS) in determinati intervalli di glicemia.

## **Risultati**

### *Campione in esame*

Sono stati arruolati, in tutto, 66 pazienti; di questi due pazienti hanno interrotto prematuramente lo studio per raggiungimento del compenso glicemico durante la seconda fase dello studio, dopo l'aggiunta di pioglitazone, prima del termine dei 9 mesi di osservazione. Questi due soggetti sono stati, pertanto, fatti uscire prematuramente dallo studio, come da protocollo, per raggiungimento dell'obiettivo glicemico previsto. Durante lo studio non si sono verificati eventi avversi né reazioni avverse relative al posizionamento del sensore o al mantenimento in sede dello stesso. Tutti i monitoraggi in continuo della glicemia raccolti sono stati scaricati su un computer dedicato alla ricerca. Poiché, a volte, durante il monitoraggio, possono verificarsi delle interruzioni nel segnale da parte del sensore, con perdita dei dati glicemici durante quel lasso di tempo, sono stati considerati validi i monitoraggi che riportavano almeno l'80% dei dati di registrazione.

### *Parametri antropometrici*

Non abbiamo osservato differenze significative durante le varie fasi dello studio per quanto riguarda la variazione di peso, BMI e circonferenze vita, addome e fianchi (Tabella 1).

### *Compenso glico-metabolico*

È emersa una significativa riduzione del valore di HbA<sub>1c</sub> nel passaggio attraverso le varie fasi dello studio, in particolare si è osservata una riduzione del valore di HbA<sub>1c</sub> dopo l'introduzione di metformina + pioglitazone ( $p < 0.05$  vs basale), e ad un'ulteriore riduzione dopo l'aggiunta di sitagliptin ( $p < 0.001$  vs basale;  $p < 0.05$  vs metformina;  $p < 0.05$  vs metformina + pioglitazone) (Tabella 2).

Per quanto riguarda i livelli di FPG e PPG, si è osservata una prima riduzione già dopo l'introduzione della sola metformina ( $p < 0.05$  vs basale), con una successiva ulteriore discesa dopo l'introduzione di metformina + pioglitazone ( $p < 0.01$  vs basale), e dopo l'ulteriore aggiunta di sitagliptin ( $p < 0.001$  vs basale;  $p < 0.05$  vs metformina;  $p < 0.05$  vs metformina + pioglitazone) (Tabella 2).

I livelli di FPI e HOMA-IR si sono significativamente ridotti dopo l'aggiunta di metformina + pioglitazone ( $p < 0.01$  vs basale) e dopo l'introduzione di sitagliptin ( $p < 0.01$  vs basale per FPI e  $p < 0.001$  vs basale per HOMA-IR). Entrambi i valori si sono ridotti con la triplice terapia rispetto alla sola metformina ( $p < 0.05$  vs metformina).

#### *Profilo lipidico e Lp(a)*

Si è osservata una riduzione del valore di TC, HDL-C, LDL-C e Tg solo dopo l'introduzione di sitagliptin ( $p < 0.05$  vs basale), anche se non si sono registrate differenze significative rispetto alla monoterapia con metformina con l'eccezione di LDL-C ( $p < 0.05$  vs metformina) o con la duplice terapia con metformina + pioglitazone. Nessuna variazione della Lp(a), invece, è stata registrata (Tabella 3).

#### *Parametri infiammatori e di danno endoteliale*

Un aumento di ADN ed una riduzione di hs-CRP sono state osservate dopo l'introduzione di pioglitazone ( $p < 0.05$  vs basale) e dopo l'introduzione di sitagliptin ( $p < 0.01$  vs basale e  $p < 0.05$  vs metformina). C'è stata una riduzione di sICAM-1 e s-VCAM-1 rispetto al basale dopo l'aggiunta di pioglitazone ( $p < 0.05$ ) e dopo l'aggiunta di sitagliptin ( $p < 0.01$ ), ma non si sono osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi. Similarmente, c'è stata una riduzione del valore di sE-selectina dopo l'aggiunta di sitagliptin ( $p < 0.05$  vs basale). Non si sono osservate variazioni di MMP-2, e -9 durante lo studio (Tabella 4).

**Tabella 1:** variabili antropometriche durante lo studio.

<b>Parametri</b>	<b>Basale</b>	<b>Metformina</b>	<b>Metformina + Pioglitazone</b>	<b>Metformina + Pioglitazone + Sitagliptin</b>
N	66	66	64	64
Sesso (maschi/femmine)	31/35	31/35	31/33	31/33
Fumatori (maschi/femmine)	7/8	7/8	7/8	7/8
Età (anni)	55.8 ± 9.2	55.8 ± 9.2	55.8 ± 9.2	55.8 ± 9.2
Durata del diabete (mesi)	5.4 ± 2.1	5.4 ± 2.1	5.4 ± 2.1	5.4 ± 2.1
Peso (kg)	79.2 ± 5.2	77.8 ± 4.8	78.1 ± 4.9	77.2 ± 4.2
Altezza (m)	1.69 ± 0.07	1.69 ± 0.07	1.69 ± 0.07	1.69 ± 0.07
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.7 ± 2.3	27.2 ± 2.1	27.3 ± 2.2	27.0 ± 1.9
CV (cm)	93.4 ± 6.3	91.2 ± 6.0	91.4 ± 6.1	90.8 ± 5.7
CA (cm)	99.8 ± 7.8	96.5 ± 7.2	96.8 ± 7.5	94.2 ± 7.1
CF (cm)	103.2 ± 9.1	100.8 ± 8.7	101.2 ± 8.8	99.4 ± 8.5

I dati sono espressi come media ± deviazione standard

BMI: indice di massa corporea; CV: circonferenza vita; CA: circonferenza addome; CF: circonferenza fianchi.

