

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag.1
1.1 SINDROME METABOLICA.....	pag.1
1.1.1 Obesità.....	pag.1
1.1.2 Diabete.....	pag.6
1.1.3 Dislipidemia.....	pag.12
1.1.4 Steatosi epatica.....	pag.16
2. STRATEGIE PER IL MANAGEMENT DEL RISCHIO CARDIO METABOLICO	pag.19
2.1 STRATEGIE TERAPEUTICHE.....	pag.19
2.1.1 Terapie incretiniche.....	pag.19
2.1.1.1 Exenatide.....	pag.27
2.1.1.2 Liraglutide.....	pag.34
2.1.2 Approccio chirurgico.....	pag.43
2.2 STRATEGIE DIAGNOSTICHE.....	pag.45
2.2.1 Strategie strumentali di diagnosi.....	pag.45
2.2.1.1 Ispessimento medio intimale carotideo (cIMT).....	pag.45
2.2.1.2 Disfunzione endoteliale.....	pag.46
2.2.1.3 Fatty Liver Index (FLI).....	pag.48
2.2.1.4 Valutazione ecografica del grasso viscerale.....	pag.49
2.2.1.5 Biopsia epatica.....	pag.52
2.2.2 Strategie biomelecolari di diagnosi.....	pag.53
2.2.2.1 Sottoclassi delle lipoproteine plasmatiche.....	pag.53
2.2.2.2 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9).....	pag.55
3. SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA	pag.63
4. STUDI CLINICI	pag.64

4.1 EFFETTI DI EXENATIDE LAR IN PAZIENTI CON DIABETE MELLITO TIPO 2 CON E SENZA NAFLD.....	pag.64
4.1.1 Materiali e Metodi.....	pag.64
4.1.2 Risultati.....	pag.67
4.1.3 Discussione.....	pag.69
4.2 EFFETTI DI LIRAGLUTIDE IN PAZIENTI OBESI CON DIABETE MELLITO TIPO 2.....	pag.73
4.2.1 Materiali e Metodi.....	pag.73
4.2.2 Risultati.....	pag.78
4.2.3 Discussione.....	pag.81
4.3 ESPRESSIONE DI PCSK9 A LIVELLO EPATICO IN PAZIENTI OBESI CON NAFLD CON E SENZA DIABETE.....	pag.83
4.3.1 Materiali e Metodi.....	pag.83
4.3.2 Risultati.....	pag.87
4.3.3 Discussione.....	pag.95
5. CONCLUSIONE.....	pag.99
6. ABBREVIAZIONI.....	pag.100
7. BIBLIOGRAFIA.....	pag.104
RINGRAZIAMENTI.....	pag.125

1. INTRODUZIONE

1.1 SINDROME METABOLICA

La *Sindrome Metabolica* (*Metabolic Syndrome*, MetS), detta anche sindrome X, sindrome da insulinoresistenza, sindrome di Reaven,¹ è una costellazione di fattori di rischio (resistenza all'insulina, iperinsulinemia, tolleranza al glucosio, *Diabete Mellito di Tipo 2* (DMT2), obesità viscerale, dislipidemia aterogena e/o alta pressione sanguigna) fra loro correlati che concorrono ad aumentare la possibilità di sviluppare patologie a carico dell'apparato circolatorio:²⁻⁴ (1) l'obesità e la mancanza di attività fisica contribuiscono allo sviluppo della resistenza all'insulina, associata ad aumenti della concentrazione dei trigliceridi (*Triglycerides*, TG) e delle particelle lipoproteiche a bassa densità e diminuzioni delle lipoproteine ad alta densità di colesterolo (*High Density Lipoprotein Cholesterol*, HDL-C), favorendo la formazione di placche ateromasiche, comportando l'insorgenza di malattie cerebrocardiovascolari;⁵ (2) la resistenza all'insulina contribuisce a livelli più elevati di insulina e glucosio sierico, precursori dello sviluppo del DMT2;⁶ (3) iperinsulinemia provoca eccessiva ritenzione renale del sodio e aumento della pressione sanguigna;⁷ (4) l'alterazione dell'espressione cellulare intrinseca dei fattori endoteliali provoca un aumento della pressione sanguigna associata alla disfunzione endoteliale e alla ridotta produzione di *Ossido Nitrico* (NO).⁸ Oltre alla predisposizione genetica, ci sono importanti fattori ambientali che possono influenzare la patogenesi di MetS; uno stile di vita malsano (troppo cibo e poca attività fisica) può influire negativamente su tutte le caratteristiche della MetS.⁹

1.1.1 Obesità

L'obesità, secondo la definizione dell'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS), è una condizione caratterizzata da eccessivo peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo in misura tale da influire negativamente sullo stato di salute. Questo eccesso di peso corporeo si ripercuote negativamente su tutto l'organismo costituendo di per sé un serio fattore di rischio per le principali malattie croniche: malattie

cardiovascolari (in particolare infarto e ictus),¹⁰ ipertensione, DMT2, MetS, alcune forme di tumori.¹¹

L'obesità è causata nella maggior parte dei casi da stili di vita scorretti: da una parte, un'alimentazione ipercalorica e dall'altra un ridotto dispendio energetico a causa della sedentarietà.

Secondo dati dell'OMS l'obesità rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica a livello mondiale perché la sua prevalenza a livello globale è raddoppiata dal 1980 ad oggi;¹² nel 2008 si contavano oltre 1,4 miliardi di adulti in sovrappeso (il 35% della popolazione mondiale); di questi oltre 200 milioni di uomini e oltre 300 milioni di donne erano obesi (l'11% della popolazione mondiale).¹³ L'obesità sta assumendo le proporzioni di una vera e propria epidemia.¹⁴

Negli ultimi anni è stato evidenziato il ruolo del tessuto adiposo come organo con funzioni immuno-metaboliche-endocrine; ciò potrebbe giustificare l'azione diretta dell'obesità nel determinare la sindrome metabolica. L'obesità rappresenterebbe, secondo la teoria dello "stato infiammatorio" uno stato cronico di infiammazione, nel quale le molecole prodotte dai macrofagi infiltrati negli adipociti altererebbero l'attività fisiologica delle β -cellule pancreatiche modificando la secrezione insulinica.¹⁵ Inoltre, è stato evidenziato che il tessuto adiposo viscerale è in grado di determinare delle interferenze con l'attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, di produrre adipochine (quali la leptina, resistina, visfatina e adiponectina),^{16,17} di produrre molecole protrombotiche come il *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1) e di secernere citochine proinfiammatorie come il *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) e le *InterLeuchine 1 e 6* (IL-1 e IL-6).¹⁸ In tutti i mammiferi, il tessuto adiposo si differenzia in *tessuto adiposo bianco* (WAT, *White Adipose Tissue*) e in *tessuto adiposo bruno* (BAT, *Brown Adipose Tissue*). Il WAT immagazzina trigliceridi e funge da riserva energetica per l'organismo, il BAT, invece, possiede la capacità di produrre calore per mantenere l'omeostasi termica in seguito a stress termogenici.¹⁹ Una caratteristica distintiva del tessuto adiposo è la notevole plasticità che gli consente di adeguarsi alle diverse esigenze energetiche dell'organismo: i grandi adipociti del tessuto adiposo bianco sarebbero in grado, come risposta a stimoli ormonali e/o ambientali, di convertirsi in elementi cellulari

più piccoli che “bruciano” le riserve di grasso attivando opportuni meccanismi termogenici (mitocondriogenesi e lipolisi), proprio come accade negli adipociti del tessuto adiposo bruno.²⁰ Fino a qualche tempo fa si pensava che gli adipociti fossero solamente depositari di *acidi grassi liberi* (FFA, *Free Fatty Acid*). Ad oggi, invece, si sa che essi rilasciano ormoni, i quali vanno a modulare la massa di grasso corporeo. L’attitudine endocrina del tessuto adiposo si manifesta con la produzione di due principali *target* metabolici: la leptina e l’adiponectina. La leptina ha un ruolo fondamentale nella regolazione del bilancio energetico attraverso due meccanismi: introito di cibo e consumo energetico; essa viene secreta dal tessuto adiposo in sinergia con l’aumento dei valori ematici di insulina e “comunica” a livello ipotalamico riducendo l’appetito e inducendo sazietà.²¹ Inoltre, si è visto che esiste una correlazione lineare tra i livelli circolanti di leptina e la massa adipocitaria totale: l’espressione della leptina è direttamente proporzionale alla quantità di tessuto adiposo presente.²² Tuttavia, gli alti livelli di leptina nei soggetti obesi non inducono senso di sazietà, determinando così una situazione definita leptina-resistenza. L’altro importante *signaling* metabolico prodotto dal tessuto adiposo è l’adiponectina, espressa abbondantemente nell’adipocita, ma al contrario di altre adipochine, i suoi livelli plasmatici sono ridotti nell’adiposità addominale. I livelli plasmatici di questa sostanza risultano diminuiti anche nei soggetti di sesso maschile e nei soggetti di sesso femminile in menopausa, nei pazienti diabetici, nei soggetti con ipertriglicemia, nei soggetti con ipertensione arteriosa, e nei soggetti con cardiopatia ischemica. Si è osservato che quest’ormone migliora la sensibilità insulinica nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel fegato; inoltre, favorisce l’ossidazione dei lipidi, migliora la vasodilatazione endotelio-dipendente; riduce l’espressione delle proteine di adesione; contrasta gli effetti negativi sulla funzione endoteliale delle *Low Density Lipoprotein* (LDL) ossidate; inibisce la differenziazione dei monociti e la formazione di cellule schiumose; ha anche azione antitrombotica riducendo l’aggregazione piastrinica e la formazione di trombi. Quindi l’adiponectina possiede importanti proprietà antiinfiammatorie e antiaterogene. I soggetti che posseggono elevati livelli plasmatici di adiponectina perciò hanno un rischio significativamente ridotto di eventi cardiovascolari.²³⁻²⁵ L’obesità può essere

considerata sia come un'ipertrofia dovuta a un aumento del numero di adipociti, che costituiscono il tessuto adiposo, sia un'iperplasia dello stesso ed è quindi dovuta a un abnorme aumento del contenuto cellulare di adipociti (lipidi).

Per definire l'*eccesso di peso* si può far riferimento al *Body Mass Index* (BMI), che rappresenta il rapporto tra il peso (espresso in kg) e l'altezza al quadrato (espressa in metri). Il BMI è il parametro di misura più diffuso ed utilizzato per gli studi clinici ed epidemiologici ed è stato convalidato dall'OMS. Esiste una classificazione del grado di obesità che, in base al valore del BMI, prevede la suddivisione degli individui obesi in tre classi (**Figura 1**).

È possibile procedere ad una stratificazione del rischio relativo di comorbidità valutando il rischio come lieve, moderato, elevato o molto elevato in rapporto al passaggio dal semplice sovrappeso alle tre classi dell'obesità, riservando la massima classe di rischio alla sottopopolazione dei super-obesi (*classe III*).²⁶

L'indicazione al trattamento chirurgico della grande obesità si pone quando ripetuti tentativi dietetico-farmacologici non hanno un successo e l'obesità, nonché la presenza di patologie ad essa correlate, aumentano i fattori di rischio per la salute del paziente. L'obeso "chirurgico" è il paziente con un BMI > 40 Kg/m² o > 35 Kg/m² se all'obesità sono associate altre complicanze mediche (diabete o ipertensione).²⁶ La chirurgia bariatrica per via laparoscopica si pone in questo contesto come una vera e propria terapia e può essere considerata come l'unica chirurgia capace di diventare terapia per una malattia medica.



* in presenza di almeno una patologia associata

Figura 1. Classificazione dell'Indice di Massa Corporea (Kg/m²).²⁶

È, infatti, ormai chiaro che la perdita di peso ottenuta dopo la chirurgia bariatrica, ed in particolar modo dopo bypass gastro-intestinale, è in grado di curare il diabete, l'ipertensione arteriosa e la dislipidemia che sono le patologie mediche più frequentemente associate all'obesità.^{27,28}

Esistono altri indici, come il *rapporto vita-fianchi* (WHR, *Waist to Hip Ratio*), che misurano aspetti differenti della composizione corporea e della distribuzione del grasso corporeo. Diversi studi hanno dimostrato che il WHR è un predittore di anomalie metaboliche più utile degli indici di sovrappeso e quindi il BMI, poiché è confermato che non solo è importante considerare quanta massa grassa si abbia, ma anche dove essa sia distribuita. Infatti, se la massa grassa è localizzata a livello dei fianchi si può considerare meno pericolosa per la salute rispetto all'accumulo della stessa a livello addominale e si tende a considerare l'individuo meno esposto al rischio di malattie cardiovascolari e di diabete (**Figura 2**).

