



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE NELLA TERAPIA DEL DIABETE: REPARIXIN, ANTAGONISTA DEI
RECCETTORI CXCR

Relatore:

Prof.ssa Maria Cristina Breschi

Candidata:

Alessandra Mazza

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

DIABETE MELLITO.....	1
DEFINIZIONE.....	1
CLASSIFICAZIONE.....	1
ALTRI TIPI SPECIFICI DI DIABETE.....	2
EPIDEMIOLOGIA.....	5
DIAGNOSI.....	5
DIABETE MELLITO DI TIPO 1.....	7
FISIOLOGIA E ANATOMIA PATOLOGICA.....	11
CLINICA.....	12
PREVENZIONE.....	14
TERAPIA.....	14
DIABETE MELLITO DI TIPO 2.....	16
DEFINIZIONE.....	16
EZIOLOGIA.....	16
FISIOPATOLOGIA.....	16
INSULINORESISTENZA.....	18
GLUCOTOSSICITÀ E LIPOTOSSICITÀ.....	20
CLINICA.....	21
PREVENZIONE.....	21
TERAPIA.....	22
GESTIONE DEI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI.....	25
COMPLICANZE DEL DIABETE MELLITO.....	26
COMPLICANZE ACUTE.....	26
COMPLICANZE CRONICHE.....	27

LA TECNICA DEL TRAPIANTO	29
TRAPIANTO DI PANCREAS COME ORGANO INTERO	29
TRAPIANTO DI ISOLE PANCREATICHE.....	30
IMMUNOSOPPRESSIONE.....	32
REPARIXIN	32
GENERALITÀ SUL FARMACO.....	32
CHEMOCHINE	33
REPARIXIN E DIABETE: STUDI PRECLINICI E CLINICI	34
CONCLUSIONI.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48

DIABETE MELLITO

DEFINIZIONE

Sotto la dizione di “diabete mellito (DM)” confluisce un gruppo di disturbi metabolici comuni che condividono il fenotipo dell’iperglicemia e che sono il risultato di una ridotta secrezione di insulina, di difetti dell’azione insulinica, o di entrambi. L’alterazione metabolica ad esso associata determina modificazioni fisiopatologiche secondarie a livello di vari organi ed apparati (occhio, rene, nervi, cuore e vasi sanguigni) (American Diabetes Association 2010) che gravano, in maniera consistente, sull’individuo affetto dalla patologia e sul sistema sanitario. Data la forte incidenza a livello mondiale, il DM rappresenta la causa principale di morbilità e mortalità.

CLASSIFICAZIONE (tabella 1)

Mentre i precedenti criteri di classificazione erano l’età di esordio o il tipo di terapia adottata, attualmente la classificazione nel DM è realizzata sulla base del meccanismo patogenetico attraverso il quale insorge l’iperglicemia. Si divide in due vaste categorie: diabete di tipo 1 e diabete di tipo 2. Mentre il DM di tipo 1 è la conseguenza di una carenza di insulina totale o quasi totale, il DM di tipo 2 si configura come un gruppo eterogeneo di alterazioni caratterizzate da gradi variabili di insulinoresistenza, alterata secrezione insulinica e aumentata produzione di glucosio. Concorrono a determinare il fenotipo dell’iperglicemia nel DM di tipo 2 diversi difetti genetici e metabolici nell’azione e/o secrezione insulinica, con importanti potenziali implicazioni terapeutiche se si considera l’attuale disponibilità di farmaci che agiscono proprio su alterazioni metaboliche specifiche. Entrambi i tipi di diabete sono preceduti da un’alterata omeostasi glucidica e, nel DM di tipo 2, questa fase è classificata come IFG, “*impaired fasting glucose*” (alterata glicemia a digiuno) o come IGT, “*impaired glucose tolerance*” (alterata tolleranza glucidica).

Con l’attuale classificazione del DM, i termini diabete mellito insulino-dipendente e diabete mellito non insulino-dipendente risultano superati in virtù del fatto che molti soggetti con DM di tipo 2, alla fine, necessitano del trattamento insulinico per il controllo della glicemia. Inoltre, l’età non compare come criterio nel nuovo sistema di classificazione per due ragioni:

- il DM di tipo 1 può insorgere a qualsiasi età, sebbene si manifesti con più frequenza prima dei 30 anni;

- il DM di tipo 2, che più tipicamente si manifesta con l'avanzare degli anni, viene oggi diagnosticato con maggiore frequenza nei giovani adulti, in particolare negli adolescenti obesi e nei bambini.

Storicamente, proprio per la mancanza di produzione di insulina, il diabete mellito tipo 1 era associato ad una diagnosi di severo dimagrimento. Tuttavia, con la diffusione in tutto il mondo del sovrappeso, c'è stato un aumento dell'incidenza del diabete mellito di tipo 2, soprattutto negli adolescenti, rendendo il diabete tipo 2 comune quanto il tipo 1 nei soggetti più giovani (Liberatore et al. 2008; Teles et al. 2011).

Types \ Stages	Normoglycemia	Hyperglycemia			
	Normal glucose regulation	Impaired Glucose Tolerance or Impaired Fasting Glucose (Pre-Diabetes)	Diabetes Mellitus		
			Not insulin requiring	Insulin requiring for control	Insulin requiring for survival
Type 1*	←	→	→	→	→
Type 2	←	→	→	→	→
Other Specific Types**	←	→	→	→	→
Gestational Diabetes **	←	→	→	→	→

Figura 1—Alterazioni glicemiche: tipi eziologici e stadi. Da American Diabetes Association, 2010.

ALTRI TIPI SPECIFICI DI DIABETE

Sono dovuti a:

- **DIFETTI GENETICI DELLA β -CELLULA**

Sono delle forme di diabete note come “Diabete giovanile a insorgenza nell’età matura” (Maturity Onset Diabetes of the Young, MODY), cioè diabete ad esordio come nell’età adulta che si manifesta nel giovane. Si tratta di un sottotipo di DM caratterizzato da ereditarietà autosomica dominante, insorgenza precoce dell’iperglicemia (solitamente a meno di 25 anni di età) e alterazione della secrezione insulinica, in assenza di difetti dell’azione insulinica (American Diabetes Association 2010).

<p>I. Diabete di tipo 1 (distruzione delle cellule β, che solitamente determina insufficienza insulinica assoluta)</p> <p>A. Immunomediato</p> <p>B. Idiopatico</p> <p>II. Diabete di tipo 2 (può variare da una forma con predominante insulino-resistenza e carenza insulinica relativa ad una forma con predominante difetto secretorio e insulino-resistenza)</p> <p>III. Altri tipi specifici di diabete</p> <p>A. Difetti genetici della funzione β-cellulare caratterizzati da mutazioni a livello di:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cromosoma 12, HNF-1α (MODY 3) 2. Cromosoma 7, glucochinasi (MODY 2) 3. Cromosoma 20, HNF-4α (MODY 1) 4. Cromosoma 13, fattore del promoter insulinico (IPF) 1 (MODY 4) 5. Cromosoma 17, HNF-1β (MODY 5) 6. Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY 6) 7. DNA mitocondriale 8. Altri <p>B. Difetti genetici nell'azione dell'insulina:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Insulinoresistenza di tipo A 2. Leprecaunismo 3. Sindrome di Rabson-Mendenhall 4. Diabete lipotrofico 5. Altri <p>C. Malattie del pancreas esocrino: pancreatite, trauma/pancreatectomia, neoplasia, fibrosi cistica, emcromatosi, pancreatopatia fibrocalcolosa, altre.</p> <p>D. Endocrinopatie: acromegalia, sindrome di Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, ipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma, altre</p> <p>E. Indotto da farmaci: vacor, pentamidina, acido nicotinic, glucorticoidi, ormoni tiroidei, diazossido, agonisti β-adrenergici, tiazidici, dilantin, interferone α, altri.</p> <p>F. Infezioni: rosolia congenita, citomegalovirus, altre.</p> <p>G. Forme rare di diabete immunomediato: sindrome "dell'uomo rigido", anticorpi antirecettore dell'insulina, altre.</p> <p>H. Altre sindromi genetiche talvolta associate a diabete: sindrome di Down, sindrome di Klinefelter, sindrome di Turner, sindrome di Wolfram, atassia di Friedrich, corea di Huntington, sindrome di Laurence-Moon-Biedl, distrofia miotonica, porfiria, sindrome di Prader-Willi, altre.</p> <p>IV. Diabete mellito gestazionale (DMG)</p>
--

Tabella 1- Classificazione eziologica del diabete mellito.

Da American Diabetes Association, 2008.

queste ultime legate ad estrema insulinoresistenza e scarsa sopravvivenza post-natale) (American Diabetes Association 2010).

- MALATTIE DEL PANCREAS ESOCRINO

Qualsiasi processo che colpisca in maniera estesa il pancreas può causare diabete mellito. Le β -cellule vengono danneggiate e, conseguentemente, si ha un'alterazione della secrezione insulinica (sono pancreatiti, traumi, infezioni, pancreasectomie, neoplasie) (American Diabetes Association 2010).

- ENDOCRINOPATIE

L'ormone della crescita, il cortisolo, il glucagone e le catecolamine agiscono da antagonisti dell'azione insulinica e un eccesso di questi ormoni, come si verifica nell'acromegalia,

Sono state identificate 7 anomalie genetiche e a titolo di esempio si riporta il difetto che si presenta nel MODY-2 in cui si ha una mutazione del gene che codifica per la glucochinasi (American Diabetes Association 2010). La glucochinasi è un'enzima che converte il glucosio in glucosio-6-fosfato e questo stimola la secrezione di insulina. La mutazione fa sì che sia necessario un più alto livello di glucosio circolante per avere una normale secrezione insulinica.

- DIFETTI GENETICI DELL'AZIONE INSULINICA

Sono delle forme rare di diabete dovute a mutazioni del recettore insulinico (alcuni esempi sono la sindrome della resistenza insulinica di tipo A, la sindrome di Rabson-Mendenhall e il leprecaunismo,

sindrome di Cushing, glucagonoma e feocromocitoma, può causare il diabete (American Diabetes Association 2010).

- **DIABETE INDOTTO DA FARMACI O AGENTI CHIMICI**

Molti farmaci, ormoni e sostanze chimiche possono alterare l'azione insulinica. Più che causare il diabete, probabilmente lo slatentizzano in soggetti predisposti, affetti da insulinoresistenza. Alcune tossine, come il Vacor, veleno per ratti, e la pentamidina, per via endovenosa, possono distruggere in maniera permanente le cellule pancreatiche. Pazienti trattati con interferone α hanno riportato lo sviluppo del diabete, la comparsa di anticorpi diretti contro le isole e, in alcuni casi, severa insulino-deficienza (American Diabetes Association 2010).

- **INFEZIONI,**

ad esempio rosolia congenita, citomegalovirus, virus coxsackie, parotite (American Diabetes Association 2010).

- **FORME NON COMUNI DI DIABETE IMMUNO-MEDIATO**

Nella sindrome della resistenza insulinica di tipo B si sviluppano anticorpi anti-recettore insulinico che bloccano il legame dell'insulina al suo recettore, causando diabete. È una forma rara di estrema insulinoresistenza. Un ulteriore esempio è rappresentato dalla sindrome "dell'uomo rigido", un disordine autoimmune che colpisce il SNC e provoca spasmi muscolari e rigidità. Di solito sono presenti alti livelli di anti-glucosaminidasi (anti-GAD) (American Diabetes Association 2010).

- **SINDROMI GENETICHE ASSOCIATE AD UN'AUMENTATA INCIDENZA DI DIABETE**

Numerose sindromi genetiche sono correlate ad un aumento di incidenza di DM. Tra queste si annovera la sindrome di Wolfram, una patologia che si caratterizza per diabete insulino-privo (all'autopsia non ci sono cellule β) e per altre manifestazioni come diabete insipido (con poliuria), ipogonadismo, atrofia ottica e sordità (American diabetes Association 2010).

- **DIABETE MELLITO GESTAZIONALE**

Per molti anni, il diabete mellito gestazionale è stato definito come un'intolleranza al glucosio di qualsiasi entità con esordio, o prima individuazione, durante la gravidanza (American Diabetes Association 2010; Rani et al. 2016). Si tratta di un diabete diagnosticato nel secondo o terzo trimestre di gravidanza e non è chiaramente né diabete di tipo 1 né diabete di tipo 2 (American Diabetes Association 2016).

La resistenza insulinica è correlata alle alterazioni metaboliche (molteplici variazioni

ormonali, come alti livelli di progesterone) che si instaurano nell'ultimo periodo di gravidanza. L'aumentato fabbisogno di insulina che ne deriva può portare ad alterata tolleranza glucidica o diabete.

Il diabete mellito gestazionale (DMG) è presente in circa il 7% delle donne gravide negli Stati Uniti. La maggior parte delle donne recupera la normale tolleranza glucidica dopo il parto, ma conserva un rischio sostanziale (dal 35 al 60%) di sviluppare DM nei successivi 10-20 anni. Il diabete gestazionale è associato ad un aumento di morbilità e mortalità perinatale e di casi di complicanze materne, come l'ipertensione e un più frequente ricorso a parto cesareo. Tali complicanze possono essere ridotte dal suo riconoscimento, dalla terapia nutrizionale e, nei casi in cui risulti necessaria, dalla terapia insulinica.

EPIDEMIOLOGIA

Si stima che il numero di soggetti affetti da diabete mellito nel mondo nel 2011 era pari a 366 milioni, che rappresenta circa il 6% della popolazione, e che nel 2030 supererà i 552 milioni (Poradzka et al. 2013). Per i prossimi due decenni si prevede un allarmante incremento nella popolazione affetta da diabete di tipo 2, sia nei Paesi sviluppati che nei Paesi in via di sviluppo (Shahani et al. 2015). L'incidenza del diabete mellito di tipo 1 è aumentata globalmente e drammaticamente negli ultimi 50 anni (Phillips et al. 2016) e nei bambini aumenta dal 3 al 5% ogni anno in tutto il mondo (DIAMOND Project Group 2006; Krzewska et al. 2016).

DIAGNOSI

La scelta del test diagnostico più idoneo deve essere fatta valutando la semplicità di esecuzione, la sensibilità e specificità, il costo e il fastidio per il paziente. Il diabete è diagnosticato attraverso la valutazione di due parametri, il glucosio plasmatico- sia in condizioni di digiuno (FPG) che a due ore dalla somministrazione di glucosio per via orale (OGTT)- e l'emoglobina glicata (International Expert Committee 2009; American Diabetes Association 2014). Gli stessi test possono essere utilizzati per la diagnosi di prediabete (American Diabetes Association 2016).

-glicemia a digiuno: test consigliato nelle linee guida dell'American Diabetes Association (ADA). È il più praticato. Consiste nel fare un prelievo di sangue venoso dopo almeno 8 ore di digiuno. Deve essere programmato in relazione al periodo di digiuno, ma è abbastanza tollerato dal paziente;

- **controllo casuale della glicemia:** test che può essere fatto in qualsiasi momento della giornata, indipendentemente dal pasto. Non deve essere programmato, ma risente del cibo ingerito nelle ore precedenti;
- **test da carico orale di glucosio (OGTT):** test che prevede l'ingestione di 75 g di glucosio per via orale e l'esecuzione di più prelievi in un periodo di 2 ore. Per eseguire il test il paziente deve stare a riposo, non deve fumare e deve aver seguito una dieta con almeno 150 g di carboidrati al giorno nei giorni precedenti il test;
- **test dell'emoglobina glicata (HbA1c).**

La tolleranza al glucosio può essere valutata tenendo conto della glicemia plasmatica a digiuno (*fasting plasma glucose*, FPG), della risposta al test di carico orale con glucosio o dell'emoglobina glicata (HbA1c). Valori soglia per definire una normale tolleranza glucidica sono:

- una FPG inferiore a 5,6mmol/L o 100mg/dl;
- un glucosio plasmatico inferiore a 11,1mmol/L o 140 mg/dl, in seguito a carico orale;
- una HbA1c inferiore al 5,6%.

FPG \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L). Il digiuno è definito come una condizione in cui non c'è introito calorico per almeno 8 ore;

oppure

2-h PG \geq 200 mg/dL (11.1mmol/L) durante un test OGTT;

oppure

A1C \geq 6,5% (48 mmol/mol);

oppure

in un paziente con i classici sintomi di iperglicemia o crisi iperglicemiche, una misurazione casuale di glucosio plasmatico \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L).

Tabella 2—Criteri per la diagnosi del diabete. Modificata da American Diabetes Association, 2010.

Un'alterata tolleranza glucidica si caratterizza per valori di glicemia a digiuno compresi tra 100 e 125 mg/dl (in questo caso si parla di IFG), una glicemia dopo carico orale di glucosio tra 140 e 199 mg/dl (condizione nota come IGT) e valori di HbA1c tra 5,7 e 6,4%. In questi tre casi si ha un rischio più elevato di sviluppare progressivamente un diabete di tipo 2 e un aumentato rischio cardiovascolare. Per indicare questa situazione di anomala tolleranza al

glucosio si possono utilizzare il termine “*prediabete*”, oppure le espressioni “*incrementato rischio di diabete*” o “*iperglicemia intermedia*”. Secondo quanto raccomandato dall’ADA, ogni tre anni in tutti gli individui di età superiore ai 45 anni e, in età giovanile, nei soggetti in sovrappeso con un BMI>25 Kg/m² e fattori di rischio aggiuntivi per il diabete, è necessario eseguire uno screening al fine di porre una diagnosi definitiva di DM (American Diabetes Association 2016).

DIABETE MELLITO DI TIPO 1

CLASSIFICAZIONE, PATOGENESI ED EZIOLOGIA

Il DM di tipo 1 si configura come il risultato di interazioni tra fattori genetici, ambientali e immunitari, che portano alla distruzione delle cellule β pancreatiche e ad una carenza di insulina. Si realizza una perdita progressiva immuno-mediata delle cellule insulari che secernono insulina (Ziegler et al. 2010), verso le quali si dirige la distruzione nella maggior parte dei pazienti affetti da questa forma di diabete. Questo è il DM di tipo 1 immuno-mediato che interessa il 90% dei soggetti. Alcune forme di DM di tipo 1, invece, sono ad eziologia sconosciuta e note con il termine “*diabete di tipo 1 idiopatico*”. Descritte in maniera prevalente in Asia ed Africa, presentano un’insulinopenia di grado variabile, sono associate a frequenti episodi di chetoacidosi e caratterizzate da assenza di marker di autoimmunità (American Diabetes Association 2010).

Di recente è stata identificata una forma di diabete autoimmune che esordisce in età adulta, generalmente sopra i 30 anni, ed è conosciuta con l’acronimo LADA, ossia “*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*”. Risulta meno grave rispetto al DM di tipo 1 e non richiede il trattamento con insulina per almeno 6 mesi successivi all’esordio clinico. Spesso è diagnosticato come tipo 2, sia per l’età di comparsa che per la sua iniziale risposta agli ipoglicemizzanti orali, ma le differenze rispetto al tipo 2 sono la mancanza di insulinoresistenza e la positività per i marker di autoimmunità (Leslie et al. 2006).

Gli individui con predisposizione genetica verso il DM di tipo 1, alla nascita, presentano una normale massa di cellule β ma, a causa di un processo autoimmune che si verifica nell’arco di mesi o anni, cominciano a perderle. Si ritiene che questo meccanismo autoimmune venga scatenato da uno stimolo infettivo o ambientale e sia poi sostenuto da una molecola specifica della cellula β . Poiché la massa cellulare si riduce, la secrezione di insulina

decrese in maniera progressiva, mentre la tolleranza glucidica si conserva e, per questo motivo, le manifestazioni cliniche del diabete non sono evidenti fino alla fase in cui la maggior parte delle cellule β non viene distrutta (Pozzilli et al. 2009; Powers, 2012). In questo stadio, alcune cellule β risultano ancora funzionanti, ma non sufficienti per il mantenimento della tolleranza glucidica. Si può instaurare una fase detta di “*luna di miele*” nei primi 1-2 anni dall’insorgenza del diabete, durante la quale si può ottenere il controllo glicemico con dosi modeste di insulina o, più raramente, persino senza insulina. È una fase abbastanza breve della produzione endogena di insulina da parte delle cellule residue che si arresta nel momento in cui le cellule vengono distrutte dal processo autoimmune con carenza di insulina (Pozzilli et al. 2009). Perciò, la carenza di insulina, insulinopenia, è una condizione che può essere considerata irreversibile sebbene, nelle fasi immediatamente successive alla diagnosi, la terapia fa sì che le cellule β rimaste riprendano per breve tempo a funzionare, con una riduzione della tossicità da glucosio.