**Tabella 2:** controllo glico-metabolico durante lo studio.

<b>Parametri</b>	<b>Basale</b>	<b>Metformina</b>	<b>Metformina + Pioglitazone</b>	<b>Metformina + Pioglitazone + Sitagliptin</b>
N	66	66	64	64
Sesso (maschi/femmine)	31/35	31/35	31/33	31/33
Fumatori (maschi/femmine)	7/8	7/8	7/8	7/8
FPG (mg/dl)	181.2 ± 16.4	170.3 ± 13.7*	152.8 ± 10.1**	135.8 ± 8.2 <sup>°^</sup> \$
PPG (mg/dl)	211.8 ± 30.7	188.7 ± 25.2*	164.5 ± 19.8**	153.7 ± 16.4 <sup>°^</sup> \$
HbA <sub>1c</sub> (%)	8.5 ± 0.9	8.2 ± 0.7	7.9 ± 0.4*	6.9 ± 0.3 <sup>°^</sup> \$
FPI (μU/ml)	14.5 ± 6.3	13.9 ± 6.1	10.8 ± 5.2**	10.6 ± 5.1 <sup>**^</sup>
HOMA-IR	6.5 ± 1.4	5.9 ± 1.1*	4.1 ± 0.8**	3.6 ± 0.5 <sup>°^</sup>

I dati sono espressi come media ± deviazione standard

\*p < 0.05 vs basale; \*\*p < 0.01 vs basale; °p < 0.001 vs basale; ^p < 0.05 vs metformina; \$p < 0.05 vs metformina + pioglitazone.

HbA<sub>1c</sub>: emoglobina glicata; FPG: glicemia a digiuno; PPG: glicemia post-prandiale; FPI: insulinemia basale; HOMA-IR: indice HOMA di resistenza all'insulina (HOMA-IR).

**Tabella 3:** profilo lipidico durante lo studio.

<b>Parametri</b>	<b>Basale</b>	<b>Metformina</b>	<b>Metformina + Pioglitazone</b>	<b>Metformina + Pioglitazone + Sitagliptin</b>
N	66	66	64	64
Sesso (maschi/femmine)	31/35	31/35	31/33	31/33
Fumatori (maschi/femmine)	7/8	7/8	7/8	7/8
TC (mg/dl)	197.3 ± 21.8	192.5 ± 20.3	182.7 ± 18.2*	180.4 ± 17.8*
LDL-C (mg/dl)	147.9 ± 20.4	142.9 ± 19.8	131.0 ± 18.5*	128.4 ± 18.1*^
HDL-C (mg/dl)	42.7 ± 8.3	43.2 ± 8.5	45.7 ± 9.1	46.2 ± 9.3*
Tg (mg/dl)	134.6 ± 46.2	127.3 ± 42.1	120.2 ± 38.5	115.7 ± 35.8*
Lp(a) (mg/dl)	14.8 ± 12.6	14.4 ± 12.3	14.2 ± 12.1	14.1 ± 11.9

I dati sono espressi come media ± deviazione standard

\*p < 0.05 vs basale; ^p < 0.05 vs metformina

TC: colesterolo totale; Tg: trigliceridi; HDL-C: colesterolo HDL; LDL-C: colesterolo LDL.

**Tabella 4:** parametri infiammatori e di danno endoteliale durante lo studio.

<b>Parametri</b>	<b>Basale</b>	<b>Metformina</b>	<b>Metformina + pioglitazone</b>	<b>Metformina + pioglitazone + sitagliptin</b>
N	66	66	64	64
Sesso (maschi/femmine)	31/35	31/35	31/33	31/33
Fumatori (maschi/femmine)	7/8	7/8	7/8	7/8
hs-CRP (mg/l)	2.1 ± 0.9	2.0 ± 0.8	1.8 ± 0.6*	1.5 ± 0.4***^
sICAM-1 (ng/ml)	214.7 ± 15.2	209.5 ± 14.8	183.4 ± 12.1*	161.3 ± 10.7**
sVCAM-1 (ng/ml)	645.6 ± 183.6	640.1 ± 179.4	622.6 ± 173.8*	597.4 ± 151.4**
sE-selectina (ng/ml)	38.1 ± 7.3	35.3 ± 7.0	33.7 ± 6.6	29.2 ± 6.1*
MMP-2 (ng/ml)	1198.8 ± 121.9	1192.5 ± 118.3	1183.6 ± 113.5	1186.1 ± 115.8
MMP-9 (ng/ml)	473.4 ± 54.6	469.2 ± 51.2	462.3 ± 48.7	454.7 ± 46.1
ADN (µg/ml)	4.4 ± 1.2	4.6 ± 1.3	5.0 ± 1.6*	5.8 ± 2.2***^

I dati sono espressi come media ± deviazione standard

\*p < 0.05 vs basale; \*\*p < 0.01 vs basale; ^p < 0.05 vs metformina

Hs-CRP: proteina C reattiva ad alta sensibilità; sICAM-1: molecola di adesione intercellulare-1; sVCAM-1: molecola di adesione cellulare vascolare-1; MMP-2: metalloproteinasi-2; MMP-9: metalloproteinasi-9; ADN: adiponectina.

