



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di medicina – DIMED

Direttore: Prof. Roberto Vettor

U.O.C. di Malattie del Metabolismo

Direttore: Prof. Angelo Avogaro

TESI DI LAUREA

**METRICHE GLICEMICHE DA MONITORAGGIO IN CONTINUO  
DELLA GLICEMIA E SKIN AUTOFLUORESCENCE NEL PAZIENTE  
CON DIABETE MELLITO TIPO 1**

Relatore: Prof. Alberto Maran

Laureanda: Chiara Campagner

Matricola: 1128298

Anno Accademico 2021/2022



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	5
<b>GENERALITÀ E CLASSIFICAZIONE</b> .....	5
<b>IL DIABETE MELLITO DI TIPO 1</b> .....	6
<b>1.1 Epidemiologia</b> .....	6
<b>1.2 Eziopatogenesi</b> .....	8
1.2.1 Fattori genetici .....	9
1.2.2 Fattori ambientali.....	11
1.2.3 Fattori autoimmunitari .....	11
<b>1.3 Quadro clinico</b> .....	15
<b>1.4 Diagnosi</b> .....	16
<b>1.5 Meccanismi di danno da iperglicemia</b> .....	17
<b>1.6 Complicanze croniche</b> .....	24
1.6.1 Complicanze microvascolari.....	24
1.6.1.1 Retinopatia diabetica .....	24
1.6.1.2 Nefropatia diabetica.....	26
1.6.1.3 Neuropatia diabetica .....	27
1.6.2 Complicanze macrovascolari.....	29
1.6.3 Altre complicanze .....	30
<b>1.7 Terapia</b> .....	31
1.7.1 Modifica dello stile di vita .....	32
1.7.2 Terapia insulinica.....	32
<b>1.8 Valutazione del controllo glicemico</b> .....	35
1.8.1 Emoglobina glicata (HbA1c).....	36
1.8.2 Automonitoraggio della glicemia capillare (Self-BGM) .....	39
1.8.3 Monitoraggio della glicemia interstiziale (CGM e FGM) .....	39
<b>1.9 Variabilità glicemica</b> .....	44
<b>1.10 Advanced Glycation End-products (AGEs)</b> .....	48

1.11 <i>Skin Autofluorescence (SAF)</i> .....	52
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	57
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	59
<b>3.1 Selezione della popolazione coinvolta nello studio</b> .....	59
3.1.1 Criteri di inclusione .....	59
3.1.2 Criteri di esclusione.....	59
<b>3.2 Creazione del database</b> .....	60
<b>3.3 Analisi statistica</b> .....	63
<b>4. RISULTATI</b> .....	65
<b>4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione</b> .....	65
<b>4.2 Metriche glicemiche</b> .....	67
<b>4.3 <i>Glucose Management Indicator (GMI)</i></b> .....	67
<b>4.4 Glicatori rapidi</b> .....	69
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	75
<b>6. CONCLUSIONI</b> .....	83
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	85

## RIASSUNTO

**Presupposti dello studio.** Nella pratica clinica esistono pazienti con diabete mellito di tipo 1 che presentano una discrepanza tra la media glicemica espressa dall'HbA1c, manifestazione dell'esposizione a elevate concentrazioni di glucosio nel sangue nei precedenti tre mesi, e la media glicemica ricavata dalle metriche dei sistemi di monitoraggio glicemico tradizionale o in continuo. Tale discrepanza può avere un impatto sullo sviluppo delle complicanze croniche correlate al diabete, che sono responsabili della maggior parte delle morbidità e mortalità associate alla patologia e che sono dovute almeno in parte all'aumento della produzione e del deposito tissutale dei prodotti di glicazione avanzata (AGEs).

**Scopo dello studio.** Valutare in una popolazione di pazienti con diabete mellito di tipo 1, la concordanza tra le metriche glicemiche ottenibili mediante l'utilizzo del sistema di monitoraggio in continuo *Flash Glucose Monitoring* (FGM), il controllo metabolico espresso dall'HbA1c e la presenza di prodotti di glicazione avanzata a livello cutaneo, tramite rilevazione diretta della *Skin Autofluorescence* (SAF).

**Materiale e metodi.** Sono stati identificati 135 pazienti adulti con diagnosi di diabete mellito di tipo 1 e utilizzo continuativo del monitoraggio glicemico interstiziale di tipo FGM, afferenti al Servizio di Diabetologia dell'UOC Malattie del Metabolismo dell'Azienda Ospedaliera - Università di Padova nel periodo compreso tra giugno 2020 e ottobre 2021. Durante la visita ambulatoriale di controllo, in tutti i soggetti venivano annotati i dati anagrafici e anamnestici, la presenza o meno di comorbidità, i fattori di rischio, il controllo glicemico, la misura della *Skin Autofluorescence*, le complicanze associate al diabete e la terapia in atto. Tutti i dati si riferivano alla condizione clinica dei soggetti nei tre mesi antecedenti la visita.

**Risultati.** In base ai risultati ottenuti dallo scarico dei dati del sensore (Freestyle Libre®) relativi ai 3 mesi antecedenti la visita, a partire dalla glicemia media nel periodo veniva determinato per ogni singolo paziente l'indicatore GMI (*Glucose Management Indicator*); questo ha consentito di calcolare il rapporto GMI/HbA1c e di suddividere i pazienti in due gruppi distinti, selezionando come cut-off un

rapporto  $< 0,9$ . Sono stati identificati pertanto 30 soggetti, definiti *glicatori rapidi*, che presentavano una discrepanza tra i valori di HbA1c misurati dal laboratorio e quelli espressi dal GMI. Questo gruppo era costituito per il 53% da pazienti di sesso maschile con un'età media significativamente superiore rispetto a quella del gruppo di controllo [50.3 (14) vs 42.7 (13.7) anni,  $p=0.008$ ], costituito dai restanti 100 pazienti, che presentavano invece concordanza tra la glicemia media calcolata dal sensore e quella stimata dall'HbA1c. Nei *glicatori rapidi* erano presenti differenze statisticamente significative nei valori medi di HbA1c misurati in laboratorio [8.6 (1.2) vs 7.5 (0.9) %,  $p=0.0001$ ], ma non nelle metriche glicemiche misurate dal sensore. Questo gruppo di soggetti presentava, inoltre, valori di SAF significativamente aumentati [2.5 (0.6) vs 2.1 (0.5) AU,  $p=0.005$ ], una maggior frequenza di dislipidemia [73 vs 44 %,  $p=0.005$ ] e assunzione di statina [21.7 vs 17.1 %,  $p=0.022$ ], di eventi cardiovascolari [17 vs 1.7 %,  $p=0.001$ ], di albuminuria [25 vs 7 %,  $p=0.038$ ], di retinopatia [61.0 vs 38.0 %,  $p=0.022$ ] e di macroangiopatia [38 vs 9 %,  $p=0.001$ ]. L'analisi di regressione ha rilevato come l'età, l'appartenenza al gruppo dei *glicatori rapidi* e la dislipidemia risultavano associate in maniera altamente significativa e indipendente alla macroangiopatia.

**Conclusioni.** Nel nostro studio i pazienti con diabete mellito di tipo 1 che mostrano una significativa discordanza tra i valori di HbA1c e le metriche ottenute mediante il monitoraggio glicemico in continuo con FGM ed espresse tramite GMI, rappresentano un caratteristico fenotipo di *rapido glicatore* a elevato rischio di danno vascolare cronico, che si manifesta con malattia cardiovascolare e macroangiopatia. La misura della *Skin Autofluorescence* come marker predittivo è utile come parametro aggiuntivo, al fine di individuare i pazienti a maggior rischio di sviluppare complicanze macrovascolari e di predisporre opportune misure di ottimizzazione terapeutica per ridurre la mortalità.

## ABSTRACT

**Background.** In clinical practice there are type 1 diabetic patients with discrepancy between the average blood glucose expressed by A1c, that expresses the exposition to hyperglycemia in the previous three months, and the one determined from the glycemic metrics available by using traditional or continuous glucose monitoring systems. This difference may have an impact on the development of chronic diabetes-related complications, which are responsible for most of morbidity and mortality associated with the disease and are partly due to the increased production and tissue deposition of advanced glycation end-products (AGEs).

**Aims.** The aim of this study was to assess in a population of patients with type 1 diabetes mellitus, the concordance between the glycemic metrics available by using *Flash Glucose Monitoring* (FGM), the metabolic control expressed by A1c and the presence of advanced glycation end-products on skin, through direct assessment of *Skin Autofluorescence* (SAF).

**Methods.** 135 adult patients with diagnosis of type 1 diabetes mellitus and use of FGM regularly followed up at the Diabetology Unit of the University of Padua Hospital have been identified between June 2020 and October 2021. During the clinical visit, in all subjects the personal and anamnestic data, the presence or absence of comorbidities, the risk factors, the glycemic control, the measurement of Skin Autofluorescence, the complications associated with diabetes and the therapy were collected. All those data referred to the clinical condition of the subjects in the three months prior to the visit.

**Results.** Based on the results obtained from downloading sensor data (Freestyle Libre®) relating to the three months prior to the visit, the Glucose Management Indicator (GMI) was determined for each patient, starting from the mean blood glucose levels recorded; this made it possible to calculate the GMI/HbA1c ratio and to identify two different groups of patients, selecting a ratio <0.9 as the cut-off.

Therefore, 30 subjects were identified, defined as *rapid glycaters*, who presented a discrepancy between the values of HbA1c laboratory measured and those expressed by GMI. This group consisted of 53% male patients with a mean age significantly higher compared to the control group [50.3 (14) vs 42.7 (13.7) years,  $p = 0.008$ ], consisting of the remaining 100 patients, which instead showed concordance between the mean blood glucose calculated by the sensor and the one estimated by HbA1c. In *rapid glycaters* there were statistically significant differences in mean laboratory measured HbA1c values [8.6 (1.2) vs 7.5 (0.9)%,  $p = 0.0001$ ], but not in sensor measured glucose metrics. This group of subjects also presented significantly increased SAF values [2.5 (0.6) vs 2.1 (0.5) AU,  $p = 0.005$ ], a higher frequency of dyslipidemia [73 vs 44%,  $p = 0.005$ ] and statin intake [21.7 vs 17.1%,  $p = 0.022$ ], cardiovascular events [17 vs 1.7%,  $p = 0.001$ ], albuminuria [25 vs 7],  $p = 0.038$ ], retinopathy [61.0 vs 38.0,  $p = 0.022$ ] and macroangiopathy [38 vs 9,  $p = 0.001$ ]. Regression analysis found that age, belonging to the group of *rapid glycaters* and dyslipidemia were significantly and independently associated with macroangiopathy.

**Conclusions.** In our study, patients with type 1 diabetes mellitus who show a significant discrepancy between the HbA1c values and the metrics obtained by FGM and expressed by GMI, represent a characteristic *rapid glyicator* phenotype with high risk of developing chronic vascular disease, such as cardiovascular disease and macroangiopathy. The assessment of SAF as a predictive marker is useful as an additional parameter and allows to identify patients with increased risk of developing macrovascular complications and to arrange appropriate therapeutic measures to reduce their mortality.

# 1. INTRODUZIONE

## GENERALITÀ E CLASSIFICAZIONE

Il diabete mellito comprende un gruppo di disturbi metabolici ad eziologia multipla, caratterizzati da iperglicemia cronica secondaria a un difetto di produzione o di azione periferica dell'insulina. Tale condizione determina variazioni nel metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine e predispone al danno d'organo, con interessamento prevalente di occhi, reni, sistema cardiovascolare e sistema nervoso centrale e periferico.

Da un punto di vista eziologico, il diabete mellito si classifica in [1]:

- Diabete mellito di tipo 1, caratterizzato dalla distruzione delle cellule  $\beta$  su base autoimmune o idiopatica, con conseguente carenza assoluta di insulina; comprende la variante LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*) che ha decorso lento e compare nell'adulto.
- Diabete mellito di tipo 2, causato dalla progressiva riduzione della secrezione insulinica da parte delle cellule  $\beta$ , in un contesto di insulino-resistenza più o meno severa su base multifattoriale;
- Diabete gestazionale, diagnosticato nel secondo o terzo trimestre di gravidanza e non manifesto misconosciuto prima della gestazione;
- Altri tipi di diabete specifici legati a [2]:
  - difetti genetici della funzione  $\beta$ -cellulare - MODY, diabete neonatale, mutazione del DNA mitocondriale;
  - difetti genetici dell'azione insulinica - insulino-resistenza di tipo A, leprecaunismo, sindrome di Rabson-Mendenhall, sindromi lipodistrofiche;
  - malattie del pancreas esocrino - pancreatiti, pancreatectomie, neoplasie, fibrosi cistica, emocromatosi;
  - endocrinopatie - acromegalia, sindrome di Cushing, feocromocitoma, glucagonoma, ipertiroidismo;
  - assunzione di farmaci o sostanze tossiche - glucocorticoidi, altri agenti immunosoppressori post-trapianto, tiazidici, diazossido, farmaci per il trattamento dell'HIV/AIDS;
  - infezioni - rosolia congenita, citomegalovirus, coxsackie;

- forme rare di diabete immunomediato – anticorpi anti-recettore dell'insulina, sindrome “dell'uomo rigido”;
- sindromi genetiche rare associate al diabete - Down, Klinefelter, Turner, Wolfram, atassia di Friedreich.

## **IL DIABETE MELLITO DI TIPO 1**

Il diabete di tipo 1, precedentemente denominato “diabete insulino-dipendente” o “diabete ad esordio giovanile”, riguarda il 5-10% del totale dei diabetici. È dovuto alla progressiva distruzione delle cellule  $\beta$  pancreatiche e viene ulteriormente suddiviso in sottotipo 1A se il deficit insulinico presenta genesi autoimmune e sottotipo 1B idiopatico quando non vi è positività per i classici marcatori immunologici. In generale, solo pochi pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 vengono classificati in quest'ultima categoria: molti di questi sono di origine afroamericana o asiatica e sembrano essere maggiormente predisposti allo sviluppo di chetoacidosi diabetica [3].

### **1.1 Epidemiologia**

Il diabete mellito rappresenta una delle patologie a maggior impatto socio-sanitario a livello mondiale, vista la crescita inarrestabile registrata negli ultimi decenni. Attualmente, i diabetici nel mondo sono più di 500 milioni (Figura 1), ma le stime prevedono il raggiungimento dei 700 milioni entro il 2045, motivo per cui la lotta al diabete figura, assieme alla tubercolosi e alla malaria, come una delle emergenze sanitarie identificate dall'Organizzazione delle Nazioni Unite (ONU) e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS/WHO) [4].



*Figura 1: Popolazione con diabete suddivisa per regione.  
International Diabetes Federation, 2021.*

All'interno di questo pattern generale di crescita anche il diabete di tipo 1 ha subito un aumento di prevalenza e incidenza in tutto il mondo, sebbene in maniera meno rilevante in termini assoluti rispetto a quanto accaduto con il diabete di tipo 2. Nel dettaglio, recenti metanalisi suggeriscono una prevalenza mondiale ed europea rispettivamente di circa 9,5 e 12,2 per 10.000 abitanti [5]. In Europa è stato riscontrato un andamento crescente Sud-Nord, con incremento della prevalenza man mano che ci si sposta dal bacino mediterraneo verso i paesi nordici. Esiste infatti una notevole variabilità di incidenza a seconda dell'area geografica di provenienza, che si manifesta anche su scala mondiale. In Scandinavia, per esempio, l'incidenza si aggira attorno ai 35 casi annui ogni 100.000 abitanti e risulta nettamente superiore a quanto si registra in Cina e Giappone, paesi in cui l'incidenza è di circa 1-3 casi ogni 100.000 abitanti. Si ritiene che l'aumento del rischio di diabete di tipo 1 rifletta la frequenza di specifici alleli HLA ad alto rischio tra i vari gruppi etnici delle differenti aree geografiche [6].

Oltre all'aspetto geografico e al genotipo, tra i determinanti del rischio e della prevalenza della patologia vanno considerati anche l'età e il sesso. In particolare, il diabete mellito di tipo 1 rappresenta il principale tipo di diabete giovanile, costituendo più dell'85% di tutti i casi di diabete nei giovani con meno di 20 anni nel mondo [7,8].

L'andamento è crescente dalla nascita e presenta picchi in età puberale tra i 10 e i 14 anni che tendono a stabilizzarsi nella prima età adulta, dove l'incidenza è inferiore nonostante un quarto delle persone riceva una diagnosi di diabete solo dopo i 30 anni (si parla in questi casi di LADA, *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*).

Per quanto riguarda il genere, pur trattandosi nella maggior parte dei casi di una patologia a genesi autoimmune, in media i due sessi risultano ugualmente colpiti tra i giovani [9]. In ogni caso sembra che le popolazioni con elevata incidenza, come quelle europee, presentino una maggiore prevalenza di pazienti di sesso maschile a differenza di quanto accade in quelli con incidenza minore.

L'incidenza di diabete mellito di tipo 1 nel panorama italiano rispecchia l'andamento europeo: il tasso di incidenza nei bambini con età compresa tra 0 e 4 anni si aggira intorno ai 13 casi annui ogni 100.000 abitanti e vi è una leggera prevalenza maschile [10]. In generale, sia per quanto concerne il diabete di tipo 1 che quello di tipo 2, le regioni meridionali e insulari (in particolar modo la Sardegna) risultano nettamente più colpite dalla patologia rispetto a quelle del centro e nord del paese.

## 1.2 Eziopatogenesi

Il diabete mellito di tipo 1 è il risultato del sinergismo di fattori genetici, ambientali e immunologici, che determinano la distruzione delle cellule  $\beta$  pancreatiche.

Lo sviluppo della malattia da un punto di vista temporale richiede l'instaurarsi di un processo di distruzione autoimmune, innescato da un *trigger* esterno e sostenuto da una specifica molecola della cellula  $\beta$ , che si propaga con velocità variabile per mesi o anni in individui con suscettibilità genetica. Nella maggior parte dei casi, i marker immunologici compaiono dopo l'evento scatenante, ma prima che il diabete si manifesti clinicamente. Ne consegue una progressiva diminuzione del numero di cellule secernenti insulina, con comparsa di sintomi franchi per perdita della tolleranza glucidica quando circa l'80% di queste viene distrutta.

Spesso a fungere da *trigger* sono condizioni che richiedono un aumento delle richieste di insulina, come le infezioni o l'instaurarsi della pubertà.

A seguito dell'iniziale presentazione clinica del diabete di tipo 1A può instaurarsi una fase di "luna di miele", durante la quale risultano sufficienti poche dosi di insulina per un buon controllo glicemico (talvolta nessuna). Tuttavia, questo temporaneo compenso da parte delle cellule  $\beta$  è destinato a esaurirsi fino alla completa distruzione cellulare e alla totale carenza ormonale (Figura 2).

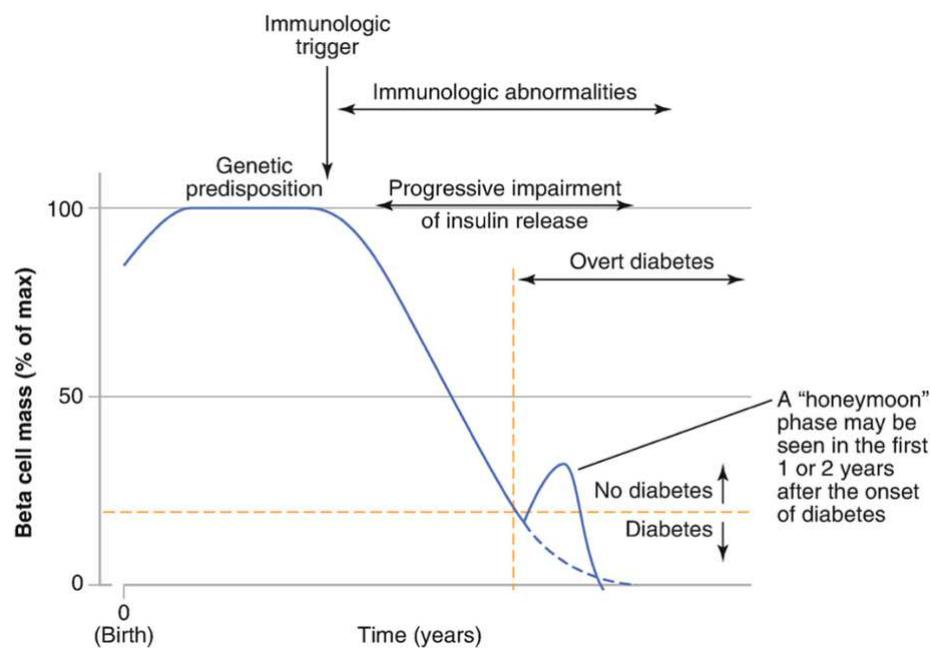


Figura 2: Modello temporale dello sviluppo del diabete mellito di tipo 1.  
Wondisford FE: *Diabetes Types and Diagnosis*. Springer 2020.

### 1.2.1 Fattori genetici

Nella storia naturale della malattia gioca un ruolo importante il genotipo. Vari studi americani ormai datati hanno dimostrato che gli individui con un parente di primo grado affetto da diabete mellito di tipo 1 hanno un rischio di 1 su 20 di sviluppare la stessa patologia rispetto alla popolazione generale, che presenta un rischio di 1 su 300. Oltre a questo aspetto, è interessante sottolineare come i gemelli monozigoti presentino un tasso di concordanza  $> 60\%$ , mentre i dizigoti un tasso che va dal 6% al 10% [11].

Inoltre, i fratelli di bambini con insorgenza di diabete prima dei 5 anni hanno un rischio cumulativo di sviluppare la patologia entro i 20 anni di 3-5 volte superiore rispetto ai fratelli di bambini con diagnosi tra i 5 e i 15 anni [12], a testimonianza dell'importanza del ruolo dei fattori genetici come *markers* di alto rischio.

Il gene principale alla base della suscettibilità allo sviluppo della patologia è localizzato nella regione HLA del cromosoma 6, la quale contiene *loci* che codificano per le molecole MHC di classe II, atte alla presentazione dell'antigene alle cellule T-Helper. In particolare, la maggior parte dei pazienti presenta un aplotipo HLA DR3 e/o DR4. Nel dettaglio, gli aplotipi DQA1\*0301, DQB1\*0302, DQA1\*501 e DQB1\*0201 sono quelli associati con maggior evidenza al diabete mellito di tipo 1A. Esistono anche geni che conferiscono protezione dallo sviluppo della malattia, come l'aplotipo DQA1\*0102 e il DQB1\*0602, che risultano estremamente rari nei pazienti diabetici.

Il ruolo del complesso maggiore di istocompatibilità è testimoniato anche dalla dimostrata associazione tra diabete mellito di tipo 1 e altre malattie autoimmuni [13].

Oltre all'associazione con il sistema MHC di classe II, al quale si può attribuire circa il 40-50% del *clustering* familiare [14], esistono almeno altri 17 loci genici che conferiscono suscettibilità, tra cui i polimorfismi della regione promoter del gene dell'insulina che sono responsabili di circa il 10% della predisposizione.

Vi è dunque una componente multigenica nella predisposizione allo sviluppo del diabete di tipo 1, ma il gene della risposta immune specifica, presentando il rischio relativo più alto, gioca il ruolo principale.

È bene sottolineare comunque che circa il 10%-20% dei casi infantili di nuova diagnosi presenta un parente di primo grado con diabete di tipo 1. Quelli con un fratello o un genitore affetto sembrano avere un rischio cumulativo del 3%-7% fino a circa 20 anni di età, rispetto a <1% della popolazione generale. Inoltre, l'incidenza cumulativa tra i gemelli monozigoti di pazienti con diabete di tipo 1 è inferiore al 50%. Pertanto, la maggior parte delle persone geneticamente predisposte non sviluppa la malattia [15].

### 1.2.2 Fattori ambientali

Alla base dell'instaurarsi del processo autoimmune nei soggetti geneticamente predisposti sono stati proposti negli anni numerosi *triggers* ambientali. Nonostante non sia ancora stato chiarito il nesso causale, tra le varie ipotesi figurano:

- Infezioni virali (Echovirus, Coxsackie A e B)
- Alimenti (proteine del latte vaccino, glutine, vitamina D) e fattori correlati
- Tossine e composti della nitrosourea

Tra questi, l'ipotesi infettiva è tra le più accreditate, dal momento che spesso all'anamnesi il paziente di nuova diagnosi riferisce un episodio di febbre o faringodinia risalente a qualche settimana prima rispetto all'esordio della sintomatologia diabetica.

### 1.2.3 Fattori autoimmunitari

Il momento fondamentale nella patogenesi del diabete mellito di tipo 1 è l'attacco da parte del sistema immunitario nei confronti delle cellule  $\beta$ : le isole di Langerhans vengono infiltrate da macrofagi e linfociti T CD4 e CD8 che determinano l'instaurarsi di un quadro di insulite con danno tissutale irreversibile (Figura 3).

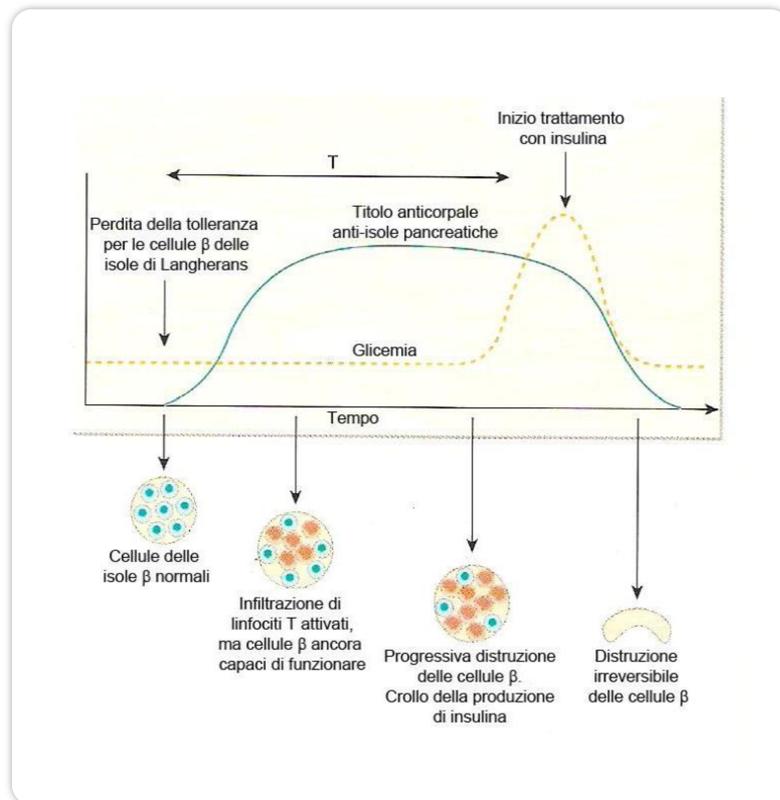


Figura 3: Fasi nell'immunopatogenesi del diabete di tipo 1.

