

Università degli Studi di Verona
Scuola di Dottorato di Scienze Ingegneria Medicina

Dottorato di Ricerca in
“Imaging Multimodale in Biomedicina”
XXVII Ciclo

Applicazione delle nuove tecnologie nel trattamento del diabete
insulino dipendente nel bambino: analisi del flusso e destino
metabolico dei substrati in fase postprandiale

Coordinatore
Prof. Carlo Zancanaro

Tutor
Prof. Claudio Maffeis

Dottorando
Dott. Marco Marigliano

Anno Accademico 2016-2017
(Settore scientifico disciplinare di afferenza MED/38)

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI

NEUROSCIENZE, BIOMEDICINA E MOVIMENTO

SCUOLA DI DOTTORATO DI

SCIENZA INGEGNERIA MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN

IMAGING MULTIMODALE IN BIOMEDICINA

CICLO /ANNO (1° anno d'Iscrizione) XXVII / 2012

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

Applicazione delle nuove tecnologie nel trattamento del diabete insulino dipendente nel bambino: analisi del flusso e destino metabolico dei substrati in fase postprandiale

S.S.D. MED/38

(indicare il settore scientifico disciplinare di riferimento della tesi dato obbligatorio)*

Coordinatore: Prof. CARLO ZANCANARO

Firma 

Tutor: Prof. CLAUDIO MAFFEIS

Firma 

Dottorando: Dott. MARCO MARIGLIANO

Firma 

* Per l'elenco dei Settori Scientifico-Disciplinari (SSD) si veda il D.M. del 4 Ottobre 2000, Allegato A "Elenco dei Settori Scientifico -Disciplinari" reperibile sul sito del Ministero dell'Università e della Ricerca al seguente indirizzo:
http://www.miur.it/atti/2000/alladm001004_01.htm

INDICE

1	PREFAZIONE	pag 4
2	ABSTRACT	pag 7
3	INTRODUZIONE	pag 9
	3.1 Epidemiologia.....	pag 10
	3.2 Patogenesi.....	pag 12
	3.3 Fisiologia.....	pag 12
	3.4 Manifestazioni cliniche.....	pag 15
	3.5 Diagnosi.....	pag 15
	3.6 Complicanze a lungo termine.....	pag 16
	3.6.1 Microangiopatia diabetica.....	pag 18
	3.6.2 Macroangiopatia diabetica.....	pag 19
	3.7 Gestione del paziente diabetico.....	pag 23
	3.7.1 La terapia insulinica e il microinfusore.....	pag 25
	3.7.2 Il microinfusore e l'alimentazione.....	pag 28
4	SCOPO DELLA RICERCA E PRESUPPOSTI DELLO STUDIO	pag 29
5	DISEGNO SPERIMENTALE DELLO STUDIO	pag 31
6	MATERIALI E METODI	pag 33
	6.1 Popolazione oggetto dello studio.....	pag 33
	6.2 Valutazione antropometrica e composizione corporea.....	pag 34
	6.3 Composizione del pasto prova.....	pag 35
	6.4 Valutazione della spesa energetica e dell'ossidazione dei substrati.....	pag 35
	6.5 Valutazione dell'ossidazione dei carboidrati esogeni.....	pag 36
	6.6 Analisi statistica.....	pag 36
7	RISULTATI	pag 37
	7.1 Caratteristiche antropometriche.....	pag 37
	7.2 Fabbisogno insulinico ed andamento glicometabolico.....	pag 38
	7.3 Analisi delle curve.....	pag 39
	7.4 Ossidazione dei nutrienti.....	pag 42
	7.5 Correlazioni.....	pag 44
8	DISCUSSIONE	pag 49
9	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	pag 53
10	BIBLIOGRAFIA	pag 54

1. PREFAZIONE

La principale linea di ricerca seguita in questi anni verte sull'applicazione delle nuove tecnologie nel trattamento del diabete insulino-dipendente nella popolazione pediatrica, in particolare nei bambini e adolescenti affetti da Diabete Mellito di Tipo 1 (DMT1). Fin dal 2012, ho potuto svolgere tale attività presso la UOC di Pediatria ad Indirizzo Diabetologico e Malattie del Metabolismo del Prof. Claudio Maffei con il quale ho collaborato a numerosi progetti di ricerca.

Le attività di ricerca di questi anni mi hanno portato a concentrare l'attenzione soprattutto sul ruolo svolto dall'alimentazione e dalla nutrizione nella gestione del DMT1 (**Marigliano M**, Maffei C, et al. "Nutritional education and carbohydrate counting in children with type 1 diabetes treated with continuous subcutaneous insulin infusion: the effects on dietary habits, body composition and glycometabolic control." *Acta Diabetol.* 2013; Maffei C, Schutz Y, **Marigliano M**, et al. "Bias in food intake reporting in children and adolescents with type 1 diabetes: the role of body size, age and gender." *Pediatr Diabetes.* 2016; Maffei C, ... **Marigliano M**. "Glucose-independent association of adiposity and diet composition with cardiovascular risk in children and adolescents with type 1 diabetes." *Acta Diabetol.* 2017) e sul ruolo svolto dalle nuove tecnologie nella gestione del DMT1 (Rabbone I, Minuto N, **Marigliano M**, et al. "Insulin pump failures in Italian children with Type 1 diabetes: retrospective 1-year cohort study." *Diabet Med.* 2016). Inoltre ho avuto la possibilità di partecipare ad alcuni progetti di sviluppo e validazione dell'uso del

pancreas artificiale (una micro-pompa che somministra insulina in un soggetto con DMT1 in modo autonomo e ragionato sulla base di algoritmi matematici), la terapia del futuro per i soggetti con DMT1 (Del Favero S, ... **Marigliano M**, et al. “Randomized Summer Camp Crossover Trial in 5- to 9-Year-Old Children: Outpatient Wearable Artificial Pancreas Is Feasible and Safe.” *Diabetes Care*. 2016).

L’argomento di questa tesi è l’analisi del flusso dei substrati energetici in fase postprandiale e sul loro destino metabolico. Come stabilito nel protocollo dello studio, il controllo della glicemia in fase postprandiale gioca un ruolo chiave nello sviluppo del danno micro- e macro-vascolare nei soggetti affetti da DMT1. In questi pazienti non è ancora del tutto chiaro il destino metabolico dei substrati nutritivi dopo l’assunzione di un pasto, in particolare un pasto misto composto da carboidrati, proteine, grassi e fibra in proporzioni variabili. Inoltre diventa fondamentale, per l’ottimizzazione dei valori della curva glicemica postprandiale, uno dei più importanti obiettivi terapeutici nel trattamento del DMT1, comprendere l’interazione tra l’azione centrale e periferica dell’insulina somministrata al pasto e l’andamento della glicemia.

La terapia del DMT1 negli ultimi anni è molto cambiata, grazie soprattutto all’arrivo di nuove tecnologie che hanno reso più semplice e sofisticata la somministrazione dell’insulina. In particolare l’utilizzo del microinfusore, una pompa miniaturizzata che somministra insulina in continuo e al bisogno, ha permesso di rendere più precisa l’insulinizzazione basale e di semplificare la somministrazione di boli ai singoli pasti. I pazienti che utilizzano queste tecnologie hanno la possibilità di migliorare il controllo

glicometabolico e prevenire lo sviluppo delle complicanze vascolari a lungo termine, tipiche del DMT1.

Ho scelto di discutere la tesi sulla analisi del flusso e destino metabolico dei substrati nutritivi in fase postprandiale, utilizzando la tecnica degli isotopi naturali, con lo scopo di esporre i risultati conseguiti fin ora, grazie ad uno studio sperimentale condotto su ragazzi adolescenti con DMT1.

2. ABSTRACT

Scopo della ricerca e obiettivi dello studio

Lo scopo dello studio è stato quello di analizzare il comportamento e l'andamento dei profili glicemici postprandiali in un gruppo di bambini e adolescenti con DMT1 in trattamento con microinfusore (CSII), in relazione alla dose totale di insulina somministrata e al tempo impiegato nella somministrazione. Inoltre è stato valutato il destino ossidativo dei substrati energetici, in particolare del glucosio, dopo somministrazione di un pasto test naturalmente arricchito con ^{13}C .

Disegno sperimentale, materiali e metodi

Lo studio è stato disegnato come studio non randomizzato, *cross-sectional*, per misure ripetute. Nel giorno del test ciascuno dei 15 pazienti arruolati ha consumato un pasto prova, composto da carboidrati (CHO) naturalmente arricchiti con isotopi stabili (^{13}C), e calcolato in modo tale da avere il medesimo contenuto energetico per kg di massa magra (FFM) per ogni paziente. 15 minuti prima dell'assunzione del pasto è stato infuso un bolo d'insulina, calcolato in base al rapporto I/CHO (insulina/carboidrati) di ciascun paziente. La valutazione del metabolismo a riposo e dopo assunzione del pasto prova è stata effettuata tramite calorimetria indiretta computerizzata. Nelle tre ore successive al pasto sono state effettuate raccolte dell'espriato (*breath-test*) per l'analisi dell'ossidazione dei CHO, in particolare di quelli di origine esogena, e sono stati raccolti prelievi ematici per valutare i livelli plasmatici di glucosio, insulina, trigliceridi e acidi grassi liberi.

Risultati

Come parametro del controllo glicemico post-prandiale è stata presa in considerazione l'area sotto la curva (AUC) della glicemia totale (mg/dl*180min) e la AUC della glicemia netta (mg/dl*180min). E' stata riscontrata, a parità di adiposità (% di massa grassa) e di CHO *intake* del pasto assunto (g), una correlazione inversamente proporzionale tra la AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) e la quantità di CHO esogeni ossidati (g) ($r = -0.57$, $p < 0.05$), e tra la AUC della glicemia netta (mg/dl*180min) e la quantità di CHO esogeni ossidati (g) ($r = -0.58$, $p < 0.05$). Inoltre è stata riscontrata una correlazione inversamente proporzionale tra la HbA1c (%), parametro di controllo glicometabolico cronico, e la quantità di CHO esogeni ossidati (g) ($r = -0.64$, $p < 0.05$). Dall'altra parte è stata riscontrata una correlazione direttamente proporzionale tra la HbA1c (%), e la AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) ($r = 0.62$, $p < 0.05$).

Discussione e Conclusioni

I dati preliminari di questo studio ci indicano come l'ossidazione del glucosio introdotto con i CHO del pasto, giochi un ruolo fondamentale nel controllo della glicemia post-prandiale e sia significativamente correlato con il livello medio di controllo glicemico a lungo termine (HbA1c). Questi dati preliminari potrebbero contribuire nel definire come strumento di screening della sensibilità insulinica, un semplice test, il *breath-test* a due punti (0' e 180' dopo pasto con ^{13}C). Inoltre, i dati preliminari potranno essere la base per la creazione di nuovi possibili algoritmi di somministrazione insulinica preprandiale per permettere ai pazienti con DMT1 di ottenere profili glicemici migliori e un miglior controllo glicemico a lungo termine.

3. INTRODUZIONE

Il diabete mellito insulino-dipendente o diabete mellito di tipo 1 (DMT1) rappresenta una delle più importanti malattie croniche dell'età evolutiva e comporta rilevanti conseguenze per lo sviluppo sia fisico ed emotivo dell'individuo. Il DMT1 si sviluppa come risultato di una risposta autoimmune dell'organismo diretta contro le beta-cellule delle isole di Langerhans del pancreas, responsabili della produzione dell'insulina, che ne determina la distruzione (1). Le beta-cellule pancreatiche sono capaci di rilasciare nel sangue quantità variabili d'insulina in base all'andamento glicemico, allo scopo di mantenere i livelli di glucosio all'interno di un *range* fisiologico relativamente ristretto. Queste cellule sono quindi molto più che delle semplici produttrici d'insulina. Una volta che le beta-cellule sono state distrutte, i pazienti con DMT1 perdono la capacità di regolare i livelli di glucosio nel sangue e questo può comportare sia l'instaurarsi di eventi acuti (ad esempio la chetoacidosi diabetica o l'ipoglicemia severa) (2) che lo sviluppo di complicanze a lungo termine (come retinopatia, nefropatia o neuropatia diabetica); tali rischi rimangono tali anche con un'appropriata terapia insulinica sostitutiva (3, 4). Il DMT1 è una patologia multifattoriale: al suo sviluppo contribuiscono fattori genetici, ambientali e stocastici. Per numerose ragioni, tra le quali una maggiore igiene, l'esposizione al sole e altri fattori ambientali non ancora ben identificati, negli ultimi vent'anni l'incidenza della patologia è aumentata in maniera considerevole, soprattutto nei bambini di età inferiore ai 5 anni (5). Il DMT1 è la forma predominante di diabete in età pediatrica. Nella popolazione generale, invece, costituisce il 5-10% di tutti i casi di diabete.

3.1 Epidemiologia

Il DMT1 può essere diagnosticato a qualsiasi età, tuttavia esso è tra le malattie croniche più comuni dell'età evolutiva. Nonostante si tratti di una malattia a patogenesi autoimmune, il DMT1 è leggermente più frequente tra i maschi (6). L'incidenza della malattia mostra dei picchi nei bambini di età tra i 5 e i 7 anni e nel periodo a cavallo dell'inizio della pubertà è influenzata dai cambiamenti di stagione e dal mese di nascita, gli esordi di diabete sono più numerosi in autunno ed inverno (7-9). Anche lo sviluppo della risposta autoimmune alla base del DMT1 (la formazione di autoanticorpi rivolti contro le cellule delle isole di Langerhans), nei mesi o negli anni che precedono l'esordio clinico della malattia, mostra una certa correlazione con le stagioni (10). Tutte queste evidenze avvalorano l'ipotesi che a scatenare o a portare avanti il meccanismo patogenetico responsabile del DMT1 ci sarebbero dei fattori di tipo ambientale, non ancora identificati, che agirebbero nelle prime fasi della vita dell'individuo.