### *Variabilità glicemica*

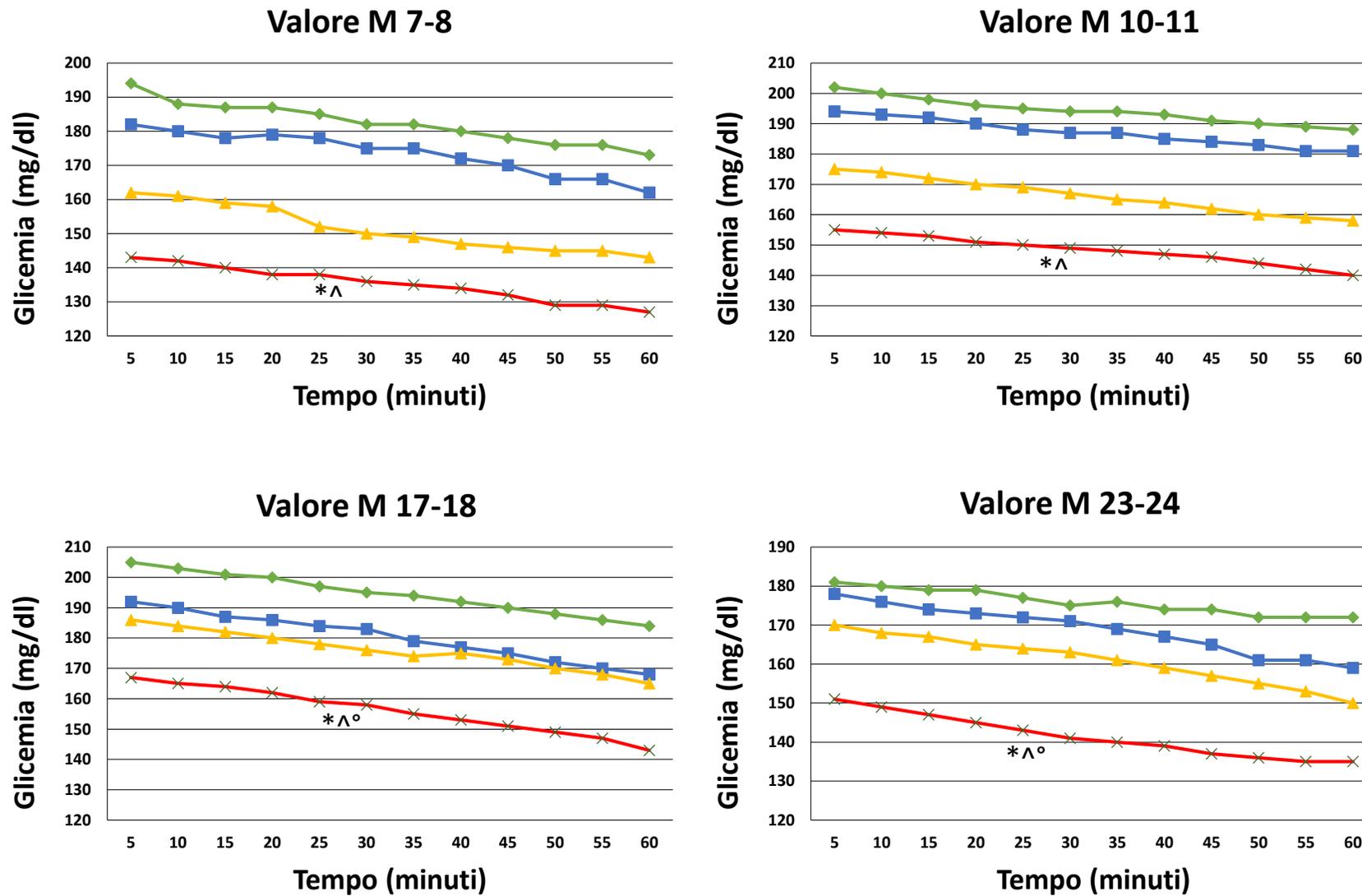
La variabilità glicemica giornaliera, espressa come valore M, è stata ridotta in maniera significativa solo dopo l'aggiunta di sitagliptin. In particolare, la figura 5 mostra il valore M del giorno 3 e del giorno 4, giorni in cui il monitoraggio glicemico risulta più affidabile. Il valore M, l'indice più utilizzato per esprimere la variabilità glicemica, ottenuto con l'aggiunta di sitagliptin è risultato inferiore rispetto a quello ottenuto con la sola metformina e con metformina + pioglitazone in particolare nelle fasce orarie 17-18 e 23-24. Conseguentemente, la deviazione standard e il valore MAGE sono risultati significativamente più bassi con la triplice terapia. Il valore di MODD è risultato inferiore con la triplice terapia rispetto alla sola monoterapia.

La minore variabilità glicemica non si è tradotta in un maggior numero di ipoglicemie, infatti, la percentuale di tempo passata in ipoglicemia non è risultato superiore con la triplice terapia metformina + pioglitazone + sitagliptin rispetto alla sola dieta, alla monoterapia con metformina o alla duplice terapia con metformina + pioglitazone (Figura 6).

### *Eventi avversi*

Durante lo studio non si sono verificati eventi avversi né reazioni avverse relative ai farmaci in studio, al posizionamento del sensore o al mantenimento in sede dello stesso.