Tra i vari meccanismi molecolari che conducono alla morte cellulare, oltre alla probabile induzione di fenomeni di apoptosi, vanno citati:

- la liberazione di perforine e di altri enzimi in grado di danneggiare la membrana cellulare;
- l'iperpressione di componenti della matrice extracellulare che altera la vascolarizzazione fino all'ischemia delle  $\beta$ -cellule [16];
- il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [17];
- le modificazioni post-traduzionali delle proteine  $\beta$ -cellulari che vengono riconosciute come non-self da parte del sistema immunitario.

Questo meccanismo di danno si associa spesso alla presenza di autoantigeni, che vengono misurati tramite rilevazione di autoanticorpi specifici. Le molecole bersaglio del processo autoimmune comprendono l'insulina, l'enzima GAD (*Glutamic acid decarboxylase*, responsabile della biosintesi del neurotrasmettitore GABA), ICA 512/IA e *phogrin*, una tirosin-fosfatasi localizzata nelle membrane delle vescicole a nucleo denso contenenti insulina [18].

Altri autoantigeni meno chiaramente definiti comprendono un ganglioside insulare e la carbossipeptidasi H. Ad eccezione dell'insulina, nessuno di questi è comunque esclusivo delle cellule  $\beta$ .

Gli autoanticorpi di maggior interesse rivolti verso le isole pancreatiche (*islet cell autoantibodies*, ICA) sono rivolti verso quattro antigeni principali, definiti e validati in *workshop* internazionali e comprendono:

- Anticorpi anti-insulina (IAA)
- Anticorpi anti-acido glutammico decarbossilasi GAD65 (GADA)
- Anticorpi anti-antigene 2 dell'isolotto della tirosina fosfatasi IA-2/ICA-512 (IA2A)
- Anticorpi anti-trasportatore dello zinco 8 (ZnT8A), di recente identificazione e utilizzati soprattutto a scopo di ricerca

Il dosaggio di tali autoanticorpi può essere utile nel classificare il diabete come tipo 1A e nell'identificare soggetti sani a rischio, combinato con altri marcatori metabolici e genetici. Insieme al rilevamento di un'alterata secrezione insulinica dopo test di tolleranza glucidica per via endovenosa, la positività anticorpale indica un rischio superiore al 50% di sviluppare la malattia entro 5 anni, mentre in assenza di alterata secrezione il rischio risulta inferiore al 25%. Tali anticorpi hanno anche contribuito alla comprensione dell'eterogeneità della malattia e suggeriscono che i fenomeni autoimmunitari alla base della patologia iniziano nelle prime fasi della vita [19].

La positività per uno o più anticorpi cambia nel corso degli anni la probabilità di sviluppare il diabete. Il paziente positivo per un solo anticorpo presenta una probabilità di evoluzione del 20%, motivo per cui potrebbe non sviluppare mai la malattia; tale probabilità raggiunge il 99% invece in caso di positività a tre anticorpi [20, 21] (Figura 4A e 4B).

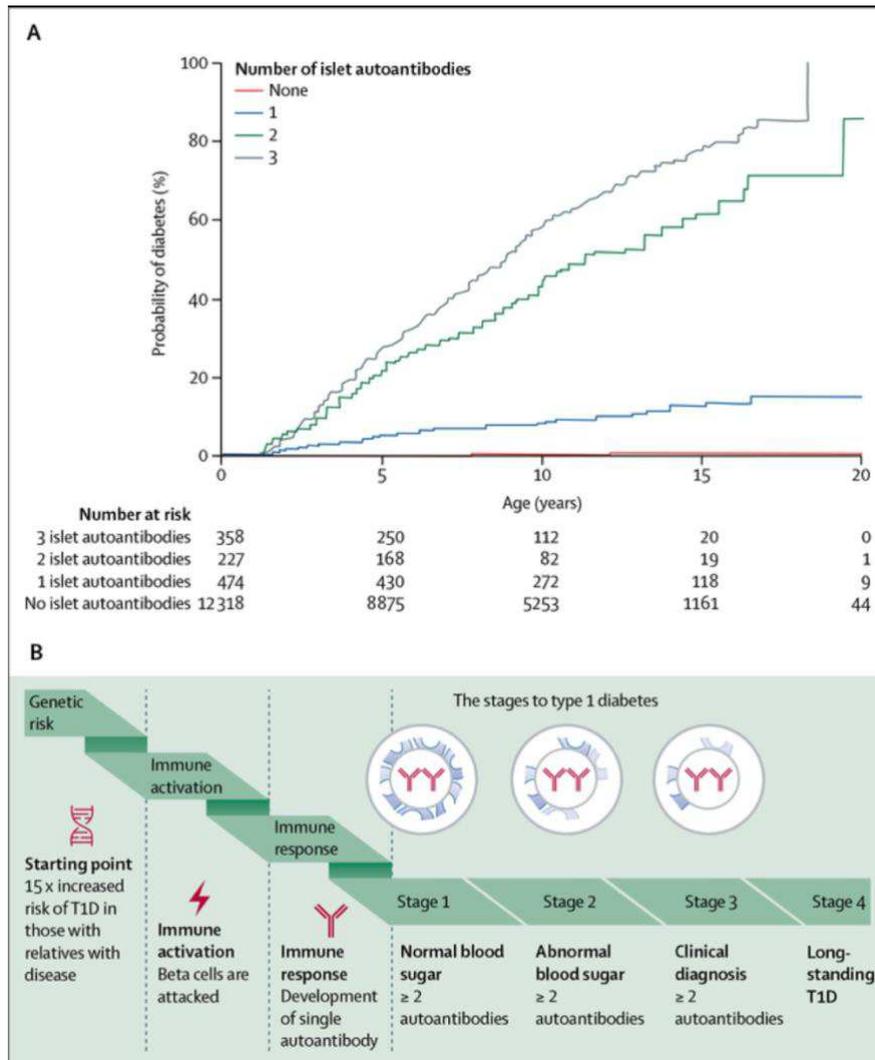


Figura 4A: Probabilità di sviluppo del diabete di tipo 1 nell'infanzia, stratificata per la positività anticorpale; 4B: Progressione e fasi di sviluppo del diabete di tipo 1.  
Di Meglio et Al: Type 1 diabetes. Lancet 2018.

Come già anticipato, i pazienti con diabete mellito di tipo 1 sono più propensi allo sviluppo anche di altre patologie a genesi autoimmune rispetto alla popolazione generale, in quanto il meccanismo instauratosi va a determinare un coinvolgimento organico sistemico. In particolare, vi è associazione dimostrata e frequente con tiroidite di Hashimoto, morbo di Graves, celiachia, morbo di Addison, vitiligine, gastrite autoimmune, miastenia grave e anemia perniziosa [22]. Rilevante è anche l'associazione con sindromi autoimmuni polighiandolari monogeniche tra cui disregolazione immunitaria, poliendocrinopatia, enteropatia e sindrome legata all'X (IPEX) [23,24] oltre a patologie reumatiche come il LES e l'artrite reumatoide.

La maggior parte delle patologie citate sono associate agli stessi aplotipi HLA tipici dei pazienti con diabete di tipo 1.

### 1.3 Quadro clinico

Il diabete mellito di tipo 1, forma più comune di diabete nell'infanzia e nell'adolescenza, ha un esordio clinico spesso eclatante e brusco che solitamente si colloca in età puberale, anche se si può verificare in qualsiasi fase della vita (Figura 5).

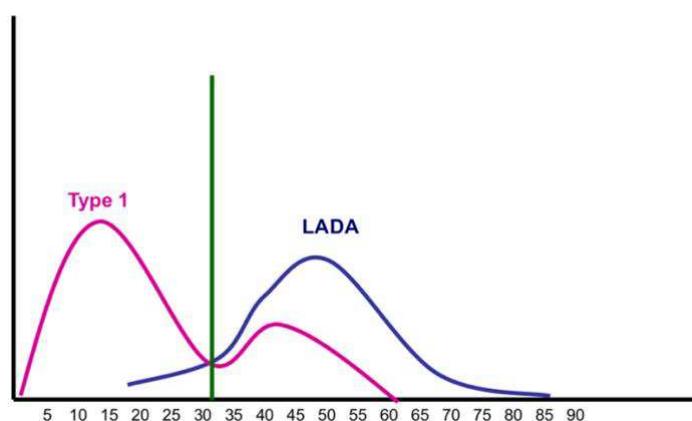


Figura 5: Distribuzione dell'esordio del diabete di tipo 1 per età.

La comparsa dei sintomi si ha in seguito alla distruzione di almeno l'80% delle cellule  $\beta$  pancreatiche. In questo stadio della malattia la secrezione di insulina residua correla con il riscontro di livelli ridotti e talvolta assenti di peptide C plasmatico, costituito da una corta catena di amminoacidi che viene rilasciata nel circolo sanguigno come sottoprodotto della sintesi endogena di insulina.

La sintomatologia nel paziente con diabete di tipo 1 è sempre presente ed è strettamente connessa all'iperglicemia, con polidipsia, polifagia, astenia, apatia, calo ponderale, disturbi visivi, prurito vulvare nelle donne e poliuria, dovuta alla maggior escrezione di glucosio che, essendo osmoticamente attivo, tende a determinare una diuresi osmotica. L'esordio può essere favorito da un'infezione per cui a tali manifestazioni possono associarsi anche sintomi come febbre, tosse e disuria.

In un terzo dei casi la prima manifestazione della malattia in bambini e adolescenti è la chetoacidosi diabetica, in condizione di grave iperglicemia. Si tratta della principale complicanza acuta dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 e si associa a carenza di insulina, deplezione di volume e alterazioni dell'equilibrio acido-base. I sintomi caratteristici sono la nausea e il vomito, la sete e la poliuria, il dolore addominale, l'alterazione dello stato mentale e la dispnea; i segni invece comprendono la tachicardia, la secchezza delle mucose, il ridotto turgore cutaneo, la disidratazione, l'ipotensione, la tachipnea, la febbre e la letargia.

Altri giovani diabetici presentano una modesta iperglicemia a digiuno che può rapidamente trasformarsi in grave iperglicemia e/o chetoacidosi a causa di infezioni o altri stress.

Quando l'esordio avviene in età adulta (LADA), generalmente si ha a che fare con pazienti che hanno mantenuto per anni una funzione  $\beta$ -cellulare sufficiente a prevenire la chetoacidosi e che diventano solo in seguito dipendenti dalla somministrazione di insulina esogena, con parallelo aumento del rischio di chetoacidosi stessa.

## 1.4 Diagnosi

Per porre diagnosi di diabete mellito di tipo 1 secondo le linee guida emesse dall'*American Diabetes Association (ADA)* ci si avvale dell'anamnesi, della clinica e della misurazione della glicemia e/o dell'emoglobina glicata.

In particolare, in presenza di sintomi caratteristici di iperglicemia quali poliuria, polidipsia e calo ponderale o con sintomi di crisi iperglicemica, per la diagnosi di diabete è sufficiente il riscontro casuale anche in una sola occasione di glicemia  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L).

Invece, nel caso in cui non siano presenti i tipici sintomi, la diagnosi di diabete deve essere posta con il riscontro, confermato in due diverse occasioni, di almeno uno dei seguenti valori:

- Glicemia a digiuno  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L); per digiuno si intende almeno 8 ore di astensione dal cibo.

- Glicemia  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L) 2 ore dopo il carico orale di glucosio (OGTT, test storico che è stato per anni il cardine della diagnosi di diabete).
- HbA<sub>1c</sub>  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol), a condizione che il dosaggio sia standardizzato, allineato IFFC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) e che tenga conto di eventuali fattori interferenti.

Altri esami che possono aiutare nella diagnosi e nella caratterizzazione della malattia sono:

- Dosaggio degli Anticorpi anti-ICA, anti-GAD, anti-IA2, anti-IAA;
- Esame delle urine per evidenziare la presenza di glicosuria e chetonuria nel diabete scompensato, particolarmente rilevante nel paziente giovane;
- Dosaggio del C-peptide: viene richiesto come stima della produzione insulinica in casi particolari;
- Test di verifica della risposta massimale del C-peptide dopo somministrazione endovenosa di 1mg di glucagone (Test del glucagone) per quantificare la risposta insulinica e valutare l'adeguatezza dello schema terapeutico;
- Insulinemia, ormai sostituita dalla quantificazione del C-peptide, in quanto equimolare;
- Fruttosamina, una proteina glicosilata il cui dosaggio nel diabete gravidico esprime l'andamento glicemico degli ultimi 15 giorni, ormai abbandonata.

## **1.5 Meccanismi di danno da iperglicemia**

Alla base dell'insorgenza del diabete mellito vi è uno stato di iperglicemia cronica conseguente al deficit di insulina. Tale condizione rappresenta il fattore eziologico più importante per la genesi di complicanze a lungo termine.

Per cercare di spiegare gli esatti meccanismi alla base della disfunzione cellulare e del danno microvascolare, sono state inizialmente proposte 4 teorie principali riguardanti vie metaboliche attivate in presenza di eccesso di glucosio nel sangue (Figura 6).

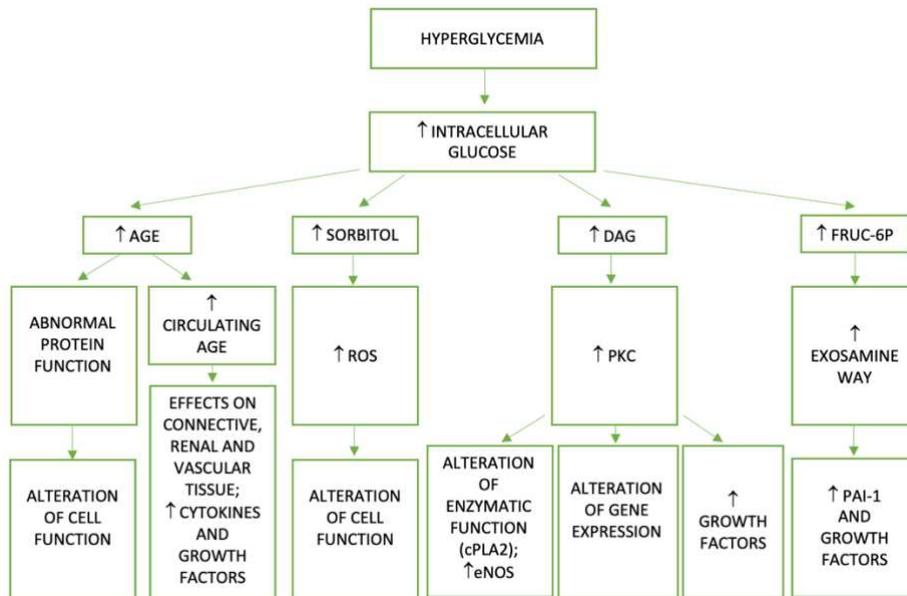


Figura 6: Meccanismi cellulari alla base delle complicanze correlate al diabete. AGE, prodotti terminali della glicosilazione avanzata; PKC, protein chinasi C; DAG, diacilglicerolo; cPLA2, fosfolipasi A2; eNOS, ossido nitrico sintasi endoteliale; ROS, specie reattive dell'ossigeno; Fruc-6P, fruttosio-6-fosfato; PAI-1, inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno.

a) La formazione dei prodotti terminali di glicosilazione avanzata (*Advanced Glycosylation end products*, AGEs).

Tale ipotesi, affrontata dettagliatamente in seguito, suggerisce che l'aumento dei livelli di glucosio intracellulare determini la formazione di AGEs attraverso la glicosilazione non enzimatica operata dai carbonili del glucosio sui gruppi amminici terminali di proteine intra- ed extracellulari.

Tali prodotti avanzati della glicazione risultano pericolosi per la cellula in quanto:

- legandosi alle proteine, tramite legami crociati, ne modificano la funzione;
- le modifiche a livello della matrice extracellulare portano ad alterazione del legame tra gli altri componenti extracellulari e i loro recettori, come le integrine;
- aumentano la produzione del recettore degli AGEs (*receptor for advanced glycation endproducts*, RAGE), che fisiologicamente lega composti ad azione pro-infiammatoria [25].

b) La via dei polioli

Nei soggetti non diabetici, il metabolismo del glucosio attraverso questa via rappresenta solo una piccola percentuale del metabolismo totale glucidico. Nel diabetico, al contrario, l'iperglicemia induce una sovrapproduzione di ROS attraverso la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni che favorisce l'attivazione dell'enzima aldoso-reduttasi. Tale enzima catalizza reazioni di riduzione di una grande varietà di composti carbonilici nella corrispondente forma alcolica.

In condizioni di iperglicemia, l'enzima aumenta la sua affinità per il glucosio e lo converte, con una reazione NADPH-dipendente, in sorbitolo, un poliolo esoso; quest'ultimo subisce poi un'ossidazione a fruttosio ad opera della sorbitolo-deidrogenasi, con riduzione del  $\text{NAD}^+$ . Complessivamente, il processo porta a depauperamento di NADPH, con diminuita rigenerazione da parte dell'enzima glutazione reduttasi del glutatione, elemento chiave di difesa contro i ROS.

Quindi, l'incremento delle concentrazioni di sorbitolo altera i potenziali redox determinando un aumento dell'osmolarità cellulare e favorendo l'aumento dei composti reattivi dell'ossigeno, con conseguenti disfunzioni cellulari che si verificano soprattutto a livello delle cellule endoteliali del microcircolo retinico [26,27] (Figura 7).

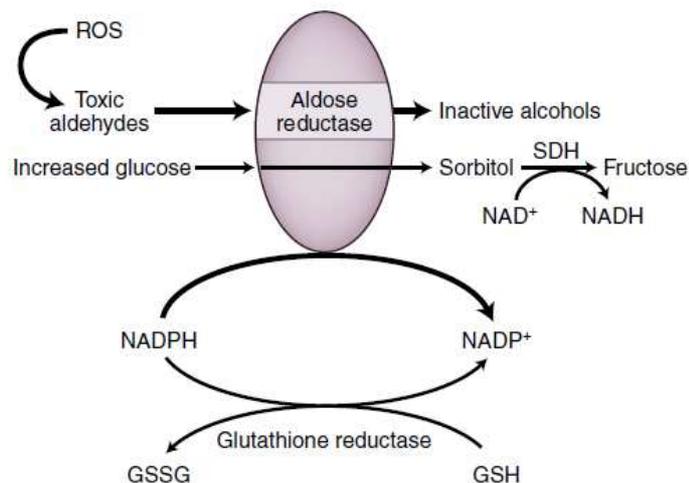


Figura 7: Meccanismo d'azione della via del sorbitolo.

c) La formazione di diacilglicerolo (DAG)

Secondo questa ipotesi alla base del danno molecolare e cellulare vi è l'attivazione, da parte del diacilglicerolo, che aumenta in seguito all'iperglicemia, della protein chinasi C (PKC). Tale enzima determina (Figura 8):

- riduzione della produzione di ossido nitrico (NO) e incremento di endotelina 1, con conseguenti anomalie del flusso ematico e disfunzione endoteliale;
- neoangiogenesi e alterazione della permeabilità vascolare per incremento del VEGF;
- aumento della trascrizione genica della fibronectina e del collagene di tipo IV e riduzione della fibrinolisi con rischio di occlusione capillare e vascolare;
- incremento della produzione di ROS e dell'infiammazione [28].

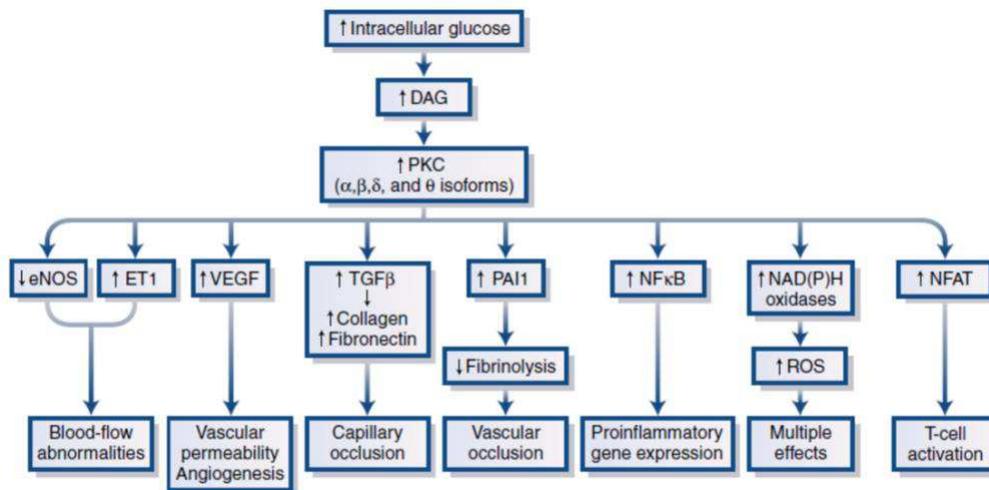


Figura 8: Meccanismo d'azione della via DAG/PKC.  
 Simran et Al: Role of Protein Kinase C in Diabetic Complications. Chitkara OAJ 2019.

d) L'attivazione della via delle esosamine

L'attivazione di questa via determina una modifica post-traduzionale di proteine intracellulari e risulta rilevante solamente in condizioni di iperglicemia.

Nel dettaglio, il glucosio in eccesso all'interno della cellula causa un incremento di fruttosio-6-fosfato, intermedio della glicolisi, il quale viene convertito dall'enzima glutamina alanina fruttosio 6-fosfato aminotransferasi (GFAT) in glucosamina-6-fosfato.

Quest'ultima subisce un'ulteriore trasformazione prima in N-acetilglucosamina-6-fosfato e poi in UDP-N-acetilglucosamina. L'enzima acetilglucosamina transferasi (OGT), trasferisce infine la N-acetilglucosamina sui residui terminali di serina e treonina delle proteine bersaglio e dei fattori di trascrizione.

Le conseguenze funzionali dell'attivazione di questa via sono rappresentate da una maggiore espressione ed attività del fattore di inibizione dell'attivazione del plasminogeno tissutale (*plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) e del fattore  $\beta$  di crescita trasformante (*transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ), entrambe mediate da modificazioni O-GlcNAc del fattore di trascrizione *Specific Protein 1* (SP1) [29].

Un lavoro di M. Brownlee pubblicato nel 2005 [30] ha illustrato come alla base dell'attivazione delle singole *pathway* di cui sopra vi sia l'iperproduzione di superossido intramitocondriale, causato dal blocco della tappa catalizzata dal coenzima Q nella produzione di ATP. In presenza di iperglicemia si ha aumento dei ROS con attivazione poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) che riduce l'attività della gliceraldeide-3P-deidrogenasi (GAPDH), determinando l'iperattivazione delle vie sopradescritte (Figura 9).

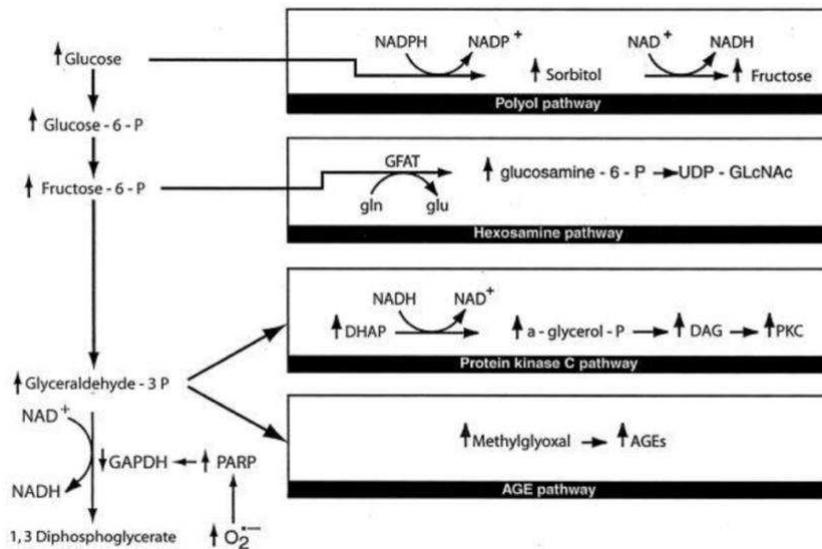


Figura 9: Riassunto dei meccanismi fisiopatologici alla base delle complicanze microvascolari correlate al diabete.

Brownlee M: *The Pathobiology of diabetes complications: a unifying mechanism. Diabetes 2005.*

L'iperglicemia quindi, agendo a livello dello scambio di elettroni mitocondriale, comporta un'alterazione strutturale e funzionale irreversibile delle membrane cellulari.

Questo tipo di approccio unificante è stato utilizzato anche per spiegare le complicanze macrovascolari. Secondo Brownlee, in questo caso il ruolo centrale è svolto dall'insulinoresistenza, che determina un aumento della lipolisi e quindi degli acidi grassi liberi (*free fatty acids*, FFA). Questi vengono ossidati a livello endoteliale e causano produzione di ROS, responsabili dell'alterazione delle quattro vie metaboliche di cui sopra (Figura 10).

