

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICOII**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE  
XXII CICLO**

**COORDINATORE: Prof. Gianni Marone**



**Le complicanze micro e macroangiopatiche  
del diabete mellito tipo 2**

**Tutor  
Prof.ssa A.A. Rivellese**

**Dottoranda  
Maria Masulli**

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE: IL DIABETE MELLITO TIPO 2 E LE SUE COMPLICANZE CRONICHE</b>	<b>3</b>
1.1 Epidemiologia del diabete mellito tipo 2	3
1.2 Le complicanze croniche del diabete: la microangiopatia diabetica	3
1.3 La nefropatia, la retinopatia e la neuropatia diabetica	6
1.4 Le complicanze croniche del diabete: la macroangiopatia diabetica	10
1.5 Gli altri fattori di rischio cardiovascolare	11
<b>2. SCOPI</b>	<b>12</b>
<b>3. STUDI</b>	<b>13</b>
3.1 Studio n.1. Utilizzo dell'indice di resistenza renale nella identificazione e predizione della nefropatia diabetica	13
3.2 Studio n. 2. Studio delle subfrazioni lipoproteiche con risonanza magnetica nucleare e della loro relazione con l'aterosclerosi subclinica – lo studio GOCADAN	25
3.3 Studio n. 3. Effetti sull'incidenza di eventi cardiovascolari dell'aggiunta di un tiazolidinedione rispetto ad una sulfonilurea in pazienti con diabete mellito tipo 2 non adeguatamente compensati con metformina.	36
<b>4. CONCLUSIONI</b>	<b>47</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>49</b>
<b>6. APPENDICE: Pubblicazioni</b>	<b>56</b>

# **1. INTRODUZIONE: IL DIABETE MELLITO TIPO 2 E LE SUE COMPLICANZE CRONICHE**

## **1.1. Epidemiologia del diabete mellito tipo 2**

Il diabete mellito tipo 2 rappresenta la forma di diabete di più comune riscontro nella pratica clinica: si stima che in Italia il diabete tipo 1 rappresenti il 3-4% di tutti i casi di diabete noto e il diabete tipo 2 rappresenti oltre il 90% dei casi (1). Un recente studio italiano, condotto nella città di Torino nel 2003, ha mostrato che la prevalenza di diabete noto è pari al 4,9% (2). Dati dell'ISTAT, provenienti da archivi elettronici dei medici di medicina generale e da alcuni studi basati sul consumo di farmaci antidiabetici indicano che la prevalenza della malattia ha superato il 5% (3). Su base nazionale questo indica che i diabetici noti in Italia sono circa 3 milioni.

Lo studio di Brunico, uno dei pochi studi di popolazione condotti con l'esecuzione di un OGTT, ha mostrato un'incidenza del diabete tipo 2 in soggetti di 40-79 anni pari a 7,6 casi per 1000 persone/anno (4), con un'incidenza 11 volte superiore nei soggetti con IFG, 4 volte superiore nei soggetti con IGT, 3 volte superiore in quelli sovrappeso e 10 volte superiore negli obesi.

## **1.2. Le complicanze croniche del diabete: la microangiopatia diabetica**

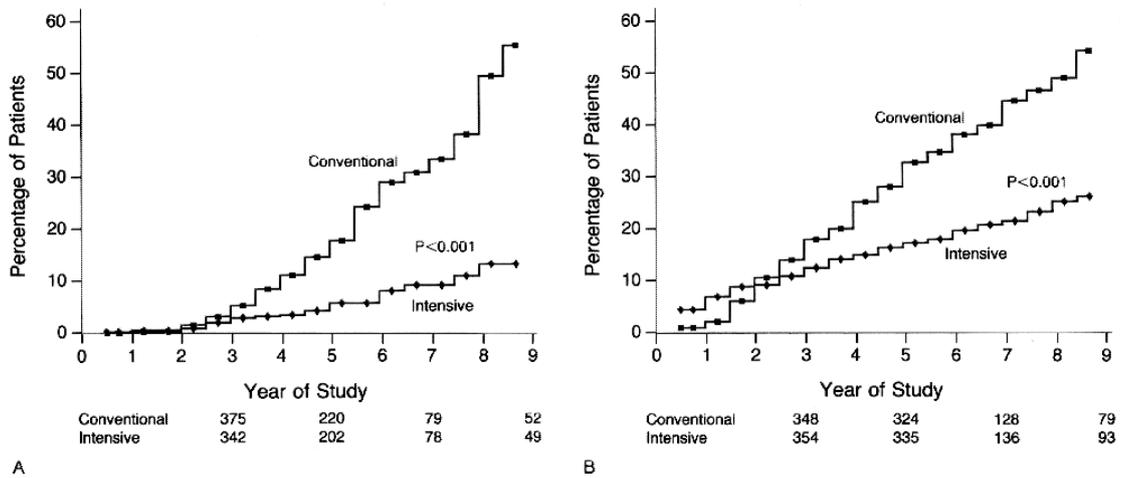
Numerosi studi, osservazionali e di intervento, indicano la durata del diabete e il cattivo compenso glicemico come i fattori più frequentemente associati allo sviluppo e alla progressione delle complicanze microvascolari del diabete.

Studi clinici randomizzati controllati come il DCCT (5), condotto in soggetti con diabete tipo 1, e gli studi Kumamoto (6) e UKPDS (7,8), condotti in soggetti con diabete tipo 2, hanno dimostrato come il miglioramento del compenso glicemico (valori medi di HbA1c pari o leggermente superiori a 7%, 1% circa al di sopra del range di normalità) sia associato alla riduzione dell'incidenza di complicanze microangiopatiche (retinopatia, nefropatia e neuropatia).

Nello studio DCCT, lo sviluppo e la progressione di retinopatia sono risultati significativamente meno frequenti nei pazienti in trattamento intensivo: il rischio di retinopatia si riduceva del 76% nella coorte in prevenzione primaria e del 54% nella coorte di intervento secondario. L'effetto benefico del compenso era evidente in entrambi i sessi, in tutti i gruppi di età e di durata del diabete ed era indipendente dalla presenza di condizioni concomitanti quali ipertensione arteriosa e neuropatia autonoma.

**The DCCT Study. Cumulative Incidence of a Sustained Change in Retinopathy in Patients with IDDM Receiving Intensive or Conventional Therapy.**

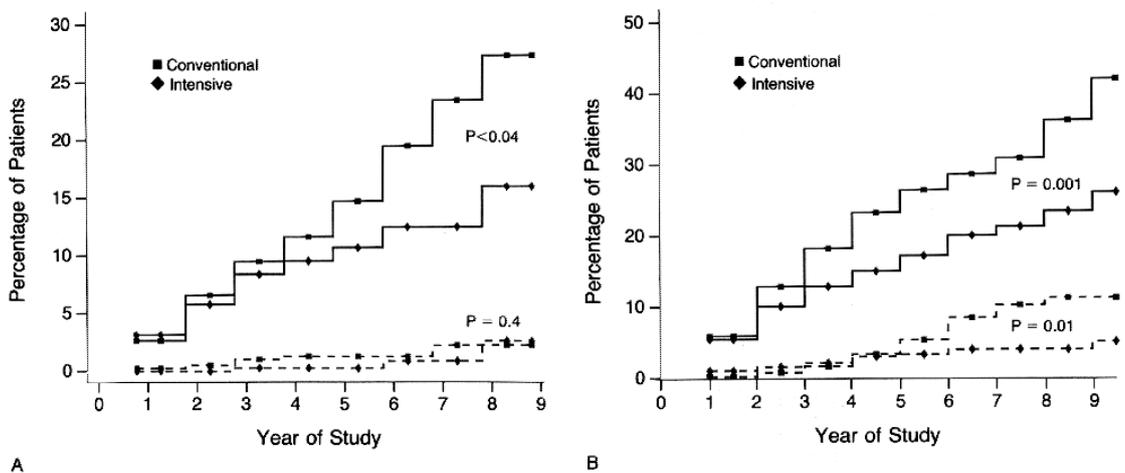
In the primary-prevention cohort (Panel A), intensive therapy reduced the adjusted mean risk of the onset of retinopathy by 76 percent during the course of the study, as compared with conventional therapy ( $P < 0.001$ ). In the secondary-intervention cohort (Panel B), intensive therapy reduced the adjusted mean risk of progression of retinopathy by 54 percent as compared with conventional therapy ( $P < 0.001$ ).



Per quel che riguarda la nefropatia, il trattamento intensivo riduceva il rischio di sviluppare microalbuminuria del 34% nella coorte in prevenzione primaria e del 43% nel gruppo di intervento secondario: in questo secondo gruppo l'evoluzione verso la macroproteinuria si riduceva del 56%. Gli effetti positivi del compenso permanevano anche dopo correzione per i valori di pressione arteriosa, durata della malattia, livelli di emoglobina glicata all'ingresso nello studio e fumo di sigaretta.

**The DCCT Study. Cumulative Incidence of Urinary Albumin Excretion  $\geq 300$  mg per 24 Hours (Dashed Line) and  $\geq 40$  mg per 24 Hours (Solid Line) in Patients with IDDM Receiving Intensive or Conventional Therapy.**

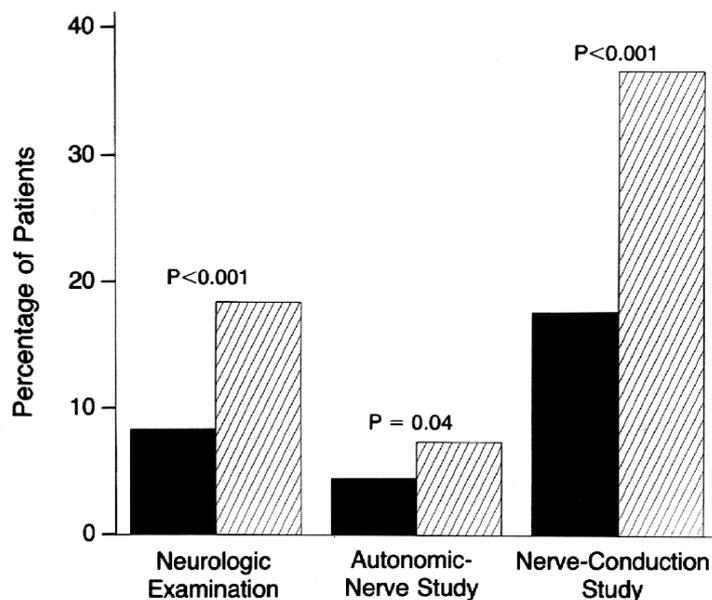
In the primary-prevention cohort (Panel A), intensive therapy reduced the adjusted mean risk of microalbuminuria by 34 percent ( $P < 0.04$ ). In the secondary-intervention cohort (Panel B), intensive therapy reduced the adjusted mean risk of albuminuria by 56 percent ( $P = 0.01$ ) and the risk of microalbuminuria by 43 percent ( $P = 0.001$ ), as compared with conventional therapy.



Riguardo alla neuropatia, dopo 5 anni di osservazione l'incidenza di questa condizione si riduceva nel gruppo in trattamento intensivo del 69% nella coorte in prevenzione primaria e del 57% nel gruppo di intervento secondario.

**The DCCT Study. Prevalence of Abnormal Clinical Neurologic Examinations, Abnormal Results of Nerve-Conduction Studies, and Abnormal Autonomic-Nerve Studies at Five Years in Patients Receiving Intensive (Solid Bars) or Conventional (Hatched Bars) Therapy.**

Abnormal results of nerve-conduction studies were defined as abnormal results of neurophysiologic tests in at least two peripheral nerves. The analysis included all patients from either cohort who did not have the abnormality in question at base line.



Questo studio ha dunque dimostrato che il compenso glicemico può ritardare lo sviluppo e la progressione delle complicanze microvascolari del diabete; i benefici sono maggiori nei pazienti con minore durata della malattia e con bassi lavori di emoglobina glicata al momento dello studio.

Successivamente lo studio DCCT-EDIC (*Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*) (studio osservazionale dei pazienti reclutati nel DCCT) ha dimostrato che gli effetti protettivi del trattamento intensivo sul rischio di malattia microvascolare persistono anche a 4 anni di distanza dal termine del trial, malgrado il controllo glicemico nel gruppo in trattamento intensivo fosse equivalente a quello in trattamento standard durante i 4 anni di follow-up (9). La prevalenza di retinopatia era significativamente più bassa nei pazienti appartenenti al gruppo della terapia intensiva rispetto a quelli appartenenti al gruppo della terapia convenzionale durante lo studio DCCT: il rischio di un peggioramento della retinopatia diabetica rispetto al baseline era del 76% inferiore nel gruppo in trattamento intensivo rispetto al gruppo in trattamento convenzionale alla fine del DCCT. Dopo 4 anni di follow-up nello studio EDIC, il 49% dei pazienti in terapia convenzionale aveva avuto progressione della retinopatia rispetto al 18% dei pazienti in trattamento intensivo. Analogamente, durante lo studio EDIC l'incidenza di

microalbuminuria era dell'11% nei pazienti appartenenti al gruppo in terapia convenzionale rispetto al 5% nei pazienti in terapia intensiva, con una riduzione del 53% del rischio.

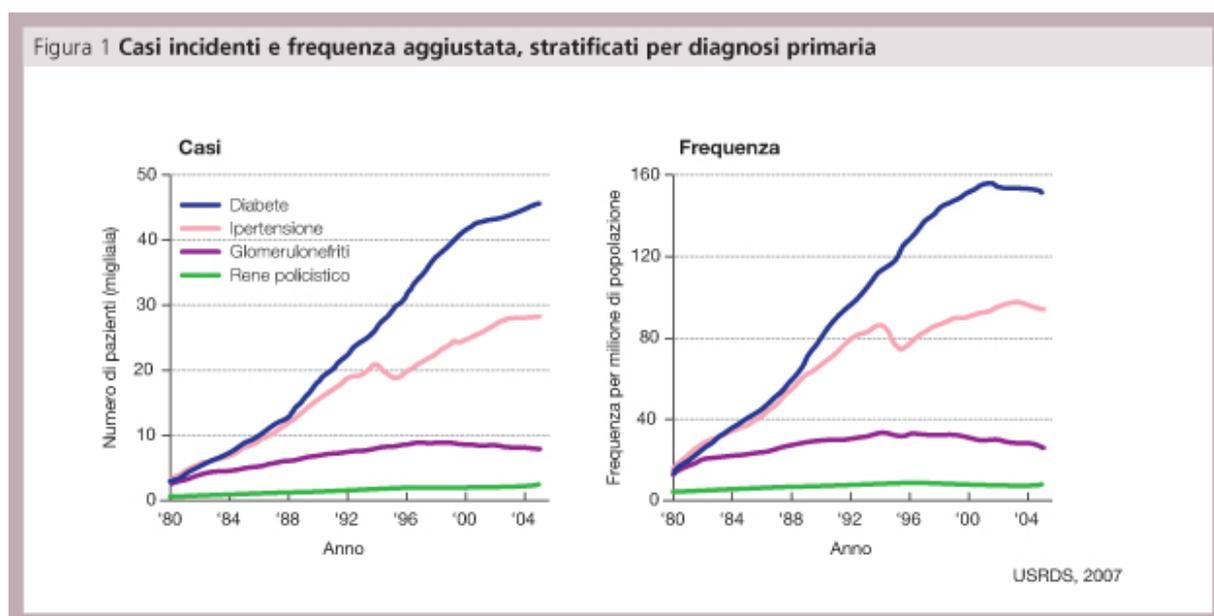
Questo studio ha dunque dimostrato che lo sviluppo delle complicanze microvascolari è influenzato dall'esposizione "cumulativa" all'iperglicemia, pertanto il buon compenso glicemico dovrebbe essere instaurato già all'esordio della malattia e protratto il più possibile nel tempo.

Analogamente a quanto osservato nello studio DCCT-EDIC, il follow-up a distanza di 10 anni dalla conclusione dello studio UKPDS ha confermato i benefici sulle complicanze microvascolari osservati nel gruppo in trattamento intensivo sebbene il controllo glicemico fosse equivalente a quello in trattamento standard durante i 10 anni di follow-up (10).

Analisi epidemiologiche basate sui dati degli studi DCCT e UKPDS dimostrano una relazione curvilinea tra livelli di HbA1c e complicanze microvascolari senza evidenziare alcun livello soglia nei valori di HbA1c (5,11). Queste analisi suggeriscono quindi che una riduzione dei livelli di HbA1c da 7% a 6% è associata con un'ulteriore riduzione del rischio di complicanze microvascolari.

### 1.3. La nefropatia, la retinopatia e la neuropatia diabetica

Il diabete mellito è una delle cause più importanti di insufficienza renale terminale. Tra i pazienti entrati in terapia sostitutiva renale, la prevalenza del diabete negli Stati Uniti è risultata pari al 44% nel periodo 1999-2002 (12) e in Italia pari al 16% nel periodo 2000-2002 (13).



Pazienti incidenti con IRT; frequenza aggiustata per età, sesso ed etnia

L'incidenza della nefropatia è simile nel diabete tipo 1 e tipo 2, con circa il 30% dei pazienti che sviluppa la complicanza. A causa però della maggiore prevalenza del diabete tipo 2, oltre l'80% dei pazienti diabetici sottoposti a terapia dialitica è rappresentato da soggetti affetti da questa forma di diabete (14).

La nefropatia diabetica comporta una riduzione dell'aspettativa di vita, dovuta in gran parte all'elevato rischio cardiovascolare. La speranza di vita è infatti superiore a 5 anni soltanto nel 20-40% dei casi; nel diabete di tipo 2, la sopravvivenza a 5 anni (< 10% in alcuni studi) è peggiore che nel diabete di tipo 1 (35-50%) (14).

La storia naturale della nefropatia diabetica può essere suddivisa in 5 stadi evolutivi.

Lo **stadio I**, di iperfiltrazione, caratterizzato da aumento del GFR (glomerular filtration rate) e ipertrofia renale. A parte l'aumento del volume, la morfologia renale è normale.

Nello **stadio II**, clinicamente silente, è presente una normale AER (albumin excretion rate), normale o elevato GFR. In questo stadio cominciano a svilupparsi tutte le alterazioni strutturali che caratterizzano la glomerulopatia diabetica, in particolare l'espansione della regione mesangiale e l'ispessimento della membrana basale glomerulare. Circa il 70% dei pazienti diabetici rimane in questo stadio.

Il **III stadio**, della nefropatia incipiente, è caratterizzato dalla presenza di microalbuminuria, mentre il GFR è normale o aumentato. La glomerulopatia è di grado moderato.

Nel **IV stadio**, chiamato anche nefropatia clinica, sono presenti macroalbuminuria e proteinuria. Il GFR è normale o ridotto e si comincia ad assistere ad un aumento progressivo della creatininemia. La glomerulopatia diabetica è molto avanzata e sono presenti lesioni anche a livello tubulo-interstiziale e vascolare.

Il **V stadio**, di insufficienza renale terminale, è caratterizzata dai sintomi dell'uremia; tutte le strutture renali presentano sclerosi e vi è necessità di terapia sostitutiva.