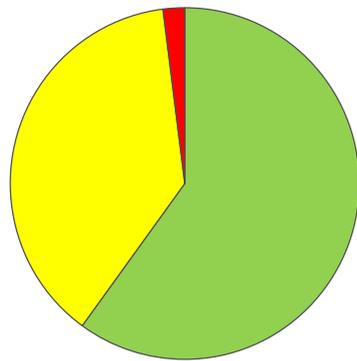
**Figura 5:** variabilità glicemica espressa come valore M nei vari gruppi



— : dieta; — : metformina; — : metformina + pioglitazone; — : metformina + pioglitazone + sitagliptin

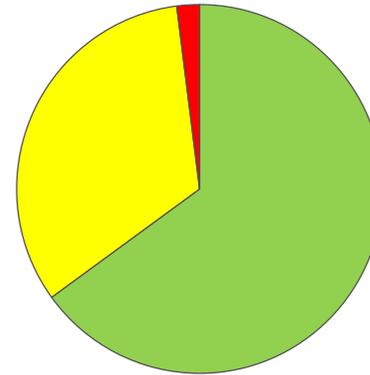
\* p < 0.05 vs basale; ^ p < 0.05 metformina; ° p < 0.05 metformina + pioglitazone

**Figura 6:** percentuale di tempo trascorso in vari stadi glicemici con i vari trattamenti



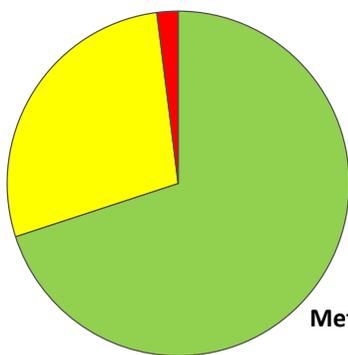
■ >70 mg/dl  
■ >180 mg/dl  
■ <70 mg/dl

**Dieta**



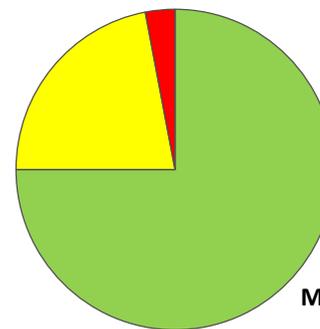
■ >70 mg/dl  
■ >180 mg/dl  
■ <70 mg/dl

**Metformina**



■ >70 mg/dl  
■ >180 mg/dl  
■ <70 mg/dl

**Metformina + Pioglitazone**



■ >70 mg/dl  
■ >180 mg/dl  
■ <70 mg/dl

**Metformina + Pioglitazone + Sitagliptin**

## Discussione

I risultati del nostro studio dimostrano che la triplice terapia, come ci si aspetterebbe, risulta più efficace rispetto alla monoterapia e alla duplice terapia nel ridurre il valore di HbA<sub>1c</sub>, in linea con quanto precedentemente riportato (48). Il dato più interessante, però, è sicuramente l'effetto della triplice terapia sulla variabilità glicemica. I dati, infatti, dimostrano che, solo dopo l'aggiunta di sitagliptin, si assiste ad una significativa riduzione della variabilità glicemica. Si potrebbe obiettare che l'effetto non sia dovuto a sitagliptin, ma ad un effetto tardivo di metformina o pioglitazone aggiunti in precedenza, tuttavia che sia sitagliptin a ridurre la variabilità glicemica è comprovato dal fatto che altri autori, in studi con disegni molto diversi tra loro, sono giunti alla medesima conclusione. Per esempio, Yuan et al. hanno dimostrato che l'aggiunta di sitagliptin alla terapia insulinica somministrata attraverso l'uso di microinfusore migliora la variabilità glicemica e conseguentemente gli eventi cardiovascolari rispetto alla sola terapia insulinica (74). Allo stesso modo Kim et al. (75) hanno riportato che sitagliptin, in aggiunta a metformina, ha mostrato un controllo glicemico migliore e anche una riduzione di MAGE rispetto a metformina in combinazione con glimepiride. I nostri dati, invece, contrastano, invece, anche se solo parzialmente, con quelli pubblicati da Shi et al.: questi autori hanno riportato che sitagliptin porta ad una riduzione della variabilità glicemica a digiuno, tuttavia, risulta meno efficace di voglibose nel ridurre le escursioni glicemiche post-prandiali (76). Questo è facilmente capibile se si considera che voglibose è un inibitore dell'alfa glucosidasi e caratteristica di questa famiglia di farmaci, come descritto in precedenza, è ridurre la glicemia post-prandiale (40). Dato interessante è che, nonostante la riduzione della variabilità glicemica, non si assiste ad un incremento del tempo passato in ipoglicemia: metformina, pioglitazone e sitagliptin, sembrano essere abbastanza sicuri da questo punto di vista. Questo aspetto non è da sottovalutare: l'ipoglicemia, infatti, specie se grave, può risultare molto pericolosa e portare ad uno stato confusionale che può progredire fino al coma e addirittura alla morte se non trattata adeguatamente (77). Avere una terapia che possa essere efficace nel ridurre il

compenso glicemico e la variabilità glicemica, senza aumentare il rischio di ipoglicemia è una garanzia, soprattutto nel paziente anziano, sicuramente più fragile e con maggiori rischi di frattura secondaria ad eventuali cadute rispetto ai soggetti giovani.