Considerazioni genetiche

La predisposizione genetica allo sviluppo del DM di tipo 1 coinvolge numerosi geni. Tuttavia, non è chiaro come i geni vadano ad influenzare lo sviluppo dell’autoimmunità e neppure quale sia lo stadio della malattia in cui intervengano. In virtù dei molteplici ruoli dei geni HLA nella selezione delle cellule T, nella presentazione dell’antigene e nella risposta immunitaria, il complesso HLA influenza sia il rischio di sviluppare la malattia che la sua progressione (Ziegler et al. 2010). Nella regione HLA del cromosoma 6 è, perciò, localizzato il gene determinante la suscettibilità al DM di tipo 1. Alcuni polimorfismi all’interno del complesso sono responsabili del 40-50% del rischio genetico di sviluppo di DM di tipo 1. Questa regione è costituita da geni che codificano per le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC) le quali, presentando l’antigene ai linfociti T helper, sono coinvolte nell’innesco della risposta immune. I soggetti che sviluppano DM di tipo 1 hanno alleli HLA DR3, DR4, o DQ2, DQ8 che sembrano correlati ad una più alta percentuale di autoimmunità diretta contro la cellula β (Ziegler et al. 2010; Pociot et al. 2016) Nel 90% circa dei pazienti europei con DM di tipo 1, infatti, si riscontrano gli alleli HLA DR3 o DR4 ed in particolare, la presenza nello stesso soggetto degli alleli HLA sia DR3 che DR4, è stata associata ad un rischio più alto di sviluppare la malattia per via di un effetto sommatorio. Il rischio di sviluppare la malattia in un bambino che ha un fratello affetto dal diabete di tipo 1 cresce da poco più dello 0% al 30% in relazione al suo genotipo

HLA di classe II (Aly et al. 2006).

Tra i 20 differenti loci genetici individuati che rendono suscettibili al DM di tipo 1 ci sono anche dei geni che sembrano proteggere dallo sviluppo della malattia (HLA DR2 e DR7). Così, un bambino che ha storia familiare di diabete di tipo 1 e alleli HLA che conferiscono protezione mostra un rischio ridotto di manifestare la patologia rispetto ad un altro bambino con storia familiare simile, ma che non presenta l'allele protettivo (Ziegler et al. 2010). Inoltre, nonostante il rischio di sviluppare il DM di tipo 1 risulti aumentato di 10 volte nei parenti degli affetti, la possibilità è comunque relativamente bassa, del 3-4% se si ha un genitore affetto da diabete di tipo 1 e del 5-15% se è un fratello o una sorella ad esserne affetto. Dunque, in genere, la maggior parte dei pazienti con diabete di tipo 1 non ha un parente di primo grado con la patologia. Molti geni che non rientrano nel complesso HLA sono associati allo sviluppo del diabete di tipo 1. Ad esempio, polimorfismi a livello della regione promoter del gene dell'insulina (INS) che si trova sul cromosoma 11 determinano una certa predisposizione allo sviluppo del DM1 (Eringsmark Regnéll et al. 2013).

Altri geni associati all'attivazione dei linfociti T sono stati identificati negli ultimi anni: il cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) e il PTPN22. Il CTLA-4 è un regolatore negativo dell'attivazione dei linfociti T. Un particolare allele di CTLA-4 fa sì che diminuiscano le cellule T regolatorie nel DM di tipo 1 ed è quindi un locus di suscettibilità, come anche una variante di PTPN22, che codifica per LYP, un altro soppressore dell'azione delle cellule T. Una variazione genetica nella PTPN22, inoltre, è associata sia al diabete di tipo 1 che ad altre malattie autoimmuni come, ad esempio, l'artrite reumatoide (Begovich et al. 2004) perciò le varianti che coinvolgono altri geni e cromosomi rispetto al complesso HLA non risultano così utili nel predire il rischio di sviluppo della malattia (Ziegler et al. 2010).

Marker immunologici

L'idea dell'origine autoimmune del DM di tipo 1 è stata avanzata negli anni '70 da Bottazzo e Doniach e la definizione della malattia come autoimmune è legata proprio allo sviluppo di anticorpi circolanti diretti contro proteine delle cellule β (Christie et al. 1992; Christie et al. 1993; Pietropaolo et al. 2012; Lernmark et al. 2013; Roep et al. 2014; Jaber-Douraki et al. 2014).

Nel DM di tipo 1 la risposta autoimmune riguarda, perciò, non solo la componente cellulo-mediata, come dimostrato dalla citotossicità mediata da linfociti T contro la β -cellula, ma anche la componente anticorpale documentata per l'appunto dai cosiddetti ICA, "islet cell

autoantibodies". Questi comprendono l'insulina stessa che è l'antigene che per primo determina la risposta anticorpale, la proteina fosfatasi, IA2, lo specifico trasportatore per lo zinco, ZnT8 e l'enzima citosolico glutammato decarbossilasi, GAD (Noel et al. 2014). I pazienti, spesso, possono presentare lo sviluppo di anticorpi diretti contro più autoantigeni e non si sa se questi anticorpi siano veramente capaci di causare la patologia o se sono generati in un secondo momento e siano, perciò soltanto dei marker di un processo patologico già esistente (Noel et al. 2014). Nonostante ci siano più evidenze a favore di questa seconda ipotesi, bisogna comunque considerare che alcuni individui sviluppano gli autoanticorpi senza manifestare la malattia. Non esiste, perciò, una assoluta correlazione tra questi due aspetti (Noel et al. 2014).

Chiaro è che la presenza di più autoanticorpi è un indice predittivo dello sviluppo della patologia nei soggetti predisposti (Nokoff et al. 2013; Bonifacio et al. 2014) e che i soggetti non diabetici che mostrano tre o più autoanticorpi circolanti presentano un rischio superiore di sviluppare la patologia (Noel et al. 2014). Il dosaggio degli autoanticorpi, perciò, consente di individuare soggetti non diabetici che sono, però, a rischio di sviluppare il DM di tipo 1. Gli ICA si riscontrano nella maggior parte degli individui (>85%) con diagnosi di DM di tipo 1 di recente insorgenza, in una minoranza di individui con recente diagnosi di DM di tipo 2 (dal 5 al 10%) e, soltanto occasionalmente, in donne con diabete mellito gestazionale (5-10%). Sono, inoltre, presenti nel 3-4% dei parenti di primo grado degli individui affetti da DM di tipo 1 che, oltre al rilievo di un'alterata secrezione insulinica dopo test di tolleranza glucidica per via endovenosa, mostrano un rischio superiore al 50% di sviluppare DM di tipo 1 entro 5 anni. Poiché con l'inizio della terapia insulinica i livelli di questi anticorpi si riducono, essi si sono dimostrati utili soltanto nella fase preclinica (positivi prima dell'esordio) e nel valutare il rischio dei parenti di primo grado di sviluppare la malattia (Taplin et al. 2008).

In modo particolare, si conosce la prevalenza degli anticorpi anti-insulina (IAA) nei bambini; si è rivelato un decremento degli anticorpi anti-tirosinchinasi (IA2) dopo la diagnosi; gli anti-glucosaminidasi, invece, persistono a 10 anni dalla comparsa del DM di tipo 1.

Fattori ambientali

Il fatto che sia solo del 30-50% la concordanza nello sviluppo del DM di tipo 1 nei gemelli monozigoti ha fatto presupporre la compartecipazione di altri fattori nell'eziopatogenesi della malattia. La tolleranza da parte del sistema immunitario nei confronti delle cellule β

pancreatiche può venire meno con l'esposizione a fattori ambientali che determinano la formazione di peptidi ibridi i quali poi agiscono da neoautoantigeni (Rewers et al. 2016). Tra i possibili eventi ambientali si possono menzionare i virus Coxsackie, della rosalia, della varicella, Retrovirus, Citomegalovirus e di Epstein Barr, le proteine del latte vaccino (BSA, ossia Bovin Serum Albumin e β -lattoglobulina), le nitrosammine, contenute nei cibi conservati o affumicati, agenti chimici, come i pesticidi e i vaccini. Da un recente studio condotto su bambini asiatici è, inoltre, emerso che bassi livelli sierici di vitamina D possano determinare una più alta incidenza e un esordio più precoce della patologia (Rasoul et al. 2016).

FISIOLOGIA E ANATOMIA PATOLOGICA

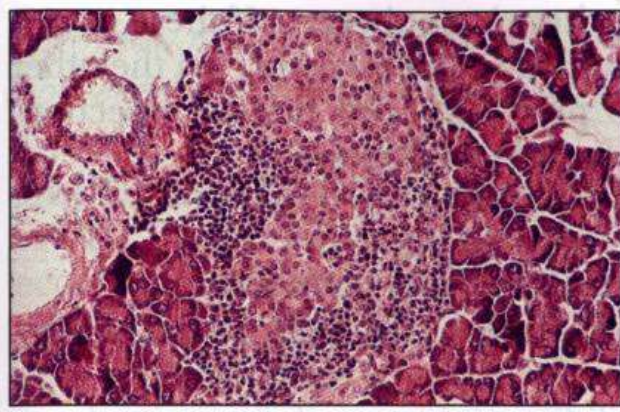


Figura 2 -Infiltrazione linfocitaria delle isole di Langerhans (insulite). Da *Immunologia Clinica*, 1991.

Il dogma afferma che le cellule insulari dei pazienti affetti dal diabete di tipo 1 siano infiammate anche se, in pratica, questo fenomeno si è potuto osservare meno frequentemente di quanto si immagini (Noel et al. 2014). Riguarda principalmente i soggetti che sono affetti da diabete di recente diagnosi e la sua frequenza diminuisce con la

durata del diabete sia perché il processo infiammatorio si attenua con la progressiva distruzione delle cellule β , sia perché dall'osservazione di sezioni di pancreas in due dimensioni non sono visibili quelle cellule immunitarie che si trovano sopra o sotto il piano (Noel et al. 2014).

Nella malattia, con un processo denominato insulite, avviene l'infiltrazione delle cellule pancreatiche da parte dei linfociti. Recenti esperimenti hanno mostrato che l'infiltrato è costituito prevalentemente da linfociti e che contiene cellule T CD8+ come principali mediatori citotossici; anche altre cellule immunitarie sono presenti nel quadro infiammatorio, come le cellule T CD4+, le cellule B e i macrofagi (Willcox et al. 2009).

Recentemente è stato scoperto che anche il pancreas esocrino risulta arricchito di entrambi i linfociti e di neutrofili (Valle et al. 2013; Rodriguez-Calvo et al. 2014) e da alcuni studi è emersa la presenza di cellule NK nell'infiltrato insulare (Dotta et al. 2007).

Una volta che tutte le cellule β sono state distrutte, si arresta il processo infiammatorio, si creano isole atrofiche e scompaiono quasi tutti i marker immunologici. Alcuni studi sul processo autoimmune nell'uomo e in alcuni modelli animali con diabete mellito di tipo 1 hanno permesso di identificare alcune anomalie, sia nella risposta umorale che in quella cellulare del SI. Si tratterebbe di: -autoanticorpi contro le cellule insulari; -linfociti attivati nelle isole, nei linfonodi peripancreatici e nel circolo sistemico; -linfociti T che sono stimolati alla proliferazione da proteine insulari; -rilascio di citochine durante il processo di insulite. Alcune citochine, quali il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), l'interferone γ e l'interleuchina 1 (IL-1) esercitano un effetto tossico sulle cellule β , nei confronti del quale queste ultime sono particolarmente sensibili.

I meccanismi di morte della cellula β non sono ancora del tutto chiari, ma si pensa siano dovuti alla formazione di metaboliti dell'ossido nitrico, all'apoptosi e alla citotossicità mediata dai linfociti T CD8+.

La distruzione delle cellule β è mediata dai linfociti T in quanto gli autoanticorpi insulari non riescono generalmente ad interagire con la superficie cellulare delle cellule insulari e a trasferire il diabete mellito agli animali.

Le molecole delle isole pancreatiche che diventano i bersagli del processo autoimmune sono l'insulina, la decarbossilasi dell'acido glutammico, ICA-512/IA (omologo alle fosfatasi tirosiniche) e un trasportatore dello zinco (ZnT-8) che è specifico delle cellule β . Tuttavia, non è chiaro come le cellule β vengano selettivamente distrutte perché nessuno degli autoantigeni è specifico di questo tipo di cellule.

Secondo le teorie attuali, il processo autoimmune inizialmente è indirizzato contro una molecola della cellula β e successivamente coinvolgerebbe altre molecole insulari, provocando la distruzione delle cellule β e creando, in questo modo, una serie di autoantigeni secondari (Powers, 2012).

CLINICA

Prima che si manifesti clinicamente, il DM di tipo 1 presenta un periodo asintomatico che ha durata variabile in cui le cellule β pancreatiche vengono distrutte determinando la perdita della secrezione insulinica, la quale in ultimo risulta in alti livelli di glucosio plasmatico e nei tipici sintomi clinici (Daneman et al. 2006; Atkinson et al. 2014). Dall'aggressività del periodo asintomatico dipende il tipo di esordio che può essere acuto,

oppure può manifestarsi nell'arco di parecchie settimane o mesi.

Nei soggetti più giovani, in seguito ad eventi scatenanti come infezioni, stress e interventi chirurgici possono manifestarsi chetoacidosi, poliuria, polidipsia, astenia, nausea e vomito (International diabetes federation 2007). Quando l'esordio è subdolo, è preceduto da un decremento di peso che si associa a polifagia. La perdita di peso all'inizio è dovuta alla perdita idrica e alla riduzione delle riserve di glicogeno, poi si ha riduzione del grasso sottocutaneo e della massa muscolare, in quanto gli amminoacidi vengono impiegati per sintetizzare i corpi chetonici. L'insulinopenia caratterizza questo tipo di diabete ed è l'aspetto principale che ne determina il quadro clinico. L'insulina ha azione sul metabolismo dei lipidi e degli amminoacidi, oltre che dei glucidi e l'insieme delle attività che svolge sui vari tessuti determina l'abbassamento dei valori glicemici. L'insulinopenia e la risposta da parte del glucagone, delle catecolamine, del cortisolo e dell'ormone della crescita determinano l'instaurarsi dell'iperglicemia, sia perché il glucosio non viene utilizzato dai tessuti periferici, sia per l'aumentata glicogenolisi e gluconeogenesi (Atkinson et al. 2001). Si ha il ricorso alla lipolisi per la produzione di energia e la liberazione di acidi grassi liberi che nel fegato sono convertiti in corpi chetonici (acido β -idrossibutirrico, acido acetoacetico, acetone): determinano la riduzione del pH ematico ed acidosi metabolica. Iperglicemia e chetonuria causano poliuria (vengono prodotte abbondanti quantità di urine e si verifica un aumento della frequenza della minzione) e disidratazione con perdita di elettroliti e polidipsia (aumento della sensazione di sete). La riduzione del volume plasmatico porta ad ipotensione posturale che, se si associa al generale catabolismo e alla perdita di potassio, porta a debolezza e astenia. La perdita di potassio determina la comparsa di crampi muscolari e dolori all'addome, oltre al rischio di aritmie. La chetoacidosi (una condizione con cui a volte la malattia esordisce specialmente in giovane età) può portare a nausea, vomito e anoressia, aggravando la disidratazione e l'iperosmolarità. Se non si adotta una adeguata terapia, i meccanismi compensatori diventano insufficienti e la chetoacidosi può evolvere in shock ipovolemico caratterizzato da ipotermia, ipotensione, tachicardia, alterazioni dello stato di coscienza e coma (Shaltout et al. 2016).

PREVENZIONE

Allo scopo di ritardare o prevenire il diabete si sono rivelati efficaci nei modelli animali alcuni interventi diretti su:

- SI, come l'immunosoppressione, la delezione selettiva di sottopopolazioni di linfociti T e l'induzione della tolleranza immunologica verso le proteine insulari; una terapia diretta sul SI, infatti, può essere intrapresa al fine di prevenire o invertire la perdita delle cellule β pancreatiche (Li et al. 2016).
- citochine citotossiche, in modo da prevenire la morte delle cellule insulari;
- isole, in modo da aumentare la loro resistenza alla distruzione.

La maggior parte di tali interventi, tuttavia, non si è rivelato efficace nella prevenzione del DM di tipo 1 nell'uomo.

Come ha concluso il Diabetes Prevention Trial-type 1, la somministrazione di insulina per via endovenosa in soggetti che mostrano un elevato rischio di sviluppare la malattia, non ha effetto preventivo. Si è visto che la vitamina A è un micronutriente essenziale per la regolazione della funzione del SI e che i pazienti con diabete mellito di tipo 1 sono carenti di vitamina A e carotenoidi; il trattamento con vitamina A, perciò, potrebbe essere un valido approccio nella prevenzione del DMT1 (Yosaee et al. 2016).

TERAPIA

La scoperta dell'insulina nel 1921-1922 ha rappresentato il più significativo evento terapeutico nella storia del DMT1, anche se la somministrazione di insulina esogena non sempre ha permesso di evitare lo sviluppo delle innumerevoli complicanze che sono associate alla patologia (Atkinson et al. 2014). Pertanto, al fine di migliorarne il trattamento e per emulare quanto più possibile la secrezione endogena dell'ormone, sono stati messi a punto degli analoghi dell'insulina e nuove tecnologie come il microinfusore e il sistema di monitoraggio continuo del glucosio (Hirsch et al. 2009). La terapia intensiva con insulina, i sistemi meccanici moderni di infusione e una terapia rivolta al blocco dell'azione distruttiva delle cellule pancreatiche si propongono di preservare la secrezione dell'insulina anche dopo l'esordio della malattia (Atkinson et al. 2014). Con iniezioni multiple giornaliere, analoghi dell'insulina a lunga durata di azione garantiscono un livello basale ormonale, mentre analoghi a breve durata di azione sono somministrati prima del pasto, in concentrazioni basate sui grammi di carboidrati assunti. Negli ultimi anni, il ricorso

all'infusione continua sottocutanea di insulina (CSII; insulin pumps) è diventato sempre più frequente, in quanto pazienti adulti sottoposti ad un trattamento integrato di infusione e controllo dei livelli glicemici (sensor-augmented pump) hanno riportato più basse concentrazioni di emoglobina glicata e, tra essi, una grande percentuale ha raggiunto i livelli consigliati per l'emoglobina glicata. Inoltre, da uno studio abbastanza recente è emerso che la pompa di insulina abbassi i livelli di emoglobina glicata più di quanto non facciano le iniezioni multiple giornaliere di insulina (Bergenstal et al. 2010; Yeh et al. 2012). Un sistema di monitoraggio continuo e in tempo reale dei livelli di glucosio riduce non solo il tempo trascorso in uno stato di ipoglicemia, ma anche i livelli di emoglobina glicata, se utilizzato per sei giorni alla settimana; il grado di riduzione è direttamente collegato ai livelli di emoglobina glicata prima dell'impiego di questo sistema di controllo (Atkinson et al. 2014). Da un altro studio è emerso che questo tipo di controllo della glicemia consente di ridurre l'ipoglicemia notturna nei bambini, rispetto all'automonitoraggio glicemico (Juvenile Diabetes Research Foundation 2010). Il sistema integrato pompa di insulina-monitoraggio continuo del glucosio permette di ottenere la lettura continua e in tempo reale della glicemia e di sospendere automaticamente il rilascio di insulina fino a due ore, in modo da evitare l'instaurarsi dell'ipoglicemia (Hirsch et al. 2012). Gli sforzi attuali sono diretti verso la messa a punto di un sistema integrato closed-loop, che funzionando come un pancreas artificiale, sembrerebbe migliorare il controllo della glicemia per tutta la notte e ridurre gli episodi di ipoglicemia notturni (Buckingham et al. 2010; Garg et al. 2012). Leggerebbe i livelli di glucosio e, tramite un algoritmo, andrebbe a rilasciare l'esatta quantità di insulina necessaria per mantenere stabile i livelli glicemici. L'insulina Degludec è utilizzata come insulina basale e fornisce un buon controllo glicemico, riducendo il rischio di ipoglicemia durante le ore notturne (Heller et al. 2012). L'ormone Pramlintide è utile nel trattamento del DMT1 in quanto agisce garantendo la riduzione dell'insulina postprandiale, del peso corporeo, della concentrazione di emoglobina glicata, delle escursioni glicemiche e rallentando lo svuotamento gastrico (Ryan et al. 2009). I ricercatori stanno cercando di sviluppare sistemi di rilascio di insulina diversi, specialmente attraverso la via polmonare ed orale basati su nanoparticelle, al fine di migliorare la qualità di vita di quei pazienti che abitualmente si somministrano insulina per via sottocutanea (Sharma et al. 2015).