Secondo lo studio DIAMOND (DIAbetes MONDial), avviato nel 1990 dall'OMS con l'obiettivo di monitorare l'andamento dell'incidenza del DMT1 nei bambini di età compresa tra 0 e 14 anni, l'incidenza e la prevalenza del DMT1 presentano una marcata variabilità a seconda dei diversi Paesi considerati: ci sono aree a bassa incidenza, come il Venezuela, la Cina e l'India (ca. 0,1/100.000 nuovi casi per anno), aree ad alta incidenza, come il Canada (21/100.000) e la Norvegia (24/100.000) ed aree ad altissima incidenza, come la Sardegna (ca. 40/100.000) e la Finlandia (più di 60/100.000) (11, 12).

In Europa, secondo i dati del network EURODIAB (EUROpe and DIABetes), l'incidenza del DMT1 in età pediatrica è notevolmente aumentata negli ultimi 30 anni, e l'incremento maggiore è avvenuto in bambini di età inferiore ai 5 anni. Nel complesso il tasso d'incidenza è alto in Europa Settentrionale ed Occidentale, mentre è basso in Europa Centrale, Orientale e Meridionale. Si rileva la presenza di un gradiente tra Nord e Sud, tra la Finlandia, ad esempio, con 60/100.000 nuovi casi/anno e la Macedonia, dove l'incidenza è pari a 3,6/100.000 nuovi casi/anno. La Sardegna rappresenta un'eccezione, con un'incidenza (ca. 40/100.000) molto più elevata di quella dei Paesi vicini. In linea con il trend a livello mondiale, anche in Europa è stato rilevato un incremento annuo dell'incidenza del DMT1 del 3-4%, che arriva fino al 5,4% nella fascia di età 0-4 anni. Se tale tendenza rimarrà costante, si stima che nel 2020 l'incidenza del DMT1 in Europa nei bambini di età inferiore ai 5 anni sarà pari al doppio di quella del 2005 e che la prevalenza della malattia in età pediatrica aumenterà del 70% da 94.000 casi nel 2005 a 160.000 nel 2020 (13).

Per quanto riguarda l'Italia, l'incidenza globale è pari a circa 12/100.000 nuovi casi/anno. C'è anche qui un'altissima variabilità geografica, in particolare tra la Sardegna (dove l'incidenza, come detto, è altissima) e il resto d'Italia, e anche tra Nord Italia, dove l'incidenza è alta (ca. 11/100.000), Italia Centrale, dove è intermedia (ca. 9/100.000), e Italia Meridionale, dove è bassa (6/100.000)(14,15). Attualmente l'incremento d'incidenza annuo in Italia è sovrapponibile a quello presente in Europa e nel Mondo, ovvero pari al 3-4%.

3.2 Patogenesi

Il DMT1 è una malattia multifattoriale: al suo sviluppo concorrono sia fattori genetici sia fattori ambientali. Nello specifico, l'azione di alcuni fattori ambientali (ancora non ben identificati) sembra essere capace di scatenare, in individui geneticamente predisposti, la genesi di una reazione autoimmune diretta contro le beta cellule delle isole pancreatiche. La reazione autoimmune determina una progressiva distruzione delle beta-cellule, che può avvenire ad una velocità variabile e che alla fine comporta la loro completa scomparsa e quindi la mancanza totale di insulina nell'organismo. Si stima che al momento dell'esordio clinico del diabete circa 80-90% delle isole pancreatiche sia stato distrutto.

La storia naturale della malattia può essere suddivisa in quattro fasi distinte:

1. autoimmunità preclinica contro le cellule beta, con progressivo deficit di secrezione insulinica;
2. esordio clinico del diabete;
3. remissione transitoria, detta anche “luna di miele”, in cui si assiste ad una transitoria diminuzione della richiesta insulinica, associata a un miglioramento della funzione beta cellulare;
4. diabete stabilizzato insulino-dipendente, associato a complicanze acute e croniche.

La suscettibilità al DMT1 è geneticamente determinata dagli alleli del complesso

maggiore d'istocompatibilità di classe II (MHCII), che codificano per gli antigeni leucocitari umani (HLA). L'ereditarietà degli antigeni HLA-DR3 o HLA-DR4 sembra conferire un rischio 3-4 volte maggiore rispetto a quello della popolazione generale di sviluppare la malattia. La maggior parte degli individui che vanno incontro a un diabete manifesto inizia ad esprimere molteplici anticorpi molto tempo prima dell'esordio clinico del diabete: anticorpi anti-citoplasma delle cellule delle isole pancreatiche (ICA), anticorpi anti-insula (IAA) e anticorpi anti-glutammato decarbossilasi (GADA).

I punti chiave della patogenesi del DMT1 sono poi rappresentati dall'infiltrazione delle insule pancreatiche da parte di cellule mononucleate (insulite) e dalla progressiva riduzione delle cellule produttrici d'insulina (16).

3.3 Fisiopatologia

L'insulina prodotta dalle beta-cellule delle insule pancreatiche riveste un ruolo critico nell'accumulo e nell'utilizzo del glucosio, che rappresenta la principale fonte di energia per la cellula. In mancanza d'insulina, le cellule non sono più in grado di utilizzare il glucosio che viene assunto e quindi di funzionare correttamente. La secrezione dell'insulina, che avviene in risposta all'assunzione di cibo, è finemente regolata da meccanismi di natura nervosa, umorale e dipendenti dalla natura del substrato, che agiscono in maniera integrata. In condizioni di normalità, a livello dei tessuti epatico, muscolare e adiposo, il metabolismo dell'individuo presenta un regolare alternarsi tra stato iperinsulinemico anabolico postprandiale e stato

ipoinsulinemico catabolico caratteristico del digiuno.

Il DMT1 consiste in una condizione ipoinsulinemica catabolica progressiva, in cui l'alimentazione esaspera i processi catabolici. Se la mancanza d'insulina è moderata, l'utilizzazione del glucosio da parte del muscolo e del tessuto adiposo diminuisce, con conseguente iperglicemia postprandiale. A valori d'insulina ancora più bassi, la glicogenolisi e la gluconeogenesi epatiche producono quantità eccessive di glucosio e inizia allora a comparire iperglicemia a digiuno.

Dalla combinazione di deficit insulinico e incremento dei livelli plasmatici di ormoni contro-regolatori (glucagone, cortisolo, adrenalina, ormone della crescita) si ottiene un'accelerazione della lipolisi e dell'alterazione della sintesi lipidica. Le interrelazioni ormonali tra deficit insulinico ed eccesso di glucagone indirizzano gli acidi grassi liberi verso la produzione di corpi chetonici, ma la velocità di formazione di questi composti, in particolare di acido beta-idrossi-butyrico e di acido acetacetico, eccede la capacità di utilizzo da parte della periferia e di escrezione da parte del rene. Si ha pertanto un accumulo di chetoacidi che porta all'instaurarsi di un'acidosi metabolica (chetoacidosi diabetica). Tra le varie manifestazioni cliniche, essa causa una modificazione del respiro, che si fa rapido e profondo (respiro di Kussmaul), nel tentativo di compensare l'acidosi metabolica eliminando valenze acide con l'esprio. L'acetone, formatosi dalla conversione non enzimatica dell'acido acetacetico, è responsabile del caratteristico odore fruttato dell'alito del paziente in chetoacidosi.

Con la progressione della condizione d'ipoinsulinemia si ha la comparsa di un'alterazione di coscienza, che può eventualmente aggravarsi ed evolvere sino ad arrivare al coma (16).

3.4 Manifestazioni cliniche

Con il progredire della malattia, e quindi in rapporto alla diminuzione del numero di beta-cellule insulari, al conseguente peggioramento del deficit insulinico, all'iperglicemia e all'eventuale chetoacidosi, i sintomi si fanno più importanti e numerosi.

Inizialmente, quando i livelli di glucosio nel sangue eccedono la capacità di riassorbimento da parte del rene (soglia renale per il glucosio), compaiono poliuria e nicturia. La riduzione progressiva di cellule beta causa un'iperglicemia cronica che si traduce in una diuresi più consistente con conseguente polidipsia. Con le urine viene perso glucosio (diuresi osmotica), ovvero calorie, e ciò innesca un'iperfagia compensatoria. Se questa iperfagia non riesce a reintegrare le calorie eliminate con le urine, si assiste ad una perdita di grasso corporeo, con dimagrimento clinico e diminuzione delle riserve di tessuto adiposo sottocutaneo.

Quando i livelli d'insulinemia raggiungono valori molto bassi, si ha accumulo di chetoacidi e il quadro clinico peggiora rapidamente. L'accumulo di corpi chetonici determina dolore addominale, nausea e vomito, che impediscono l'assunzione orale di liquidi per reintegrare quelli persi con le urine. Si instaura così un circolo vizioso che, se non interrotto, può portare al coma chetoacidotico (15).

3.5 Diagnosi

Criteria diagnostici per il DM1

In assenza dei sintomi tipici della malattia (poliuria, polidipsia e calo ponderale), la diagnosi deve essere posta con il riscontro, confermato in almeno due occasioni di:

- HbA1c > 6,5%;

oppure

- valori plasmatici di glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dl (si definisce “digiuno” un periodo di assenza di introito calorico di almeno 8 ore);

oppure

- glicemia dopo 2 ore durante OGTT $75 \text{ g} \geq 200$ mg/dl (il test deve essere realizzato come descritto dalla World Health Organization, ovvero usando un carico di glucosio equivalente a 75 g di glucosio anidro disciolto in acqua).

In presenza di sintomi tipici della malattia (poliuria, polidipsia, calo ponderale), la diagnosi deve essere posta con il riscontro occasionale anche di un solo valore di glicemia ≥ 200 mg/dl (dove per “occasionale” si intende un qualsiasi momento della giornata, indipendentemente dal tempo di digiuno) (17).

3.6 Complicanze a lungo termine

La presenza cronica di elevati livelli di glicemia comporta dei danni a carico dei tessuti le cui cellule non necessitano di insulina per accedere al glucosio e che, in presenza di un aumento dei livelli di glucosio circolante, non hanno quindi modo di limitarne l'ingresso. Pertanto, in condizioni di eccessiva disponibilità dello zucchero, si assiste sia ad un incremento di alcune vie metaboliche, che all'attivazione di altre. In particolare attraverso vari meccanismi si verifica un aumento della produzione di radicali liberi e prodotti avanzati della glicazione o AGEs (ovvero molecole modificate dal glucosio) e l'attivazione della protein-chinasi C, una molecola che

gioca un ruolo chiave nei processi di trasduzione del segnale all'interno della cellula.

Tutto ciò avviene in particolare a livello delle cellule che costituiscono il vaso sanguigno, secondo un processo che conduce ad alterazioni a carico del ricambio cellulare, della matrice extracellulare, della regolazione del tono e della permeabilità vascolare e della coagulazione.

L'endotelio normale costituisce una barriera al passaggio di macromolecole e cellule, contribuisce a regolare la pressione arteriosa ed il flusso sanguigno, modula la coagulazione e la fibrinolisi e partecipa al rimodellamento vascolare. Un endotelio sano tende pertanto ad avere un'azione vasodilatante, anticoagulante ed anti-aggregante, agisce come una barriera selettiva, inibisce la proliferazione cellulare e l'accumulo di matrice. Per questo, tra i vari elementi cellulari che concorrono alla costituzione del vaso sanguigno, gli studi patogenetici si sono focalizzati sulle cellule endoteliali, dal momento che le alterazioni funzionali di tali cellule rappresentano l'evento centrale capace di innescare tutte le modificazioni vascolari tipiche della vasculopatia diabetica.

L'endotelio tipico della vasculopatia diabetica si presenta danneggiato e aterogeno: tende alla vasocostrizione, ha un'elevata permeabilità, un assetto che favorisce la coagulazione e l'aggregazione piastrinica e una tendenza alla proliferazione cellulare e all'accumulo di matrice. Il processo assume poi caratteristiche specifiche in relazione ai tipi di vasi interessati dal processo patologico: il sistema vascolare può essere colpito sia a livello dei grossi vasi, come l'aorta o l'arteria carotidea, sia a livello dei vasi di minor calibro che costituiscono il piccolo circolo, come i vasi responsabili dell'irrorazione di retina, nervi e rene, causando lesioni che possono

portare progressivamente ad infarto, cecità, neuropatia ed insufficienza renale. In base al distretto colpito, si parlerà quindi di macroangiopatia o di microangiopatia diabetica.

3.6.1 Microangiopatia diabetica

Le più importanti complicanze microvascolari associate al diabete mellito sono la retinopatia, la nefropatia e la neuropatia.

La retinopatia diabetica ha un decorso che può essere suddiviso in due fasi: quella non proliferante e quella proliferante. Nella prima fase, la parete dei capillari retinici diventa troppo spessa e ciò comporta l'interruzione del flusso di ossigeno e di sostanze nutritive e quindi la comparsa di diverse lesioni a carico della retina. La retinopatia proliferante è invece caratterizzata dalla proliferazione di piccoli vasi che vanno ad invadere la retina: quando si verifica l'occlusione di alcuni capillari, le zone limitrofe cercano di sopperire alla mancanza di ossigeno e di nutrienti con la produzione di nuovi capillari (neovascolarizzazione). La struttura dei vasi neoformati è però debole e disordinata: essi tendono a rompersi facilmente dando luogo a ripetuti episodi emorragici seguiti dalla formazione di tessuto fibrotico cicatriziale che, contraendosi, può esercitare una trazione sulla retina e causarne anche il distacco (18). Rispetto ai pazienti adulti, gli adolescenti affetti da DMT1 hanno un rischio maggiore di progressione verso una retinopatia che minacci la capacità visiva e tale progressione può essere rapida, soprattutto nei soggetti in cui il controllo glicemico è scarso (19, 20).