Per quanto riguarda i dati riguardanti gli effetti sui parametri infiammatori e di danno endoteliale, dati precedentemente pubblicati dimostrano che sICAM-1 e sVCAM-1 sono elevate nei pazienti diabetici e che sono più correlate allo stato di iperglicemia piuttosto che all'iperinsulinemia e all'insulino-resistenza, mentre la sE-selectina sembra essere correlata all'iperglicemia, all'iperinsulinemia e all'insulino-resistenza nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 (78). Questi dati sono stati confermati anche nei pazienti con patologia coronarica confermata tramite coronarografia (79), a riprova che elevati livelli di tali molecole aumentano il rischio cardiovascolare del soggetto. Nel nostro studio abbiamo osservato una riduzione di hs-CRP, sICAM-1, sVCAM-1, e sE-selectina ed un aumento di ADN nei pazienti a cui era stato aggiunto sitagliptin. Questo effetto anti-infiammatorio di sitagliptin può essere attribuito alla riduzione di HbA<sub>1c</sub>, ma, soprattutto, alla riduzione della variabilità glicemica. È stato dimostrato, infatti, che le fluttuazioni glicemiche, soprattutto quelle post-prandiali, piuttosto che un'iperglicemia cronica stabile, portano ad un aumento degli indici infiammatori e di danno endoteliale, incluse hs-CRP e molecole di adesione (80). La minore variabilità glicemica, infatti, crea un minore danno endoteliale.

Per quanto riguarda gli effetti neutrali della terapia in studio sui livelli di Lp(a), nell'ultimo decennio numerosi studi clinici hanno dimostrato una correlazione tra elevati livelli plasmatici di Lp(a) ed un'aumentata incidenza di patologie cardiovascolari (81). La Lp(a), inoltre, è una proteina di fase acuta la cui concentrazione aumenta in condizioni di flogosi (82). Il suo ruolo fisiopatologico durante il processo infiammatorio consiste nel trasporto in sede di danno tessutale del colesterolo. Quest'ultimo verrà quindi incorporato nella biogenesi delle membrane cellulari durante il processo riparativo (83). Il livello di Lp(a) costituisce fattore di rischio indipendente per l'aterosclerosi coronarica (84). La concentrazione di Lp(a), tuttavia, è primariamente controllata da fattori di tipo

genetico e si mantiene relativamente costante nel corso della vita (85), questo potrebbe giustificare il mancato effetto della terapia su tale parametro. Per quanto riguarda, infine, gli effetti sui livelli di metalloproteinasi (MMPs), le MMPs appartengono ad una famiglia di endopeptidasi che degradano, attraverso reazioni enzimatiche, la matrice extracellulare e, pertanto, influiscono sulle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, contribuendo alla modulazione della differenziazione, della maturazione, della migrazione e della sopravvivenza cellulare. Per questo motivo le MMPs potrebbero avere un ruolo come target per la terapia della malattia aterotrombotica cardiovascolare (86). Infatti, sono stati riscontrati elevati livelli circolanti di MMPs in pazienti con infarto miocardico acuto, angina instabile e sottoposti ad angioplastica coronarica (87). Inoltre è stato descritto un incremento della concentrazione delle MMPs in sede di aree di instabilità di placca a livello delle carotidi (88) e suggerito che la loro espressione potrebbe non solo essere correlata all'instabilità di placca ma anche alla formazione di eventi ristenotici. MMP-2 e MMP-9 sono note al nostro gruppo grazie ai risultati di una serie di lavori scientifici precedentemente pubblicati. Proprio questi evidenziano che i livelli di MMPs sono lievemente, ma significativamente, aumentati in diverse condizioni di elevato rischio cardiovascolare come l'ipertensione (89), il diabete mellito di tipo 2 (90), la sindrome metabolica e l'ipercolesterolemia familiare (91). Il nostro gruppo ha, inoltre, dimostrato che i livelli di MMP-9 rimangono significativamente elevati nei pazienti diabetici anche dopo tre mesi da un evento coronarico acuto e che nei soggetti obesi si riscontrano concentrazioni significativamente più elevate di MMP-2 e MMP-9 rispetto a gruppo di controlli sani, costituito da soggetti non obesi (92-95). Ci si potrebbe chiedere come mai la riduzione della variabilità glicemica indotta da sitagliptin non porti ad una riduzione anche dei livelli di MMP-2 e -9: la risposta potrebbe essere identificata nel breve periodo osservazionale dello studio: i pazienti sono stati monitorati per soli tre mesi dopo l'aggiunta di sitagliptin, questo breve periodo può aver fatto sì che non ci sia stato il tempo di verificare gli effetti di sitagliptin anche su questi parametri.

## **Conclusioni**

La combinazione di metformina + pioglitazone + sitagliptin sembra essere efficace non solo nel migliorare il controllo glicemico testimoniato da una progressiva riduzione del valore di HbA<sub>1c</sub>, ma anche, soprattutto, nel ridurre la variabilità glicemica e alcuni marcatori infiammatori e di danno endoteliale. Avere una terapia che possa essere efficace nel ridurre il compenso glicemico e la variabilità glicemica, senza aumentare il rischio di ipoglicemia è una garanzia, soprattutto nel paziente anziano, sicuramente più fragile e con maggiori rischi di frattura secondaria ad eventuali cadute rispetto ai soggetti giovani.