Tabella 1 Storia naturale della nefropatia diabetica nel diabete mellito tipo 1

Stadio	Albuminuria	Pressione arteriosa	GFR	Alterazioni strutturali
<b>Iperfiltrazione</b>	Normale o aumentata	Normale	Aumentato	ipertrofia glomerulare ↑ pressione intraglomerulare
<b>Latente (clinicamente)</b>	Normale	Normale	Normale o aumentato	↑ spessore GBM ↑ volume mesangiale
<b>Nefropatia incipiente</b>	30-299 mg/24 ore	Normale, ma in aumento	Normale o aumentato	↑↑ spessore GBM ↑↑ volume mesangiale
<b>Nefropatia conclamata</b>	300 mg/24 ore	Aumentata	Normale o in progressiva riduzione	↑↑↑ spessore GBM ↑↑↑ volume mesangiale obliterazione glomerulare parziale con ipertrofia glomeruli residui
<b>Insufficienza renale terminale</b>	300 mg/24 ore	Aumentata	Ridotto	obliterazione glomerulare totale

GBM: membrana basale glomerulare

La microalbuminuria è il più precoce marcatore clinicamente rilevabile di nefropatia (15). Nel diabete tipo 1, la sua prevalenza è intorno al 20% e l'incidenza è compresa tra l'1,6 e il 4,8 per 100 persone/anno. Dati recenti hanno mostrato che la progressione verso la proteinuria nell'arco di un decennio avviene in circa il 30-45% dei casi, mentre il 20-25% dei pazienti regredisce alla normoalbuminuria e il 30-50% rimane allo stadio di microalbuminuria. Nel diabete tipo 2, la prevalenza della microalbuminuria è del 20% e l'incidenza è compresa tra l'1,0 e il 7,2 per 100 persone/anno. Può presentarsi già alla diagnosi o a breve distanza da essa, in parte perché l'esordio della malattia risale in realtà a diversi anni prima. Inoltre nel diabete tipo 2, la microalbuminuria è un marcatore meno specifico di nefropatia diabetica, data la maggiore frequenza di altre patologie associate al diabete, quali l'ipertensione arteriosa. La progressione verso la macroalbuminuria avviene nel 21-50% dei casi.

Oltre a costituire un marcatore precoce di nefropatia, la microalbuminuria è un indicatore di aumentata mortalità cardiovascolare, tanto da rappresentare un fattore di rischio cardiovascolare indipendente (16). Infine, la microalbuminuria è associata anche ad insulinoresistenza e sindrome metabolica, di cui è un importante marcatore (17).

Numerosi sono i fattori di rischio di sviluppo e progressione della nefropatia diabetica. Studi epidemiologici e familiari (18-22) hanno dimostrato che la suscettibilità genetica contribuisce allo sviluppo di nefropatia sia nel diabete tipo 1 che nel diabete tipo 2. I principali fattori di rischio potenzialmente modificabili di sviluppo e progressione di nefropatia diabetica in individui suscettibili sono il cattivo compenso glicemico (23-25) e l'ipertensione arteriosa (26-28): nei pazienti con diabete di tipo 1, l'ipertensione è più frequentemente causata da una coesistente nefropatia diabetica e caratteristicamente si manifesta nel momento in cui compare microalbuminuria; nei pazienti con diabete tipo 2, l'ipertensione è già presente al momento della diagnosi di diabete in circa il 70% dei soggetti e può essere associata alla presenza di nefropatia diabetica, oppure può essere espressione di una coesistenza di ipertensione essenziale, oppure può essere secondaria ad altre cause, quali la malattia renovascolare.

Altri fattori riconosciuti in grado di aumentare il rischio di nefropatia sono l'iperfiltrazione glomerulare (29, 30), il fumo di sigaretta (31, 32), la iperlipidemia (33, 34), i livelli di proteinuria (35,36) e fattori dietetici, quali la quantità e la qualità di proteine e i grassi contenuti nella dieta (37-40).

Per quanto riguarda la retinopatia diabetica, nei paesi industrializzati, essa rappresenta la più frequente causa di nuovi casi di cecità nella popolazione tra i 20 e i 74 anni (41-43). La sua prevalenza è pari al 23% nei pazienti con diabete mellito tipo 1, 14% nei pazienti con diabete tipo 2 insulino-trattati e del 3% in pazienti con diabete mellito tipo 2 non insulino-trattati (44). L'incidenza di retinopatia nella popolazione diabetica italiana è pari a 5-7/100 pazienti-anno, con tassi superiori nel diabete tipo 1 e nel diabete tipo 2 in trattamento insulinico. Secondo i dati rilevati dai registri dell'Unione Italiana Ciechi, la retinopatia diabetica si colloca in Italia come la prima causa di ipovisione o di cecità legale in età lavorativa (45).

In aggiunta alla glicemia, molti altri fattori sembrano aumentare il rischio di retinopatia diabetica, quali la nefropatia, l'ipertensione arteriosa, che è un ben definito fattore di rischio per lo sviluppo di edema maculare (46, 47), la dislipidemia (48).

Le evidenze scientifiche dimostrano che i programmi di screening ed il trattamento della retinopatia diabetica riducono drasticamente la cecità da diabete: nei paesi in cui tali programmi sono già stati applicati, è stata ottenuta una sostanziale riduzione della cecità da diabete, accompagnata da una importante riduzione del costo socio- sanitario (49,50).

La neuropatia diabetica, periferica ed autonoma, è una patologia eterogenea, con diverse manifestazioni cliniche, che ha una prevalenza del 20-30% circa nei diabetici adulti. Uno studio multicentrico italiano riporta una prevalenza di neuropatia periferica del 32,3% e dimostra come la severità della malattia aumenti con l'aumentare dell'età e della durata di malattia (51).

Tra i fattori di rischio vi sono il compenso metabolico, la pressione arteriosa, i lipidi plasmatici, la durata del diabete, l'indice di massa corporea, il fumo di sigaretta e il consumo di alcool (52).

La neuropatia autonoma ha una prevalenza del 16-22% nel diabete tipo 2, in rapporto alle metodiche diagnostiche utilizzate e alle caratteristiche della popolazione esaminata. Età, durata della malattia, tipo di diabete, compenso metabolico e fattori di rischio cardiovascolare sono fattori associati alla comparsa della complicanza. Essa si associa ad un'aumentata mortalità, soprattutto cardiovascolare (53, 54): infatti clinicamente si può presentare con tachicardia a riposo, intolleranza all'esercizio fisico, ipotensione ortostatica, ischemia cardiaca silente, sindrome da denervazione cardiaca, fino alla morte improvvisa.

Da qui nasce l'esigenza di una maggiore attenzione allo screening per la neuropatia autonoma, che potrebbe permettere una riduzione del rischio cardiovascolare e della mortalità nei diabetici affetti da tale complicanza.

#### **1.4. Le complicanze croniche del diabete: la macroangiopatia diabetica**

La macroangiopatia diabetica, nella sua localizzazione coronarica, cerebrale e periferica degli arti inferiori, è la più frequente causa di morte ed è una importante causa di invalidità nella popolazione diabetica dei paesi industrializzati (55).

I pazienti diabetici presentano un eccesso di mortalità pari al 30-40% rispetto alla popolazione non diabetica (56, 57).

La patogenesi delle lesioni vascolari nel diabetico è tuttora oggetto di studio. Certamente un precoce ed accelerato sviluppo della aterosclerosi costituisce la principale spiegazione per le manifestazioni cliniche della macroangiopatia diabetica. Tuttavia l'aterosclerosi non può essere identificata come l'unica causa delle complicanze cardiovascolari del diabete. Infatti non è possibile escludere che anche altre lesioni vascolari, tipicamente associate al diabete, come la microangiopatia e la sclerosi di Monkeberg (calcificazione della media) abbiano un ruolo almeno nel precipitare le manifestazioni cliniche delle malattie cardiovascolari nel paziente diabetico e nell'influenzarne la prognosi.

L'associazione tra rischio cardiovascolare e compenso glicemico è stata documentata in numerosi studi. Diversi studi osservazionali prospettici e metanalisi hanno dimostrato che il rischio di complicanze macrovascolari nel diabete mellito è correlato con i valori di HbA1c (58-60).

Nello studio DCCT, è stata osservata una tendenza verso la riduzione degli eventi cardiovascolari nel gruppo in trattamento intensivo rispetto al gruppo in trattamento standard (41% riduzione del rischio, IC 95% 10-68%) (5). Tuttavia, lo studio DCCT-EDIC ha dimostrato che gli effetti protettivi del trattamento intensivo sul rischio di malattia cardiovascolare nei diabetici tipo 1 diventano significativi a 11 anni di distanza dal termine del trial (61). Infatti, i soggetti randomizzati al trattamento intensivo mostravano una riduzione del 42% degli eventi cardiovascolari (IC 95% 9-63%;  $p = 0,02$ ) e una riduzione del 57% del rischio di infarto del miocardio non fatale, ictus o morte cardiovascolare (IC 95% 12-79%;  $p = 0,02$ ).

L'importanza del buon controllo glicemico sin dalla diagnosi di diabete al fine di ridurre non solo il rischio di microangiopatia ma anche quello cardiovascolare è ampiamente ribadita dai dati a 10 anni dell'UKPDS; lo studio dimostra, infatti, come gli effetti di un buon controllo glicemico, ottenuto nel passato, si traducano in una significativa riduzione della mortalità e degli eventi cardiovascolari (10).

### **1.5. Gli altri fattori di rischio cardiovascolare**

Alcune condizioni spesso associate al diabete, quali l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia, il fumo di sigaretta ecc., sono indipendenti fattori di rischio cardiovascolari. Studi clinici hanno dimostrato che un intervento intensivo teso all'ottimizzazione di tutti questi fattori di rischio riduce la mortalità totale, la mortalità cardiovascolare e gli eventi cardiovascolari (62, 63).

L'alterazione lipidica più comune e più tipica del diabete è rappresentata dall'ipertrigliceridemia, diminuzione del colesterolo HDL, aumento delle LDL e HDL più piccole e dense, aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi in fase postprandiale (64-67). L'insieme di queste alterazioni costituisce la cosiddetta "dislipidemia diabetica", che contribuisce all'aumentato rischio cardiovascolare caratteristico dei diabetici. L'aumento del colesterolo LDL è il principale fattore lipidico di rischio cardiovascolare anche nel paziente diabetico. Numerosi trial clinici hanno dimostrato l'efficacia del trattamento ipocolesterolemizzante, in particolare con statine, nella popolazione generale – sia in prevenzione primaria sia in quella secondaria. Gli studi effettuati nella popolazione diabetica sono, invece, in numero inferiore. Due metanalisi di tali studi, però, una del 2006 e una del 2008 (68, 69), dimostrano che la riduzione di un mmol di colesterolo LDL induce nei diabetici effetti almeno pari a quelli ottenuti nei non diabetici: riduzione significativa della mortalità totale (9% nei diabetici vs 13% nei non diabetici), di quella cardiovascolare (13 vs 18%) e degli eventi cardiovascolari (21% per entrambi). Inoltre, la riduzione sia del rischio relativo sia assoluto è significativa, indipendentemente dal livello di colesterolo LDL iniziale, ed è presente sia in prevenzione primaria che secondaria. Sulla base dei risultati ottenuti negli studi di intervento le principali linee-guida indicano come obiettivo ottimale un valore di colesterolo LDL < 100mg/dl per tutti i diabetici sia in prevenzione primaria che secondaria (70-73). Nei pazienti in prevenzione secondaria a rischio cardiovascolare molto elevato per la co-presenza di altri fattori di rischio, livelli di colesterolo LDL ancora più bassi (< 70 mg/dl) potrebbero rappresentare un'opzione terapeutica aggiuntiva.

Anche l'ipertensione arteriosa è una comorbilità comune nel diabete ed è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di patologia cardiovascolare. Studi clinici randomizzati, tra cui gli studi HOT (*Hypertension Optimal Treatment*), UKPDS-38 (*UK Prospective Diabetes Study*) ed ABCD, dimostrano che nei soggetti diabetici l'abbassamento dei valori pressori a < 130 mmHg per la sistolica e < 80 mmHg per la diastolica si associa a riduzione degli eventi coronarici ed ictus (74-78). Sulla base di questi dati un obiettivo pressorio < 130/80 mmHg è quindi raccomandato dalla maggior parte delle più recenti linee-guida.

## 2. SCOPI

Da quanto detto finora, si evince che il vero obiettivo nel trattamento del paziente con diabete mellito tipo 2 è la prevenzione e la cura delle sue complicanze croniche, sia microangiopatiche che macroangiopatiche.

È per questo motivo che la mia attività di ricerca svolta durante questo ciclo di dottorato si è diretta proprio verso questo argomento ed in particolare si è focalizzata sui seguenti aspetti specifici delle complicanze del diabete.

Per quanto riguarda le complicanze microangiopatiche, scopo della mia ricerca è stato quello di:

1. *Valutare la morfologia renale del paziente diabetico e le alterazioni emodinamiche che si associano alla nefropatia diabetica incipiente e studiare i marcatori precoci/predittori della nefropatia diabetica*

Per quanto riguarda invece le complicanze macroangiopatiche, la mia ricerca è stata indirizzata verso:

2. *Lo studio della relazione tra le sub frazioni lipoproteiche e l'aterosclerosi subclinica*
3. *La valutazione comparativa degli effetti di due trattamenti ipoglicemizzanti orali sulla mortalità e la morbilità cardiovascolare*

Per raggiungere questi obiettivi, sono stati effettuati 3 studi di cui riporterò i dettagli nei capitoli seguenti. I primi due studi sono stati completati durante il corso del dottorato e sono stati pubblicati su riviste scientifiche internazionali (riportate in Appendice). Il terzo studio invece è tuttora in corso e presenterò nei dettagli il rationale, protocollo di studio e lo stato di avanzamento dei lavori.

### 3. STUDI

#### **3.1 Studio n.1. Utilizzo dell'indice di resistenza renale nella identificazione e predizione della nefropatia diabetica**

L'ecografia è un metodo semplice, facilmente applicabile, non invasivo e ben validato per lo studio della morfologia renale, per la diagnosi di stenosi dell'arteria renale e per la misurazione delle resistenze vascolari nel parenchima renale (79-81).

L'indice di resistenza renale (RI), misurato attraverso l'ecodoppler, è attualmente utilizzato largamente nella pratica clinica come indice di perfusione renale. È stato dimostrato essere associato con il rigetto a lungo termine del rene trapiantato e con la sopravvivenza nei pazienti portatori di trapianto renale (82,83). In uno studio prospettico, in soggetti trapiantati di rene, un elevato indice di resistenza si è mostrato un forte predittore di perdita per rigetto, più forte di altri fattori di rischio già noti, quali la proteinuria e l'età del donante (84).

Non esiste al momento un cut-off validato per distinguere valori di indice di resistenza alti da valori normali. Radermacher et al. hanno dimostrato che valori di RI compresi tra 0.75 e 0.85 sono associati con decadimento della funzione renale nei pazienti con insufficienza renale cronica e stenosi dell'arteria renale, e predicono la perdita per rigetto di rene trapiantato (85). Gli stessi autori hanno poi messo in relazione l'aumentato indice di resistenza con la degenerazione fibroproliferativa del rene (86). Un aumentato indice di resistenza riflette un processo di degenerazione renale che risulta in una riduzione dell'area vascolare intrarenale con conseguente aumento delle resistenze vasali intrarenali (87): il progressivo danno renale si associa a fibrosi interstiziale e perdita di capillari e glomeruli, con conseguente progressiva riduzione dell'area vascolare renale e quindi incremento delle resistenze vascolari intrarenali. È stato pertanto ipotizzato che un aumento delle resistenze renali si verifichi anche nella degenerazione renale tipica della nefropatia diabetica. Diversi autori hanno osservato elevate resistenze renali in pazienti con diabete e con nefropatia diabetica (88-90), al contrario di altri (91). Poco chiara è invece la capacità dell'indice di resistenza renale di identificare e predire lo sviluppo di nefropatia in soggetti diabetici ma con normale funzione renale. Uno studio prospettico condotto in pazienti diabetici con ipertensione, albuminuria ed un'elevata prevalenza di eventi cardiovascolari, ha mostrato che un  $RI \geq 0.80$  si associa con la tipica nefropatia diabetica (valutata su campioni biotici) e con il decadimento della funzione renale a 4 anni (92). Se l'RI predice la nefropatia diabetica anche in pazienti a più basso rischio, indipendentemente dall'albuminuria, e quale sia il migliore cut-off da utilizzare in questi soggetti, rimane non noto.

Noi abbiamo valutato l'uso della misurazione dell'indice di resistenza renale nella normale pratica clinica, studiando prospetticamente una coorte di pazienti diabetici tipo 2 ipertesi, prevalentemente normoalbuminurici, in assenza di precedenti eventi cardiovascolari, largamente rappresentativi dei pazienti diabetici routinariamente seguiti negli ambulatori di diabetologia e nella pratica clinica.

Quindi, scopo del nostro lavoro è stato:

1. confrontare l'indice di resistenza renale in soggetti diabetici e in soggetti ipertesi non diabetici ed identificare un cut-off utile a definire le elevate resistenze renali
2. valutare se un aumento delle resistenze renali si associa ai segni clinici della nefropatia diabetica e alla sua progressione nel tempo

### **Materiali e metodi**

La popolazione di studio è costituita da 92 pazienti affetti da diabete mellito tipo 2, di età 40-70 anni, con una durata di malattia di almeno un anno, ipertensione arteriosa di grado lieve o moderato e con normale funzione renale, reclutati consecutivamente presso l'area di Diabetologia del nostro Istituto tra il novembre 2001 e il marzo 2002, e da 37 soggetti di controllo ipertesi non diabetici, nello stesso range di età. Criteri di esclusione erano: alterata funzione renale, obesità severa, precedenti eventi cardiovascolari.

Il diabete è stato definito secondo i criteri OMS: glicemia a digiuno superiore a 126 mg/dl in più di un'occasione, o uso di farmaci ipoglicemizzanti (93). L'ipertensione è stata definita secondo i criteri del Seventh Report of the Joint National Committee on high blood pressure e cioè pressione arteriosa sistolica superiore a 140 mmHg e/o pressione arteriosa diastolica superiore a 90mmHg, o uso di farmaci antipertensivanti (94).

La funzione renale è stata misurata attraverso la valutazione della clearance della creatinina calcolata e definita normale se la clearance della creatinina risultava superiore o uguale a 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> della superficie corporea (95).

I soggetti marcatamente obesi (peso corporeo > 120 kg) sono stati esclusi dallo studio a causa delle possibili difficoltà tecniche nell'esame ultrasonografico.

### **Misurazioni**

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad esame clinico completo: sono state raccolte informazioni sull'abitudine al fumo di sigaretta, sull'anamnesi patologica e sulla terapia farmacologica in atto. L'esame clinico comprendeva la misurazione dell'altezza (m) e del peso corporeo (kg), effettuati in abiti leggeri, senza scarpe. L'indice di massa corporeo (IMC) è stato calcolato come il rapporto tra il peso espresso in kg e l'altezza espressa in m<sup>2</sup>; la pressione arteriosa (mmHg) veniva misurata in decubito supino, dopo circa 5 minuti di riposo, tre volte consecutivamente a distanza di circa due minuti e la media di queste tre è

stata usata nell'analisi. Gli esami ematochimici venivano effettuati al mattino a digiuno. La glicemia, la colesterolemia totale e HDL, la trigliceridemia e la creatininemia venivano misurate con metodi standard. L'emoglobina glicata (HbA1c) veniva misurata con il metodo HPLC.