La nefropatia diabetica è definita come la presenza di una persistente proteinuria > 500 mg/24 ore o di un'albuminuria > 300 mg/24 ore e spesso ad essa si associano ipertensione ed riduzione del filtrato glomerulare (21). Sono necessari molti anni perché si arrivi allo stadio finale dell'insufficienza renale eppure, nonostante questo, per i giovani adulti affetti da DMT1 la nefropatia diabetica rappresenta una delle principali cause di morbilità e di mortalità (22).

Anche il sistema nervoso può essere colpito dal diabete mellito, sia nella sua componente somatica che autonoma. La polineuropatia diabetica sensitivo-motoria, in cui il danno è diffuso a tutte le fibre nervose periferiche, rappresenta la neuropatia generalizzata più frequente. Il disturbo si presenta insidiosamente e progressivamente: all'inizio c'è una perdita di sensibilità ed in un secondo momento viene interessata anche la funzione motoria, con una distribuzione a calza e a guanto delle lesioni. La neuropatia autonoma può provocare ipotensione posturale, vomito, diarrea, ritenzione urinaria, impotenza, eiaculazione retrograda, sudorazione anomala e compromissione del riflesso alla luce e può dare alterazioni della frequenza cardiaca e un allungamento del QT. Tali alterazioni della funzione cardiaca sono associate ad un aumento del rischio di morte improvvisa (23).

3.6.2 Macroangiopatia diabetica

E' ormai assodato che il processo aterosclerotico ha inizio nell'infanzia, tuttavia nei pazienti con DMT1 esso risulta accelerato; numerosi studi hanno dimostrato che nei

pazienti affetti il rischio di morte per malattie cardiovascolari aumenta da 2 a 20 volte rispetto alla popolazione generale, e che proprio le malattie cardiovascolari sono la principale causa di decesso dei giovani adulti con DMT1, ancor più che la nefropatia diabetica (24-27).

Il deterioramento della funzione endoteliale che precede la formazione della placca aterosclerotica è considerato un segno precoce di aterosclerosi nei bambini ed è quindi un importante *marker* non invasivo di rischio cardiovascolare, in particolare nei soggetti con DMT1 (28-31). I parametri utilizzati per valutare lo stato dei vasi sono l'IMT (Intima-Media Thickness), misurato a livello della carotide comune di destra, e la FMD (Flow-Mediated Dilatation) dell'arteria brachiale, valutata misurando la risposta del diametro arterioso ad un aumento del flusso. L'aumento dell'IMT è considerato un segno precoce del rimodellamento della parete arteriosa, mentre l'alterazione della FMD è un *marker* di alterazione delle cellule endoteliali: la dilatazione arteriosa è principalmente dovuta al rilascio di ossido nitrico (NO) da parte degli endotelioцити (32).

Nei giovani soggetti affetti da DMT1 si è riscontrato un precoce aumento dell'IMT ed un'alterazione della funzione endoteliale dopo soli 6 mesi di malattia (30, 31, 33-36).

Nei soggetti adulti l'alterazione dei 2 *markers*, IMT e FMD, si associa a fattori di rischio cardiovascolare e ad aterosclerosi coronarica (37, 38). Secondo una meta-analisi di otto studi, un incremento dell'IMT a livello carotideo pari a 0,1 mm comporta un aumento del rischio d'infarto dal 10% al 15% e del rischio di ictus dal 13% al 18% (dopo aggiustamento per sesso ed età) (39). Si è pertanto ipotizzato che nei giovani soggetti con DMT1 un aumento dell'IMT di 0,02 mm (cioè il 20% di 0,1

mm) possa comportare un maggiore rischio cardiovascolare rispetto ai soggetti sani di controllo. Tutti questi risultati sottolineano l'enorme importanza di una attenta gestione del diabete di tipo 1 durante l'età evolutiva (40).

In letteratura esistono numerose evidenze dell'importanza del controllo glicemico, misurato come HbA1c (o emoglobina glicosilata; essa è uno specchio fedele della glicemia media nei 60 giorni che precedono la misurazione), nella patogenesi dell'aterosclerosi nei soggetti con DMT1. Ogni riduzione dei valori di HbA1c sembra essere associata ad una consistente diminuzione del rischio di sviluppo di complicanze micro- e macrovascolari. Alla luce di tali evidenze, l'ADA (American Diabetes Association) ha formulato delle nuove linee guida in cui viene definito il target ottimale di HbA1c per ogni fascia d'età. Per ridurre in maniera sostanziale il rischio di vasculopatia diabetica e di aterosclerosi, nei bambini in età prescolare (0-6 anni) è sufficiente raggiungere un valore di HbA1c inferiore a 8,5%, anche se un miglior traguardo ($HbA1c < 8\%$) risulta ragionevole, se può essere raggiunto senza incorrere in eccessive ipoglicemie. Nei bambini in età scolare (6-12 anni) il valore target di HbA1c è $< 8\%$; anche in questo caso, compatibilmente con il numero di ipoglicemie, si consiglia di raggiungere valori più bassi, inferiori a 7,5%. Negli adolescenti e giovani adulti (13-19 anni) l'HbA1c dovrebbe rimanere al di sotto del 7,5%, se non addirittura del 7% (41).

Sul paziente con DMT1 l'ipertensione esercita, in termini di rischio cardiovascolare, un impatto maggiore che sull'individuo non diabetico; è pertanto auspicabile un regolare controllo dei valori pressori (42). La pressione sanguigna deve essere

mantenuta a valori al di sotto del 95° percentile per sesso ed età o al di sotto di 130/80 mmHg nel giovane adulto. In realtà valori pressori che ricadono tra il 90° e il 95° percentile configurano uno stato di pre-ipertensione, pertanto il target pressorio ottimale è un valore al di sotto del 90° percentile per sesso ed età (43).

Nel paziente affetto da DMT1 diventa importante anche il controllo del peso corporeo, poiché un BMI elevato rappresenta un fattore di rischio per malattie cardiovascolari e per problematiche microvascolari associate a retinopatia, nefropatia e neuropatia (44-47).

Nella popolazione generale l'alterazione dell'assetto lipidico rappresenta un indubbio fattore di rischio cardiovascolare e lo stesso accade nel paziente con DMT1. Sono numerosi gli studi (48, 49) che hanno dimostrato come il migliore predittore del livello di lipidi e di lipoproteine nell'adulto sia il livello che viene riscontrato nell'infanzia; la valutazione precoce del profilo lipidico assume pertanto una grande importanza. Il profilo lipidico ideale prevede i seguenti valori: colesterolo LDL < 100 mg/dl, colesterolo HDL > 45 mg/dl, trigliceridi < 150 mg/dl (50). Tra tutti questi, il colesterolo LDL sembra essere quello maggiormente associato allo sviluppo di malattie cardiovascolari; pertanto anche in età pediatrica in caso di un aumento eccessivo delle LDL (> 160 mg/dl o > 130 mg/dl in associazione ad almeno un altro fattore di rischio cardiovascolare) che non viene corretto con un intervento sullo stile di vita, si può rendere necessaria una terapia con statine (51, 53). Nell'adulto, al fine di quantificare il rischio cardiovascolare, si è dimostrato in realtà più utile il rapporto tra le varie lipoproteine, piuttosto che il loro valore assoluto (51). In modo particolare si è provata l'efficacia del rapporto trigliceridi/HDL (TG/HDL) (52). Recentemente è

stato documentato come, anche nel bambino, un aumento di tale rapporto si associ ad un profilo di rischio cardiometabolico sfavorevole; in particolare bambini con un rapporto TG/HDL >2,0 hanno un rischio aumentato di presentare segni subclinici di danno cardiaco (ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro) ed epatico (livelli di ALT elevati, che sono indicatori di NAFLD-Non Alcoholic Fatty Liver Disease), indipendentemente dai valori di circonferenza vita, pressione sanguigna e dalla presenza di insulino-resistenza (53).

3.7 Gestione del paziente diabetico

La gestione del paziente in cui sia stata fatta diagnosi di DMT1 prevede il coinvolgimento di un team multidisciplinare. Il giovane paziente e la sua famiglia dovrebbero essere coinvolti in un programma d'informazione in merito alla gestione della terapia insulinica, all'auto-monitoraggio della glicemia, ai possibili effetti di patologie intercorrenti sul controllo glicemico e al rilevamento e gestione delle eventuali ipoglicemie.

E' ormai globalmente accettata la convinzione che nella gestione del paziente diabetico, soprattutto se pediatrico, si debba porre una grande attenzione anche nel prevenire il più possibile lo sviluppo di future complicanze, sia macro- che microvascolari. E' quindi importante discutere con il paziente e la sua famiglia delle problematiche croniche collegate al DMT1; è fondamentale che il paziente prenda coscienza dell'aumentato rischio, soprattutto di natura cardiovascolare, che la malattia comporta e che quindi metta in atto dei cambiamenti dello stile di vita e adotti dei comportamenti che possano posticipare al massimo l'insorgenza di tali complicanze

(54). Sia l'attività fisica che la composizione della dieta svolgono ruoli importanti nella corretta gestione della malattia.

Lo svolgimento di una regolare attività fisica comporta una consistente riduzione della necessità di insulina e livelli di attività fisica da moderati a vigorosi sono stati associati a bassi livelli di HbA1c, indipendentemente da sesso, età, composizione corporea e dose di insulina (55). I benefici dell'attività fisica nella prevenzione e nel trattamento delle malattie cardiovascolari sono stati largamente descritti nell'adulto (56). Nei bambini l'attività fisica si è dimostrata capace di migliorare la pressione arteriosa, il profilo lipidico e la composizione corporea, che sono importanti determinanti del processo aterosclerotico (57). Il semplice aumento del flusso sanguigno nelle arterie indotto dall'esercizio fisico induce uno stress vascolare che provoca la produzione di NO non solo durante, ma anche dopo l'esercizio, con conseguente riduzione della resistenza vascolare (58).

Per ottimizzare il controllo glicemico e ridurre quindi il rischio cardiovascolare, l'American Diabetes Association raccomanda, oltre allo svolgimento di una regolare attività fisica, anche l'adozione di una dieta sana (59). In passato si è ritenuto che l'eliminazione di alcuni alimenti dalla dieta fosse il miglior modo per evitare aumenti della glicemia, ma questo approccio si è poi rivelato fallace e pericoloso, causando grave malnutrizione e conseguente precoce mortalità. Le linee guida di recente pubblicazione suggeriscono un approccio più flessibile in relazione agli interventi nutrizionali e al contenuto di carboidrati nella dieta, permettendo ai pazienti di regolare la dose di insulina da assumere in funzione della composizione del pasto.

Questo è il principio che sta alla base del conteggio dei carboidrati (CHC) (60). Tramite il CHC moderne terapie, come il microinfusore di insulina e regimi insulinici modificabili, hanno portato a diete meno restrittive (61). Tuttavia i giovani pazienti affetti da DMT1 devono comunque essere informati circa la necessità di seguire una dieta sana come parte integrante dell'educazione nutrizionale del diabete (61,62). Metha et al. hanno dimostrato come un preciso conteggio dei carboidrati ed un adeguato monitoraggio glicemico si associno a livelli di HbA1c più bassi, sia nel bambino che nell'adolescente (63).

3.7.1 La terapia insulinica e il microinfusore

Gli obiettivi del trattamento dei bambini e degli adolescenti affetti da DMT1 comprendono il raggiungimento di livelli glicemici vicini alla norma, in modo tale da ridurre il più possibile il rischio di glicemia, ottimizzare la qualità di vita e prevenire o ritardare la comparsa delle complicanze micro- e macroangiopatiche (64, 65). Da questo punto di vista, l'infusione continua sottocutanea d'insulina (CSII, Continuous Subcutaneous Insulin Infusion) rappresenta una valida opzione terapeutica, aiutando a raggiungere tali obiettivi nel paziente pediatrico (66, 67); la terapia con CSII si è rivelata efficace nel ridurre sia i livelli di emoglobina glicosilata, sia la frequenza degli episodi ipoglicemici. Inoltre tali effetti positivi sono stati raggiunti senza che ci fosse un impatto negativo sulla sicurezza della terapia, sulla qualità della vita, o sull'aumento del peso corporeo, soprattutto quando associata all'uso dei nuovi analoghi dell'insulina e ai miglioramenti tecnologici dei microinfusori (68-72). Tuttavia il dibattito internazionale tra i medici diabetologi riguardo ai vantaggi della

CSII rispetto alla terapia multi-iniettiva (MDI, Multiple Daily Injections) è ancora molto acceso, soprattutto in termini di rapporto costo-efficacia (73), riduzione stabile dei valori di HbA1c, episodi di ipoglicemia severa o di chetoacidosi diabetica e numero di ricoveri nei giovani pazienti con DMT1.

Generalmente l'uso della CSII nei bambini e negli adolescenti si associa ad un miglioramento del controllo glicemico e della qualità di vita (74) e non presenta rischi maggiori rispetto alla terapia MDI. Per ridurre i possibili rischi associati alla CSII è necessario predisporre gli stessi interventi che favoriscono la sicurezza della terapia in tutti i pazienti con DMT1, compresi un'informazione adeguata, il frequente monitoraggio della glicemia, l'attenzione all'alimentazione e all'esercizio fisico e il mantenimento di buoni canali di comunicazione con l'équipe di diabetologia. La diffusione dell'uso dei sensori glicemici per la rilevazione in continuo della glicemia ed i continui progressi tecnologici, fino all'auspicabile sviluppo di un sistema di infusione dell'insulina automatizzato, potrebbe portare ad un'ulteriore riduzione dei rischi correlati alle complicanze a lungo termine del DMT1 (75).