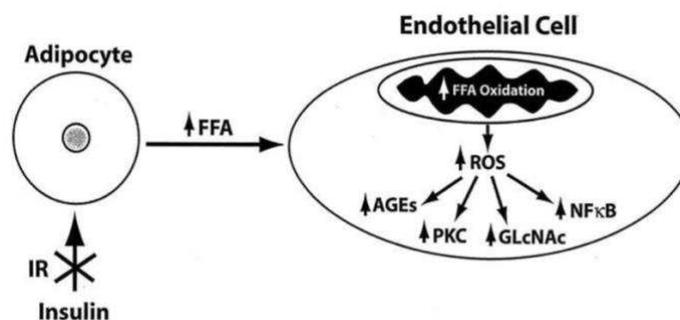


Figura 10: Meccanismi fisiopatologici alla base delle complicanze macrovascolari correlate al diabete.

Brownlee M: *The Pathobiology of diabetes complications: a unifying mechanism. Diabetes 2005.*

È bene citare tra i meccanismi alla base del danno organico nei pazienti diabetici anche la via dell'idrolasi epossido solubile (sEH). Si tratta di un enzima bifunzionale con idrolasi C-terminale e attività fosfatase N-terminale, responsabile della conversione degli acidi epossieicosatrienoici (EET) in acidi diidrossieicosatrienoici (DHET), forme biologicamente meno attive o inattive. Gli EET sono sintetizzati dall'acido arachidonico e modulano la funzione fisiologica cellulare, con ruolo antinfiammatorio. In particolare, riducono l'attivazione di NFκB con conseguente down-regolazione della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2), dell'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e della lipossigenasi 5 (LOX-5) [31]. Studi recenti hanno rilevato un incremento dell'espressione di sEH nella retina di topi diabetici, con formazione di composti che compromettono le interazioni tra cellule endoteliali e periciti; la retinopatia diabetica non proliferante è caratterizzata, tra l'altro, dalla perdita dei periciti e dalla disfunzione endoteliale [32].

Rilevanti sono infine le alterazioni dei meccanismi di riparazione tissutale. A tal proposito, esemplare è quanto accade nell'ulcera del piede diabetico, dove si verifica un'intensa e prolungata reazione infiammatoria con richiamo di neutrofili. Tali cellule attivate giungono in loco e formano i cosiddetti NETs (*neutrophil extracellular traps*), costituiti da filamenti di materiale nucleare rilasciati dalle stesse cellule, atti a intrappolare ed eliminare i patogeni. Fisiologicamente queste strutture svolgono una funzione di potenziamento della risposta immunitaria innata. L'iperglicemia aumenta il rilascio di NETs con conseguente rallentamento nella guarigione delle ferite [33]. In aggiunta, nei diabetici si osserva ridotta mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSPC) dal midollo osseo ai tessuti target a causa dell'alterata regolazione della chemochina CXCL-12 conseguente all'iperglicemia e all'accumulo di AGEs. Da tali cellule derivano i progenitori endoteliali che permettono la rigenerazione tissutale e l'angiogenesi; una loro riduzione comporta pertanto un rallentato processo di riparazione nei tessuti target [34].

## 1.6 Complicanze croniche

Le complicanze croniche del diabete mellito riguardano molteplici apparati e sono responsabili della maggior parte delle morbilità e mortalità associate alla patologia. Il rischio di sviluppare danno d'organo aumenta in funzione della durata dell'iperglicemia e solitamente si manifesta nella seconda decade di esposizione agli alti livelli plasmatici di glucosio.

Le complicanze possono essere suddivise in vascolari e non vascolari. Queste ultime vengono ulteriormente suddivise in macro- e microvascolari. Alla base vi sono i molteplici meccanismi fisiopatologici precedentemente descritti legati all'iperglicemia. Tuttavia, vi sono pazienti che nel corso della vita non sviluppano complicanze, a parità di controllo glicemico. Questo suggerisce la contemporanea presenza di altri fattori nella modulazione dello sviluppo del danno d'organo, tra cui l'ipertensione, il fumo, la dislipidemia e la suscettibilità genetica [35]; tuttavia, *loci genici* probabilmente responsabili di tale predisposizione non sono ancora stati identificati.

### 1.6.1 Complicanze microvascolari

#### 1.6.1.1 Retinopatia diabetica

La retinopatia rappresenta la complicanza più frequente nel paziente diabetico con una prevalenza del 77,3% nei pazienti con diabete di tipo 1 e un'incidenza dell'80% entro i 15-20 anni dalla diagnosi [36]. La durata del diabete e il grado di controllo glicemico rappresentano i migliori indici predittivi di sviluppo di retinopatia.

La vasculopatia retinica rappresenta la causa principale di cecità nella fascia d'età compresa tra i 20 e i 74 anni [37]. La gravità del problema è sottolineata anche dal fatto che i diabetici hanno una probabilità di perdita totale della vista 25 volte superiore alla popolazione generale. Tali dati sottolineano l'importanza della prevenzione, attuabile con il controllo dei fattori di rischio come l'ipertensione, il fumo, l'obesità e la dislipidemia, unitamente al mantenimento di un buon controllo glicemico sin dalle fasi iniziali di malattia [38] e allo screening periodico tramite esame del fondo oculare (*fundus oculi*).

In particolare, poiché si stima che la retinopatia richieda almeno 5 anni per svilupparsi dopo l'insorgenza dell'iperglicemia, i pazienti con diabete di tipo 1 dovrebbero sottoporsi a un esame oculistico iniziale e completo entro 5 anni dalla diagnosi [39]. Esami più precisi sono l'ecografia oculare e l'OCT (tomografia ottica a radiazione coerente), i quali possono evidenziare con buona definizione alterazioni del pavimento retinico come l'aumento dimensionale in caso di edema.

La cecità rappresenta il risultato finale di una retinopatia a decorso lento e progressivo e di un edema maculare clinicamente significativo. Nel paziente diabetico i livelli di glucosio nel sangue regolano la vasocostrizione e la vasodilatazione dei vasi retinici, motivo per cui la patogenesi di questa complicanza risulta strettamente legata all'andamento glicemico. L'iperglicemia, infatti, stimola la vasocostrizione con formazione nel lungo periodo di zone di ischemia a livello retinico. L'ipossia comporta perdita dei periciti [40] e alterata permeabilità vasale con rilascio di fattori di crescita come VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), il quale stimola la genesi di circoli collaterali compensatori costituiti da vasi di piccolo calibro più fragili, la cui rottura determina piccole emorragie. Tali spandimenti di sangue, se non riassorbiti, causano perdita dell'acuità visiva, che è totale quando viene colpita la fovea. Si riscontrano anche zone infiammate con presenza di essudato, di edema e di fibrosi, formatosi in seguito al riassorbimento dell'emorragia. L'insieme di questi fenomeni porta alla modifica della struttura della retina. Nei casi più gravi si può incorrere nel distacco retinico.

In questi pazienti è molto utile la terapia laser per bloccare l'evoluzione verso l'emorragia, o la terapia intraoculare a base di inibitori del VEGF per impedire la neoangiogenesi, sia nelle fasi iniziali che avanzate della patologia [41].

La retinopatia viene generalmente distinta in non proliferativa e proliferativa:

- La *retinopatia non proliferativa* solitamente compare verso la fine della prima o l'inizio della seconda decade di malattia ed è caratterizzata da microaneurismi, emorragie puntiformi, zone di ischemia e fenomeni essudativi cotonosi tipici della retinopatia *background*, presente nella maggior parte dei casi di diabete di tipo 1.

Il quadro è lieve e clinicamente poco rilevante; non vi è interferenza con la quotidianità del paziente, in quanto non vi è modificazione dell'acuità visiva.

- La *retinopatia proliferativa* presenta come carattere distintivo la neovascolarizzazione con proliferazione della microglia e formazione di edemi con compromissione della vista. Il quadro risulta clinicamente rilevabile [42].

L'edema della macula è tipico di una fase di passaggio fra le due forme e presenta una classificazione specifica. La gravità del quadro aumenta con l'estensione e la quantità di essudato. La fluoroangiografia consente di identificare precocemente l'edema, il quale si associa, se non trattato, a una probabilità compresa tra il 22 e il 33% di sviluppare una moderata perdita visiva nei successivi 3 anni [43].

#### 1.6.1.2 Nefropatia diabetica

La nefropatia diabetica costituisce la principale causa di malattia renale cronica e di insufficienza renale terminale in tutto il mondo, soprattutto nei paesi industrializzati. Inoltre, rappresenta una delle cause principali di mortalità e morbilità correlate al diabete, colpendo circa il 40 % dei pazienti con diabete mellito di tipo 1.

L'incidenza in questo gruppo di pazienti ha subito un notevole decremento negli ultimi decenni grazie al monitoraggio serrato e periodico della funzionalità renale.

Tra i fattori di rischio più rilevanti figurano il controllo metabolico e pressorio, la suscettibilità genetica e la durata del diabete, in quanto la probabilità di sviluppare la complicanza aumenta proporzionalmente alla durata dell'esposizione all'iperglicemia. In particolare, si registra un picco di incidenza tra la prima e la seconda decade successiva alla diagnosi di diabete [44].

Alla base del danno vi è l'attivazione, in presenza di iperglicemia cronica, delle vie della PKC, delle esosamine, dei polioli e la formazione dei prodotti avanzati di glicazione (AGEs), che agiscono su un *background* genetico che rende il paziente più predisposto allo sviluppo di complicanze.

Tali vie determinano ischemia distrettuale dei piccoli vasi con coinvolgimento delle arteriole glomerulari e progressivo danno del glomerulo con sclerosi, alterazione mesangiale, perdita dei podociti e alterazione della permeabilità. Complessivamente si assiste all'instaurarsi di un quadro istologico di glomerulosclerosi di Kimmelstiel-Wilson, con ischemia di tutto il parenchima e fibrosi, diagnosticabile con la biopsia renale [45].

La storia naturale della malattia è caratterizzata da una prevedibile sequenza di eventi. Nei primi anni successivi all'insorgenza del diabete si verifica iperfiltrazione glomerulare subclinica che si riflette in un incremento del VGF/GFR (*glomerular filtration rate*). Durante i primi 5 anni si instaura un quadro di ipertrofia glomerulare e ispessimento della membrana basale con progressiva normalizzazione del GFR fino a quando, dopo 5-10 anni si ha la comparsa di microalbuminuria, definita da un rapporto albumina/creatinina (ACR) compreso tra 30 e 300 mg/g, entrambe misurate in un campione estemporaneo di urine. Questa condizione si definisce "incipiente" in quanto può regredire o rallentare nella progressione grazie al controllo glicemico e pressorio, che si ottiene agendo farmacologicamente a livello dell'arteriola afferente con gli ACE-inibitori. Il riscontro di microalbuminuria nel diabete di tipo 1 è un indice molto importante di rischio di progressione verso la proteinuria franca, in maniera indipendente dalla pressione e dal colesterolo.

All'instaurarsi della macroalbuminuria (ACR > 300 microgr/mg), si ha un declino progressivo del GFR e nell'arco di 7-10 anni il 50% dei diabetici va incontro a insufficienza renale terminale con necessità di dialisi o trapianto. Quando si instaura la sindrome nefrosica (perdita di più di 4g/die di proteine) si ha formazione di importanti edemi discrasici e aumento esponenziale del rischio cardiovascolare.

#### 1.6.1.3 Neuropatia diabetica

La neuropatia diabetica compare in circa il 55% degli individui con diabete mellito di tipo 1 di durata superiore ai 10-15 anni, ma dipende soprattutto dal controllo metabolico degli anni precedenti [46].

Come per le precedenti microangiopatie, nella genesi del disturbo giocano un ruolo essenziale fattori vascolari (trombi, ridotta perfusione periferica), ma anche l'aspetto metabolico legato alla glucotossicità. Il controllo glicemico può infatti prevenire efficacemente l'instaurarsi della complicanza [47].

Si tratta di un gruppo eterogeneo di disturbi clinicamente differenti e caratterizzati dalla disfunzione del sistema nervoso periferico nelle sue componenti somatica e autonoma, a causa della progressiva perdita di fibre nervose e della mielina che le avvolge, conseguente alla disfunzione dei *vasa nervorum*. Si può manifestare con polineuropatia, mononeuropatia, radiculopatia toracoaddominale, amiotrofia e/o neuropatia autonoma.

La forma più comune di neuropatia diabetica è la polineuropatia simmetrica distale, che generalmente si manifesta a livello degli arti inferiori con alterazione della sensibilità (anestesia o iperestesia, parestesia e disestesia) che dai piedi si diffonde prossimalmente. Con il passare del tempo tali sintomi diventano invalidanti, tanto da associarsi a ipotrofia muscolare. In alcuni soggetti si sviluppa un dolore neuropatico, a volte preceduto da miglioramento del controllo glicemico, che è presente a riposo e si accentua nelle ore notturne con sensazione urente. La progressiva perdita della "sensibilità protettiva" (*loss of protective sensation*, LOPS) rappresenta un fattore di rischio per l'ulcerazione del piede diabetico. Per tale ragione, tutti i pazienti con diabete di tipo 1 diagnosticato da 5 o più anni devono essere valutati annualmente tramite anamnesi e test clinici [48]. Si stima che circa il 15% di tutti i pazienti con diabete svilupperà ulcere del piede [49].

La neuropatia autonoma è invece un quadro più complesso che coinvolge direttamente il sistema colinergico, noradrenergico e peptidergico. Tra i numerosi apparati coinvolti vi sono quello sudoriparo e genitourinario, ma soprattutto quello cardiovascolare e gastrointestinale. La disfunzione vagale determina alterazione della frequenza cardiaca e della motilità gastrointestinale, con conseguenti compromissioni organiche gravi e permanenti. È importante sottolineare l'importanza del riconoscimento di tale forma di neuropatia diabetica: potendo comportare riduzione della secrezione di ormoni controregolatori, può essere responsabile dell'incapacità di avvertire in maniera appropriata episodi di

ipoglicemia, esponendo il paziente a rischi molto gravi per la vita e complicando gli sforzi per migliorare il controllo glicemico [50].

### 1.6.2 Complicanze macrovascolari

La malattia cardiovascolare aterosclerotica (*atherosclerotic cardiovascular disease*, ASCVD), definita come malattia coronarica, malattia cerebrovascolare e arteriopatia periferica di origine aterosclerotica, rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da diabete mellito, con un costo sanitario annuo negli Stati Uniti stimato attorno ai 40 miliardi di dollari [51].

L'iperglicemia diabetica costituisce un fattore di rischio indipendente di ASCVD, unitamente ad altri fattori come l'obesità e il sovrappeso, l'ipertensione, la dislipidemia, il fumo, la storia familiare di malattia coronarica, la malattia renale cronica e la presenza di microalbuminuria.

L'aterosclerosi nel diabetico è precoce, polidistrettuale, progressiva e aggressiva, accelerata in caso di compresenza dei vari fattori citati. In questi pazienti risultano maggiormente colpiti i rami arteriosi più distali bilateralmente, con calcificazioni vasali ad alto rischio di rottura o di formazione aneurismatica.

Lo studio Framingham ha evidenziato inoltre un marcato aumento negli individui affetti da diabete mellito di scompenso cardiaco. Analisi recenti hanno rilevato che i tassi di ospedalizzazione per insufficienza cardiaca a frazione di eiezione ridotta o conservata sono due volte più elevati nei pazienti con diabete [52].

Secondo le linee guida dell'*American Diabetes Association*, per la prevenzione e la gestione sia dell'ASCVD che dell'insufficienza cardiaca, i fattori di rischio cardiovascolare dovrebbero essere valutati sistematicamente almeno una volta all'anno in tutti i pazienti con diabete.

Alcuni studi hanno dimostrato che il rischio di malattia coronarica a 10 anni negli adulti statunitensi con diabete risulta sensibilmente diminuito, così come la morbilità e la mortalità associate, grazie al controllo dei singoli fattori [53].

In ogni caso è importante sottolineare che ad oggi pochi studi sono stati specificamente progettati per valutare l'impatto delle strategie di riduzione del rischio cardiovascolare nei pazienti con diabete di tipo 1.

### 1.6.3 Altre complicanze

Oltre al danno vascolare, il diabete è responsabile anche di alterazioni a livello di altri organi e apparati.

- Nel tratto gastrointestinale si possono verificare ritardato svuotamento gastrico (gastroparesi) e alterata motilità (stipsi e diarrea) [54]. Alla base della gastroparesi vi è la disfunzione parasimpatica conseguente all'iperglicemia cronica, ma anche l'iperglicemia stessa, che ha effetti sullo svuotamento gastrico. La diarrea notturna alternata a stipsi è invece un aspetto comune della disfunzione autonoma tipica del diabete.
- A livello genitourinario, gli effetti a lungo termine del diabete mellito si possono manifestare con quadri di cistopatia, calcificazione del dotto deferente con disfunzione erettile e disfunzione sessuale femminile [55].
- La cute può risultare coinvolta a causa del ritardo nella riparazione delle ferite e della comparsa di ulcere. Nello 0,3-1,6% delle giovani pazienti con diabete di tipo 1, si manifesta la *necrobiosis lipoidica diabetorum*, una affezione rara caratterizzata da lesioni granulomatose eritematose che si sviluppano nella regione pretibiale e che evolvono in un quadro ulceroso, spesso doloroso [56].
- A livello oculare si ha aumento del rischio glaucoma e di cataratta, che rappresenta la complicanza oculare più comune [57].
- Il sistema immunitario risulta coinvolto a causa di alterazioni dell'immunità cellulomediata e della fagocitosi associate ad iperglicemia [58]. Tale quadro determina una maggiore predisposizione allo sviluppo di infezioni con frequenza e gravità maggiori. In generale, l'iperglicemia favorisce la colonizzazione di vari microrganismi, rappresentando il glucosio un ottimo *pabulum* di crescita.

## 1.7 Terapia

Gli obiettivi del trattamento integrato del diabete mellito sono [59]:

- 1) Controllare i sintomi correlati all'iperglicemia;
- 2) Ritardare/evitare l'insorgenza delle complicanze croniche micro- e macroangiopatiche;
- 3) Prevenire l'insorgenza di complicanze acute (coma ipoglicemico e scompenso iperglicemico con coma chetoacidotico iperosmolare);
- 4) Mantenere una buona qualità della vita.

Per realizzarli è fondamentale identificare un livello personalizzato di riferimento del controllo glicemico, fornire risorse educative per il raggiungimento dello stesso e monitorare le complicanze della malattia.

Basandosi sulla premessa che il controllo glicemico è strettamente legato allo sviluppo delle complicanze, sono stati individuati degli obiettivi glicemici da conseguire nei pazienti diabetici adulti. Negli *Standard Italiani per la cura del diabete* [60] figurano:

- HbA1c < 53 mmol/mol (7,0%) nei pazienti con complicanze e <48 mmol/mol (6,5%) nei soggetti che ancora non ne presentano, per prevenirne l'insorgenza. Possono essere tollerati livelli più elevati (7-8%) in soggetti con ridotta aspettativa di vita per età avanzata o comorbidità, oppure in caso di diabete di lunga durata con precedenti cardiovascolari o inadeguato compenso glicemico.
- Glicemia a digiuno e pre-prandiale di 80-130 mg/dL.
- Glicemia post-prandiale (mezzora dopo l'inizio del pasto) < 160 mg/dL, qualora non vi sia eccessivo rischio di ipoglicemia o di altri effetti collaterali.

L'ADA, *American Diabetes Association*, sottolinea l'importanza del trattamento dei concomitanti fattori di rischio cardiovascolare, in particolare del controllo della pressione e della dislipidemia, indicando come *targets*:

- Pressione sanguigna <140/80 mmHg.
- Colesterolo LDL <100 mg/dL; Trigliceridi <150 mg/dL; Colesterolo HDL >40 mg/dL negli uomini e >50 mg/dL nelle donne.

### 1.7.1 Modifica dello stile di vita

L'intervento sullo stile di vita risulta di primaria importanza e si esplica attraverso l'adozione di misure atte alla riduzione del peso in eccesso, allo stimolo all'attività fisica regolare, possibilmente di tipo aerobico e all'alimentazione equilibrata povera di carboidrati e di grassi, ma ricca di fibre. In particolare, l'ADA definisce *Terapia medica nutrizionale* (TMN) il bilancio ottimale tra l'apporto calorico e gli altri aspetti della terapia del diabete (insulina, attività fisica e calo ponderale). Nel paziente con diabete di tipo 1 l'obiettivo della TMN è il bilanciamento dell'apporto calorico sia temporalmente che quantitativamente con un'appropriata somministrazione insulinica, cercando di minimizzare l'incremento ponderale che può conseguire al trattamento insulinico intensivo.

### 1.7.2 Terapia insulinica

Nel diabete di tipo 1, il fulcro del trattamento è la terapia sostitutiva insulinica, che mira al controllo della concentrazione di glucosio nel sangue, contenendo per quanto possibile il rischio di ipoglicemia. Lo schema di terapia attualmente raccomandato è quello *basal-bolus*, che consiste nella somministrazione intensiva di insulina a breve durata d'azione ai pasti in associazione a un'insulinizzazione basale, ottenuta tramite somministrazione sottocutanea di insulina ad azione lenta o attraverso l'infusione sottocutanea continua di insulina ad azione rapida grazie a microinfusori [61].

Generalmente l'insulina basale viene somministrata a livello dei glutei o delle cosce, zone dove la velocità di assorbimento è minore, mentre per la rapida vengono preferiti l'addome e le braccia. Le varie iniezioni vengono eseguite in maniera circolare con rotazione in senso orario o antiorario nella zona, per evitare l'interessamento continuo dello stesso punto che potrebbe generare un quadro di lipodistrofia, complicanza che si verifica nel 25-30% dei pazienti con diabete di tipo 1 [62].

Nel soggetto non diabetico l'andamento glicemico è fluttuante, caratterizzato da una secrezione insulinica basale associata a dei bruschi picchi postprandiali.

Nel paziente diabetico è quindi fondamentale compensare il deficit secretivo somministrando una quota di insulina esogena che comprenda sia la quantità basale normalmente presente nel sangue, che quella rilasciata in corrispondenza dei pasti (Figura 11). L'obiettivo dello schema *basal-bolus* è infatti quello di simulare la secrezione insulinica fisiologica.

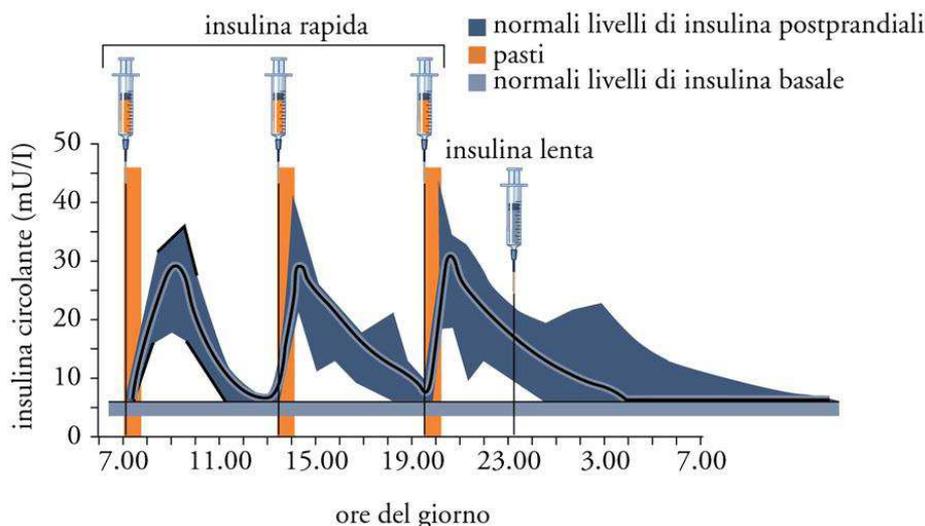


Figura 11: Schema della terapia insulinica basal-bolus con regime a componenti multiple.

Le attuali preparazioni insuliniche sono prodotte mediante tecnologia del DNA ricombinante e consistono in sequenze di amminoacidi di insulina umana o varianti di questa. Vanno distinte insuline (Figura 12) [63]:

- Ad azione ultrarapida: *Lispro, Aspart e Glulisine*.  
Tali analoghi devono essere iniettati 10-15 minuti prima del pasto, dal momento che presentano un tempo di latenza di circa 5-10 minuti. Il picco di azione si verifica in un tempo che varia tra i 30-90 minuti e la durata media è di 4 ore. La somministrazione di questo tipo di insulina va rapportata all'apporto di carboidrati con la dieta ed è finalizzata a promuovere l'utilizzazione e l'accumulo di glucosio.
- Ad azione rapida: *umana regolare*.
- A durata d'azione intermedia: *NPH*, non più utilizzata.
- A lunga durata d'azione: *Degludec, Glargina, Detemir*.

Gli analoghi lenti hanno solitamente emivita superiore alle 24 ore e sono in grado di mantenere molto stabile la glicemia durante tutta la giornata in condizioni di digiuno, così da riservare l'ultrarapida ai pasti. Hanno un ruolo fondamentale nella regolazione di glicogenolisi, gluconeogenesi, lipolisi e chetogenesi. Detemir è una delle poche insuline basali che può essere usata in una paziente diabetica in gravidanza, dal momento che la sua assunzione non presenta un aumento del rischio di malformazioni fetali.

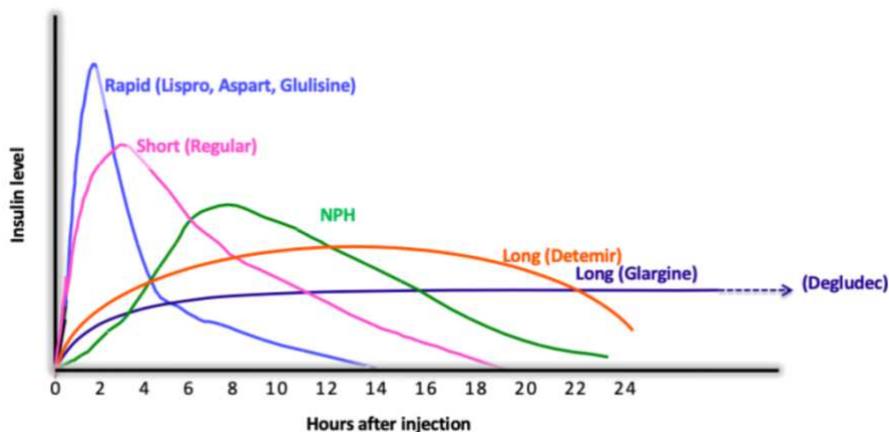


Figura 12: Durata d'azione post-iniezione degli analoghi dell'insulina.