L'esame urine e il dosaggio della albuminuria e della creatinuria veniva praticato su raccolta estemporanea delle urine, in assenza di possibili cause di albuminuria intercorrenti, quali presenza di iperglicemia o ipertensione marcate, scompenso cardiaco congestizio, episodi febbrili concomitanti. La microalbuminuria e la macroalbuminuria sono stati definite secondo le indicazioni dell'American Diabetes Association, e cioè la microalbuminuria come un valore di albuminuria compreso tra 30 e 299 µg/mg di creatinuria e la macroalbuminuria come un valore superiore o uguale a 300 µg/mg di creatinuria (96). La clearance della creatinina è stata calcolata secondo l'equazione del Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Group modificata secondo Levey: Clearance della creatinina (ml/min/1.73 m<sup>2</sup>) = 186 x [creatininemia (mg/dl)]<sup>-1.154</sup> x [età (anni)]<sup>-0.203</sup> x 0.742 (nelle femmine) x 1.210 (nei soggetti di razza nera) (97)

### **Studio prospettico**

Ai fini della valutazione prospettica, i soggetti diabetici sono stati sottoposti ad un secondo esame clinico a distanza di 48 ± 5 mesi. Sono state ricavate informazioni sull'abitudine al fumo di sigaretta, sull'anamnesi patologica prossima e sulla terapia farmacologica in atto. Sono state effettuate le misurazione dell'antropometria e della pressione arteriosa. Gli esami ematochimici comprendevano profilo lipidico, glicemia, HbA1c, esame urine e microalbuminuria con successivo calcolo della clearance della creatinina.

La progressione della nefropatia diabetica è stata definita come il passaggio da una condizione di normoalbuminuria al primo esame ad una condizione di microalbuminuria o macroalbuminuria al secondo esame, oppure come il passaggio dalla microalbuminuria al primo esame alla macroalbuminuria al follow-up.

### **Studio con EcoColorDoppler**

Al basale, tutti i partecipanti sono stati sottoposti a studio ecografico dei reni. Tutti gli esami sono stati effettuati con un EcoColorDoppler Philips HDI 5000 Sono-CT, utilizzando un trasduttore C 5-2, da due operatori che non erano a conoscenza dei dettagli clinici del paziente né dei rilievi laboratoristici. L'esame veniva effettuato a paziente in posizione supina, con decubito laterale, dopo una notte di digiuno al fine di minimizzare l'interferenza dei gas intestinali. Una completa valutazione ultrasonografica B-mode della morfologia renale veniva praticata a tutti i pazienti: il volume renale (in cm<sup>3</sup>) è stato calcolato come il prodotto di lunghezza (cm) x larghezza (cm) x spessore (cm) x π/6, secondo la formula

dell'ellissoide, ed espresso per ogni soggetto come il valore medio dei due reni (Mean Renal Volume MRV). Il Renal Area Index (RAI) è stato misurato come MRV/ superficie corporea e la superficie corporea calcolata secondo la seguente formula: superficie corporea =  $0.20247 \times \text{altezza (m)}^{0.725} \times \text{peso corporeo (kg)}^{0.425}$  (98).

L'aorta addominale veniva visualizzata e il picco di velocità sistolica (PSV Peak Systolic Velocity) misurato a livello dell'arteria mesenterica. La velocità veniva misurata sui segmenti prossimale, medio e distale di ambedue le arterie renali, con un angolo tra la sonda e l'arteria renale  $\leq$  al 60%. La presenza e la severità della stenosi dell'arteria renale è stata valutata secondo criteri validati (99-101). L'Indice di Resistenza è stato calcolato come  $RI = PSV - \text{velocità di fine diastole} / PSV$ . Sei misurazioni venivano ottenute dalle arterie superiore, media ed inferiore di ogni rene e il valore medio è stato utilizzato per l'analisi. La durata media di ogni esame era di circa 30 minuti.

La variabilità tra i due operatori che praticavano l'esame ecografico è stato valutato in un gruppo di 26 pazienti a cui l'IR era misurato a distanza di 1 ora da entrambi gli operatori in cieco. L'analisi ha dimostrato una elevata concordanza, infatti l'intervallo di variabilità interosservatori era  $-0.035/\pm 0.044$ , il coefficiente di riproducibilità era 0.0043 e l'analisi del t-test di Student per dati appaiati non ha mostrato differenze significative tra le misurazioni effettuate tra i due operatori ( $t = 0.15$ , p ns) (102)

### **Studio con Risonanza Magnetica Nucleare (RMN)**

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad angio-RMN al basale al fine di valutare la presenza di eventuali stenosi significative dell'arteria renale. La stenosi dell'arteria renale interferisce con la misurazione delle resistenze intrarenali, portando ad un aumento dell'indice di resistenza renale, indipendente dal grado di compromissione delle strutture intraparenchimali. Attualmente la RMN rappresenta il gold standard per la diagnosi di tale patologia ed è pertanto stata utilizzata al fine di escludere quei casi con alte resistenze renali da cause vascolari. L'esame veniva effettuato con un apparecchio a 1.5 T (Gyrosan, Intera, Philips Medical System). Il mezzo di contrasto utilizzato era il gadopentato dimeglumina (Magnevist, Schering, Berlin, Germany). Stenosi pari o superiori al 50% sono state considerate come emodinamicamente significative.

È stata osservata un'elevata concordanza tra ecografia e RMN, condotti in doppio cieco, in quanto tutte le alterazioni emodinamiche diagnosticate all'osservazione ecografica (sia le stenosi significative che le alterazioni non significative) sono state confermate all'analisi RMN.

### **Analisi statistica**

Le analisi statistiche sono state condotte con il software SPSS per Windows (103). I dati sono stati espressi come media e deviazione standard o percentuali; per le variabili distribuite in maniera non normale, i valori sono stati trasformati in forma logaritmica e utilizzati come tali nelle analisi statistiche ma sono mostrati nel testo come valori originali. Il confronto tra medie è stato eseguito con il t-test di Student per dati non appaiati e con l'ANOVA test. Le proporzioni sono state confrontate con l'analisi del Chi quadrato e l'aggiustamento per le covariate con la regressione logistica, quando opportuno.

## **Risultati**

L'angio-RMN è stata praticata nell'88% dei pazienti diabetici (80/92). Ai restanti 12 soggetti l'esame non è stato effettuato per specifiche controindicazioni o a causa di claustrofobia. In questi pazienti, la presenza di stenosi delle arterie renali è stata esclusa sulla base del riscontro ecografico.

Dei 92 pazienti diabetici reclutati nello studio, un paziente è stato escluso in quanto l'esame ecografico è risultato tecnicamente inadeguato; in un soggetto è stata riscontrata una stenosi di un'arteria renale > 60%, confermata all'angio-RMN, per cui è stato eliminato dall'analisi; un terzo era portatore di alta velocità di flusso e turbolenza all'origine di una delle arterie, dovuta a tortuosità (kinking). In un quarto paziente, infine, è stata incidentalmente riscontrata una massa renale di natura neoplastica. Questi pazienti sono stati esclusi dalle analisi statistiche per l'interferenza che tali patologie possono portare sul volume e sull'emodinamica renale.

Tutti i soggetti di controllo avevano arterie renali normali.

Riassumendo, la popolazione finale che è stata inclusa nelle analisi è composta da 88 soggetti diabetici e 37 controlli non diabetici.

Le caratteristiche generali della popolazioni sono mostrate nella tabella 2. I pazienti diabetici erano significativamente più vecchi e più in sovrappeso e, per definizione, avevano valori di glicemia a digiuno più alti rispetto ai controlli; la pressione arteriosa, i lipidi plasmatici e la clearance della creatinina erano simili nei due gruppi. I pazienti diabetici avevano volume renale maggiore e più alte resistenze intrarenali rispetto ai soggetti non diabetici ( $p < 0.001$ ); queste differenze persistevano anche dopo correzione per la differenza di età e di BMI tra i due gruppi con l'analisi della covarianza. Tutti i partecipanti erano in trattamento con farmaci per l'ipertensione e la proporzione di pazienti in terapia con inibitori del sistema renina-angiotensina (ACE inibitori o ARB- antagonisti recettoriali dell'angiotensina) era lievemente, ma non significativamente, maggiore nei soggetti diabetici.

**Table 1** General characteristics of diabetic and non-diabetic participants

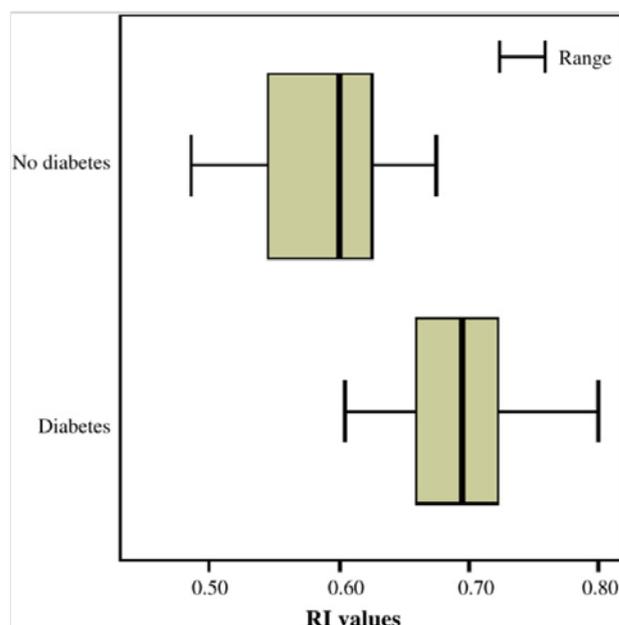
	Without diabetes (n = 37)	With diabetes (n = 88)
M/F	27/10	44/44*
Age (years)	51.0 ± 12.0	57.4 ± 7.6*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.9 ± 3.6	28.9 ± 3.6*
Plasma glucose (mg/dl)	86 ± 8	171 ± 57**
Systolic blood pressure (mmHg)	139 ± 15	140 ± 16
Diastolic blood pressure (mmHg)	82 ± 8	81 ± 8
Total cholesterol (mg/dl)	201 ± 32	202 ± 36
HDL cholesterol (mg/dl)	48 ± 9	51 ± 14
Triglycerides (mg/dl)	112 [83–179]	123 [95–174]
Serum creatinine (mg/dl)	0.92 ± 0.11	0.87 ± 0.20
e-GFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	86.8 [72.8–106.4]	90.9 [78.8–107.2]
Renal volume (cm <sup>3</sup> )	165 ± 32	197 ± 46**
Renal resistance index	0.59 ± 0.05	0.69 ± 0.05**
Treated with ACE-I (%)	42	47
Treated with ARB (%)	48	53

e-GFR: estimated glomerular filtration rate; ACE-I: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB: angiotensin receptor blockers. Data is expressed as M ± SD or percentages.

Triglycerides and e-GFR are expressed as median and interquartile range [ ].

\*p < 0.01; \*\*p < 0.001.

I valori osservati di IR erano normalmente distribuiti in entrambi i gruppi di diabetici e non diabetici. La distribuzione di frequenza sono mostrati nella figura 1. I valori vanno da 0.61 a 0.80 nel gruppo di soggetti diabetici e da 0.48 a 0.67 nel gruppo di controllo; la mediana e il range interquartile erano, rispettivamente, 0.69 (0.66-0.72) e 0.60 (0.54-0.62). In questa popolazione nessuno dei pazienti diabetici aveva valori di IR > 0.80, un valore precedentemente associato alla progressione della nefropatia diabetica. L'80° percentile della distribuzione dell'IR nei pazienti diabetici (i.e. IR<sub>≥</sub>0.73) è stato scelto come cut-off arbitrario per separare i soggetti con normale da quelli con alto indice di resistenza renale nelle analisi successive. Questo valore chiaramente separa i diabetici dai non diabetici.



**Figure 1** Frequency distribution (median, interquartile range and range) of RI values in diabetic and non-diabetic participants.

Le caratteristiche al basale dei soggetti diabetici, suddivisi in base all'IR sono riassunti nella tabella 2. I pazienti con alte resistenze renali ( $IR \geq 0.73$ ) presentavano, rispetto a quelli con basse resistenze ( $IR < 0.73$ ), una durata del diabete significativamente maggiore ed una minore pressione diastolica ( $p < 0.05$ ); l'età, il BMI, la pressione diastolica, la pulse pressure, i lipidi plasmatici, l'HbA1c e la percentuale di fumatori non erano significativamente differenti tra i due gruppi. La proporzione di pazienti in trattamento con farmaci inibitori del sistema renina-angiotensina (ACE-I o ARB) non differiva tra i due gruppi: tutti i pazienti diabetici erano in trattamento con farmaci agenti sul sistema renina-angiotensina, da soli o in associazione con farmaci antipertensivanti appartenenti ad altre classi (tra i soggetti con basse resistenze renali, il 52% era in trattamento con sartani ed il restante 48% con ACE inibitori, mentre nel gruppo con alte resistenze, il 54% era in terapia con sartani e il restante 46% con ACE inibitori). Nessuna differenza era presente nella prevalenza di retinopatia e di complicanze macroangiopatiche clinicamente evidenti.

Per quanto riguarda i parametri di funzione renale, nessuna differenza era presente nei valori creatinina plasmatica e di clereance della creatinina, mentre l'escrezione urinaria di albumina (AER - albumin excretion rate) era significativamente maggiore nei soggetti con alte resistenze rispetto a quelli con resistenze normali ( $p < 0.01$ ); questa differenza persisteva anche dopo correzione per la durata del diabete nell'analisi della covariata.

**Table 2** General characteristics of diabetic participants by renal resistance index

	RI < 0.73 (n = 67)	RI ≥ 0.73 (n = 21)
M/F	35/32	9/12
Age (years)	56.6 ± 7.8	60.0 ± 7.3
Diabetes duration (years)	10.5 ± 8.8	18.1 ± 12.6**
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.7 ± 3.5	29.8 ± 4.0
Systolic blood pressure (mmHg)	139 ± 15	140 ± 20
Diastolic blood pressure (mmHg)	82 ± 8	78 ± 9*
Pulse pressure (mmHg)	57 ± 14	62 ± 18
HbA1c (%)	7.2 ± 1.3	7.6 ± 1.6
Serum creatinine (mg/dl)	0.87 ± 0.21	0.83 ± 0.20
e-GFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	91.8 [78.6–107.1]	87.5 [79.2–107.8]
Albumin excretion rate (µg/mg)	15.1 [8.6–33.4]	27.7 [12.1–235.4]**
With albuminuria, n (%)	19 (29)	10 (48)
Renal resistance index	0.67 ± 0.03	0.75 ± 0.02***
Renal volume (cm <sup>3</sup> )	202 ± 50	182 ± 35
Treated with ACE-I (%)	48	46
Treated with ARB (%)	52	54

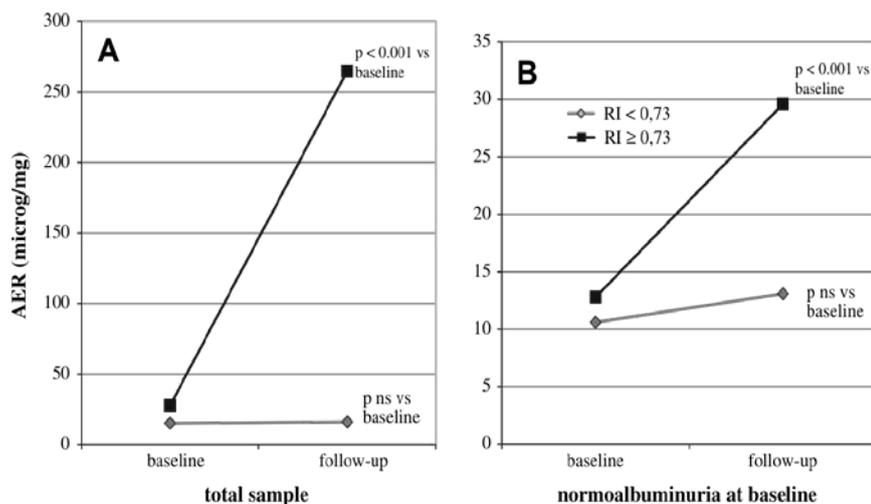
e-GFR: estimated glomerular filtration rate; ACE-I: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB: angiotensin receptor blockers.

Data is expressed as M ± SD or percentages.

e-GFR and albumin excretion rate are expressed as median and interquartile range [ ].

\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

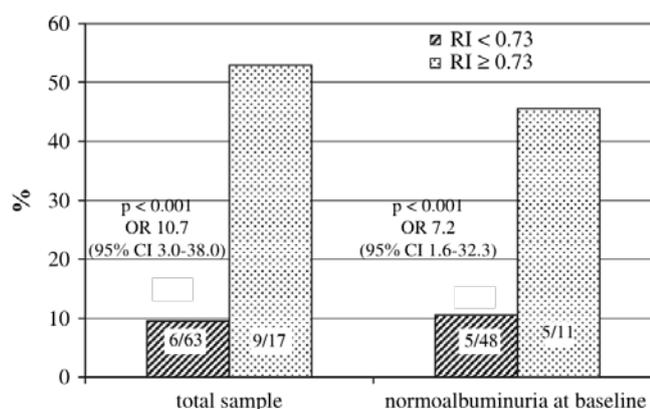
Per valutare il significato prognostico dell'indice di resistenza, i soggetti diabetici sono stati rivalutati dopo circa 4 anni. Al follow-up, l'AER aumentava sostanzialmente da 27.7 µg/mg (12.1-235.4) a 265.0 µg/mg (23.8-1018.1) nei soggetti con alto IR (p < 0.001), ma non i quelli con IR < 0.73, da 15.1 µg/mg (8.6-33.4) a 16.1 µg/mg (10.7-67.2) (figura 2-A). I risultati erano sostanzialmente simili quando l'analisi veniva ristretta al sottocampione di soggetti con normalalbuminuria al baseline (figura 2-B).



**Figure 2** Albumin excretion rate (median) at baseline and follow-up (4.5 years) in patients with normal or high intrarenal resistance index (RI).

Al contrario, la clearance della creatinina si riduceva significativamente nel gruppo con alte resistenze (da 91.8 ml/min a 66.5 ml/min, p < 0.001) ma non nel gruppo con IR < 0.73 (da 87.5 ml/min a 70.2 ml/min, p ns).

In totale, 15 pazienti (6 soggetti con  $IR < 0.73$  e 9 soggetti con  $IR \geq 0.73$ ) erano andati incontro a progressione dello stato albuminurico (progressione da una condizione basale di normoalbuminuria ad una condizione di micro/macroalbuminuria al follow-up oppure progressione da una condizione basale di microalbuminuria alla macroalbuminuria al follow-up). Una proporzione significativamente maggiore di soggetti con alte resistenze renali mostravano progressione dello stato albuminurico rispetto ai soggetti con  $IR < 0.73$  (52.9% vs 9.5%,  $p < 0.001$ ; OR 10.7 con 95% CI 3.0-38.0) (figure 3). I pazienti con macroalbuminuria al baseline ( $n = 8$ ) erano esclusi da quest'analisi. Quando l'analisi era ristretta al sottogruppi di pazienti con normoalbuminuria al baseline ( $n = 59$ ), la percentuale di progressione era pari al 45.5% e al 10.5% rispettivamente nel gruppo con  $IR \geq 0.73$  e nel gruppo con  $IR < 0.73$  ( $p < 0.001$ , OR 7.27 con 95% CI 1.6-32.3).