DIABETE MELLITO DI TIPO 2

DEFINIZIONE

Elementi centrali nello sviluppo del DM di tipo 2 sono l'insulinoresistenza e la secrezione anomala di insulina. Infatti, il DM di tipo 2 è definito come un disordine metabolico ad eziologia multipla caratterizzato da iperglicemia cronica e da alterazioni nel metabolismo di zuccheri, grassi e proteine a causa di un difetto nella secrezione di insulina da parte del pancreas e di un variabile grado di resistenza all'ormone da parte dei tessuti insulino-sensibili, quali fegato, muscoli e tessuto adiposo.

EZIOLOGIA

Considerazioni genetiche

La malattia presenta una forte componente genetica. Nei gemelli monozigoti, infatti, esiste una concordanza del DM di tipo 2 tra il 70 e il 90%. Se un genitore è affetto dalla patologia, i figli sono più a rischio di sviluppare il diabete e se entrambi i genitori hanno diabete mellito di tipo 2 il rischio nei figli può raggiungere il 40%. La malattia viene definita poligenica e ad eziologia multipla perché, oltre alla predisposizione genetica, intervengono a modificarne il fenotipo fattori ambientali come l'obesità, l'alimentazione e l'attività fisica.

Anche se i geni che predispongono al DM di tipo 2 non sono stati completamente identificati, recenti studi di associazione genome-wide hanno permesso di identificare numerosi geni (più di 20) associati ad un rischio relativamente basso di DM di tipo 2.

Il più importante sembra essere una variante del gene che codifica per il TCFL2 (transcription factor 7-like 2), associato al diabete mellito di tipo 2 in molte popolazioni e ad alterata tolleranza al glucosio in quelle popolazioni ad alto rischio di sviluppare il diabete. Sono stati inoltre individuati polimorfismi genetici associati al DM di tipo 2 nei geni che codificano per il recettore γ attivato dai proliferatori perossisomiali, per il canale del potassio, per il trasportatore dello zinco, per l'IRS e per la calpaina 10.

I meccanismi attraverso i quali questi loci incrementano la suscettibilità al diabete non sono chiari, anche se sembra che alterino la funzione o lo sviluppo insulari o la secrezione dell'ormone.

FISIOPATOLOGIA

Il DM di tipo 2 è caratterizzato da un'eccessiva produzione epatica di glucosio e alterato metabolismo dei grassi. Nel paziente affetto da questo tipo di diabete è molto comune

l'obesità, in particolare quella viscerale o centrale (l'80% degli individui è obeso). L'insulinoresistenza è fortemente correlata all'obesità e all'inattività fisica. Sono stati, infatti, identificati diversi meccanismi che mediano questa correlazione. Un certo numero di ormoni circolanti, citochine e acidi grassi non esterificati (NEFA), che provengono dagli adipociti, modulano l'azione dell'insulina. Un aumento della massa delle riserve di trigliceridi, soprattutto nel tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo profondo, porta alla resistenza degli stessi adipociti nei confronti dell'insulina che normalmente agisce per bloccare la lipolisi (Stumvoll et al. 2005). Questo meccanismo determina un aumento dei livelli di acidi grassi non esterificati e glicerolo in circolo e l'insulinoresistenza da parte del muscolo scheletrico e del fegato (Boden et al. 1997).

Nelle fasi precoci della patologia si ha una normale tolleranza glucidica, in quanto le cellule β mettono in atto un meccanismo di compensazione per contrastare l'insulinoresistenza. Al progredire dell'insulinoresistenza e dell'iperinsulinismo compensatorio, in alcuni pazienti, le cellule del pancreas sviluppano intolleranza al glucosio, con un aumento dei livelli glicemici postprandiali. Se si riduce ulteriormente la secrezione insulinica e si ha un aumento della produzione di glucosio a livello epatico si instaura il diabete conclamato e compare iperglicemia anche a digiuno. La cellula β diventa, così, insufficiente. La capacità secretiva della cellula β rappresenta una condizione critica per lo sviluppo del diabete: se la cellula β , in risposta all'aumentata richiesta di ormone, è in grado di produrre maggiori quantità di insulina il diabete non si sviluppa, anche se è presente uno stato di insulinoresistenza. Si ritiene che un secondo difetto genetico si sovrapponga all'insulinoresistenza e possa determinare l'insufficienza della cellula β . Nei soggetti con diabete di tipo 2 di lunga durata si nota una riduzione di circa la metà della massa delle cellule β . Nelle isole di questi pazienti il polipeptide amiloide insulare, o amilina, viene cosecreto dalla cellula β insieme all'insulina, ma ad una velocità più bassa (Stumvoll et al. 2005) e forma depositi di fibrille amiloidi. Non è noto il ruolo fisiologico del polipeptide, anche se si ritiene possa svolgere diversi ruoli, come l'inibizione dell'azione insulinica e l'inibizione della secrezione di insulina e glucagone (Stumvoll et al. 2005). Piccoli aggregati sono citotossici, presumibilmente per la produzione di radicali liberi (Janson et al. 1999). Gli acidi grassi non esterificati sembrano avere un effetto additivo sulla citotossicità degli aggregati (Hull et al. 2004).

INSULINORESISTENZA

Per insulinoresistenza si intende una ridotta sensibilità dei tessuti all'azione dell'ormone. Per comprenderne gli effetti sull'omeostasi glucidica sono state create delle situazioni di privazione del recettore per l'insulina utilizzando il sistema Cre-lox (Stumvoll et al. 2005). Con questo studio si è visto che soltanto i casi Knockouts del recettore a livello del fegato e delle cellule β (Kulkarni et al. 1999) hanno manifestato intolleranza al glucosio, mentre ciò non è accaduto per il muscolo e il tessuto adiposo (Bruning et al. 1998; Bluher et al. 2003). I risultati ottenuti supportano il ruolo centrale della resistenza epatica all'ormone nella patogenesi nel DM di tipo 2 e suggeriscono l'importanza di un adeguato segnale insulinico nella cellula β pancreatica per il mantenimento della sua funzionalità (Stumvoll et al. 2005). L'insulinoresistenza è determinata da più di un meccanismo molecolare. Ad esempio può essere collegata alla defosforilazione dei residui di tirosina ad opera di fosfatasi o alla fosforilazione sui residui di serina e treonina del recettore e delle proteine IRS. La fosfotirosinafosfatasi 1B (PTP1B), responsabile della defosforilazione, è largamente espressa e ha un ruolo importante nella down-regulation del segnale insulinico (Goldstein et al. 2003). La fosforilazione dei residui di serina/treonina di IRS1 riduce la sua capacità di agire come substrato per l'attività tirosinchinasica del recettore per l'insulina e inibisce l'accoppiamento ai suoi principali sistemi effettori della cascata. Inoltre, una down-regulation del segnale insulinico può verificarsi anche tramite internalizzazione recettoriale con perdita del recettore dalla superficie della cellula e tramite la degradazione delle proteine IRS (Zhande et al. 2002).

L'incremento dei livelli di acidi grassi non esterificati e di citochine infiammatorie, come il TNF α (tumor necrosis factor α) e l'interleuchina 6 rilasciate dal tessuto adiposo viscerale che è, per questo motivo, considerato un vero e proprio organo endocrino, influenza negativamente la cascata del segnale insulinico (Ravussin et al. 2002; Rajala et al. 2003). Gli acidi grassi non esterificati impediscono l'utilizzazione del glucosio nel muscolo scheletrico e attivano il processo di gluconeogenesi nel fegato. In aggiunta, attivano delle chinasi cellulari che, a loro volta, sono in grado di attivare delle chinasi come IKK e chinasi N-terminali c-Jun (JNK) che sono responsabili dell'aumentata fosforilazione dei residui di serina/treonina e, perciò della down-regulation del segnale insulinico (Griffin et al. 1999; Gao et al. 2004; Itani et al. 2005). All'aumento degli acidi grassi non esterificati contribuisce anche il processo lipolitico stimolato dal TNF α che svolge un'azione negativa sulla cascata

attivata dall'ormone. Da uno studio condotto sui roditori è emerso che la neutralizzazione di questa citochina risolve l'insulinoresistenza, ma non è ancora completamente noto quanto sia effettivamente coinvolta nell'insulinoresistenza umana (Moller et al. 2000). L'IL-6 proinfiammatoria inibisce il segnale insulinico attraverso l'aumento dell'espressione delle proteine SOCS che partecipano alla degradazione delle proteine IRS (Senn et al. 2003; Krebs et al. 2003). L'obesità viscerale, inoltre, si associa alla riduzione dei livelli di una proteina prodotta in modo specifico dal tessuto adiposo che è l'adiponectina. L'adiponectina è un ormone proteico che, tramite la via della chinasi AMP, stimola il processo di ossidazione degli acidi grassi nel muscolo, ne riduce l'apporto al fegato e il contenuto di trigliceridi e diminuisce la gluconeogenesi a livello epatico. Tutti questi effetti hanno una complessiva azione insulino-sensibilizzante, pertanto una riduzione dei livelli di adiponectina si associa ad una riduzione della sensibilità del muscolo e del fegato all'azione dell'insulina (Yamauchi et al. 2002; Rajala et al. 2003; Goldstein et al. 2004).

L'AMP-chinasi è coinvolta nel meccanismo di azione della metformina e, presumibilmente, anche dei tiazolidindioni e questo suggerisce il suo coinvolgimento nella terapia contro il diabete (Zhou et al. 2001; Fryer et al. 2002; Zou et al. 2004).

È stata individuata, inoltre, una stretta correlazione tra l'insulinoresistenza e il segnale dell'infiammazione. Il fattore nucleare κB è mantenuto in uno stato inattivo dal partner inibitorio, I κB . La fosforilazione di quest'ultimo da parte della sua chinasi IKK porta alla degradazione di I κB e viene così rilasciato NF κB per la sua traslocazione verso il nucleo dove influenza la trascrizione di diversi geni coinvolti nella risposta infiammatoria (Karin et al. 2000).

Alte dosi di salicilati, esercitando un blocco dell'attività di IKK, possono migliorare l'iperglicemia e l'insulinoresistenza nel diabete e nell'obesità (Yin et al. 1998).

Il blocco genetico di IKK β risolve l'insulinoresistenza causata dagli acidi grassi non esterificati, attraverso un miglioramento nel processo di fosforilazione delle tirosine di IRS1 e l'attivazione del segnale a cascata intracellulare (Shoelson et al. 2003). Questo suggerisce, quindi, che l'IKK potrebbe essere un target importante nello sviluppo di nuove terapie per l'insulinoresistenza, specialmente nel caso di adiposità viscerale (Stumvoll et al. 2005).

In aggiunta all'effetto che i fattori circolanti del tessuto adiposo esercitano sul segnale insulinico, si ha l'influenza sulla funzione dell'endotelio vascolare che crea una correlazione tra l'aumentato rischio vascolare nella sindrome metabolica e i meccanismi di resistenza

cellulare all'insulina. I fattori prodotti dal tessuto adiposo reclutano e attivano le cellule infiammatorie, perpetuando uno stato di infiammazione sistemico che va ad influenzare fortemente la funzione vascolare e può causare l'aterogenesi (Havel et al. 2002; Wellen et al. 2003; Goldstein et al. 2004). L'accumulo di trigliceridi nei depositi viscerali e, in modo particolare, a livello del fegato sembra essere dovuto ad un difetto nell'ossidazione mitocondriale dei lipidi nei pazienti con diabete di tipo 2 che mostrano una capacità ossidativa compromessa e pochi mitocondri nel muscolo scheletrico (Kelley et al. 2002). Il PPAR γ co-attivatore 1 (PGC1) è un fattore di trascrizione per geni coinvolti nel processo di ossidazione mitocondriale degli acidi grassi e nella sintesi di ATP e risulta scarsamente presente nella progenie giovane, magra ed insulinoresistente di individui affetti da diabete tipo 2. Questo, perciò, sta ad indicare che un difetto ereditario nella fosforilazione ossidativa mitocondriale conduce ad un accumulo di lipidi a livello cellulare (Petersen et al. 2004). Studi sul profilo genetico hanno anche dimostrato che una ridotta espressione di PGC1 e dei relativi prodotti influenza la funzione mitocondriale in soggetti con insulinoresistenza e diabete di tipo 2 (Patti et al. 2003; Mootha et al. 2003).

GLUCOTOSSICITÀ E LIPOTOSSICITÀ

Sulla funzione insulare ha un impatto negativo l'ambiente metabolico del diabete. Si parla, infatti, di "tossicità glucidica" perché l'iperglicemia cronica altera la funzione insulare, determinando un peggioramento dell'iperglicemia. Si parla di "lipotossicità" in virtù del fatto che l'aumento degli acidi grassi liberi e dei grassi introdotti con la dieta peggiora la funzionalità delle isole pancreatiche.

Nelle cellule β il metabolismo ossidativo del glucosio porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno che normalmente sono detossificate da enzimi come la catalasi e la superossidodismutasi (Stumvoll et al. 2005). Le cellule β , tuttavia, sono dotate di una ridotta quantità di questi enzimi e dell'enzima che regola il processo di ossido-riduzione, glutatione perossidasi (Robertson et al. 2003). È stato suggerito che l'iperglicemia conduca ad un aumento cospicuo di specie reattive dell'ossigeno e ad un danno dei costituenti cellulari delle cellule β (Stumvoll et al. 2005). Inoltre, le specie reattive dell'ossigeno stimolano l'attività di NF κ B che induce l'apoptosi delle cellule β (Stumvoll et al. 2005).

Sia nei pazienti obesi diabetici che non, i livelli di acidi grassi non esterificati aumentano come risultato di una stimolazione del processo di lipolisi (Stumvoll et al. 2005). Gli acidi

grassi in acuto stimolano la secrezione di insulina, mentre la inibiscono dopo un periodo di 24 h con l'esposizione cronica (Stumvoll et al. 2005). In presenza di glucosio, si ha l'inibizione dell'ossidazione degli acidi grassi nelle cellule β e l'accumulo di Acil-CoA a lunga catena (Robertson et al. 2004). L'acil-CoA a lunga catena, attraverso l'apertura dei canali al potassio, porta ad una riduzione della secrezione di insulina. Un secondo meccanismo di azione potrebbe essere un'aumentata espressione della proteina di disaccoppiamento mitocondriale 2 che porta ad una riduzione della produzione di ATP e ad una ridotta secrezione di insulina. Un terzo meccanismo coinvolge l'apoptosi delle cellule β (Stumvoll et al. 2005).

CLINICA

Nell'80% dei casi il paziente con DM di tipo 2 è un individuo sovrappeso o obeso che presenta anche dislipidemia con aumento dei trigliceridi, del colesterolo LDL e riduzione del colesterolo HDL, oltre ad ipertensione. Poiché si caratterizza per la presenza di una certa quantità di insulina e non per carenza assoluta dell'ormone, non compaiono i sintomi caratteristici come poliuria, polidipsia, astenia e dimagrimento o sono lievi per parecchi anni e questo implica una diagnosi molto spesso tardiva. Per la caratterizzazione clinica sono sufficienti un'accurata anamnesi familiare (per capire se ci sono familiarità per la malattia o per le patologie cardiovascolari, ipertensione e dislipidemia) e personale (età di comparsa, abitudini alimentari, attività fisica, fattori di rischio per disturbi cardiovascolari) e l'esame obiettivo. Nel paziente diabetico si misura il peso corporeo e il BMI e si valuta la circonferenza vita che esprime la presenza di tessuto adiposo viscerale e correla con la comparsa della malattia e delle malattie cardiovascolari.

Tuttavia, non tutti i pazienti con diabete tipo 2 sono obesi in quanto esiste una percentuale assai più bassa che è normopeso e mostra una circonferenza vita nella norma. In questi pazienti non si riscontra una situazione di insulinoresistenza, ma si ha prevalenza del deficit di secrezione insulinica.

PREVENZIONE

Il DM di tipo 2 segue un periodo di alterata glicemia a digiuno (IFG) o di alterata tolleranza glucidica (IGT). Per prevenire o ritardare l'insorgenza della malattia si possono adottare o modifiche dello stile di vita o la terapia con alcuni farmaci. Secondo il Diabetes Prevention Program (DPP), dieta ed esercizio fisico per almeno 30 minuti al giorno per 5 giorni alla

settimana in soggetti che mostrano un'alterata tolleranza glucidica sono efficaci nel prevenire o ritardare lo sviluppo della patologia del 60% circa rispetto al placebo, indipendentemente dall'età, dal sesso e dal gruppo etnico. Con lo stesso studio si è visto come la metformina previene o ritarda la comparsa del diabete del 31% rispetto al placebo. I soggetti con forte familiarità e a rischio di sviluppare il DM di tipo 2 e quelli con alterata glicemia a digiuno o alterata tolleranza glucidica devono essere sensibilizzati all'importanza di un BMI nella norma e alla pratica di una regolare attività fisica. La terapia farmacologica nei soggetti con prediabete è controversa; l'ADA (American Diabetes Association) ha suggerito l'adozione di una terapia con metformina per quei soggetti ad alto rischio di progressione verso il diabete che presentano IFG o IGT. Soggetti con IFG, IGT o HbA1c pari a 5,7-6,4% dovrebbero essere sottoposti a monitoraggio ogni anno per individuare la presenza dei criteri di diagnosi per il diabete.

TERAPIA

Al fine di risolvere l'insulinoresistenza, principalmente coinvolta nella patogenesi del diabete di tipo 2 e nelle complicanze cardiovascolari ad esso collegato, si consiglia di intervenire sullo stile di vita facendo esercizio fisico ed indirizzandosi verso la perdita di peso, in modo da ridurre il rischio di progressione da un'anomala tolleranza al glucosio al diabete conclamato e migliorare, così, molti dei fattori di rischio cardiovascolari della sindrome metabolica (Stumvoll et al. 2005).

- *Tiazolidindioni o glitazoni*

Questi farmaci sono in grado di attivare specifici recettori nucleari PPAR γ che si riscontrano nei tessuti bersaglio dell'insulina. Sono i farmaci che, in misura maggiore, stimolano la sensibilità all'insulina e la funzione vascolare, migliorando il quadro dislipemico e infiammatorio del paziente diabetico di tipo 2 (Yki-Jarvinen et al. 2004). Agiscono aumentando i livelli di adiponectina, riducono la concentrazione di citochine proinfiammatorie circolanti e determinano la redistribuzione dei trigliceridi viscerali, immagazzinando i NEFA nel tessuto adiposo sottocutaneo meno lipolitico e riducendo il contenuto di lipidi a livello epatico. Possono essere utilizzati nei pazienti diabetici con ridotta funzionalità renale (Stumvoll et al. 2005).

- *Metformina*

Questo farmaco è di prima scelta nel trattamento del DMT2; non agisce stimolando il pancreas a produrre insulina, ma riduce la produzione di glucosio da parte del fegato, quindi è particolarmente indicata per il trattamento di pazienti obesi, iperinsulinemici. Ha effetti benefici sulle complicanze cardiovascolari (Bailey et al. 1996; Cusi et al. 1996; Mamputu et al. 2003). Non determina l'aumento di peso nel paziente, come i glitazoni. Non causa ipoglicemia, ma non può essere impiegata nei pazienti affetti da insufficienza renale.

- *Inibitori dell' α -glucosidasi*

Esercitano un'azione a livello intestinale dove riducono l'assorbimento del glucosio e quindi l'iperglicemia postprandiale. Da uno studio è emerso che l'acarbiosio (unico farmaco di questa categoria disponibile in Italia) sia in grado di ridurre le escursioni glicemiche e di proteggere dallo sviluppo del diabete e delle malattie cardiovascolari (Chiasson et al. 1998).

- *Sulfaniluree e glinidi*

Le sulfaniluree sono una famiglia di farmaci secretagoghi utilizzati per il trattamento del DMT2. La loro azione avviene a livello delle cellule insulari del pancreas che hanno una capacità residua di produrre insulina ed è diretta sui canali del potassio ATP-dipendenti. Sono distinte in prima e seconda generazione (prima generazione: tolbutamide; seconda generazione: glibenclamide). Le sulfaniluree di seconda generazione hanno durata d'azione maggiore e sono più potenti, quindi è maggiore sia l'effetto terapeutico sia il rischio di ipoglicemia durante il trattamento (Rendell et al. 2004). Dai risultati di uno studio è emerso che il rischio di complicazioni microvascolari e macrovascolari si riduce con l'utilizzo di questi farmaci. La terapia antiipertensiva è in grado di ridurre il rischio di complicanze macrovascolari di circa il 20%, mentre un trattamento combinato con antiipertensivi consente di ridurre ancor più il rischio (Stumvoll et al. 2005). I glinidi (conosciuti anche come meglitinidi) sono una classe di farmaci antidiabetici orali che stimolano la secrezione insulinica in modo rapido e di breve durata, attraverso l'interazione con il canale del potassio ATP-dipendente. Sono particolarmente indicati per il controllo della glicemia postprandiale. Si associano ad un rischio più basso di ipoglicemia e possono essere impiegati nei pazienti con ridotta funzionalità renale (Rendell et al. 2004).