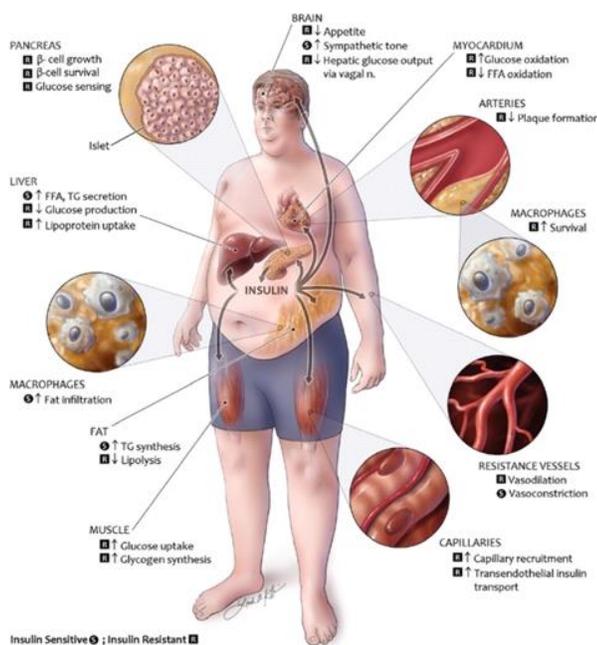


Figura 2. Signaling dell'insulina tessuto specifica e della sindrome metabolica.²⁹

La spiegazione di questo fenomeno sembrerebbe risiedere nel fatto che gli adipociti del tessuto adiposo addominale scindono rapidamente i lipidi immagazzinati e riversano nel circolo ematico gli acidi grassi prodotti, fatto che può causare un

aumento pericoloso dei livelli di trigliceridi e di glucosio nel sangue. Nel corso degli anni moltissimi ricercatori hanno confermato e ampliato questi risultati e hanno dimostrato anche che, quando alti valori ematici di acidi grassi arrivano alle cellule muscolari, queste ultime hanno difficoltà a prelevare glucosio dal circolo e ciò porta all'aumento dei livelli ematici di glucosio e un aumentato rischio di manifestare poi il DMT2. Inoltre, gli acidi grassi provenienti dagli adipociti siti in addome hanno accesso diretto al fegato, attraverso la vena porta, dove interferiscono con il normale processo di metabolizzazione dell'insulina e di conseguenza aumentano i livelli ematici di insulina rendendo i miociti scheletrici, gli adipociti e gli epatociti meno sensibili all'ormone, condizione che incrementa ulteriormente i livelli di glucosio ematico.²⁸

1.1.2 Diabete

Il *Diabete Mellito* (DM) è un gruppo di diversi disordini metabolici di varia eziologia (fattori genetici, ambientali, familiari e comportamentali) che determina un'alterazione del metabolismo glucidico, lipidico e proteico, la cui caratteristica principale è l'aumento della concentrazione ematica di glucosio (iperglicemia). L'iperglicemia è il risultato del difetto di secrezione o di attività dell'insulina, o, più frequentemente, dalla combinazione dei due meccanismi.³⁰

In accordo con l'*American Diabetes Association* (ADA) il principale segno è l'iperglicemia random ≥ 200 mg/dl o ≥ 126 mg/dl a digiuno, causata da un difetto secretivo di insulina o da una condizione definita "insulino-resistenza", che determina una mancata risposta all'azione ipoglicemizzante dell'insulina secreta in circolo; tale iperglicemia è generalmente accompagnata da alcuni sintomi quali: poliuria, polifagia, polidipsia e calo ponderale.³⁰

Il DM può manifestare delle complicanze che possono essere sia acute che croniche. Tra le acute riconosciamo la chetoacidosi, che colpisce tipicamente il *Diabete Mellito di Tipo 1* (DMT1), e la sindrome iperglicemica iperosmolare non chetosica; mentre le croniche possono essere distinte in macroangiopatia (aterosclerosi precoce) e microangiopatia (retinopatia, nefropatia, neuropatia), inoltre la macroangiopatia e la

neuropatia sono responsabili della comparsa del piede diabetico. Queste complicanze croniche sono causa di disabilità ed elevata morbilità e mortalità.³⁰

L'attuale classificazione del DM si fonda su criteri eziopatogenetici, a differenza delle precedenti classificazioni, basate sull'età di insorgenza o sul trattamento terapeutico, che sono state completamente abbandonate. Si distinguono:

- Diabete mellito di tipo 1
- Diabete mellito di tipo 2

Gli altri tipi di diabete sono:

- Il *Diabete Autoimmune Latente dell'Adulto (Latent Autoimmune Diabetes in Adults, LADA)* noto per la sua insorgenza in età adulta e per la presenza di marcatori immunitari tipici del DM1. La patogenesi non è ancora chiara, ma si ipotizzano diversi insulti che possono colpire la β -cellula pancreatica in soggetti che sono geneticamente predisposti, conducendo a un più lento e graduale declino della loro funzione rispetto a ciò che si osserva nel DM1.³⁰

- Il *diabete di tipo adulto a esordio giovanile (Maturity Onset Diabetes of the Young, MODY)* è una forma monogenica di diabete a trasmissione autosomica dominante. Si conoscono 6 difetti genetici, che attraverso meccanismi differenti, determinano un deficit della funzione della β -cellula. Questo tipo di diabete, generalmente, insorge prima dei 25 anni di età e non sono presenti markers di autoimmunità. La trasmissione ereditaria dominante, presente in almeno 3 generazioni, è utile alla determinazione di questo particolare tipo di diabete. Il controllo glicometabolico viene mantenuto senza insulina per circa due anni dalla diagnosi.³⁰

- Il *Diabete Mellito Gestazionale (DMG)* è un diabete diagnosticato per la prima volta durante la gravidanza. Colpisce circa il 4% delle donne gravide, poiché durante la gravidanza, fisiologicamente, si instaura uno stato di insulino-resistenza che aumenta la richiesta di insulina. La maggior parte delle donne colpite ritorna a uno stato di normale tolleranza glucidica dopo la gravidanza, tuttavia tali donne presentano un aumentato rischio di sviluppare il DM nel corso della loro vita.

Il DMT1 è causato da una distruzione delle β -cellule pancreatiche che conduce a un deficit assoluto di insulina con necessità di terapia insulinica sostitutiva per prevenire l'insorgenza di chetoacidosi. Distinguiamo due forme di diabete di tipo 1:

- sottoclasse 1A, a eziologia autoimmune e
- sottoclasse 1B, a eziologia idiopatica.

La sottoclasse 1A è caratterizzata dalla distruzione delle β -cellule pancreatiche ad opera delle cellule effettrici immunitarie che reagiscono contro antigeni endogeni delle β -cellule e nel siero dei pazienti si riscontra la presenza di autoanticorpi. La patogenesi deriva da una combinazione di suscettibilità genetica (presenza di *Human Leukocyte Antigen* HLA correlati, nella maggior parte dei casi, ma sono coinvolti anche geni non HLA) e fattori ambientali (infezioni da parotite, rosolia, coxsackie B o citomegalovirus). Il tipo 1B non presenta evidenza di autoimmunità (10%) o correlazioni HLA, è caratterizzato da una perdita delle β -cellule e insulinopenia permanente e tendenza a sviluppare chetoacidosi. Il DMT1 rappresenta circa il 5-10% dei casi ed è il sottotipo maggiormente diagnosticato nei pazienti al di sotto dei vent'anni.³⁰

Probabilmente il DMT2 riconosce complesse intercause nonostante la specifica eziologia non sia nota; difatti non vi sono né segni di distruzione autoimmune delle β -cellule, né di altre cause note di DM e non è associato a particolari alterazioni HLA.³⁰ Nonostante quest'incognita, i fattori genetici nel DMT2 hanno un'influenza più importante rispetto al DMT1; tanto è vero che la concordanza tra gemelli omozigotici oscilla dal 70 al 90%. Inoltre, analizzando il fenotipo familiare, si è notato che soggetti con un genitore diabetico hanno un rischio di sviluppare la malattia durante la vita del 38%, mentre se ne sono affetti entrambi i genitori il rischio aumenta del 60%. Benché sia chiaro questo condizionamento genetico, raramente sono identificabili singoli geni responsabili di tali alterazioni, nella maggior parte dei casi la malattia è poligenica e fortemente influenzata da fattori ambientali (obesità, sedentarietà e elevato apporto calorico).³¹ Il deficit funzionale della β -cellula ha un ruolo chiave nella patogenesi del DMT2. Difatti nei pazienti diabetici l'insulinemia a digiuno è notevolmente bassa in proporzione ai livelli glicemici, ma in valore assoluto può essere aumentata; questo si realizza perché la risposta dell'insulina

all'introito orale di glucosio è ridotta; invece, quando il glucosio è infuso per via endovenosa manca la risposta insulinica precoce (fase cefalica) e viene conservata quella tardiva così come la risposta ad altri stimoli, quali aminoacidi, glucagone, sulfaniluree e i β -agonisti.³² Una recente ipotesi sulla patogenesi dell'insulino-resistenza si concentra su un difetto della via di segnale della *Fosfatidilinositolo-3-Chinasi* (PI3-K) che è in grado di determinare sia una ridotta traslocazione del *GLucose Transporter type 4* (GLUT4) sulla membrana plasmatica sia altre alterazioni; tuttavia non tutte le vie di trasduzione del segnale dell'insulina sono resistenti agli effetti dell'insulina, basti pensare a quelle vie trasduzionali che controllano il differenziamento e la crescita cellulare, quindi l'iperinsulinismo potrebbe incrementare l'azione insulinica attraverso queste vie. Un'altra ipotesi sulla patogenesi del DMT2 pone l'attenzione su degli aspetti comuni dell'obesità, ovvero elevati livelli di acidi grassi liberi e un accumulo di trigliceridi intracellulari, sia a livello muscolare che a livello epatico, determinando lipotossicità e questo meccanismo contribuirebbe al deterioramento della β cellula.³³ Diversi studi condotti su modelli animali hanno evidenziato come l'incremento di trigliceridi nelle β cellule pancreatiche si manifesta prima dell'instaurarsi dello stato iperglicemico, probabilmente per una competizione metabolica tra i substrati, trigliceridi e glucosio; tale competizione potrebbe spiegare la resistenza all'insulina, ciò è dimostrato dal fatto che l'accumulo dei lipidi nei muscoli precede di molti anni l'insorgenza del diabete. A tal proposito, risulta interessante l'identificazione di un polimorfismo, geneticamente determinato, del coattivatore del recettore γ , il quale viene attivato dalla proliferazione dei perossisomi (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*, PPAR- γ), siglato PGC-1 α ; è stato dimostrato che soggetti in sovrappeso e con storia familiare di DMT2 hanno una diminuita espressione di PGC-1 anche quando la tolleranza ai glucidi è ancora normale;³⁴ quindi l'identificazione di questo polimorfismo potrebbe portare luce circa l'incerta patogenesi del DMT2. Il PGC-1 è un coattivatore trascrizionale fondamentale per la sintesi di enzimi mitocondriali, utili per la β -ossidazione degli acidi grassi; dunque un'alterazione dell'attività del PGC-1 si traduce in una scorretta ossidazione degli acidi grassi intracellulari, per cui i trigliceridi tenderanno ad accumularsi nelle cellule.