**Figure 3** Progression of albuminuric state according to baseline intrarenal resistance index (RI).

L' HbA1c, i lipidi plasmatici, la prevalenza del fumo di sigaretta o di tipo di terapia antiipertensiva non cambiava significativamente dal baseline al follow-up in entrambi i gruppi (dati non mostrati).

Infine è stata condotta l'analisi di regressione Cox con la progressione dello stato albuminurico come variabile out come e l'IR, l'AER al basale, la clearance della creatinina, la pressione arteriosa, la pulse pressure, l'HbA1c, la durata del diabete, il fumo di sigaretta, la terapia antipertensiva e l'età come predittori. Questa analisi ha confermato che l' $IR \geq 0.73$  è un potente predittore della progressione della microalbuminuria, indipendente dagli altri fattori di rischio per albuminuria. L'OR per la progressione dello stato albuminurico, calcolato come esponenziazione dei coefficienti di regressione, era 5.00 (95% CI 1.4-17.7) per i pazienti con  $IR \geq 0.73$  vs quelli con  $IR < 0.73$  (tabella 3)

**Table 3** Multivariate regression analysis (Cox model) of the relation of RI with progression of the albuminuric state

Baseline	OR	95% CI
RI (<0.73, ≥0.73)	5.01	1.45–17.7
Age (years)	0.95	0.86–1.05
Smoking (yes/no)	0.93	0.40–2.17
Systolic blood pressure (mmHg)	1.00	0.97–1.04
Diabetes duration (years)	1.02	0.97–1.07
e-GFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.97	0.94–1.01
HbA1c (%)	1.39	0.91–2.11
Antihypertensive therapy	1.01	0.97–1.05
Baseline albumin excretion rate (µg/mg)	0.76	0.18–3.25

e-GFR: estimated glomerular filtration rate.

Results were very much the same if pulse pressure was used instead of systolic blood pressure.

## Discussione

Il nostro studio mostra chiaramente che i pazienti con diabete mellito tipo 2 ed ipertensione arteriosa e con normale funzione renale hanno valori di resistenze renali significativamente maggiori rispetto ai pazienti ipertesi non diabetici.

Un valore di RI di 0.73, corrispondente all'80esimo percentile della distribuzione dell'RI nella popolazione diabetica chiaramente discrimina i soggetti diabetici da quelli non diabetici; inoltre, un RI  $\geq 0.73$  si associa nei soggetti diabetici ad un'aumentata escrezione urinaria di proteine nelle analisi cross-sectional e predice lo sviluppo/progressione dell'albuminuria nel tempo. L'OR non aggiustato per la progressione dello stato albuminurico era di 10.7 con 95% CI di 3.0-38.0 per i soggetti con alto RI vs quelli con RI normale.

L'iperglicemia, l'ipertensione arteriosa e il fumo di sigaretta sono fattori di rischio noti per nefropatia diabetica mentre l'uso di farmaci inibitori del sistema renina angiotensina può rallentare la progressione della malattia (7-11, 104-109). Dopo correzione per questi fattori e per l'AER basale, l'OR per la progressione dello stato albuminurico associato ad un valore di RI  $\geq 0.73$  era di 5.01 con 95% CI di 1.4-17.7, confermando quindi che un elevato RI è un predittore significativo ed indipendente di progressione di nefropatia diabetica.

I valori di pressione arteriosa e la proporzione di soggetti in trattamento con farmaci agenti sul sistema renina angiotensina erano simili al baseline nei due gruppi con elevate e con normali resistenze; inoltre, nessun cambiamento significativo nei valori di pressione arteriosa e di compenso glicemico o nella proporzione dei soggetti in terapia con ACE inibitori o con antagonisti recettoriali dell'angiotensina II sono stati osservati in entrambi i gruppi tra il baseline e il follow-up, dando conferma del ruolo indipendente dell'RI

nell'identificazione di quei pazienti più propensi a sviluppare o andare incontro a peggioramento della nefropatia diabetica.

Uno dei vantaggi dell'utilizzo in clinica della misurazione delle resistenze renali nella valutazione del paziente diabetico è che questo è un dato facilmente rilevabile con esame ecografico. L'ecodoppler renale è un strumento non invasivo di studio della vascolarizzazione renale, validato in differenti patologie, quali l'insufficienza renale acuta e cronica, il rigetto da trapianto, le ostruzioni delle vie urinarie e le malattie glomerulari ed interstiziali croniche. In particolare, il calcolo dell'indice di resistenza a livello delle arterie interlobari è stato dimostrato essere un indicatore accurato e riproducibile dell'impedenza del flusso ematico renale. Un aumento dell'indice di resistenza potrebbe riflettere un processo di sclerosi renale risultante in una riduzione dell'area vascolare intrarenale e conseguentemente con l'aumento delle resistenze vascolari intrarenali (86, 87). Il progressivo danno renale è associato con fibrosi interstiziale e perdita dei glomeruli, con conseguente riduzione dell'area vascolare renale e incremento sempre maggiore delle resistenze vascolari intrarenali. Più recentemente è stato dimostrato che le elevate resistenze intrarenali si associano anche con i tradizionali fattori di rischio cardiovascolari (110), così come con un danno vascolare aterosclerotico subclinico, suggerendo quindi che l'indice di resistenza renale può anche rappresentare un marcatore precoce di danno vascolare sistemico (111, 112).

Non esiste al momento un cut-off validato per distinguere valori di indice di resistenza alti da valori normali; valori di RI compresi tra 0.75 e 0.85 sono stati associati con decadimento della funzione renale nei pazienti con insufficienza renale cronica e stenosi dell'arteria renale (82, 85, 86), e sembrano predire la perdita per rigetto di rene trapiantato (84).

Diversi studi cross-sectional hanno dimostrato che i pazienti diabetici mostrano un incremento dei valori di RI rispetto ai soggetti non diabetici e che più alti valori di RI sono associati con alterazione della funzione renale (88, 89). Gli studi prospettici invece che hanno valutato l'uso dell'RI come predittore di nefropatia diabetica, soprattutto in soggetti a più basso rischio, sono stati davvero pochi. Uno studio prospettico condotto in pazienti diabetici tipo 2, con micro/macroalbuminuria, ipertensione e ad alto rischio cardiovascolare (e quindi ad alto rischio di sviluppare/peggiore la nefropatia diabetica) ha mostrato che un  $RI \geq 0.80$  era associato con gli aspetti tipici della nefropatia diabetica, valutata su campioni bioptici renali percutanei, e con il decadimento della funzione renale nel tempo (92).

Il nostro studio espande le conoscenze attuali dimostrando che in una coorte di pazienti a più basso rischio e quindi maggiormente rappresentativi dei pazienti con diabete tipo 2 routinariamente visti nella pratica clinica, un valore di  $RI \geq 0.80$  è raramente riscontrabile.

Inoltre, un valore di  $RI \geq 0.73$  chiaramente discrimina i soggetti diabetici dai non diabetici e predice l'insorgenza e la progressione della microalbuminuria, indipendentemente dagli altri predittori di nefropatia diabetica, tra cui l'escrezione urinaria di albumina al baseline.

Questi risultati, sebbene prodotti in un piccolo campione, suggeriscono fortemente che la misurazione dell'RI è un metodo utile per la identificazione di quei pazienti più prone a sviluppare o peggiorare lo stato di albuminuria, permettendo quindi l'implementazione di interventi appropriati per prevenire o ritardare la progressione della nefropatia diabetica.

I limiti di questo studio includono le ridotte dimensioni del campione e la definizione dell'albuminuria basata su una sola misurazione. Entrambi le condizioni però si potrebbero associare ad un risultato nullo, piuttosto che ad un risultato positivo. Il disegno prospettico dello studio e la totale completezza dei dati al follow-up rappresentano i maggiori punti di forza dello studio; inoltre l'accurata ricerca delle stenosi dell'arteria renale e la selezione della popolazione di studio, che rende largamente generalizzabili i risultati, devono anche essere tenuti in conto.

Se replicato in un campione di più ampie dimensioni, i risultati di questo studio potrebbero giustificare l'uso routinario dell'ecodoppler renale, in aggiunta alla misurazione dell'albuminuria, per l'identificazione di quei pazienti che più probabilmente vanno incontro a danno renale, nei quali l'applicazione di appropriati interventi potrebbero prevenire o ritardare la progressione a stadi più avanzati della malattia.

### **3.2 Studio n.2 Relazione tra le Subfrazioni lipoproteiche e l'aterosclerosi a livello carotideo in una popolazione di Eschimesi d'Alaska (lo studio GOCADAN)**

È noto che i lipidi plasmatici “classici” hanno un ruolo fondamentale nella definizione del rischio cardiovascolare. Il profilo lipidico tipicamente più aterogeno è quello caratterizzato da un aumento del colesterolo LDL, con aumento delle LDL piccole e dense, una riduzione del colesterolo HDL e un aumento dei trigliceridi. In realtà, ogni classe lipoproteica è costituita da uno spettro continuo di particelle con differenti dimensioni, densità, metabolismo e con conseguente differente impatto aterogeno. La relazione tra le subfrazioni lipoproteiche e l'aterosclerosi è stata finora poco studiata, principalmente perché i metodi di laboratorio per la determinazione delle lipoproteine richiedono campioni di sangue voluminosi, sono laboriosi e lunghi, e quindi poco adatti a studi di popolazione. Recentemente è stata introdotta la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (RMN) protonica, un metodo rapido e relativamente poco costoso che misura su un piccolo campione di sangue, fresco o congelato, allo stesso tempo dimensioni e distribuzione dell'intero spettro lipoproteico. Queste caratteristiche rendono questo metodo adatto per studi su popolazioni di ampia numerosità.

In questo studio, abbiamo utilizzato questo metodo per studiare la relazione tra le subfrazioni lipoproteiche (VLDL, LDL e HDL, larghe, medie e piccole) con l'aterosclerosi, ed in particolare l'aterosclerosi subclinica a livello carotideo, negli eschimesi nativi d'Alaska, partecipanti allo studio GOCADAN (The Genetics of Coronary Artery Disease in Alaska Natives). Questa popolazione è caratteristica perché presenta un elevato rischio cardiovascolare (113-116), con una prevalenza di placche superiore alla popolazione U.S. (117). Questi soggetti presentano elevata percentuale di fumo di sigaretta (118) e di infiammazione subclinica (119), mentre dall'altra parte mostrano un profilo lipidico favorevole, con LDL colesterolo e trigliceridi non elevati ed alto HDL colesterolo (120) e dieta e stile di vita tradizionali (113). Lo scopo di questo studio era quello di valutare la relazione tra concentrazione e dimensioni delle sub frazioni lipoproteiche e misure di aterosclerosi carotidea in questa popolazione ad elevato rischio cardiovascolare ma buon profilo lipidico.

#### **Metodi**

La popolazione di studio GOCADAN include 1214 membri di famiglie con età  $\geq 18$  anni, residenti in villaggi e nella città di Nome nella Norton Sound Region dell'Alaska, reclutati nel 2000-2004 (121, 122). Ogni partecipante era stato sottoposto ad esame fisico complete,

anamnesi, raccolta di campioni biologici e altri tests diagnostici. I dettagli dello studio sono stati precedentemente pubblicati (121, 122). Le analisi del nostro studio sono state focalizzate su 796 soggetti partecipanti allo studio GOCADAN, di età  $\geq 35$  anni. Sono stati esclusi i soggetti che non avevano effettuato l'ecodoppler carotideo ( $n=61$ ), o quelli per i quali fossero mancanti i dati sulle particelle lipoproteiche ( $n=56$ ), o i soggetti che avevano ricevuto diagnosi di diabete, secondo i criteri WHO 1998 (123) ( $n=40$ ) o quelli in trattamento con farmaci ipolipidizzanti ( $n=40$ ), lasciando 656 soggetti nel dataset finale. Tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad esame clinico completo, comprendente la misurazione dell'altezza, del peso corporeo, della circonferenza vita, effettuati a digiuno, con abiti leggeri, senza scarpe, secondo un protocollo standard (121). La circonferenza vita veniva misurata con un metro flessibile a livello dell'ombelico con il soggetto in posizione supina; la pressione arteriosa (mmHg) veniva misurata in decubito supino, dopo circa 5 minuti di riposo, tre volte consecutivamente a distanza di circa due minuti e la media di queste tre veniva usata come misura finale.

I campioni di sangue intero, plasma, siero e urine venivano raccolti e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tutti i metodi di laboratorio sono stati precedentemente pubblicati (121). I lipidi plasmatici sono stati analizzati con metodi enzimatici convenzionali (Virtos 950, Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA) (124, 125). Il colesterolo LDL era calcolato con la formula di Friedewald (126). L'Apolipoproteina B (Apo B) e l'apolipoproteina A1 (apo A1) sono state misurate (127). La glicemia a digiuno è stata misurata con il metodo dell'esochinsai su Hitachi 717 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

Una dettagliata sub classificazione delle lipoproteine (tipo [LDL, VLDL, HDL], dimensioni [piccolo, intermedie, grandi], e concentrazione) è stata effettuata su plasma-EDTA isolato tramite centrifugazione (3,000 rpm, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per la spettroscopia NMR, utilizzando un metodo rapido, automatico, disponibile in commercio (LipoScience Inc., Raleigh, NC, USA) (128).

I dettagli della metodologia NMR sono stati precedentemente pubblicati (128, 129).

In queste analisi, i dati sono presentati come concentrazioni molarali. Al fine di semplificare le analisi, le 15 subfrazioni lipoproteiche evidenziate dall'analisi NMR (V1-V6, lipoproteine a densità intermedia [IDL], L1-L3, H1-H5) sono state raggruppate in 3 gruppi (grandi, intermedie, e piccole) per ogni classe di lipoproteine. Questo risulta nel seguente spettro di particelle: VLDL grandi (V5 + V6, 60-220 nm), VLDL intermedie (V3 + V4, 35-60 nm), e VLDL piccole (V1 + V2, 27-35 nm); LDL grandi (L3, 21.3-22.7 nm), LDL intermedie (L2, 19.8-21.2 nm), e LDL piccole (L1, 18.3-19.7 nm); HDL grandi (H4 + H5, 8.8-13 nm), HDL intermedie (H3, 8.2-8.8 nm), ed HDL piccole (H1 + H2, 7.3-8.2 nm)

(129). I dati sulle IDL (25 nm) non sono riportate in questo studio. Per tutte le analisi, le particelle LDL intermedie e piccole sono raggruppate insieme e considerate particelle piccolo, come in altri studi (130, 131).

Alla visita al basale, tutti i partecipanti sono stati sottoposti all'ecodoppler carotideo per valutare lo spessore medio intinale (intimal medial thickness - IMT) e valutare la presenza e la localizzazione di placche, attraverso un protocollo standard pubblicato (132).

Gli esami doppler venivano effettuati da un operatore centralmente addestrato ed interpretati da un centro di lettura centralizzato (Cornell Medical Center, NY) da un singolo operatore medico, in cieco rispetto alle caratteristiche del paziente.

La placca è stata definita come una protusione focale all'interno del lume del vaso di almeno il 50% ; il plaque score è stato definito come il numero di segmenti (0-8) di ogni carotide interessato da placche.

### **Analisi statistica**

Sono stati calcolati i coefficienti di correlazione di Spearman per le lipoproteine, i lipidi e l'ateroscleri carotidea. I confronti tra i gruppi sono stati valutati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) per le variabili continue e attraverso la regressione logistica per le variabili discrete, aggiustate per possibili fattori confondenti (età, sesso, BMI, pressione, fumo). Per le variabili distribuite in maniera non normale, i valori sono stati trasformati in forma logaritmica e utilizzati come tali nelle analisi statistiche ma sono mostrati nel testo come valori originali.

I dati sono stati analizzati utilizzando il programma SAS versione 9.1.

### **Risultati**

La tabella 1 mostra le caratteristiche generali della popolazione di studio: BMI e pressione arteriosa (sistolica e diastolica) erano nella norma, con una piccola proporzione di soggetti in trattamento antipertensivante. I lipidi plasmatici erano in media più bassi rispetto a quelli riscontrati nella popolazione generale americana, con elevati valori di colesterolo HDL. La prevalenza di fumatori è alta e circa la metà dei partecipanti mostrava la presenza di almeno 1 placca.

**Table 1. General characteristics of the study population (n = 656)**

Variable	Mean	Range
Age (years)	50	35-92
Women	55%	
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	27.4	16.7-52.7
Waist circumference (cm)	88.1	50.8-139.7
Systolic blood pressure (mmHg)	120	84-175
Diastolic blood pressure (mmHg)	77	52-107
Fasting plasma glucose (mg/dL)	92.7	71-124
Plasma cholesterol (mg/dL)	213.7	122-389
Plasma triglyceride (mg/dL)	126.4	32-891
LDL cholesterol (mg/dL)	125.6	48-275
HDL cholesterol (mg/dL)	63.3	24-170
Apolipoprotein A1 (mg/dL)	163.3	57-296
Apolipoprotein B (mg/dL)	104.0	35-196
Current smoker	58.4%	
Use of antihypertensive drugs	13.4%	
Intimal medial thickness (mm)	0.64	0.34-1.10
Median plaque score (n. of segments)	0	0-7
Persons with at least 1 plaque	45.9%	

Le subfrazioni lipoproteiche sono riportate nella tabella 2. La maggior parte di particelle VLDL ed HDL erano piccolo, mentre le particelle LDL erano egualmente distribuite.

**Table 2. Lipoprotein subfractions concentration and size (mean and standard deviation) in the GOCADAN participants (n = 656)**

<b>VLDL (nmol/l)</b>	±
Total particles	64.4 (29.0)
Large	1.6 (2.1)
Intermediate	17.1 (12.4)
Small	45.7 (20.0)
Size (nm)	44.3 (8.7)
<b>LDL (nmol/l)</b>	±
Total particles	1119 (319)
Large	570 (181)
Small	525 (339)
Size (nm)	21.6 (0.63)
<b>HDL (µmol/l)</b>	±
Total particles	29.0 (6.5)
Large	6.7 (4.0)
Intermediate	1.7 (2.7)
Small	20.6 (5.2)
Size (nm)	9.2 (0.5)

Al fine di valutare la relazione tra la concentrazione e le dimensioni delle particelle lipoproteiche e l'IMT e il plaque score, la popolazione di studio è stata analizzata secondo i tertili di IMT e i gruppi di plaque score (0, 1, and 2-7). Lo stesso è stato fatto per il lipidi standard, e tutti i dati sono stati aggiustati per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e fumo di sigaretta. Il colesterolo LDL aumentava all'aumentare sia dell'IMT che del plaque score (tabella 3). Al contrario, i trigliceridi si riducevano con l'aumento di IMT e plaque score, raggiungendo la significatività statistica solo per il plaque score (tabella 3). I livelli di Apo B tendevano ad aumentare nei tertili crescenti di IMT e nei gruppi di plaque score, ma senza raggiungere la significatività statistica. Nessuna associazione è stata trovata tra colesterolo HDL e Apo A1 con IMT e plaque score (tabella 3)

**Table 3. Standard plasma lipids and apolipoproteins according to tertiles of intimal medial thickness and plaque score groups**

	Triglycerides (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	Apolipoprotein A1 (mg/dL)	Apolipoprotein B (mg/dL)
<b>Intimal medial thickness</b>					
<b>Tertile 1</b>	114.7±1.0	121.6±2.6	62.9±1.3	162.7±2.20	101.1±1.77
<b>Tertile 2</b>	113.7±1.0	124.3±2.4	64.8±1.2	163.2±2.00	104.7±1.61
<b>Tertile 3</b>	108.0±1.0	130.9±2.8*	62.1±1.4	164.1±2.36	106.4±1.90
<b>P for trend</b>	0.26	0.03	0.69	0.70	0.07
<b>Plaque score</b>					
<b>Group 1</b>	116.1±1.0	120.8±2.1	62.9±1.0	162.6±1.75	101.6±1.40
<b>Group 2</b>	114.5±1.0	131.1±3.2**	62.3±1.6	161.5±2.72	108.1±2.19*
<b>Group 3</b>	103.1±1.0*§	131.2±3.0**	64.6±1.5	164.7±2.55	106.2±2.05
<b>P for trend</b>	0.02	0.01	0.42	0.66	0.09

Notes. HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol.