Nei soggetti con diabete mellito di tipo 1, il trattamento con gli analoghi insulinici si associa a minor rischio di ipoglicemia e di aumento di peso, nonché a una minore HbA1c se paragonati all'utilizzo delle insuline umane, impiegate in passato [64].

Il fabbisogno giornaliero di insulina (*Total Daily Dose*), comprensivo sia della quota prandiale che di quella basale si stabilisce sulla base del fabbisogno insulinico del singolo paziente. Generalmente si considera una dose di 0,4-1,0 UI/kg/die: il 50% di questo fabbisogno può essere fornito con l'iniezione di insulina basale mentre la quota rimanente viene ripartita nei 3 pasti principali, dipendentemente dal quantitativo dei carboidrati assunti.

È fondamentale la titolazione sulla base del diario glicemico, facendo riferimento in particolare alla glicemia a digiuno del mattino o alle glicemie rilevate ai pasti [65].

All'interno del suddetto regime che prevede la combinazione di insulina basale e di insulina rapida pre-prandiale, sono possibili variazioni delle dosi di quest'ultima per adeguarsi agli anticipi dei consumi alimentari e all'attività fisica (insulina correttiva) [66].

Per ogni paziente esiste un fattore di sensibilità insulinica, che consente di calcolare quante unità devono essere aggiunte alla dose abituale per correggere una eventuale iperglicemia pre-prandiale.

Un altro regime a componenti multiple è rappresentato dall'infusione sottocutanea continua di insulina tramite microinfusore. Tale dispositivo può erogare insulina in maniera costante o programmata per fasce orarie. Il sistema permette di regolare velocità multiple di infusione basale, utile per soddisfare le richieste notturne rispetto alle diurne (fenomeno *dawn*, con aumento della glicemia nelle prime ore del mattino) e per adeguare il fabbisogno in relazione all'attività fisica. Spesso nei sistemi più avanzati vi è una connessione diretta con il glucometro, che fa sì che il microinfusore riceva informazioni sulla glicemia in tempo reale e possa autonomamente interrompere la liberazione di insulina quando la glicemia scende al di sotto di una certa soglia (*low-glucose suspend*). L'insulina post-prandiale viene rilasciata dal dispositivo su istruzione del paziente. Questo tipo di sistema si serve unicamente di insulina rapida, per cui in caso di interruzione dell'infusione, dovuta a ostruzione del dispositivo o a disconnessione, vi è alto rischio di iperglicemia o chetoacidosi. Per tali ragioni, questo tipo di tecnologia va riservato unicamente a pazienti adeguatamente istruiti con caratteristiche cliniche definite: in particolare, è indicata nei soggetti con HbA<sub>1c</sub> persistentemente superiore al target desiderabile nonostante la terapia intensiva multi-iniettiva *basal-bolus* e/o la presenza di ipoglicemia ricorrente, grave o notturna [67].

## 1.8 Valutazione del controllo glicemico

La valutazione del controllo glicemico si basa essenzialmente sulla valutazione dell'emoglobina glicata e sull'automonitoraggio glicemico capillare (BMG, *blood glucose monitoring*) o il monitoraggio in continuo (CGM, *continuous glucose monitoring*).

Queste due misurazioni risultano complementari, in quanto le determinazioni eseguite dal paziente forniscono un quadro del controllo glicemico a breve termine, mentre l'HbA1c riflette il controllo medio dei 2-3 mesi precedenti. L'analisi in parallelo consente al medico di verificare l'adeguatezza del piano di automonitoraggio, la precisione del glucometro utilizzato per la rilevazione, la presenza di ipoglicemie o iperglicemie post-prandiali e la variabilità glicemica.

A livello pratico, grazie soprattutto al monitoraggio BCM/CGM i pazienti sono in grado di valutare le proprie risposte alla terapia insulinica e di realizzare se gli obiettivi glicemici vengono raggiunti in sicurezza. Inoltre, tali sistemi risultano utili per guidare la terapia nutrizionale e l'attività fisica, prevenire gli episodi di ipoglicemia e aiutare nella gestione farmacologica.

#### 1.8.1 Emoglobina glicata (HbA1c)

Studi investigativi negli anni '70 hanno dimostrato la capacità del glucosio di legarsi a molte proteine. Nell'emoglobina, la glicazione può verificarsi in maniera irreversibile in più siti, in particolare a livello della valina N-terminale della catena  $\beta$  [68]. Nel tempo il glucosio si lega all'emoglobina a una velocità dipendente dalla sua concentrazione prevalente nel sangue. Circa l'1% degli eritrociti viene distrutto ogni giorno a parità di rigenerazione, quindi A1C è un riflesso dinamico della concentrazione sanguigna media di glucosio nei 2/3 mesi precedenti, avendo i globuli rossi un'emivita di 120 giorni [69].

La misurazione dell'HbA1c rappresenta il metodo standard per la valutazione del controllo glicemico a lungo termine. Esistono vari metodi di misurazione, ma lo standard di riferimento è rappresentato dall'HPLC (*High-performance liquid chromatography*) e il valore rilevato, a partire dal 2013, non viene più espresso in unità derivate (%) ma in unità IFCC (mmol/mol) (Tabella I). L'intervallo di riferimento nei soggetti sani è compreso tra 20 e 42 mmol/mol e un incremento dell'1% dell'HbA1c si traduce in un aumento di circa 2 mmol/L di glicemia [71].

HbA <sub>1c</sub> valori attuali (allineati al DCCT) %	HbA <sub>1c</sub> valori nuovi (allineati all'IFCC) mmol/mol
4,0	20
5,0	31
6,0	42
7,0	53
8,0	64
9,0	75
10,0	86

Tabella I: corrispondenza tra i valori di HbA1c allineati al DCCT e al IFCC.  
SID, 2018.

Le linee guida indicano che la valutazione dell'HbA1c nei pazienti con diabete mellito deve essere effettuata non meno di 2 volte l'anno, generalmente ogni 3 mesi nei pazienti in cui l'obiettivo terapeutico non è ancora stato raggiunto o non è stabile nel tempo, o nei quali sia stata modificata la terapia [70]. Inoltre, nelle raccomandazioni presenti negli *Standards of Medical Care in Diabetes – 2022*, viene indicato di:

- Considerare come target un valore di HbA1c negli adulti diabetici (escluse le gestanti) <7% (53 mmol/mol), in assenza di episodi di ipoglicemia significativa.;
- Accettare valori compresi tra 7 e 8 % (53-64 mmol/mol) in pazienti con aspettativa di vita limitata o con rapporto rischio/beneficio non favorevole.

Nella valutazione dell'HbA1c, che negli anni si è affermato come marker glicemico primario, è importante tenere conto dei fattori interferenti che possono alterarne il valore [71]. Tra i fattori più comuni figurano i cambiamenti nella sopravvivenza degli eritrociti: per esempio, in presenza di anemia sideropenica o pernicioso non trattata, i valori di HbA1c risultano falsamente elevati per la presenza di un basso turnover eritrocitario e l'aumento del numero di globuli rossi più vecchi; invece, in presenza di condizioni emolitiche (comprese quelle causate da emoglobinopatie) o emorragiche i valori di HbA1c risultano falsamente bassi a causa del rapido turnover che determina una maggiore percentuale di globuli rossi giovani in circolo.

In condizioni di insufficienza renale cronica, possono verificarsi falsi aumenti di HbA1c a causa di elevate quantità di urea in circolo o false riduzioni nei pazienti in emodialisi o in trattamento con eritropoietina.

Un'altra condizione da citare è il diabete gravidico: spesso si riscontrano valori bassi di HbA1c durante il secondo trimestre per la diminuzione dell'emivita eritrocitaria e valori alti intorno al terzo trimestre a causa della sideropenia.

Infine, alterazioni si riscontrano anche in pazienti con fibrosi cistica, a causa dello stato di infiammazione cronica che aumenta il turnover degli eritrociti.

Oltre alle limitazioni di cui sopra, diversi studi hanno dimostrato la presenza dei cosiddetti "fenotipi della glicazione" spesso legati all'etnia, che coinvolgono maggiormente gli afroamericani, ispanici e asiatici, rispetto ai caucasici.

Alla base delle differenze razziali vi sono differenze di glicazione intracellulare e della sopravvivenza degli eritrociti [72].

Infine, è bene ricordare che stato riscontrato un aumento annuo dello 0,03% dell'HbA1c, senza evidenza di intolleranza glucidica, a testimonianza dell'influenza data dall'età [73].

L'HbA1c fornisce una misura indiretta della glicemia media (eAG). Tuttavia, un recente studio che ha messo in relazione la glicemia media misurata con CGM rispetto a quella ricavata dal valore dell'HbA1c ha dimostrato che la glicata può sotto- o sovrastimarne il valore. Tali discrepanze, oltre alle condizioni sopra descritte, sono da ricondurre alla variabilità glicemica, non valutabile con la sola valutazione dell'HbA1c. Pertanto, per una ottimizzata gestione terapeutica risulta fondamentale l'associazione con BGM/CGM [74].

Sono disponibili altre variabili per la valutazione della glicemia media, come la fruttosamina e l'1,5-anidroglicitolo, ma la loro traduzione in livelli medi di glucosio e il loro significato prognostico non sono così evidenti.

### 1.8.2 Automonitoraggio della glicemia capillare (Self-BGM)

L'autocontrollo glicemico domiciliare inteso come misurazione della glicemia capillare, interpretazione dei risultati e conseguenti interventi terapeutici di miglioramento, costituisce parte integrante della terapia del paziente con diabete mellito di tipo 1 e risulta di fondamentale importanza nella gestione della malattia, sia per ottenere un buon controllo metabolico con il fine ultimo di ridurre il rischio di insorgenza di complicanze microangiopatiche, che per ridurre il rischio di ipoglicemie [75].

Ai pazienti con diabete di tipo 1 viene raccomandato il controllo della glicemia prima di ogni somministrazione di insulina per poterne aggiustare il dosaggio sulla base del valore rilevato e del contenuto di carboidrati del pasto successivo. Nelle raccomandazioni emesse dall'ADA nel 2022 si sottolinea come il controllo delle glicemie capillari dovrebbe essere eseguito sistematicamente prima dei pasti e degli spuntini, occasionalmente dopo i pasti principali, prima di andare a letto e prima dell'esecuzione di un esercizio fisico, e sempre nel sospetto di ipoglicemia, dopo la correzione delle ipoglicemie e prima di guidare. Studi storici hanno dimostrato che l'aumento della frequenza nell'autocontrollo si associa a un miglior controllo glicemico [76].

### 1.8.3 Monitoraggio della glicemia interstiziale (CGM e FGM)

Questo tipo di rilevazione avviene grazie a innovativi strumenti che, tramite un ago-sensore inserito nel sottocute, misurano continuamente la concentrazione interstiziale del glucosio, inviando a una unità esterna una grande quantità di dati relativi alle glicemie puntuali e alle variazioni nelle 24 ore.

Tali dispositivi spesso richiedono una periodica calibrazione con i valori del glucosio plasmatico per consentire la conversione del segnale bioelettrico ricevuto in un valore numerico.

Il glucosio interstiziale richiede un certo intervallo di tempo per equilibrarsi con quello plasmatico (*lag time*) e tale ritardo è direttamente proporzionale alla variazione glicemica.

Per tale motivo ai pazienti viene raccomandato di effettuare una rilevazione della glicemia capillare ogni volta che il valore rilevato dal dispositivo risulta in rapida modificazione o prima di prendere una decisione terapeutica come l'iniezione di un bolo di insulina rapida, o quando non vi sia corrispondenza con i sintomi percepiti.

Dall'immissione del primo dispositivo sul mercato nel 1999, numerosi studi hanno evidenziato effetti benefici sul compenso metabolico e sulla frequenza delle ipoglicemie [77]. Negli ultimi anni, il CGM rappresenta il metodo standard per il monitoraggio della glicemia per la maggior parte degli adulti con diabete di tipo 1 in terapia insulinica intensiva [78]. I dati rielaborati dall'unità esterna possono essere visualizzati retrospettivamente oppure in tempo reale (*real-time CGM*, RT-CGM), con visualizzazione diretta di grafici relativi all'andamento glicemico delle ultime ore. Attualmente, ci sono tre sensori CGM sul mercato: Dexcom, Freestyle Libre e Medtronic.

Le informazioni rese disponibili da tali apparecchi oltre a consentire una migliore interpretazione del profilo glicemico, forniscono nuovi indicatori di compenso come la percentuale di tempo in *range* terapeutico (*time in range*, TIR).

Inoltre, l'analisi dei dati del sensore, il CGM consente al paziente di comprendere in maniera diretta come la dieta, l'esercizio fisico, i farmaci e lo stile di vita influiscano sui propri livelli glicemici, mettendolo nella condizione di prendere decisioni più consapevoli e di acquisire un maggior senso di fiducia nell'autogestione della terapia e della propria condizione.

Nei pazienti con diabete di tipo 1 in terapia insulinica intensiva, il CGM riduce l'HbA1c dello 0,3% se applicato in modalità continuativa [79]. Tale riduzione è stata rilevata anche in un recente studio multicentrico nel quale sono stati analizzati soggetti con diabete di tipo 1 in terapia con microinfusore [80].

Una particolare modalità di monitoraggio del glucosio interstiziale è il *Flash Glucose Monitoring* (FGM), caratterizzato dalla rilevazione della glicemia *on demand* (Figura 13). Il sensore utilizzato (spesso il Freestyle Libre) non necessita di calibrazioni quotidiane su sangue capillare e l'ago inserito nel sottocute richiede una sostituzione ogni 14 giorni.



*Figura 13: Illustrazione del meccanismo di funzionamento di FGM.  
Ang E et Al: Flash glucose monitoring (FGM): A clinical review on glycaemic outcomes and impact on quality of life. J Diabetes Complications 2020.*

L'esperienza dimostra che l'impiego di FGM può contribuire a un miglioramento della qualità di vita del paziente con diabete mellito di tipo 1. Trattandosi comunque di un dispositivo tecnologico sofisticato, è fondamentale un'adeguata formazione del paziente per la corretta interpretazione e utilizzazione.

Grazie a tale dispositivo è possibile ottenere una rielaborazione delle scansioni eseguite dal paziente su periodi prolungati, generando un report nel quale figura il "Profilo Glicemico Ambulatoriale" (*ambulatory glucose profile, AGP*), che fornisce la sintesi dell'andamento glicemico nel corso di una giornata "tipo" rappresentativa del periodo temporale esaminato, unitamente a una serie di rielaborazioni statistiche standardizzate (Figura 14) [81].

1. Number of days CGM device is worn (recommend 14 days)	
2. Percentage of time CGM device is active (recommend 70% of data from 14 days)	
3. Mean glucose	
4. Glucose management indicator	
5. Glycemic variability (%CV) target $\leq 36\%^*$	
6. TAR: % of readings and time $>250$ mg/dL ( $>13.9$ mmol/L)	Level 2 hyperglycemia
7. TAR: % of readings and time 181–250 mg/dL (10.1–13.9 mmol/L)	Level 1 hyperglycemia
8. TIR: % of readings and time 70–180 mg/dL (3.9–10.0 mmol/L)	In range
9. TBR: % of readings and time 54–69 mg/dL (3.0–3.8 mmol/L)	Level 1 hypoglycemia
10. TBR: % of readings and time $<54$ mg/dL ( $<3.0$ mmol/L)	Level 2 hypoglycemia

*Figura 14: Metriche standardizzate del CGM.  
ADA, 2022.*

Tra le varie metriche, gli indicatori più importanti forniti dal CGM sono la glicemia media, TIR (*time in range*) e GMI (*glucose management indicator*), di cui si parlerà nel capitolo successivo.

TIR esprime la percentuale di tempo trascorsa dal paziente nell'intervallo di euglicemia compreso tra 70 e 180 mg/dL durante un periodo di 24 ore.

Si tratta di una misura composita del controllo glicemico, privilegiata tra le altre provenienti dal CGM per la sua semplicità interpretativa e la capacità di fornire informazioni di estrema utilità nella pratica clinica, in aggiunta alla valutazione dell'HbA1c. Nelle diverse categorie di pazienti vengono proposti TIR differenziati (Figura 15).

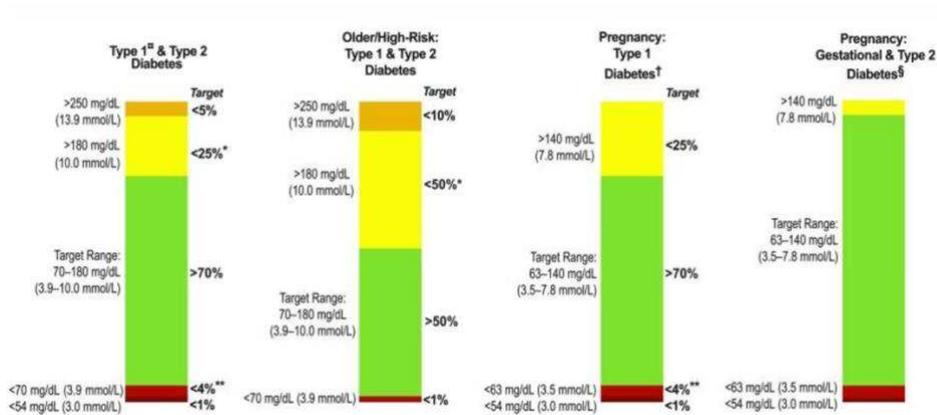


Figura 15: Target range suddivisi per popolazione.  
ADA, 2019.

Gli studi dimostrano una correlazione tra TIR e HbA1c: in particolare è stata dimostrato un allineamento tra un valore di HbA1c di 7% e TIR > 70% [82, 83]. Inoltre, nuovi dati supportano la premessa che l'aumento percentuale di TIR si correli con la riduzione del rischio di sviluppo di complicanze nel paziente con diabete mellito di tipo 2 [84, 85, 86].

Ulteriori metriche interessanti sono il tempo al di sopra (*time above range* -TAR, >180 mg/dL) e al di sotto (*time below range* - TBR, <70 e <54 mg/dL) dell'intervallo glicemico ideale, utili per aggiustare il regime terapeutico, e la variabilità glicemica (*glycemic variability*, GV), solitamente espressa tramite il calcolo del coefficiente di variazione percentuale.

L'AGP *report* costituisce pertanto un software avanzato in grado di riassumere statisticamente i dati sulla glicemia raccolti in più giorni, permettendone una visualizzazione grafica con un'interfaccia *user-friendly*. Vengono generati pattern glicemici giornalieri di immediata comprensione, consentendo di individuare le più piccole anomalie nel metabolismo glicemico in condizioni di vita reale. Nella curva dell'AGP è possibile identificare quattro fasce, indicative della distribuzione in percentili dei valori glicemici.

La linea mediana mostra il valore medio della glicemia (50° percentile): tale tracciato idealmente dovrebbe rimanere confinato all'interno del *target range*. Le fasce immediatamente al di sopra e al di sotto (rispettivamente 25° e 75°) indicano lo scarto interquartile e le fasce più esterne (5° e 95°) rappresentano le massime escursioni glicemiche: più risulta ampia quest'ultima fascia, maggiore è la variabilità glicemica [87] (Figura 16).

## AGP Report: Continuous Glucose Monitoring

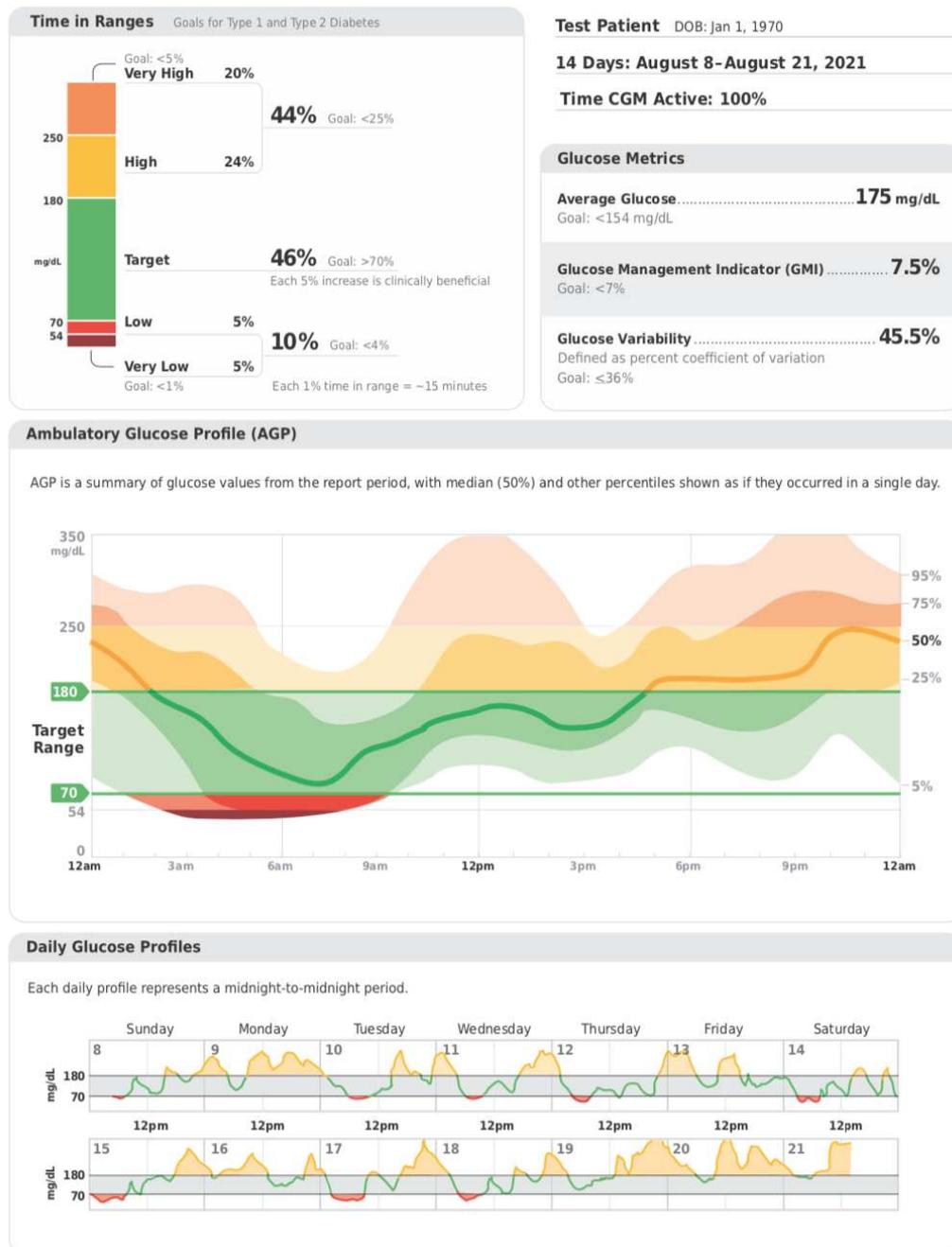


Figura 16: Esempio di AGP report.  
ADA, 2022.

### 1.9 Variabilità glicemica

Gli standard per il controllo glicemico sono cambiati a seguito della pubblicazione dei risultati del *Diabetes Control and Complications Trial* nel 1993, il quale ha dimostrato che nel paziente con diabete mellito di tipo 1 un controllo glicemico più intensivo determina una riduzione di oltre il 50% di insorgenza di complicanze

microvascolari. Da quasi 30 anni, tale approccio clinico rappresenta lo standard di cura per il paziente diabetico [88].

Per un controllo glicemico esaustivo è necessario controllare contemporaneamente l'esposizione e la variabilità glicemica. Per definizione, l'esposizione rappresenta la media delle glicemie in un determinato periodo di tempo, mentre la variabilità rappresenta la frequenza e l'ampiezza della fluttuazione attorno alla media dei valori glicemici del paziente (Figura 17).

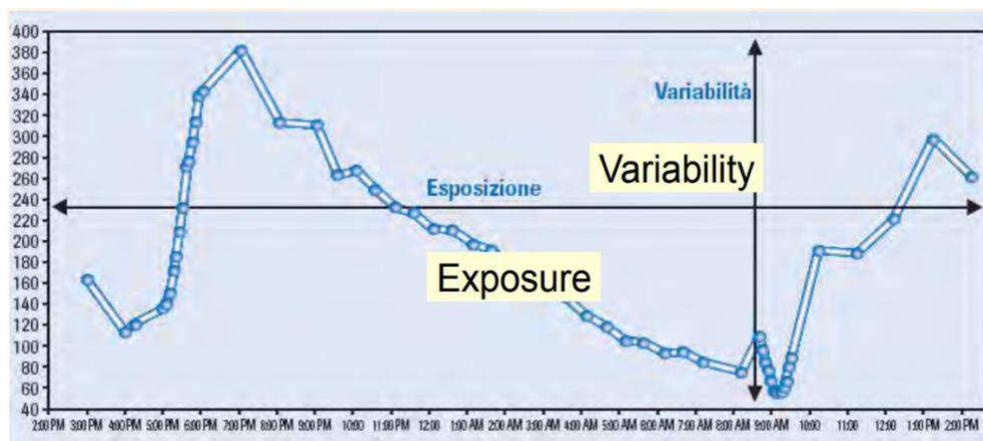


Figura 17: Relazione tra esposizione e variabilità glicemica.

L'esposizione glicemica viene tradizionalmente valutata tramite l'HbA1c, che riflette il controllo glicemico a lungo termine fornendo una stima della glicemia media del paziente e predicendo lo sviluppo di complicanze.