Questo meccanismo ci consente di spiegare sia l'insulino-resistenza del tessuto muscolare, ma anche la stretta correlazione tra DMT2 e l'aumento ponderale fino all'obesità.³⁴

Vi è, quindi, un nesso tra i fattori esogeni e l'insorgenza del DMT2; difatti un aumento ponderale determina un'incrementata sintesi di trigliceridi ed è chiaro che, qualora fosse presente un difetto di ossidazione degli acidi grassi, il loro accumulo intracellulare sarebbe fondamentale nell'insorgenza tanto della insulino-resistenza quanto di una ridotta funzionalità delle β -cellule pancreatiche. Di contro, sia la riduzione del peso corporeo che l'esercizio fisico, inibirebbero queste reazioni tardando l'insorgenza del DMT2, proprio perché l'attività fisica stimola l'espressione genica nei mitocondri e la loro capacità ossidativa, probabilmente anche attraverso un aumento dei livelli di PGC-1.³⁵ Inoltre, è stato anche visto che l'invecchiamento induce un declino fisiologico delle funzioni mitocondriali e diminuisce la velocità di sintesi di *Adenosina Trifosfato* (ATP) nei muscoli, quindi anche l'invecchiamento contribuisce a slatentizzare il difetto genetico alla base della patogenesi del DMT2. Ciononostante, vi sono ancora diversi punti da chiarire relativi all'assenza di una costante e perfetta consequenzialità tra incremento ponderale e suscettibilità al DMT2.³⁵

Il DMT2 è una delle più grandi emergenze sanitarie globali del 21° secolo. La prevalenza aumenta sempre più, in accordo con i cambiamenti culturali e sociali. Secondo la *Fondazione Internazionale del Diabete (International Diabetes Foundation, IDF)* si stima che nel mondo 415 milioni di adulti tra i 20 e i 79 anni, compresi i 193 milioni non diagnosticati, abbiano il diabete; statisticamente risulta affetta 1 persona su 11. Inoltre si stima che 318 milioni di adulti abbiano *l'Impaired Glucose Tolerance (IGT)* e che quindi siano a rischio di manifestare il DM. Entro la fine del 2018, il diabete avrà causato 5 milioni di morti e la spesa sanitaria aumenterà di circa 673 miliardi di dollari. Se questo incremento non viene arrestato, nel 2040 ci saranno 642 milioni di persone con il DM.³⁶

Il DMT2 rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini che vanno da una predominante insulino-resistenza con deficit insulinico relativo a un difetto predominante della secrezione di insulina con insulino-resistenza. Questa forma può

non manifestarsi per anni, in quanto l'iperglicemia è frequentemente asintomatica: la diagnosi viene effettuata per riscontro occasionale e spesso quando le complicanze sono già in atto.³² L'evoluzione naturale della malattia conduce a manifestazioni macrovascolari e microvascolari, che determinano danno d'organo e disabilità e conseguentemente morbilità e mortalità.³⁷ La β -cellula è in grado di adeguarsi alle variazioni dell'attività dell'insulina, dunque quando si riduce l'attività dell'insulina, essa viene compensata da un'augmentata secrezione di insulina della β -cellula stessa. La risposta della β -cellula riesce a mantenere l'omeostasi glucidica nelle fasi precoci della malattia. Nelle fasi avanzate di insulino-resistenza la β -cellula non è più in grado di soddisfare la richiesta via via crescente di insulina e si sviluppa il diabete.³² L'insufficienza della β -cellula è una caratteristica del DMT2, il cui declino funzionale comincia circa 10 anni prima della diagnosi di diabete, ovvero quando la funzione β -cellulare è ridotta intorno al 30%. In questa fase la secrezione insulinica non riesce a compensare la resistenza a tale ormone e la malattia metabolica diventa manifesta con sintomi e segni clinici. In sintesi, la patogenesi del DMT2 scaturisce da due fattori determinanti: da un lato la resistenza insulinica e dall'altro il declino nel tempo della funzionalità delle β -cellule pancreatiche che vengono continuamente iperstimolate.³² L'insulino-resistenza è quella condizione in cui gli effetti biologici dell'insulina (rimuovere il glucosio circolante da parte del muscolo scheletrico, oppure sopprimere la gluconeogenesi epatica) non sono al pari di quanto atteso. Questo è ciò che accade anche nel DMT2, ma tale resistenza è relativa, poichè gli aumentati livelli di insulinemia normalizzano la glicemia; tuttavia la ridotta sensibilità e la ridotta risposta massimale inducono una riduzione generale dell'utilizzo massimo di glucosio dal 30 al 60% in meno rispetto ai soggetti sani. In sintesi, la resistenza all'azione dell'insulina altera l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti normalmente insulino-sensibili e aumenta la gluconeogenesi epatica; entrambi gli effetti derminano un innalzamento dei valori glicemici ematici (iperglicemia), tipici del diabete.³⁰ Un peggioramento dell'insulino-resistenza e il progressivo declino funzionale della β -cellula pancreatica rappresentano, dunque, i principali elementi della progressione del DMT2. Rilevanti studi clinici come l'UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*)³⁸ e lo studio ADOPT (*A Diabetes Outcome Progression Trial*)³⁸ hanno

evidenziato come il progressivo peggioramento del compenso glicemico, fosse strettamente correlato alla perdita funzionale della β -cellula pancreatica; questo fenomeno era presente indipendentemente dall'approccio terapeutico con cui erano stati trattati i pazienti. Inoltre questi studi clinici hanno dimostrato che la velocità di progressione del declino della β -cellula è diversa tra i vari farmaci studiati, ma, pur variando la velocità, risulta un processo inevitabile negli anni.³⁸

La sua cronicità e l'aumento notevole dell'incidenza, sempre più in giovane età, rende indispensabile la ricerca di una scelta terapeutica che abbia lo scopo di stabilizzare le fasi di scompenso al fine di prevenire l'insorgenza di complicanze. Trials clinici hanno fornito un contributo fondamentale nel panorama mondiale del diabete evidenziando come lo sviluppo di complicanze vascolari si associ chiaramente agli stati di iperglicemia³⁹⁻⁴² e come l'utilizzo di farmaci innovativi possa ridurre il rischio di eventi cardio-metabolici per i vari effetti pleiotropici che svolgono. Alla luce di questa osservazione risulta evidente come il compito del medico sia proprio quello di mantenere un controllo della patologia attraverso il raggiungimento di target glicemici il più vicino possibile ai livelli di euglicemia. Inoltre, dovendo agire in un'ottica di prevenzione è di estrema importanza il monitoraggio dei parametri che correlano con un alto rischio di sviluppare le complicanze tipiche del DMT2. Altrettanto utile è il riconoscimento precoce dei soggetti a rischio di sviluppare il DMT2 per poter intervenire con strategie terapeutiche utili nelle fasi iniziali della malattia e quindi mirate verso i difetti iniziali.

1.1.3 Dislipidemia

Con dislipidemia si intende una condizione clinica caratterizzata da anomalie del metabolismo lipidico e lipoproteico; ciò comporta una variazione delle concentrazioni plasmatiche di lipidi e lipoproteine. I lipidi più importanti nell'organismo umano sono:

- Acidi grassi;
- Trigliceridi;
- Colesterolo;
- Lecitine.

Le dislipidemie possono essere classificate in primitive (su base genetica) e secondarie (o acquisite).

Le forme primitive sono dovute ad alterazioni metaboliche di tipo ereditario, le quali possono essere di tipo monogenico o poligenico, coinvolgenti cioè uno o più geni attivi nel metabolismo delle lipoproteine; si sono osservate comunque influenze di tipo ambientale dovute al tipo di alimentazione dei soggetti.

Le forme secondarie sono dipendenti dalla presenza di un'altra malattia, la quale causa un'alterazione del metabolismo lipidico, o dall'utilizzo di farmaci o altre sostanze esogene che possono interferire sulle medesime vie metaboliche.

La prima classificazione delle dislipidemie fu proposta da Fredrickson nel 1967 (**Figura 3**) e successivamente fatta propria dall'OMS. Essa distingue sei profili lipoproteici plasmatici (fenotipi) caratterizzati in base all'aumento selettivo di alcune classi lipoproteiche.⁴³

Fredrickson Classification of the Hyperlipidemias

Phenotype	Lipoprotein(s) elevated	Serum cholesterol concentration	Serum triglyceride concentration	Relative frequency, %
I	Chylomicrons	Normal to ↑	↑↑↑↑	<1
IIa	LDL	↑↑	Normal	10
IIb	LDL and VLDL	↑↑	↑↑	40
III	IDL	↑↑	↑↑↑	<1
IV	VLDL	Normal to ↑	↑↑	45
V	VLDL and chylomicrons	↑ to ↑↑	↑↑↑↑	5

Figura 3. Classificazione delle dislipidemie di Fredrickson.⁴³

Le malattie cardiovascolari sono la principale causa di morte nei paesi industrializzati. In Italia, secondo i dati raccolti tra il 1998 e il 2002 dal Progetto Cuore,⁴⁴ che misura i fattori di rischio *cardiovascolare* (CV) in campioni di popolazione adulta (uomini e donne di età compresa fra 35 e 74 anni), il 21% degli uomini e il 23% delle donne è ipercolesterolemico (colesterolemia totale uguale o superiore a 240 mg/dl, o sotto trattamento specifico), mentre il 37% degli uomini e il 34% delle donne è in una condizione definita borderline (colesterolemia compresa fra 200 e 239 mg/dl). Nella popolazione anziana (uomini e donne di età compresa fra 65 e 74 anni), il 24% degli uomini e il 39% delle donne sono ipercolesterolemici; il 36%

degli uomini e il 38% delle donne è borderline. Oltre agli anziani, le donne in menopausa (età media 62 anni) costituiscono una classe particolarmente a rischio di ipercolesterolemia: in Italia, il 36% delle donne in menopausa ha il valore della colesterolemia totale uguale o superiore a 240 mg/dl, oppure è sotto trattamento farmacologico specifico, mentre il 38% è in una condizione borderline. Per quanto riguarda il trattamento farmacologico, nel nostro paese, solo il 13% dei soggetti ipercolesterolemici di sesso maschile è trattato in modo adeguato (sotto trattamento e con colesterolemia totale inferiore a 240 mg/dl), mentre il restante 81% dichiara di non essere sottoposto ad alcun trattamento farmacologico. Gran parte della popolazione di Paesi con diversi livelli di reddito ignora l'esistenza delle cure per l'ipercolesterolemia oppure non viene trattata in caso di diagnosi positiva.

Ormai è stato confermato da numerosi studi clinici che vi è una relazione tra la quantità di lipidi nel siero e il rischio di malattie cardiovascolari: in particolare si è visto che l'elevato livello di colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL) rappresenta uno dei principali fattori di rischio. Vi sono quindi alcuni fattori di rischio che devono essere trattati per effettuare una prevenzione efficace: fumo, ipertensione, diabete, obesità e dislipidemia, che comprende trigliceridi elevati, bassi livelli di HDL-C ed alti livelli di LDL-C.⁴⁵ Tra questi, uno dei più diffusi è l'ipercolesterolemia, la quale è uno stato di alterazione patologica in cui si ha un eccesso di colesterolo sierico, sia totale che legato alle proteine plasmatiche. Questa condizione di alterazione, se non adeguatamente trattata, determina un rischio per la salute, poiché porta ad una maggiore probabilità di sviluppare l'aterosclerosi, una patologia che consiste nella formazione di placche di colesterolo, le quali si depositano sulla parete delle arterie, andando a causarne l'occlusione, con conseguenti ripercussioni sulla circolazione sanguigna periferica, e può dare origine a trombi e di conseguenza causare infarti ed ictus. Oltre ad una ipercolesterolemia esogena, dovuta ad una inadeguata alimentazione, esiste anche un'ipercolesterolemia familiare, un disordine genetico ad ereditarietà dominante, in cui si hanno alterazioni funzionali o strutturali del recettore per le LDL; ciò causa un inadeguato "uptake" (assorbimento) di colesterolo nelle cellule di conseguenza i livelli ematici di colesterolo sono superiori alla norma, anche 3 o 4 volte superiori.

La dislipidemia aterogena è una condizione clinica caratterizzata da un'anomala concentrazione di lipidi nel sangue. Le LDL nell'uomo sono una classe di lipoproteine plasmatiche estremamente eterogenea. Per quanto riguarda le loro dimensioni (size), sono stati identificati due differenti fenotipi, chiamati "*pattern A*" (LDL grandi e leggere), e "*pattern B*" (LDL piccole e dense).⁴⁶ La dimensione delle LDL è direttamente proporzionale ai livelli plasmatici di HDL-colesterolo ed inversamente proporzionale ai livelli plasmatici di trigliceridi. La presenza contemporanea di LDL piccole e dense, di ridotti livelli di HDL-colesterolo e aumentati livelli di trigliceridi è stata definita come la "*triade lipidica*" o "*fenotipo lipoproteico aterogeno*" (*atherogenic lipoprotein phenotype*).⁴⁷

Negli ultimi anni si è molto dibattuto sull'efficacia delle dimensioni delle LDL come fattore predittivo di eventi cardiovascolari, e recentemente una predominanza di LDL piccole e dense è stata accettata come un emergente fattore di rischio cardiovascolare da parte del *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)*.⁴⁸

Questa predominanza di LDL piccole e dense (*pattern B*) è stata osservata nel 30% circa degli uomini adulti, nel 5-10% dei giovani uomini e delle donne con età < 20, e nel circa 15-25% delle donne in post menopausa.⁴⁹⁻⁵² La concentrazione e le dimensioni delle LDL sono geneticamente influenzate, con un'ereditabilità che varia dal 35-45%, con un modello autosomico dominante o co-dominante e vari effetti additivi e poligenici. Vi è anche un'influenza di tipo non genetico e ambientale sull'espressione di questo fenotipo: alcuni esempi sono l'uso di contraccettivi orali (che portano ad un aumento delle LDL piccole e dense)⁴⁹ o l'alimentazione (una dieta ricca di carboidrati può portare al *pattern B* in quei soggetti predisposti geneticamente). Inoltre, la predominanza delle LDL piccole e dense si trova comunemente in associazione a disturbi familiari del metabolismo delle lipoproteine, come l'iperlipidemia familiare combinata, l'iper-beta-lipoproteinemia e l'ipo-alfa-lipoproteinemia, associati ad un maggior rischio di malattia coronarica prematura.⁴⁶ Durante i numerosi studi sull'associazione tra LDL e rischio cardiovascolare, si è cercato di capire a cosa fosse dovuto questo aumento di eventi cardiovascolari e a tal proposito sono state avanzate numerose ipotesi sul perché le LDL piccole e dense

fossero aterogene. Si è visto che le LDL piccole e dense sono più facilmente assimilate dal tessuto arterioso rispetto alle LDL larghe e leggere,⁵⁰ suggerendo un maggiore trasporto trans-endoteliale delle particelle di minore dimensione. Inoltre, si è osservato un ridotto “uptake” di questo tipo di LDL. Le proprietà alterate dello strato lipidico superficiale associato ad un ridotto contenuto di colesterolo libero e maggiore contenuto di acidi grassi polinsaturi potrebbe anche contribuire a una maggiore suscettibilità ossidativa delle LDL piccole e dense.