- *Incretine*

Le incretine sono ormoni secreti nel tratto gastrointestinale in seguito all'introduzione di carboidrati che stimolano la secrezione di insulina. Le due principali incretine sono il GLP-1

(Glucagonlike peptide-1) e il GIP (Glucose Dependent Insulinotropic Polipeptide). Le incretine come tali sono però inutilizzabili in terapia data la loro breve emivita in quanto sono rapidamente inattivate dall'enzima dipeptidil peptidasi IV (DPP-IV). Per prolungare la durata di azione sono stati sintetizzati analoghi con modifiche strutturali che non li esponano alla degradazione da parte del DPP-IV e inibitori dell'enzima DPP-IV. Al primo gruppo appartiene l'Exenatide, la versione sintetica del peptide identificato nella saliva della lucertola "il mostro di Gila". I pazienti in trattamento con questo farmaco mostrano una significativa riduzione di peso a causa di un calo dell'appetito. L'azione delle Incretine è glucosio-dipendente perciò, in assenza di glucosio, non esercitano alcun effetto. Proprio per questo motivo non causano ipoglicemia. Sembrano avere un effetto positivo sulla proliferazione delle β -cellule e rallentano lo svuotamento gastrico (Stumvoll et al. 2005). Al secondo gruppo appartengono il Sitagliptin e il Vildagliptin. Come gli analoghi del GLP-1 non danno ipoglicemie.

- *Insulina*

Un ripristino di adeguate concentrazioni di insulina è essenziale per l'effetto della metformina e dei glitazoni, che non sono efficaci se non è disponibile l'ormone e sembrerebbe utile nel ridurre il processo infiammatorio a livello vascolare (Dandona et al. 2003). Un passaggio alla terapia insulinica deve essere considerato quasi "obbligatorio" nel trattamento, in virtù della perdita di funzionalità della cellula β . Per la protezione della massa β -cellulare, sarebbe opportuno intervenire quanto più precocemente possibile con farmaci che ottimizzano il compenso e risparmiano la β -cellula e l'insulina dovrebbe diventare un farmaco da utilizzare il più presto possibile nel trattamento del diabete tipo 2. Nei soggetti magri e in quelli interessati da un importante calo ponderale, nei soggetti con nefropatia o epatopatia che non consente l'impiego di ipoglicemizzanti orali, oppure nei pazienti ricoverati in ospedale e con malattie acute, l'insulina dovrebbe essere la terapia iniziale nel diabete mellito di tipo 2 (Powers 2012).

- *Approcci sperimentali*

PTP1B è una tirosina fosfatasi che modula in senso negativo il segnale insulinico. L'inibizione della sua attività con specifici agenti farmacologici o la riduzione della sua concentrazione con nuovi oligonucleotidi antisense sembra in grado di stimolare l'azione dell'ormone insulina nei modelli pre-clinici (Liu et al. 2004).

GESTIONE DEI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI

TRATTAMENTO IPERTENSIONE

Nel paziente affetto da DMT2 si riscontrano con una certa frequenza anche ipertensione, malattie coronariche e disturbi cerebrovascolari (Stumvoll et al. 2005). Il trattamento antipertensivo nei pazienti con diabete apporta maggiori benefici rispetto al non diabetico e ha come scopo il raggiungimento di valori di pressione sistolica <130 mmHg e di pressione diastolica <80 mmHg, come suggerito dall'ADA. Per fare questo, bisognerebbe dapprima indirizzarsi verso il calo ponderale, frequente attività fisica, ridotto consumo di sodio e, in ultimo, terapia farmacologica. Molti pazienti necessitano di due o più diversi farmaci antipertensivi per raggiungere lo scopo (Stumvoll et al. 2005). I β -bloccanti, i diuretici, gli ACE inibitori, i calcio antagonisti e i bloccanti del recettore per l'angiotensina sono tutti agenti efficaci nel ridurre i valori pressori nel diabetico, mentre gli α -bloccanti sembrano essere meno efficaci (Beckman et al. 2002). Il trattamento con un antiaggregante piastrinico, generalmente aspirina, è correlato ad una riduzione del rischio di manifestazioni aterosclerotiche del 19% (Beckman et al. 2002). L'ADA raccomanda la somministrazione di basse dosi di aspirina come strategia di prevenzione secondaria dopo malattie aterosclerotiche e l'impiego del farmaco in pazienti ad alto rischio di malattie aterosclerotiche, soprattutto in soggetti di oltre 40 anni o con un fattore di rischio aggiuntivo (storia familiare di malattia cardiovascolare, ipertensione, fumo, dislipidemia o albuminuria (Colwell et al. 2004).

TRATTAMENTO DISLIPIDEMIA

Nei diabetici con dislipidemia sono fondamentali una dieta povera di grassi saturi e colesterolo, una più frequente attività fisica e la correzione di tutti i fattori di rischio cardiovascolari.

Le statine, inibitori dell'idrossi-metil-glutaril-CoA riduttasi, sono i farmaci di prima scelta per la prevenzione della malattia cardiovascolare in quanto riducono i livelli di LDL. Il ruolo benefico dei farmaci ipolipemizzanti è stato stabilito da uno studio "*Scandinavian Simvastatin Survival Study*" che ha dimostrato una riduzione della mortalità totale del 43% (Stumvoll et al. 2005). Allo stesso modo, lo studio "*Hearth protection*" ha mostrato un rischio di mortalità per disturbi cardiovascolari più basso (Heart Protection Study Collaborative Group 2002). I fibrati hanno un ruolo importante nel trattamento del paziente diabetico in quanto determinano un aumento dei livelli di colesterolo HDL e una

riduzione dei livelli di trigliceridi. Riducono il rischio di infarto del miocardio del 24% (Beckman et al. 2002). Studi più recenti, tuttavia, non fanno emergere un reale beneficio derivante dall'uso di questi farmaci. Una terapia combinata di un fibrato con una statina o un altro farmaco ipolipemizzante sembra essere utile nel raggiungere concentrazioni di colesterolo LDL inferiori a 70 mg/dl nel paziente con malattia cardiovascolare nota. Le terapie combinate statine/fibrati causano con più frequenza effetti collaterali, come la miosite. L'acido nicotinico può innalzare i livelli di colesterolo HDL, ma porta anche ad un innalzamento dei livelli glicemici (Grundy et al. 2002) se usato a dosi superiori a 2g/die, con peggioramento del quadro di insulinoresistenza.

COMPLICANZE DEL DIABETE MELLITO

COMPLICANZE ACUTE

La chetoacidosi diabetica e lo stato iperglicemico iperosmolare sono le complicanze metaboliche acute del diabete mellito, sia di tipo 1 che di tipo 2. Nonostante siano stati messi a punto dei criteri diagnostici e dei protocolli per il loro trattamento, restano due importanti cause di morbidità e mortalità (Kitabchi et al. 2009).

La chetoacidosi diabetica presenta una forte alterazione nel metabolismo dei carboidrati, delle proteine e dei lipidi. Si instaurano dei processi catabolici che portano all'esaurimento dei depositi di glicogeno, all'idrolisi dei trigliceridi dal tessuto adiposo e alla mobilitazione degli amminoacidi dal muscolo (Kitabchi et al. 2006) che liberati diventano substrati per la produzione di glucosio e corpi chetonici nel fegato. L'iperglicemia e i corpi chetonici svolgono un ruolo centrale nello sviluppo di questo scompenso metabolico. Si riscontra la presenza di alti livelli di citochine proinfiammatorie, marker di perossidazione lipidica, fattori che stimolano il processo di coagulazione, come l'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno di tipo 1 e la proteina C reattiva (Gosmanov et al. 2015). I livelli di questi fattori ritornano alla normalità con la terapia insulinica e la correzione dello stato iperglicemico (Stentz et al. 2004).

Lo stato iperglicemico iperosmolare si caratterizza per la presenza di una certa quantità di insulina che non porta alla lipolisi e alla chetogenesi, ma è insufficiente per consentire l'utilizzazione del glucosio (Schade et al. 1980; McGarry et al. 1999). Ha un esordio più lento ed insidioso rispetto alla chetoacidosi. Il quadro clinico comune ad entrambe le complicanze è dovuto all'iperglicemia e comprende: poliuria, polifagia, polidipsia, perdita

di peso, debolezza e disidratazione, tachicardia, ipotensione e shock. Nella chetoacidosi si manifestano anche il respiro Kussmaul (atti respiratori rapidi e profondi), l'alito dall'odore di frutta marcia dovuto all'eliminazione dell'acetone, nausea, vomito e dolore addominale. I disturbi dello stato di coscienza e il coma sono, invece, più frequenti nella sindrome iperosmolare iperglicemica.

COMPLICANZE CRONICHE

Le complicanze del diabete si associano ad un danno a lungo termine e, quindi, al deterioramento della funzionalità di vari organi. Si possono distinguere due tipi di complicanze: complicanze microvascolari e macrovascolari. Il diabete determina, infatti, delle modificazioni a livello dei piccoli vasi che rappresentano le caratteristiche patognomiche della microvasculopatia e queste, associate a fenomeni come lo stress ossidativo e la formazione di prodotti finali di glicosilazione avanzata, portano alle complicanze macrovascolari (Chawla et al. 2016). Alti livelli di glucosio per lunghi periodi di tempo determinano il danno a livello di diversi organi, in particolare occhi, rene, nervi e cuore (Standards of medical care in diabetes 2016). Nonostante un intensivo controllo glicemico riduca l'incidenza e la progressione delle complicanze microvascolari, la morbilità che si associa a tali disturbi è ancora in aumento (Patel et al. 2008). Degli studi hanno dimostrato che lo stretto controllo glicemico sia in grado di limitare i disturbi microvascolari, mentre non si conosce ancora se abbassamenti dei livelli glicemici siano in grado di migliorare le complicanze macrovascolari (Chawla et al. 2016). Esiste una relazione lineare tra la comparsa di complicanze microvascolari e la durata della malattia; tuttavia, non è ancora del tutto chiaro se le complicanze microvascolari precedano quelle macrovascolari o se le due progrediscono in maniera simultanea (Chawla et al. 2016). I pazienti affetti da diabete mellito e da complicanze microvascolari ad esso associate mostrano un rischio elevato di aterosclerosi che, in ultimo, causa malattie cardiovascolari e morte prematura (Kalofoutis et al. 2007). Negli ultimi anni, è stata rivolta grande attenzione al trattamento delle complicanze macrovascolari, come gli infarti e la sindrome coronarica acuta. Le complicanze microvascolari sono la retinopatia diabetica, la nefropatia e la neuropatia. Il rischio del loro sviluppo nel paziente diabetico si riduce con una terapia insulinica intensiva (Atkinson et al. 2014).

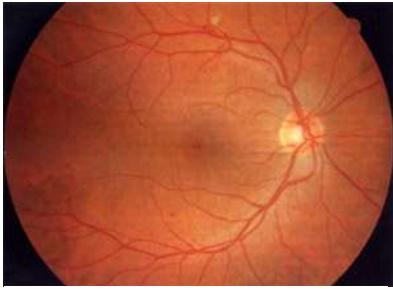


Figura 3- Retinopatia diabetica. Da Harrison, *Principi di medicina interna*, 2012

La *retinopatia diabetica* è la più comune complicanza del diabete (Simo et al. 2014) e il contesto neurodegenerativo ed infiammatorio che è prevalente nell'occhio del paziente diabetico ha un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione della malattia. Si tratta della principale causa di deficit visivo e cecità nell'adulto in età di lavoro nel mondo (Cheung et al. 2010; Yau et al. 2012). Il rischio di

sviluppare retinopatia diabetica nel paziente affetto da DMT2 dipende sia dall'entità della iperglicemia che dalla presenza di ipertensione (Chawla et al. 2016). Altre complicanze a livello oculare nel paziente diabetico sono il glaucoma e la cataratta, ossia l'opacizzazione del cristallino.

La *nefropatia diabetica* è la più comune causa di malattia renale terminale nei Paesi più sviluppati e interessa un terzo circa dei pazienti con diabete mellito (Tang et al. 2016). I meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo della patologia sono la formazione di specie reattive dell'ossigeno e l'accumulo di prodotti finali di glicosilazione, i cosiddetti AGE (Cade et al. 2008).

La *neuropatia diabetica* è una complicanza che può coinvolgere sia i nervi periferici che quelli autonomi e colpisce quasi la metà della popolazione affetta da diabete (Tong et al. 2006). Il rischio di sviluppare questo tipo di complicanza è direttamente proporzionale all'entità e alla durata dell'iperglicemia (Chawla et al. 2016).



Figura 4- Piede diabetico. Da www.my personaltrainer.it

Nell'ambito delle neuropatie, il *piede diabetico* è una seria complicanza del diabete mellito e la più comune causa di ospedalizzazione. L'eziologia della comparsa di ulcerazioni è abbastanza complessa proprio perché

multifattoriale, anche se si ritiene che la polineuropatia sia molto determinante nel provocare la formazione delle tipiche ulcere (Volmer-Thole et al. 2016).

Le malattie cardiovascolari che compaiono come conseguenza del DMT2 sono la principale causa di morte associata a questa patologia.

La *cardiomiopatia diabetica* è caratterizzata da modificazioni morfologiche, funzionali e metaboliche a livello del cuore (Westermeier et al. 2016). I disordini cardiaci sono dovuti

ad iperglicemia ed iperlipidemia costanti che determinano un aumento dello stress ossidativo, dello stato infiammatorio, della fibrosi e un'alterazione della funzione mitocondriale (Bugger et al. 2014). Rispetto ad un soggetto normale, i pazienti con diabete di tipo 1 mostrano esiti meno favorevoli in seguito ad un evento coronarico acuto, come evidenziato da un recente studio in cui, dopo l'infarto in questi soggetti è emersa la produzione di anticorpi diretti contro le proteine del cuore (Eckel et al. 2012; Gottumukkala et al. 2012).

LA TECNICA DEL TRAPIANTO

Attualmente esistono due possibilità terapeutiche per un paziente affetto da diabete che necessita del trapianto (Mittal et al. 2014): il trapianto dell'organo intero e il trapianto delle sole isole di Langerhans.

TRAPIANTO DI PANCREAS COME ORGANO INTERO

La maggior parte dei pazienti sottoposti al trapianto dell'intero organo solido è costituita da pazienti affetti da insufficienza renale cronica secondaria al diabete. Il trapianto di solo rene, infatti, in questi casi non è indicato in quanto associato ad una prognosi infausta (Cosio et al. 2008; Taber et al. 2013).

Tuttavia, il trapianto combinato di rene e pancreas è una procedura abbastanza impegnativa che si associa ad alcune problematiche. Proprio per questa ragione può essere presa in considerazione, soltanto in ultima spiaggia, per quei pazienti che sono affetti da complicanze molto gravi (Chan et al. 2016). Viene praticato in caso di DMT1 associato a malattia renale terminale e conduce ad aumento della sopravvivenza, per effetto della riduzione delle comorbidità associate, e a miglioramento della qualità della vita. Un trapianto di pancreas funzionante, infatti, potrebbe liberare il paziente dalla necessità di auto-somministrazione di insulina e garantire livelli di glucosio più stabili nel sangue (Robertson et al. 1996) (Robertson et al. 1998). I risultati ottenuti con un trapianto combinato pancreas-rene sono paragonabili ai risultati conseguenti al trapianto di un altro organo solido, sia esso il rene, il fegato o il cuore (Mittal et al. 2014). Per quanto riguarda il DMT2, sia l'efficacia che la possibilità di applicazione restano controverse, anche se in realtà gli esiti sembrerebbero paragonabili a quelli ottenuti in caso di DMT1 (Chan et al. 2016). Inoltre, si ritiene che la tecnica del trapianto in generale, nel caso di pazienti affetti

da DMT2, sia adatta a soggetti insulino-dipendenti non obesi e non insulinoresistenti (Mittal et al. 2014).

TRAPIANTO DI ISOLE PANCREATICHE

Si tratta di un'opzione terapeutica che consiste nel trapianto di nuove cellule β pancreatiche nei pazienti affetti da DMT1 (Health Quality Ontario 2015), in particolare in coloro che sono affetti da "*diabete labile o instabile*". Si tratta di una rara e severa forma di diabete che colpisce 3 pazienti su 1000 affetti da diabete di tipo 1 (Diabetes.co.uk 2015). In questi soggetti, nonostante il trattamento con insulina, si verificano frequenti episodi di ipo- ed iperglicemia, ipoglicemia inconsapevole (la condizione in cui i livelli di glucosio nel sangue si riducono molto senza alcun sintomo allarmante) e chetoacidosi. L'instabilità dei valori glicemici, spesso, comporta ricorrenti o prolungate ospedalizzazioni e determina la comparsa di complicanze che riducono le aspettative di vita (Diabetes.co.uk 2015). Con il trapianto, infatti, oltre al controllo glicemico, viene garantito il miglioramento delle complicanze secondarie al diabete. Nel caso di instabilità glicemica, in presenza di ipoglicemia inconsapevole, la scelta tra il trapianto dell'organo intero o il trapianto di isole dipende dalle esigenze e dalle preferenze del paziente. Si tratterebbe, infatti, di scegliere tra una procedura a più alta morbilità, ma con maggiore capacità di garantire l'insulino-indipendenza (il trapianto dell'organo intero) e una a più basso rischio (raramente possono verificarsi trombosi portale ed emorragie), ma associata a minore riuscita (trapianto di isole). Tuttavia, l'obiettivo principale è quello di risolvere l'ipoglicemia più che un raggiungimento dell'insulino-indipendenza e, in virtù di questo, la scelta tra le due opzioni risulterebbe indifferente (Mittal et al. 2014). Esistono due metodi o fonti di cellule per il trapianto di cellule β . L'allogtrapianto di isole avviene con la raccolta delle isole di organi provenienti da più donatori; l'autotrapianto, invece, è realizzato dopo pancreasectomia totale, usando isole che provengono dal pancreas dello stesso paziente. Mentre il primo tipo è utilizzato per il DMT1, il secondo tipo di trapianto rappresenta un'opzione terapeutica nei pazienti affetti da pancreatite cronica al fine di prevenire o attenuare la gravità del diabete dopo rimozione del pancreas. Esistono tre tipi di allogtrapianto: trapianto isolato di isole, trapianto di isole dopo trapianto renale e trapianto di isole combinato con il trapianto renale (Health Quality Ontario 2015). I trapianti associati al trapianto renale sono presi in considerazione nei casi di insufficienza renale e il rapporto rischio-beneficio è

migliore nel caso del trapianto di isole successivo al trapianto renale perché il paziente è già obbligato al trattamento immunosoppressore (Deng et al. 2009). Nell'ultimo decennio, i risultati raggiunti con il trapianto di isole sono molto migliorati, in particolare grazie all'impiego di un trattamento immunosoppressore privo di farmaci glucocorticoidi (Shapiro et al. 2000), con il nuovo protocollo Edmonton. I pazienti sottoposti al trapianto di isole, infatti, devono intraprendere la terapia con farmaci immunosoppressori per prevenire il rigetto e questo fatto, insieme alla ridotta disponibilità di donatori, ha da sempre rappresentato un fattore limitante alla diffusione di tale pratica chirurgica. Nonostante in passato fossero ritenuti più adatti come donatori di isole soggetti più vecchi e con un alto BMI, attualmente si ritiene che il donatore migliore sia un soggetto giovane (Niclauss et al. 2011).

COME AVVIENE IL TRAPIANTO DELLE ISOLE?

L'isolamento delle isole di Langerhans richiede un processo di digestione dell'organo per via enzimatica (con soluzioni fredde di collagenasi o liberasi) e meccanica e la purificazione insulare tramite la separazione a gradiente di densità. Sebbene il protocollo originale Edmonton prevedesse il trapianto subito dopo l'isolamento, molti centri mantengono le isole in coltura per un periodo di almeno 24 ore prima di effettuare il trapianto (Shapiro et al. 2000). Questo metodo non solo migliora la tecnica del trapianto, ma consente alle isole di riprendersi dopo l'isolamento; inoltre è utile in modo particolare per le isole di maggiori dimensioni per le quali il processo di necrosi centrale può essere tenuto sotto controllo durante il periodo di coltura (Health Quality Ontario et al. 2015). Il trapianto viene, in massima parte, realizzato attraverso la vena porta nei sinusoidi epatici e sotto anestesia locale. Il paziente ricevente viene trattato con farmaci anticoagulanti e l'eparina è aggiunta all'infusione insulare in modo da attenuare la risposta infiammatoria che si ritiene responsabile della perdita precoce delle isole (Cabric et al. 2007).

In condizioni sperimentali, il trapianto è stato realizzato anche in altre sedi: rene, ossa, testicoli, cervello, timo, cavità peritoneale, stomaco (Ricordi et al. 2005; Lau et al. 2009). Il trapianto insulare sotto la capsula renale è una tecnica molto invasiva e richiede una massa cellulare più estesa.