L'emoglobina glicata è proporzionale al valore medio della glicemia nei 120 giorni precedenti alla rilevazione, corrispondenti all'emivita degli eritrociti nel sangue. Pertanto, riflette l'esposizione globale del paziente all'iperglicemia, ma non la variabilità glicemica nel breve periodo: infatti, il 50% dell'HbA1c è determinato dai valori glicemici del mese precedente alla determinazione, il 25% nei 30-60 giorni prima e il restante 25% negli ultimi 60-120 giorni.

Ne consegue che HbA1c non si possa considerare un indicatore esaustivo di variabilità glicemica, in quanto uno stesso valore può essere conseguente a fluttuazioni diverse (Figura 18).

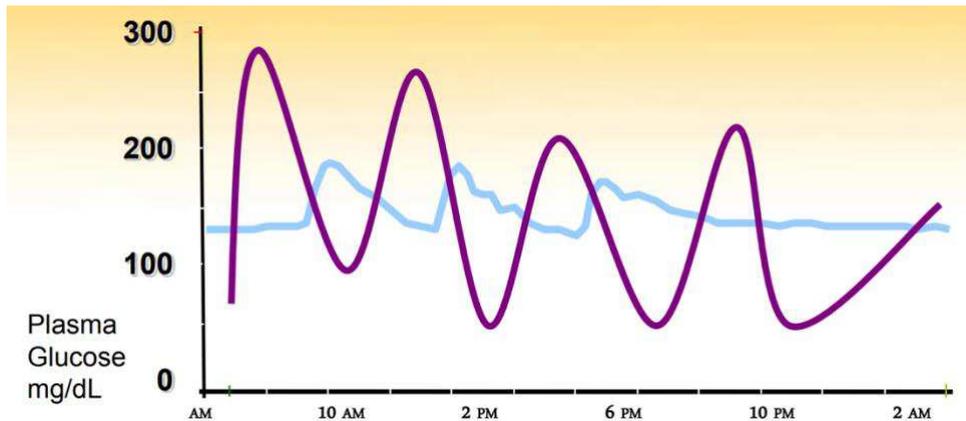


Figura 18: Oscillazioni glicemiche a parità di valore di HbA1c.

L'HbA1c costituisce l'unico marcatore glicemico a lungo termine standardizzato a livello mondiale; tuttavia, è importante riconoscere che non tutti i pazienti possono essere monitorati esaustivamente da tale parametro. Estremamente innovative in questo senso sono le metriche derivate dal CGM, le quali potenzialmente offrono informazioni sulla variabilità glicemica, che si sospetta possano spiegare i diversi tassi di complicanze diabetiche che talvolta si riscontrano in pazienti con simili valori di HbA1c o di glicemia media.

La variabilità glicemica (*glycemic variability, GV*), definita come una componente integrale dell'omeostasi del glucosio, sta emergendo come una metrica importante da considerare nella pratica clinica. La sua rilevanza è testimoniata dalle numerose evidenze accumulate, le quali suggeriscono una associazione, come fattore di rischio indipendente, con l'aumentato rischio di complicanze macro- e microvascolari diabetiche, di ipoglicemia, del tasso di mortalità e di altri eventi clinici avversi [89]. Costituisce un indicatore glicemico di tipo qualitativo che può essere espresso tramite vari indici (Figura 19).

Indicatori qualitativi	
1.	Indici statistici di variabilità/fluttuazione:
	- numero delle ipo e iperglicemie registrate
	- deviazione standard della glicemia
	- $HbA_{1c} \times DS/100$
	- coefficiente di variazione della glicemia
	- range medio della glicemia circadiana
	- range interquartile
	- valore M di Schlichtkrull
	- ampiezza media delle escursioni glicemiche (MAGE)
	- indice di labilità glicemica
	- LBGI ( <i>Low Blood Glucose Index</i> )
	- HBGI ( <i>High Blood Glucose Index</i> )
	- ADDR ( <i>Average Daily Risk Range</i> )
2.	Indici biologici di variabilità/fluttuazione:
	- 1,5-anidroglicotolo
	- metilglicosale

*Figura 19: Indici di variabilità glicemica.*  
Cignarelli, et Al: *Gli Indicatori glicemici. Il Diabete 2008.*

Generalmente i più comunemente utilizzati sono la deviazione standard (*standard deviation*, SD) della glicemia, il coefficiente di variazione espresso in percentuale (%CV) (che si calcola dividendo la DS per la glicemia media), l'ampiezza media delle escursioni glicemiche (MAGE) e il *range* interquartile.

Considerando il CV, si parla di variabilità glicemica bassa se questo risulta <36% e viceversa [90].

Accanto a questi, estremamente innovativo è il GMI (*Glucose Management Indicator*), un nuovo termine destinato a esprimere il concetto di emoglobina glicata stimata (eA1c). Si tratta di una misura che converte la glicemia media misurata con il CGM in un valore stimato di HbA1c, tramite le seguenti formule:

$$GMI(\%) = 3,31 + 0,02392 * \left[ mean\ glucose\ in\ \frac{mg}{dL} \right]$$

$$GMI\left(\frac{mmol}{mol}\right) = 12,71 + 4,70587 * \left[ mean\ glucose\ in\ \frac{mmol}{L} \right]$$

Tale parametro di controllo glicemico è stato calcolato derivando la retta di regressione della relazione tra glicemia media, misurata mediante sistema DEXCOM in una popolazione di 528 individui derivati da 4 diversi trials, e l'HbA1c misurata simultaneamente in laboratorio su sangue venoso.

Il GMI fornisce una misura utile per collegare le metriche CGM all'HbA1c misurata in laboratorio e rafforza la necessità di una gestione continuativa del diabete e del coinvolgimento attivo dei pazienti [91].

L'importanza di tale parametro è testimoniata dal fatto che figure all'interno delle ultime raccomandazioni emesse dall'ADA relativamente al monitoraggio glicemico. Infatti, negli *Standards of Medical Care in Diabetes – 2022*, viene suggerito di:

- Valutare il controllo glicemico tramite HbA1c o TIR e GMI ricavati da CGM almeno due volte l'anno nei pazienti che stanno raggiungendo gli obiettivi del trattamento e che hanno un controllo glicemico stabile;
- Valutare il controllo glicemico almeno trimestralmente e secondo necessità nei pazienti con compenso instabile o precario o nei quali la cui terapia sia stata modificata di recente senza raggiungimento dell'obiettivo terapeutico.

Secondo tali linee guida, TIR e GMI forniscono informazioni per una gestione del diabete più personalizzata della malattia e possono fungere da surrogato dell'HbA1c da utilizzare nella gestione clinica.

In conclusione, l'analisi della variabilità glicemica rappresenta un elemento aggiuntivo nella valutazione globale del controllo glicemico e può rappresentare una guida per il medico nella gestione della terapia e per il paziente nella prevenzione delle complicanze acute, in particolare ipoglicemiche, contribuendo a un miglioramento della qualità di vita.

### **1.10 *Advanced Glycation End-products (AGEs)***

L'iperglicemia, che costituisce il fattore patogenetico chiave nello sviluppo delle complicanze croniche del diabete mellito, agisce attraverso vari meccanismi, tra cui la glicazione non enzimatica.

Tale processo, che costituisce la reazione di Maillard, avviene fisiologicamente nell'organismo e aumenta all'aumentare dell'età. Tuttavia, diviene più frequente e incontrollato quando aumentano i livelli di glucosio nel sangue.

La reazione di Maillard può essere suddivisa in tre fasi. Nella fase iniziale lo zucchero riducente (generalmente glucosio ma anche fruttosio, ribosio o altri pentosi) si lega a un gruppo amminico libero presente in macromolecole (proteine, lipidi e acidi nucleici) per formare una aldimina labile (Base di Schiff), la quale subisce un riarrangiamento intramolecolare a pH fisiologico e temperatura ambiente che in circa 15-20 giorni consente la formazione di un composto stabile, il prodotto di Amadori. Tale reazione è influenzata in vivo da una serie di fattori, tra cui la durata e l'entità dell'iperglicemia, il turnover proteico, la permeabilità cellulare al glucosio e l'accessibilità degli amino gruppi. Nella fase intermedia, il prodotto di Amadori viene convertito in una serie di composti dicarbonilici estremamente reattivi, che nella fase finale subiscono una serie di altre reazioni, portando alla formazione irreversibile dei prodotti di glicazione avanzata. Nel dettaglio, gli AGEs possono derivare dall'autossidazione extracellulare e intracellulare del glucosio a gliosale, dalla decomposizione dei prodotti di Amadori in deossiglucosoni, e dalla frammentazione della gliceraldeide-3-fosfato a metilgliosale (Figura 20).

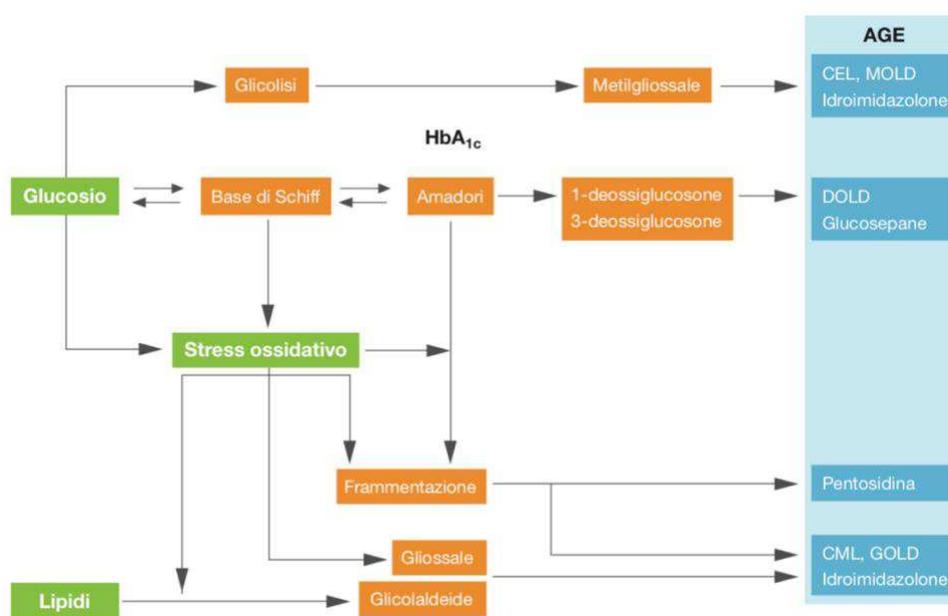
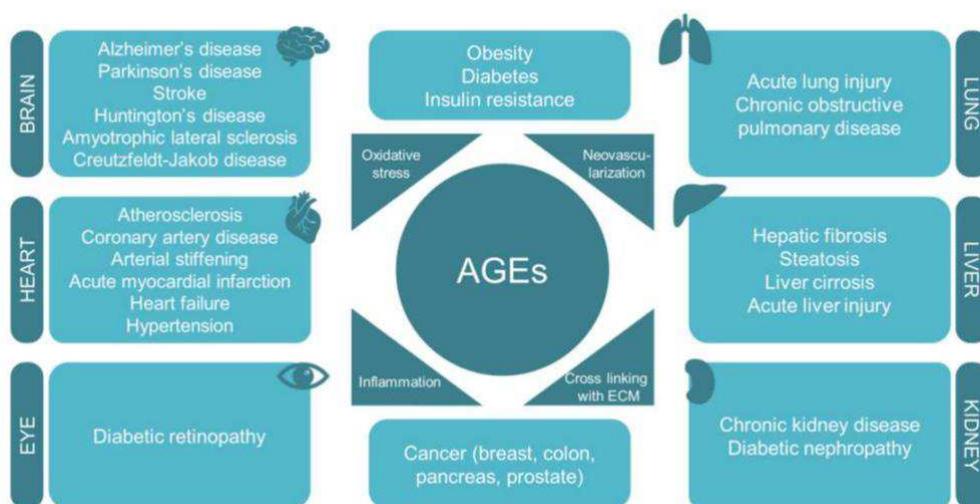


Figura 20: Schema della reazione di Maillard che porta alla formazione degli AGEs.  
Cignarelli, et Al: Gli Indicatori glicemici. Il Diabete 2008.

Pertanto, gli AGEs, tra cui vanno menzionati la carbossietillisina (CEL), la carbossimetillisina (CML) e l'idroimidazolone, sono delle molecole eterogenee e altamente tossiche derivate da modificazioni post-traduzionali non enzimatiche (glicazione e ossidazione) che avvengono di forma lenta e continua per tutta la vita e che tendono a depositarsi in vari tessuti, aumentandone la rigidità. Molti AGEs possiedono inoltre intrinseca fluorescenza.

Vari fattori possono accelerare la formazione e l'accumulo di AGEs a livello tissutale: tra i fattori endogeni oltre all'iperglicemia vanno citati l'invecchiamento, l'obesità, l'insufficienza renale cronica e le malattie infiammatorie e autoimmuni; tra quelli ambientali rilevante è il ruolo della dieta, del fumo di sigaretta e dello stile di vita sedentario [92].

Tali composti sono coinvolti nella patogenesi o nei meccanismi di danno caratteristici di varie malattie metaboliche e associate all'età per il loro intrinseco legame con lo stress ossidativo, la neovascolarizzazione, l'infiammazione e la capacità di formare *cross-links* con la matrice extra-cellulare, con conseguente danno d'organo [93] (Figura 21).



*Figura 21: Coinvolgimento degli AGEs nella patogenesi di varie patologie. Cepas V et Al: Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs). Antioxidants 2020.*

I principali meccanismi molecolari di danno operati degli AGEs sono:

- La formazione di *cross-links* con proteine come il collagene, con conseguente danno tissutale diretto come l'irrigidimento delle pareti vascolari.
- L'accumulo intracellulare nei macrofagi, nelle cellule muscolari lisce modificate (*foam cells*), nella stria lipidica e nella placca aterosclerotica.
- Il legame con specifici ligandi, come il recettore *scavenger* espresso a livello di monociti/macrofagi e dei linfociti T, responsabile della degradazione delle molecole senescenti, e il recettore RAGE, espresso anche a livello di cellule muscolari lisce, fibroblasti, cellule mesangiali, endoteliali e neuronali. In generale, il legame AGE-recettore determina una riduzione del processo di degradazione delle proteine tissutali e un aumento della produzione dei fattori di crescita con conseguente aumento della sintesi di matrice extracellulare. Il legame AGE-RAGE nello specifico è riconosciuto come il principale processo responsabile della generazione di ROS e dell'attivazione di fattori di trascrizione come NF- $\kappa$ B, il quale promuove la trascrizione di geni implicati nell'apoptosi e nella proliferazione, ma soprattutto di diversi mediatori infiammatori implicati nelle complicanze diabetiche (Figura 22). L'interazione AGE-RAGE attiva un circolo vizioso, in quanto l'aumentare dello stress ossidativo accelera la formazione degli stessi AGEs.

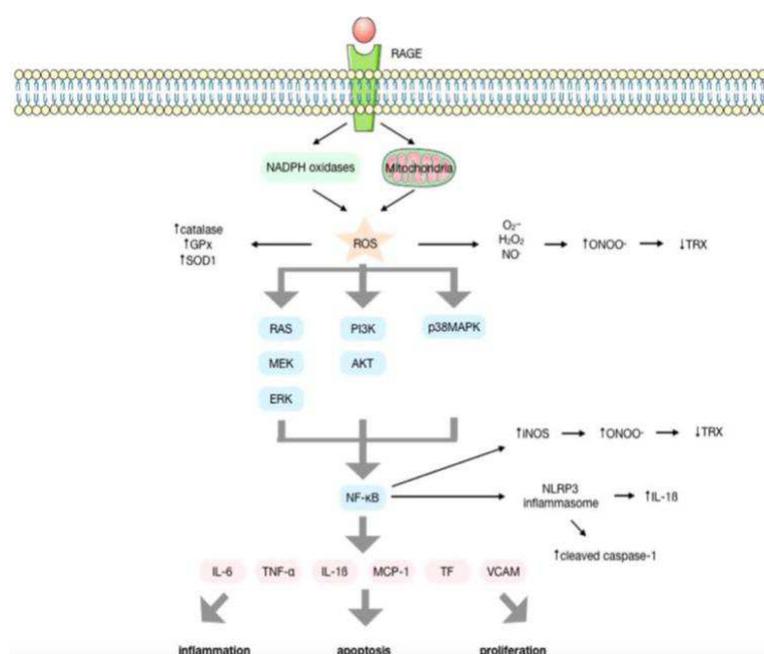


Figura 22: Pathway attivata dal legame AGE-RAGE.

Cepas V et Al: Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs). Antioxidants 2020.

In conclusione, nel diabete l'iperglicemia determina incremento e accelerazione della formazione degli AGEs, i quali costituiscono uno dei meccanismi responsabili del danno tissutale alla base dell'insorgenza delle complicanze macro e microangiopatiche caratteristiche della patologia e rappresentano un promettente marcatore di danno tissutale cronico.

### **1.11 *Skin Autofluorescence* (SAF)**

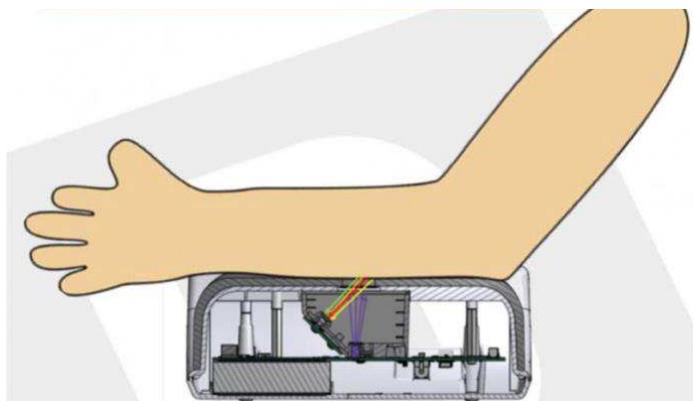
Tra le principali vie metaboliche coinvolte nella patogenesi delle complicanze diabetiche tardive, la misurazione degli AGEs sembra la più appropriata per valutare i reali effetti dell'iperglicemia cronica.

Tra i vari tessuti in cui si verifica il deposito dei prodotti terminali della glicazione non enzimatica e della ossidazione di proteine e grassi vi è la cute. A questo livello, la glicazione avanzata riguarda il collagene, una proteina che presenta un ricambio molto lento e un'emivita stimata di circa 10-15 anni [94]. Tale accumulo correla con la presenza di complicanze micro- e macrovascolari nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 [95], oltre che con il controllo glicemico a lungo termine: la loro valutazione tiene conto dell'esposizione cumulativa all'iperglicemia e della variabilità glicemica, superando potenzialmente i limiti dell'HbA1c come marcatore degli esiti diabetici [96].

Il deposito cutaneo degli AGEs è stato inizialmente valutato tramite biopsia; tuttavia, tale approccio invasivo e ad alto costo non risultava applicabile alla pratica clinica. Nel 2004 è stata poi dimostrata una correlazione tra il livello degli AGEs rilevato tramite fluorescenza e quello presente nelle biopsie cutanee, evidenziando come questa valutazione non invasiva possa essere altrettanto valida come biomarcatore per lo screening delle patologie legate agli AGEs, tra cui il diabete e le sue complicanze [97].

Uno dei dispositivi validati utilizzati nella valutazione della fluorescenza cutanea (*Skin Autofluorescence*, SAF) è l'AGE Reader. Si tratta di un *device* rivoluzionario di facile utilizzo, affidabile, preciso, clinicamente testato e mobile, in grado di fornire informazioni in tempo reale.

La rilevazione viene effettuata sul lato volare dell'avambraccio, verificando che si tratti di un'area di pelle normale, priva di eczema o cicatrici importanti, con minima esposizione alla luce solare e si esegue in meno di 30 secondi (Figura 23).



*Figura 23: Rilevazione della fluorescenza cutanea con AGE Reader.  
Diagnoptics® 2013.*

Il lettore a luce fluorescente contiene una lampada ad emissione di raggi UVA, che emette onde luminose con una lunghezza d'onda di picco di 360-370 nm; la luce riflessa emessa dalla pelle nell'intervallo 300-600 nm viene successivamente misurata da una serie di fotodiodi e rielaborata da un software di correzione del colore della pelle. La fluorescenza cutanea viene calcolata come rapporto tra la luce di eccitazione (300-420 nm) e quella di emissione (420-600 nm), motivo per cui il valore viene espresso in unità arbitrarie (AU); per semplificare, il numero risultante viene moltiplicato per 100. Non essendo state stabilite le esatte strutture molecolari che contribuiscono alla fluorescenza cutanea, la banda di lunghezza d'onda utilizzata dall'AGE Reader è stata selezionata in modo tale che il maggior contributo provenga dagli AGEs fluorescenti, che per la maggior parte presentano un'onda di eccitazione di 370 nm e una emissione di 440 nm [98].

Esistono dei fattori che influiscono nella lettura come la pigmentazione scura (fototipo V-VI di Fitzpatrick), l'uso di prodotti per la pelle come creme solari o abbronzanti, i tatuaggi o le alterazioni cutanee. Nella valutazione del dato è importante considerare l'età del paziente e la funzionalità renale; sembra esserci una correlazione anche con il digiuno e lo stile di vita (fumo) [99].

La regola di calcolo e i valori di riferimento sono stati ricavati da uno studio effettuato su una popolazione di soggetti sani con diverse età e sono stati pubblicati nel 2006 nel *Diabetes Care* (Tabella II).

<b>male</b>	<b>mean</b>	<b>sd</b>	<b>n</b>	<b>sem</b>
20-30	1.5978	0.2803	6	0.1145
30-40	1.7712	0.4358	17	0.1057
40-50	1.7527	0.3393	15	0.0876
50-60	2.0069	0.3018	13	0.0837
60-70	2.3257	0.5560	14	0.1486
70-80	2.8514	0.6553	14	0.1751
<b>female</b>	<b>mean</b>	<b>sd</b>	<b>n</b>	<b>sem</b>
20-30	1.7738	0.3436	8	0.1215
30-40	1.8961	0.4772	23	0.0995
40-50	1.8817	0.4188	29	0.0778
50-60	2.1463	0.3380	30	0.0617
60-70	2.6663	0.6492	16	0.1623
70-80	2.5375	0.3308	12	0.0955

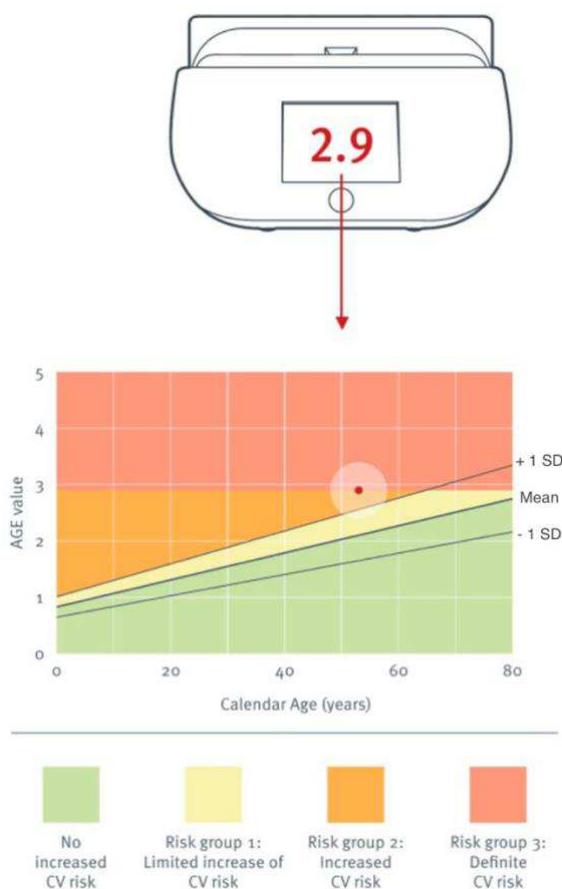
*Tabella II: Valori di riferimento di SAF nei soggetti sani.*

*Lutgers HL et Al: Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage. Diabetes Care 2006.*

Il valore ottenuto tramite utilizzo di AGE Reader aumenta considerevolmente con l'età sia nei soggetti sani che in quelli con diabete o malattia renale. L'età anagrafica è anche un indicatore in termini di rischio cardiovascolare, strettamente associato al diabete stesso. Le medie AGE-dipendenti fino a 1 deviazione standard (SD) costituiscono valori di riferimento per una certa età, ma possono essere considerate normali soltanto per il gruppo di età a cui fanno riferimento. Riferendosi al rischio cardiovascolare vanno distinti (Figura 24):

- Gruppo normale: nessun rischio cardiovascolare.  
Il soggetto rientra in questo gruppo se il valore di SAF misurato è inferiore o uguale alla media relativa all'età.
- Classe di rischio I: nessun aumento o aumento limitato di rischio cardiovascolare.  
Il valore misurato si colloca al di sopra della media, ma all'interno di 1 SD dalla media relativa all'età.
- Classe di rischio II: aumentato rischio cardiovascolare.  
Il valore misurato è superiore a 1 SD della media per età.
- Classe di rischio III: definitivo rischio cardiovascolare.

Il valore di SAF risulta maggiore o uguale a 2.9. In questi casi si suggerisce un intervento clinico intensivo.



*Figura 24: SAF e classi di rischio. Esempio di interfaccia grafica visualizzabile nel monitor del dispositivo.  
Diagnoptics® 2013.*

La variabilità interindividuale nella capacità di glicazione tissutale e nell'attività-espressione tissutale del recettore RAGE sono fattori limitanti che vanno ricordati [100].

Gli AGEs sono presenti anche significativamente in diversi alimenti, in quantità dipendenti dal tipo di cottura, soprattutto sulle superfici di cibi fritti o grigliati. Nei pazienti con diabete la restrizione degli AGEs con la dieta riduce i marcatori dello stress ossidativo e dell'infiammazione [101].



## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Nella pratica clinica esistono pazienti con diabete mellito di tipo 1 che presentano una discrepanza tra la media glicemica ricavata dall'HbA1c, espressione dell'esposizione a elevate concentrazioni di glucosio nel sangue nei precedenti tre mesi, e la media glicemica ricavata dalle metriche dei sistemi di monitoraggio glicemico tradizionale o in continuo. Tale discrepanza può avere un impatto sullo sviluppo delle complicanze croniche correlate al diabete, che sono responsabili della maggior parte delle morbidità e mortalità associate alla patologia e che sono dovute almeno in parte all'aumento della produzione e del deposito tissutale dei prodotti di glicazione avanzata (AGEs).