Numerosissimi studi mostrano un’associazione significativa tra concentrazione di LDL piccole e dense e l’aumento del rischio di malattia coronarica (*Coronary Heart Disease*, CHD).⁴⁵ E’ stata osservata che l’infarto acuto del miocardico e il fenotipo delle lipoproteine aterogene condividono una serie di alterazioni metaboliche, tra cui modificazioni dei lipidi plasmatici e lipoproteine (un aumento di trigliceridi e una riduzione nelle concentrazioni di LDL e HDL)⁵¹ nonché un relativo assorbimento di glucosio mediato dalla resistenza all’insulina. Queste alterazioni lipidiche hanno una grande rilevanza clinica, poiché devono essere prese in considerazione quando si tratta di prendere decisioni riguardo la terapia da applicare.

1.1.4 Steatosi Epatica

La steatosi epatica non alcolica (*Non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) rappresenta una delle principali comorbidity sviluppate dai pazienti affetti da Mets.⁵² I dati osservazionali dimostrano, infatti, che la NAFLD presenta la sua maggiore prevalenza nei pazienti obesi (BMI > 30 kg/m²) e che l’insulino-resistenza, il Diabete Mellito di tipo 2 e l’iperlipidemia sono strettamente correlati alla patogenesi di essa.⁵³ La prevalenza di NAFLD nella popolazione generale è del 20-40%, strettamente connessa alla prevalenza dell’obesità.⁵⁴

La NAFLD viene definita come uno spettro di lesioni istologiche che vanno dalla semplice steatosi ad un modello più complesso caratterizzato da lesioni epatocitarie ed infiammazione (**Figura 4**). La NAFLD è comunemente classificata in NAFLD e NASH (*Non-Alcoholic Steatohepatitis*). In realtà, oggi sappiamo che questa classificazione dicotomica non è sufficiente e con molta probabilità esistono delle classi istopatologiche intermedie.^{55,56} La NAFLD interessa un ampio gruppo di

pazienti ed è caratterizzata dallo sviluppo di steatosi semplice, ovvero dall'accumulo dei trigliceridi in eccesso in almeno il 5% degli epatociti e si identifica come condizione istologica benigna. La NASH è caratterizzata da due principali entità istopatologiche: l'infiammazione lobulare e la degenerazione balloniforme degli epatociti.⁵⁶

Circa la metà dei pazienti affetti da NASH sviluppa fibrosi ed ha un elevato rischio di sviluppare cirrosi epatica metabolica e carcinoma epato-cellulare.⁵⁴ I pazienti affetti da NAFLD hanno, inoltre, un notevole rischio di mortalità cardio-vascolare.⁵³

L'insulino-resistenza, che, come abbiamo visto precedentemente, gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della MetS, sembrerebbe la protagonista nella patogenesi (**Figura 4**) della NAFLD.⁵⁷ Se è vero che l'insulino-resistenza è alla base dello sviluppo di NAFLD, a sua volta l'accumulo di lipidi a livello epatico favorisce insulino-resistenza, creando un vero e proprio circolo vizioso. In particolare, gli studi suggeriscono che alcuni intermedi lipidici, come i *Dicilgliceroli* (DAG), vanno ad attivare la *Proteina Chinasi Cε* (PKCε), che inibisce ulteriormente il recettore dell'insulina a livello epatico e la sua segnalazione a valle.⁵⁸

L'aumento dei livelli lipidici all'interno degli epatociti nei pazienti con NAFLD risulta da uno squilibrio tra l'*uptake* degli acidi grassi, la *de novo* sintesi dei trigliceridi ed il loro *release* tramite le *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL).⁵²

Abbiamo già visto che, in presenza di insulino-resistenza, vi è un'alterazione del metabolismo lipidico. Viene meno l'azione anti-lipolitica dell'insulina a livello dei tessuti periferici, soprattutto muscolo ed adipe, e viene promossa la lipolisi con liberazione nel plasma di FFA che attraverso la vena porta raggiungono il fegato.⁵⁷

Ad accumularsi a livello epatico non sono solo gli FFA rilasciati dai tessuti periferici, ma anche gli acidi grassi provenienti dalla dieta. I chilomicroni che diffondono nel *post-prandium* forniscono una certa quantità di acidi grassi, ma, poichè l'attività di *fat storage* da parte del tessuto adiposo del paziente obeso e/o insulino-resistente è inefficiente, gli FFA si accumulano come grassi ectopici principalmente a livello epatico. Inoltre, parte del carico lipidico epatico deriva dalla *De Novo Lipogenesis* (DNL).⁵⁹

Il danno a livello epatico sembrerebbe dunque derivare dall'accumulo di FFA, ma parlare solo di lipotossicità non è sufficiente. L'obesità e l'insulino-resistenza, componenti centrali della MetS, sono associate ad una riduzione delle adipochine anti-infiammatorie (adiponectina) e ad un aumentato rilascio di adipochine e citochine pro-infiammatorie (Interleuchine, TNF α , *Proteina C Reattiva*-PCR) che promuovono l'attivazione di una serie di *pathways* infiammatori a livello epatico. Di fatto, la progressione da NAFLD a NASH si ha quando i meccanismi adattativi non riescono più a proteggere gli epatociti dalla lipotossicità causando infiammazione, stress ossidativo e apoptosi.^{57,60}

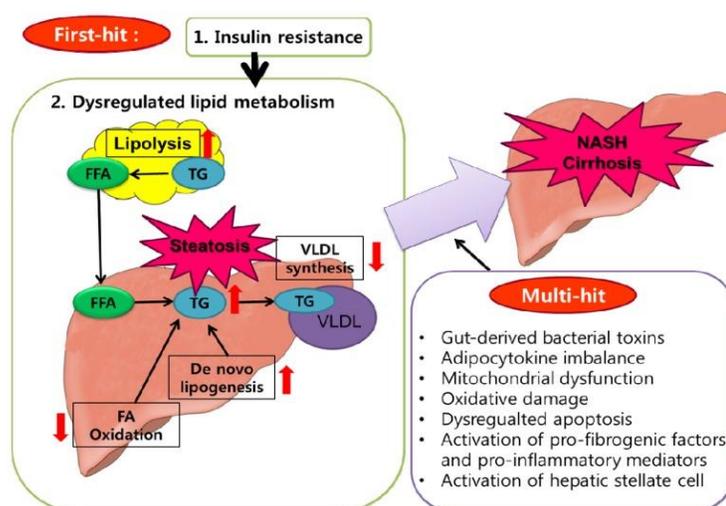


Figura 4. Patogenesi della NAFLD multi-step. Il primo step, rappresentato dall'insulino-resistenza, induce disregolazione lipidica, lo sviluppo di steatosi semplice e rende gli epatociti suscettibili ai vari fattori che nel complesso conducono a NASH e cirrosi, fra cui le tossine batteriche derivate dalla barriera intestinale, lo squilibrio delle adipochine, la disfunzione mitocondriale, lo stress ossidativo, l'apoptosi degli epatociti, l'attivazione di fattori pro-fibrotici e pro-infiammatori, l'attivazione delle cellule epatiche stellate.⁶¹

Ad oggi la diagnosi di NAFLD si avvale della biopsia epatica e della valutazione istopatologica, ma ulteriori studi dovranno essere svolti per trovare criteri diagnostici di più semplice utilizzo clinico. La biopsia epatica, infatti, non può essere considerata una procedura di *screening* per tutti i pazienti. Sia perchè si tratta di una procedura invasiva e potenzialmente dannosa, sia perchè esistono dei limiti interni alla stessa procedura della biopsia. Tra i metodi di indagine non invasiva più utilizzati che agevolano la diagnosi di steatosi epatica e fibrosi ricordiamo l'indagine

ultrasonografica associata al FibroScan. Quest'ultimo ci permette di valutare il livello epatico di *stiffness*.⁶²

Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato che cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMCs) possono essere considerate uno “specchio” del danno d’organo. In particolare, in pazienti con infezione da HCV l’analisi genetica del materiale biotico e delle PBMC ha mostrato che il 72,4% dei geni dell’infiammazione, del metabolismo lipidico e glucidico erano modulati nella stessa maniera nel tessuto epatico e nelle cellule periferiche,⁶³ suggerendo che i PBMCs possano rispecchiare le modifiche di espressione genica di alcune vie metaboliche intraepatiche e quindi possano essere utilizzati come un nuovo potenziale strumento non invasivo in grado di stratificare correttamente i pazienti affetti da NAFLD e seguirne la progressione della malattia.

2. STRATEGIE PER IL MANAGEMENT DEL RISCHIO CARDIOMETABOLICO

Un approccio corretto al management cardiometabolico è quello di valutare dapprima il rischio cardiovascolare del paziente (storia familiare, aspetti genetici) e, in un secondo luogo, porre l’attenzione sulla presenza della sindrome metabolica e dei fattori di rischio cardiometabolico ad essa associati quali iperglicemia a digiuno o postprandiale, sovrappeso/obesità, pressione sistolica e diastolica elevate, dislipidemia. L’integrazione fra corretto stile di vita, terapie innovative adeguate metodiche di imaging e il dosaggio di markers informativi sul rischio cardiometabolico possono aiutare il medico nella gestione personalizzata del singolo paziente.

2.1 STRATEGIE TERAPEUTICHE

2.1.1 Terapie Incretiniche

Nel 1902 Bayliss e Starling identificarono per la prima volta un fattore chimico circolante, estratto dalla mucosa intestinale, capace di stimolare la secrezione esocrina del pancreas a cui venne dato il nome di secretina.⁶⁴ Nel 1930, La Barre e Still purificarono un fattore intestinale, capace di stimolare in maniera selettiva la

secrezione endocrina pancreatica, senza influenzare quella esocrina⁶⁵ che chiamarono “incretina”.⁶⁶ Successivamente, nel 1940, con Loew et al., era stato ipotizzato che il controllo della glicemia post-prandiale dipendesse anche da fattori prodotti a livello intestinale.⁶⁷

Una determinata quantità di glucosio assunta per via orale determina un incremento di secrezione insulinica superiore rispetto a quella indotta dalla stessa quantità di glucosio somministrata per via endovenosa; per questo motivo si intuì la presenza di un fattore intestinale (**Figura 5**) che potenziasse la secrezione insulinica.⁶⁸

Il grafico in **Figura 5**, a sinistra mostra come i livelli di glicemia nel plasma aumentino in maniera sovrapponibile sia che il glucosio venga somministrato per via orale, sia che venga somministrato per via endovenosa; invece il grafico a destra, sempre in **Figura 5**, mostra che le concentrazioni plasmatiche di c-peptide sono molto più alte in tutti i tempi presi in esame se il carico di glucosio viene fatto per via orale (linea blu), rispetto a quando viene dato endovena (linea rossa);⁶⁸ questa fisiologica maggiore risposta insulinica ad un carico orale di glucosio somministrato per via orale, rispetto alla somministrazione per via endovenosa, prende il nome di “effetto incretinico”.

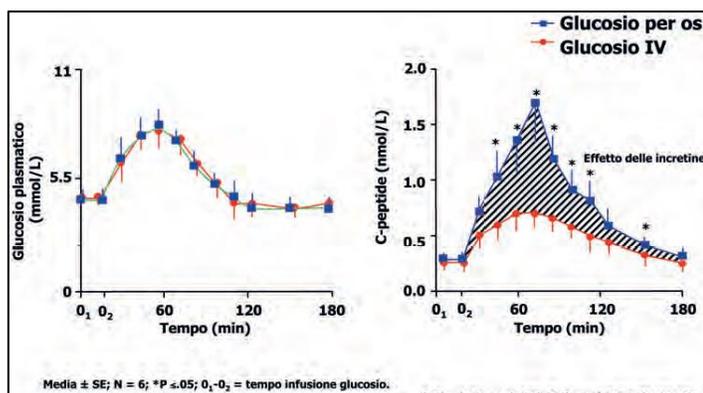


Figura 5. La secrezione insulinica in risposta a carico di glucosio è maggiore quando tale carico è effettuato per via orale rispetto a quando è effettuato per via endovenosa.⁶⁸

Fisiologicamente le principali incretine che vengono secrete dopo pasto sono il *Glucagon-Like Peptide 1* (GLP-1) ed il *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP). Il primo è un ormone polipeptidico secreto dalle cellule

enteroendocrine L situate nel tratto distale dell'ileo e del colon; il secondo è sintetizzato dalle cellule K situate nel duodeno e nelle anse prossimali del digiuno. Oltre al pancreas, i recettori per il GLP-1 e GIP sono presenti in diversi tessuti,⁶⁹ quali: cuore, vasi, endotelio, reni, fegato, polmoni, cervello, stomaco, duodeno, tessuto adiposo, surrene, muscolo scheletrico, ipofisi, facendo intuire un loro ruolo anche in altri distretti (**Figura 6**).