Intimal medial thickness tertile 1: 0.335-0.565, n = 219; tertile 2: 0.570-0.665, n = 221; tertile 3: 0.670-1.100, n = 216.

Plaque score group 1: plaque score 0, n = 355; group 2: plaque score 1, n = 119; group 3: plaque score 2-7, n = 182.

Data are expressed as LSMEANS ± SE.

Data are adjusted for age, gender, body mass index, systolic blood pressure, and current smoking.

\* p < 0.05 vs tertile 1; \*\* p < 0.01 vs tertile 1; § p < 0.05 vs tertile 2.

Abbiamo inoltre studiato la relazione tra le variabili ultrasonografiche e concentrazione e dimensioni delle particelle lipoproteiche e i risultati sono riassunti nella tabella 4: i tertili più alti di IMT erano associati con un aumento significativo della concentrazione delle particelle LDL totali. Le particelle LDL, sia grandi che piccole, mostravano un lineare, ma non significativo, incremento con l'aumentare dei tertili di IMT. Un più alto plaque score

era invece associato con livelli più alti di particelle LDL grandi (tabella 4). Nessuna relazione è stata trovata tra IMT e plaque score e la dimensione delle LDL.

Con l'aumentare del plaque score, c'era una riduzione lineare significativa nella concentrazione di VLDL e una riduzione non significativa delle particelle intermedie. Inoltre, un più alto plaque score risultava associato con più piccole dimensioni delle VLDL. Nessuna relazione è stata invece trovata tra i tertili di IMT e la concentrazione e le dimensioni delle particelle VLDL. IMT e plaque score non erano associati a concentrazione e dimensioni delle particelle HDL (tabella 4).

**Table 4. Association of intimal medial thickness and plaque score with very low-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein particle concentration and size**

	VLDL concentration (nmol/l)				VLDL Size (nm)	LDL concentration (nmol/l)			LDL Size (nm)	HDL concentration (µmol/l)				HDL Size (nm)
	Total**	Large**	Intermediate**	Small		Total	Large	Small		Total	Large	Intermediate**	Small	
<b>Intimal Medial Thickness Tertile</b>														
<b>Tertile 1</b>	57.5±1.04	0.6±1.1	12.7±1.10	45.0±1.49	44.9±0.06	1080±23	553±13	501±23	21.6±0.04	28.9±0.47	6.71±0.28	0.22±1.16	20.3±0.38	9.19±0.03
<b>Tertile 2</b>	56.3±1.04	0.4±1.1	10.6±1.08	45.9±1.36	44.4±0.58	1120±20	573±12	524±21	21.6±0.04	29.2±0.43	7.01±0.25	0.28±1.27	20.4±0.35	9.23±0.03
<b>Tertile 3</b>	56.5±1.05	0.5±1.1	10.6±1.60	46.2±1.60	43.7±0.69	1156±24*	587±14	547±25	21.6±0.05	28.8±0.51	6.42±0.30	0.17±1.25	21.1±0.41	9.14±0.03
<sup>§</sup> p for trend	0.812	0.266	0.198	0.615	0.266	0.037	0.113	0.226	0.492	0.851	0.514	0.423	0.212	0.445
<b>Plaque Score Group</b>														
<b>Group 1</b>	57.3±1.03	0.5±1.12	12.3±1.07	45.2±1.18	45.1±0.51	1103±18	546±10	534±18	21.6±0.03	29.4±0.37	6.90±0.22	0.24±1.21	20.7±0.30	9.20±0.03
<b>Group 2</b>	60.2±1.05	0.5±1.20	10.9±1.11	48.8±1.84	44.3±0.79	1151±28	592±16*	535±29	21.6±0.05	29.0±0.59	6.29±0.34	0.20±1.19	21.0±0.48	9.14±0.04
<b>Group 3</b>	53.5±1.05	0.3±1.18*	9.67±1.10	44.7±1.72	42.9±0.73	1130±26	606±15*	499±27	21.7±0.05	28.3±0.55	6.74±0.32	0.19±1.23	20.1±0.44	9.20±0.04
<sup>§</sup> p for trend	0.304	0.038	0.069	0.846	0.03	0.432	0.003	0.333	0.201	0.124	0.703	0.376	0.268	0.912

Intimal medial thickness tertile 1: 0.335-0.565, n = 219; tertile 2: 0.570-0.665, n = 221; tertile 3: 0.670-1.100, n = 216.

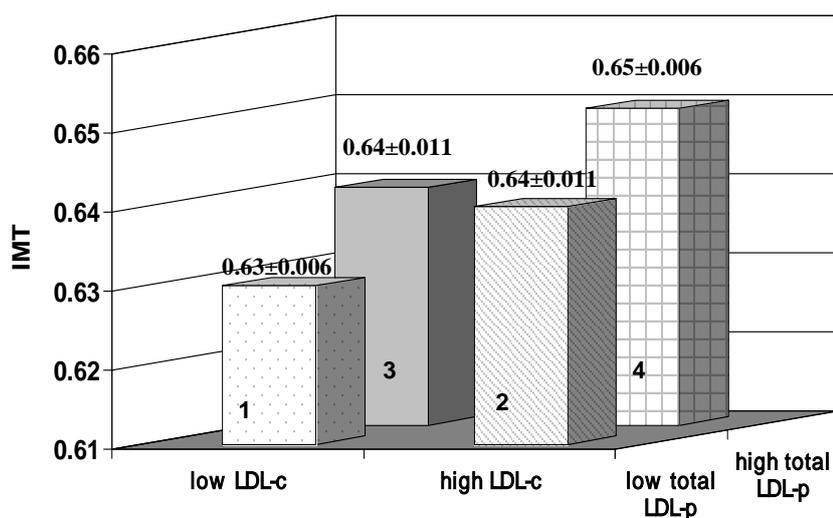
Plaque score group 1: plaque score 0, n = 355; group 2: plaque score 1, n = 119; group 3: plaque score 2-7, n = 182.

Data are expressed as LSMEANS ± SE. Data are adjusted for age, gender, BMI, systolic blood pressure, and current smoking.

\* p < 0.05 vs tertile 1. \*\* Values for total VLDL, large VLDL, intermediate VLDL, and intermediate HDL are back log-transformed.

Al fine di valutare l'effetto separato e combinato del colesterolo LDL e della concentrazione delle particelle LDL totali sull'IMT, abbiamo diviso la popolazione di studio in 4 gruppi sulla base dei quartili di colesterolo LDL (LDL-C) e delle particelle LDL (LDL-P): 1) quelli con basso LDL-C e bassa concentrazione di LDL-P (gruppo 1, n = 248); 2) quelli con alto LDL-C e bassa concentrazione di LDL-P (gruppo 2, n = 80); 3) quelli con basso LDL-C e alta concentrazione di LDL-P (gruppo 3, n = 81); e 4) quelli con alto LDL-C e alta concentrazione di LDL-P (gruppo 4, n = 247) utilizzando una analisi della varianza a due vie (figura 1). I gruppi con una sola alterazione lipidica (alto LDL-C oppure alta concentrazione di particelle LDL, gruppi 2 e 3 rispettivamente) avevano un valore intermedio di IMT, non significativamente differente dal gruppo 1 (gruppo con sia LDL-C che concentrazione di LDL-P normali). Al contrario, i soggetti con elevati LDL-C e LDL-P (gruppo 4) mostravano valori di IMT maggiori ( $p = 0.015$  vs gruppo 1).

**Figure 1. Additive role of total LDL cholesterol and LDL particle concentration in early atherosclerosis as measured by intimal medial thickness**



**Group 1 = low LDL cholesterol and low LDL particle concentration, n = 248.**

**Group 2 = high LDL cholesterol and low LDL particle concentration, n = 80.**

**Group 3 = low LDL cholesterol and high LDL particle concentration, n = 81.**

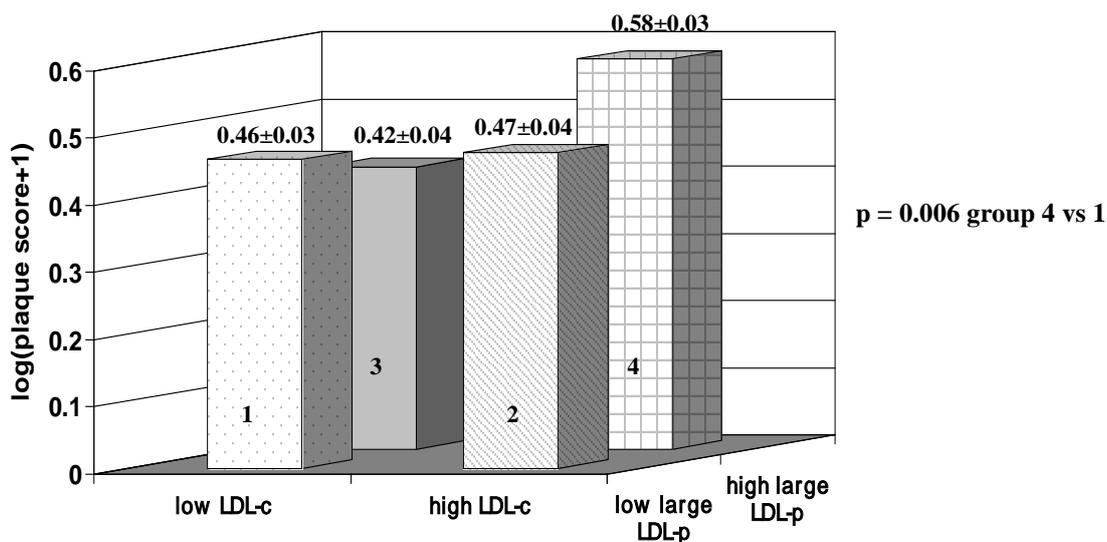
**Group 4 = high LDL cholesterol and high LDL particle concentration, n = 247.**

**Abbreviations.** IMT = intimal medial thickness; LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol; LDL-P = low-density lipoprotein particle number.

La stessa analisi è stata effettuata per il plaque score, utilizzando la concentrazione di particelle LDL grandi al posto della concentrazione di particelle LDL totali (figura 2).

Anche in questa analisi, solo il gruppo con entrambe le anomalie lipidiche mostrava un aumento significativo del plaque score rispetto al gruppo con nessuna anomalia ( $p = 0.006$ , gruppo 4 vs gruppo 1).

**Figure 2. Additive role of large LDL cholesterol and LDL particle concentration in later atherosclerosis as measured by plaque score**



**Group 1 = low LDL cholesterol and low large LDL particle concentration), n = 221.**

**Group 2 = high LDL cholesterol and low large LDL particle concentration, n = 107.**

**Group 3 = low LDL cholesterol and high large LDL particle concentration, n = 108.**

**Group 4 = high LDL cholesterol and high large LDL particle, n = 220.**

**Abbreviations. LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol; LDL-P = low-density lipoprotein particle number.**

## **Discussione**

Questo studio, condotto in una popolazione ad elevato rischio cardiovascolare nonostante il favorevole assetto lipidico e pressorio e con uno stile di vita attivo, ha mostrato i seguenti risultati:

- La concentrazione di particelle LDL in questa popolazione era relativamente bassa ed era rappresentata prevalentemente da LDL larghe.
- Un'elevata proporzione di soggetti presentava placche.

- Livelli più alti di IMT erano significativamente associate con più alti livelli di colesterolo LDL e con una più alta concentrazione di particelle LDL totali, indipendentemente dagli altri fattori di rischio cardiovascolare (i.e., età, BMI, pressione arteriosa sistolica, fumo di sigaretta). Queste 2 alterazioni lipidiche sembrerebbero avere effetti additivi sull'IMT.
- La presenza di placche carotidee era associate con elevate livelli di LDL-C, più alti livelli di particelle LDL larghe, una concentrazione più alta di VLDL piccole ad una più bassa dimensione delle VLDL size. Gli effetti del colesterolo LDL-C e della dimensione delle particelle LDL sul plaque score era additivo.
- IMT e plaque score non erano associati con il colesterolo HDL né con la concentrazione delle sub frazioni HDL.

Gli studi che hanno messo in relazione la concentrazione o le dimensioni delle particelle LDL con l'IMT hanno dato risultati contrastanti: 2 studi hanno trovato nessuna relazione con le dimensioni delle LDL (133, 134) mentre un altro studio ha trovato una relazione non significativa con le dimensioni delle LDL in soggetti asintomatici con iperlipidemia familiare combinata (135). Un altro studio, condotto in una popolazione multi-etnica, ha esaminato sia le dimensioni che la concentrazione delle particelle LDL ed ha trovato una relazione significativa con la concentrazione delle LDL larghe e piccole (18), mentre la nostra analisi ha mostrato una relazione significativa solo con la concentrazione delle LDL totali. La popolazione studiata da Mora et al. (130) era di dimensioni maggiori e differiva dalla nostra popolazione in quanto includeva una larga percentuale di pazienti diabetici e presentava una maggiore concentrazione di LDL piccole.

Un altro finding intrigante era la relazione inversa esistente tra il plaque score e i trigliceridi plasmatici. Questa associazione era accompagnata da una relazione inversa con la concentrazione delle VLDL larghe e con le dimensioni delle VLDL. A nostra conoscenza, nessun altro studio ha mostrato la relazione tra le particelle lipoproteiche e il plaque score. Le particelle VLDL più piccole potrebbero più facilmente penetrare nello spazio sub-endoteliale e alcuni studi (136, 137) hanno suggerito un ruolo aterotrombotico dei remnant con le placche, la cui formazione è più specificamente legata al processo trombotico rispetto all'IMT.

Il nostro studio indica possibili differenze nei determinanti lipoproteici dell'IMT e della comparsa (e/o peggioramento) delle placche. La concentrazione di particelle LDL potrebbe essere più strettamente correlate all'IMT, mentre la concentrazione delle VLDL piccole e delle LDL grandi potrebbero essere più legate al plaque score. La relazione del plaque score

con le LDL larghe piuttosto che con le LDL totali o piccole è in linea con altri studi, incluso quello di Mora et al. (130) che suggeriscono che le particelle LDL grandi, e non solo le piccole, possono essere implicate nell'evoluzione del processo aterosclerotico e nella malattia cardiovascolare. Inoltre la concentrazione delle particelle LDL grandi era significativamente ed inversamente associata con le dimensioni delle VLDL. Quindi l'associazione delle particelle LDL con il plaque score potrebbe essere mediata dalla loro associazione con le VLDL piccole.

La mancanza di associazione tra l'aterosclerosi carotidea con il colesterolo HDL, l'Apo A1 e la concentrazione delle particelle HDL potrebbe dipendere dagli elevati livelli di colesterolo HDL che caratterizzano questa popolazione e dal fatto che il tasso di malattia cardiovascolare è alto nonostante gli alti livelli di colesterolo HDL.

Altri studi sarebbero sicuramente utili per studiare il metabolismo delle HDL in questa popolazione.

I punti di forza di questo studio sono rappresentati dal tipo di popolazione, relativamente omogenea, dalla standardizzazione delle misurazioni carotidee e dalla disponibilità di dati sulle sub frazioni lipoproteiche in un ampio gruppo di partecipanti. Inoltre, l'alta prevalenza di malattia carotidea in questa coorte non è dipendente da iperlipidemia, permettendo pertanto la valutazione del possibile ruolo della concentrazione e delle dimensioni delle diverse lipoproteine come fattori di rischio cardiovascolare addizionali in una popolazione con lipidi plasmatici entro il range di normalità.

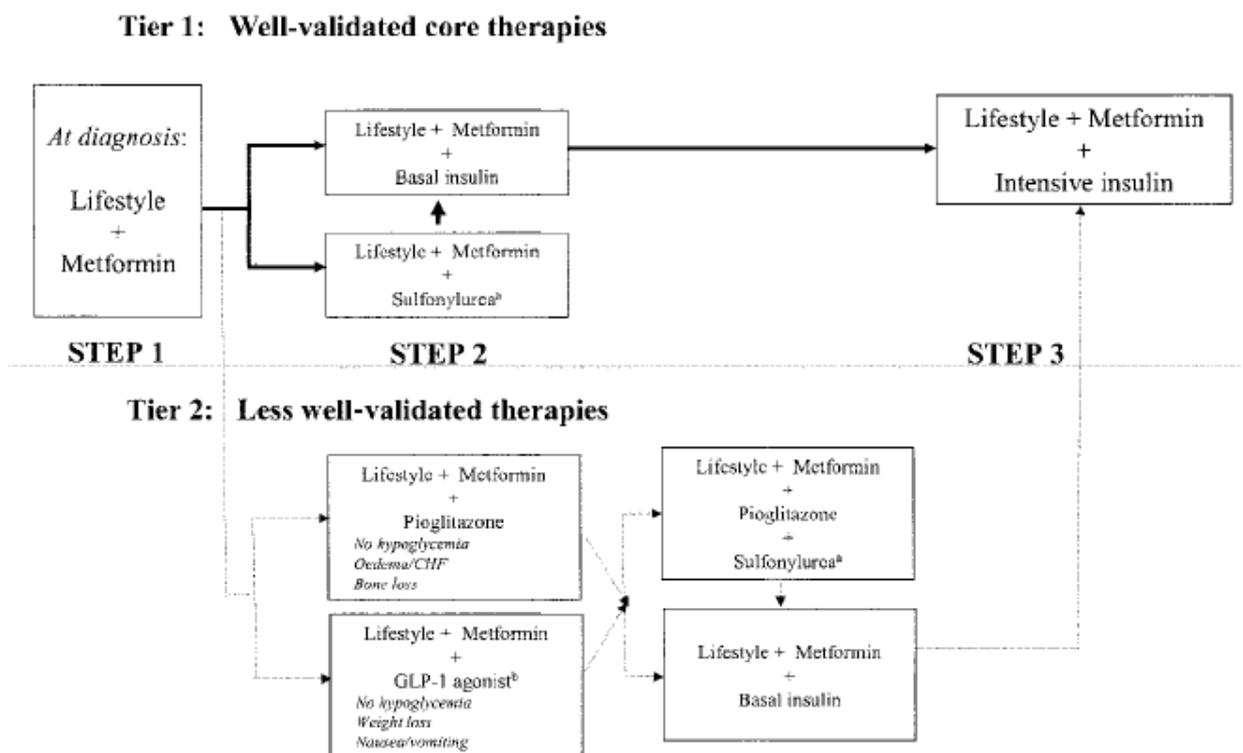
Dall'altra parte invece, i punti di debolezza di questo studio sono che i nostri dati non sono applicabili ad altre popolazioni e la natura cross-sectional delle analisi, che non permette di stabilire il rapporto di causa-effetto. Inoltre, sebbene le analisi siano state aggiustate per il sesso, non è stato possibile condurre le analisi separate per uomini e donne a causa delle dimensioni del campione.