In letteratura esistono limitate evidenze che abbiano valutato simultaneamente l'associazione tra il controllo metabolico espresso dalla variabilità glicemica e il deposito tissutale degli AGEs.

Pertanto, lo scopo del presente studio è stato quello di valutare in una popolazione di pazienti con diabete mellito di tipo 1, la concordanza tra le metriche glicemiche ottenibili mediante l'utilizzo del sistema di monitoraggio in continuo *Flash Glucose Monitoring*, il controllo metabolico espresso dall'HbA1c e la presenza di prodotti di glicazione avanzata a livello cutaneo tramite rilevazione diretta della *Skin Autofluorescence*.



## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Selezione della popolazione coinvolta nello studio

In questo studio osservazionale trasversale monocentrico è stata effettuata un'analisi su 135 pazienti con diagnosi di Diabete Mellito di tipo 1 afferenti al Servizio di Diabetologia aggregato all'U.O. Malattie del Metabolismo dell'Azienda Ospedaliera - Università di Padova nel periodo compreso tra giugno 2020 e ottobre 2021.

#### 3.1.1 Criteri di inclusione

Per la selezione della popolazione oggetto di studio tra il totale dei soggetti con diagnosi Diabete Mellito afferenti al servizio, sono stati considerati i seguenti requisiti:

- Diagnosi di Diabete Mellito di tipo 1;
- Monitoraggio glicemico in continuo (*Flash Glucose Monitoring*, FGM);
- Età >18 anni.

#### 3.1.2 Criteri di esclusione

Del totale dei diabetici afferenti al servizio nel suddetto periodo, sono stati inizialmente reclutati 186 pazienti, alcuni dei quali tuttavia non hanno successivamente soddisfatto i requisiti di interesse per il nostro studio. I principali criteri di esclusione risultavano infatti:

- Insufficiente numero di scansioni glicemiche effettuate (cut-off arbitrario di almeno 1000 rilevazioni nei 3 mesi antecedenti alla visita ambulatoriale);
- Impossibilità di scaricare i diari glicemici relativi al periodo di interesse dalle piattaforme a disposizione.

Per tale motivo, su un totale di 186 pazienti candidati come potenziali unità di analisi, 51 pazienti non venivano inclusi nello studio e il lavoro ha coinvolto 135 soggetti.

### 3.2 Creazione del database

I dati di interesse per ogni singolo paziente sono stati ricavati dalla visita clinica di controllo, dalle informazioni presenti nella cartella clinica informatizzata *MyStar Connect* in uso presso il servizio, dalla piattaforma online *LibreView* per lo scarico dati del sensore Freestyle Libre® (Abbott Diabetes Care, Witney, Oxon, Regno Unito) e in rari casi dalle interviste telefoniche, a causa della concomitante pandemia di COVID-19.

In particolare, tali dati possono essere così categorizzati:

- Dati anagrafici
  - Et 
  - Genere
  
- Dati anamnestici
  - Anno di diagnosi del diabete (durata della malattia)
  
- Dati clinici (comorbidit  e fattori di rischio)
  - Peso (Kg) e *Body Mass Index* (BMI)
  - Pressione arteriosa sistolica e diastolica
  - Trigliceridi
  - Colesterolo totale, LDL e HDL
  - Dislipidemia
  - Distiroidismo
  - Ipertensione
  
- Controllo glicemico
  - HbA1c, %
  - Media glicemica nel periodo di interesse
  
- Valore di *Skin Autofluorescence* (SAF)

- Complicanze associate al diabete
  - Malattia cardiovascolare (CDV)
  - Macroangiopatia
  - Retinopatia diabetica
  - Neuropatia diabetica
  - Nefropatia diabetica
  - eGFR (con formula CDK-EPI)
  - Albuminuria (normo-, micro- e macroalbuminuria)
  
- Terapia insulinica
  - Dose totale
  - Insulina basale
  - Insulina prandiale
  
- Altri farmaci assunti
  - Metformina
  - Statina
  - Ace-inibitori
  - RAS bloccanti
  - Beta bloccanti
  - Diuretici

La rilevazione della fluorescenza cutanea (SAF) è stata effettuata in sede ambulatoriale tramite il dispositivo AGE Reader<sup>TM</sup> (DiagnOptics Technologies B.V., Groningen, Paesi Bassi) e il valore rilevato è stato espresso, conformemente alle linee guida, in unità arbitrarie (A.U.) [102] (Figura 25). La misurazione è stata effettuata sul lato volare dell'avambraccio, in assenza di fattori confondenti (cicatrici, lichenificazione o altre anomalie) ed è stata ripetuta tre volte a distanza di qualche minuto e nello stesso sito, per confermarne la lettura.



Figura 25: Dispositivo AGE Reader™ per la valutazione della fluorescenza cutanea.

Tutti i dati di cui sopra sono stati registrati al momento della misurazione della fluorescenza cutanea. Poiché le visite specialistiche si svolgevano ogni tre/quattro mesi presso il nostro centro, tali dati riflettono la condizione clinica e il controllo glicemico del paziente nei tre mesi immediatamente antecedenti la rilevazione.

Il valore della glicemia media nel periodo considerato è stato calcolato sulla base dei diari glicemici forniti dal monitoraggio in continuo della concentrazione di glucosio interstiziale tramite *Flash Glucose Monitoring* (FGM), mediante il sensore Freestyle Libre®. Nel dettaglio, sono stati analizzati i dati relativi agli ultimi tre mesi di misurazione.

Lo screening per le complicanze diabetiche è stato supportato dai seguenti esami svolti dai rispettivi specialisti del settore:

- Malattia cardiovascolare: anamnesi, esame obiettivo, ECG e 12 derivazioni ed ecocardiografia color doppler.
- Vasculopatia carotidea: ecografia bidimensionale dei tronchi sovraortici con quantificazione di eventuali stenosi.
- Retinopatia: esame oftalmologico del fondo dell'occhio in midriasi.
- Nefropatia: calcolo del rapporto albumina/creatinina (ACR) in un campione estemporaneo di urine per la valutazione dell'escrezione urinaria di albumina e stadiazione in normoalbuminuria (< 30 mg/g), microalbuminuria (30-299 mg/g) e macroalbuminuria ( $\geq$  300 mg/g). La velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) è stata determinata utilizzando la formula della Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) e definita come un valore < 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.

- Neuropatia: specifici test clinici e valutazione neurologica per la ricerca di disfunzione autonoma, in caso di sospetto.

### **3.3 Analisi statistica**

Le variabili continue (o quantitative) normalmente distribuite sono state espresse come media aritmetica  $\pm$  deviazione standard e per valutare la significatività statistica delle differenze riscontrate in gruppi indipendenti è stato applicato il test t di Student per dati non appaiati.

Le variabili categoriche (o qualitative) sono state rappresentate come frequenze assolute e il confronto tra i valori osservati e quelli attesi è stato effettuato attraverso il test Chi-quadrato di Pearson ( $X^2$ -test).

Infine, è stata effettuata un'analisi di regressione logistica binaria selezionando le complicanze macrovascolari come variabile indipendente e l'età, il gruppo di appartenenza e la dislipidemia come variabili indipendenti.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite software statistico SPSS (*Statistical Package for Social Science*), versione 26.

In tutti i casi la significatività statistica è stata definita come un valore di  $p < 0,05$  (test a due code).



## 4. RISULTATI

### 4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione

Sono stati analizzati 135 pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1, la cui durata media di malattia risultava pari a 21 (12.4) anni [media (SD)]. L'età media era pari a 44 anni, il 58% dei soggetti era di sesso maschile e il peso corporeo medio risultava pari a 74 (13.5) kg. Del totale dei pazienti, 125 erano in terapia insulinica con schema *basal bolus* e 10 in terapia mediante infusione insulinica sottocutanea continua con microinfusore (CSII). La terapia insulinica era costituita da 24 (9.8) U/die di insulina basale e 20 (8.3) U/die di insulina rapida, ripartita ai pasti principali. Il rapporto insulina totale per peso corporeo risultava pari a 0.54 (0.17) U/kg.

Il controllo glicemico intermedio espresso dai valori di HbA1c risultava pari a 7.7 (1.1) %. Un'analisi dei 2 valori precedenti di glicata, corrispondenti ai 9 mesi antecedenti la visita ambulatoriale dello studio, confermavano simili valori [7.7 (1.0) %]. La glicemia media derivata dai dati del sensore FSL nei 3 mesi precedenti la visita risultava pari a 168 (31.9) mg/dl. I soggetti presentavano, inoltre, valori di PAO sistolica media pari a 136 (16.4) mmHg e diastolica pari a 79 (10.2) mmHg. Il 34.2 % dei pazienti risultava affetto da ipertensione arteriosa in trattamento farmacologico con Ace-inibitori (27%), farmaci bloccanti del RAS (7%), beta bloccanti (7.4%) e diuretici (11.9 %).

Nel 17% dei pazienti era presente una diagnosi di ipotiroidismo (in primis Tiroidite di Hashimoto) in trattamento con adeguata terapia ormonale sostitutiva. Nel 49% dei soggetti era presente dislipidemia in trattamento farmacologico con statine. I valori di colesterolo plasmatico medio risultavano pari a 174 (27.3) mg/dl, il colesterolo HDL pari a 62.5 (14.9) mg/dl, il colesterolo LDL pari a 95.6 (25.1) mg/dl.

Tra le complicanze microangiopatiche del diabete la retinopatia diabetica era presente nel 42.4% dei soggetti, la neuropatia nel 48 % e la micro-macroalbuminuria nell'11%. I valori di eGFR risultavano pari a 103 (17.8) ml/min/1.73 m<sup>2</sup>.

L'1.7% dei pazienti presentava malattia renale cronica (*chronic kidney disease*, CKD). Tra le complicanze macroangiopatiche del diabete, il 5.2% dei pazienti presentavano una malattia cardiovascolare e il 14% una macroangiopatia.

La media dei valori di *skin autofluorescence* misurati durante la visita ambulatoriale risultava pari a 2.2 (0.6).

Tutti i dati di cui sopra sono riassunti in Tabella III.

	<b>Pazienti (n=135)</b>
<b>Dati anagrafici</b>	
Età, anni	44,4 (14.1)
Sesso (M), %	58
<b>Dati anamnestici</b>	
Durata del diabete, anni	21 (12.4)
<b>Comorbidità e fattori di rischio</b>	
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25,1 (3.6)
Peso corporeo, kg	74 (13.5)
Ipertensione, %	34.2
Pressione sistolica, mmHg	136 (16.4)
Pressione diastolica, mmHg	79 (10,2)
Dislipidemia, %	49
Colesterolo Totale, mg/dl	174 (27,3)
HDL colesterolo, mg/dl	62.5 (14.9)
Trigliceridi, mg/dl	78 (39,7)
LDL colesterolo, mg/dl	95,6 (25,1)
Distiroidismo, %	17
<b>Controllo glicemico</b>	
Glicemia (FSL), mg/dl	168 (31,9)
HbA1c, %	7.7 (1,1)
<b>Complicanze</b>	
Malattia cardiovascolare, %	5,2
CKD, %	1,7
eGFR, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	103 (17,8)
Micro-/macro-albuminuria, %	11
Retinopatia, %	42,4
Neuropatia, %	48
Macroangiopatia, %	14

<b>Terapia insulinica</b>	
Dose totale	40 (15.6)
Insulina basale	24 (9.8)
Insulina prandiale	20 (8.3)
Insulina/peso kg	0,54 (0.17)
<b>Skin Autofluorescence</b>	2,2 (0.6)
<b>Altri farmaci</b>	
Metformina %	6,3
Ace inibitori %	27
RAS bloccanti, %	7
Beta bloccanti	7,4
Diuretici	11,9
Statina, %	42

*Tabella III: Caratteristiche cliniche della popolazione.*

I dati sono presentati come media (deviazione standard) o percentuale. BMI, body mass index; eGFR, filtrato glomerulare; RAS, sistema renina angiotensina.

## 4.2 Metriche glicemiche

La glicemia media ottenuta dai risultati del monitoraggio glicemico per il periodo degli ultimi 30 giorni risultava pari a 168 (34) mg/dl, la SD pari a 61 (16) mg/dl e il coefficiente di variazione pari a 36.5 (7.5) %. Inoltre, i valori di glicemia < 54 mg/dl costituivano l'1.19 (2.6) % del totale, <70 il 3.2 (2.88) %, in range il 57.3 (17.4) %, >180 mg/dl il 25.3 (9) % e >250 mg/dl il 12.9 (13.7) %.

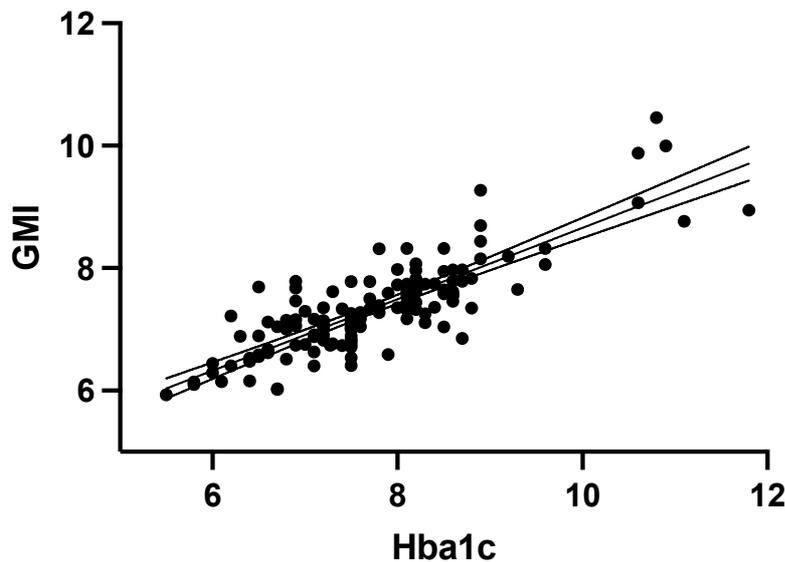
## 4.3 Glucose Management Indicator (GMI)

In base ai risultati ottenuti dallo scarico dei dati del sensore (FSL) relativi ai 3 mesi antecedenti la visita, veniva calcolato per ogni singolo paziente a partire dalla glicemia media l'indicatore GMI (*Glucose Management Indicator*), tramite la seguente formula:

$$GMI(\%) = 3,31 + 0,02392 * \left[ \text{mean glucose in } \frac{mg}{dL} \right]$$

IL GMI calcolato risultava pari a 7.4 (0.7) %, pertanto significativamente inferiore ai valori di Hba1c al momento della visita 7.7 (1.1) %,  $p < 0.0001$ .

Il GMI è stato quindi confrontato mediante correlazione lineare con i valori di Hba1c (Figura 26), evidenziando una correlazione altamente significativa tra la glicemia media rilevata dal sensore e quella stimata dall'Hba1c [ $r=0,8349$  (95% C.I.=0.7753 - 0.879),  $r^2=0,6970$ ,  $p<0.0001$ ].



*Figura 26: Grafico raffigurante la concentrazione media di glucosio misurata dal FGM espressa tramite l'indicatore GMI (asse y) in rapporto all'HbA1c misurata in laboratorio (asse x).*

Come dimostrato dalla correlazione tra GMI ed Hba1c è possibile notare come esista un'ampia variabilità nei valori di GMI di alcuni pazienti, che si discostano significativamente dai valori medi di Hba1c.

In particolare, alcuni pazienti presentano per ciascun valore di GMI, valori di Hba1c sensibilmente aumentati e non correlati alla media glicemica misurata dal sensore. Per tale motivo abbiamo suddiviso la popolazione di pazienti diabetici in due gruppi in base al rapporto GMI/HbA1c, selezionando come cut-off il valore di  $<0.9$ . Tale scelta consente di identificare i pazienti che presentano una sostanziale discrepanza tra i valori medi della glicemia misurati dal sensore (glicemia media) e i valori di Hba1c misurati nel laboratorio.

Inoltre, questa selezione conservativa consente di escludere la possibilità di valorizzare quelle variazioni in percentuale (es. 0.5% tra GMI e HbA1c) che in condizioni di iperglicemia marcata (es HbA1c > 9%) hanno scarso impatto clinico.

Tale selezione ha consentito di suddividere la popolazione in due gruppi distinti:

- Glicatori rapidi: pazienti con discrepanza tra il valore di GMI (e quindi di glicemia media calcolata dal sensore) e di HbA1c, misurato in laboratorio (GMI/HbA1c <0.9);
- Normali Glicatori: pazienti senza discrepanza significativa tra il valore di GMI e di HbA1c (GMI/HbA1c > 0.9).

#### 4.4 Glicatori rapidi

Il gruppo di pazienti *glicatori rapidi* così identificato era costituito da 30 soggetti sul totale dei 135 pazienti oggetto di studio. I pazienti di tale gruppo presentavano valori di HbA1c stimata paragonabili al gruppo di controllo (100 pazienti), come dimostrato dai valori medi di GMI pari a 7.4 (0.8) vs 7.3 (0.7), p=0.524 e valori simili di glicemia media (da FSL), 172 (32) vs 168 (31), p=0.638.

Le caratteristiche cliniche dei due gruppi di pazienti sono riassunte in Tabella IV.

	<b>Normali glicatori (n=105)</b>	<b>Glicatori Rapidi (n=30)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
<b>Dati anagrafici</b>				
Età, anni	42.7 (13.7)	50.3 (14)	-2.674	<b>0,008</b>
Sesso M, %	58	53		
<b>Dati anamnestici</b>				
Durata del diabete, anni	20,1 (12)	23.5 (13.8)	-1.342	0,22
<b>Controllo glicemico</b>				
Glicemia media (FSL), mg/dl	168 (31)	172 (32)	-0.638	0.524
HbA1c, %	7.5 (0.9)	8,6 (1.2)	-5.714	<b>0,0001</b>
GMI, %	7,3 (0.7)	7,4 (0.8)	-0.638	0.524
<b>Skin Autofluorescence</b>	2,1 (0.5)	2,5 (0.6)	-2.88	<b>0.005</b>

<b>Fattori di rischio e comorbidità</b>				
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25 (3.7)	25 (3.4)	-0.188	0,85
Peso, Kg	74.2 (13.7)	74.0 (14.6)	0,263	0,79
Ipertensione, %	47	53	0,305	0,561
Pressione sistolica, mmHg	136 (16)	136 (18)	0,077	0,93
Pressione diastolica, mmHg	79,2 (10)	79,9(10.2)	1,598	0,11
Dislipidemia %	44	73	7,882	<b>0,005</b>
Colesterolo totale, mg/dl	175 (27)	171 (27)	0,730	0,47
HDL colesterolo, mg/dl	63 (15)	61,2 (14.9)	0,565	0,572
Trigliceridi, mg/dl	78 (42)	79 (28)	-0,110	0,91
LDL colesterolo, mg/dl	96 (26)	95 (22.6)	0,296	0,77
Ipotiroidismo, %	14.5	13.3	1,082	0,218
<b>Complicanze</b>				
Malattia cardiovascolare, %	1.7	17	10,342	<b>0,001</b>
Malattia renale cronica, %	3.2	5.7	0,98	0,385
eGFR, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	104 (17)	99 (20)	1,270	0,21
Micro-/macro-albuminuria, %	7	25	4,51	<b>0,038</b>
Retinopatia, %	38.0	61,0	5,016	<b>0,022</b>
Neuropatia, %	41.8	48.3	0,028	0,538
Macroangiopatia, %	9	38	14,594	<b>0,001</b>
<b>Dose insulinica</b>				
Totale	40 (16)	40 (15)	0,211	NS
Basale	20,5 (11)	20 (9)	0,149	NS
TTDose (U/kg)	0.5 (0.2)	0.5 (0.2)	0,696	NS
<b>Altri farmaci</b>				
Statina, %	17.1	21.7	4,950	<b>0,022</b>

Tabella IV: Caratteristiche cliniche dei pazienti glicatori rapidi vs normali glicatori.

I dati raccolti nel periodo di osservazione di 90 giorni (media delle osservazioni pari a 8800) evidenziava come la media glicemica, il *Time in Range* (TIR), la SD e l'esposizione ad elevate glicemie (>180 e >250 mg/dl) risultavano simili nei 2 gruppi di pazienti. Non vi erano inoltre differenze significative relativamente alla percentuale di tempo trascorso in ipoglicemia (<70 o <54 mg/dl).

Analogamente, analizzando i dati relativi solo agli ultimi 30 giorni non si evidenziavano differenze significative nei due gruppi di pazienti nelle metriche glicemiche misurate dal sensore (Tabella V).

	Ultimi 3 mesi			Ultimo mese		
	Normali Glicatori (n=105)	Glicatori rapidi (n=30)	p	Normali Glicatori (n=105)	Glicatori rapidi (n=30)	p
Media, mg/dl	167,5 (32)	171,7 (32)	0,524	169,8 (37)	171.1 (38)	0,838
SD, mg/dl	61,5 (15,3)	67,4 (21,2)	0,160	61,2 (15,7)	65,5 (25,8)	0,260
CV, %	36,7 (6,2)	39 (9,5)	0,214	42.1 (13.2)	41.3 (10.7)	0,214
Molto basso, % <54 mg/dl	0,97 (1.4)	1,9 (3.3)	0,141	1 (1,5)	2,3 (4,6)	0,068
Basso, % 55-70 mg/dl	3,2 (2,3)	3,6 (2,7)	0,373	3,16 (2,5.0)	3,3(2,7)	0,629
Range, % 71-180 mg/dl	58 (17.0)	54 (16)	0,270	57 (18)	54 (16.4)	0,425
Alto, % 181-250 mg/dl	25.4 (8)	25.7 (9)	0,856	25,7 (8,7)	26.5 (11,1)	0,668
Molto alto, % >250 mg/dl	12,5 (12.9)	14,6 (11.7)	0,417	13,3 (14,4)	1,35 (11.9)	0,944

Tabella V: Caratteristiche cliniche dei pazienti glicatori rapidi vs normali glicatori.

Tuttavia, i valori di HbA1c nei pazienti *glicatori rapidi* risultavano significativamente più elevati [8.6% (1.2) vs 7.5 (0.9)] rispetto al gruppo di controllo (p = 0,0001), nel quale i valori di GMI risultavano paragonabili ai valori di HbA1c misurati dal laboratorio (p=NS) (Figura 27).

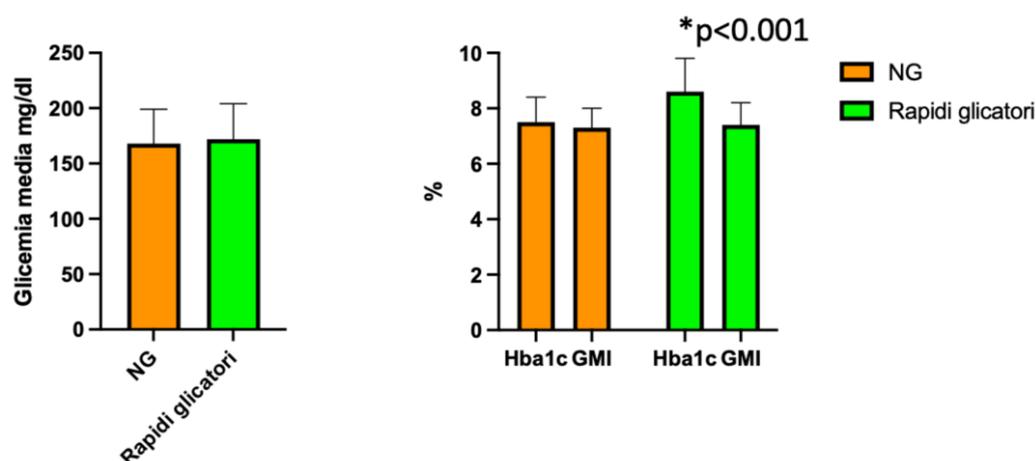


Figura 27: Grafici a barre raffiguranti glicemia media, HbA1c e GMI nei due gruppi (normali glicatori NG e glicatori rapidi).

Il gruppo di pazienti glicatori rapidi era costituito per il 53% da pazienti di sesso maschile, aveva un'età media significativamente maggiore [50.3 (14) vs 42.7 (13.7) anni,  $p = 0.008$ ] e una più lunga durata di malattia, anche se non significativa [23.5 (13.8) vs 201.1 (12) anni,  $p = 0.22$ ]. Il rapporto peso/altezza espresso dal BMI nei due gruppi risultava simile [25 (3.4) vs 25 (3.7),  $p = 0.85$ ].

I valori di *Skin Autofluorescence* risultavano significativamente aumentati nel gruppo di glicatori rapidi: 2.5 (0.6) vs 2.1 (0.5),  $p = 0.005$  (Figura 28).

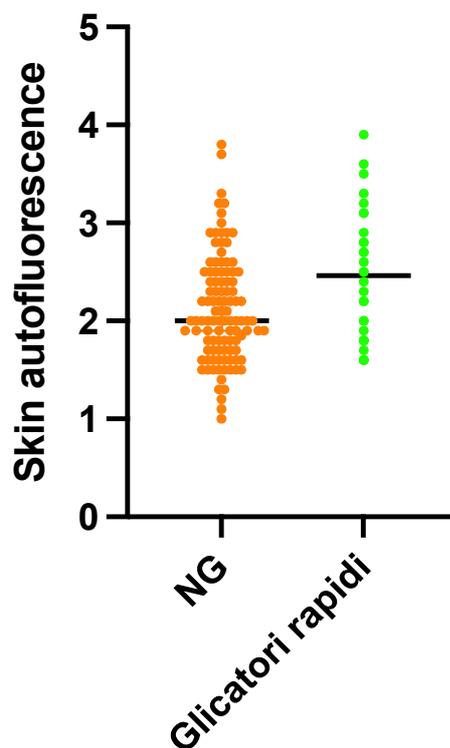


Figura 28: Grafico raffigurante la distribuzione dei valori di SAF nei due gruppi (normali glicatori NG e glicatori rapidi).