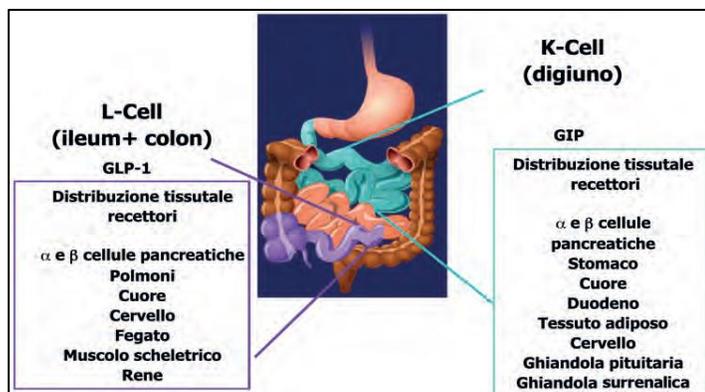


Figura 6. Localizzazione tissutale delle cellule produttrici GIP e GLP-1 e loro distribuzione recettoriale.⁶⁹

La secrezione del GLP-1 è regolata da stimolatori sia di origine neuronale, sia endocrini, ma anche per contatto diretto dei nutrienti con le cellule entero-endocrine L. Il GIP viene rilasciato in seguito alla stimolazione dei grassi contenuti negli alimenti. Entrambi aumentano la secrezione insulinica glucosio-dipendente dalle β-cellule pancreatiche.

GIP e GLP-1 mostrano degli effetti comuni quali: riduzione della glicemia; aumento della secrezione insulinica glucosio-dipendente; aumento delle β-cellule pancreatiche; riduzione dell'apoptosi delle β-cellule; riduzione dello svuotamento gastrico; aumento dell'utilizzazione periferica del glucosio. Gli effetti che riguardano solamente il GLP-1 sono: aumento del senso di sazietà; riduzione dell'assunzione di cibo; riduzione del peso corporeo; riduzione della secrezione di glucagone; riduzione della secrezione gastrica; riduzione dell'estrazione epatica dell'insulina; aumento della biosintesi dell'insulina.

Il GLP-1 riduce la secrezione di glucagone da parte delle α-cellule pancreatiche ed è anche in grado di rallentare lo svuotamento gastrico, di indurre sazietà e perdita di

peso; tuttavia la limitazione risulta essere quella di avere un'emivita di circa 2 minuti⁷⁰ e di essere rapidamente degradato dall'enzima *Dipeptidil-Peptidasi IV* (DPP-4) nella sua posizione N-terminale con la rimozione di 2 aminoacidi.

Nei soggetti diabetici di tipo 2 sono ridotte sia la secrezione insulinica glucosio-indotta,^{71,72} sia il potenziamento insulinico da parte delle incretine; inoltre, in questi soggetti, la secrezione di glucagone è elevata durante il digiuno, non viene soppressa durante un carico orale di glucosio ed è aumentata maggiormente dopo un pasto misto.⁷³⁻⁷⁶ Questo è dovuto al fatto che i soggetti con DMT2 mostrano un ridotto effetto incretinico rispetto ai soggetti normali (**Figura 7**) e la secrezione di GLP-1 è ridotta in risposta ad un pasto (**Figura 8**).^{77,78}

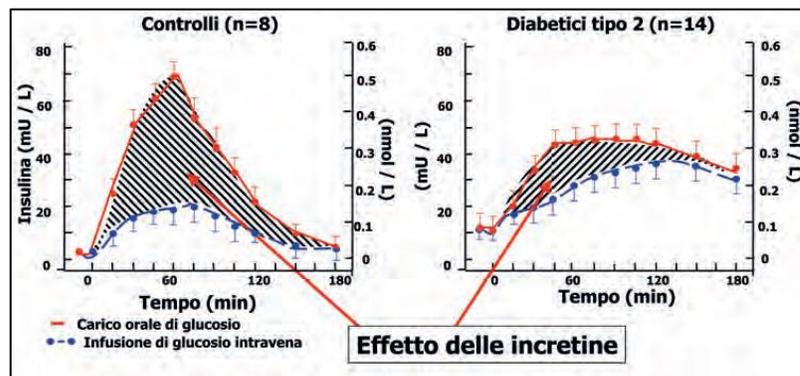


Figura 7. Effetto delle incretine nei soggetti sani ed in soggetti con DMT2.⁶⁹

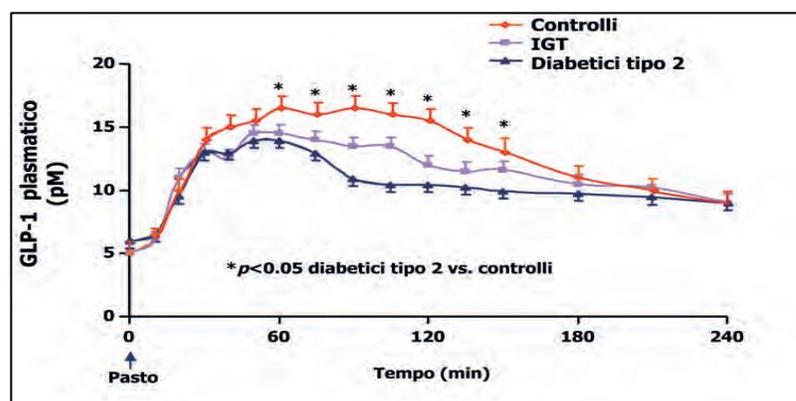


Figura 8. Riduzione dell'effetto del GLP-1 in soggetti con DMT2.⁷⁹

A prescindere dal loro effetto ipoglicemizzante, il GLP-1 e i suoi analoghi esercitano effetti benefici sul sistema cardiovascolare ed a livello epatico. È stato dimostrato come il GLP-1 riesca a modulare la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa; inoltre, ha un effetto protettivo contro i danni causati dalla riperfusione ischemica.⁸⁰ È molto importante sottolineare il fatto che la terapia con analoghi del GLP-1 sembri agire sui fattori di rischio cardiovascolari, tra cui ipertensione, dislipidemia e infiammazioni sub-cliniche di basso grado.^{81,82} Questi effetti favorevoli sul sistema cardiovascolare sono mediati esclusivamente mediante il GLP-1R espresso nei miocardiociti, nelle cellule endoteliali coronariche e nelle cellule vasali muscolari lisce.^{80,83} Il miglioramento della pressione arteriosa può essere correlato al fatto che si ha una maggiore escrezione urinaria di sodio ed acqua e un miglioramento della filtrazione glomerulare.⁸⁴ In aggiunta a questo, alcuni studi suggeriscono come il metabolita inattivo, presumibilmente il GLP-1 (9-36) ammide, possa migliorare il recupero funzionale nel cuore ischemico attraverso dei meccanismi estranei al GLP-1R.⁸⁵ A livello epatico, il GLP-1 ha un effetto anabolizzante che porta ad un aumento della sintesi di glicogeno a partire dal glucosio circolante e possa essere in grado di sopprimere la produzione epatica di glucosio, inibendo la secrezione di glucagone da parte delle cellule α -pancreatiche.

Osservando le caratteristiche del GLP-1 sono stati prodotti dei farmaci che cercano di riprodurre le caratteristiche del GLP-1 (seppur con qualche modifica) e di inibire l'attività dell'enzima che degrada il GLP-1. Questi farmaci usati, al momento, per la terapia del DMT2 sono gli agonisti recettoriali e gli analoghi del GLP-1. Le modifiche apportate agli analoghi del GLP-1 in posizione N-terminale conferiscono a queste molecole di resistere alla degradazione del DPP-4, mentre quelle con sostituzioni a livello della porzione C-terminale sono caratterizzate da una minore clearance renale.⁸⁶ Inoltre in base alla loro emivita in circolo si dividono in analoghi ad emivita più breve (exenatide, lixisenatide) e in analoghi ad emivita più lunga (exenatide Long Acting Release-LAR, liraglutide e dulaglutide); è stato visto negli studi LEAD-6 (*Liraglutide Effect and Action in Diabetes*) e DURATION-6 (*Exenatide once weekly versus liraglutide once daily in patients with type 2 diabetes*) che gli analoghi ad emivita più lunga riescano a ridurre in maniera più efficace

l'Emoglobina Glicata (Glycated Hemoglobin, HbA1c) e la glicemia a digiuno rispetto agli analoghi a più breve emivita.^{87,88} Possono essere utilizzate in associazione ad altri ipoglicemizzanti orali. Il trattamento con questi farmaci inizialmente potrebbe comportare nausea e vomito e questa terapia è sconsigliata in soggetti con insufficienza renale cronica. Questa nuova classe di farmaci è molto importante da tenere in considerazione non soltanto per raggiungere il controllo glicemico, ma anche per i pochi effetti collaterali, il basso rischio di ipoglicemie, per gli effetti sul peso corporeo e per il mantenimento dell'efficacia che sembra mantenersi indipendentemente dal peso corporeo e dalla HbA1c di partenza. Agendo sulla funzione endocrina insulare, dovrebbero essere utilizzati in una fase precoce della malattia, dove ancora è presente una buona massa di β -cellule funzionanti. Nonostante il ricorso a questi farmaci sia consentito dopo il fallimento terapeutico con altri antidiabetici orali, sarebbe opportuno, in linea con le indicazioni dell'European Association for the Study of Diabetes e dell'American Diabetes Association (EASD/ADA), adottare un atteggiamento terapeutico pro-attivo, che permetta di utilizzare le incretine non appena i valori di HbA1c vadano oltre il valore di 7.0%. Di contro però, le stesse indicazioni ufficiali ne raccomandano l'uso per modeste deviazioni dell'obiettivo terapeutico suggerendone l'introduzione per valori di HbA1c $\geq 7.5\%$ dopo il fallimento della terapia con metformina. Ancora più adeguato sarebbe il loro utilizzo in fasi precoci se si confermasse un effetto protettivo della β -cellula. Studi ad hoc in pazienti con pre-diabete sono in corso, così come sono in corso trials clinici con lo scopo di verificare se gli incretino-mimetici, da soli o in associazione ad insulino-sensibilizzante, saranno in grado di mantenere a lungo il compenso glicemico.⁸⁹ Inoltre, un altro vantaggio da prendere in considerazione con l'utilizzo degli analoghi del GLP-1 è la perdita di peso; infatti, ad oggi, sono gli unici a stimolare la secrezione insulinica senza comportare un aumento del peso corporeo, al contrario di sulfoniluree o insulina.

Da alcuni anni i farmaci incretinici per mantenere la commercializzazione devono dimostrare la propria sicurezza cardiovascolare, cioè viene richiesto, relativamente all'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori, che il farmaco in studio non sia inferiore al placebo, con un margine superiore dell'intervallo di confidenza che non

superi 1.30, in un trial specifico o in una metanalisi di trial condotti su popolazioni ad alto rischio.⁹⁰

Il primo studio è stato con Lixisenatide (*Evaluation of Lixisenatide in Acute Coronary Syndrome study, ELIXA*)³⁹. ELIXA è uno studio randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli disegnato per valutare il rischio cardiovascolare di lixisenatide, rispetto a placebo su una popolazione di 6.000 soggetti adulti con DMT2, ad elevato rischio cardiovascolare (recente episodio di sindrome coronarica acuta). L'endpoint primario composito, valutato per la non-inferiorità e la superiorità, comprendeva morte per cause cardiovascolari, infarto del miocardio non fatale, ictus non fatale o ricovero per angina instabile. Lo studio è iniziato nel giugno 2010 ed è stato completato nel 2015. Il GLP-1 analogo si è rivelato non inferiore, anche se non superiore al placebo per quanto attiene la sicurezza sugli endpoint cardiovascolari.