Tutti i pazienti in età pediatrica sono potenziali candidati all'uso della CSII (76-79) e non vi sono limiti di età per il suo inizio. A causa però dei costi elevati di tale terapia, è necessaria un'attenta valutazione dei possibili candidati, al fine di selezionare i pazienti più adatti alla CSII ed evitare i *drop-out*, cioè gli abbandoni della terapia. Pertanto la decisione di iniziare ad utilizzare il microinfusore dovrebbe essere raggiunta congiuntamente dal giovane paziente, dalla sua famiglia e dall'équipe diabetologica che ha in cura il bambino.

Secondo le raccomandazioni internazionali, l'indicazione principale alla scelta del

microinfusore è rappresentata dal raggiungimento di un buon compenso metabolico in soggetti che presentano uno scarso controllo glicemico, una marcata instabilità metabolica con ipoglicemie ricorrenti, insulino-resistenza o ridotto fabbisogno glucidico, pur seguendo già un regime MDI ottimale (che prevede quindi un'educazione completa anche sull'autocontrollo e sull'alimentazione). I criteri che servono per identificare un candidato idoneo alla CSII possono essere differenti a seconda dell'età del giovane paziente, a causa dei cambiamenti che avvengono nel metabolismo nei diversi anni del periodo evolutivo (80). Nei bambini molto piccoli il rischio principale è sicuramente rappresentato dall'ipoglicemia. Le altre indicazioni all'uso del microinfusore sono l'importante instabilità glicemica, il fabbisogno insulinico estremamente ridotto, con dosi non facilmente frazionabili e la difficoltà del piccolo paziente ad accettare iniezioni multiple (agofobia). Durante l'adolescenza l'indicazione principale è data dal “fenomeno alba” con iperglicemia al risveglio, poi ci sono la tipica insulino-resistenza, le ipoglicemie ricorrenti, lo scarso compenso metabolico e l'impatto della malattia sulla qualità della vita (81-85). Oltre alle indicazioni specifiche per i pazienti, sono indispensabili alcuni prerequisiti sia del centro diabetologico che prende in carico il paziente, come ad esempio la presenza di un team specializzato nell'uso e nell'insegnamento della terapia con CSII, sia della famiglia e del paziente, come l'accettazione dello strumento, la motivazione, l'educazione alla terapia e all'autocontrollo e la volontà di eseguire frequenti e accurati controlli glicemici. Se il centro diabetologico o la famiglia e il paziente non rispondono a tali prerequisiti, la controindicazione alla terapia con il microinfusore è assoluta.

Il momento giusto per iniziare la terapia con microinfusore rimane un fattore essenziale al fine di ottenere il miglior successo possibile. A causa poi dell'elevato costo della terapia, che è totalmente a carico del Sistema Sanitario Nazionale, è importante evitare i fallimenti. Pertanto si ritiene che il paziente candidato alla CSII debba effettuare un congruo periodo di terapia MDI prima di iniziare ad utilizzare il microinfusore (80). La sospensione della terapia va comunque presa in considerazione qualora vengano meno i presupposti che hanno portato ad iniziare la CSII.

3.7.2 Il microinfusore e l'alimentazione

Un'alimentazione bilanciata che contenga il 55-60% di carboidrati (CHO), derivanti da cereali, frutta e verdura, è un punto di partenza importante. I livelli glicemici postprandiali sono influenzati da diversi fattori e certamente non solo dalla quantità di carboidrati, ma anche dal tipo, dalla fonte, dalla composizione dell'intero pasto (in particolare dal contenuto di macronutrienti e fibra), dalla digeribilità e dal metodo di cottura. Per tali motivi, la terapia insulinica con CSII deve essere adattata al regime dietetico. Gli ultimi modelli di microinfusore hanno diverse funzioni molto utili, quali la capacità di poter somministrare vari tipi di bolo (semplice, a onda quadra, a onda doppia), il calcolatore di bolo e l'insulina attiva. E' fondamentale mettere il paziente nelle condizioni di poter utilizzare tutti questi strumenti, affinché possa adattarli al meglio alle proprie abitudini alimentari. E' possibile prendere in considerazione quantità e tipo di carboidrati, contenuto in fibre, indice glicemico del pasto e durata dell'assorbimento intestinale dei carboidrati e degli altri nutrienti. Per aiutare a trovare

la dose insulinica più adeguata al singolo pasto, o anche solo per correggere un'iperglicemia, sono determinanti il fattore di sensibilità insulinica (che determina l'entità di abbassamento della glicemia per unità di insulina) e il rapporto insulina/carboidrati (cioè quanti grammi di CHO vengono metabolizzati con un'unità di insulina). Tali valori sono di difficile identificazione in età pediatrica, diventa quindi molto importante poterli determinare e personalizzare, per trovare quelli più corretti per il singolo paziente (80).

4. SCOPO DELLA RICERCA E PRESUPPOSTI DELLO STUDIO

Nei soggetti affetti da DMT1 il controllo della glicemia in fase postprandiale gioca un ruolo chiave per lo sviluppo delle complicanze micro- e macrovascolari. L'ottimizzazione dell'andamento della curva glicemica postprandiale rappresenta pertanto uno degli obiettivi terapeutici più importanti nel trattamento di tale patologia. La disponibilità di nuovi strumenti terapeutici, come ad esempio del microinfusore d'insulina, offre nuove prospettive nella gestione della terapia insulinica, permettendo una riduzione del rischio di ipoglicemia ed un incremento del controllo glicemico (HbA1c). Per garantire un utilizzo ottimale del microinfusore è però necessario poter conoscere la corretta dose insulinica da infondere e le giuste tempistiche per farlo, sia prima sia dopo il pasto. Per calcolare tutto questo, sono in fase di creazione nuovi algoritmi, che devono tenere conto della composizione del pasto (ad esempio della quota di carboidrati presente) e del tempo. Per ottimizzare la somministrazione del bolo insulinico preprandiale diventano quindi determinanti le informazioni relative al destino metabolico dei substrati, soprattutto della quota di

carboidrati ossidati e non ossidati; la quota ossidata rispecchia la parte dei carboidrati usata per produrre energia, mentre la quota non ossidata deriva sia dai carboidrati esogeni che non sono stati utilizzati, e che quindi possono essere immagazzinati oppure rimanere in circolo e contribuire all'aumento della glicemia postprandiale, sia dai carboidrati endogeni, prodotti soprattutto dal fegato. Quindi la conoscenza del flusso postprandiale dei substrati, in particolare della frazione non ossidativa, permetterebbe di analizzare la relazione esistente tra apporto glucidico, grado di insulinizzazione in funzione del tempo, variazione glicemica e frazione di immagazzinamento del glucosio, offrendo così l'opportunità di costruire dei modelli matematici per calcolare più finemente la dose pre-prandiale di insulina. Ad oggi in letteratura non ci sono riferimenti al riguardo, né in ambito pediatrico, né per quanto riguarda l'adulto.

Lo scopo di questo studio è stato pertanto quello di analizzare il comportamento e l'andamento dei profili glicemici postprandiali in un gruppo di bambini diabetici in trattamento con microinfusore (CSII) in relazione alla dose totale di insulina somministrata e al tempo impiegato nella somministrazione, e il destino ossidativo dei substrati energetici, in particolare del glucosio, dopo somministrazione di un pasto test naturalmente arricchito con ^{13}C . La determinazione di tali variabili può consentire la personalizzazione dello schema terapeutico ed una migliore determinazione della dose insulinica utilizzata al pasto; inoltre i dati ottenuti potranno contribuire allo sviluppo di nuovi possibili algoritmi di somministrazione insulinica preprandiale che, in seguito all'assunzione di un pasto a composizione nota,

permettano di ottenere dei profili glicemici migliori nella fase postprandiale.

5. DISEGNO SPERIMENTALE DELLO STUDIO

Lo studio è stato disegnato come studio non randomizzato, *cross-sectional*, per misure ripetute. Ogni test si è svolto in un'unica giornata ed ha avuto una durata di circa 4 ore consecutive, durante le quali i pazienti sono rimasti sotto costante supervisione medica. Nei giorni che hanno preceduto lo svolgimento del test non sono stati fatti tentativi di modifica della dieta e delle abitudini alimentari dei bambini, che però sono stati invitati a non svolgere alcuna attività fisica. Il giorno del test ciascun bambino, accompagnato dai genitori, si è presentato presso l'ambulatorio della UOC di Pediatria ad Indirizzo Diabetologico e Malattie del Metabolismo della AOUI di Verona alle ore 8.00 di mattina in condizioni di digiuno dalla sera precedente. All'arrivo suo arrivo, il paziente è stato sottoposto alla misurazioni antropometriche (peso, statura, circonferenza vita, parametri vitali), è stata effettuata una impedenzometria con la valutazione della composizione corporea e per meglio definire la composizione del pasto

Una volta terminate queste valutazioni, è stata misurata la glicemia del paziente; nei casi in cui si è rivelata troppo elevata, è stata corretta con la somministrazione di un bolo di insulina somministrato attraverso il microinfusore del paziente stesso. Solo quando la glicemia ha raggiunto valori più stabili e vicini a quelli di normalità (compatibilmente con la presenza di DMT1; ca. 150 mg/dl) e dopo essere rimasto disteso su un lettino per qualche minuto in condizioni di assoluto riposo in ambiente termo-confortevole (ca. 24°C), il bambino è stato sottoposto alla prima calorimetria

indiretta della durata di 30', al fine di misurare e valutare gli scambi respiratori in condizioni basali e, di conseguenza, il metabolismo basale (ovvero la spesa energetica a riposo). Al termine della calorimetria, ad ogni bambino è stato fatto il primo prelievo ematico (ore 9.00 circa) tramite posizionamento di catetere venoso. Dopo aver effettuato il prelievo è stato consumato il pasto e, a 15 minuti dall'assunzione del pasto, ancora tramite il microinfusore, è stato somministrato un bolo semplice di insulina, calcolato in base al rapporto I/CHO (insulina/carboidrati) di ciascun paziente.

Il paziente ha quindi consumato il pasto prova, composto esclusivamente da carboidrati naturalmente arricchiti con isotopi stabili (^{13}C) e preparato in modo tale da avere il medesimo contenuto energetico per kg di massa magra (FFM) per ogni paziente. Al termine del pasto è stato raccolto il primo campione di espirato (*breath-test*) per la valutazione della quota di CHO esogena ed endogena ossidata in fase postprandiale. La raccolta del primo campione di espirato corrisponde al tempo 0' (T0) e definisce l'inizio delle tre ore dedicate alla raccolta dei valori delle diverse variabili in studio nella fase postprandiale. Al pasto sono seguiti altri sei prelievi venosi (effettuati ai minuti 30, 60, 90, 120, 150 e 180 della fase postprandiale) intervallati da pause durante le quali sono state effettuate altre tre calorimetrie indirette (a T30, T90 e T150), ciascuna della durata di 20', e sono stati raccolti altri 6 campioni di espirato. La Figura 1 illustra schematicamente la struttura di questo studio.

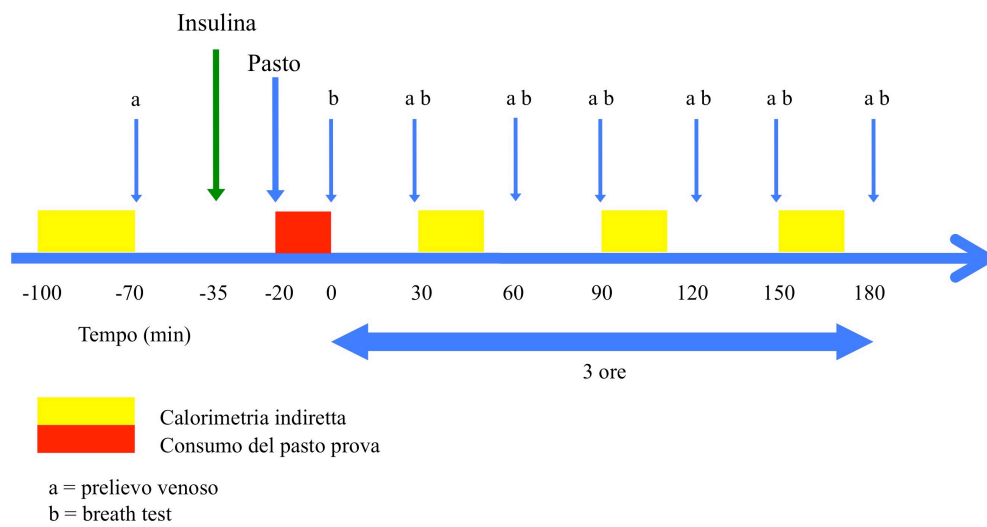


Figura 1 Disegno dello studio e tempistiche delle misurazioni.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Popolazione oggetto dello studio

Sono stati sottoposti a screening e considerati idonei all'arruolamento 44 pazienti che afferiscono regolarmente al Centro di Diabetologia Pediatrica della UOC di Pediatria ad Indirizzo Diabetologico e Malattie del Metabolismo della AOUI di Verona e tra questi hanno accettato di partecipare in 15.