### **3.3. Studio n.3. Effetti sull'incidenza di eventi cardiovascolari dell'aggiunta di un tiazolidinedione rispetto ad una sulfonilurea in pazienti con diabete mellito tipo 2 non adeguatamente compensati con metformina (TOSCA.IT - Thiazolidinediones Or Sulphonylureas and Cardiovascular Accidents Intervention Trial)**

Uno dei maggiori obiettivi del trattamento del diabete mellito tipo 2 è il raggiungimento di una emoglobina glicosilata (HbA1c) < 7%, poiché questo parametro rappresenta il più forte predittore di complicanze croniche della malattia. Purtroppo questo obiettivo è difficilmente perseguibile a causa del progressivo deterioramento della funzione beta cellulare e dell'insulinosensibilità, tanto che dopo 3 anni dalla diagnosi solo il 50% dei pazienti raggiunge l'obiettivo glicemico con la monoterapia, percentuale che si riduce al 25% dopo 9 anni (138). L'approccio terapeutico comunemente utilizzato nella pratica clinica procede per gradini: si comincia con l'intervento sullo stile di vita e contestualmente con la terapia farmacologica, che viene progressivamente intensificata attraverso la combinazione di differenti classi di farmaci ipoglicemizzanti. La metformina è raccomandata come farmaco di prima scelta per la terapia del diabete tipo 2 (139, 140). Recentemente, è stata introdotta una nuova classe di farmaci - i tiazolidinedioni (TZDs), che agiscono migliorando la sensibilità insulinica a livello epatico e dei tessuti periferici attraverso un'azione diretta sul tessuto adiposo e la regolazione di diverse adipochine (141). Migliorando l'insulinosensibilità, i TZDs producono una significativa riduzione dei livelli ematici di glucosio, sia in monoterapia che in combinazione con la metformina o con una sulfonilurea (SU) (141), e migliorano diversi fattori di rischio cardiovascolare (CV) associati all'insulinoreistenza, tra cui l'ipertensione, la dislipidemia, la microalbuminuria, l'alterazione della fibrinolisi e l'infiammazione subclinica (141-143). Inoltre, i TZDs esercitano un effetto cito-protettivo sulle cellule beta-pancreatiche evidenziato sia in animali da esperimento (144) che in studi clinici (145). La disponibilità di questi nuovi farmaci ha ampliato le opzioni terapeutiche nel diabete mellito tipo 2 ma, contemporaneamente, ha generato incertezza su quali siano i farmaci più appropriati da utilizzare in associazione alla metformina. Lo studio ADOPT (A Diabetes Outcome Progression Study) ha dimostrato che il rosiglitazone rispetto alla metformina e alla glibenclamide è più efficace nel mantenere un buon compenso glicemico nel tempo in pazienti con diabete tipo 2 di recente diagnosi (meno di tre anni) (146). L'incidenza cumulativa del fallimento della monoterapia era del 15% nel gruppo trattato con rosiglitazone, 21% con metformina e 34% con glibenclamide. Le differenze nei livelli di emoglobina glicosilata tra i tre gruppi di trattamento erano modeste (l'HbA1c nel gruppo in trattamento con rosiglitazone era più bassa dello 0.13% rispetto al gruppo con metformina e

dello 0.42% rispetto al gruppo con glibenclamide). Inoltre, il rosiglitazone induceva un maggiore incremento ponderale e un più alta incidenza di edema rispetto agli altri due trattamenti, ma minori disturbi gastrointestinali rispetto alla metformina e minori ipoglicemie rispetto alla glibenclamide. Tuttavia mancano studi controllati randomizzati che abbiano confrontato l'efficacia di differenti regimi di combinazione di ipoglicemizzanti orali.

La carenza di solide evidenze scientifiche al riguardo è stata sottolineata nel recente documento di Consensus elaborato dall'American Diabetes Association e dall'European Association for the Study of Diabetes (139) che stabilisce che in caso di fallimento della monoterapia con metformina è possibile associare sia una SU sia un TZD, riservando l'insulina ai pazienti con valori di HbA1c particolarmente alti. La Consensus suggerisce particolare cautela nell'utilizzo degli analoghi del GLP-1 in quanto non esistono dati di sicurezza sull'utilizzo di questi farmaci a lungo termine.



L'aggiunta di una SU o di un TZD alla metformina risulta in un sostanziale miglioramento del compenso glicemico con una riduzione dell'HbA1c di 1-1.5%. Sarebbe quanto mai utile poter disporre di un confronto diretto tra queste due strategie terapeutiche in considerazione del fatto che le due classi di farmaci differiscono profondamente per meccanismo d'azione, effetti collaterali e costi. L'unico studio di confronto tra SU e TZD in aggiunta alla metformina, della durata di 24 settimane (147), ha mostrato una maggiore riduzione della

HbA1c (- 1.5%) con l'associazione metformina-glibenclamide rispetto alla associazione metformina-rosiglitazone (-1.1%,  $p < 0.001$ ). Inoltre, un maggior numero di pazienti riceventi l'associazione metformina-glibenclamide raggiungeva l'obiettivo di HbA1c  $< 7.0$  % rispetto all'associazione metformina-rosiglitazone (60% vs. 47%) e i pazienti trattati con metformina + glibenclamide mostravano un più favorevole profilo lipidico, sebbene questo dato non trovi conferma in altri studi (148).

Allo stato attuale non vi sono informazioni sufficienti per operare una scelta terapeutica basata sull'evidenza, anche in considerazione del fatto che mancano dati sugli outcomes cardiovascolari che costituiscono un parametro di importanza cruciale nella valutazione globale dell'efficacia di questi farmaci, anche se sono in corso alcuni studi che valutano i potenziali effetti cardiovascolari di differenti farmaci ipoglicemizzanti orali (149, 150). Studi retrospettivi di coorte hanno mostrato un aumentato rischio di eventi avversi cardiovascolari in pazienti trattati con SU in monoterapia o in combinazione con metformina rispetto ai pazienti trattati con metformina da sola (151). Nello studio UKPDS, i pazienti diabetici trattati con glibenclamide + metformina mostravano una più elevata mortalità cardiovascolare rispetto agli altri gruppi di trattamento. Tuttavia, va considerato che questi dati derivavano da un'analisi post-hoc e, pertanto, devono essere interpretati con cautela. Al contrario, lo studio ADOPT ha documentato un minore numero di eventi cardiovascolari nei pazienti trattati con glibenclamide rispetto a quelli in trattamento con rosiglitazone o metformina (146). Tale discrepanza sottolinea la necessità di valutare l'incidenza di eventi cardiovascolari della associazione metformina-SU rispetto alle altre strategie terapeutiche. Un recente studio prospettico (PROACTIVE) ha confrontato l'efficacia dell'aggiunta del pioglitazone (15-45 mg/die) o di placebo alla terapia ipoglicemizzante standard nella prevenzione secondaria di eventi cardiovascolari in pazienti con diabete mellito tipo 2 (152). Il trattamento con pioglitazone non modificava significativamente l'endpoint principale (mortalità per tutte le cause, infarto del miocardio non fatale, ictus cerebrale, sindrome coronarica acuta, interventi chirurgici o endovascolari su coronarie o vasi periferici e amputazione arti inferiori), ma riduceva significativamente il numero di pazienti che sperimentavano l'endpoint secondario (mortalità per tutte le cause, infarto miocardio non fatale e ictus cerebrale). Tuttavia, nel gruppo trattato con pioglitazone si registravano 115 episodi di scompenso cardiaco congestizio in più rispetto al gruppo placebo. Inoltre, la terapia con pioglitazone si associava ad un maggiore incremento ponderale (4 kg in più rispetto al gruppo placebo), un incremento ben maggiore di quello atteso sulla base del migliorato compenso glicemico (153). Questi dati supportano la necessità di trials clinici su larga scala che confrontino l'efficacia dell'associazione

metformina + SU vs metformina + TZD sugli outcomes cardiovascolari. Per queste ragioni la Società Italiana di Diabetologia (SID) ha proposto uno studio clinico controllato randomizzato sugli effetti cardiovascolari a lungo termine di queste due strategie terapeutiche. I TZD attualmente in commercio sono il rosiglitazone ed il pioglitazone. Si è deciso di usare il pioglitazone in quanto questo presenta effetti più favorevoli sui fattori di rischio cardiovascolare rispetto al rosiglitazone, come indicato dai risultati di alcune metanalisi di studi condotti con questi farmaci (154-156). Questa scelta è sostenuta anche dalla Consensus dell'ADA e dell'EASD che suggerisce di utilizzare solo il pioglitazone nella pratica clinica.

La valutazione comparativa dei due trattamenti, metformina + SU vs metformina + pioglitazone, permetterà di fare luce su alcuni punti di estrema rilevanza: 1) l'impatto sul tempo di fallimento della terapia ipoglicemizzante orale; 2) gli effetti collaterali; 3) il rapporto costo/efficacia dei due schemi di trattamento. Tale confronto inoltre potrebbe costituire una "prova di concetto" che l'insulinoresistenza rappresenta un fattore indipendente di rischio cardiovascolare. Studi osservazionali hanno chiaramente indicato che l'insulinoresistenza è un forte predittore di malattia cardiovascolare, mancano però studi di intervento che dimostrino un rapporto di causalità. Valutare se i farmaci insulinosensibilizzanti abbiano un valore aggiunto nel migliorare gli outcomes cardiovascolari rispetto agli altri farmaci antidiabetici orali è senza dubbio un quesito di notevole rilevanza scientifica. Questo aspetto non è stato chiarito nello studio PROACTIVE dal momento che i gruppi in trattamento con pioglitazone e placebo differivano in termini di compenso glicemico (differenza media in HbA1c di circa 0.5%), e questo potrebbe aver contribuito alle differenze osservate nell'incidenza di eventi cardiovascolari.

### **Scopo dello studio**

Valutare se in pazienti con diabete mellito tipo 2 non adeguatamente compensati con la massima dose tollerata di metformina, l'aggiunta di pioglitazone rispetto all'aggiunta di una sulfonilurea riduce l'incidenza di eventi cardiovascolari. I due trattamenti verranno anche confrontati in termini di efficacia sul compenso glicemico, sui maggiori fattori di rischio cardiovascolare, sicurezza, tollerabilità e costi.

Outcome primario: un endpoint composito comprendente: morte per tutte le cause, infarto miocardico non fatale (incluso IMA silente), ictus non fatale, rivascolarizzazione coronarica non programmata.

Outcomes secondari: il principale outcome secondario è:

- un endpoint ischemico composito comprendente: morte improvvisa, IMA fatale e non fatale (incluso IMA silente), ictus fatale e non fatale, amputazioni maggiori di

gamba (al di sopra della caviglia), interventi chirurgici o endovascolari su carotidi, coronarie o vasi periferici.

Altri outcomes secondari:

- un endpoint cardiovascolare composito comprendente l'outcome primario più lo scompenso cardiaco (definito secondo i criteri di Boston), interventi chirurgici o endovascolari su carotidi, coronarie o vasi periferici, angina (definita secondo i criteri WHO e confermato da anomalie di recente comparsa all'elettrocardiogramma), claudicatio intermittens con un indice di Winsor inferiore a 0.90;
- compenso glicemico, valutato come modifiche dal basale della HbA1c e tempo di fallimento della terapia ipoglicemizzante orale (i.e. HbA1c > 8% in due occasioni successive a distanza di 3 mesi);
- un endpoint microvascolare (sviluppo di nefropatia) composito comprendente: raddoppio dei valori basali di creatininemia o riduzione di 20ml/min/1.73m<sup>2</sup> del filtrato glomerulare stimato o sviluppo di insufficienza renale (dialisi o creatininemia >3,3 mg/dl) o sviluppo di macroalbuminuria;
- effetto sui maggiori fattori di rischio cardiovascolare (lipidi plasmatici, pressione arteriosa, microalbuminuria, circonferenza vita, markers di infiammazione subclinica).

L'analisi di efficacia sarà intention to treat. In base al numero di eventi e quindi al potere statistico, saranno valutati i singoli componenti degli outcomes primario e secondari. Una specifica Commissione di valutazione degli endpoints, composta da cardiologi ed internisti con esperienza in campo vascolare, avrà il compito di aggiudicare gli eventi sulla base di criteri definiti a priori. Questa commissione lavorerà in cieco rispetto al trattamento assegnato ai pazienti ed indipendentemente dallo Steering Committee. La sicurezza e gli effetti collaterali (i.e. incremento ponderale, edemi periferici, ipoglicemie) saranno monitorati. I costi diretti ed indiretti dei due trattamenti saranno valutati.

### **Metodi**

Trattasi di uno studio di intervento multicentrico, randomizzato, aperto, a gruppi paralleli, della durata di almeno 4 anni (PROBE: Prospective Randomized Open Blinded End-Point).

L'analisi di efficacia sarà eventi-guidata: lo studio termina quando il prefissato numero di eventi si è verificato.

### **Popolazione di studio**

Criteri di inclusione :

- Pazienti con diabete mellito tipo 2 (criteri WHO) da almeno 2 anni
- Uomini e donne
- 50-75 anni di età

- IMC 20-40 Kg/m<sup>2</sup>
- Trattamento stabile da almeno 3 mesi con metformina in monoterapia
- HbA1c >7.0% e ≤9.0%
- Donne in età fertile ma in trattamento contraccettivo

Criteri di esclusione:

- Diabete mellito tipo 1
- Intolleranza/controindicazioni alla metformina, alle sulfoniluree o ai tiazolidinedioni
- Uso cronico di glucocorticoidi
- Storia documentata di eventi coronarici o cerebrovascolari nei precedenti 3 mesi
- Creatininemia >1.3 mg/dl
- Ulcere ischemiche o gangrena
- Storia di scompenso cardiaco congestizio classe NYHA (New York Heart Association) I o superiore
- Epatopatia (ALT 2.5 volte maggiore rispetto al limite superiore)
- Gravidanza o allattamento
- Cancro, tossicodipendenza o qualunque altro problema che possa interferire con l'aspettativa di vita o l'adesione al protocollo di studio

### **Intervento**

Il protocollo di studio sarà approvato dai Comitati Etici Locali. Prima di essere sottoposti a qualsiasi procedura, i pazienti firmeranno il consenso informato.

Lo screening ed il follow-up avranno luogo in diverse Unità Operative (UO) cliniche che lavoreranno in collaborazione con una rete di centri. Ogni UO coordinerà un gruppo (3-7) di strutture ambulatoriali appartenenti alla stessa area geografica (regione/provincia).

Tutte le procedure dello studio (screening e follow-up) saranno effettuate secondo un protocollo standard da personale addestrato.

Tutti i pazienti che incontrano i criteri di inclusione, in assenza di condizioni che rientrino tra i criteri di esclusione, e che hanno dato il consenso informato, entrano in un periodo di run-in di 8±2 settimane. Durante questo periodo, i pazienti ricevono indicazioni sullo stile di vita (dieta e attività fisica) e fanno terapia con sola metformina al dosaggio di 2 gr/die; i pazienti che non tollerano la metformina vengono invece esclusi dallo studio.

Al termine del periodo di run-in, la eleggibilità dei partecipanti viene nuovamente verificata e i pazienti vengono randomizzati ad uno dei due bracci di trattamento:

- Metformina (2 gr/die) + sulfonilurea
- Metformina (2 gr/die) + pioglitazone

Nel gruppo randomizzato a metformina + sulfonilurea, la scelta tra glibenclamide, gliclazide e glimepiride è lasciata allo sperimentatore, che segue la pratica clinica locale.

Le sequenze di randomizzazione sono prodotte presso l'Unità Epidemiologica del "Consorzio Mario Negri Sud". L'assegnazione al braccio di randomizzazione viene

effettuata telefonicamente, dopo la verifica di tutti i criteri di inclusione ed esclusione. La randomizzazione avviene secondo la procedura che prevede la stratificazione per Unità Operativa, sesso e pregressa storia di eventi cardiovascolari dei partecipanti.

I pazienti sono sottoposti a visite di follow-up dopo 1, 3 e 6 mesi dalla fine del run –in e poi ogni 6 mesi per tutta la durata dello studio a meno che le condizioni cliniche non richiedano controlli più frequenti (secondo la GCP). Sono previsti inoltre contatti telefonici bimestrali per la rilevazione di eventuali eventi avversi, per l'acquisizione dei dati di compenso glicemico ed eventuali modifiche del dosaggio dei farmaci.

La dose di metformina rimane costante durante tutto lo studio. La dose iniziale di farmaco aggiunto è 5 mg di glibenclamide, o 30 mg di gliclazide (R.M.), o 2 mg di glimepiride per il gruppo randomizzato a metformina + SU e 15 mg di pioglitazone per il gruppo randomizzato a metformina + pioglitazone.

Se il compenso glicemico è insoddisfacente (glicemia a digiuno > 120 mg/dl o glicemia post-prandiale > 160 mg/dl in più del 50% delle rilevazioni in un periodo di 8 settimane), il dosaggio dei farmaci in studio viene aumentato fino al dosaggio massimo efficace (i.e. 15 mg per glibenclamide, 120 mg per gliclazide, 6 mg per glimepiride, 45 mg per pioglitazone).

Se in occasione di una qualunque visita di follow-up si dovesse riscontrare un valore di HbA1c >8%, il paziente riceverà un rinforzo delle informazioni sullo stile di vita, verrà verificata l'aderenza al protocollo e ripetuto il dosaggio della HbA1c a distanza di 3 mesi. Un valore confermato di HbA1c >8%, nonostante l'aderenza al trattamento nei tre mesi precedenti, comporterà la necessità di aggiungere una somministrazione serale di insulina Glargine. La titolazione dell'insulina sarà effettuata in base ai valori di glicemia capillare a digiuno e seguirà un algoritmo predefinito. Se in due controlli successivi effettuati a distanza di 3 mesi ciascuno, l'HbA1c dovesse essere ancora > 8%, si aggiungeranno una o più somministrazioni di analogo rapido ai pasti (157). Il dosaggio dell'insulina verrà invece ridotto, secondo un algoritmo predefinito, in caso di frequenti ipoglicemie.

L'uso concomitante di altri farmaci è permesso durante lo studio. L'inizio e il management della terapia antipertensiva, ipolipidemizzante ed antiaggregante segue le indicazioni dettate dalla Good Clinical Practice Guidelines; nome commerciale e dosaggio di tutti i farmaci utilizzati devono però essere registrati ad ogni visita.

I pazienti dovranno interrompere il trattamento sperimentale ed escono dallo studio, ma non dal follow-up, qualora si dovesse verificare una delle seguenti condizioni:

- un incremento dell'alanina aminotransferasi di 2.5 volte o più rispetto al valore al basale in due occasioni successive a distanza di un mese;

- segni o sintomi suggestivi di scompenso cardiaco congestizio, secondo le indicazioni della consensus sull'uso dei tiazolidinedioni dell'American Heart Association e della American Diabetes Association (149).