Simile risultato è stato confermato dallo studio EXSCEL (*Exenatide Study of Cardiovascular Event Lowering*) con Exenatide⁴⁰ che ha valutato la sicurezza e l'efficacia CV a lungo termine della formulazione settimanale a rilascio prolungato (extended release, ER) dell'originale Exenatide. L'outcome primario dello studio è stato la prima comparsa di uno degli eventi compositi di morte CV, l'infarto miocardico non fatale o l'ictus non fatale (3 punti *Major Adverse Cardiac Event, MACE*), mentre gli outcome secondari hanno compreso la mortalità per tutte le cause, la morte per cause CV e la prima comparsa di infarto miocardico non fatale o fatale, l'ictus non fatale o fatale, l'ospedalizzazione per sindrome coronarica acuta e il ricovero per insufficienza cardiaca. L'outcome primario ha dato risultati deludenti, con un HR per il braccio exenatide versus placebo di 0.91 (*Confidence Interval, CI* 95% 0.83-1.00; $p < 0.001$ per la non inferiorità, ma solo 0.061 per la superiorità). Tutti gli altri outcome secondari, inclusi i componenti del primario nonché il ricovero per insufficienza cardiaca, erano neutrali.

Lo studio LEADER (*Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results*)⁴¹ è un trial effettuato allo scopo di dimostrare la sicurezza cardiovascolare della Liraglutide. Lo studio è stato eseguito su pazienti con DMT2 e alto rischio cardiovascolare, prevalentemente con pregressi eventi. Sebbene l'obiettivo primario fosse la non inferiorità rispetto al placebo, nello studio LEADER

si è evidenziata una riduzione significativa dell'incidenza complessiva di eventi cardiovascolari maggiori e della mortalità, sia totale che cardiovascolare; un trend verso la riduzione, seppure senza raggiungere la significatività statistica, è stato osservato anche per l'incidenza di infarto, ictus e ospedalizzazioni per scompenso cardiaco.

Sono stati ottenuti ottimi risultati sull'outcome cardiovascolare anche con un altro agonista del GLP-1, Semaglutide (*Long-term Outcomes with Semaglutide in Subjects with Type 2 Diabetes Study*, SUSTAIN 6)⁴². L'endpoint primario dello studio era il primo evento di morte cardiovascolare, infarto miocardico o ictus non fatale. L'endpoint primario è stato osservato in 108 su 1648 pazienti (6.6%) nel gruppo allocato a semaglutide ed in 146 su 1649 pazienti (8.9%) in quello a placebo (*Hazard Ratio*, HR= 0.74; 95% CI= 0.58-0.95; p<0.001 per la non-inferiorità). L'infarto non fatale è stato documentato nel 2.9% dei pazienti trattati con semaglutide e nel 3.9% di quelli trattati con placebo (HR= 0.74; 95% CI, 0.51-1.08; p=0.12); mentre i pazienti con ictus non fatale erano l'1.6% e il 2.7%, rispettivamente per Semaglutide e placebo (HR= 0.61; 95% CI, 0.38-0.99; p=0.04). Per Semaglutide si è osservato il fenomeno opposto, con un rischio minore di ictus e (in misura minore) di infarto non fatali, mentre la mortalità non ha mostrato significative riduzioni.

Anche albiglutide è stata valutata per la prevenzione della mortalità cardiovascolare, infarto miocardico o ictus.⁹¹ È stato condotto uno studio randomizzato in doppio cieco, controllato versus placebo in 610 siti in 28 nazioni (*Albiglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease*, HARMONY Study). Si sono assegnati in maniera randomizzata pazienti di età ≥ 40 anni con diabete tipo 2 e malattie cardiovascolari (in rapporto 1:1) ad iniezione sottocutanea di albiglutide (30-50 mg, sulla base della risposta glicemica e tollerabilità) o di un volume corrispondente di placebo una volta alla settimana, in aggiunta alle terapie standard.⁹¹ Si è ipotizzato che l'albiglutide fosse non-inferiore al placebo per l'esito primario di mortalità cardiovascolare, infarto miocardico o ictus. L'endpoint composito primario, valutato in 9463 pazienti con una mediana di follow-up di 1.6 anni, si è verificato in 338 (7%) dei 4731 pazienti ad albiglutide con un tasso di incidenza di 4.6 eventi per 100 persone all'anno, e in 428 (9%) dei 4732

pazienti a placebo con un tasso di incidenza di 5.9 eventi per 100 persone all'anno (HR= 0.78, 95% CI 0.68-0.90), con albiglutide che è risultata superiore al placebo (p<0.0001 per la non inferiorità; p=0.0006 per la superiorità). In pazienti con DMT2 e malattie cardiovascolari, l'albiglutide è risultata superiore al placebo per i MACE.⁹¹

La terapia con agonisti del recettore del GLP-1 basata sulle evidenze dovrebbe quindi essere parte di una strategia complessiva per ridurre il rischio di eventi cardiovascolari nei pazienti con DMT2. Ad oggi avevamo a disposizione dati di sicurezza cardiovascolare per lixisenatide ed exenatide (studi ELIXA, FREEDOM ed EXSCEL) e dati di beneficio cardiovascolare per liraglutide e semaglutide (studi LEADER e SUSTAIN-6). Va evidenziato che il driver principale per il beneficio cardiovascolare della liraglutide era stata la riduzione della mortalità cardiovascolare (-22% del rischio relativo nello studio LEADER), mentre il driver principale per il beneficio cardiovascolare della semaglutide era stata la riduzione dell'ictus cerebrale non fatale (-39% del rischio relativo nello studio SUSTAIN-6). Restano da comprendere i meccanismi coinvolti nel beneficio cardiovascolare per albiglutide.

2.1.1.1 Exenatide

Exenatide è stato il primo degli agonisti recettoriali del GLP-1 approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) nel 2005 da utilizzare nei pazienti con DMT2 non adeguatamente controllato. Exenatide è una versione sintetica dell'exendina-4, un ormone trovato nella saliva della lucertola Gila Monster, che vive nel deserto della California.

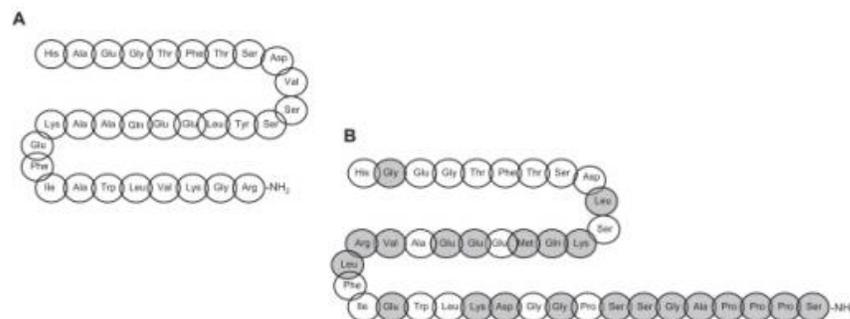


Figura 9. Struttura molecolare del GLP-1 umano (A), Exenatide (B).

Exenatide è composta da 39 aminoacidi e condivide con il GLP-1 umano il 53% di omologia strutturale, rendendola maggiormente resistente all'azione degradativa del DPP-4 (**Figura 9**). Exenatide si lega al recettore del GLP-1, lo attiva e riduce i livelli di glicemia sia a digiuno che post-prandiale.

Nonostante la farmacocinetica dell'Exenatide sia più lunga rispetto al GLP-1 nativo, questa necessita di due somministrazioni giornaliere. Nel 2003, per ovviare a questa breve, seppur maggiore, emivita è stata sviluppata una formulazione a lunga durata d'azione, incapsulandola in micro-sfere di un polimero biodegradabile del diametro di 0.06 mm;⁹² quando questa formulazione viene iniettata per via sottocutanea, le microsfele si degradano lentamente, controllando il rilascio del farmaco oltre le 10 settimane. È stato visto che Exenatide LAR 2 mg raggiunge la minima concentrazione terapeutica (>50 pg/ml) in circa 2 settimane e lo steady-state (circa 300 pg/ml) in 6-7 settimane; possiede un'emivita media di circa due settimane e dopo la sospensione è stato visto che la concentrazione decresce in circa 6-7 settimane.⁹³ È eliminato prevalentemente attraverso la filtrazione renale ed ha una clearance media di 9.1 l/h.

Gli studi DURATION 1-6 hanno comparato Exenatide LAR con altri ipoglicemizzanti compresa l'insulina; questi studi generalmente hanno incluso pazienti con una HbA1c compresa tra 7.1% - 11% ed un BMI compreso tra 24-40 kg/m². Gli studi DURATION e le metanalisi a disposizione hanno permesso di chiarire meglio gli effetti di Exenatide rispetto agli altri ipoglicemizzanti orali sul controllo glicemico e su altri parametri come peso corporeo e pressione sanguigna.⁹⁴

Effetti sul controllo glicemico

Negli studi DURATION-1 e DURATION-5 sono stati comparati l'efficacia ed il profilo di sicurezza di Exenatide LAR contro 10 µg di Exenatide somministrata due volte al giorno. Nel primo sono stati presi 295 pazienti con DM2 ed una HbA1c= 8.3±1.0%. Alla fine delle 30 settimane si sono ottenuti risultati migliori nel controllo glicemico con l'Exenatide settimanale rispetto alla somministrazione giornaliera, con una riduzione della HbA1c di circa 1.9% rispetto a circa 1.5% della giornaliera ed il 77% dei pazienti ha raggiunto il target di HbA1c= 7.0%, contro il 61% dei pazienti

valutabili. Exenatide LAR ha migliorato anche la glicemia a digiuno di circa 41 mg/dl versus 25 mg/dl. Tuttavia la glicemia post-prandiale è risultata più bassa nella formulazione giornaliera (-124 mg/dl versus -95 mg/dl).⁹⁵ Anche lo studio DURATION-5, della durata di 24 settimane, ha messo in evidenza come l'Exenatide LAR migliora l'HbA1c e la glicemia a digiuno rispetto alla somministrazione bis-in-die, in accordo con lo studio DURATION-1.⁹⁶ Exenatide LAR si è mostrata superiore nel ridurre la HbA1c e la glicemia a digiuno rispetto a sitagliptin e pioglitazone, come mostra lo studio DURATION-2 in cui si ha, alla fine delle 52 settimane, un miglioramento della HbA1c pari a $1.6 \pm 0.1\%$ e un miglioramento della glicemia a digiuno di -32 ± 5 mg/dl nei pazienti che hanno ricevuto solo Exenatide LAR. I pazienti che hanno fatto lo switch da sitagliptin ad Exenatide LAR hanno avuto un miglioramento sulla HbA1c pari a $0.3 \pm 0.1\%$ e sulla glicemia a digiuno pari a 13 ± 4 mg/dl. Infine i pazienti che hanno cambiato da pioglitazone a Exenatide LAR hanno ottenuto risultati paragonabili ai pazienti che hanno avuto solamente Exenatide LAR per quanto riguarda la HbA1c ed una glicemia a digiuno pari a -31 ± 5 mg/dl.⁹⁷ È stato comparato anche Exenatide LAR con insulina glargine nello studio DURATION-3 in cui, a tre anni, la variazione nella media dei minimi quadrati dell'HbA1c è risultata di -1.01% (*Standard error*, SE 0.07) nel gruppo Exenatide rispetto a -0.81% (SE 0.07) nel gruppo glargine.⁹⁸ La valutazione degli effetti di Exenatide a rilascio prolungato rispetto ad un altro agonista del GLP-1R è stato fatto nello studio randomizzato, open-label, DURATION-6 della durata di 26 settimane. I risultati preliminari hanno evidenziato come i risultati migliori si sono ottenuti nei pazienti del gruppo liraglutide 1.8 mg giornaliera; infatti, la HbA1c si è ridotta di 1.48% (SE= 0.05) nei soggetti appartenenti a questo gruppo, rispetto a quelli appartenenti a Exenatide LAR (HbA1c= -1.28% , SE= 0.05).⁸⁷ Questi risultati persistono per più di 2 anni, come dimostrato nella fase di continuazione degli studi DURATION, in cui mostrano che dopo 2 anni, la HbA1c e la glicemia a digiuno hanno una riduzione media di -1.7% e -40 mg/dl, rispettivamente.^{99,100} Gli studi clinici con Exenatide a rilascio prolungato hanno indicato un miglioramento della funzione β -cellulare, usando metodi di misurazione come *l'Homeostasis Model Assesment* (HOMA-B) la durata dell'effetto sulla funzione beta-cellulare è stata mantenuta per 52 settimane.