## **Bibliografia**

1. Weir GC, Leahy JL. Pathogenesis of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. In Joslin's diabetes mellitus. 13th edition. C.R. Kahn and G.E. Weir, editors. Lea & Febiger. Philadelphia, PA 1994; 240-264.
2. Bogardus C. Metabolic abnormalities in the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. In Diabetes mellitus. D. LeRoith, S.I. Taylor, and J.M. Olefski, editors. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, PA. 1996; pp 459.
3. DeFronzo RA. Lilly Lecture 1987. The triumvirate:  $\beta$ -cell, muscle, liver. A collision responsible for NIDDM. Diabetes. 1988; 37: 667-687.
4. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2016. Diabetes Care 2016; 39 (Suppl. 1): S1-S119.
5. Derosa G, Limas CP, Macías PC, Estrella A, Maffioli P. Dietary and nutraceutical approach to type 2 diabetes. Arch Med Sci 2014; 10(2): 336-344.
6. Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. JAMA 2002; 287: 360-372.
7. Doar JW, Thompson ME, Wilde CE, et al. Diet and oral antidiabetic drugs and plasma sugar and insulin levels in patients with maturity-onset diabetes mellitus. BMJ 1976; 1: 498-500.
8. Schade DS, Jovanovic L, Schneider J. A placebo-controlled, randomized study of glimepiride in patients with type 2 diabetes mellitus for whom diet therapy is unsuccessful. J Clin Pharmacol 1998; 38: 636-641.
9. Derosa G, Cicero AF, Gaddi A, et al. Metabolic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with diabetes and metabolic syndrome treated with glimepiride: a twelve-month, multicenter, double-blind, randomized, controlled, parallel-group trial. Clin Ther 2004; 26: 744-754.

10. Derosa G, Gaddi AV, Piccinni MN, et al. Differential effect of glimepiride and rosiglitazone on metabolic control of type 2 diabetic patients treated with metformin: a randomized, double-blind, clinical trial. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 197-205.
11. Derosa G, Maffioli P, Salvadeo SAT, et al. Exenatide versus glibenclamide in patients with diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2010; 12: 233-240.
12. Derosa G, Gaddi AV, Ciccarelli L, et al. Long-term effect of glimepiride and rosiglitazone on non-conventional cardiovascular risk factors in metformin-treated patients affected by metabolic syndrome: a randomized, double-blind clinical trial. *J Int Med Res* 2005; 33: 284-294.
13. Derosa G, Cicero AF, D'Angelo A, Gaddi A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Salvadeo SA, Pricolo F, Ferrari I, Gravina A, Ragonesi PD. Effects of 1 year of treatment with pioglitazone or rosiglitazone added to glimepiride on lipoprotein (a) and homocysteine concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: a multicenter, randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Clin Ther* 2006; 28: 679-688.
14. Derosa G, Cicero AF, Gaddi AV, Ciccarelli L, Piccinni MN, Salvadeo S, Pricolo F, Fogari E, Ghelfi M, Ferrari I, Fogari R. Long-term effects of glimepiride or rosiglitazone in combination with metformin on blood pressure control in type 2 diabetic patients affected by the metabolic syndrome: a 12-month, double-blind, randomized clinical trial. *Clin Ther* 2005; 27: 1383-1391.
15. Derosa G, Mugellini A, Ciccarelli L, Crescenzi G, Fogari R. Comparison between repaglinide and glimepiride in patients with type 2 diabetes mellitus: a one-year, randomized, double-blind assessment of metabolic parameters and cardiovascular risk factors. *Clin Ther* 2003; 25: 472-484.
16. Holstein A, Egberts EH. Risk of hypoglycaemia with oral antidiabetic agents in patients with Type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 7: 405-414.

17. Derosa G, D'Angelo A, Fogari E, Salvadeo S, Gravina A, Ferrari I, Cicero AFG. Nateglinide and glibenclamide metabolic effects in naive type 2 diabetic patients treated with metformin. *J Clin Pharm Ther* 2009; 34: 13-23.
18. Musi N, Hirshman NF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2074-2081.
19. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med* 1996; 334: 574-579.
20. Johansen K. Efficacy of metformin in the treatment of NIDDM: meta-analysis. *Diabetes Care* 1999; 22: 33-37.
21. Inzucchi SE, Maggs DG, Spolletti GR, Page SL, Rife FS, Walton V, Shulman GI. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1998; 338: 867-872.
22. DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 541-549.
23. Fontbonne A, Charles MA, Juhan-Vague I, Bard JM, André P, Isnard F, Cohen JM, Grandmottet P, Vague P, Safar ME, Eschwège E. The effect of metformin on the metabolic abnormalities associated with upper-body fat distribution: BIGPRO Study Group. *Diabetes Care* 1996; 19: 920-926.
24. Derosa G, Gaddi AV, Piccinni MN, Ciccarelli L, Salvadeo S, Peros E, Ghelfi M, Ferrari I, Cicero AF. Antithrombotic effects of rosiglitazone-metformin versus glimepiride-metformin combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Pharmacotherapy* 2005; 25: 637-645.
25. Mather KJ, Verma S, Anderson TJ. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1344-1350.

26. Derosa G, Maffioli P, Salvadeo SAT, Ferrari I, Gravina A, Mereu R, Palumbo I, D'Angelo A, Cicero AF. Direct comparison among oral hypoglycemic agents and their association with insulin resistance evaluated by euglycemic hyperinsulinemic clamp: the 60's study. *Metabolism* 2009; 58: 1059-1066.
27. Mudaliar S, Henry RR. New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: the glitazones or insulin sensitizers. *Annu Rev Med* 2001; 52: 239-257.
28. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2000; 106: 1221-1228.
29. Bulcão C, Ferreira SR, Giuffrida FM, et al. The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2: 19-28.
30. Marx N, Sukhova G, Murphy C, et al. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 1998; 153: 17-23.
31. Derosa G, Mereu R, D'Angelo A, et al. Effect of pioglitazone and acarbose on endothelial inflammation biomarkers during oral glucose tolerance test in diabetic patients treated with sulphonylureas and metformin. *J Clin Pharm Ther* 2010; 35: 565-579.
32. Derosa G, D'Angelo A, Ragonesi PD, et al. Effects of rosiglitazone and pioglitazone combined with metformin on prothrombotic state of patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome and metabolic syndrome. *J Int Res* 2006; 34: 545-555.
33. Garber AJ, Duncan TG, Goodman AM, et al. Efficacy of metformin in type II diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled, dose-response trial. *Am J Med* 1997; 103: 491-497.
34. Hoffmann J, Spengler M. Efficacy of 24-week monotherapy with acarbose, metformin, or placebo in dietary-treated NIDDM patients: the Essen-II Study. *Am J Med* 1997; 103: 483-490.

35. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, et al. Response of pancreatic beta-cells to improved insulin sensitivity in women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 782-788.
36. Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, et al. Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats: rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 2001; 50: 1021-1029.
37. Lebovitz HE, Dole JF, Patwardhan R, et al. The Rosiglitazone Clinical Trials Study Group: rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 280-288.
38. Derosa G, Cicero AF, D'Angelo A, et al. Thiazolidinedione effects on blood pressure in diabetic patients with metabolic syndrome treated with glimepiride. *Hypertens Res* 2005; 28: 917-924.
39. Derosa G, Fogari E, Cicero AF, et al. Blood pressure control and inflammatory markers in type 2 diabetic patients treated with pioglitazone or rosiglitazone and metformin. *Hypertens Res* 2007; 30: 387-394.
40. Derosa G, Maffioli P.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 2012; 8(5): 899-906.
41. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, et al. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987; 2: 1300-1304.
42. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, et al. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50: 609-613.
43. Bergman AJ, Stevens C, Zhou Y, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers. *Clin Ther* 2006; 28: 55-72.
44. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Zinman B; EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016; 375(4): 323-334.

45. Derosa G, Maffioli P. GLP-1 agonists exenatide and liraglutide: a review about their safety and efficacy. *Curr Clin Pharmacol* 2012; 7(3): 214-228.
46. Ceriello A, Kilpatrick ES. Glycemic variability: both sides of the story. *Diabetes Care* 2013; 36(2): S272-275.
47. Derosa G, Salvadeo SA, Mereu R, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Ferrari I, Gravina A, Maffioli P, Tinelli C. Continuous glucose monitoring system in free-living healthy subjects: results from a pilot study. *Diabetes Technol Ther* 2009; 11(3):159-169.
48. Derosa G, Cicero AF, Franzetti IG, Querci F, Carbone A, Piccinni MN, D'Angelo A, Fogari E, Maffioli P. A comparison between sitagliptin or glibenclamide in addition to metformin + pioglitazone on glycaemic control and  $\beta$ -cell function: the triple oral therapy. *Diabet Med* 2013; 30(7): 846-854.
49. Rydén L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ, Cosentino F, Jönsson B, Laakso M, Malmberg K, Priori S, Ostergren J, Tuomilehto J, Thrainsdottir I, Vanhorebeek I, Stramba-Badiale M, Lindgren P, Qiao Q, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm J, Dean V, Deckers J, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo J, Zamorano JL, Deckers JW, Bertrand M, Charbonnel B, Erdmann E, Ferrannini E, Flyvbjerg A, Gohlke H, Juanatey JR, Graham I, Monteiro PF, Parhofer K, Pyörälä K, Raz I, Schernthaner G, Volpe M, Wood D; Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for the Study of Diabetes (EASD). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2007; 28(1): 88-136.
50. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L,

- Winston M, Wylie-Rosett J. Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2186-2191.
51. Molnar GD, Taylor WF, Ho MM. Day-to-day variation of continuously monitored glycaemia: a further measure of diabetic instability. *Diabetologia* 1972; 8: 342-348.
52. Service FJ, Molnar GD, Rosevear JW, Ackerman E, Gatewood LC, Taylor WF. Mean amplitude of glycemic excursions, a measure of diabetic instability. *Diabetes* 1970; 19: 644-655.
53. Zhou J, Li H, Ran X, Yang W, Li Q, Peng Y, Li Y, Gao X, Luan X, Wang W, Jia W. Establishment of normal reference ranges for glycemic variability in Chinese subjects using continuous glucose monitoring. *Med Sci Monit* 2011; 17: CR9-13.
54. Schlichtkrull J, Munck O, Jersild M. The M-value, an index of blood sugar control in diabetics. *Acta Med Scand* 1965; 177: 95-102.
55. Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM. The glycosylation of haemoglobin. Relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978; 200: 21-27.
56. European Diabetes Policy Group. A desktop guide to type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 716-730.
57. Heding LG. Determination of total serum insulin (IRI) in insulin-treated diabetic patients. *Diabetologia* 1972; 8: 260-266.
58. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.
59. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487-1495.
60. Klose S, Borner K. Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins mit dem [Enzymatic dosage of total cholesterolemia by Greiner Selective Analyzer (GSA II)]. *J Clin Chem Clin Biochem* 1978; 15: 121-130.