I criteri di inclusione del protocollo di studio erano i seguenti::

- età compresa tra 10 e 16 anni;
- normopeso (BMI < 85° percentile per età e genere);
- diabete di tipo 1 (diagnosi formulata da almeno 1 anno) in trattamento con microinfusore;

- consenso alla partecipazione allo studio

I criteri di esclusione, invece, sono stati:

- presenza di altre patologie croniche (eccetto il DMT1);
- presenza di disturbi del comportamento alimentare;
- regime dietetico ipocalorico;
- sovrappeso ed obesità

Il consenso informato è stato ottenuto dai bambini e dai loro genitori prima che lo studio avesse inizio e la versione definitiva del protocollo di ricerca è stata approvata dal Comitato Etico dell'Azienda ULSS 20 di Verona. Non è stato previsto l'impiego di soggetti sani di controllo, in quanto non avrebbero tratto alcun beneficio diretto dimostrabile dalla partecipazione allo studio (pertanto eticamente improponibile).

6.2 Valutazione antropometrica e composizione corporea

All'arrivo del paziente al Centro di Diabetologia, in condizioni di digiuno, sono state effettuate le misurazioni di altezza, peso corporeo, circonferenza vita e pressione arteriosa. Il peso e la composizione corporea (% di massa grassa e % di massa magra) sono stati determinati tramite l'impiego di una bilancia impedenziometrica (Tanita BF-350, Tanita Corporation, Tokio, Japan). L'altezza è stata misurata utilizzando il metro a parete, con un'approssimazione di 0,5 cm. Sono stati poi calcolati il BMI e il relativo valore di deviazione standard (BMI z-score). La circonferenza vita è stata misurata al cm più vicino con un metro a nastro flessibile mentre i soggetti erano in

piedi, in fase di lieve espirazione, come circonferenza minima sul piano orizzontale tra il margine costale inferiore e il margine superiore della cresta iliaca.

6.3 Composizione del pasto prova

Il giorno del test ciascun paziente ha consumato un pasto prova calcolato in modo tale da avere il medesimo contenuto energetico per kg di massa magra (FFM) per ogni paziente; il pasto era costituito per il 13% da proteine, per il 29% da grassi e per il 58% da carboidrati e tutti i carboidrati presenti erano naturalmente arricchiti con ^{13}C (mais, succo tropicale). I valori degli apporti energetici e dei nutrienti sono stati calcolati basandosi su tabelle di confronto degli alimenti stabiliti dall'Istituto Italiano della Nutrizione, con l'uso di un programma di database e analisi computerizzata (MetaDieta, Meteda, S. Benedetto del Tronto, Italia). La consumazione del pasto è avvenuta sotto costante supervisione medica.

6.4 Valutazione della spesa energetica e dell'ossidazione dei substrati

La valutazione del metabolismo a riposo e dopo assunzione del pasto prova è stata effettuata tramite calorimetria indiretta computerizzata, che misura gli scambi respiratori tramite un sistema a calotta trasparente ventilata (Deltatrac, Datex, Inc., Finland). La prima misurazione è stata effettuata al T0 (misurazione basale) ed è durata 30'. Dopo l'assunzione del pasto prova sono state ripetute altre 3 misurazioni, della durata di 20 minuti ciascuna. Dall'analisi degli scambi respiratori delle quattro calorimetrie effettuate, quindi quantificando la quota di ossigeno consumata (VO_2) e la quota di anidride carbonica prodotta (VCO_2) dal soggetto nell'unità di tempo, è

stato possibile calcolare la spesa energetica del paziente sia a riposo (REE: Rest Energy Expenditure) che nei vari momenti della fase postprandiale. Il calcolo della spesa energetica è stato effettuato utilizzando la formula di Weir (spesa energetica a riposo = $3,94 \times \text{VO}_2 + 1,11 \times \text{VCO}_2$). Tutto ciò ha reso poi possibile la valutazione dell'ossidazione dei macronutrienti introdotti con la dieta e quindi della quota ossidata di CHO (esogena ed endogena), proteine e grassi introdotti con il pasto.

6.5 Valutazione dell'ossidazione dei carboidrati esogeni

A partire dal tempo 0, dopo l'assunzione da parte del bambino del pasto prova ricco in carboidrati naturalmente arricchiti in isotopi stabili (^{13}C), sono state effettuate in tutto 6 raccolte del respiro (*breath-test*), una ogni 30 minuti. Questo è stato effettuato per valutare il rapporto tra isotopi $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ nella CO_2 espirata e per ottenere una stima l'ossidazione dei carbonio esogeno nel periodo post-prandiale. La valutazione dell'arricchimento in isotopo ^{13}C nella CO_2 presente nel campione di espirato raccolto è stato determinato attraverso uno spettrometro di massa per l'analisi del flusso di isotopi (CF-IRMS, Tracer Mass; Europa Scientific Inc.).

6.6 Analisi statistica

Tutti i risultati sono espressi come media e deviazione standard (DS) o errore medio (SEM). Per quantificare il grado di associazione tra le variabili è stata utilizzata l'analisi di correlazione di Pearson. Il livello di significatività dei test è stato fissato a $p < 0.05$. I grafici sono stati creati utilizzando il software Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Le analisi statistiche sono state condotte con software SPSS

19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7. RISULTATI

7.1 Caratteristiche antropometriche

I quindici pazienti arruolati (M/F 9/6) presentavano le seguenti caratteristiche antropometriche: tutti i pazienti erano in fase di sviluppo puberale; l'età media al momento dell'esecuzione del test è risultata di $12,7 \pm 1,1$ anni; la durata media di malattia (DT1) è risultata pari a $5,7 \pm 3,7$ anni. Le caratteristiche antropometriche al momento dell'esecuzione del test sono riassunte nella **Tabella 1**.

	MEDIA	DS
Genere (M/F)	9/6	-
Età media (anni)	12,7	1,1
Durata DT1 (anni)	5,7	3,7
Peso (kg)	50,7	15,4
Altezza (cm)	155,9	11,9
BMI (kg/m ²)	20,4	4,0
BMI z score	0,68	2,02
Circ. Vita (cm)	71,3	10,2
CV/Altezza	0,46	0,04
Massa Magra (%)	79,8	9,4
Massa Grassa (%)	20,2	9,4
PA sistolica	107,0	9,2
PA diastolica	67,3	8,1

Tabella 1. Caratteristiche antropometriche dei 15 pazienti arruolati nello studio.

7.2 Fabbisogno insulinico ed andamento glicometabolico

Nei pazienti è stato riscontrato un equilibrio tra fabbisogno insulinico basale e consumo insulinico sotto forma di boli per la copertura dei pasti. In media sono state utilizzate 43,9 UI di insulina al giorno, suddivise in 22,3 UI/die per il fabbisogno basale e 21,6 UI/die sotto forma di boli *preprandiali* (**Figura 2**).

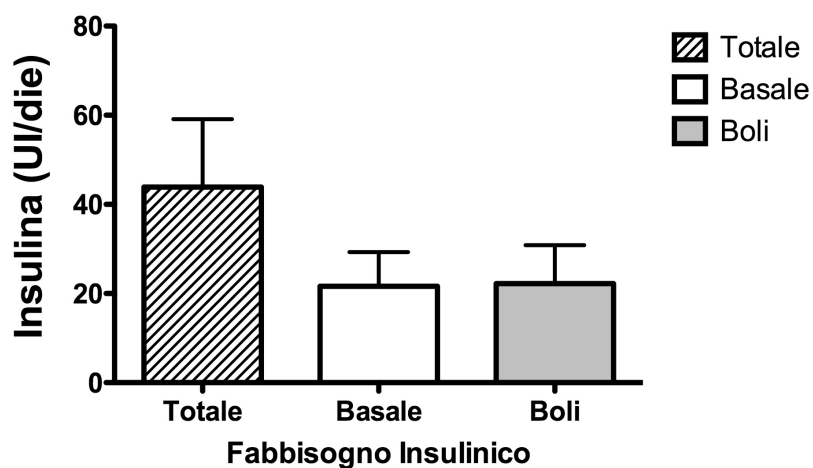


Figura 2. Ripartizione del fabbisogno insulinico.

Le restanti caratteristiche che descrivono il fabbisogno insulinico e l'andamento del controllo glicometabolico dei 15 soggetti sono riassunte nella **Tabella 2**.

	Media	Dev. Standard
Totale Insulina Basale/die (IU/die)	21,6	7,7
Totale Insulina Boli/die (IU/die)	22,3	8,6
Totale Insulina/die (IU/die)	43,9	15,3
Totale Insulina/Peso (IU/Kg)	0,87	0,2
HbA1c (%)	7,67	0,69

Tabella 2. Fabbisogno insulinico e controllo glicometabolico.

7.3 Analisi delle curve

Dopo l'assunzione del pasto prova contenente carboidrati arricchiti in ^{13}C , ogni 30 minuti sono stati effettuati prelievi ematici, per un totale di 7 prelievi. Attraverso l'analisi di questi campioni è stato valutato l'andamento dei valori di glicemia, insulinemia, trigliceridi (TG) e acidi grassi liberi (FFA); la glicemia si eleva nei primi minuti della fase postprandiale (al controllo dei 30'), si riduce nella parte centrale dell'osservazione (controlli a 60' e a 90') e torna ad assumere valori elevati in seguito (controlli a 120', 150' e 180' dal pasto). Per quanto riguarda i TG, all'inizio si assiste ad uno steady state (controlli a 30' e 60') cui segue un progressivo aumento dei valori (Figura 3).

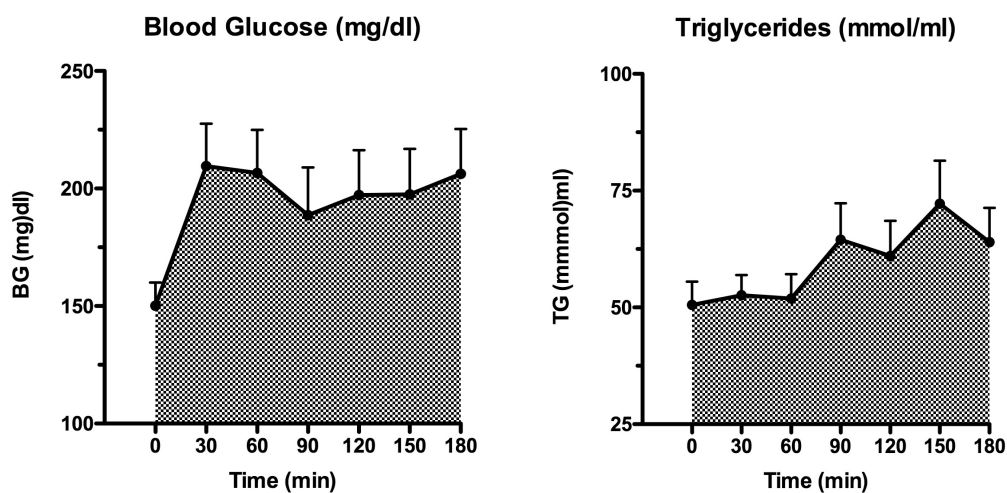


Figura 3. Andamento della glicemia postprandiale e dei trigliceridi. I valori sono espressi come media e DS.

Andando poi a confrontare la curva della glicemia con quella dell'insulinemia (Figura 4) si nota che la concentrazione insulinica raggiunge un picco nei primi

controlli (minuto 30 e 60) e tende poi progressivamente a diminuire nei controlli successivi, mentre l'andamento della glicemia presenta una sorta di “doppia fase”. Nella “prima fase” si assiste ad un rialzo della curva (minuto 30), cui segue una flessione al controllo dei 90 minuti (glicemia media pari a $188,6 \pm 20,3$ mg/dl), verosimilmente consensuale alla massima azione dell'insulina, nei controlli successivi (90', 120' e 150') c'è invece una tendenza al rialzo, in linea con la riduzione dei livelli di insulinemia.

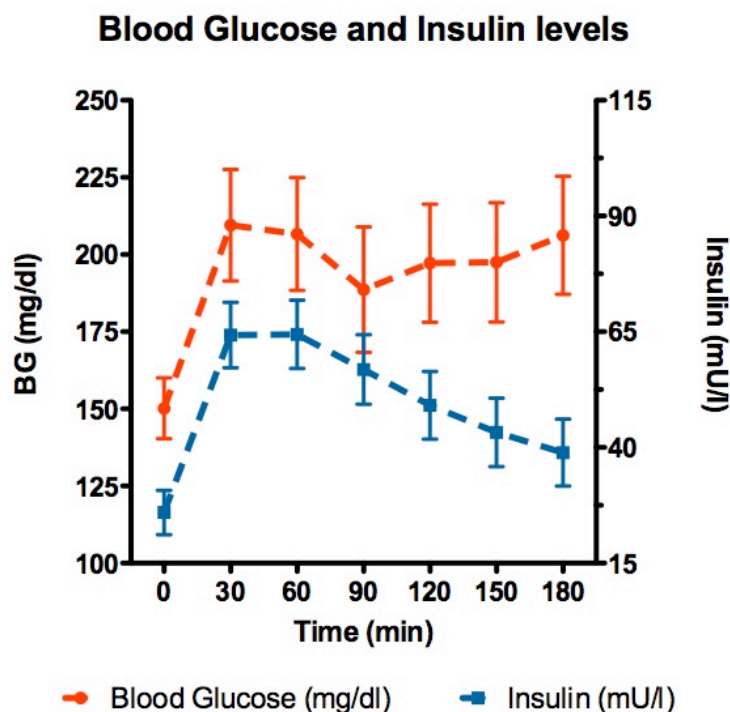


Figura 4. Confronto tra curva della glicemia (rosso) e curva dell'insulinemia (blu).

Secondo la curva dell'andamento dei valori degli acidi grassi liberi (**Figura 5**), la concentrazione dei FFA diminuisce nella prima parte del periodo postprandiale (al minuto 30 e 60), in seguito si assiste ad una stabilizzazione dei valori.