- condizioni cliniche richiedenti la sospensione degli ipoglicemizzanti orali e trattamento insulinico stabile

### **Numerosità del campione**

Il calcolo della numerosità del campione è basato su un rischio stimato dell'endpoint primario del 3,5% per anno (158-160). La numerosità del campione deve essere tale da identificare con una significatività del 5% ( $p < 0.05$ , test a due code) e con un potere statistico dell'80% una riduzione del rischio di eventi del 20% (HR=0.80; metformina + pioglitazone vs metformina + SU)

Dati questi assunti, un totale di 652 eventi è necessario per l'analisi di efficacia. Quindi, un totale di 4.396 pazienti dovrebbe essere arruolato e seguito per almeno 4 anni (in ogni caso lo studio termina quando il prefissato numero di eventi si è verificato). Assumendo una perdita al follow-up di circa il 15% dei partecipanti, sarà necessario arruolare 5.172 pazienti (2.586 in ogni braccio di studio).

L'analisi di efficacia sarà eventi-guidata.

### **Analisi statistica**

Tutte le analisi di efficacia saranno condotte secondo l'intention to treat e saranno eventi-guidate. La significatività statistica è fissata a  $p < 0.05$ . I tassi di incidenza nei gruppi di trattamento metformina + pioglitazone vs. metformina + SU saranno confrontati usando le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier e l'analisi logrank. Inoltre, l'efficacia dei trattamenti verrà analizzata attraverso l'analisi multivariata usando il modello di regressione di Cox. Sono previste analisi per sottogruppi di sesso, età, IMC e storia di eventi cardiovascolari.

### **Raccolta delle informazioni**

Al basale e ad ogni visita di follow-up (ogni 6 mesi) i seguenti parametri vengono rilevati:

- segni vitali, peso, circonferenza vita, glicemia, eventi avversi e/o effetti collaterali, segni o sintomi di scompenso cardiaco, aderenza al trattamento;
- ogni nuovo segno o sintomo;
- profilo glicemico domiciliare;
- frequenza e severità degli episodi di ipoglicemia. L'ipoglicemia viene definita come un valore di glicemia capillare  $< 60$  mg/dl in presenza o assenza di sintomi e viene distinto in moderata (non richiedente aiuto per il trattamento) o grave (con perdita di coscienza o

richiedente assistenza per il trattamento). In quest'ultimo caso, i sintomi dovrebbero essere sempre confermati dalla misurazione della glicemia capillare (< 40 mg/dl) oppure dall'uso terapeutico di glucagone o glucosio e.v.;

- malattie/eventi intercorrenti, modifiche nell'uso o il dosaggio dei farmaci;
- storia di ospedalizzazione per infarto miocardico, ictus, amputazioni maggiori di gamba (sopra la caviglia), scompenso cardiaco, interventi endovascolari o chirurgici su coronarie o arterie degli arti inferiori o carotidi;
- claudicatio intermittens (WHO) con un indice di Winsor inferiore a 0.90;
- angina (WHO) confermato da anomalie elettrocardiografiche di nuova insorgenza.

Al basale ed ogni 6 mesi vengono monitorati transaminasi (ALT, AST) ed HbA1c.

Al basale ed ogni 12 mesi vengono misurati i lipidi plasmatici (colesterolo totale, colesterolo HDL e trigliceridi), la microalbuminuria e proteina C reattiva.

Al basale ed ogni 12 mesi un ECG standard a riposo viene effettuato.

Tutte le procedure di studio devono essere effettuate secondo un protocollo standard e descritte in dettaglio nel manuale operativo che è stato redatto dal Centro Coordinatore. Prima dell'inizio dello studio, tutti gli investigatori hanno seguito un programma di addestramento e standardizzazione delle procedure al fine di ridurre la variabilità inter-osservatore; queste sessioni sono state organizzate e supervisionate dal Centro Coordinatore.

### **Monitoraggio dello studio**

La condotta dello studio (i.e. timing, aderenza al protocollo etc..) di ogni Centro partecipante viene monitorata con visite regolari di monitors professionisti ANMCO (allo start-up, alla fine dello studio e due volte l'anno).

Lo Steering Committee si incontra regolarmente ogni 6 mesi per rivedere le fasi di avanzamento dello studio

Il Data and Safety Monitoring Board (DSMB) è responsabile del monitoraggio degli outcomes di sicurezza durante tutto il corso dello studio. Questa commissione si riunisce indipendentemente dallo Steering Committee, ad intervalli definiti per valutare i dati di sicurezza e gli endpoints di efficacia critici e proporrà allo Steering Committee di continuare, modificare o interrompere lo studio. Criteri statistici definiti a priori saranno utilizzati per decidere se interrompere precocemente lo studio in caso di una netta differenza di eventi tra i due gruppi di trattamento. Il DSMB potrebbe decidere di sospendere lo studio anche per altri seri motivi di sicurezza.

### **Aspetti etici**

Lo studio viene condotto secondo le norme della Good Clinical Practice (GCP).

Ad ogni paziente viene chiesto di firmare un consenso.

I farmaci adoperati nello studio sono ampiamente utilizzati per il trattamento del diabete tipo 2, non sono pertanto previsti effetti collaterali diversi da quelli già noti connessi al loro uso. Gli effetti collaterali verranno attentamente monitorati dal DSMB che deciderà se far interrompere lo studio per motivi di sicurezza.

### **Caratteristiche organizzative**

Al momento partecipano allo studio oltre 40 Unità Operative cliniche distribuite sul territorio nazionale.

Il Centro di Coordinamento (Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Napoli "Federico II") è responsabile di: preparazione del protocollo di studio, preparazione del manuale operativo, organizzazione del corso di addestramento per gli investigatori, preparazione dei manuali di monitoraggio (apertura centro e visite di follow-up) dello studio, monitoraggio delle attività di screening e reclutamento dei centri.

L'Unità Epidemiologica ("Consorzio Mario Negri Sud") è responsabile della randomizzazione telefonica centralizzata, della creazione della CRF elettronica, della creazione del database, dell'analisi dei dati e del monitoraggio della qualità dei dati inviati dagli sperimentatori.

Il monitoraggio degli eventi avversi e le relative analisi sono effettuati dall'Unità di Farmacovigilanza dell'Università di Napoli Federico II (Prof. G. Di Renzo).

La valutazione di farmacoeconomia viene effettuata dal centro Interdipartimentale di Farmacoeconomia dell'Università di Napoli Federico II (Prof G.L. Mantovani)

### **Determinazioni di laboratorio**

Nel laboratorio centralizzato (Ospedale di Desio, Milano), che partecipa ad un programma di controllo esterno di qualità vengono effettuate le misurazioni di: HbA1c, profilo lipidico standard (colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi), creatininemia, microalbuminuria, proteina C reattiva.

### **Stato di avanzamento dei lavori**

Lo studio è partito nella maggior parte dei centri partecipanti.

Le Unità Operative Cliniche attualmente impegnate sono oltre 40 e quasi tutte hanno iniziato le procedure di screening e di randomizzazione dei pazienti.

Ad oggi 684 soggetti sono stati screenati ed hanno pertanto iniziato il periodo di run-in di 8 settimane previsto dal protocollo: al momento 244 pazienti sono stati già randomizzati. In alcuni centri sono state anche effettuate le visite a 1, 3 e 6 mesi.

È in corso di preparazione il lavoro di presentazione del protocollo di studio, che verrà sottomesso ad una rivista scientifica internazionale.

#### 4. CONCLUSIONI

Le complicanze del diabete mellito tipo 2, sia micro che macroangiopatiche, hanno un notevole impatto socio-economico, riducendo notevolmente l'aspettativa e la qualità di vita dei pazienti diabetici: la patologia macrovascolare è infatti la più frequente causa di morte nella popolazione diabetica, mentre la nefropatia e la retinopatia diabetica sono le più frequenti cause di insufficienza renale terminale e di cecità rispettivamente.

Le evidenze scientifiche dimostrano che i programmi di screening ed il trattamento di queste patologie riducono significativamente la mortalità e la morbilità nei pazienti diabetici. Da qui nasce l'esigenza di una maggiore attenzione alla ricerca di marcatori sempre più precoci di malattia, che potrebbero permettere l'individuazione di soggetti a maggior rischio di sviluppare le complicanze del diabete, nei quali l'applicazione di appropriati interventi potrebbero prevenire o ritardare la progressione a stadi più avanzati della malattia

Pertanto la mia attività di ricerca durante questo ciclo di dottorato si è soffermata su tre aspetti specifici delle complicanze croniche del diabete:

- 1) lo studio di un indice utile come marcatore precoce della nefropatia diabetica e predittore di sviluppo e progressione del danno renale
- 2) lo studio delle subfrazioni lipoproteiche come nuovi fattori di rischio di aterosclerosi subclinica a livello carotideo (ispessimento medio-intimale e placche carotidiche)
- 3) la valutazione comparativa di due trattamenti ipoglicemizzanti orali sulla mortalità cardiovascolare

Per quanto riguarda la predizione della nefropatia diabetica, il mio studio, prospettico osservazionale, ha dimostrato che l'indice di resistenza renale, una semplice misura dell'emodinamica intrarenale misurata attraverso l'ecodoppler delle arterie renali, è un marcatore di nefropatia diabetica largamente utilizzabile nella pratica clinica, capace di predire lo sviluppo e la progressione della malattia renale anche nei soggetti normoalbuminurici, quindi in una fase precocissima della malattia in cui i soggetti sarebbero identificati, secondo le attuali conoscenze, come esenti da danno renale.

Per quanto riguarda invece il secondo punto, questo studio ha permesso di dimostrare che la concentrazione e le dimensioni delle diverse particelle lipoproteiche hanno un ruolo importante come fattori di rischio cardiovascolare, aggiuntivo rispetto al profilo lipidico classico: in particolare indica possibili differenze nei determinanti lipoproteici dell'IMT e

della comparsa (e/o peggioramento) delle placche. La concentrazione di particelle LDL potrebbe essere più strettamente correlate all'IMT, mentre la concentrazione delle VLDL piccole e delle LDL grandi potrebbero essere più legate al plaque score. La relazione del plaque score con le LDL larghe piuttosto che con le LDL totali o piccole suggerisce che le particelle LDL grandi, e non solo le piccole, possono essere implicate nell'evoluzione del processo aterosclerotico e nella malattia cardiovascolare.

Il secondo aspetto studiato della malattia cardiovascolare è tutt'ora in corso di valutazione con uno studio di intervento multicentrico randomizzato che si propone di valutare nei pazienti diabetici l'effetto di due differenti strategie terapeutiche (associazione metformina + sulfoniluree vs metformina + tiazolidinedioni), largamente utilizzate nella pratica clinica, su mortalità e morbilità cardiovascolare, nonché compenso glicemico, effetti collaterali, rapporto costo/efficacia. Questo studio è di grande interesse ed attualità perché permetterà di rispondere a importanti domande che si pongono sulla efficacia dei farmaci ipoglicemizzanti nella prevenzione della malattia cardiovascolare, domande a cui non è stata data una chiara risposta dai trials finora condotti, così come sottolineato dalle maggiori società scientifiche nazionali ed internazionali.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Garancini MP. L'epidemiologia del diabete tipo 2 e della ridotta tolleranza al glucosio. In: Vaccaro O, Bonora E, Bruno G, Garancini MP, Muntoni S (Eds). Il diabete in Italia. Kurtis, Milano, 1996.
2. Gnani R, Karaghiosoff L, Costa G, Merletti F, Bruno G: Socio-economic differences in the prevalence of diabetes in Italy: the population-based Turin Study on administrative data sources. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008; 18: 678-82
3. Cricelli C, Mazzaglia G, Samani F, Marchi M, Sabatini A, Nardi R, Ventriglia G, Caputi AP. Prevalence estimates for chronic diseases in Italy: exploring the differences between self-report and primary care database. *J Public Health Med* 2003;25:254-257.
4. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Meigs JB, Bonadonna RC, Muggeo M. Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in caucasians: the Bruneck Study. *Diabetes* 2004;53:1782-1789
5. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: 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;329:977-986.
6. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995;28:103-117.
7. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: 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;352:837-853.
8. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998;352:854-865.
9. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group: Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med* 2000;342:381-389.
10. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA: 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;359:1577-1589.
11. 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;321:405-412.
12. US Renal Data System, <http://www.usrds.org/adr.htm>
13. Registro Italiano di Dialisi e Trapianto, <http://www.sin-ridt.org>
14. Estasio RO, Schrier RW. Diabetic nephropathy: pathogenesis, diagnosis, and prevention of progression. *Adv Intern Med* 46: 359-408, 2001
15. Caramori MI, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 49: 1399-1408, 2000
16. Bruno G, Merletti F, Biggeri A, Bargerò G, Ferrero S, Pagano G, Cavallo-Perin P. Fibrinogen and albumin excretion rate are major independent predictors of 11-yr cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study. *Diabetologia* 48: 427-434, 2005
17. Mykkanen L, Zaccaro DJ, Wagerknecht LE, Robbins DC, Gabriel M, Haffner SM. Microalbuminuria is associated with insulin resistance in non diabetic subjects: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 47: 793-00, 1998
18. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia.* Aug;39(8):940-5. 1996
19. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* Jul;33(7):438-43, 1990
20. Freedman BI, Tuttle AB, Spray BJ. Familial predisposition to nephropathy in African-Americans with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis.* May; 25(5):710-3, 1995
21. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes.* Nov;46(11):1829-39, 1997.
22. Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes.* Apr;48(4):909-13, 1999

23. Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *BMJ* 314: 783-788, 1997
24. The Microalbuminuria Collaborative Study Group. Predictors of the development of microalbuminuria in patients with Type 1 diabetes mellitus: a seven-year prospective study. *Diabet Med.* Nov;16(11):918-25, 1999
25. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med.* Jul 9;339(2):69-75, 1998
26. Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D, Levy Z, Rachmani R. Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern Med.* May 11;158(9):998-1004, 1998
27. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, Wright AD, Turner RC, Holman RR. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 321(7258):412-9, 2000
28. Viberti G. The need for tighter control of cardiovascular risk factors in diabetic patients. *J Hypertens* 21 (Suppl):S3-S6, 2003
29. Caramori ML, Gross JL, Pecis M, de Azevedo MJ. Glomerular filtration rate, urinary albumin excretion rate, and blood pressure changes in normoalbuminuric normotensive type 1 diabetic patients: an 8-year follow-up study. *Diabetes Care* 22 :1512-6, 1999
30. Dahlquist G, Stattin EL, Rudberg S. Urinary albumin excretion rate and glomerular filtration rate in the prediction of diabetic nephropathy; a long-term follow-up study of childhood onset type-1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant.* Jul;16(7):1382-6, 2001
31. Sawicki PT, Didjurgeit U, Muhlhauser I, Bender R, Heinemann L, Berger M. Smoking is associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 17(2):126-31, 1994.
32. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Parving HH. Smoking and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26 (3):911-6, 2003.
33. Chaturvedi N, Fuller JH, Taskinen MR; EURODIAB PCS Group. Differing associations of lipid and lipoprotein disturbances with the macrovascular and microvascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 (12): 2071-7, 2001.
34. Appel GB, Radhakrishnan J, Avram MM, DeFronzo RA, Escobar-Jimenez F, Campos MM, Burgess E, Hille DA, Dickson TZ, Shahinfar S, Brenner BM; RENAAL Study. Analysis of metabolic parameters as predictors of risk in the RENAAL study. *Diabetes Care* 26 (5):1402-7, 2003
35. Ruggenenti P, Remuzzi G. Nephropathy of type-2 diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol.* 9 (11):2157-69, 1998
36. Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int* 51 (1):2-15, 1997
37. Toeller M, Buyken A, Heitkamp G, Bramswig S, Mann J, Milne R, Gries FA, Keen H. Protein intake and urinary albumin excretion rates in the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 40 (10):1219-26, 1997
38. Mollsten AV, Dahlquist GG, Stattin EL, Rudberg S. Higher intakes of fish protein are related to a lower risk of microalbuminuria in young Swedish type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 24 (5):805-10, 2001
39. Pecis M, de Azevedo MJ, Gross JL. Chicken and fish diet reduces glomerular hyperfiltration in IDDM patients. *Diabetes Care* 17 (7):665-72, 1994
40. Riley MD, Dwyer T. Microalbuminuria is positively associated with usual dietary saturated fat intake and negatively associated with usual dietary protein intake in people with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 67(1):50-7, 1998
41. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, et al. Retinopathy in Diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(suppl 1):S84-S87.
42. Klein R, Klein BEK. Vision disorders in diabetes. In: *Diabetes in America*. 2nd ed. Bethesda, MD National Diabetes Data Group, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 1995;293- 338.
43. Klein R, Klein BEK, Moss SE. Visual impairment in diabetes. *Ophthalmology* 1984;91:1-9.
44. Klein R, Klein BEK, Moss SE. Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1992;15:1875-1891
45. Porta M. Retinopatia Diabetica. *Il Diabete* 2004;16:343-347
46. Klein R, Moss SE, Klein BEK, et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XI. The incidence of macular edema. *Ophthalmology* 1989;96:1501-1510
47. Moss SE, Klein R, Klein BEK. Ten-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 1994;101:1061-70
48. Chew EY, Klein ML, Ferris FL III, et al. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) report 22. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:1079-1084

49. Agardh E, Agardh C-D, Hansson-Lundblad C. The five-year incidence of blindness after introducing a screening programme for early detection of treatable diabetic retinopathy. *Diabetic Med* 1993; 10:555-59
50. Backlund LB, Algyere PV, Rosenqvist U. New blindness in diabetes reduced by more than one third in Stockholm County. *Diabetic Med* 1997;14:732-740
51. Fedele D, Comi G, Coscelli C, Cucinotta D, Feldman EL, Ghirlanda G, Greene DA, Negrin P, Santeusano F. A multicenter study on the prevalence of diabetic neuropathy in Italy. Italian Diabetic Neuropathy Committee. *Diabetes Care* 1997;20:836-843
52. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28:956-962
53. Witte DR, Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Kempler P, Fuller JH. EURODIAB Prospective Complications Study Group. Risk factors for cardiac autonomic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005;48:164-167
54. Veglio M, Sivieri R, Chinaglia A, Scaglione L, Cavallo-Perin P. QT interval prolongation and mortality in type 1 diabetic patients: a 5-year cohort prospective study. Neuropathy Study Group of the Italian Society of the Study of Diabetes, Piemonte Affiliate. *Diabetes Care* 2000;23:1381-383.
55. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339:229- 234.
56. Bruno G, Merletti F, Boffetta P, Cavallo-Perin P, Barger G, Gallone G, Pagano G. Impact of glycaemic control, hypertension and insulin treatment on general and cause-specific mortality: an Italian population-based cohort of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42:297-301
57. Brun E, Nelson RG, Bennett PH, Imperatore G, Zoppini G, Verlato G, Muggeo M. Verona Diabetes Study. Diabetes duration and cause-specific mortality in the Verona Diabetes Study. *Diabetes Care* 2000;23:1119-23
58. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH: Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004;141:421-431
59. Stettler C, Allemann S, Juni P, Cull CA, Holman RR, Egger M, Krahenbuhl S, Diem P: Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J* 2006; 152:27-38
60. Lawson ML, Gerstein HC, Tsui E, Zinman B: Effect of intensive therapy on early macrovascular disease in young individuals with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 1999;22:B35-B39.
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;353:2643-2653
62. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2003;348:383-393
63. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:580-591
64. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance and metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1999;83:25F-29F.
65. Haffner SM. Management of dyslipidemia in adults with diabetes (American Diabetes Association position statement). *Diabetes Care* 1998;21:160-78
66. Stamler J, Vaccaro O, Neaton J, Wentworth D. Diabetes, other risk factors and 12-yr mortality for man screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434-44
67. Taskinen MR. Qualitative and quantitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes* 1992;41(Suppl 2):12-17
68. Costa J, et al. Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ* 2006;doi.10.1136/bmj. 38793.468449.AE
69. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators: Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18686 people with diabetes in 14 randomized trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 2008;371:117-125
70. ADA. Standards of Medical Care in Diabetes 2009. *Diabetes Care* 2009,32:S13-S61
71. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunnigake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone JN. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:720-32
72. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee. Canadian Diabetes