61. Wahlefeld AW. Triglycerides determination after enzymatic hydrolysis. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2<sup>nd</sup> English ed. New York: Academic Press; 1974. p. 18-31.
62. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-1353.
63. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
64. Scanu AM, Scandian L. Lipoprotein (a): structure, biology and clinical relevance. *Adv Intern Med* 1991; 36: 249-70.
65. Uterman G, Weber W. Protein composition of lipoprotein (a). *J Clin Invest* 1987; 80: 458-465.
66. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Med* 2001; 7: 941-946.
67. Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15: 91-98.
68. Peter K, Weirich U, Nordt TK, Ruef J, Bode C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1999; 82: 38-43.
69. Fujimoto N, Mouri N, Iwata K, Ohuchi E, Okada Y, Hayakawa T. A onestep sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 2 118 (72-kDa gelatinase/type IV collagenase) using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1993; 221: 91-103.
70. Fujimoto N, Hosokawa N, Iwata K, Shinya T, Okada Y, Hayakawa T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for inactive precursor and complexed forms of human matrix

metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase, gelatinase B) using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1994; 231: 79-88.

71. Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clinical Chemistry* 1999; 45(12): 2136-2141.
72. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006; 36: 33-47.
73. Winer BJ. *Statistical Principles in Experimental Design*. 2<sup>nd</sup> ed, McGraw-Hill, New York 1971.
74. Yuan G, Hu H, Wang S, Yang Q, Yu S, Sun W, Qian W, Mao C, Zhou L, Chen D, Wang Z, Gong Q, Wang D. Improvement of  $\beta$ -cell function ameliorated glycemic variability in patients with newly diagnosed type 2 diabetes after short-term continuous subcutaneous insulin infusion or in combination with sitagliptin treatment: a randomized control trial. *Endocr J* 2015; 62(9): 817-834.
75. Kim HS, Shin JA, Lee SH, Kim ES, Cho JH, Son HY, Yoon KH. A comparative study of the effects of a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor and sulfonylurea on glucose variability in patients with type 2 diabetes with inadequate glycemic control on metformin. *Diabetes Technol Ther* 2013; 15(10): 810-816.
76. Shi CH1, Wang L, Bai R, Wang YB, Liu D, Zhang XY, Wang H, Yang Y, Du JL. Comparison of therapeutic effects between sitagliptin and voglibose both combined with sensor-augmented insulin pump in newly diagnosed type 2 diabetes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2016; 96(32): 2554-2558.
77. Maffioli P, Derosa G. Hypoglycemia, its implications in clinical practice, and possible ways to prevent it. *Curr Med Res Opin* 2014; 30(5): 771-773.
78. Blüher M, Unger R, Rassoul F, Richter V, Paschke R. Relation between glycaemic control, hyperinsulinaemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or Type II diabetes. *Diabetologia* 2002; 45: 210-216.

79. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 1996; 45: 954-959.
80. Derosa G, D'Angelo A, Salvadeo SA, Ferrari I, Fogari E, Gravina A, Mereu R, Palumbo I, Maffioli P, Randazzo S, Cicero AF. Oral glucose tolerance test effects on endothelial inflammation markers in healthy subjects and diabetic patients. *Horm Metab Res* 2010; 42(1): 8-13.
81. Marcovina SM, Zhang ZH, Gaur VP, Albers JJ. Identification of 34 apolipoprotein(a) isoforms: differential expression of apolipoprotein(a) alleles between American blacks and whites. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191:1192-1196.
82. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic bases of inherited disease*, 7<sup>th</sup> ed. 1995.
83. Kumar V, Abbas AB, Fausto N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* 7<sup>th</sup> edition 2005.
84. Bays H, Dujovne CA, Mays JB. Elevated lipoprotein (a) blood levels as the single treatable atherosclerotic risk factor in patients with coronary artery disease. *J Ky Med Assoc* 1993; 91: 498-500.
85. Fless GM, Snyder ML, Furbee JW Jr, Garcia-Hedo MT, Mora R. Subunit composition of lipoprotein(a) protein. *Biochemistry* 1994; 33: 13492-13501.
86. Sieravogel MJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Strauss BH. Matrix metalloproteinases: a therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9(13): 1033-1040.
87. Ikeda U, Shimada K. Matrix metalloproteinases and coronary artery diseases. *Clin Cardiol* 2003; 26: 55-59.
88. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E. Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2003; 169: 139-146.

89. Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo SA, Montagna L, Gravina A, Ferrari I, Galli S, Paniga S, Tinelli C, Cicero AF. Matrix Metalloproteinase-2, -9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothelium* 2007; 13: 227-231.
90. Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R, Penno G, Del Prato S, Paniga S, Cicero AF. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab* 2007; 33(2): 129-134.
91. Cicero AF, Derosa G, Manca M, Bove M, Borghi C, Gaddi AV. Vascular remodeling and prothrombotic markers in subjects affected by familial combined hyperlipidemia and/or metabolic syndrome in primary prevention for cardiovascular disease. *Endothelium* 2007; 14: 193-198.
92. Derosa G, D'Angelo A, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Peros E, Fogari E, Cicero AF. Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 2007; 22: 361-370.
93. Derosa G, Cicero AF, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Peros E, Fogari E, D'Angelo A. Metalloproteinases in diabetics and nondiabetics during acute coronary syndromes and after 3 months. *Endothelium* 2007; 14: 175-183.
94. Derosa G, Cicero AF, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Piccinni MN, Peros E, Geroldi D, Fogari E, D'Angelo A. Metalloproteinase-2 and -9 in diabetic and nondiabetic subjects during acute coronary syndromes. *Endothelium* 2007; 14: 45-51.
95. Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo SA, Ciccarelli L, Piccinini MN, Gravina A, Ramondetti F, Maffioli P, Cicero AF. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothelium* 2008; 15(4): 219-224.