Effetti sul peso corporeo

Un effetto molto interessante di Exenatide osservato non soltanto negli studi DURATION, ma anche in diverse metanalisi, è stato quello sul controllo del peso corporeo; indipendentemente dalla presenza di nausea, Exenatide determina una riduzione dell'assunzione di cibo senza modificare il dispendio energetico, determinando un significativo calo ponderale,¹⁰¹ che sembra essere maggiore se viene associato alla metformina, suggerendo una possibile sinergia tra i due farmaci.¹⁰² La terapia con Exenatide LAR è associata ad una perdita di peso di -2.56 kg (95% CI= -3.12 a -2.00).¹⁰³ Analisi post-hoc hanno raccolto dati da pazienti che assumevano Exenatide ed hanno osservato che c'è stata una perdita di peso dal base-line di -2.5 kg (95% CI= -2.8 kg a -2.3 kg), dopo 24-30 settimane di trattamento.¹⁰⁴ Rispetto ai comparatori, come pioglitazone ed insulina glargine, Exenatide LAR ha avuto risultati nettamente migliori sul peso corporeo, il quale è risultato essere maggiore al termine del trattamento sia con pioglitazone (DURATION-2 e -4) che con glargine (DURATION-3). Tuttavia non ci sono stati significativi cambiamenti nei pazienti che hanno assunto altri analoghi del GLP-1 (DURATION-1 e -5); di contro, la liraglutide è stata più efficace nella perdita di peso corporeo con -3.6 kg (SE= 0.18), rispetto a -2.68 kg (SE= 0.18) di Exenatide LAR al termine delle 26 settimane (DURATION-6). Da valutare è anche l'andamento nel tempo dell'effetto ponderale; infatti le estensioni in aperto degli studi clinici in doppio cieco mostrano che, proseguendo la terapia, la riduzione del peso continua senza avere un apparente effetto "plateau" fino a 3 anni di trattamento,¹⁰⁵ suggerendo che Exenatide non induca tolleranza ai propri effetti sul peso, almeno a medio termine.

Effetti sul profilo lipidico

È stato osservato anche l'importante contributo che Exenatide LAR offre sul profilo lipidico. Gli agonisti del GLP-1R sono in grado di ridurre le LDL piccole e dense, che sono le principali responsabili del rischio aterogeno, con un aumento delle LDL di più grandi dimensioni.⁸² È stato visto come l'Exenatide settimanale, somministrata per 30 settimane, riduce l'apolipoproteina B e il rapporto apolipoproteina

B/apolipoproteina A₁, indipendentemente dal compenso glicemico e dalla perdita di peso.¹⁰⁶ In un altro studio di 52 settimane è stato visto che, pazienti che all'inizio avevano LDL ≥ 100 mg/dl, HDL $\leq 40/50$ (maschi/femmine) o trigliceridi ≥ 150 mg/dl hanno mostrato, al termine dello studio, miglioramenti importanti in tutti questi parametri lipidici con il trattamento di Exenatide LAR:

1. LDL: -12.7 (SE=1.61) mg/dl, $p < 0.0001$;
2. HDL: 2.5 (SE=0.34) mg/dl, $p < 0.0001$;
3. trigliceridi: -21% (1.9), $p < 0.0001$.¹⁰⁷

Effetti sui fattori di rischio cardiovascolare

Il trattamento con agonisti GLP-1R è stato visto essere in grado di ridurre la pressione arteriosa. Studi di metanalisi, hanno mostrato come sia in grado di abbassare la pressione sistolica di -1.79 mmHg (95% CI = -2.94 a -0.64) in confronto al placebo e di -2.39 mmHg (95% CI = -3.35 to -1.42) rispetto al controllo attivo; la pressione diastolica, invece, non ha subito grandi variazioni di importanza statistica.¹⁰⁸ In considerazione di queste osservazioni uno studio di 52 settimane ha valutato anche l'effetto di Exenatide LAR sulla pressione arteriosa. I risultati alla fine questo studio hanno mostrato miglioramenti sia sulla *pressione sistolica* (SBP), che su quella *diastolica* (DBP):

- SBP: -3.6 (SE=0.56) mmHg, $p < 0.0001$;
- DBP: -1.2 (SE=0.34) mmHg $p < 0.001$.

I risultati migliori si sono osservati nei pazienti con SBP elevata all'inizio dello studio (≥ 130 mmHg), con i seguenti valori alla fine delle 52 settimane:

- SBP: -8.5 (SE=0.85) mmHg, $p < 0.0001$;
- DBP: -3.0 (SE=0.50) mmHg, $p < 0.0001$.

Infine pazienti che al base-line avevano SBP ≥ 130 mmHg e DBP ≥ 80 mmHg, alla fine dello studio mostravano:

- SBP: -8.9 (SE=1.10) mmHg, $p < 0.0001$;
- DBP: -5.0 (SE=0.58) mmHg $p < 0.0001$.

Dei pazienti *Intent-To-Treats* (ITT) con SBP anormale alla base-line, il 41% ha raggiunto una SBP normale al termine delle 52 settimane.¹⁰⁷ Questa azione

probabilmente è dovuta ad una azione diretta del farmaco sulle resistenze periferiche.¹⁰⁹ Uno studio ha messo in rilievo come l'exendina-4 riesca a inibire l'ipertrofia cardiaca attraverso l'up-regolazione dell'espressione del recettore del GLP-1 e attivando il pathway di segnale AMPK/mTOR (*AMP-Activated Protein Kinase/Mammalian Target of Rapamycin*);¹¹⁰ inoltre, un altro studio, effettuato su topi modificati geneticamente, ha mostrato come l'exendina-4 sia capace di migliorare l'infiammazione epatica e vasale, risultando potenzialmente e simultaneamente utile nel trattamento della NASH e dell'aterosclerosi, attraverso la riduzione dell'infiltrazione macrofagica nel fegato e la riduzione delle LDL ossidate fagocitate dai macrofagi a livello vasale.¹¹¹ Non è da escludere che Exenatide possa agire attivando questa stessa via e contribuire alla riduzione dell'ipertrofia cardiaca. Tuttavia il ruolo del GLP-1 sull'ipertrofia cardiaca rimane ancora sconosciuto.

Sicurezza e tollerabilità

L'ipoglicemia è l'evento avverso più significativo quando si attua una terapia anti-diabetica, soprattutto se si utilizzano sulfoniluree ed insulina (DURATION-1 e -5). Le terapie basate su Exenatide, verosimilmente dovuto al suo meccanismo d'azione, sono associate ad un minimo rischio di ipoglicemia. Uno degli studi a dimostrare questo è stato lo studio EUREXA (*Europe Exenatide Study*) che ha documentato come l'incidenza di ipoglicemia è stata significativamente inferiore con Exenatide rispetto alle sulfoniluree¹⁷⁴. L'incidenza dell'ipoglicemia è aumentata quando Exenatide LAR è stato usato in associazione con una sulfonilurea (24% versus 5.4%) e per ridurre il rischio sarebbe opportuno rivalutare la terapia con le sulfoniluree, diminuendone la dose. Exenatide LAR è stato associato ad un'incidenza significativamente inferiore di episodi di ipoglicemia rispetto ad un'insulina basale nei pazienti che ricevevano metformina ed anche nei pazienti che ricevevano metformina associata ad una sulfonilurea (DURATION-3).⁹⁸

I frequenti eventi avversi associato ad Exenatide e sottolineati negli studi DURATION sono stati legati ad una sintomatologia gastro-intestinale, come nausea e vomito, i quali tendono a migliorare dopo circa 8 settimane di trattamento. Lo studio DURATION-1 mostra come l'Exenatide settimanale ha un'incidenza di nausea

minore rispetto all'Exenatide Bis-in-die, rispettivamente 26% e 35%; inoltre, sempre in questo studio, l'incidenza del vomito è stata minore ancora una volta nella somministrazione settimanale, con un 11% rispetto al 19%.⁸⁸ Tuttavia, le percentuali di sospensione della terapia a causa degli effetti collaterali sono state maggiori nei soggetti con Exenatide LAR versus insulina glargine (DURATION-3), Exenatide LAR versus i DPP-4 (DURATION-2 e -4) e pressoché paragonabili negli studi in cui si confrontavano Exenatide LAR versus metformina, pioglitazone ed Exenatide bis-in-die (DURATION-4 e -5). È stato osservato che alcuni pazienti possono sviluppare anticorpi anti-Exenatide, in seguito al trattamento con Exenatide LAR; questo titolo anticorpale diminuisce nel tempo e circa il 45% dei pazienti ha avuto un titolo anticorpale basso alla fine degli studi clinici. Dal punto di vista del controllo glicemico non sono state viste discordanze rispetto ai pazienti che non hanno sviluppato anticorpi anti-Exenatide.

L'uso degli analoghi del GLP-1 è stato potenzialmente associato all'incremento del rischio di pancreatiti e di tumore al pancreas. Bisogna però sottolineare che il rischio di pancreatite nei soggetti diabetici è aumentato rispetto alla popolazione generale, a seguito della concomitante presenza in questi soggetti di possibili altri fattori di rischio per la pancreatite stessa, quali calcolosi biliare e ipertrigliceridemia. Sono state fatte delle ricerche riguardanti gli agonisti del recettore del GLP-1 e di Exenatide LAR raccogliendo tutti gli studi randomizzati della durata maggiore di 11 settimane che hanno arruolato pazienti con DMT2. I dati ottenuti hanno confermato la sicurezza degli agonisti del GLP-1R per quanto riguarda la pancreatite ed il cancro al pancreas, in quanto l'incidenza di queste due patologie non era significativamente differente rispetto ai comparatori.¹¹² Tuttavia dovrebbero essere condotti in futuro ulteriori studi a lungo termine, con campioni di pazienti più ampi, per confermare questi risultati, in quanto i pareri a riguardo da parte della comunità scientifica sono ancora discordanti. Alla luce di questi risultati, l'Exenatide LAR si presenta non soltanto come un farmaco altamente tollerabile, ma anche con un buon profilo di sicurezza.

2.1.1.2 Liraglutide

La terapia con la Liraglutide rappresenta un cardine nel trattamento del DMT2, se il paziente non è adeguatamente compensato. La Liraglutide è un analogo strutturale del substrato naturale GLP-1. Essa è caratterizzata da un'omologia del 97% rispetto al GLP-1 endogeno, poiché vi è l'unica sostituzione di un solo aminoacido (arginina al posto della lisina in posizione 34) e l'aggiunta di una catena di 16 carboni di acido grasso (acido palmitico) legata alla lisina in posizione 26, come è mostrato in **Figura 10**. Queste modifiche permettono da un lato una modificazione della struttura quaternaria che andrà a nascondere il sito di attacco per il clivaggio e l'inattivazione della molecola ad opera dell'enzima DPP-4 e dall'altro consentono un legame non covalente con l'albumina che ritarda il catabolismo e l'eliminazione della molecola stessa. Tali caratteristiche strutturali rendono particolare la farmacocinetica e la farmacodinamica della Liraglutide, tanto da consentirne un utilizzo in monosomministrazione sottocutanea giornaliera. Difatti, l'azione prolungata è garantita sia dall'autoaggregazione spontanea nel sito di iniezione sia per il legame, sopracitato, con l'albumina circolante.¹¹³

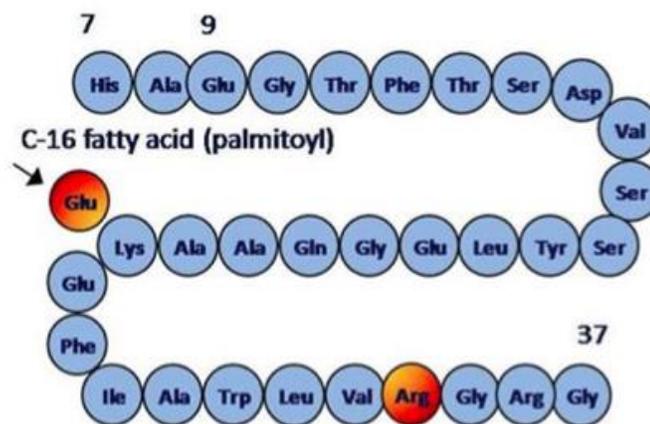


Figura 10: Struttura molecolare della Liraglutide.¹¹⁴

La Liraglutide è stata testata in un'ampia e articolata rete di studi clinici di fase 3 noti come LEAD trials in un programma che ha coinvolto oltre 6500 pazienti (di cui 4445 sottoposti alla molecola) in 600 differenti centri in 41 paesi in tutto il mondo. L'obiettivo degli studi LEAD 1-5, cui è seguito lo studio LEAD 6, prevedeva di

testare l'efficacia della Liraglutide nel DMT2 sia in monoterapia che in terapia combinata con agenti farmacologici che con maggiore frequenza vengono usati per la terapia del DMT2; lo studio LEAD 6, in particolar modo, ha valutato la tollerabilità a lungo termine rispetto all'Exenatide, altro agonista recettoriale del GLP-1.¹¹⁵⁻¹²⁰ Valutando i risultati dei trials clinici e le metanalisi¹²¹ è possibile ricavare indicazioni interessanti circa il profilo clinico della molecola e il suo impiego nella terapia del DMT2, relativamente all'efficacia normoglicemizzante e quindi gli effetti sul controllo glicemico, sul peso, sui fattori di rischio cardiovascolare e sulla sicurezza.