IMMUNOSOPPRESSIONE

L'immunosoppressione riduce il rischio di rigetto del trapianto e limita la distruzione autoimmune delle isole pancreatiche. È necessaria per tutta la durata della vita in seguito ad un trapianto. Come per il trapianto di pancreas intero, diversi regimi immunosoppressivi vengono impiegati nel trapianto di isole pancreatiche. Inizialmente l'immunosoppressione prevedeva l'utilizzo di azatioprina, ciclosporina, corticosteroidi e garantiva l'insulino-indipendenza soltanto nel 10% circa dei pazienti e per un anno. Il protocollo Edmonton, prevedendo un regime che esclude i glucocorticoidi e, come agenti di mantenimento, gli immunosoppressori Tacrolimus e Sirolimus ha permesso il raggiungimento di una completa insulino-indipendenza nell'80% dei pazienti. Si tratta, infatti, di un trattamento meno diabetogeno che non causa tossicità nei confronti delle cellule β né insulinoresistenza periferica (Shapiro et al. 2000; Poradzka et al. 2013). Molti centri hanno sostituito il Sirolimus con il Micofenolato Mofetile. I criteri di esclusione dal trapianto di isole comprendono, tra gli altri, anche la controindicazione del regime immunosoppressore, trattamento indispensabile in quanto un trapianto scatena l'azione difensiva del sistema immunitario del ricevente e il rigetto. Le isole, infatti, rilasciano in grande quantità proteine a basso peso molecolare, note come chemochine, che vanno ad agire sui loro recettori. La via mediata da questi recettori, con l'attivazione da parte dei ligandi, sembrerebbe coinvolta nel danneggiamento delle isole infuse e potrebbe essere, perciò, il bersaglio di un intervento volto a migliorare l'efficacia del trapianto (Citro et al. 2012). In questo modo, si opta per un trattamento avente come bersaglio le cellule immunitarie proinfiammatorie responsabili della distruzione delle isole trapiantate e si va ad agire sul problema del rigetto in modo più specifico rispetto ad una immunosoppressione generalizzata più potente (Citro et al. 2012).

REPARIXIN

GENERALITÀ SUL FARMACO

Reparixin è un inibitore allosterico non competitivo e selettivo per i recettori CXCR1/2 delle chemochine. Questi recettori rientrano nella famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, sono localizzati sui neutrofili (PMN) e vengono normalmente attivati dal fattore chemiotattico CXCL8 (o IL-8) che è responsabile della migrazione delle cellule T e NK al sito

dell'infiammazione (Ludwig et al. 1997; Casilli et al. 2005; Cugini et al. 2005; Kendrick et al. 2014; Citro et al. 2015). Il farmaco, messo a punto da Dompé Farmaceutici S.p.a. e noto in origine come Repartaxin, ha completato gli studi di fase I ed è già entrato negli studi di fase II/III (Allegretti et al. 2012). Si tratta di un'acilmetansulfonammide identificata nell'ambito di un programma volto all'identificazione di nuovi potenti inibitori della chemiotassi dei leucociti polimorfonucleati CXCL8-indotta. La molecola è stata sviluppata, specificamente, allo scopo di fornire un utile trattamento per la condizione post-ischemia/riperfusion e deriva da ricerche condotte su una classe di derivati degli acidi 2-arilfenilpropionici. Da studi effettuati su Reparixin, è emersa la sua capacità di inibire in vitro la migrazione dei leucociti PMN indotta sia da CXCL8 che da CXCL1 (ad una IC50 rispettivamente di 1 nM e di 400 nM) (Bizzarri et al. 2006). Inoltre, è stata provata la sua efficacia in diversi modelli animali con danno da ischemia/riperfusion e nella prevenzione di un ritardo nella funzionalità del trapianto (DGF, Delayed Graft Function) in soggetti sottoposti a trapianto di rene o polmone (Bizzarri et al. 2006). Infatti, si è dimostrato in grado di ridurre il reclutamento di granulociti e citochine in un modello renale di ischemia/riperfusion e di attenuare, del 90% circa, il reclutamento di leucociti PMN in un modello di ischemia/riperfusion nel fegato di ratto (Bertini et al. 2004; Cugini et al. 2005). La somministrazione di Reparixin riduce il processo infiammatorio nel danno da ischemia/riperfusion anche a livello cerebrale, cardiaco e intestinale (Souza et al. 2004; Villa et al. 2007). Reparixin, inoltre, è risultato efficace nel rimuovere in maniera selettiva le cellule staminali cancerose (CSC) in vitro in due linee cellulari di tumore alla mammella e nell'attaccare queste stesse cellule negli allotrapianti di tumori alla mammella umani, ritardando, così, la crescita tumorale e riducendo la comparsa di metastasi (Ginestier et al. 2010).

Ha un'azione inibitoria più potente sul recettore delle chemochine CXCR1: vi si lega e lo blocca in una conformazione inattiva, impedendo così l'attivazione della trasduzione del segnale intracellulare (Bertini et al. 2004; Bizzarri et al. 2006). Esistono, infatti, numerose prove che attestano il ruolo dominante del recettore CXCR1 nella chemiotassi indotta dalla chemochina CXCL8 dei leucociti PMN che, tuttavia, esprimono entrambi i recettori.

CHEMOCHINE

Le chemochine sono delle citochine chemiotattiche che controllano, attraverso i propri recettori, una grande varietà di processi, sia fisiologici che patologici, che vanno dalla sorveglianza da parte del sistema immunitario al processo infiammatorio e dalle infezioni

virali al cancro (Sallusto et al. 2008; Bonecchi et al. 2009; Mortier et al. 2012). Sono classificate in 4 sottofamiglie sulla base della presenza o meno di cisteine all'estremità amino-terminale: CXC, CC, CX3C e C (Murphy et al. 2000; Gangur et al. 2002). Le chemochine CXC, in particolare, possono essere suddivise in CXC ERL+ e CXC ERL- a seconda della presenza o meno del tripeptide Glu-Leu-Arg all'estremità amino-terminale.

L'interleuchina 8 (CXCL8), insieme ad altre chemochine, appartiene alla sottofamiglia delle chemochine ERL+ (Murphy et al. 2000) che rivestono un ruolo fondamentale nel determinare la migrazione e l'attivazione dei leucociti (Bizzarri et al. 2006).

Esse richiamano, in maniera specifica, i leucociti polimorfonucleati (PMN) dal circolo sanguigno verso il sito di infiammazione periferico e il loro accumulo a questo livello avviene grazie al susseguirsi di più fasi come il rotolamento, l'adesione e la trasmigrazione (Bizzarri et al. 2006). Diversi studi, infatti, hanno fatto emergere il loro ruolo chiave in svariate patologie infiammatorie, quali la colite ulcerosa, il danno da ischemia/riperfusion, la sindrome da bronchiolite obliterante e la progressione tumorale (Bizzarri et al. 2006). La secrezione da parte delle stesse cellule β pancreatiche di chemochine che favoriscono il reclutamento dei leucociti sembrerebbe determinare, infatti, l'inizio e il mantenimento del processo di infiltrazione dei leucociti a livello delle isole pancreatiche sia nel topo che nell'uomo. Ad esempio, CCL2- una chemochina prodotta dalle cellule β - recluta monociti e macrofagi nelle isole pancreatiche (Monti et al. 2003; Martin et al. 2008; Melzi et al. 2010; Kriegel et al. 2012) e la chemochina CXCL10, secreta dalle cellule produttrici di insulina, promuove l'infiltrazione delle cellule T (Rhode et al. 2005; Roep et al. 2010).

REPARIXIN E DIABETE: STUDI PRECLINICI E CLINICI

Uno studio condotto recentemente e avente come scopo quello di testare la capacità di Reparixin nel prevenire l'induzione farmacologica del diabete ha coinvolto topi maschi C57BL/6. In alcuni topi è stato somministrato il Reparixin (Bertini et al. 2004) ad una certa dose (5,4 mg/h/kg) e per infusione sottocutanea continua, mentre in altri il veicolo (sodio cloruro 0,9%) per una settimana. Per indurre il diabete, sono state somministrate dosi multiple di Streptozotocina (STZ) per via intraperitoneale e per 5 giorni consecutivi (Citro et al. 2015). I topi con glicemia non a digiuno superiore o uguale a 250 mg/dL in due

misurazioni consecutive sono stati considerati diabetici e il primo rilevamento di iperglicemia è stato stabilito come giorno di esordio del diabete (Citro et al. 2015).

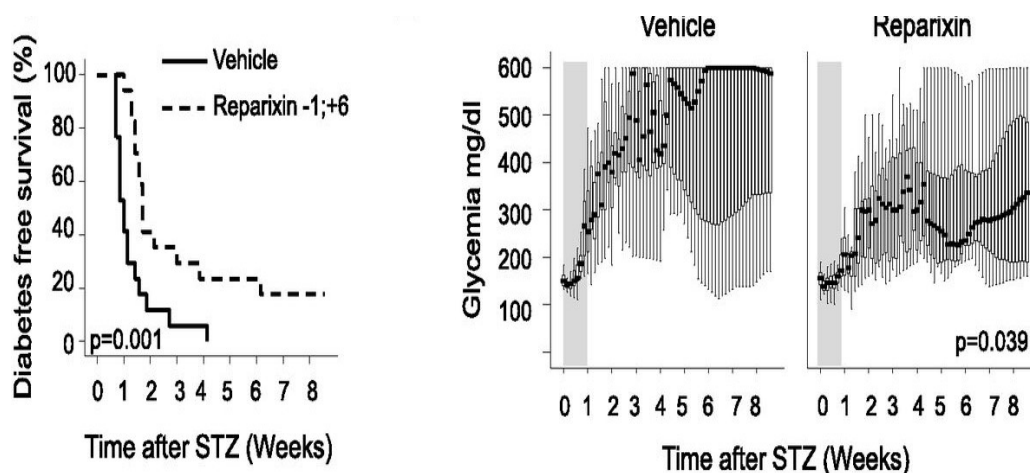


Figura 5- Il blocco dei recettori CXCR1/2 da parte di Reparixin modula l'induzione del diabete da parte di STZ. A sinistra: analisi del tempo di sopravvivenza senza malattia; A destra: glicemia non a digiuno durante il periodo di controllo. Modificata da: Citro et al. 2015.

Dallo studio è emerso che il trattamento con Reparixin (sommministrato per infusione continua per via della sua breve emivita) ritarda in maniera significativa il periodo di comparsa del diabete (Citro et al. 2015). Nel topo diabetico i livelli glicemici, infatti, si sono mantenuti costanti e sono risultati più bassi nel gruppo trattato con Reparixin rispetto al gruppo trattato con il veicolo (Citro et al. 2015). Al contrario, da un trattamento analogo con DF1726A, un composto fornito da Dompé farmaceutici S.p.a come lo stesso Reparixin e ad esso strutturalmente correlato, è emersa l'inefficacia di questo agente nel prevenire lo sviluppo del diabete (Citro et al. 2015) in quanto non agisce sui recettori CXCR1 e CXCR2 (De Paola et al. 2007). Tuttavia, dallo studio è anche emerso che Reparixin, somministrato per os tre volte a settimana e ad una dose di 15 mg/Kg, non inibisce anche il recettore CXCR2, oltre al recettore CXCR1, e quindi non agisce in modo efficace nel prevenire la comparsa del diabete (Citro et al. 2015). Dunque, il farmaco somministrato ad una dose alla quale inibisce solo il recettore CXCR1 non risulta efficace nel prevenire la comparsa del diabete nel modello murinico trattato con STZ. Anche se recenti studi hanno riportato l'esistenza di un omologo murinico del recettore CXCR1 umano, non è ancora emersa un'azione delle chemochine su quest'ultimo (Fu et al. 2005; Moepps et al. 2006; Fan et al. 2007). Si può, pertanto, ritenere che i topi abbiano soltanto il recettore CXCR2 funzionale come unico target degli inibitori dei recettori CXC, nonostante non si possa completamente escludere una possibile azione, non ancora scoperta, mediata dall'inibizione del recettore

CXCR1 (Citro et al. 2015). Lo studio, sebbene su un modello preclinico, ha fatto emergere, dunque, l'efficacia dell'inibizione dei recettori CXCR1/2 nel garantire la sopravvivenza delle isole contrastata dal processo infiammatorio e dal danno mediato dal processo autoimmunitario. Questa strategia farmacologica, proprio perché in grado di preservare la funzionalità delle cellule β residue, potrebbe essere presa in considerazione per un trattamento innovativo dei pazienti affetti da DMT1 (Citro et al. 2015).

Recentemente uno studio ha dimostrato che l'inibizione dei recettori delle chemochine CXCR1/2 è di fondamentale importanza per garantire la sopravvivenza di isole murine o umane dopo il loro trapianto (Citro et al. 2012). I recettori delle chemochine e i loro ligandi, infatti, sembrano svolgere un'azione negativa sul trapianto di isole ed è stato visto che le isole pancreatiche rilasciano grandi quantità di chemochine (CXCL1 e CXCL8) capaci di legarsi a questi recettori (Citro et al. 2012). L'inibizione farmacologica dell'asse CXCR1 e CXCR2 nei topi migliora il trapianto intraepatico di isole e riduce il reclutamento di leucociti polimorfonucleati e di cellule NKT (Citro et al. 2012).

In topi C57BL/6, affetti da diabete severo indotto con Alloxana, trapiantati con isole singeniche a livello del fegato e trattati con Reparixin, si è visto un migliore attecchimento delle isole rispetto al veicolo, sia nel caso del trapianto di un numero di un più basso numero di equivalenti insulari che nel caso di un numero più alto (Citro et al. 2012).

Tra le popolazioni di leucociti intraepatici, il recettore CXCR2 è espresso su tutti i leucociti polimorfonucleati e su una sottopopolazione di cellule NKT ed è responsabile del loro reclutamento. È stato studiato che entrambe queste categorie di cellule sono marcatamente aumentate nel fegato di topi C57BL/6 sottoposti a trapianto intraepatico di equivalenti insulari singenici C57BL/6 o allogenici BALB-c (Citro et al. 2012) e il trattamento con l'inibitore dei recettori CXCR, Reparixin, ne blocca l'incremento. I polimorfonucleati sono le cellule che, in maniera predominante, nei modelli sperimentali costituiscono l'infiltrato delle isole pancreatiche (Moberg et al. 2005) mentre le cellule NKT, se ridotte nel numero o inibite, ne migliorano l'attecchimento e ne ritardano il rigetto (Yasunami et al. 2005; Toyofuku et al. 2006; Matsuoka et al. 2010).

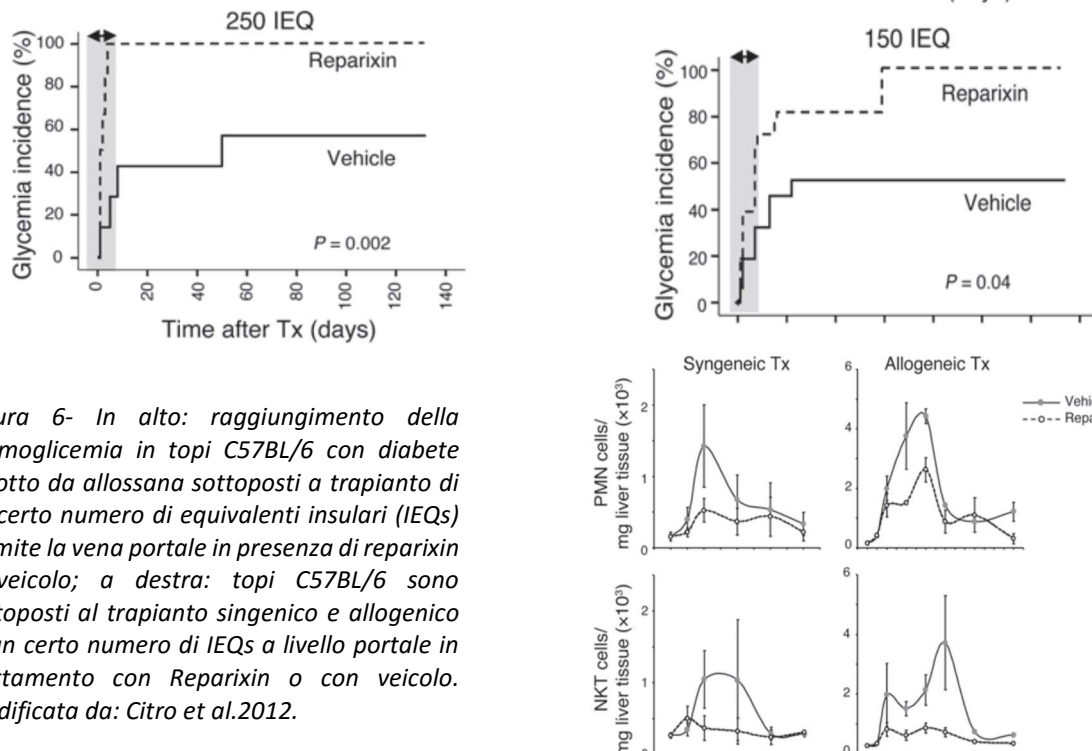


Figura 6- In alto: raggiungimento della normoglicemia in topi C57BL/6 con diabete indotto da allossana sottoposti a trapianto di un certo numero di equivalenti insulari (IEQs) tramite la vena portale in presenza di reparixin o veicolo; a destra: topi C57BL/6 sono sottoposti al trapianto singenico e allogeneico di un certo numero di IEQs a livello portale in trattamento con Reparixin o con veicolo. Modificata da: Citro et al.2012.

Uno studio clinico pilota, open-label, di fase 2 randomizzato, in seguito alla somministrazione di Reparixin nell'uomo, ha mostrato un esito migliore del trapianto di isole allogeniche mediante infusione singola. L'inibizione farmacologica dei recettori CXCR1/2 si è rivelata in grado di migliorare il post-trapianto nell'uomo (Citro et al. 2012). Prima del trapianto, è stato esaminato il rilascio di chemochine e citochine da parte di isole pancreatiche mantenute in coltura per una giornata. CXCL8, l'omologo funzionale della chemochina CXCL1 nel topo, rappresenta il fattore proinfiammatorio rilasciato in più grande quantità. Ad intervalli di tempo prestabiliti dopo il trapianto allogeneico, le concentrazioni sieriche delle chemochine sono state analizzate in pazienti con diabete di tipo 1 e trapiantati sotto due diversi regimi immunosoppressori: ATG (globulina antitimocitaria), FK506 (Tacrolimus), and MMF (Micofenolato Mofetile) e ATG, RAPA (Rapamicina), MMF insieme a bassi dosaggi di steroidi e ad un antagonista del recettore di IL-1. CXCL8 aumenta in maniera significativa dopo l'infusione di isole in entrambi i gruppi. Questo suggerisce che il rilascio della chemochina non è completamente controllato dal protocollo immunosoppressore standard che prevede l'impiego di agenti antinfiammatori (Citro et al. 2012). Lo studio è stato condotto allo scopo di provare l'efficacia e la sicurezza dell'inibizione dei recettori CXCR1/2 in pazienti trapiantati con infusione singola di isole e sottoposti ad un regime immunosoppressore che comprende ATG per l'induzione e FK506

con MMF per il mantenimento dell'immunosoppressione. In un certo numero di pazienti non è stato messo in atto altro intervento sperimentale, mentre in altri, per una settimana e dal giorno prima del trapianto, è stato somministrato Reparixin per via sottocutanea. Nei pazienti sottoposti al trattamento non si sono verificati effetti avversi dovuti al farmaco (Citro et al. 2012). Nessuno dei pazienti nel gruppo di controllo ha mostrato cellule β funzionanti un mese dopo il trapianto (non c'è stata, infatti, riduzione nella richiesta di insulina e le concentrazioni di peptide C sono risultate più basse di 0,9 ng/ml a causa del rigetto). Al contrario, i pazienti trattati con Reparixin hanno mostrato miglioramenti nel post-trapianto con un miglior controllo glicemico, una riduzione nella richiesta di insulina e livelli di peptide C superiori a 0,3 ng/ml (Citro et al. 2012). In questo studio un paziente non ha mostrato un miglioramento del post-trapianto anche se trattato con Reparixin registrando, al contrario, un aumento di circa 10 volte degli autoanticorpi Anti-GAD, subito dopo il trapianto. Con una seconda infusione di isole nei pazienti trattati con Reparixin è stato possibile raggiungere persino l'insulino-indipendenza (Citro et al. 2012). I risultati dello studio hanno rappresentato la prima conferma, dal punto di vista clinico, che l'inibizione del recettore delle chemochine potrebbe avere un certo beneficio terapeutico. Nonostante lo studio abbia coinvolto un piccolo numero di soggetti, esso ha dimostrato che la causa della disfunzione delle isole trapiantate nell'uomo è un processo infiammatorio non specifico mediato dai recettori CXCR1/2, il quale non può essere inibito in maniera adeguata da un regime immunosoppressore generalizzato.