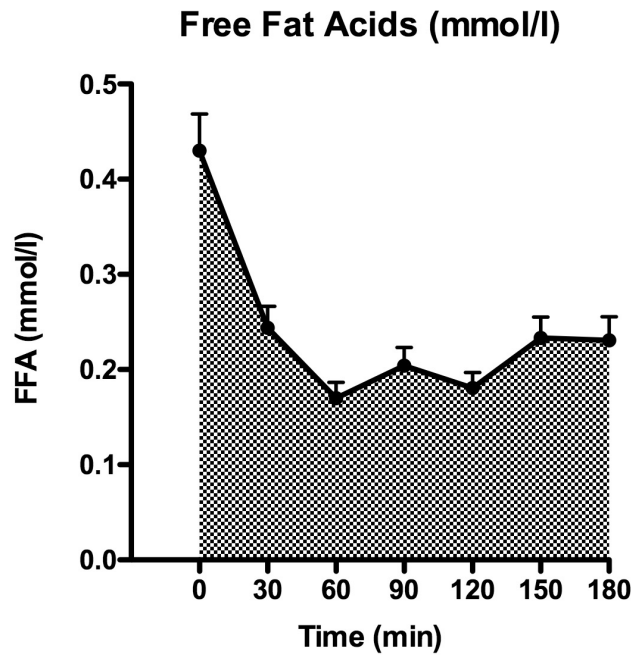


Figura 5. Andamento degli acidi grassi liberi (FFA) in fase postprandiale. I valori sono espressi come media e DS.

E' stata poi analizzata la curva dell'arricchimento di ^{13}C nella CO_2 espirata per valutare la componente ossidata dei CHO introdotti con il pasto prova (i valori sono stati ottenuti analizzando i campioni di espirato del *breath-test* raccolti nel corso dello studio). Come si può notare dalla **Figura 6**, nei 180 minuti di osservazione l'arricchimento in ^{13}C della CO_2 è costante in tutte le misurazioni, con il raggiungimento di un plateau al termine del periodo di osservazione.

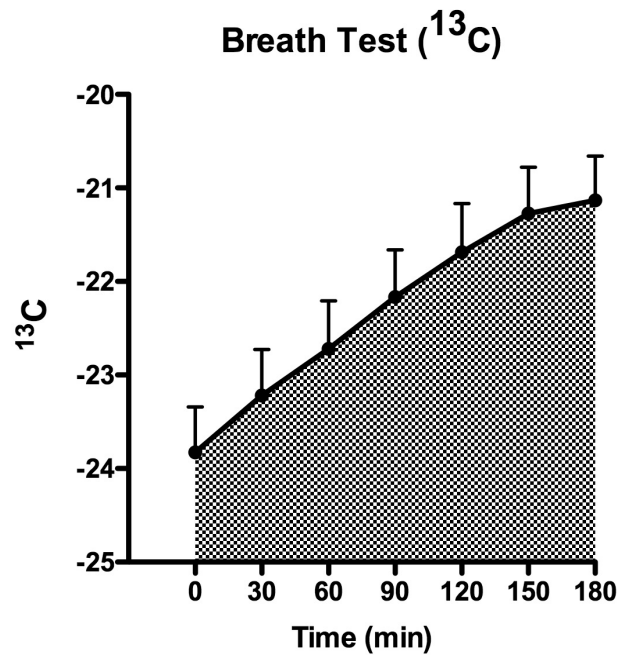


Figura 6. Andamento della curva del breath test postprandiale. I valori sono espressi come media e DS.

7.4 Ossidazione dei nutrienti

Dall'analisi del consumo e dell'ossidazione dei CHO nel corso dei 180 minuti di osservazione dopo la somministrazione del pasto prova e del bolo insulinico, si è calcolato che in totale sono stati ossidati circa 19 g di CHO ($18,7 \text{ g} \pm 1,6$) e che di questi circa 5 g ($5,4 \text{ g} \pm 0,49$, cioè il 30,9 %) sono di origine esogena, cioè introdotti con il pasto. Considerando che in media i pazienti hanno assunto con il pasto circa 90 g di CHO ($90,6 \text{ g} \pm 5,6$), risulta che la quota ossidata ammonta a quasi il 6% del totale (5,96%) (**Figura 7**).

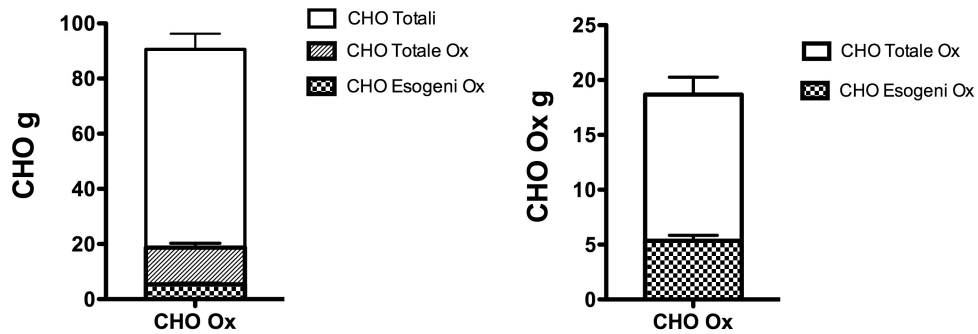


Figura 7. L'ossidazione totale dei CHO al termine dell'osservazione espressa in grammi. I valori sono espressi come media e SEM.

Se si valuta l'andamento dell'ossidazione dei CHO dopo il pasto prova (ai minuti 30, 90 e 150), si possono osservare una riduzione della quantità totale di CHO ossidati ed un contemporaneo aumento della quota ossidata di derivazione esogena (**Figura 8**). Tutto ciò a dimostrazione che l'assorbimento dei CHO introdotti con il pasto, in particolare nel caso di un pasto a composizione mista, sia un processo che richiede un certo periodo di tempo.

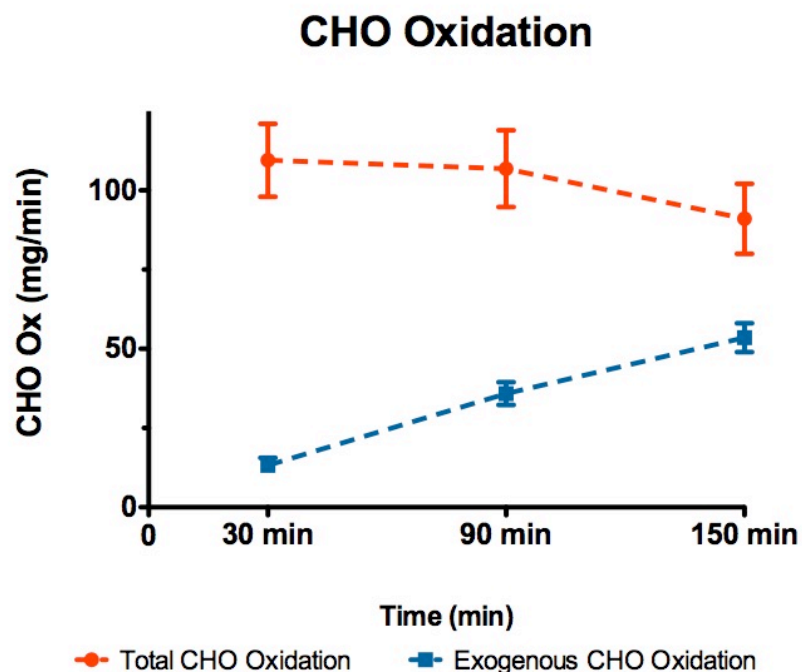


Figura 8. L'ossidazione dei CHO nel corso del test. In rosso la quota totale dei CHO ossidati, in blu la componente esogena introdotta con la dieta. I valori sono espressi come media e DS.

7.5 Correlazioni

Per valutare il grado di associazione tra le variabili distribuite normalmente è stata effettuata l'analisi di correlazione di Pearson. Come parametro del controllo glicemico post-prandiale è stata presa in considerazione l'area sotto la curva (AUC) della glicemia totale (mg/dl*180min) e la AUC della glicemia netta (mg/dl*180min), che è stata ottenuta sottraendo alla AUC della glicemia totale la glicemia media al *baseline*, nelle tre ore di osservazione del test. E' stata riscontrata, a parità di adiposità (% di massa grassa) e di CHO *intake* del pasto assunto (g), una correlazione inversamente proporzionale tra la AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) e la

quantità di CHO esogeni ossidati (g) ($r = -0.57$, $p < 0.05$), e tra la AUC della glicemia netta ($\text{mg/dl} \cdot 180\text{min}$) e la quantità di CHO esogeni ossidati (g) ($r = -0.58$, $p < 0.05$) (Figura 9a e 9b).

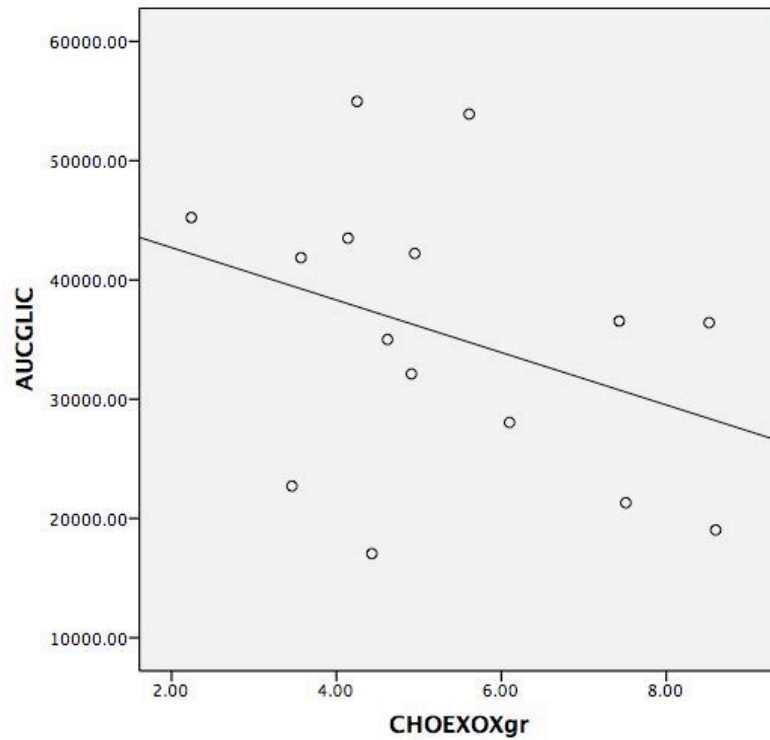


Figura 9a. Correlazione inversamente proporzionale tra la AUC della glicemia totale e l'ossidazione dei CHO esogeni al termine del test ($r = -0.57$, $p < 0.05$)

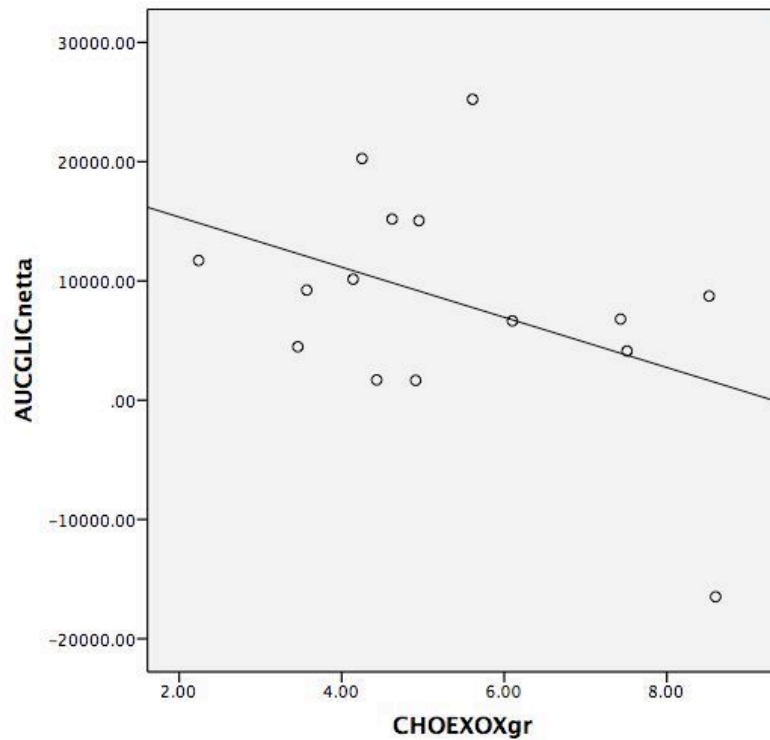


Figura 9b. Correlazione inversamente proporzionale tra la AUC della glicemia netta e l'ossidazione dei CHO esogeni al termine del test ($r = -0.58$, $p < 0.05$)

Inoltre è stata riscontrata, sempre a parità di adiposità (% di massa grassa) e di CHO intake del pasto assunto (g), una correlazione inversamente proporzionale tra la HbA1c (%), parametro di controllo glicometabolico cronico, e la quantità di CHO esogeni ossidati (g) ($r = -0.64$, $p < 0.05$) (**Figura 10**).