- Association 2008 Clinical Practice Guidelines for Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Canadian Journal of Diabetes* 2008;32(Suppl 1):S107-S1113
73. EASD/ESC. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary: The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes. *Eur Heart J* 2007;28:88-136
  74. UK Prospective Diabetes Study Group: Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 1998;317:703-713
  75. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B, Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S, HOT Study Group: Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. *Lancet* 1998;351:1755-1762
  76. Orchard TJ, Forrest KY, Kuller LH, Becker DJ; Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study: Lipid and blood pressure treatment goals for type 1 diabetes: 10-year incidence data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2001;24:1053-9
  77. Estacio RO, Schrier RW: Antihypertensive therapy in type 2 diabetes: implications of the appropriate blood pressure control in diabetes (ABCD) trial. *Am J Cardiol* 1998;82:9R-14R
  78. Schrier RW, Estacio RO, Esler A, Mehler P: Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes. *Kidney Int* 2002; 61:1086-97
  79. Krumme B, Blum U, Schwertfeger E, Flugel P, Hollstin F, Schollmeyer P, Rump EC et al. Diagnosis of renovascular disease by intra and extrarenal Doppler scanning. *Kidney International* 50:1288-1292, 1996
  80. Mastorakou I, Robbins ME, Bywaters T. Resistance and pulsatility Doppler indices: how accurately do they reflect changes in renal vascular resistance. *Br J Radiol* 66: 577-580, 1993
  81. Zierler RE, Bergelin RO, Isaacson JA, Strandness DE jr. Natural history of atherosclerotic renal artery stenosis: a prospective study with duplex ultrasonography. *J Vasc Surg* 19: 250-258, 1994
  82. Petersen LJ, Petersen JR, Tallaruuphus U, Ladefoged SD, Mehelsen J, Jensen HA. The pulsatility index and the resistive index in renal arteries: association with long term progression in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 12: 1376-1380, 1997
  83. Hollenbeck M. New diagnostic techniques in clinical nephrology. Colour coded duplex sonography for evaluation of renal transplants – tool or toy for the nephrologist? *Nephrol Dial Transplant* 9: 1822-1828, 1994
  84. Radermacher J, Mengel M, Ellis S, Stucht S, Hiss M, Schwarz A, Eisenberger U, Burg M, Luft FC, Gwinner W, Haller H. The renal arterial resistance index and renal allograft survival. *N Engl J Med* 349: 115-124, 2003
  85. Radermacher J, Chavan A, Bleck J, Vitzhum A, Stoess B, Gebel MJ, Galanski M, Koch KM, Haller H. Use of Doppler ultrasonography to predict the outcome of therapy for renal-artery stenosis. *N Eng J Med* 344: 410-417, 2001
  86. Radermacher J, Ellis S, Haller H. Renal resistance index and progression of renal disease. *Hypertension* 39: 699-703, 2002
  87. Pape L, Offner G, Enrich JH. Renal Arterial Resistance Index. *N Engl J Med* 349: 1573-1574, 2003
  88. Ishimura E, Nishizawa Y, Kawagishi T, Okuno Y, Kogawa K, Fukumoto S, et al. Intrarenal hemodynamic abnormalities in diabetic nephropathy measured by duplex Doppler sonography. *Kidney Int* 51: 1920-1927, 1997
  89. Matsumoto N, Ishimura E, Taniwaki H, Emoto M, Shoji T, Kawagishi T et al. Diabetes mellitus worsens intrarenal hemodynamic abnormalities in nondialyzed patients with chronic renal failure. *Nephron* 86: 44-51, 2000
  90. Platt JF, Rubin JM, Ellis JH. Diabetic nephropathy: evaluation with renal duplex Doppler US. *Radiology* 190: 343-346, 1994
  91. Okten A, Dinc H, Kul M, Kaya G, Can G. Renal duplex Doppler ultrasonography as a predictor of preclinical diabetic nephropathy in children. *Acta Radiol* 40: 246-249, 1999
  92. Nosadini R, Velussi M, Brocco E, Abaterusso C, Carraro A, Piarulli F, Morgia G, Satta A, Faedda R, Abhyankar A, Luthman H, Tomolo G. Increased renal arterial resistance predicts the course of renal function in type 2 diabetes with microalbuminuria. *Diabetes* 55: 234-238, 2006
  93. ADA Position Statement: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 29 (Suppl 1): S43-S48, 2006
  94. Seventh Report of the Joint Committee on Prevention, Detection, and Treatment of high blood pressure. *Hypertension* 42 (6): 1206-1252, 2003
  95. National Kidney Foundation: K/DOQI. Clinical Practice guidelines for chronic kidney disease: Definition and Classification of stages of chronic kidney disease. *Am J Kidney Disease* 39(2) Suppl, S46-S75, 2002
  96. ADA Position Statement: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 29 (Suppl 1): S21-S23, 2006

97. Froissart M, Rossert J, Jacquot C, paillard M, Houillier P. Predictive Performance Of the Modification of Diet in Renal Disease and Cockcroft-Gault Equations for Estimating renal Function. *J Am Soc Nephrol* 16: 763-773, 2005
98. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16 (1): 31-41, 1976
99. Hoffmann U, Edwards JM, Carter S, Goldman ML, Harley JD, Zaccardi MJ, Strandness DE jr. Role of Duplex scanning for the detection of atherosclerotic renal artery disease. *Kidney International* 39: 1232-1239, 1991
100. Taylor DC, Kattler MD, Moneta GL, Kohler TR, Kazmers A, Beach KW, Strandness DE jr. Duplex ultrasound scanning in the diagnosis of renal artery stenosis: a prospective evaluation. *J Vasc Surg* 7: 363-369, 1988
101. Olin JW, Piedimonte MR, Young JR, De Anna S, Grubb M, Childs MB. The utility of duplex ultrasound scanning of the renal arteries for diagnosis significant renal artery stenosis. *Ann Intern Med* 122: 833-838, 1995
102. Mancini M, Daniele S, Raffio T, Liuzzi R, Sabbatini M, Cianciaruso B, Ferrara LA, Salvatore M. Intra e interobserver variability of renal allograft ultrasound volume and resistive index measurements. *Radiol Med* 109: 385-394, 2005
103. SPSS user's guide Mc Graw Hill, New York, 1986
104. The Microalbuminuria Collaborative Study Group. Predictors of the development of microalbuminuria in patients with Type 1 diabetes mellitus: a seven-year prospective study. *Diabet Med* Nov 1999;16(11):918e25.
105. Writing team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of diabetes interventions and complications 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. *JAMA* 2003;290: 2159e67.
106. Wang PH, Lau J, Chalmers TC. Meta-analysis of effects of intensive blood glucose control on late complications of type 1 diabetes. *Lancet* 1993;341:1306e9.
107. Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D, Levy Z, Rachmani R. Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern Med* 1998;158(9):998e1004.
108. De Cosmo S, Lamacchia O, Rauseo A, Viti R, Gesualdo L, Pilotti A, et al. Cigarette smoking is associated with low glomerular filtration rate in male patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(11):2467e70.
109. Casas JP, Chua W, Loukogeorgakis S, Vallance P, Smeeth L, Hingorani AD, et al. Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2005; 66(9502):2026e33.
110. De Cosmo S, Trevisan R, Minenna A, Vedovato M, Viti R, Santini SA, et al. Insulin resistance and the cluster of abnormalities related to the metabolic syndrome are associated with reduced glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(2):432e4
111. Ohta Y, Fujii K, Arima H, Matsumura K, Tsuchihashi T, Tokumoto M, et al. Increased renal resistive index in atherosclerosis and diabetic nephropathy assessed by Doppler sonography. *J Hypertens* 2005;23(10):1905e11
112. Heine GH, Reichart B, Ulrich C, Kohler H, Girndt M. Do ultrasound renal resistance indices reflect systemic rather than renal vascular damage in chronic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(1):163e70
113. Maynard JE, Hammes LM, Kester FE. Mortality due to heart disease among Alaskan Natives 1955-65. *Public Health Reports* 1967; 82:714-720.
114. M, Bulkow LR, Gellin BG. Cardiac mortality in Alaska's indigenous and non-native residents. *Int J Epidemiology* 1993;22:62-71.
115. Middaugh JP. Cardiovascular deaths among Alaskan Natives 1980-86. *Am J Public Health* 1990;80:282-285.
116. Newman WP, Middaugh JP, Propst MT, Rogers DR. Atherosclerosis in Alaska Natives and non-natives. *Lancet* 1993;341:1056-1057.
117. Cutchins A, Roman MJ, Devereux RB, Ebbesson SO, Umans JG, Zhu J, Weissman NJ, Howard BV. Prevalence and correlates of subclinical atherosclerosis in Alaska Eskimos: the GOCADAN study. *Stroke* 2008;39:3079-3082.
118. Kaufman DJ, Roman MJ, Devereux RB, Fabsitz RR, MacCluer JW, Dyke B, Ebbesson SO, Wenger CR, Romanesko T, Comuzzie AG, Howard BV. Prevalence of smoking and its relationship with carotid atherosclerosis in Alaskan Eskimos of the Norton Sound region: the GOCADAN study. *Nicotine Tob Res* 2008;10:483-491.
119. Howard BV, Best L, Comuzzie A, Ebbesson SO, Epstein SE, Fabsitz RR, Howard WJ, Silverman A, Wang H, Zhu J, Umans J. C-Reactive Protein, Insulin Resistance, and Metabolic Syndrome in a

- Population with a High Burden of Subclinical Infection: Insights from the GOCADAN Study. *Diabetes Care* 2008;12: 2312-2314.
120. Rivellese AA, Patti L, Kaufman D, Zhu J, Annuzzi G, Vaccaro O, Ebbesson SO, Howard WJ, Riccardi G, Howard BV. Lipoprotein particle distribution and size, insulin resistance, and metabolic syndrome in Alaska Eskimos: the GOCADAN study. *Atherosclerosis* 2008;200:350-358.
  121. Howard BV, Devereux RB, Cole SA, Davidson M, Dyke B, Ebbesson SO, Epstein SE, Robinson DR, Jarvis B, Kaufman DJ, Laston S, MacCluer JW, Okin PM, Roman MJ, Romenesko T, Ruotolo G, Swenson M, Wenger CR, Williams-Blangero S, Zhu J, Saccheus C, Fabsitz RR, Robbins DC. A genetic and epidemiologic study of cardiovascular disease in Alaska Natives (GOCADAN): design and methods. *Int J Circumpolar Health* 2005;64:206-221.
  122. Ebbesson SO, Laston S, Wenger CR, Dyke B, Romenesko T, Swenson M, Fabsitz RR, MacCluer JW, Devereux R, Roman M, Robbins D, Howard BV. Recruitment and community interactions in the GOCADAN study. *Int J Circumpolar Health* 2006;65:55-64.
  123. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1977;20:1183-1197.
  124. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.
  125. Spayd RW, Bruschi B, Burdick BA, Dappen GM, Eikenberry JN, Esders TW, Figueras J, Goodhue CT, LaRossa DD, Nelson RW, Rand RN, Wu TW. Multilayer film elements for clinical analysis: applications to representative chemical determinations. *Clin Chem* 1978;24:1343-1350.
  126. Friedewald WT, Levy RI, Fredrikson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
  127. Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1994: 943-944.
  128. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennet DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem* 1992;38:1632-1638.
  129. Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab* 2002;48:171-180.
  130. Mora S, Szklo M, Otvos JD, Greenland P, Psaty BM, Goff DC Jr, O'Leary DH, Saad MF, Tsai MY, Sharrett AR. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007;192:211-217.
  131. Festa A, Williams K, Hanley AJ, Otvos JD, Goff DC, Wagenknecht LE, Haffner SM. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2005;111:3465-3472.
  132. Devereux RB, Roman MJ. Evaluation of cardiac and vascular structure by echocardiography and other noninvasive techniques. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 1995:1969-1985.
  133. Hulthe J, Wiklund O, Bondjers G, Wikstrand J. LDL particle size in relation to intima-media thickness and plaque occurrence in the carotid and femoral arteries in patients with hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 2000;248:42-52.
  134. Tzou WS, Douglas PS, Srinivasan SR, Chen W, Berenson G, Stein JH. Advanced lipoprotein testing does not improve identification of subclinical atherosclerosis in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Ann Intern Med* 2005;142:742-750.
  135. Liu ML, Ylitalo K, Nuotio I, Salonen R, Salonen JT, Taskinen MR. Association between carotid intima-media thickness and low-density lipoprotein size and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Stroke* 2002;33:1255-1260.
  136. Roche HM, Gibney MJ. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:317-324.
  137. Gianturco SH, Bradley WA. Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: cellular aspects. *Clin Cardiol* 1999;22(6 Suppl):II7-14.
  138. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulphonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). *JAMA* 1999, 281:2005-2012
  139. Standard of Medical Care in Diabetes – 2009 – A position statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* January 2009 32:S13-S61
  140. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. (UKPDS 34) *Lancet* 1998;352:854-865
  141. Parulkar A, Pendergrass ML, Granda-Ayala R, Lee TR, Fonseca VA. Non-hypoglycemic effects of thiazolidinediones. *Ann. Intern Med* 2001;134:61-71
  142. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004; 351:1106-1118

143. Goldeberg RB, Kendall DM, Deeg MA, et al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dislipidemia. *Diabetes Care* 2005; 28:1547-1554
144. Finegood DT, McArthur MD, Koywang D. et al. Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 2001;50:1021-1029
145. Ovalle F, Bell DSH. The effect of rosiglitazone versus insulin on the pancreatic beta-cell function of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:2585-2589
146. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Kravitz BG, Lachin JM, O'Neill MC, Zinman B, and Viberti G for the ADOPT Study Group. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Eng J Med* 2006;355:2427-43
147. Garber A, Klein E, Bruce, Sankoh S, Mohideen P. Metformin-glibenclamide versus metformin plus rosiglitazone in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin monotherapy. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2006;8:156-163
148. Charbonnel B, Schernthaner G, Brunetti P, Matthews DR, Urquhart R, Tan MH, Hanefeld M. Long-term efficacy and tolerability of add-on pioglitazone therapy to failing monotherapy compared with addition of gliclazide or metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005; 48:1093-104
149. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Dargie H, Komajda M, Gubb J, Biswas N, Jones NP. Rosiglitazone evaluated for cardiac outcomes and regulation of glycaemia in diabetes (RECORD): study design and protocol. *Diabetologia* 2005; 48:1726-1735
150. Magee MF, Isley WL: BARI2D Trial Investigators. Rationale, design, and methods for glycemic control in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes (BARI 2D) Trial. *Am J Cardiol*. 2006; 97:20G-30G
151. Evans JM, Ogston SA, Emslie-Smith A, Morris AD. Risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: a comparison of patients treated with sulfonylureas and metformin. *Diabetologia* 2006; 49:930-936
152. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJA et al. on behalf of the PROactive Investigators. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomized controlled trial. *Lancet* 2005; 366:1279-1289
153. Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, Le Winter M, Porte D, Semenkovich CF, Smith S, Young LH, Kahn R. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2004; 27:256-63
154. Solomon DH, Winkelmayr WC. Cardiovascular risk and the Thiazolidinediones .Dejà vu or all over again? *JAMA* 2008;1216-18, 2007
155. Nissen EM, Volsky k, Effect of rosiglitazone and risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356: 2457,2007
156. Lincoff AM, et al. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus . A metaanalysis of randomised trials. *JAMA* 298:1180, 2007
157. Riddle MC, Rosenstock J, Geric J, on behalf of the Insulin Glargine 4002 Study Investigators. The Treat-to-Target Trial. Randomised addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 26: 3080-3086, 2003
158. Brunn E et al Diabetes duration and cause-specific mortality in the Verona Diabetes Study. *Diabetes Care*. 2000 Aug;23(8):1119-23
159. Bo S, Ciccone G , Gancia R, Rosato R, Grassi G, Merletti F, Pagano GF. Mortality within the first 10 years of the disease in Type 2 diabetic patients. *NMCD* 2006; 16:8-12
160. McAlpine RR, Morris AD, Emslie-Smith A, James P, Evans MM . The annual incidence of diabetic complications in a population of patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabet Med* 2005; 22:348-52

## 6. APPENDICE: Pubblicazioni

### Lavori in estenso

Measurement of the intrarenal arterial resistance index for the identification and prediction of diabetic nephropathy. Masulli M, Mancini M, Liuzzi R, Daniele S, P P Mainenti, Vergara E, Genovese S, Salvatore M, Vaccaro O. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2008 Sep 19

Relationships Among Lipoprotein Subfractions and Early Carotid Atherosclerosis – The GOCADAN study. Maria Masulli, Lidia Patti, Gabriele Riccardi, Olga Vaccaro, Giovanni Annuzzi, Sven O.E. Ebbesson, Richard R. Fabsitz, James D. Otvos, Mary J. Roman, Hong Wang, Barbara.V. Howard, Angela A. Rivellese. (American Journal of Cardiology, in press)

### Abstracts

Evaluation of intrarenal resistance index for the identification and prediction of diabetic nephropathy

Masulli M, Mancini M, Liuzzi R, Daniele S, Mainenti P, Vergara E, Genovese S, Rivellese AA, Salvatore M, Riccardi G, Vaccaro O. Diabetologia, 2007

NMR lipoprotein subfractions and subclinical atherosclerosis - the GOCADAN Study

M. Masulli, A.A. Rivellese, L. Patti, O. Vaccaro, G. Annuzzi, G. Riccardi, S. Ebbesson1, D. Kaufman, B.V. Howard. Circulation 2008

Subfrazioni delle lipoproteine valutate con Risonanza Magnetica Nucleare e aterosclerosi subclinica: lo studio GOCADAN. M. Masulli, L. Patti, G. Riccardi, O. Vaccaro, G. Annuzzi, S. Ebbesson, H Wang, B.V. Howard, A.A. Rivellese. Il Diabete 2008

Nuclear Magnetic Resonance lipoprotein subfraction profile and early carotid atherosclerosis: the GOCADAN study. M. Masulli, L. Patti, G. Riccardi, O. Vaccaro, G. Annuzzi, S. Ebbesson, H Wang, B.V. Howard, A.A. Rivellese. Diabetologia 2008

Effetti sull'incidenza di eventi cardiovascolari dell'aggiunta di un tiazolidinedione rispetto ad una sulfonilurea in pazienti con diabete mellito tipo 2 non adeguatamente compensati con metformina (TOSCA.IT -Thiazolidinediones Or Sulphonylureas and Cardiovascular Accidents Intervention Trial). M. Masulli, O. Vaccaro, G. Riccardi. Atti del Convegno. La ricerca indipendente AIFA. 30 settembre 2008.