Uno studio di fase 3 a doppio cieco, multicentrico, randomizzato e parallelo ha cominciato a confermare i risultati di questo studio pilota (Citro et al. 2012).

Reparixin, infatti, in fase di sviluppo clinico avanzato per il trapianto da donatore (allograpianto) in diversi Paesi Europei, è, attualmente, protagonista negli Stati Uniti di un trial clinico REP0112 per valutare il suo ruolo nel miglioramento dei risultati dell'autotrapianto di isole pancreatiche. In tutto il mondo, a partire dal 1977, anno in cui è stata realizzata la prima totale pancreasectomia con autotrapianto di isole, sono stati messi in atto più di 300 interventi di questo tipo con risultati promettenti sia per l'insulino-indipendenza che per la funzionalità delle isole trapiantate nel lungo termine (Rodriguez et al. 2003; Blondett et al. 2007). Nel trial REP0112 è previsto il coinvolgimento di 100 pazienti adulti con diabete iatrogeno, insorto cioè dopo rimozione chirurgica del pancreas, che riceveranno un autotrapianto di isole pancreatiche intraepatico. Sono coinvolti nel trial

pazienti destinati al trapianto di isole pancreatiche sottoposti a pancreatectomia totale. I pazienti verranno randomizzati in due gruppi: il primo riceverà il trattamento con Reparixin in infusione continua per sette giorni, il secondo un placebo (sito internet: www.businesswire.com).

“Per la prima volta si valutano negli Usa l’efficacia e la sicurezza di un farmaco espressamente studiato per migliorare i risultati del trapianto autologo di isole pancreatiche”- spiega Melena Bellin dello Schulze Diabetes Institute, University of Minnesota Medical School, e Primary Investigator del trial. “Lo studio intende determinare la percentuale di pazienti insulino-indipendenti ad un anno, principale endpoint di efficacia. Saranno inoltre monitorati il controllo glicemico e dell’emoglobina glicata, nonché il fabbisogno di insulina e i parametri infiammatori specifici” (sito internet: www.businesswire.com).

Secondo quanto affermato da Lorenzo Piemonti, Vicedirettore del “San Raffaele Diabetes Research Institute” e Direttore del programma trapianto di isole, - “si tratta del naturale completamento del trial di Fase III in corso in Europa per valutare l’efficacia e la sicurezza di Reparixin nel trapianto allogenico di isole pancreatiche e che coinvolge circa la metà di quanti annualmente vengono sottoposti a questa procedura terapeutica” (sito internet: www.businesswire.com). “L’avvio della Fase III, coniugato al riconoscimento della Orphan Drug Designation da parte della FDA e dell’EMA- dichiara Eugenio Aringhieri, Amministratore Delegato del Gruppo Dompé- è una tappa determinante nello sviluppo clinico di Reparixin per il miglioramento dell’efficacia del trapianto di isole pancreatiche e per la sua piena affermazione come concreta alternativa terapeutica per i pazienti affetti da diabete giovanile” (sito internet: www.portalediabete.org).

In ambito clinico, tuttavia, il trattamento con Reparixin del soggetto trapiantato non si è rivelato efficace in maniera assoluta nel prevenire il rigetto dopo trapianto intraportale di isole. Infatti, se isole umane sono trapiantate nei pazienti attraverso la vena portale, queste sono immediatamente attaccate dall’istantanea reazione infiammatoria mediata dal sangue (IBMIR) (Rena et al. 2016). È stato stimato che più del 50% delle isole infuse sono distrutte entro pochi minuti dal trapianto, soprattutto per via della IBMIR, “reazione infiammatoria istantanea mediata dal sangue” (Eich et al. 2007; Eriksson et al. 2009; Pepper et al. 2013). Subito dopo il trapianto intraportale si ha la stimolazione della risposta immunitaria innata. Le isole pancreatiche si ottengono con una serie di procedure che

determinano stress ossidativo e l'attivazione di una cascata di segnali che portano alla produzione di citochine dannose per le cellule β stesse. Una volta trapiantate, l'ambiente proinfiammatorio richiama le cellule infiammatorie dell'immunità innata le quali producono citochine che possono indurre necrosi e apoptosi delle cellule β (Pavlakis et al. 2007). Il contatto delle isole pancreatiche con le cellule del sangue del ricevente può portare a IBMIR, caratterizzata dall'attivazione della cascata della coagulazione e di quella del complemento, dal reclutamento di leucociti e macrofagi nel sito del trapianto, dalla deposizione di piastrine (Reffet et al. 2006). Da qui si generano mediatori dell'ossidazione che contribuiscono ad amplificare, a loro volta, il processo portando infine ad una maggior risposta immunitaria specifica. Tale processo determina la formazione di ischemie epatiche a causa di trombi dati dalle isole. L'apoptosi e la necrosi risultanti nel tessuto epatico circostante potrebbero portare ad una successiva distruzione delle isole di Langerhans trapiantate. Tali fenomeni sono ora generalmente attenuati dall'utilizzo di terapia profilattica anticoagulante prima del trapianto, poi con citoprotettori, eparina e la somministrazione di insulina per le prime settimane successive al trapianto (Pavlakis et al. 2007). Successivamente, nonostante venga superata questa fase iperacuta, si riscontra nel tempo un decremento del controllo glicemico che riflette una diminuzione nella funzionalità delle isole dovuta anche ad una distruzione auto- o alloimmune (Ryan et al. 2005). Nella seconda fase le isole sono il bersaglio della risposta immunitaria specifica, che può provocare il rigetto acuto del trapianto.

Tutte queste evidenze hanno indotto un gruppo di ricercatori a testare quest'anno, con uno studio recentissimo, il ruolo di Reparixin nuovamente in ambito preclinico. L'allograpianto è stato realizzato anche in una sede diversa da quella epatica, ovvero nello spazio sottocapsulare renale (Rena et al. 2016). Gli effetti di Reparixin sulla sopravvivenza nel post-trapianto sono stati confrontati con quelli del solo Ig CTLA-4, essendo nota l'efficacia di quest'ultimo in monoterapia nel prolungare la sopravvivenza del trapianto a livello sottocapsulare renale e nel migliorare la tolleranza al glucosio (Pawlick et al. 2014). Reparixin è stato, dunque, somministrato in combinazione con l'Ig CTLA-4, al fine di provare gli effetti di un regime immunosoppressore più forte. L'Ig CTLA-4 è un inibitore competitivo della via metabolica di CD28/B7 che funziona da agente immunosoppressore ed è in grado di prolungare la sopravvivenza di un organo trapiantato (Najafian et al. 2000)

Le isole pancreatiche sono state ricavate da topi maschi BALB/c attraverso un processo di

digestione del pancreas con enzima liberasi in soluzione salina. In topi maschi C57BL/6 è stato indotto il diabete con somministrazione intraperitoneale di STZ. Gli animali sono stati considerati diabetici quando i livelli di glucosio nel sangue sono risultati superiori o uguali a 18 mmol/L (324 mg/dl) (Rena et al. 2016). In topi C57BL/6 sono state trapiantate isole BALB/c; è stato somministrato il Reparixin per via sottocutanea e ad una dose di 8 mg/Kg/ora dal giorno prima del trapianto fino a sei giorni dopo il trapianto; Ig CTLA-4 da solo è stato somministrato per iniezione intraperitoneale ad una dose di 10 mg/Kg a giorni alterni; Reparixin e Ig CTLA-4 sono stati somministrati anche in combinazione. La funzione del trapianto di isole nei topi con diabete farmaco-indotto viene valutata attraverso la misurazione del glucosio nel sangue non a digiuno tre volte a settimana. Il rigetto è stato stabilito nel momento in cui due letture consecutive sono risultate superiori o uguali a 11,1 mmol/L (o 263 mg/dL) (Rena et al. 2016).

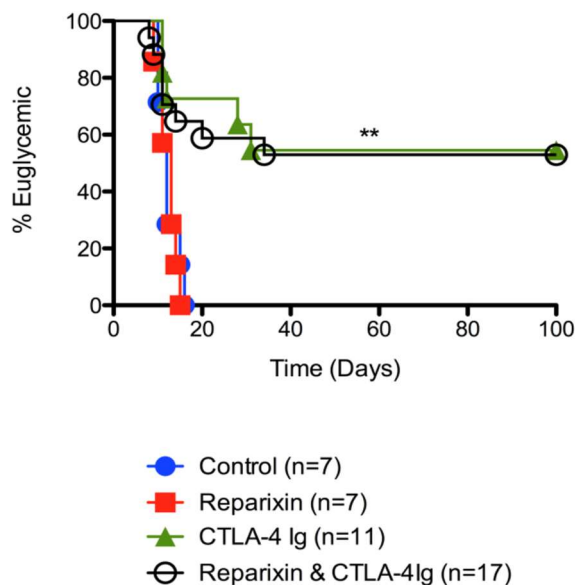


Figura 7- Efficacia di un trapianto allogenico di isole a livello subcapsulare renale in topi in trattamento con la combinazione Ig CTLA-4 e Reparixin. Da Rena et al. 2016.

trattato con solo Reparixin (Rena et al. 2016). Ad ogni modo, Ig CTLA-4 da solo o in combinazione con Reparixin determina un aumento della sopravvivenza se confrontata con quella ottenuta dal trattamento immunosoppressivo con solo Reparixin o con quella che si ha nel gruppo di controllo (Rena et al. 2016).

Dallo studio è emerso un miglioramento e un incremento della sopravvivenza del trapianto di isole a livello subcapsulare renale quando Reparixin è somministrato in combinazione con Ig CTLA-4. L'entità del miglioramento non è tanto più consistente di quella ottenuta con l'Ig CTLA-4 usato in monoterapia. Per questo motivo, non ci sono né un effetto cumulativo né delle interazioni dichiarate tra i due agenti. Non sono state riscontrate differenze significative tra il controllo e il gruppo

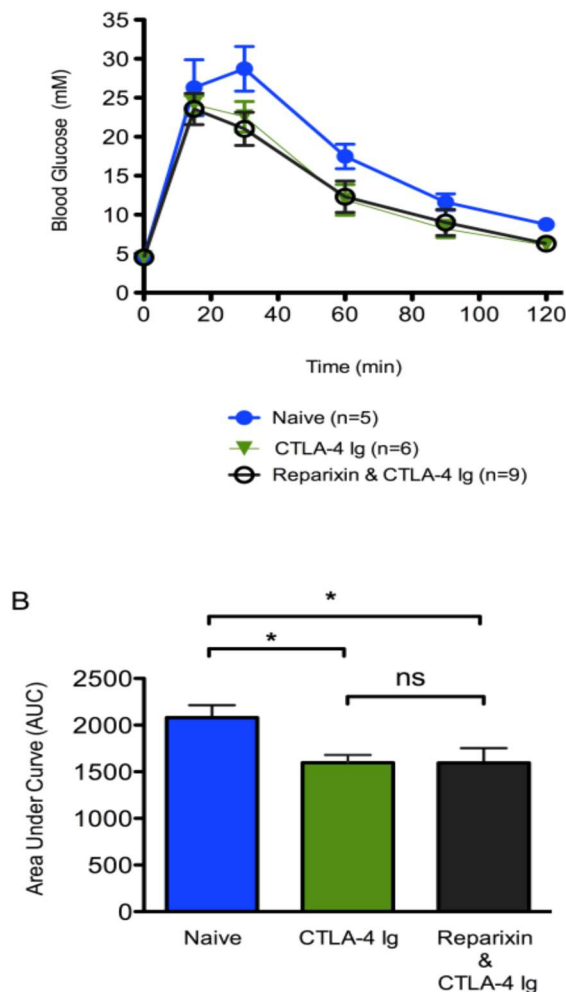


Figura 8- Test di tolleranza al glucosio intraperitoneale su topi sottoposti a trapianto allogenico di isole a livello sottocapsulare renale in trattamento con la combinazione Reparixin- Ig CTLA-4. Da Rena et al. 2016.

gruppo trattato con Ig CTLA-4 e il gruppo trattato con Ig CTLA-4-Reparixin se confrontati con il controllo non trattato C57BL/6 oppure con il controllo BALB/c sottoposto a trapianto singenico, ma non si sono riscontrate significative differenze tra il trattamento con solo Ig CTL-4 e quello combinato (Rena et al. 2016). Inoltre è stato visto che gli animali con livelli glicemici nella norma, se 100 giorni dopo il trapianto sono sottoposti ad un intervento di nefrectomia, diventano iperglicemici. Gli animali sono sottoposti a monitoraggio per cinque giorni e l'iperglicemia che si manifesta giunge a conferma dell'azione benefica del trapianto (Rena et al. 2016).

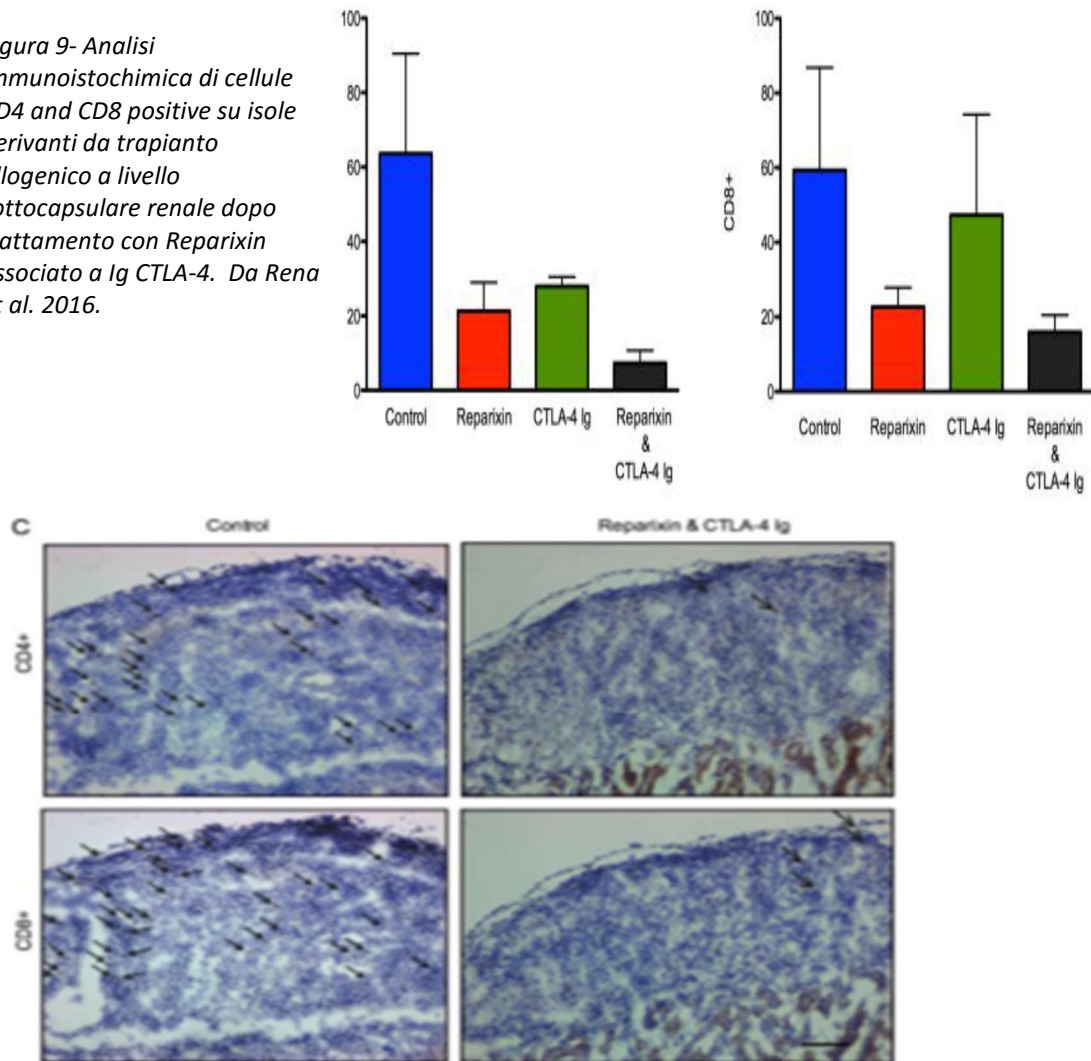
Nello studio il siero di topi trapiantati allogenicamente a livello subcapsulare renale e trattati con placebo (gruppo di controllo), Reparixin e Ig CTLA-4 (in combinazione e monoterapia) è stato raccolto ed analizzato 24 ore e 7 giorni dopo il trapianto. I livelli sierici

La funzionalità in vivo delle isole pancreatiche è stata analizzata attraverso il test di tolleranza al glucosio intraperitoneale (IPGTT) in topi euglicemici che hanno subito il trapianto a livello sottocapsulare renale, 60 giorni dopo il trapianto (Rena et al. 2016). Dallo studio non sono emerse significative differenze tra i tre gruppi di controllo: topi non trattati C57BL/6, topi non trattati BALB/c e topi BALB/c che hanno ricevuto un trapianto singenico. I topi BALB/c non trattati hanno mostrato un miglioramento della tolleranza al glucosio se confrontata con gli altri due gruppi di controllo, anche se non significativa. C'è stata una significativa differenza di migliorata tolleranza al glucosio tra il

di IFN- γ , una citochina proinfiammatoria, sono risultati molto simili in tutti i gruppi 24 ore dopo il trapianto e significativamente più bassi nel gruppo sottoposto a trattamento combinato rispetto al gruppo di controllo 7 giorni dopo. Le concentrazioni sieriche delle altre citochine TNF α , IL-1 β e IL-10 sono rimaste invariate dopo il trapianto, se confrontate con i valori nel gruppo di controllo, anche se si è visto un leggero aumento nei livelli di TNF- α nei gruppi trattati con solo Ig CTLA-4 a 24 ore dal trapianto. I livelli di citochina IL12p70 sono risultati simili nei riceventi il trapianto a 24 ore dal trapianto, anche se 7 giorni dopo il trapianto, quando è stato somministrato Ig CTLA-4 in combinazione con Reparixin, sono aumentati in maniera significativa. Si sono verificati degli incrementi nei livelli sierici di IL-2, IL-5 dopo trattamento in tutti i gruppi, con un aumento significativo di IL-5 nel gruppo trattato solo con Ig CTLA-4 a 24 ore dal trapianto. KC GRO, una chemochina derivata dai cheratinociti/oncogene correlato alla crescita, nota anche come CXCL1, e IL-6 sono aumentati nel siero a 24 ore dal trapianto nel gruppo trattato con solo Ig CTLA-4, se confrontato con il gruppo trattato solo con Reparixin e con il controllo. Tuttavia, i livelli sierici di queste citochine nei vari gruppi di trattamento sono diminuiti significativamente entro sette giorni. Inoltre, a 24 ore dal trapianto i livelli sierici di IL-4 nel siero dei topi riceventi risultano particolarmente simili tra i diversi gruppi di trattamento fino ad essere talmente bassi a sette giorni dal trapianto da non essere addirittura rilevabili (Rena et al. 2016).

Durante lo studio è stato eseguito, inoltre, un esame immunohistologico su isole trapiantate allogenicamente a livello subcapsulare e prelevate dai topi 7 giorni dopo l'intervento. Sono emersi alcuni effetti benefici derivanti dal trattamento con Reparixin. È stata riscontrata, infatti, una riduzione del numero di cellule CD4⁺ T in tutti i gruppi di trattamento (Reparixin in monoterapia, Ig CTLA-4 in monoterapia e Reparixin-Ig CTLA-4) rispetto alla popolazione cellulare rilevabile nel gruppo di controllo. Allo stesso modo, nei trapianti prelevati da animali trattati con Reparixin le cellule T CD8⁺ sono risultate diminuite in numero. Un decremento più consistente è stato, tuttavia, riscontrato nel gruppo trattato con Reparixin e Ig CTLA-4 per entrambe le popolazioni cellulari di tipo T (Rena et al. 2016).

Figura 9- Analisi immunohistochimica di cellule CD4 and CD8 positive su isole derivanti da trapianto allogenico a livello sottocapsulare renale dopo trattamento con Reparixin associato a Ig CTLA-4. Da Rena et al. 2016.



Da un'analisi di immunofluorescenza è stato possibile studiare la popolazione recettoriale CXCR1/2 in trapianti allogenici a livello subcapsulare renale una settimana dopo il trattamento con Ig CTLA-4 e Reparixin. La popolazione cellulare CXCR1+ è risultata più bassa nei gruppi di trattamento rispetto al controllo e il numero di cellule CXCR2+, rispetto alle cellule CXCR1+, è diminuito maggiormente con il trattamento con solo Reparixin. Le cellule CXCR2+, dunque, si sono rivelate più basse sia nel gruppo trattato con solo Reparixin che in quello trattato con Reparixin-Ig CTLA-4 (Rena et al. 2016).