Il fabbisogno insulinico giornaliero, l'insulina basale, l'insulina rapida prandiale e il rapporto insulina/kg di peso corporeo risultavano sovrapponibili nei due gruppi. Anche i valori pressori erano simili, PAO sistolica 136 (18) vs 136 (16) [ $p = 0.93$ ] e PAO diastolica 79.9 (10.2) vs 79.2 (10) [ $p = 0.11$ ], così come la percentuale di pazienti affetti da ipertensione arteriosa 53 vs 47% [ $p = 0.561$ ].

I pazienti *glicatori rapidi* presentavano inoltre una frequenza significativamente maggiore di dislipidemia (73 vs 44 %,  $p=0,005$ ) e risultavano trattati più frequentemente con statina (21.7 vs 17.1 %,  $p=0,022$ ). I valori del profilo lipidico (colesterolo totale 171 (27) vs 175 mg/dl (27),  $p=0.47$ ; colesterolo HDL 61.2 (14.9) vs 63 (15) mg/dl,  $p=0.572$ ; trigliceridi 79 (28) vs 78 (42) mg/dl,  $p=0,91$ ; LDL colesterolo 95 (22.6) vs 96 (26) mg/dl,  $p=0.77$ ) risultavano simili nei 2 gruppi di pazienti (Figura 29).

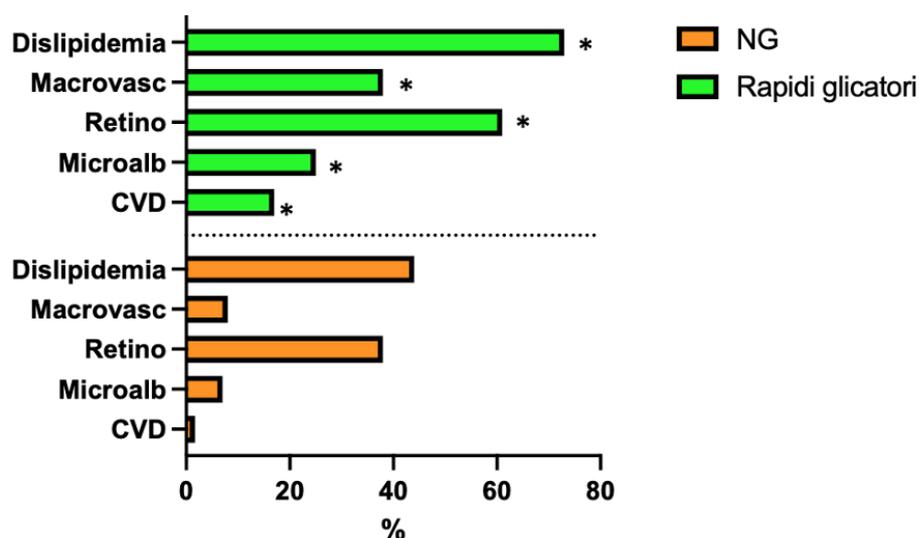


Figura 29: Grafico a barre raffigurante la distribuzione delle complicanze correlate al diabete nei due gruppi (normali glicatori NG e rapidi glicatori).

La presenza di alterazioni della funzione tiroidea (in primis la tiroidite di Hashimoto) risultava simile nei 2 gruppi di pazienti (13.3 vs 14.5 %,  $p=0,218$ ).

Nel gruppo di pazienti glicatori rapidi, tuttavia, la retinopatia risultava significativamente più frequente (61 vs 38 %,  $p=0.022$ ), così come la micro/macroalbuminuria (25 vs 7%,  $p=0,038$ ). Non si osservavano invece differenze significative negli indici di funzionalità renale [eGFR 99 (20) vs 104 (17) ml/min/m<sup>2</sup>]. La malattia renale cronica risultava più frequentemente rappresentata nei glicatori rapidi (5.7 vs 3.2), anche se non in maniera significativa. Inoltre, la frequenza di neuropatia periferica risultava simile nei 2 gruppi (48.3 vs 41.8,  $p=0,538$ ).

Per quanto riguarda la macroangiopatia, definita dalla presenza in anamnesi di eventi cardio-cerebrovascolari (infarto miocardico e/o ictus cerebrale) e/o placca carotidea determinante una stenosi >20%, i pazienti *glicatori rapidi* presentavano una frequenza significativamente maggiore se paragonata al gruppo di pazienti di controllo (38 vs 9 %,  $p=0,001$ ). In maniera analoga la prevalenza di eventi cardiovascolari risultava significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo (17 vs 1.7,  $p=0,001$ ).

È stata inoltre eseguita un'analisi di regressione logistica binaria selezionando come variabile indipendente la macroangiopatia e come variabili dipendenti l'età, la dislipidemia e l'appartenenza al gruppo (normali glicatori o glicatori rapidi).

L'analisi di regressione ha rilevato come sia l'età che la dislipidemia che l'appartenenza al gruppo dei *glicatori rapidi*, risultino associate in maniera altamente significativa e indipendente alla macroangiopatia, con valore di *odds ratio* pari a 4.4 (Tabella VI).

	B	S.E.	Wald	gl	Sign(p)	Exp(B)	95% C.I.per EXP(B)	
							Inferiore	Superiore
Età	0,058	0,027	4,438	1	<b>0,035</b>	1,059	1,004	1,118
Gruppo GR	1,316	0,571	5,314	1	<b>0,021</b>	3,728	1,218	11,410
Dislipidemia	2,209	1,099	4,044	1	<b>0,044</b>	9,110	1,058	78,455
Costante	-6,799	1,614	17,749	1	0,000	0,001		

*Tabella VI: Analisi di regressione logistica binaria tra macroangiopatia (variabile indipendente) ed età, dislipidemia e appartenenza al gruppo dei Glicatori Rapidi (variabili dipendenti).*

## 5. DISCUSSIONE

I risultati della presente tesi hanno evidenziato come nel diabete di tipo 1 sia possibile identificare, attraverso metriche ottenute con il monitoraggio glicemico in continuo di tipo *Flash*, un gruppo di pazienti che presentano un'elevata discordanza tra i valori medi della glicemia misurati dal sensore negli ultimi tre mesi e i valori di HbA1c misurati con le metodiche di riferimento nel laboratorio. Questi pazienti, definiti anche *glicatori rapidi* presentano valori di HbA1c significativamente più elevati, hanno un'età più avanzata e una frequenza significativamente maggiore di macroangiopatia, di complicanze macrovascolari legate al diabete e di disipidemia, rispetto a un gruppo di controllo dove i valori dell'HbA1c risultano concordanti con i valori della glicemia media del sensore espressi dal GMI (normali glicatori).

Nel gruppo di glicatori rapidi, inoltre, i valori di autofluorescenza cutanea (*Skin autofluorescence*) risultano aumentati significativamente rispetto al gruppo di pazienti di controllo ad espressione di un danno irreversibile legato all'iperglicemia cronica.

Inoltre, i risultati dell'analisi logistica di regressione binaria sottolineano come nel gruppo di pazienti glicatori rapidi, l'età, la dislipidemia e l'appartenenza al gruppo dei *rapidi glicatori* risultino associate significativamente e in modo indipendente alla presenza di macroangiopatia.

L' HbA1c rappresenta clinicamente il *gold standard* per le strategie del controllo glicemico e costituisce un marker consolidato per lo sviluppo futuro di complicanze, nonché per il rischio di morbidità e mortalità per il paziente diabetico.

Il principale studio d'intervento nel diabete di tipo 1 (Il DCCT) ha seguito 1441 persone con diabete mellito di tipo 1 nel periodo 1983-1989 e ha confrontato la terapia insulinica convenzionale con la terapia insulinica intensiva con iniezioni multiple giornaliere di insulina o utilizzando un microinfusore. Il regime intensivo è stato progettato per ottenere livelli di glucosio nel sangue il più vicino possibile all'intervallo fisiologico "normale", in particolare livelli pre-prandiali compresi tra 70 e 120 mg/dl (3,9-6,7 mmol/l), concentrazioni postprandiali <180 mg/dl (10 mmol/l) e HbA1c < 6,05% (42,6 mmol/mol).

Durante lo studio DCCT, l'HbA1c veniva misurata ogni mese. Il DCCT ha dimostrato in maniera definitiva come la terapia insulinica intensiva riduce il rischio di sviluppare retinopatia del 76%, l'incidenza di microalbuminuria o albuminuria rispettivamente del 39% e del 54% e la neuropatia clinica del 60% [76]. Queste significative riduzioni del rischio sono state osservate in persone con diabete di tipo 1 che hanno mantenuto i loro livelli medi di HbA1c vicino al 7,0% (53 mmol/mol) nel periodo medio di studio di 6,5 anni, rispetto a persone con una media del 9,0% (75 mmol/mol) di HbA1c nel braccio di trattamento convenzionale.

Gli importanti risultati nel T1D sono stati seguiti dal Prospective Diabetes Study (UKPDS) del Regno Unito nel diabete di tipo 2 (T2D) [103]. L'UKPDS ha valutato il controllo intensivo della glicemia dopo la diagnosi di T2D, che ha raggiunto una HbA1c mediana del 7,0% (53 mmol/mol) rispetto al 7,9% (63 mmol/mol) nei pazienti randomizzati al trattamento convenzionale su un follow-up mediano di 10,0 anni, dal 1977 al 1997. UKPDS ha mostrato che ogni riduzione dell'1% della HbA1c era associata a una riduzione del 43% del rischio di sviluppare malattie vascolari periferiche, una riduzione del 37% del rischio di sviluppare retinopatia o nefropatia e una riduzione del 14% del rischio di infarto del miocardio correlati al diabete. È importante sottolineare che il rischio di morte per qualsiasi causa correlata al diabete è stato ridotto del 21% [104].

Tuttavia, l'HbA1c ha alcune importanti limitazioni: essa, infatti, non fornisce informazioni sul controllo glicemico a breve termine, inclusa la frequenza dell'ipoglicemia o la variabilità glicemica quotidiana. La relazione tra la glicemia media giornaliera nel tempo e un valore finale di HbA1c non risulta inoltre lineare. La glicemia media nel mese immediatamente precedente un test HbA1c contribuisce a determinare circa il 50% del valore di HbA1c, con contributi decrescenti nei precedenti 2-3 mesi. Inoltre, diverse velocità di glicazione possono generare diversi valori di HbA1c per lo stesso valore medio di glucosio. Condizioni fisiopatologiche non glicemiche possono alterare la biodisponibilità dell'emoglobina così che i livelli di HbA1c non riflettano in maniera accurata l'esposizione glicemica media degli ultimi 3 mesi [105]. Da sottolineare anche il fatto che sia la vita media del globulo rosso che i processi di glicazione individuali possono avere un impatto sui valori di HbA1c per cui differenti velocità di

glicazione possono generare valori finali diversi di HbA1c per la medesima concentrazione media di glucosio [106]. Infine, anche fattori individuali tra cui l'età, le comorbidità e differenze etniche, possono modificare in modo significativo la velocità di glicazione responsabile del valore finale dell'HbA1c.

Con la disponibilità dei nuovi sensori per il monitoraggio glicemico in continuo sono stati proposti nel corso degli ultimi anni nuovi indicatori per la misurazione della glicemia media dei pazienti con diabete di tipo 1 che hanno avuto un importante impatto clinico.

L'eA1c, ad esempio, è stato sviluppato come una metrica in grado di monitorare l'esposizione glicemica tra le misurazioni laboratoriali dell'HbA1c, utilizzando i valori medi della glicemia capillare misurata mediante glucometro. L'analisi di regressione lineare dell'HbA1c e del glucosio medio è stata utilizzata per sviluppare una formula standard in base alla quale i valori medi di glucosio possono essere correlati con l'HbA1c a lungo termine, ed essere inoltre valutati più facilmente e frequentemente [107]. Questo calcolo è stato successivamente aggiornato per calcolare eA1c dai soli dati del monitoraggio glicemico in continuo (CGM), utilizzando il valore medio della glicemia in mg/dl o mmol/l ed esprimendo eA1c come valore % (unità DCCT) o mmol/mol (unità IFCC), simile al valore di HbA1c [75].

Le raccomandazioni del consenso internazionale per l'utilizzo del monitoraggio glicemico in continuo (CGM) includevano l'eA1c in un elenco di 14 parametri chiave per la valutazione del controllo glicemico basato sulla disponibilità di 10-14 giorni consecutivi di dati derivati dal CGM [108]. Va sottolineato che l'estensione del periodo di raccolta dei dati fino a 3 mesi non dimostrava di aumentare significativamente la correlazione con la glicemia media a lungo termine.

Tuttavia, come dimostrato dagli studi successivi [75], l'eA1c non implica una relazione diretta tra i valori di HbA1c e la nuova misura della glicemia media derivata dal sensore. Molte escursioni glicemiche non venivano documentate, risultando in calcoli glicemici medi imprecisi [75]. Inoltre, sebbene i calcoli originali includessero anche i dati CGM, questi sono venivano raccolti in pacchetti da 2/3 giorni ogni 4 settimane nell'arco di 3 mesi.

Pertanto, non è stata riscontrata una correlazione assoluta tra eA1c e HbA1c in grado di influenzare i tassi di glicazione secondo il risultato previsto.

È stato pertanto definito nel 2018 un nuovo parametro il *Glucose Management Indicator* o GMI con lo scopo di utilizzare il glucosio medio derivato dai dati del sensore CGM e adattarlo al fine di generare una misura diversa del controllo della glicemia a breve termine che poteva essere confrontata con l'HbA1c.

Il GMI è ancora una misura della glicemia media, ma si basa su un'analisi di regressione del glucosio e dell'HbA1c misurata contemporaneamente utilizzando i dati di quattro studi randomizzati, e HypoDE, [80], REPLACE-BG e DIAMOND [109,110], ciascuno dei quali utilizzava esclusivamente dati CGM di pazienti con diabete di tipo 1 e tipo 2. In questi studi veniva utilizzato il sistema CGM della Dexcom (Dexcom, San Diego, CA, USA), ma è stato successivamente convalidato utilizzando i dati di valutazioni cliniche effettuate con Guardian Sensor 3 (Medtronic Inc., Northridge, CA, USA) e Freestyle Navigator II (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, USA). Dal momento che il GMI si basa esclusivamente sui dati provenienti dal CGM con regressione ai valori contemporanei di HbA1c, eA1c è stato considerato obsoleto e il GMI costituisce ora la metrica di riferimento quando si esaminano i dati CGM per qualsiasi paziente.

Il GMI può differire dai valori di HbA1c. Infatti, la relazione tra GMI e HbA1c è influenzata dalla cinetica della glicazione e dalla durata della vita dei globuli rossi che in ciascun paziente determina i valori finali di HbA1c. In base ai risultati di correlazione si stima che la differenza attesa tra GMI e HbA1c sarà compresa tra 0,1% e 0,2% per il 14%, tra 0,2% e 0,3% per il 16% e tra 0,3% e 0,4% per il 12% dei soggetti con diabete. Cumulativamente, il 28% delle persone con diabete di tipo 1 presenta un GMI che differisce dalla loro HbA1c di  $\geq 0,5\%$ . [91, 111].

Alla luce di queste evidenze, nel nostro studio abbiamo suddiviso i pazienti attraverso il calcolo del rapporto tra GMI e HbA1c in modo da poter identificare quei pazienti che si discostavano maggiormente dai valori medi di glicemia misurati dal sensore. Come dimostrato nei risultati, il rapporto GMI/HbA1c  $< 0.9$  identifica un gruppo di 30 pazienti che a parità di GMI misurati dal sensore FGM, presenta un aumento significativo dei valori di HbA1c (8.6 vs 7.5%).

La presenza di una differenza consistente tra i valori di HbA1c e GMI definisce il cosiddetto *Haemoglobin glycation index* (HGI), che permette una valutazione informativa del cosiddetto *gap* di glicazione tra glucosio medio e HbA1c [106].

La differenza relativa tra GMI e HbA1c, infatti, consente di identificare tre categorie di pazienti che utilizzano il CGM: (1) glicatori medi, in cui GMI e HbA1c risultano strettamente approssimati, (2) bassi glicatori, in cui GMI è costantemente superiore all'HbA1c misurata, e (3) alti glicatori, in cui GMI è costantemente inferiore all'HbA1c misurata. Poiché le cellule diverse dai globuli rossi sono esposte alla stessa cinetica di glicazione, comprese quelle degli organi e tessuti coinvolti nelle complicanze del diabete, i *glicatori rapidi* hanno il potenziale per un danno maggiormente mediato dal glucosio rispetto ai bassi glicatori, nonostante la stessa esposizione media al glucosio, con documentato aumento del rischio di nefropatia diabetica [112,113], retinopatia [114] e mortalità [115].

I dati del nostro studio confermano che nel gruppo di pazienti con rapporto GMI/HbA1c <0.9, definiti *glicatori rapidi*, le complicanze macroangiopatiche e la malattia cardiovascolare sono presenti con frequenza significativamente maggiore rispetto ai pazienti bassi o medi glicatori. Tra i noti fattori di rischio cardiovascolare la dislipidemia risulta inoltre significativamente più frequente e questo spiega anche il motivo per cui risultino più frequentemente in trattamento con terapia ipolipemizzante. L'altro aspetto che va sottolineato riguarda l'età dei pazienti. Il gruppo di glicatori rapidi presenta anche un'età significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo e questo è uno dei più importanti fattori di rischio cardiovascolare non modificabile che contribuisce allo sviluppo delle complicanze croniche della malattia.

Inoltre, a conferma di un avanzato processo di glicazione cronica, la misurazione della *Skin Autofluorescence* (SAF) è risultata significativamente più elevata rispetto al gruppo di pazienti di controllo. Come è noto, l'effetto del controllo intensivo della glicemia sugli eventi cardiovascolari è risultato significativo solo 11 anni dopo l'intervento di controllo intensivo della glicemia nel *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), a causa dell'effetto "memoria del glucosio" [27].

L'analisi dettagliata dei fattori di rischio cardiovascolare dei partecipanti al DCCT-EDIC ha sottolineato l'importanza dell'HbA1C come espressione della media glicemica ponderata nel tempo [116].

I prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) generati dal glucosio in eccesso presentano effetti deleteri sulle cellule endoteliali. Si ritiene infatti che contribuiscano alla memoria dell'iperglicemia [117]. Le concentrazioni cutanee di AGEs sono state correlate alla progressione dello spessore dell'intima media nello studio DCCT-EDIC [97]. A causa delle loro proprietà fluorescenti, l'accumulo di AGE nei tessuti può essere stimato semplicemente misurando l'autofluorescenza cutanea (SAF) [118]. La SAF si è dimostrata in grado di predire eventi cardiovascolari successivi in pazienti con diabete di tipo 2 [119] ed è stata correlata con una successiva compromissione della funzionalità renale e neuropatia [120] nei pazienti con diabete di tipo 1. Più recentemente Blanc Bisson [121] ha evidenziato in una popolazione di 230 pazienti con diabete di tipo 1 che valori di SAF elevata (del tutto sovrapponibili ai risultati riscontrati nel nostro studio) risultavano associati a un aumento del rischio di eventi cardiovascolari successivi (HR: 4,13, CI 95%: 1,30–13,07) dopo aggiustamento per durata del diabete, ipertensione arteriosa, trattamento con statine, parametri renali e precedenti eventi cardiovascolari. La SAF appare quindi come un predittore significativo di eventi cardiovascolari nel diabete di tipo 1. I soggetti con diabete di tipo 1 che hanno sperimentato un evento cardiovascolare durante il follow-up di 7 anni erano più anziani, con una durata del diabete più lunga di 9 anni, ma HbA1C simile rispetto agli altri. È interessante notare come il gruppo di controllo nel quale non erano evidenti eventi vascolari presentasse valori medi di SAF pari a 2.1, che è concorde con i risultati del nostro studio nel gruppo di pazienti diabetici definiti normali glicatori.

Per le complicanze microangiopatiche, la retinopatia e la microalbuminuria risultano significativamente più frequenti anche se tale significatività si riduce quando l'analisi viene corretta per l'età.

Pertanto, a parità di glicemia media, calcolata analizzando 90 giorni di monitoraggio glicemico in continuo con FGM ed espressa nel GMI, i *rapidi*

*glicatori* sono pazienti con maggior prevalenza di eventi cardiovascolari e potrebbero presentare un rischio di mortalità aumentato.

Come dimostrato inoltre dall'analisi di regressione, l'appartenenza al gruppo dei *glicatori rapidi* assieme all'età e alla dislipidemia rappresenta un fattore indipendente significativamente associato al rischio di macroangiopatia.

Analizzando i dati del sensore si può apprezzare come i pazienti presentino valori di glicemia media e variabilità glicemica simili nei 2 gruppi. Non si sono infatti evidenziate differenze significative nei valori della glicemia media, del TIR, del CV, della SD, del tempo trascorso in iperglicemia o in ipoglicemia. Ad ogni modo, appare indispensabile nel gruppo di pazienti *glicatori rapidi* modificare le strategie terapeutiche esistenti per ottimizzare il controllo glicemico e ridurre i fattori di rischio associati, al fine di diminuire il rischio di mortalità cardiovascolare. In particolare, è necessario migliorare la percentuale di tempo trascorso in euglicemia (*Time in range*, TIR) al fine di ridurre nel tempo i valori di emoglobina glicata. È stato stabilito che un individuo con diabete di tipo 1 o 2 dovrebbe trascorrere più del 70% del giorno (16 ore e 48 minuti) nei valori target; un periodo superiore al 50% (> 12 ore) è raccomandato nei soggetti con diabete di tipo 2 ad alto rischio, così da ridurre il tempo trascorso in iper e ipoglicemia [81]. Tali target diventano più restrittivi nel caso delle pazienti diabetiche in gravidanza: in questi casi, TIR dev'essere > 70%, ma il target glicemico risulta compreso tra 63 e 140 mg/dl. Recenti lavori hanno concluso che per ogni aumento del 10% nel TIR corrisponde una riduzione di circa 0.5% di HbA1c sia nei soggetti con diabete mellito di tipo 1 sia in quelli di tipo 2 [83].

È inoltre ormai accertata la relazione esistente tra il TIR e le complicanze del diabete. Il TIR è stato associato allo sviluppo di complicanze microvascolari sia nel diabete di tipo 1 [122] che nel tipo 2 [123]. Lu et. Al hanno osservato una relazione inversa tra TIR e mortalità cardiovascolare e per tutte le cause nei pazienti con diabete di tipo 2 [124].

A tale proposito l'utilizzo di sensori che consentono di programmare allarmi per l'ipoglicemia e l'iperglicemia può consentire di migliorare il controllo glicemico e di conseguenza nel medio termine i valori di HbA1c.

Questi pazienti potrebbero inoltre beneficiare di un trattamento insulinico ottimizzato mediante somministrazione sottocutanea dell'insulina in continuo (CSII), con inserite le funzioni di sospensione nell'erogazione nel caso di previsione di un evento ipoglicemico (*LGS-pump*).

I dati dello studio inoltre evidenziano che nonostante il trattamento esistente con farmaci ipolipemizzanti, i valori di colesterolo LDL dei nostri pazienti non risultavano a target. È quindi necessaria un'intensificazione degli schemi di trattamento anche mediante l'utilizzo di nuove molecole (come PCSK9-i) al fine di raggiungere i target raccomandati ( $LDL < 55$  mg/dl) dalle linee guida.

L'originalità del nostro lavoro di tesi riguarda l'applicazione del rapporto GMI/HbA1c per identificare i pazienti con frequente malattia cardiovascolare e l'identificazione di un fenotipo di paziente definito *glicatore rapido*, che presenta una significativa discrepanza tra i valori medi della glicemia dal sensore e i valori di HbA1c ottenuta in laboratorio. Questa analisi si è basata sulla disponibilità di 90 giorni di misurazione in continuo della glicemia mediante il sensore FSL, che veniva utilizzato da tutti i pazienti coinvolti nello studio. La misurazione della *Skin Autofluorescence* può rappresentare un dato clinico aggiuntivo per meglio definire la presenza di un marker di glicazione avanzata da valorizzare in questi pazienti nel tempo. Si tratta di una misura semplice, rapida che può essere ripetuta nel tempo durante le visite di controllo ambulatoriali. Può rappresentare pertanto un marker predittivo di glicazione nei pazienti con diabete di tipo 1, abbinata ai valori di GMI e di HbA1c.

I risultati del nostro studio necessitano di essere confermati nel tempo con protocolli di studio longitudinali nei pazienti che abitualmente afferiscono ai nostri ambulatori diabetologici, al fine di valutare la possibilità, attraverso l'utilizzo delle metriche glicemiche ottenute dal sensore per il monitoraggio in continuo del glucosio abbinate alla misurazione dell'HbA1c e della *Skin Autofluorescence*, di una precoce identificazione dei pazienti a maggior rischio di malattia cardiovascolare e macroangiopatia in generale.

## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, i dati della presente tesi dimostrano che i pazienti con diabete mellito di tipo 1 che mostrano una significativa discordanza tra i valori di HbA1c e le metriche ottenute mediante il monitoraggio glicemico in continuo con FGM ed espresse tramite GMI, rappresentano un caratteristico fenotipo di *rapido glicatore* ad elevato rischio di danno vascolare cronico, che si manifesta con malattia cardiovascolare e macroangiopatia. La misura della *Skin Autofluorescence* come marker predittivo è utile come parametro aggiuntivo, al fine di individuare i pazienti a maggior rischio di sviluppare complicanze macrovascolari e di predisporre opportune misure di ottimizzazione terapeutica per ridurre la mortalità.



## BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee: 2. *Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022*. *Diabetes Care* 2022;45(1): 17–22.
2. American Diabetes Association: *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care* 2014;37(1): 81–90.
3. Balasubramanyam A, Nalini R, Hampe CS, Maldonado M: *Syndromes of ketosis-prone diabetes mellitus*. *Endocr Rev* 2008;29(3): 292–302.
4. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R, IDF Diabetes Atlas Committee: *Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition*. *Diabetes Res Clin Pract* 2019;157: 107843.
5. Mobasser M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Hosseini Fard H, Ghojzadeh M: *Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis*. *Health Promot Perspect* 2020;10(2): 98–115.
6. Powers AC: *Diabetes Mellitus*. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16/e (Vol. 2). Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL eds McGraw-hill Publ, New York, 2005, p2428.
7. Liese AD, D'Agostino RB Jr, Hamman RF, Kilgo PD, Lawrence JM, Liu LL, Loots B, Linder B, Marcovina S, Rodriguez B, Standiford D, Williams DE: *The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study*. *Pediatrics* 2006;118(4): 1510-1518.
8. Thunander M, Petersson C, Jonzon K, Fornander J, Ossiansson B, Torn C, Edvardsson S, Landin-Olsson M: *Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden*. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82(2): 247-255.
9. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G, EURODIAB Study Group: *Worldwide childhood type 1 diabetes incidence-what can we learn from epidemiology?* *Pediatr Diabetes* 2007;8(6): 6-14.
10. Vichi M, Iafusco D, Galderisi A, Stazi MA, Nisticò L: *An easy, fast, effective tool to monitor the incidence of type 1 diabetes among children aged 0-4 years in Italy: The Italian Hospital Discharge Registry (IHDR)*. *Acta Diabetol* 2014;51(2): 287-294.
11. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T: *Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins*. *N Engl J Med* 2008;359(26): 2849-2850.

12. Gillespie KM, Gale EA, Bingley PJ: *High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes*. Diabetes 2002;51(1): 210-214.
13. Tsirogianni A, Pipi E, Soufleros K. *Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus*. Autoimmun Rev 2009;8(8): 687-691.
14. Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, Todd JA, Rich SS, Type 1 Diabetes Genetics Consortium: *Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families*. Diabetes 2005;54(10): 2995-3001.
15. Tuomilehto J: *The emerging global epidemic of type 1 diabetes*. Curr Diab Rep 2013;13(6): 795-804.
16. Bogdani M, Korpos E, Simeonovic CJ, Parish CR, Sorokin L, Wight TN: *Extracellular matrix components in the pathogenesis of type 1 diabetes*. Curr Diab Rep 2014;14(12): 552.
17. Wilcox NS, Rui J, Hebrok M, Herold KC: *Life and death of  $\beta$  cells in Type 1 diabetes: A comprehensive review*. J Autoimmun 2016;71: 51-58.
18. Caromile LA, Oganessian A, Coats SA, Seifert RA, Bowen-Pope DF: *The neurosecretory vesicle protein phogrin functions as a phosphatidylinositol phosphatase to regulate insulin secretion*. J Biol Chem 2010;285(14): 10487-10496.
19. Wasserfall CH, Atkinson MA: *Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes*. Autoimmun Rev 2006;5(6): 424-428.
20. Isermann B, Ritzel R, Zorn M, Schilling T, Nawroth PP: *Autoantibodies in diabetes mellitus: current utility and perspectives*. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2007;115(8): 483-490.
21. Di Meglio LA, Evans-Molina C, Oram RA: *Type 1 diabetes*. Lancet 2018; 391(10138): 2449-2462.
22. American Diabetes Association Professional Practice Committee: *4. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities: Standards of Medical Care in Diabetes—2022*. Diabetes Care 2022; 45 (1): 46–59.
23. Ben-Skowronek I: *IPEX Syndrome: Genetics and Treatment Options*. Genes (Basel) 2021;12(3): 323.
24. Frommer L, Kahaly GJ: *Autoimmune Polyendocrinopathy*. J Clin Endocrinol Metab 2019;104(10): 4769-4782.
25. Thornalley PJ: *The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life*. Biochem J 1990;269(1): 1-11.

26. Bohren KM, Grimshaw CE, Gabbay KH: *Catalytic effectiveness of human aldose reductase. Critical role of C-terminal domain.* J Biol Chem 1992;267(29): 20965-20970.
27. Brownlee M: *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.* Nature 2001;414(6865): 813-820.
28. Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S, King GL: *Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation.* Am J Physiol 1993;265(5 Pt 1): E783-793.
29. Zachara N, Akimoto Y, Hart GW et Al: *The O-GlcNAc Modification.* In: *Essentials of Glycobiology 3/e.* Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH eds Cold Spring Harbor Publ, New York, 2015, pp 239-251.
30. Brownlee M: *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.* Diabetes 2005;54(6): 1615-1625.
31. Morisseau C, Hammock BD: *Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 2013; 53: 37-58.
32. Hu J, Dziumbila S, Lin J, Bibli SI, Zukunft S, de Mos J, Awwad K, Frömel T, Jungmann A, Devraj K, Cheng Z, Wang L, Fauser S, Eberhart CG, Sodhi A, Hammock BD, Liebner S, Müller OJ, Glaubitz C, Hammes HP, Popp R, Fleming I: *Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents diabetic retinopathy.* Nature 2017;552(7684): 248-252.
33. Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, Scattolini V, Poncina N, Bruttocao A, Ciciliot S, Mammano F, Ciubotaru CD, Brocco E, Marescotti MC, Cappellari R, Arrigoni G, Million R, Vigili de Kreutzenberg S, Albiero M, Avogaro A: *NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans.* Diabetes 2016;65(4): 1061-1071.
34. Albiero M, Bonora BM, Fadini GP: *Diabetes pharmacotherapy and circulating stem/progenitor cells. State of the art and evidence gaps.* Curr Opin Pharmacol 2020;55: 151-156.
35. Ceriello A, Prattichizzo F: *Variability of risk factors and diabetes complications.* Cardiovasc Diabetol 2021;20(1): 101.
36. Lee R, Wong TY, Sabanayagam C: *Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss.* Eye Vis (Lond) 2015; 2: 17.
37. Cheung N, Mitchell P, Wong TY: *Diabetic retinopathy.* Lancet 2010; 376(9735): 124-36.
38. Porta M, Sjoelie AK, Chaturvedi N, Stevens L, Rottiers R, Veglio M, Fuller JH, EURODIAB Prospective Complications Study Group: *Risk factors for progression to proliferative diabetic retinopathy in the EURODIAB Prospective Complications Study.* Diabetologia 2001;44(12): 2203-9.

39. Hooper P, Boucher MC, Cruess A, Dawson KG, Delpero W, Greve M, Kozousek V, Lam WC, Maberley DA: *Canadian Ophthalmological Society evidence-based clinical practice guidelines for the management of diabetic retinopathy*. *Can J Ophthalmol* 2012; 47(2): 1–54.
40. Beltramo E, Porta M: *Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences*. *Curr Med Chem* 2013;20(26): 3218-3225.
41. Gupta N, Mansoor S, Sharma A, Sapkal A, Sheth J, Falatoonzadeh P, Kuppermann B, Kenney M: *Diabetic retinopathy and VEGF*. *Open Ophthalmol J* 2013;7: 4-10.
42. Wang W, Lo ACY: *Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments*. *Int J Mol Sci* 2018;19(6): 1816.
43. The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: *Photocoagulation for diabetic macular edema: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report n. 4*. *Int Ophthalmol Clin* 1987; 27(4): 265-272.
44. Wang G, Ouyang J, Li S, Wang H, Lian B, Liu Z, Xie L: *The analysis of risk factors for diabetic nephropathy progression and the construction of a prognostic database for chronic kidney diseases*. *J Transl Med* 2019;17(1): 264.
45. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K: *Molecular mechanisms of diabetic kidney disease*. *J Clin Invest* 2014 Jun;124(6): 2333-2340.
46. Zilliox L, Russell JW: *Treatment of diabetic sensory polyneuropathy*. *Curr Treat Options Neurol* 2011;13(2): 143-59.
47. Ang L, Jaiswal M, Martin C, Pop-Busui R: *Glucose control and diabetic neuropathy: lessons from recent large clinical trials*. *Curr Diab Rep* 2014;14(9): 528.
48. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM, Ziegler D: *Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association*. *Diabetes Care* 2017;40(1): 136-154.
49. Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA: *The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US*. *Diabetes Care* 2003;26(6): 1790-1795.
50. Lin YK, Fisher SJ, Pop-Busui R: *Hypoglycemia unawareness and autonomic dysfunction in diabetes: Lessons learned and roles of diabetes technologies*. *J Diabetes Investig* 2020;11(6): 1388-1402.
51. American Diabetes Association: *Economic costs of diabetes in the U.S. in 2017*. *Diabetes Care* 2018;41: 917–928.

52. McAllister DA, Read SH, Kerssens J, Livingstone S, McGurnaghan S, Jhund P, Petrie J, Sattar N, Fischbacher C, Kristensen SL, McMurray J, Colhoun HM, Wild SH: *Incidence of Hospitalization for Heart Failure and Case-Fatality Among 3.25 Million People With and Without Diabetes Mellitus*. *Circulation* 2018;138(24): 2774-2786.
53. Ali MK, Bullard KM, Saaddine JB, Cowie CC, Imperatore G, Gregg EW: *Achievement of goals in U.S. diabetes care, 1999-2010*. *N Engl J Med* 2013;368: 1613–1624.
54. Shakil A, Church RJ, Rao SS: *Gastrointestinal complications of diabetes*. *Am Fam Physician* 2008;77(12): 1697-1702.
55. Rodriguez-de-Velasquez A, Yoder IC, Velasquez PA, Papanicolaou N: *Imaging the effects of diabetes on the genitourinary system*. *Radiographics* 1995;15(5): 1051-1068.
56. Duff M, Demidova O, Blackburn S, Shubrook J: *Cutaneous manifestations of diabetes mellitus*. *Clin Diabetes* 2015;33(1): 40-48.
57. Kiziltoprak H, Tekin K, Inanc M, Goker YS: *Cataract in diabetes mellitus*. *World J Diabetes* 2019;10(3): 140-153.
58. Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N: *Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections*. *Immunology* 2015;144(2): 171-185.
59. Simó R, Hernández C: *Treatment of diabetes mellitus: general goals, and clinical practice management*. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(8): 845-860.
60. Associazione Medici Diabetologi (AMD), Società Italiana di Diabetologia (SID): *Standard italiani per la cura del diabete mellito 2018*. *SID* 2018; IV: 45-47.
61. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B, Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group: *Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes*. *N Engl J Med* 2005;353(25): 2643-2653.
62. Richardson T, Kerr D: *Skin-related complications of insulin therapy*. *Am J Clin Dermatol* 2003;4(10): 661-667
63. Mathieu C, Gillard P, Benhalima K: *Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time*. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13(7): 385-399.
64. Tricco AC, Ashoor HM, Antony J, Beyene J, Veroniki AA, Isaranuwachai W, Harrington A, Wilson C, Tsouros S, Soobiah C, Yu CH, Hutton B, Hoch JS, Hemmelgarn BR, Moher D, Majumdar SR, Straus SE: *Safety, effectiveness, and cost effectiveness of long acting versus intermediate acting insulin for patients with type 1 diabetes: systematic review and network meta-analysis*. *BMJ* 2014; 349: g5459.

65. American Diabetes Association Professional Practice Committee: 9. *Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2022*. *Diabetes Care* 2022;45(1): 125–143.
66. Holt RIG, DeVries JH, Hess-Fischl A, Hirsch IB, Kirkman MS, Klupa T, Ludwig B, Nørgaard K, Pettus J, Renard E, Skyler JS, Snoek FJ, Weinstock RS, Peters AL: *The management of type 1 diabetes in adults. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. *Diabetes Care* 2021;44(11): 2589–2625.
67. Peters AL, Ahmann AJ, Battelino T, Evert A, Hirsch IB, Murad MH, Winter WE, Wolpert H: *Diabetes Technology-Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Therapy and Continuous Glucose Monitoring in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline*. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101(11): 3922-3937.
68. Bunn HF, Haney DN, Gabbay KH, Gallop PM: *Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c*. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;67: 103-109.
69. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD: *The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay*. *N Engl J Med* 1984;310(6): 341-346.
70. Phillips PJ, Leow S: *HbA1c, blood glucose monitoring and insulin therapy*. *Aust Fam Physician* 2014;43(9): 611-615.
71. Lundholm MD, Emanuele MA, Ashraf A, Nadeem S: *Applications and pitfalls of hemoglobin A1C and alternative methods of glycemic monitoring*. *J Diabetes Complications* 2020;34(8): 107585.
72. Selvin E, Steffes MW, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL: *Racial differences in glycemic markers: a cross-sectional analysis of community-based data*. *Ann Intern Med* 2011;154(5): 303-309.
73. Pani LN, Korenda L, Meigs JB, Driver C, Chamany S, Fox CS, Sullivan L, D'Agostino RB, Nathan DM: *Effect of aging on A1C levels in individuals without diabetes: evidence from the Framingham Offspring Study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004*. *Diabetes Care* 2008;31(10): 1991-1996.
74. American Diabetes Association Professional Practice Committee: 6. *Glycemic targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2022*. *Diabetes Care* 2022;45(1): 83–96.
75. Beck RW, Connor CG, Mullen DM, Wesley DM, Bergenstal RM: *The fallacy of average: how using HbA1c alone to assess glycemic control can be misleading*. *Diabetes Care* 2017;40: 994–999.

76. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C: *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med 1993;329(14): 977-986.
77. Schütt M, Kern W, Krause U, Busch P, Dapp A, Grziwotz R, Mayer I, Rosenbauer J, Wagner C, Zimmermann A, Kerner W, Holl RW, DPV Initiative: *Is the frequency of self-monitoring of blood glucose related to long-term metabolic control? Multicenter analysis including 24,500 patients from 191 centers in Germany and Austria*. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2006;114(7): 384-388.
78. Holt RIG, DeVries JH, Hess-Fischl A, Hirsch IB, Kirkman MS, Klupa T, Ludwig B, Nørgaard K, Pettus J, Renard E, Skyler JS, Snoek FJ, Weinstock RS, Peters AL: *The Management of Type 1 Diabetes in Adults. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Diabetes Care 2021;44(11): 2589-2625.
79. American Diabetes Association Professional Practice Committee: *7. Diabetes technology: Standards of Medical Care in Diabetes—2022*. Diabetes Care 2022;45 (1): 97–112.
80. Heinemann L, Freckmann G, Ehrmann D, Faber-Heinemann G, Guerra S, Waldenmaier D, Hermanns N: *Real-time continuous glucose monitoring in adults with type 1 diabetes and impaired hypoglycaemia awareness or severe hypoglycaemia treated with multiple daily insulin injections (HypoDE): a multicentre, randomised controlled trial*. Lancet 2018;391(10128): 1367-1377.
81. Battelino T, Danne T, Bergenstal RM, Amiel SA, Beck R, Biester T, Bosi E, Buckingham BA, Cefalu WT, Close KL, Cobelli C, Dassau E, DeVries JH, Donaghue KC, Dovic K, Doyle FJ 3rd, Garg S, Grunberger G, Heller S, Heinemann L, Hirsch IB, Hovorka R, Jia W, Kordonouri O, Kovatchev B, Kowalski A, Laffel L, Levine B, Mayorov A, Mathieu C, Murphy HR, Nimri R, Nørgaard K, Parkin CG, Renard E, Rodbard D, Saboo B, Schatz D, Stoner K, Urakami T, Weinzimer SA, Phillip M: *Clinical Targets for Continuous Glucose Monitoring Data Interpretation: Recommendations From the International Consensus on Time in Range*. Diabetes Care 2019;42(8): 1593-1603.
82. Vigersky RA, McMahon C: *The relationship of hemoglobin A1C to time-in-range in patients with diabetes*. Diabetes Technol Ther 2019;21: 81–85.
83. Beck RW, Bergenstal RM, Cheng P, Kollman C, Carlson AL, Johnson ML, Rodbard D: *The Relationships Between Time in Range, Hyperglycemia Metrics, and HbA1c*. J Diabetes Sci Technol. 2019;13(4): 614-626.
84. Mayeda L, Katz R, Ahmad I, Bansal N, Batacchi Z, Hirsch IB, Robinson N, Trencle DL, Zelnick L, de Boer IH: *Glucose time in range and peripheral neuropathy in type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease*. BMJ Open Diabetes Res Care 2020;8(1): e000991.

85. Yoo JH, Choi MS, Ahn J, et Al: *Association between continuous glucose monitoring-derived time in range, other core metrics, and albuminuria in type 2 diabetes*. *Diabetes Technol Ther* 2020;22: 768–776.
86. Lu J, Ma X, Shen Y, Wu Q, Wang R, Zhang L, Mo Y, Lu W, Zhu W, Bao Y, Vigersky RA, Jia W, Zhou J: *Time in Range Is Associated with Carotid Intima-Media Thickness in Type 2 Diabetes*. *Diabetes Technol Ther* 2020;22(2): 72-78.
87. Bergenstal RM, Ahmann AJ, Bailey T, Beck RW, Bissen J, Buckingham B, Deeb L, Dolin RH, Garg SK, Golland R, Hirsch IB, Klonoff DC, Kruger DF, Matfin G, Mazze RS, Olson BA, Parkin C, Peters A, Powers MA, Rodriguez H, Southerland P, Strock ES, Tamborlane W, Wesley DM: *Recommendations for standardizing glucose reporting and analysis to optimize clinical decision making in diabetes: the Ambulatory Glucose Profile (AGP)*. *Diabetes Technol Ther* 2013 Mar;15(3): 198-211.
88. Zhou Z, Sun B, Huang S, Zhu C, Bian M: *Glycemic variability: adverse clinical outcomes and how to improve it?* *Cardiovasc Diabetol* 2020;19(1):102.
89. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C: *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med* 1993;329(14): 977-986.
90. Monnier L, Colette C, Wojtusciszyn A, Dejager S, Renard E, Molinari N, Owens DR: *Toward Defining the Threshold Between Low and High Glucose Variability in Diabetes*. *Diabetes Care* 2017;40(7): 832-838.
91. Bergenstal RM, Beck RW, Close KL, Grunberger G, Sacks DB, Kowalski A, Brown AS, Heinemann L, Aleppo G, Ryan DB, Riddlesworth TD, Cefalu WT: *Glucose Management Indicator (GMI): A New Term for Estimating A1C From Continuous Glucose Monitoring*. *Diabetes Care* 2018;41(11): 2275-2280.
92. Shen CY, Lu CH, Wu CH, Li KJ, Kuo YM, Hsieh SC, Yu CL: *The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases*. *Molecules* 2020; 25(23): 5591.
93. Cepas V, Collino M, Mayo JC, Sainz RM: *Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Diet-Related Diseases*. *Antioxidants (Basel)* 2020;9(2): 142.
94. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM: *Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products*. *J Biol Chem* 2000;275(50): 39027-39031.
95. Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P, Kohn RR: *Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence*. *N Engl J Med* 1986;314(7): 403-408.

96. Simó-Servat O, Planas A, Ciudin A, Simó R, Hernández C: *Assessment of advanced glycation end-products as a biomarker of diabetic outcomes*. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)* 2018;65(9): 540-545.
97. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW, Gans ROB, Smit AJ: *Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation*. *Diabetologia* 2004;47(7): 1324-1330.
98. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH: *Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct*. *Arch Biochem Biophys* 1997;344(1): 29-36.
99. Fokkens BT, Smit AJ: *Skin fluorescence as a clinical tool for non-invasive assessment of advanced glycation and long-term complications of diabetes*. *Glycoconj J* 2016;33(4): 527-35.
100. Son M, Chung WJ, Oh S, Ahn H, Choi CH, Hong S, Park KY, Son KH, Byun K: *Age dependent accumulation patterns of advanced glycation end product receptor (RAGE) ligands and binding intensities between RAGE and its ligands differ in the liver, kidney, and skeletal muscle*. *Immun Ageing* 2017;14: 12.
101. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H: *Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet*. *J Am Diet Assoc* 2010;110(6): 911-916.
102. Koetsier M, Lutgers HL, De Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaf R: *Reference values of skin autofluorescence*. *Diabetes Technol Ther* 2010;12: 399-403.
103. UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS): *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)*. *Lancet* 1998;352(9131): 837-853.
104. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR: *Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study*. *BMJ*. 2000 Aug 12;321(7258): 405-412.
105. Nayak AU, Holland MR, Macdonald DR, Nevill A, Singh BM: *Evidence for consistency of the glycation gap in diabetes*. *Diabetes Care* 2011;34(8): 1712-1716.
106. Hempe JM, Gomez R, McCarter RJ Jr, Chalew SA: *High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes: a challenge for interpretation of glycemic control*. *J Diabetes Complications* 2002;16(5): 313-320.

107. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ, A1c-Derived Average Glucose Study Group: *Translating the A1C assay into estimated average glucose values*. *Diabetes Care* 2008;31(8): 1473-1478.
108. Danne T, Nimri R, Battelino T, Bergenstal RM, Close KL, DeVries JH, Garg S, Heinemann L, Hirsch I, Amiel SA, Beck R, Bosi E, Buckingham B, Cobelli C, Dassau E, Doyle FJ 3rd, Heller S, Hovorka R, Jia W, Jones T, Kordonouri O, Kovatchev B, Kowalski A, Laffel L, Maahs D, Murphy HR, Nørgaard K, Parkin CG, Renard E, Saboo B, Scharf M, Tamborlane WV, Weinzimer SA, Phillip M: *International Consensus on Use of Continuous Glucose Monitoring*. *Diabetes Care* 2017;40(12): 1631-1640.
109. Aleppo G, Ruedy KJ, Riddlesworth TD, Kruger DF, Peters AL, Hirsch I, Bergenstal RM, Toschi E, Ahmann AJ, Shah VN, Rickels MR, Bode BW, Philis-Tsimikas A, Pop-Busui R, Rodriguez H, Eyth E, Bhargava A, Kollman C, Beck RW, REPLACE-BG Study Group: *REPLACE-BG: A Randomized Trial Comparing Continuous Glucose Monitoring With and Without Routine Blood Glucose Monitoring in Adults With Well-Controlled Type 1 Diabetes*. *Diabetes Care* 2017;40(4): 538-545.
110. Beck RW, Riddlesworth T, Ruedy K, Ahmann A, Bergenstal R, Haller S, Kollman C, Kruger D, McGill JB, Polonsky W, Toschi E, Wolpert H, Price D, DIAMOND Study Group: *Effect of Continuous Glucose Monitoring on Glycemic Control in Adults With Type 1 Diabetes Using Insulin Injections: The DIAMOND Randomized Clinical Trial*. *JAMA* 2017;317(4): 371-378.
111. Perlman JE, Gooley TA, McNulty B, Meyers J, Hirsch IB: *HbA1c and Glucose Management Indicator Discordance: A Real-World Analysis*. *Diabetes Technol Ther* 2021;23(4): 253-258.
112. Liu H, Yang D, Deng H, Xu W, Lv J, Zhou Y, Luo S, Zheng X, Liang H, Yao B, Qiu L, Wang F, Liu F, Yan J, Weng J: *Impacts of glycemic variability on the relationship between glucose management indicator from iPro™2 and laboratory hemoglobin A1c in adult patients with type 1 diabetes mellitus*. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2020;11:1-9.
113. Cosson E, Banu I, Cussac-Pillegand C, Chen Q, Chiheb S, Jaber Y, Nguyen MT, Charnaux N, Valensi P: *Glycation gap is associated with macroproteinuria but not with other complications in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Care* 2013;36(7): 2070-2076.
114. Nayak AU, Singh BM, Dunmore SJ: *Potential Clinical Error Arising From Use of HbA1c in Diabetes: Effects of the Glycation Gap*. *Endocr Rev* 2019; 40(4): 988-999.
115. Nayak AU, Nevill AM, Bassett P, Singh BM: *Association of glycation gap with mortality and vascular complications in diabetes*. *Diabetes Care* 2013;36(10): 3247-53.

116. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Pocai A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M: *Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia*. J Exp Med 2008;205(10): 2409-2417.
117. Monnier VM, Sun W, Gao X, Sell DR, Cleary PA, Lachin JM, Genuth S, DCCT/EDIC Research Group: *Skin collagen advanced glycation endproducts (AGEs) and the long-term progression of sub-clinical cardiovascular disease in type 1 diabetes*. Cardiovasc Diabetol 2015;14:118.
118. Lutgers HL, Gerrits EG, Graaff R, Links TP, Sluiter WJ, Gans RO, Bilo HJ, Smit AJ: *Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia 2009;52(5): 789-97.
119. Vélayoudom-Céphise FL, Rajaobelina K, Helmer C, Nov S, Pupier E, Blanco L, Hugo M, Farges B, Astrugue C, Gin H, Rigalleau V: *Skin autofluorescence predicts cardio-renal outcome in type 1 diabetes: a longitudinal study*. Cardiovasc Diabetol 2016;15(1): 127.
120. Rajaobelina K, Farges B, Nov S, Maury E, Cephise-Velayoudom FL, Gin H, Helmer C, Rigalleau V: *Skin autofluorescence and peripheral neuropathy four years later in type 1 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev 2017;33(2): e2832.
121. Blanc-Bisson C, Velayoudom-Cephise FL, Cougnard-Gregoire A, Helmer C, Rajaobelina K, Delcourt C, Alexandre L, Blanco L, Mohammedi K, Monlun M, Rigalleau V: *Skin autofluorescence predicts major adverse cardiovascular events in patients with type 1 diabetes: a 7-year follow-up study*. Cardiovasc Diabetol 2018;17(1): 82.
122. Beck RW, Bergenstal RM, Riddlesworth TD, Kollman C, Li Z, Brown AS, Close KL: *Validation of Time in Range as an Outcome Measure for Diabetes Clinical Trials*. Diabetes Care 2019;42(3): 400-405.
123. Lu J, Ma X, Zhou J, Zhang L, Mo Y, Ying L, Lu W, Zhu W, Bao Y, Vigersky RA, Jia W: *Association of Time in Range, as Assessed by Continuous Glucose Monitoring, With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes*. Diabetes Care 2018;41(11): 2370-2376.
124. Lu J, Home PD, Zhou J: *Comparison of Multiple Cut Points for Time in Range in Relation to Risk of Abnormal Carotid Intima-Media Thickness and Diabetic Retinopathy*. Diabetes Care 2020;43(8): e99-e101.