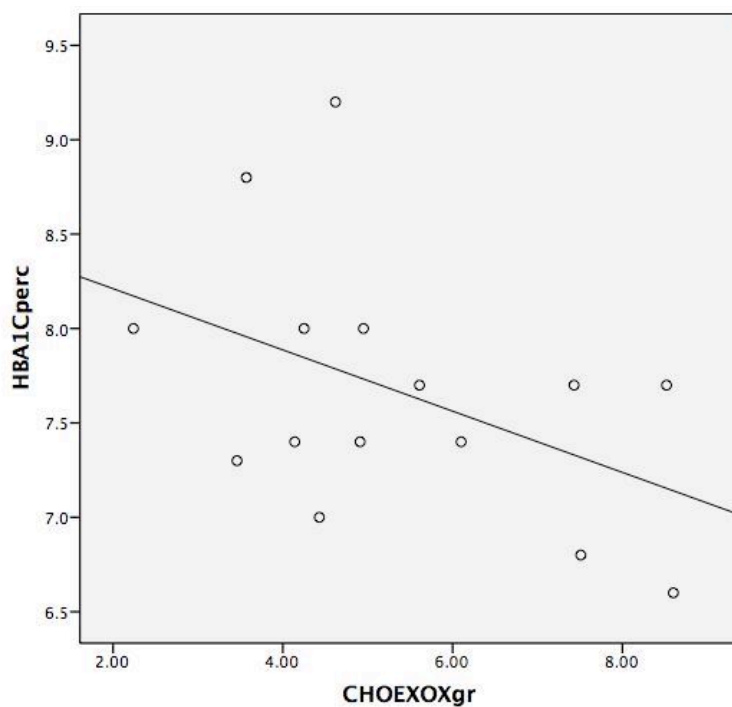


Figura 10. Correlazione inversamente proporzionale tra la HbA1c (%) e l'ossidazione dei CHO esogeni al termine del test ($r = -0.64$, $p < 0.05$)

Allo stesso tempo è stata riscontrata, a parità di adiposità (% di massa grassa) e di CHO intake del pasto assunto (g), una correlazione inversamente proporzionale tra il differenziale tra il tempo 0' e il tempo 180' del *breat-test* raccolto nei pazienti (deltaBT), parametro di arricchimento in ^{13}C dell'espriato dei pazienti, e la quantità di CHO esogeni ossidati (g) ($r = -0.61$, $p < 0.05$), (**Figura 11**). Non è risultata statisticamente significativa la correlazione tra il differenziale tra il tempo 0' e il tempo 180' del *breath test* raccolto nei pazienti (deltaBT) e la AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) anche se è mostrata una relazione di tipo positivo ($r = 0.40$,

p=NS). Probabilmente la limitata numerosità del campione ne ha ridotto la potenza statistica.

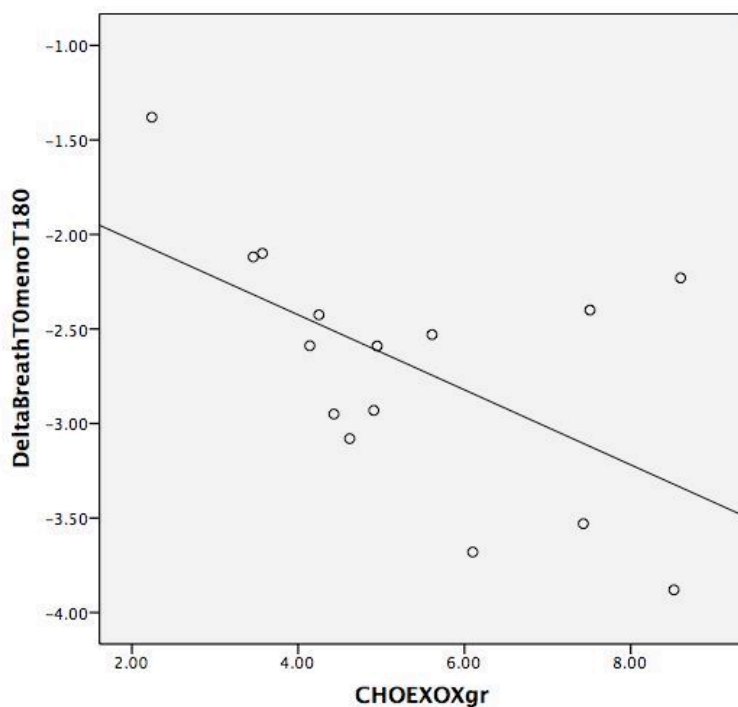


Figura 11. Correlazione inversamente proporzionale tra il deltaBT e l'ossidazione dei CHO esogeni al termine del test ($r = -0.61$, $p < 0.05$)

Dall'altra parte è stata riscontrata, a parità di adiposità (% di massa grassa) e di CHO intake del pasto assunto (g), una correlazione direttamente proporzionale tra la HbA1c (%), e la AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) ($r = 0.62$, $p < 0.05$), (**Figura 12**) e una correlazione inversamente proporzionale tra la AUC della

insulinemia netta (IU/ml*180min) e la AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) ($r = -0.60$, $p < 0.05$) e la AUC della glicemia netta (mg/dl*180min) ($r = -0.70$, $p < 0.02$).

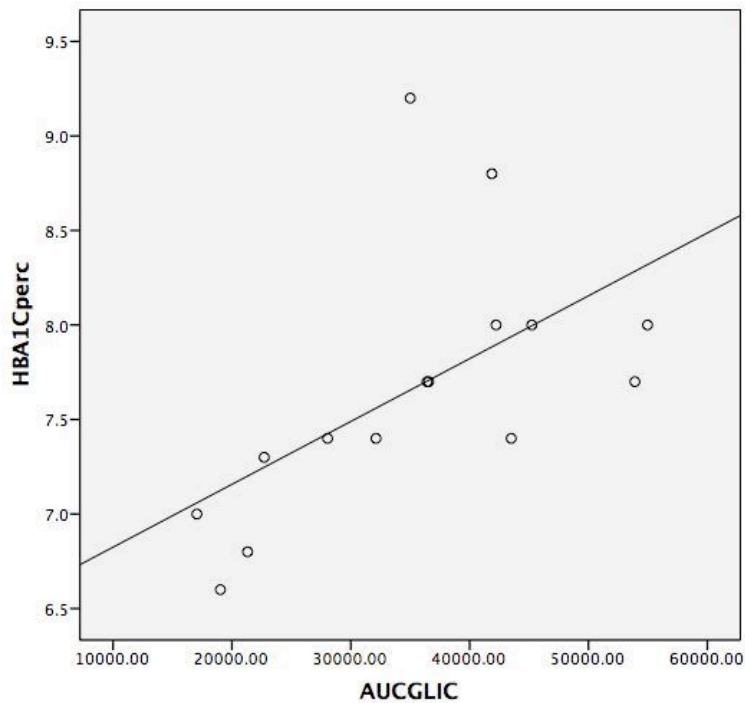


Figura 12. Correlazione direttamente proporzionale tra la HbA1c (%) e l'AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) ($r = 0.62$, $p < 0.05$)

8. DISCUSSIONE

Nei soggetti affetti da DMT1 il controllo della glicemia in fase postprandiale gioca un ruolo chiave nello sviluppo del danno micro e macrovascolare (24-27). Pertanto, l'ottimizzazione dei valori della curva glicemica postprandiale costituisce uno dei più

importanti obiettivi nel trattamento di questa patologia cronica. La disponibilità di nuovi strumenti terapeutici, come ad esempio il microinfusore di insulina (80), offre nuove prospettive nel panorama della gestione della terapia nei pazienti con DMT1, come la riduzione degli eventi ipoglicemici e l'incremento del controllo glicemico (in termini di AUC della glicemia postprandiale e valori di assoluti di HbA1c).

I dati preliminari dello studio mostrano come l'effetto insulinico del bolo semplice somministrato in condizioni standard (con un tempo d'attesa convenzionale di 15 minuti prima della consumazione del pasto), risulti essere discretamente efficace nel controllare la glicemia nel breve periodo (nei primi 60 e 90 minuti), ma non nella fase successiva, in cui si assiste ad una riduzione del livello di insulinemia e ad un contestuale aumento della glicemia (Figura 4). Questa osservazione supporta l'ipotesi a favore dell'importanza della somministrazione del bolo insulinico in tempi diversi (ad esempio ricorrendo ad un bolo *multi-wave* con somministrazione di insulina prolungata nel tempo) per ottimizzare il controllo glicemico postprandiale dopo il picco d'azione insulinica.

Nelle tre ore successive all'assunzione del pasto test, pasto a composizione standard (13% di proteine, 29% di grassi e 58% di carboidrati) e a contenuto calorico sovrapponibile a quello di un comune pranzo, i pazienti con DMT1 ossidano una quantità corrispondente a circa il 22% del contenuto in CHO presente nel pasto. In particolare, circa il 30% di questa quota deriva dai CHO di origine esogena (assunti cioè con gli alimenti), mentre l'altro 70% è di origine endogena (prodotto

principalmente tramite i processi di gluconeogenesi e di glicogenolisi che avvengono nel fegato) (Figura 7). A parità di condizioni di partenza, cioè di caratteristiche antropometriche, adiposità del soggetto, glicemia, contenuto energetico e di CHO del pasto, e a parità di valori di insulinemia nel corso del test, si è riscontrata una correlazione inversa tra livello di ossidazione dei CHO esogeni ed andamento glicemico.

I dati mostrati da questo studio, anche se ancora preliminari, mettono alla luce nuove conoscenze sul destino metabolico del glucosio dopo un pasto misto (CHO, proteine, grassi e fibra). In particolare è stato mostrato che, a parità di percentuale di massa grassa corporea (indice periferico di insulino-resistenza) e a parità di *intake* di CHO nel pasto, esiste una correlazione inversamente proporzionale tra il livello e la capacità ossidativa dei CHO esogeni introdotti con il pasto e il livello di AUC della glicemia totale e della glicemia netta rispetto al *baseline* ($r = -0.57$, $p < 0.05$; $r = -0.58$, $p < 0.05$, rispettivamente). Questo dato ci mostra come la capacità di ossidazione dei CHO esogeni introdotti con il pasto, e quindi il livello indiretto di sensibilità insulinica del soggetto con DMT1, si rifletta direttamente nell'esposizione al glucosio nelle 3 ore della fase post-prandiale (AUC della glicemia); questo è quindi indirettamente correlato con un aumentato rischio di sviluppare macroangiopatia diabetica nella vita adulta. In altri termini, a parità di ossidazione totale, i soggetti, che hanno ossidato una quota minore di CHO di origine esogena, sono quelli la cui AUC della glicemia nel corso delle tre ore di osservazione ha assunto i valori più elevati (ovvero in cui il controllo glicometabolico è stato peggiore). Tutto questo

sembra indicare che questi soggetti hanno una minore capacità di utilizzare i CHO introdotti con il pasto, verosimilmente a causa di una maggiore resistenza insulinica indipendente dalla quantità di tessuto adiposo. La mancata significatività statistica nel rapporto tra il differenziale tra il tempo 0' e il tempo 180' del *breath-test* (deltaBT), la AUC della glicemia totale (mg/dl*180min) e la AUC della glicemia netta (mg/dl*180min), non ci permette di proporre il *breath-test* a due punti (Tempo 0' e Tempo 180') come semplice test di screening del livello di capacità ossidativa del soggetto affetto da DMT1 dopo pasto test. La ridotta numerosità del campione ha limitato la potenza statistica dell'analisi, e, probabilmente, con un ampliamento della casistica in studi futuri, potremmo arrivare a proporre il *breath-test* come test di screening indiretto della sensibilità insulinica.

L'analisi dei dati dello studio ha mostrato anche una correlazione tra la capacità ossidativa dei CHO esogeni introdotti con il pasto e il livello di HbA1c, espressa in % ($r = -0.64$, $p < 0.05$), indice cronico del controllo glicometabolico di un soggetto con DMT1. Questo dato ci mostra come la capacità ossidativa dei CHO non è solamente correlata in maniera inversamente proporzionale con l'evento "acuto", rappresentato dal pasto misto con CHO, proteine, grassi e fibra (e quindi l'esposizione a glicemie elevate durante le 3 ore successive al pasto stesso) ma è anche correlata con il l'evento "cronico" di cattivo controllo del DMT1, rappresentato da un elevato livello medio dell'HbA1c, parametro che rispecchia il livello medio della glicemia negli ultimi 3 mesi. Questo dato ci supporta ulteriormente nell'ipotesi che divenga sempre più importante il controllo della glicemia post-prandiale per migliorare la gestione a

lungo termine del paziente con DMT1 e che divenga sempre più necessario lo sviluppo di nuove strategie di personalizzazione dello schema insulinico, soprattutto per quanto riguarda il calcolo, la calibrazione e la tempistica nella somministrazione della dose insulinica da utilizzare ai pasti.

9. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

I dati preliminari di questo studio ci indicano come l'ossidazione dei substrati energetici, in particolare il glucosio introdotto con i CHO del pasto, giochi un ruolo fondamentale nel controllo della glicemia post-prandiale, *marker* sempre più importante del controllo glicemico in un soggetto con DMT1. Inoltre il livello di ossidazione del glucosio, indice della capacità del soggetto affetto da DMT1 di utilizzare in maniera metabolicamente attiva i CHO introdotti con il pasto, è significativamente correlato con il livello medio di controllo glicemico a lungo termine (HbA1c), a dimostrazione che questo indicatore indiretto di sensibilità insulinica, risulta importante anche nel controllo cronico della malattia diabetica. Sulla base di questi dati preliminari e con un ampliamento della casistica, si potrà meglio definire il possibile ruolo come strumento di screening della sensibilità insulinica, di un test semplice da eseguire, come il *breath-test* a due punti (0'-180') dopo pasto con ¹³C. Inoltre i dati preliminari di questo studio possono essere considerati la base sulla quale sviluppare nuovi possibili algoritmi di somministrazione insulinica preprandiale che permettano di ottenere profili glicemici migliori e in prospettiva, miglior controllo glicemico a lungo termine.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, M. S. & Bluestone, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 447–485 (2005).
2. Vauzelle-Kervroedan, F. et al. Analysis of mortality in French diabetic patients from death certificates: a comparative study. *Diabete Metab.* 25, 404–411 (1999).
3. Maahs, D. M. & Rewers, M. Editorial: mortality and renal disease in type 1 diabetes mellitus—progress made, more to be done. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3757–3759 (2006).
4. Steffes, M. W. et al. (EDIC Research Group). Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *J. Am. Med. Assoc.* 290, 2159–2167 (2003).
5. Harjutsalo, V., Sjoberg, L. & Tuomilehto, J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 371, 1777–1782 (2008).
6. Ostman J, Lonnberg G, Arnqvist HJ, et al. Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983–2002. *J Intern Med* 2008; **263**: 386–94
7. Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 2008; **371**: 1777–82.
8. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. Seasonal variation of diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabet Med* 2009; **26**: 673–78.