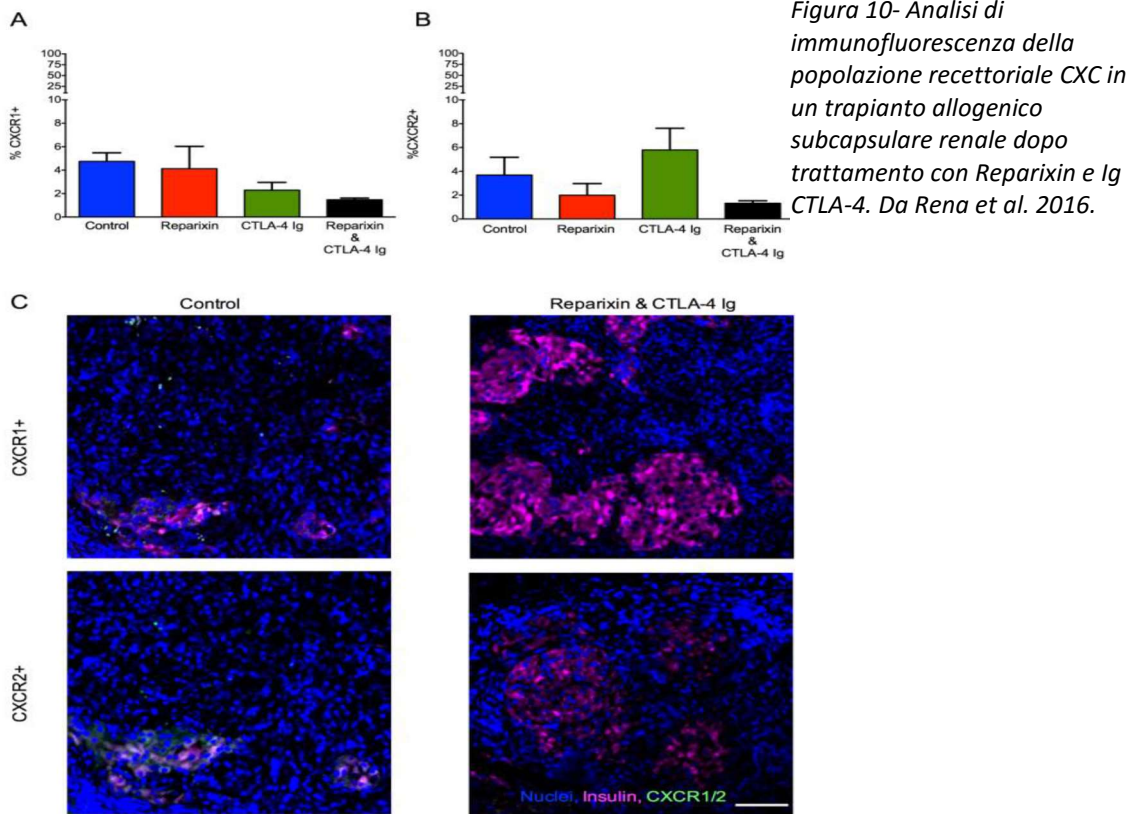


Figura 10- Analisi di immunofluorescenza della popolazione recettoriale CXC in un trapianto allogenico subcapsulare renale dopo trattamento con Reparixin e Ig CTLA-4. Da Rena et al. 2016.

Nello studio condotto da Rena e dai suoi collaboratori, il trattamento combinato è stato realizzato anche in topi sottoposti ad allotrapianto di isole a livello intraportale. In questi modelli, tuttavia, non sono state riscontrate differenze significative tra i diversi gruppi di trattamento nella sopravvivenza del trapianto (Rena et al. 2016).

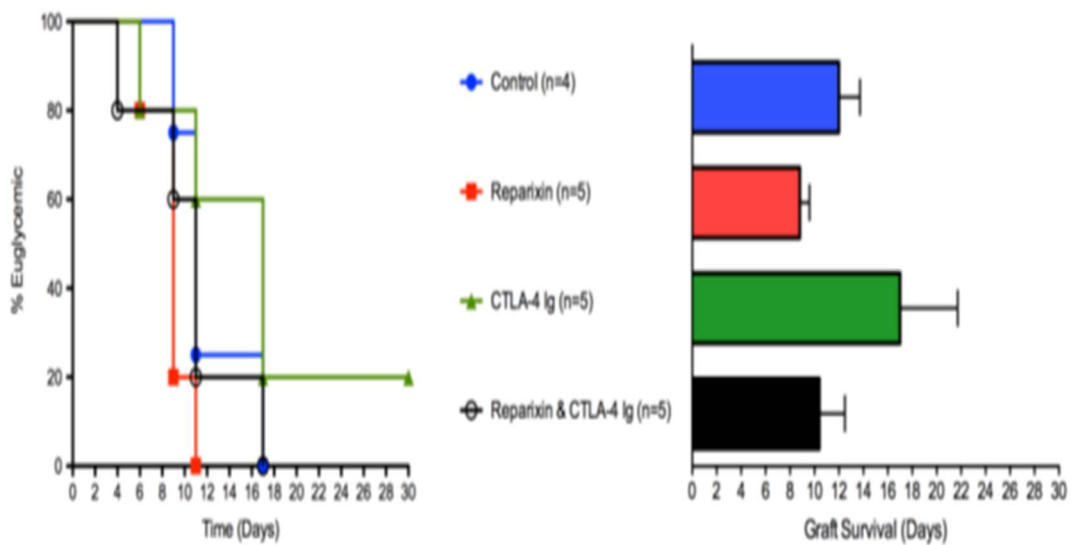


Figura 11- Efficacia del trapianto allogenico intraportale di isole in topi in trattamento combinato con Reparixin e Ig CTLA-4. Da Rena et al. 2016.

In questo studio, Reparixin-somministrato in combinazione con l'Ig CTLA-4- non ha determinato un aumento della sopravvivenza dell'allograft eseguito per via intraportale, ma, dai risultati ottenuti con il trapianto singenico di isole per via intraportale, è emerso il potenziale anti-rigetto dell'inibitore dei recettori CXC in un tipo di trapianto di isole meno immunogeno (Citro et al.2012). Proprio questo costituisce l'argomento di ricerca dello studio clinico internazionale in cieco, controllato e randomizzato attualmente in corso (Rena et al. 2016).

CONCLUSIONI

Il trapianto di isole pancreatiche si è rivelato un approccio terapeutico innovativo nel trattamento di selezionati pazienti affetti da diabete di tipo 1 non adeguatamente controllato dal trattamento intensivo insulinico. Permette, infatti, di ottenere un miglior controllo glicemico, di prevenire le ipoglicemie, di ridurre il rischio di complicanze secondarie al diabete e di migliorare qualità e aspettative di vita del paziente affetto dalla malattia. Si propone, come obiettivo finale, l'indipendenza del paziente dall'autosomministrazione di insulina. I risultati conseguibili, però, possono essere compromessi dalla reazione infiammatoria che si realizza immediatamente dopo l'infusione insulare sia nel trapianto da donatore che nel trapianto autologo, anche se in misura minore. Il farmaco Reparixin, bloccando la risposta immunitaria del ricevente che compromette precocemente la funzionalità delle isole infuse, può migliorare l'efficacia della procedura, aumentando la sopravvivenza del trapianto nel lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

- American Diabetes Association. *“Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus”*. Diabetes Care. 2010 Jan; 33(Suppl 1): S62–S69.
- Liberatore RR, Cardoso-Demartin AA, Ono AHA, et al. *“Prevalência de obesidade em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1”*. Rev Paul Pediatr. 2008; 26:142–5.
- Teles SAS, Fornés NS. *“Consumo alimentar e controle metabólico em crianças e adolescentes portadores de diabetes melito tipo1”*. Rev Paul Pediatr. 2011; 29: 378–84.
- Reddi Rani, Jasmina Begum. *“Screening and Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus, Where Do We Stand”*. Journal of Clinical and Diagnostic Research 10(4): QE-01-QE04 · April 2016.
- American Diabetes Association. *“Classification and Diagnosis of Diabetes”*. Diabetes Care Volume 39, Supplement 1, January 2016.
- Anna Poradzka, Jakub Wro-Ski, Mariusz Jasik, Waldemar Karnafel, Piotr Fiedor. *“Insulin Replacement Therapy in patients with type 1 diabetes by isolated pancreatic islet transplantation”*. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research. 2013; Vol. 70 No. 6 pp. 943-950.
- Savita Shahani, Lokesh Shahani. *“Use of insulin in diabetes: a century of treatment”*. Hong Kong Med J 2015;21: 553–9.
- Phillips JE, Couper JJ, Penno MAS, Harrison LC, ENDIA Study Group. *“Type 1 diabetes: a disease of developmental origins”*. Pediatr Diabetes. 2016 Aug 15.
- DIAMOND Project Group. *“Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999”*. Diabet Med. 2006 Aug;23(8):857-66.
- Aleksandra Krzewska, Iwona Ben-Skowronek. *“Effect of Associated Autoimmune Diseases on Type 1 Diabetes Mellitus Incidence and Metabolic Control in Children and Adolescents”*. BioMed Research International, vol. 2016, Article ID 6219730, 12 pages, 2016.
- International Expert Committee. *“International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes”*. Diabetes Care. 2009 Jul; 32(7): 1327–1334.

- American Diabetes Association. *“Standards of Medical Care in Diabetes—2014”*. Diabetes Care 2014 Jan; 37(Supplement 1): S14-S80.
- Anette G Ziegler, Gerald T Nepom, *“Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes”*. Immunity. 2010 April 23; 32(4): 468–478.
- Leslie RD, Williams R, Pozzilli P. *“Clinical review: Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: one end of the rainbow”*. J Clin Endocrinol Metab. 2006 May;91(5):1654-9.
- Pozzilli P, Strollo R, Barchetta I. *“Natural history and immunopathogenesis of type 1 diabetes”*. Endocrinol Nutr.2009 Dec;56 Suppl 4:50-2.
- Alvin C. Powers. *“Diabete mellito”*, in: Dan L. Longo, Dennis L. Kasper, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Joseph Loscalzo, *“Harrison- Principi di Medicina Interna”*. Milano. Casa Editrice Ambrosiana. 2012.
- Pociot F, Lernmark Å. *“Genetic risk factors for type 1 diabetes”*. Lancet. 2016 Jun 4;387(10035):2331-9.
- Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, Yu L, Miao D, Erlich HA, Fain PR, Barriga KJ, Norris JM, Rewers MJ, Eisenbarth GS. *“Extreme genetic risk for type 1A diabetes”*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 19;103(38):14074-9.
- S. Eringsmark Regnéll, Å. Lernmark. *“The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes”*. Diabet Med. 2013 Feb; 30(2): 155–160.
- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. *“A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis”*. Am. J. Hum. Genet. 2004; 75:330–337.
- Christie M R, Brown T J, Cassidy D. *“Binding of antibodies in sera from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients to glutamate decarboxylase from rat tissues. Evidence for antigenic and non-antigenic forms of the enzyme”*. Diabetologia (1992) 35: 380.

- Christie M R, Hollands J A, Brown T J, Michelsen B K, Delovitch T L. "Detection of pancreatic islet 64,000 M(r) autoantigens in insulindependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase". J Clin Invest. 1993 Jul; 92(1): 240–248.
- Pietropaolo M, Towns R, Eisenbarth GS. "Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes". Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Oct 1;2(10).
- Lernmark A, Larsson H E. "Immune therapy in type 1 diabetes mellitus". Nat Rev Endocrinol. 2013 Feb;9(2):92-103.
- Roep B O, and Tree T I. "Immune modulation in humans: implications for type 1 diabetes mellitus". Nat Rev Endocrinol. 2014 Apr;10(4):229-42.
- Jaber-Douraki M, Liu SW, Pietropaolo M, Khadra A. "Autoimmune responses in T1DM: quantitative methods to understand onset, progression, and prevention of disease". Pediatr Diabetes. 2014 May;15(3):162-74.
- Noel G. Morgan, Pia Leete, Alan K. Foulis, Sarah J. Richardson. "Critical review: Islet Inflammation in Human Type 1 Diabetes Mellitus". International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Volume 66, Number 11, November 2014; Pages 723–734.
- Nokoff N, Rewers M. "Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals". Ann N Y Acad Sci. 2013 Apr; 1281:1-15.
- Bonifacio E, Krumsiek J, Winkler C, Theis F J, Ziegler A G. "A strategy to find gene combinations that identify children who progress rapidly to type 1 diabetes after islet autoantibody seroconversion", Acta Diabetol (2014) 51: 403.
- Taplin CE, Barker JM. "Autoantibodies in type 1 diabetes". Autoimmunity. 2008 Feb;41(1):11-8.
- Rewers M, Ludvigsson J. "Environmental risk factors for type 1 diabetes". Lancet. 2016 Jun 4;387(10035):2340-8.
- Majedah A. Rasoul, Maria Al-Mahdi, Hessa Al-Kandari, Gursev S. Dhaunsi, Mohammad Z. Haider. "Low serum vitamin-D status is associated with high prevalence and early onset of type-1 diabetes mellitus in Kuwaiti children". Rasoul et al. BMC Pediatrics (2016) 16:95.

- Willcox A, Richardson S J, Bone A J, Foulis A K, Morgan N G. *“Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes”*. Clin Exp Immunol. 2009 Feb;155(2):173-81.
- Valle A, Giamporcaro G M, Scavini M, Stabilini A, Grogan P, et al. *“Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes”*. Diabetes. 2013 Jun;62(6):2072-7.
- Rodriguez-Calvo T, Ekwall O, Amirian N, Zapardiel-Gonzalo J, von Herrath M G. *“Increased immune cell infiltration of the exocrine pancreas: a possible contribution to the pathogenesis of type 1 diabetes”*. Diabetes. 2014 Nov;63(11):3880-90.
- Dotta F, Censini S, van Halteren A G, Marselli L, Masini M, et al. *“Coxsackie B4 virus infection of b cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients”*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 20;104(12):5115-20.
- Daneman D. *“Type 1 diabetes”*. Lancet. 2006 Mar 11;367(9513):847-58.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. *“Type 1 diabetes”*. Lancet. 2014; 383:69–82.
- International diabetes federation (IDF). *“Diabetes in children: epidemiology”*. Pediatr Diabetes.2007; 8(suppl.8):10-8.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS. *“Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment”*. Lancet. 2001 Jul 21;358(9277):221-9.
- Shaltout A, Channanath AM, Thanaraj TA, Omar D, Abdulrasoul M, Zanaty N, Almahdi M, Alkandari H, AlAbdulrazzaq D, d'Mello L, Mandani F, Alanezi A, AlBasiry E, Alkhawari M. *“Ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes mellitus among children: a study from Kuwait”*. Sci Rep. 2016 Jun 22; 6:27519.
- Li X, Cheng J, Zhou Z. *“Revisiting multiple models of progression of β -cell loss of function in type 1 diabetes: Significance for prevention and cure”*. J Diabetes. 2016 Jul;8(4):460-9.
- Yosae S, Akbari Fakhrabadi M, Shidfar F. *“Positive evidence for vitamin A role in prevention of type 1 diabetes”*. World J Diabetes. 2016 May 10;7(9):177-88.
- Hirsch IB. *“Clinical review: realistic expectations and practical use of continuous glucose monitoring for the endocrinologist”*. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94:2232–38.

- Bergenstal RM, Tamborlane WV, Ahmann A, Buse JB, Dailey G, Davis SN, Joyce C, Peoples T, Perkins BA, Welsh JB, Willi SM, Wood MA; STAR 3 Study Group. *“Effectiveness of sensor-augmented insulin-pump therapy in type 1 diabetes”*. N Engl J Med. 2010; 363:311–20.
- Yeh HC, Brown TT, Maruthur N, Ranasinghe P, Berger Z, Suh YD, Wilson LM, Haberl EB, Brick J, Bass EB, Golden SH. *“Comparative effectiveness and safety of methods of insulin delivery and glucose monitoring for diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis”*. Ann Intern Med. 2012 Sep 4;157(5):336-47.
- Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group. *“Prolonged nocturnal hypoglycemia is common during 12 months of continuous glucose monitoring in children and adults with type 1 diabetes”*. Diabetes Care. 2010; 33:1004–8.
- Hirsch IB. *“Low glucose suspend: ready for prime time?”*. Diabetes Technol Ther. 2012; 14:201–2.
- Bruce Buckingham, H. Peter Chase, Eyal Dassau, Erin Cobry, Paula Clinton, Victoria Gage, Kimberly Caswell, APRN, John Wilkinson, Fraser Cameron, Hyunjin Lee, B. Wayne Bequette, Francis J. Doyle III. *“Prevention of nocturnal hypoglycemia using predictive alarm algorithms and insulin pump suspension”*. Diabetes Care. 2010; 33:1013–17.
- Garg S, Brazg RL, Bailey TS, Buckingham BA, Slover RH, Klonoff DC, Shin J, Welsh JB, Kaufman FR. *“Reduction in duration of hypoglycemia by automatic suspension of insulin delivery: the in-clinic ASPIRE study”*. Diabetes Technol Ther. 2012; 14:205–9.
- Heller S, Buse J, Fisher M, Garg S, Marre M, Merker L, Renard E, Russell-Jones D, Philotheou A, Francisco AM, Pei H, Bode B; BEGIN Basal-Bolus Type 1 Trial Investigators. *“Insulin degludec, an ultra-longacting basal insulin, versus insulin glargine in basal-bolus treatment with mealtime insulin aspart in type 1 diabetes (BEGIN Basal-Bolus Type 1): a phase 3, randomised, open-label, treat-to-target non-inferiority trial”*. Lancet. 2012; 379:1489–97.
- Ryan G, Briscoe TA, Jobe L. *“Review of pramlintide as adjunctive therapy in treatment of type 1 and type 2 diabetes”*. Drug Des Devel Ther. 2009; 2:203–14.

- Garima Sharma, Ashish Ranjan Sharma, Ju-Suk Nam, George Priya C. Doss, Sang-Soo Lee, Chiranjib Chakraborty. *"Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes"*. J Nanobiotechnol (2015) 13:74.
- Michael Stumvoll, Barry J Goldstein, Timon W van Haeften. *"Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy"*. Lancet. 2005 Apr 9-15;365(9467):1333-46.
- Boden G. *"Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM"*. Diabetes.1997; 46: 3–10.
- Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. *"The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles"*. Diabetes. 1999; 48: 491–98.
- Hull RL, Westermark GT, Westermark P, Kahn SE. *"Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes"*. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89: 3629–43.
- Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. *"Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes"*. Cell. 1999; 96: 329–39.
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. *"A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance"*. Mol Cell. 1998; 2: 559–69.
- Bluher M, Kahn BB, Kahn CR. *"Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue"*. Science. 2003; 299: 572–74.
- Goldstein BJ. *"Protein-tyrosine phosphatases and the regulation of insulin action"*, In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text. Philadelphia: Lippincott, 2003: 255–68.
- Zhande R, Mitchell JJ, Wu J, Sun XJ. *"Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1"*. Mol Cell Biol 2002; 22: 1016–26.
- Ravussin E, Smith SR. *"Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus"*. Ann N Y Acad Sci. 2002; 967: 363–78.
- Rajala MW, Scherer PE. *"Minireview: the adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis"*. Endocrinology. 2003; 144: 3765–73.

- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. *“Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade”*. Diabetes. 1999; 48: 1270–74.
- Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J. *“Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes”*. Mol Endocrinol. 2004; 18: 2024–34.
- Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. *“Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α ”*. Diabetes. 2002; 51: 2005–11.
- Moller DE. *“Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes”*. Trends Endocrinol Metab. 2000; 11: 212–17.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. *“Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes”*. J Biol Chem. 2003; 278:13740–46.
- Krebs DL, Hilton DJ. *“A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling”*. Sci STKE. 2003 Feb 11;2003(169):PE6.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. *“Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase”*. Nat Med. 2002; 8: 1288–95.
- Goldstein BJ, Scalia R. *“Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function”*. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:2563–68.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. *“Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action”*. J Clin Invest. 2001; 108: 1167–74.
- Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. *“The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways”*. J Biol Chem. 2002; 277: 25226–32.

- Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG 4th, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldman MH. *“Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo: Role of mitochondrial reactive nitrogen species”*. J Biol Chem. 2004; 279: 43940–51.
- Karin M, Delhase M. *“The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling”*. Semin Immunol. 2000; 12: 85–98.
- Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. *“The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta”*. Nature. 1998; 396: 77–80.
- Shoelson SE, Lee J, Yuan M. *“Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance”*. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003; 27 (suppl 3): S49–52.1344.
- Havel PJ. *“Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin”*. Curr Opin Lipidol. 2002; 13: 51–59.
- Wellen KE, Hotamisligil GS, *“Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue”*, J Clin Invest 2003; 112: 1785–88.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. *“Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes”*. Diabetes. 2002; 51: 2944–50.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. *“Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes”*. N Engl J Med. 2004; 350: 664–71.
- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ. *“Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1”*. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 8466–71.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. *“PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes”*. Nat Genet. 2003; 34: 267–73.

- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. *"Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection"*. Diabetes. 2003; 52: 581–87.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. *"Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes"*. Diabetes. 2004; 53 (suppl 1): S119–24.
- Yki-Jarvinen H. *"Thiazolidinediones"*. N Engl J Med. 2004; 351:1106–18.
- Bailey CJ, Turner RC. *"Metformin"*. N Engl J Med. 1996; 334: 574–79.
- Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. *"Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus"*. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81: 4059–67.
- Mamputu JC, Wiernsperger NF, Renier G. *"Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence"*. Diabetes Metab. 2003; 29: 6S71–76.
- Chiasson JL, Gomis R, Hanefeld M, Josse RG, Karasik A, Laakso M. *"The STOP-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus"*. Diabetes Care. 1998; 21: 1720–25.
- Rendell M. *"The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus"*. Drugs. 2004; 64: 1339–58.
- Dandona P, Aljada A, Dhindsa S, Garg R. *"Insulin as an antiinflammatory and antiatherosclerotic hormone"*. Clin Cornerstone. 2003; suppl 4: S13–20.
- Liu G. *"Technology evaluation: ISIS-113715, Isis"*. Curr Opin Mol Ther. 2004; 6: 331–36.
- Beckman JA, Creager MA, Libby P. *"Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management"*. JAMA. 2002; 287: 2570–81.
- Colwell JA. *"Aspirin therapy in diabetes"*. Diabetes Care. 2004; 27 (suppl 1): S72–73.
- Heart Protection Study Collaborative Group. *"MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial"*. Lancet. 2002; 360: 7–22.
- Grundy SM, Vega GL, McGovern ME, Tulloch BR, Kendall DM, Fitz-Patrick D, Ganda OP, Rosenson RS, Buse JB, Robertson DD, Sheehan JP; Diabetes Multicenter

- Research Group. *“Efficacy, safety, and tolerability of once-daily niacin for the treatment of dyslipidemia associated with type 2 diabetes: results of the assessment of diabetes control and evaluation of the efficacy of niacin trial”*. Arch Intern Med. 2002; 162: 1568–76.
- Kitabchi AE, Umpierrez GE, Miles JM, Fisher JN. *“Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes”*. Diabetes care. 2009; 32:1335-1343.
 - Abbas E. Kitabchi, Guillermo E. Umpierrez, Mary Beth Murphy, Robert A. Kreisberg. *“Hyperglycemic Crises in Adult Patients With Diabetes”*. Diabetes Care 2006 Dec; 29(12): 2739-2748.
 - Gosmanov AR, Gosmanova EO, Kitabchi AE. *“Hyperglycemic Crises: Diabetic Ketoacidosis (DKA), And Hyperglycemic Hyperosmolar State (HHS)”*, In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, SourceEndotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. 2015 May 19.
 - Stentz FB, Umpierrez GE, Cuervo R, Kitabchi AE. *“Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises”*. Diabetes.2004; 53:2079-2086.
 - Schade DS, Eaton RP. *“The temporal relationship between endogenously secreted stress hormones and metabolic decompensation in diabetic man”*. J Clin Endocrinol Metab. 1980; 50:131-136.
 - McGarry JD, Dobbins RL. *“Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion”*. Diabetologia. 1999; 42:128-138.
 - Aastha Chawla, Rajeev Chawla, Shalini Jaggi. *“Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?”*. Indian J Endocrinol Metab. 2016 Jul-Aug; 20(4): 546–551.
 - *“Standards of medical care in diabetes-2016: Summary of revisions”*. Diabetes Care. 2016;39(Suppl 1): S4–5.
 - ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F. *“Intensive blood glucose control and*

- vascular outcomes in patients with type 2 diabetes*". N Engl J Med. 2008 Jun 12;358(24):2560-72.
- Kalofoutis C, Piperi C, Kalofoutis A, Harris F, Phoenix D, Singh J. *"Type II diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: Current therapeutic approaches"*. Exp Clin Cardiol. 2007; 12:17–28.
 - R. Simo, C. Hernandez. *"Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives"*. Endocrinology & Metabolism, vol. 25, no. 1, pp. 23–33, 2014.
 - N Cheung, P Mitchell, T Y Wong. *"Diabetic retinopathy,"*. Lancet, vol. 376, no. 9735, pp. 124–136, 2010.
 - Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, Chen SJ, Dekker JM, Fletcher A, Grauslund J, Haffner S, Hamman RF, Ikram MK, Kayama T, Klein BE, Klein R, Krishnaiah S, Mayurasakorn K, O'Hare JP, Orchard TJ, Porta M, Rema M, Roy MS, Sharma T, Shaw J, Taylor H, Tielsch JM, Varma R, Wang JJ, Wang N, West S, Xu L, Yasuda M, Zhang X, Mitchell P, Wong TY; Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. *"Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy"*. Diabetes Care. 2012 Mar; 35(3):556-64.
 - Tang SCW, Chan GCW, Lai KN. *"Recent advances in managing and understanding diabetic nephropathy"* [version 1; referees: 3 approved]. F1000Research 2016, 5(F1000 Faculty Rev):1044.
 - Cade WT. *"Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting"*. Phys Ther. 2008; 88:1322–35.
 - Tong PC, Kong AP, So WY, Ng MH, Yang X, Ng MC, Ma RC, Ho CS, Lam CW, Chow CC, Cockram CS, Chan JC. *"Hematocrit, independent of chronic kidney disease, predicts adverse cardiovascular outcomes in chinese patients with type 2 diabetes"*. Diabetes Care. 2006 Nov;29(11):2439-44.
 - Maren Volmer-Thole, Ralf Lobmann. *"Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome"*. Int. J. Mol. Sci. 2016; 17(6), 917.
 - Francisco Westermeier, Jaime A. Riquelme, Mario Pavez, Valeria Garrido, Ariel Díaz, Hugo E. Verdejo, Pablo F. Castro, Lorena García, Sergio Lavandero *"New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy"*. Front Physiol. 2016; 7: 125.

- Bugger H, Abel E D, *“Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy”*. Diabetologia. 2014 Apr; 57(4): 660–671.
- Eckel RH, Eisenbarth GS. *“Autoimmune diabetes inflames the heart”*. Sci Transl Med. 2012 Jun 13;4(138):138fs18.
- Gottumukkala RV, Lv H, Cornivelli L, Wagers AJ, Kwong RY, Bronson R, Stewart GC, Schulze PC, Chutkow W, Wolpert HA, Lee RT, Lipes MA. *“Myocardial infarction triggers chronic cardiac autoimmunity in type 1 diabetes”*. Sci Transl Med. 2012 Jun 13;4(138):138ra80.
- Shruti Mittal, Paul Johnson, Peter Friend. *“Pancreas Transplantation: Solid Organ and Islet”*. Cold Spring Harb Perspect Med.2014;4: a 015610.
- Cosio FG, Hickson LJ, Griffin MD, Stegall MD, Kudva Y. *“Patient survival and cardiovascular risk after kidney transplantation: The challenge of diabetes”*. Am J Transplant. 2008; 8: 593–599.
- Taber DJ, Meadows HB, Pilch NA, Chavin KD, Baliga PK, Egede LE. *“Pre-existing diabetes significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation”*. Clin Transplant. 2013;27: 274–282.
- CM Chan, Thomas MY Chim, KC Leung, CH Tong, TF Wong, Gilberto KK Leung. *“Simultaneous pancreas and kidney transplantation as the standard surgical treatment for diabetes mellitus patients with end-stage renal disease”*. Hong Kong Med J. 2016; 22:62–9.
- Robertson RP, Sutherland DE, Kendall DM, Teuscher AU, Gruessner RW, Gruessner A. *“Metabolic characterization of long-term successful pancreas transplants in type I diabetes”*. J Investig Med.1996; 44:549-55.
- Robertson RP, Holohan TV, Genuth S. *“Therapeutic controversy: Pancreas transplantation for type I diabetes”*. J Clin Endocrinol Metab.1998; 83:1868-74.
- Health Quality Ontario. *“Pancreas Islet Transplantation for Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Clinical Evidence Review”*. Ontario Health Technology Assessment Series. 2015; Vol. 15: No. 16, pp. 1–84.
- Brittle diabetes (labile diabetes) [Internet]. United Kingdom: Diabetes.co.uk; 2015 [cited 2015 Feb 5].

- Deng S, Markmann JF, Rickels M, Yeh H, Kim JI, Lian MM, Gu Y, Markmann E, Palanjian M, Barker CF, Najj A. *"Islet alone versus islet after kidney transplantation: metabolic outcomes and islet graft survival"*. *Transplantation*.2009;88(6):820-5.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. *"Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen"*. *N Engl J Med*.2000; 343: 230–238.
- Niclauss N, Bosco D, Morel P, Demuylder-Mischler S, Brault C, Milliat-Guittard L, Colin C, Parnaud G, Muller YD, Giovannoni L, Meier R, Toso C, Badet L, Benhamou PY, Berney T. *"Influence of donor age on islet isolation and transplantation outcome"*. *Transplantation*. 2011; 91: 360–366.
- Cabric S, Sanchez J, Lundgren T, Foss A, Felldin M, Källén R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Larsson R, Korsgren O, Nilsson B. *"Islet surface heparinization prevents the instant bloodmediated inflammatory reaction in islet transplantation"*. *Diabetes*.2007; 56: 2008–2015.
- Ricordi C, Inverardi L, Kenyon NS, Goss J, Bertuzzi F, Alejandro R. *"Requirements for success in clinical islet transplantation"*. *Transplantation*. 2005 May 27;79(10):1298-300.
- Lau J, Henriksnäs J, Svensson J, Carlsson PO. *"Oxygenation of islets and its role in transplantation"*. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009 Dec;14(6):688-93.
- Antonio Citro, Elisa Cantarelli, Paola Maffi, Rita Nano, Raffaella Melzi, Alessia Mercalli, Erica Dugnani, Valeria Sordi, Paola Magistretti, Luisa Daffonchio, Pier Adelchi Ruffini, Marcello Allegretti, Antonio Secchi, Ezio Bonifacio, Lorenzo Piemonti. *"CXCR1/2 inhibition enhances pancreatic islet survival after transplantation"*. *J Clin Invest*.2012; 122(10):3647–3651.
- Andreas Ludwig, Frank Petersen, Stefan Zahn, Otto Götze, Jens-Michael Schröder, Hans-Dieter Flad, Ernst Brandt. *"The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2"*. *Blood* 1997; 90:4588-97.
- Casilli F, Bianchini A, Gloaguen I, Biordi L, Alesse E, Festuccia C, Cavalieri B, Strippoli R, Cervellera MN, Di Bitondo R, Ferretti E, Mainiero F, Bizzarri C, Colotta F, Bertini R. *"Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor*

- of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2*". Biochem Pharmacol 2005; 69:385-94.
- Cugini D, Azzollini N, Gagliardini E, Cassis P, Bertini R, Colotta F, Noris M, Remuzzi G, Benigni A. *"Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion"*. Kidney Int 2005; 67:1753-61.
 - Kendrick AA, Holliday MJ, Isern NG, Zhang F, Camilloni C, Huynh C, Vendruscolo M, Armstrong G, Eisenmesser EZ. *"The dynamics of interleukin-8 and its interaction with human CXC receptor 1 peptide"*. Protein Sci 2014; 23:464-80.
 - Citro A, Cantarelli E, Piemonti L. *"The CXCR1/2 Pathway: Involvement in Diabetes Pathophysiology and Potential Target for T1D Interventions"*. Curr Diab Rep 2015; 15:68.
 - Allegretti M, Cesta MC, Garin A, Proudfoot AE. *"Current status of chemokine receptor inhibitors in development"*. Immunol Lett 2012; 145:68–78.
 - Cinzia Bizzarri, Andrea Rosario Beccari, Riccardo Bertini, Michela Rita Cavicchia, Simona Giorgini, Marcello Allegretti. *"ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets"*. Pharmacology & Therapeutics 112 (2006) 139–149.
 - Riccardo Bertini, Marcello Allegretti, Cinzia Bizzarri, Alessio Moriconi, Massimo Locati, Giuseppe Zampella, Maria N. Cervellera, Vito Di Cioccio, Maria C. Cesta, Emanuela Galliera, Fernando O. Martinez, Rosa Di Bitondo, Giulia Troiani, Vilma Sabbatini, Gaetano D'Anniballe, Roberto Anacardio, Juan C. Cutrin, Barbara Cavalieri, Fabrizio Mainiero, Raffaele Strippoli, Pia Villa, Maria Di Girolamo, Franck Martin, Marco Gentile, Angela Santoni, Daniela Corda, Giuseppe Poli, Alberto Mantovani, Pietro Ghezzi, and Francesco Colotta. *"Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury"*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:11791-6
 - Souza DG, Bertini R, Vieira AT, Cunha FQ, Poole S, Allegretti M, Colotta F, Teixeira MM. *"Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury"*. Br J Pharmacol 2004; 143:132-42.
 - Villa P, Triulzi S, Cavalieri B, Di Bitondo R, Bertini R, Barbera S, Bigini P, Mennini T, Gelosa P, Tremoli E, Sironi L, Ghezzi P. *"The interleukin-8 (IL-8/CXCL8) receptor*

- inhibitor reparixin improves neurological deficits and reduces long-term inflammation in permanent and transient cerebral ischemia in rats*". Mol Med 2007; 13:125-33.
- Christophe Ginestier, Suling Liu, Mark E. Diebel, Hasan Korkaya, Ming Luo, Marty Brown, Julien Wicinski, Olivier Cabaud, Emmanuelle Charafe-Jauffret, Daniel Birnbaum, Jun-Lin Guan, Gabriela Dontu, and Max S. Wicha. "*CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts*". The Journal of Clinical Investigation. Volume 120 Number 2. February 2010.
 - Sallusto F, Baggiolini M. "*Chemokines and leukocyte traffic*". Nat Immunol 2008; 9:949–952.
 - Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. "*Chemokines and chemokine receptors: an overview*". Front Biosci (Landmark Ed) 2009; 14:540–551.
 - Mortier A, Van Damme J, Proost P. "*Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability*". Immunol Lett 2012; 145:2–9.
 - Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. "*International union of pharmacology: XXII. Nomenclature for chemokine receptors*". Pharmacol Rev. 2000 Mar;52(1):145-76.
 - Gangur V, Birmingham NP, Thanavorakul S. "*Chemokines in health and disease*". Veterinary Immunology and Immunopathology. 2002; 86(3-4):127-136.
 - Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L. "*The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity*". Cancer Res 2003; 63:7451–7461.
 - Martin AP, Rankin S, Pitchford S, Charo IF, Furtado GC, Lira SA. "*Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes*". Diabetes 2008; 57: 3025–3033.
 - Melzi R, Mercalli A, Sordi V, Cantarelli E, Nano R, Maffi P, Sitia G, Guidotti LG, Secchi A, Bonifacio E, Piemonti L. "*Role of CCL2/MCP-1 in islet transplantation*". Cell Transplant 2010; 19:1031–1046.

- Kriegel MA, Rathinam C, Flavell RA. *"Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells"*. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109:3457–3462.
- Rhode A, Pauza ME, Barral AM, Rodrigo E, Oldstone MB, von Herrath MG, Christen U. *"Islet-specific expression of CXCL10 causes spontaneous islet infiltration and accelerates diabetes development"*. J Immunol 2005; 175: 3516–3524.
- Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AG, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, Marchetti P, Dotta F. *"Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes"*. Clin Exp Immunol 2010; 159:338–343.
- De Paola M, Buane P, Biordi L, Bertini R, Ghezzi P, Mennini T. *"Chemokine MIP-2/CXCL2, acting on CXCR2, induces motor neuron death in primary cultures"*. Neuroimmunomodulation 2007; 14:310–316.
- Fu W, Zhang Y, Zhang J, Chen WF. *"Cloning and characterization of mouse homolog of the CXC chemokine receptor CXCR1"*. Cytokine 2005; 31:9–17.
- Moepps B, Nuesseler E, Braun M, Gierschik P. *"A homolog of the human chemokine receptor CXCR1 is expressed in the mouse"*. Mol Immunol 2006;43: 897–914.
- Fan X, Patera AC, Pong-Kennedy A, Deno G, Gonsiorek W, Manfra DJ, Vassileva G, Zeng M, Jackson C, Sullivan L, Sharif-Rodriguez W, Opdenakker G, Van Damme J, Hedrick JA, Lundell D, Lira SA, Hipkin RW. *"Murine CXCR1 is a functional receptor for GCP-2/CXCL6 and interleukin-8/CXCL8"*. J Biol Chem 2007; 282: 11658–11666.
- Moberg L, Korsgren O, Nilsson B. *"Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood"*. Clin Exp Immunol. 2005;142(1):125–131.
- Yasunami Y, Kojo S, Kitamura H, Toyofuku A, Satoh M, Nakano M, Nabeyama K, Nakamura Y, Matsuoka N, Ikeda S, Tanaka M, Ono J, Nagata N, Ohara O, Taniguchi M. *" α 14 NK T cell-triggered IFN-gamma production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets"*. J Exp Med. 2005;202(7):913–918.
- Atsushi Toyofuku, Yohichi Yasunami, Kentaroh Nabeyama, Masahiko Nakano, Masayuki Satoh, Nobuhide Matsuoka, Junko Ono, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, Masao Tanaka and Seiyo Ikeda. *"Natural killer T-cells participate in rejection of islet allografts in the liver of mice"*. Diabetes. 2006;55(1):34–39.

- Nobuhide Matsuoka, Takeshi Itoh, Hiroshi Watarai, Etsuko Sekine-Kondo, Naoki Nagata, Kohji Okamoto, Toshiyuki Mera, Hiroshi Yamamoto, Shingo Yamada, Ikuro Maruyama, Masaru Taniguchi, and Yohichi Yasunami. "High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice". *J Clin Invest.* 2010; 120(3):735–743.
- Rodriguez Rilo HL, Ahmad SA, D'Alessio D, Iwanaga Y, Kim J, Choe KA, Moulton JS, Martin J, Pennington LJ, Soldano DA, Biliter J, Martin SP, Ulrich CD, Somogyi L, Welge J, Matthews JB, Lowy AM. "Total pancreatectomy and autologous islet cell transplantation as a means to treat severe chronic pancreatitis". *J Gastrointest Surg.* 2003; 7:978–989.
- Blondet JJ, Carlson AM, Kobayashi T, Jie T, Bellin M, Hering BJ, Freeman ML, Beilman GJ, Sutherland DE. "The role of total pancreatectomy and islet autotransplantation for chronic pancreatitis". *Surg Clin North Am.* 2007; 87:1477–1501.
- sito internet: www.businesswire.com
- sito internet: www.portalediabete.org
- Pawlick RL, Wink J, Pepper AR, Bruni A, Abualhassen N, Rafiei Y, Gala-Lopez B, Bral M, Shapiro AM. "Reparixin, a CXCR1/2 inhibitor in islet allotransplantation". *Islets.* 2016 Jun 21: e1199303.
- Eich T, Eriksson O, Lundgren T. "Visualization of early engraftment in clinical islet transplantation by positron-emission tomography". *N Engl J Med* 2007; 356:2754-5.
- O. Eriksson, T. Eich, A. Sundin, A. Tibell, G. Tufveson, H. Andersson, M. Felldin, A. Foss, L. Kyllönen, B. Langstrom, B. Nilsson, O. Korsgren, T. Lundgren. "Positron emission tomography in clinical islet transplantation". *Am J Transplant* 2009; 9:2816-24.
- Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AM. "Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site". *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:352315.
- Pavlakis M, Khwaja K. "Pancreas and islet cell transplantation in diabetes". *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007;14(2):146-150.
- Reffet S., Thivlet C. "Immunology of pancreatic islet transplantation". *Diabetes Metab.* 2006; 32: 523-526.

- Ryan E. A., Paty B. W., Senior P. A., Bigam D., Alfadhi E., Kneteman N. M., Lakey J. R., Shapiro A. M. *“Five-years follow up after clinical islet transplantation”*. Diabetes, 2005; 54: 2060-2069.
- Pawlick R, Gala-Lopez B, Pepper AR, McCall M, Ziff O, Shapiro AM. *“The combination of anti-NKG2D and CTLA-4 Ig therapy prolongs islet allograft survival in a murine model”*. Am J Transplant 2014; 14:2367-74.
- Najafian N, Sayegh MH. *“CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent”*. Expert Opin Investig Drugs. 2000 Sep;9(9):2147-57.