9. Kahn HS, Morgan TM, Case LD, et al. Association of type 1 diabetes with month of birth among US youth: the SEARCH for Diabetes in Youth study. *Diabetes Care* 2009; **32**: 2010–15.
10. Kukko M, Kimpimaki T, Korhonen S, et al. Dynamics of diabetes-associated autoantibodies in young children with human leukocyte antigen-conferred risk of type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 2712–17.
11. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; **39**: 481–97.
12. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009; **373**: 2027–33.
13. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009; **373**: 2027–33.
14. Carle F, Gesuita R, Bruno G, Coppa GV, Falorni A, Lorini R, Martinucci RE, Pozzilli P, Prisco F, Songini M, Tenconi MT, Cherubini V, RIDI Study Group. Diabetes incidence in 0- to 14-year age group in Italy: a 10 year prospective study. *Diabetes Care*, 2004; 27: 2790-2796
15. Bruno G, Maule M, Merletti F, Novelli G, Falorni A, Iannilli A, et al. Age-period-cohort analysis of 1990-2003 incidence time trends of childhood diabetes in

Italy: the RIDI Study. *Diabetes* 2010; 59 (9): 2281-7.

16. Alemzadeh R, Wyatt DT: Diabete mellito nei bambini. In: *Pediatria di Nelson*. Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. Eds Leschiera Paola. Publ Elsevier, 2009, pp 2465-93.

17. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes. *Diabetes Care*, 2014; 37 (Suppl. 1): S81-S90.

18. Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Archives of Ophthalmology*, 1984; 102: 520-26.

19. Maguire A, Chan A, Cusumano JM, et al. The case for biennial retinopathy screening in children and adolescents. *Diabetes Care*, 2005; 28(3): 509-13.

20. Maguire A, Cusumanu JM, Craig ME, et al. The case for biennial retinopathy screening in children and adolescents: response to Stefansson. *Diabetes Care*, 2006; 29: 178-9.

21. Mogensen CE, Keane WF, Bennett PH, et al. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet*, 1995; 346: 1080-84.

22. Schultz CJ, Konopelska-Bahu T, Dalton RN, et al. Microalbuminuria prevalence varies with age, sex, and puberty in children with type 1 diabetes followed from diagnosis in a longitudinal study. Oxford Regional Prospective Study Group. *Diabetes Care*, 1999; 22: 495-502.

23. Donaghue KC, Chiarelli F, Trotta D, et al. Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, 2009; 10: 195-203.

24. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *New England Journal of Medicine*, 1998; 338: 1650-56.
25. Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia*, 2005; 48: 1445-53.
26. Skrivarhaug T, Bangstad HJ, Stene LC, et al. Long-term mortality in a nationwide cohort of childhood-onset type 1 diabetic patients in Norway. *Diabetologia*, 2003; 49: 298-305.
27. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*, 2003; 46: 760-65.
28. Galle J, Busse R, Bassenge E. Hypercholesterolemia and atherosclerosis change vascular reactivity in rabbits by different mechanisms. *Arterioscler Thromb*, 1991; 11: 1712-18.
29. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 1992; 340: 1111-15.
30. Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 41: 661-65.
31. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, et al. Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes. *Circulation*, 2004; 109: 1750-55.
32. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, et al. Nitric oxide is responsible for flow-

dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, 1995; 91: 1314-19.

33. Stakos DA, Schuster DP, Sparks EA, et al. Cardiovascular effects of type 1 diabetes mellitus in children. *Angiology*, 2005; 56: 311-17.

34. Dalla Pozza R, Bechtold S, Bonfig W, et al. Age of onset of type 1 diabetes in children and carotid intimal-medial thickness, *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92: 2053-57.

35. Atabek ME, Pirgon O, Kurtoglu S, et al. Evidence for an association between type 1 diabetes and premature carotid atherosclerosis in childhood. *Pediatr Cardiol*, 2006; 27: 428-33.

36. Krantz JS, Mack WJ, Hodis HN, et al. Early onset of subclinical atherosclerosis in young persons with type 1 diabetes. *J Pediatr*, 2004; 145: 452-57.

37. Wofford JL, Kahl FR, Howard GR, et al. 3rd Relation of extent of extracranial carotid artery atherosclerosis as measured by B-mode ultrasound to the extent of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb*, 1991; 11: 1786-94.

38. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*, 1995; 26: 1235-41.

39. Lorenz MWMH, Bots ML, Rosvall M, et al. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intimal-medial thickness: a systemic review and meta-analysis. *Circulation*, 2007; 115: 459-67.

40. Trigona B, Aggoun Y, Maggio A, et al. Preclinical non-invasive markers of atherosclerosis in children and adolescents with type 1 diabetes are influenced by

physical activity. *J Pediatr*, 2010; 157: 533-39.

41. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes – 2014. *Diabetes Care*, 2014; 37 (Suppl.1): 434-44.

42. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, et al. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*, 1993; 16: 434-44.

43. Donaghue KC, Chiarelli F, Trotta D, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines “009 compendium. Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, 2009; 10 (Suppl.12): 195-203.

44. Dorchy H, Claes C, Verougstraete C. Risk factors of developing proliferative retinopathy in type 1 diabetic patients: role of BMI. *Diabetes Care* 2002; 25 (Suppl.4): 798-99.

45. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. Impact of overweight on chronic microvascular complications in type 1 diabetes patients. *Diabetes Care*, 2005; 28: 1649-55.

46. Stone ML, Craig ME, Chan AK, et al. Natural history and risk factors for microalbuminuria in adolescents with type 1 diabetes: a longitudinal study. *Diabetes Care*, 2006; 29: 2072-77.

47. Koivisto VA, Stevens LK, Mattock M, et al. Cardiovascular disease and its risk factors in IDDM in Europe. EURODIAB IDDM Complications Study Group. *Diabetes Care*, 1996; 19: 689-97.

48. Webber LS, Srinivasn SR, Wattigney WA, et al. Tracking of serum lipids and

lipoproteins from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol*, 1991; 133: 884-99.

49. Lauer RM, Lee J, Clarke WR. Predicting adult cholesterol levels from measurements in childhood and adolescence: the Muscarine Study. *Bull N Y Acad Med*, 1989; 65: 1127-42; discussion 1154-60.

50. Trevor J, Kimberly Y, Kuller LH, et al. Lipid and blood pressure treatment goals for type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2001; 24: 1053-59.

51. Millàn J, Pintò, Munoz A, et al. Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc Health Risk Manag*, 2009; 5: 757-65.

52. Kannel WB, Vasan RS, Keyes MJ, et al. Usefulness of the triglyceride high-density lipoprotein versus the cholesterol high-density lipoprotein ratio for predicting insulin resistance and cardiometabolic risk (from the Framingham Off-spring Cohort). *Am J Cardiol*, 2008; 101: 497-501.

53. Di Bonito P, Moio N, Scilla C, et al. Usefulness of the high triglyceride-to-HDL cholesterol ratio to identify cardiometabolic risk factors and preclinical signs of organ damage in outpatient children. *Diabetes Care*, 2012; 35: 158-62.

54. NICE clinical guidelines, July 2004 (last modified: October 2011).

55. Cuenca-García M, Jago R, Shield JPH, et al. How does physical activity and fitness influence glycaemic control in young people with type 1 diabetes? *Diabet Med*, 2012; 29: 369-76.

56. Thompson PD, Buchner D, Pina IL, et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from

the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical activity and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*, 2003; 107: 3109-16.

57. Strong WB, Malina RM, Blimkie CJ, et al. Evidence based physical activity for school-age youth. *J Pediatr*, 2005; 146: 732-7.

58. Kingwell BA, Sherrard B, Jennings GL, et al. Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. *Am J Physiol*, 1997; 272: H1070-7.

59. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes-2012. *Diabetes Care*, 2012; 33: S4-S10.

60. Costa ACP, Thalacker M, Besenbruch N, et al. Metabolic and nutritional aspects in the carbohydrates counting method treatment of Diabetes Mellitus type 1. *J Brazilian Soc Food Nutr*, 2001; 36 (1): 151-62.

61. Rovner AJ, Nansel TR. Are children with type 1 diabetes consuming a healthful diet? *The Diabetes Educator*, 2009; 35 (1): 97-107.

62. Gellar L, Rovner AJ, Nansel RT. Whole grain and legume acceptability among youths with type 1 diabetes. *The Diabetes Educator*, 2009; 35 (3): 422-7.

63. Metha SN, Quinn N, Volkening LK, et al. Impact of carbohydrate counting on glycemic control in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2009; 32 (6): 1014-

64. The diabetes Control Complication Trial (DCCT) research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-depend- ent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.

65. The Diabetes Control and Complication Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC). Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005;353:2643-52.
66. Battelino T, Ursic-Bratina N, Bratanic N, Zerjav-Tansek M, Avbelj M, Krzisnik C. The use of continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) as the treatment of choice in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004; 1(suppl 3):537-9.
67. Eugster EA, Francis G, Lawson-Wilkins Drug and Therapeutics Committee. Position Statement: continuous subcutaneous insulin infusion in very young children with type 1 diabetes. *Pediatrics* 2006;118:e1244-9.
68. McMahon SK, Airey FL, MArangou DA, McElwee KJ, Carne CL, Clarey AJ et al. Insulin pump therapy in children and adolescents: improvements in key parameters of diabetes management including quality of life. *Diabet Med* 2005; 22: 92-6.
69. Weinzimer SA, Sikes KA, Steffen, AT, Tamborlane WV. Insulin pump treatment of childhood type 1 diabetes. *Pediatr Clin North Am* 2005;52:1677-88.
70. Rodrigues IA, Reid HA, Ismail K, Amiel SA. Indications and efficacy of continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) therapy in type 1 diabetes mellitus: a clinical audit in a specialist service. *Diabet Med* 2005;22:842-9.
71. Nahata L. Insulin therapy in pediatric patients with type I diabetes: continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily injections. *Clin Pediatr (Phila)* 2006;45:503-8.

72. Tamborlane WV, Swan K, Sikes KA, Steffen AT, Weinzimer SA. The renaissance of insulin pump treatment in childhood type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:205-13.
73. Nuboer R, Bruining J. Cost-effectiveness of continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) in children: illusion or delusion? *Pediatr Diabetes* 2006;7:39-44.
74. Bernard KD, Lloyd CE, Skinner TC. Systematic review: quality of life associated to pump use in type 1 diabetes. *Diabetic Med* 2007;24:607-17.
75. Pohar SL. Subcutaneous open-loop insulin delivery for type 1 diabetes: paradigm real-time system. *Issues Emerg Health Technol* 2007;105:1-6.
76. Fox LA, Buckloh LM, Smith SD, Wysocki T, Mauras N. A randomized controlled trial of insulin pump therapy in young children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1277-81.
77. Willi SM, Planton J, Egede L, Schwarz S. Benefits of continuous subcutaneous insulin infusion in children with type 1 diabetes. *J Pediatr* 2003;143:796-801.
78. Plotnick LP, Clark LM, Brancati FL, Erlinger T. Safety and effectiveness of insulin pump therapy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:1142-6.
79. Kordonouri O, Hartmann R, Lauterborn R, Barnekow C, Hoeffe J, Deiss D. Age-specific advantages of continuous subcutaneous insulin infusion as compared with multiple daily injections in paediatric patients: one-year follow-up comparison by matched-pair analysis. *Diabetes Care* 2006;29:133-4.
80. Scaramuzza A, Pinelli L, Salardi S, et al. Raccomandazioni italiane all'utilizzo del microinfusore sottocutaneo di insulina in età pediatrica. *G It Diabetol Metab*

2008; 28: 253-260.

81. Cotterill AM, Daly F, Holly JM, Hughes SC, Camacho-Hübner C, Abdulla AF et al. The “dawn phenomenon” in adolescents with insulin dependent diabetes mellitus: possible contribution of insulin-like growth factor binding protein-1. *Clin Endocrinol* 1995;43:567-74.

82. Rabbone I, Bobbio A, Berger K, Trada M, Sacchetti C, Cerutti F. Age-related differences in metabolic response to continuous subcutaneous insulin infusion in pre-pubertal and pubertal children with type 1 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 2007; 30:477-83.

83. Fisher LK. The selection of children and adolescents for treatment with continuous subcutaneous insulin infusion (CSII). *Pediatric Diabetes* 2006;7(suppl 4):11-14.

84. Kapellen TM, Heidtmann B, Bachmann J, Ziegler R, Grabert M, Holl RW. Indication for insulin pump therapy in different age groups- an analysis of 1567 children and adolescents. *Diabetic Med* 2007;24:836-42.

85. Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A et al.; American Diabetes Association. Nutrition principles and recommendations in diabetes. *Diabetes Care* 2004;1(suppl 1):S36-46.