Effetti sul controllo glicemico

Secondo gli studi LEAD da 1-5, il trattamento con Liraglutide alla dose di 1.2 mg/die e ancor di più alla dose di 1.8 mg/die determinava una significativa riduzione dell'emoglobina glicosilata, in media di 1.5 punti percentuali rispetto al basale. Questa diminuzione era, nella maggior parte dei casi, significativamente superiore rispetto a quella che si otteneva con le varie molecole utilizzate come comparatori attivi, che inducevano una riduzione dell'HbA1c compreso tra 0.4 e 1.1 punti percentuali. Per di più, una considerevole percentuale di soggetti trattati con Liraglutide raggiungeva il target di trattamento rispetto ai soggetti trattati con i comparatori attivi. Infatti, considerando come target di compenso glicemico il valore di HbA1c minore di 7%, esso veniva raggiunto da circa il 70% dei pazienti trattati con Liraglutide negli studi LEAD 6.¹²² Inoltre, fra gli studi LEAD, i quali hanno avuto una durata di 26 settimane, lo studio LEAD-3, che compara l'efficacia e la sicurezza del trattamento in monoterapia di Liraglutide vs glimepiride 8 mg, ha una durata di 52 settimane con un'estensione a 2 anni.¹¹⁶ Lo studio LEAD-3 dimostra che, nei pazienti trattati con Liraglutide in monoterapia, a due anni il controllo glicemico rimaneva migliore rispetto ai pazienti trattati con glimepiride; in particolare, il miglioramento in termini di valori di HbA1c, già in 8-10 settimane di terapia, rimaneva essenzialmente invariato per tutta la durata dei due anni di follow up.¹¹⁶ I pazienti dello stesso studio in terapia con glimepiride, invece, mostravano una minore diminuzione dei valori di HbA1c ma maggiormente si osserva una tendenza al peggioramento del controllo glicemico nel corso del trattamento. Queste osservazioni

sostengono un forte razionale nell'impiego di una molecola, come Liraglutide, con potenziali azioni protettive sulla funzione β -cellulare pancreatica nelle fasi molto precoci della malattia; quindi, in questo modo si ha l'intento di ristabilire una sufficiente funzione β -cellulare tale da consensuire un controllo glicemico stabile nel tempo.

Altri studi clinici condotti su Liraglutide mostrano un miglioramento in termini di funzione β -cellulare,¹²³ misurata attraverso il modello di valutazione dell'omeostasi per la funzionalità delle β -cellule pancreatiche (HOMA-B) e attraverso il rapporto tra proinsulina e insulina (-0.11 a 0.01). È stato dimostrato un miglioramento della prima e seconda fase di secrezione insulinica dopo 52 settimane di trattamento con Liraglutide¹¹⁶ in un sottogruppo di pazienti con DMT2 (n=29).

Negli studi LEAD¹¹⁵⁻¹²⁰ la Liraglutide si è, evidentemente, dimostrata non solo capace di indurre un miglioramento della HbA1c, ma anche della glicemia a digiuno, con un riduzione media, negli studi LEAD 1-5 di 43 mg/dl, maggiore della riduzione dai 5 ai 32 mg/dl osservato nei comparatori attivi. Analogamente, il miglioramento della glicemia post-prandiale risultava, nella maggior parte dei casi, superiore con Liraglutide rispetto sia al farmaco placebo che alle altre molecole utilizzate nei trial LEAD; la riduzione del valore glicemico oscilla tra i 31 e i 49 mg/dL dopo tutti e tre i pasti principali.¹²⁴

Effetti sul profilo lipidico

Uno studio su pazienti anziani, in sovrappeso o obesi, con pre-diabete, ha dimostrato che, dopo 14 settimane di trattamento con Liraglutide (1.8 mg) migliorano significativamente i livelli di trigliceridi paragonati ai risultati ottenuti con il placebo (-0.4 vs -0.1 mmol/l).¹²⁵

È stato condotto uno studio osservazionale della durata di 24 settimane, in cui sono stati arruolati pazienti con DMT2 e obesi, sottoposti a trattamento con Liraglutide (di 0.6 mg/die per 3 giorni, seguiti da 1.2 mg per i 10 giorni successive e, per ultimo, 1.8 mg/die per 22 settimane) in associazione alla terapia antidiabetica.¹²⁶ I pazienti sono stati valutati dopo 12 e 24 settimane di terapia ed è stato osservato che il colesterolo totale (mg/dl) da 166.07 ± 38.53 al baseline, dopo 12 settimane di terapia si riduceva

(134.5±25.35) e veniva mantenuto il decremento dopo 24 settimane (125.14±22.04) ($p<0.001$); LDL-colesterolo (mg/dl) 64.21±30.92 al baseline, dopo 12 settimane si riduceva a 74.71±24.26, e dopo 24 settimane era ancora ridotto (64.5±21.17; $p=0.001$); *Trigliceridi* (TG) (mg/dl) da 129.07±56.34 al baseline, dopo 12 settimane si riducevano a 103.64±43.37, dopo 24 settimane veniva mantenuto il decremento (93.36±36.68; $p=0.002$).¹²⁶

Eppure, è da sottolineare il fatto che il trattamento con analoghi del GLP-1 induce una riduzione della concentrazione delle LDL piccole e dense, principali responsabili dell'aterogenesi, favorendo l'aumento delle LDL-colesterolo con diametro maggiore che sono responsabili in misura minore del rischio aterogeno.^{81,127}

Effetti sul peso corporeo

Il principale problema della maggior parte dei farmaci, che tradizionalmente vengono utilizzate per il trattamento del DMT2 (sulfaniluree, tiazolidinedioni, insulina), è che il loro impiego è associato ad un aumento ponderale, fatto non auspicabile generalmente, ma specialmente nei diabetici di tipo 2, poiché la maggior parte dei pazienti sono in sovrappeso o addirittura obesi, nei quali il calo ponderale dovrebbe essere uno dei target della terapia non farmacologica. In opposizione ai farmaci sopracitati, la Liraglutide non provoca aumento ponderale, ma anzi è in grado di ridurre il peso corporeo. Questo importante dato è emerso molto nitidamente dagli studi LEAD dove Liraglutide, sia in monoterapia che in terapia combinata con altri ipoglicemizzanti orali, si rivelava capace di indurre una copiscua perdita di peso che poteva rasentare i 3 kg, ove i comparatori attivi inducevano un aumento ponderale che oscillava tra 1 e 2 kg.^{115,120} Quanto esposto è dimostrato dallo studio LEAD-3, infatti, dopo 104 settimane di follow-up, i pazienti trattati con Liraglutide 1.8 mg/die avevano perso in media 2.7 kg, mentre i pazienti in terapia con glimepiride avevano in media guadagnato 1.1 kg, per una differenza netta tra i due trattamenti di quasi 4 kg.¹¹⁶ A questo proposito, il BMI dei pazienti prima della terapia non sembra avere influenze sulla capacità della Liraglutide di indurre un calo ponderale, infatti attraverso un'analisi dei LEAD 1-5^{115,119} si evince che si assisteva ad una riduzione ponderale a prescindere dalle classi di BMI. Prevedibilmente, l'effetto è ottenuto in

soggetti con un maggiore BMI, mentre tende a essere meno consistente in soggetti con BMI <25 kg/m².

Inoltre, uno studio condotto su 59 pazienti affetti da DMT2 ha dimostrato che il calo ponderale indotto dalla Liraglutide è attribuibile, in primis a una consistente perdita di massa grassa; in particolare la riduzione del grasso viscerale sarebbe più consistente rispetto alla riduzione del grasso sottocutaneo.¹²⁸ I meccanismi fisiopatologici di questo calo ponderale sembrerebbero connessi a un effetto centrale che la Liraglutide esercita sui meccanismi deputati alla regolazione dell'equilibrio fame/sazietà. Quanto detto può essere supportato da importanti e numerosi dati preclinici, i quali dimostrano che si assiste ad un'attivazione delle vie nervose preposte alla regolazione dello stimolo all'assunzione del cibo in seguito alla somministrazione di Liraglutide, ma anche dal fatto che la perdita ponderale si realizza in modo pressochè identico sia nei pazienti che lamentavano gli effetti collaterali gastrointestinali, in seguito all'assunzione del farmaco, sia in quelli che non li hanno manifestati.¹²⁹ Ciò testimonia che il calo ponderale non può essere imputato alla più o meno moderata nausea avvertita da circa il 20-30% dei pazienti durante le prime settimane di trattamento.

Infine, è opportuno sottolineare che la perdita di peso, sebbene costituisca già di per se un fondamentale target terapeutico, non può essere considerato il meccanismo responsabile dell'effetto normoglicemizzante della Liraglutide, infatti la riduzione della HbA1c risulta di pari entità sia nei pazienti che perdono peso sia in quelli in cui non si verifichi un importante modifica ponderale.¹²⁴

Effetti sui fattori di rischio cardiovascolari

L'obiettivo della terapia del DMT2 dovrebbe essere quello di prevenire gli eventi cardiovascolari, poiché costituiscono la principale fonte di morbilità e mortalità nei soggetti affetti. Quindi è fondamentale che gli interventi farmacologici adottati non abbiano effetti negativi, diretti o indiretti, sul rischio cardiovascolare; per di più, sarebbe un grande vantaggio se la terapia somministrata per il controllo glicemico potesse avere un effetto protettivo diretto contro le complicanze macrovascolari.

La terapia con metformina sembrerebbe avere un moderato effetto protettivo sul rischio di infarto del miocardio, su soggetti in sovrappeso o obesi.¹³⁰

Sembra che il pioglitazone, in pazienti in prevenzione secondaria, riduca in maniera modesta ma significativa il rischio che occorra un endpoint composto da morte per cause cardiovascolari, come infarto del miocardio o stroke. Il trial clinico IRIS¹³¹ ha dimostrato che il trattamento con Pioglitazone migliora gli esiti cardiovascolari su pazienti insulino-resistenti non diabetici con pregresso ictus o *Transient Ischemic Attack* (TIA).

Trattando, invece, gli effetti cardiovascolari della Liraglutide, va citata un'analisi sull'incidenza di MACE intesi come morte cardiovascolare, infarto del miocardio o stroke, in pazienti diabetici arruolati nei trial LEAD, rivela che i pazienti esposti alla molecola mostravano una minore tendenza di incidenza di MACE rispetto ai pazienti del gruppo controllo.¹³²

Vi sono dei dati consolidati, ottenuti dal programma LEAD, i quali dimostrano un effetto positivo della molecola su alcuni fattori di rischio cardiovascolare. Nei trials LEAD 1-5 si è osservata una diminuzione consistente della pressione arteriosa sistolica, con riduzioni statisticamente significative che vanno da 2.1 a 6.7 mmHg rispetto al valore basale;¹²² questi dati non sono trascurabili, anche perché è opportuno ricordare che una riduzione dei valori pressori di 5.6 mmHg in pazienti diabetici si è dimostrata in grado di ridurre del 9% il rischio di eventi micro o macrovascolari maggiori e di ridurre del 18% il rischio di morte cardiovascolare.¹³³ La riduzione dei valori della pressione arteriosa sistolica si verifica precocemente in corso di terapia con Liraglutide e appare quindi indipendentemente dal calo ponderale, poiché si realizza ancor prima di quest'ultimo.¹²⁴

In aggiunta all'effetto positivo sulla pressione sistolica, la Liraglutide, come già anticipato, sembra avere una favorevole influenza sul profilo lipidico, infatti una metanalisi dei trials LEAD ha dimostrato una riduzione del colesterolo totale, del colesterolo LDL, dei trigliceridi e degli acidi grassi liberi, rispetto ai pazienti trattati con i comparatori attivi.¹²⁴

Recentemente, invece, abbiamo ottenuto una conferma attraverso lo studio LEADER.⁴¹ Esso è uno studio randomizzato multicentrico condotto su 9340 pazienti

che ha dimostrato come la Liraglutide riduca il rischio cardiovascolare rispetto al placebo.⁴¹ Lo studio ha previsto un follow-up di 3.8 anni; l'evento primitivo nei pazienti appartenenti al gruppo trattato con la Liraglutide si è verificato nel 13% dei casi (608 su 4668 pazienti) rispetto al gruppo di pazienti trattati con il placebo (694 su 4672 pazienti, 14.9%) (HR, 0.87; 95% CI, 0.78 to 0.97; $p < 0.001$ for non inferiority; $p = 0.01$ for superiority). Sono andati incontro a exitus per cause cardiovascolari nel gruppo dei pazienti Liraglutide (219 pazienti [4.7%]) rispetto al gruppo placebo (278 [6.0%]) (HR, 0.78; 95% CI, 0.66 to 0.93; $p = 0.007$).; anche il tasso di morti per qualsiasi causa è risultato più basso nel gruppo Liraglutide (381 pazienti, 8.2%) piuttosto che il gruppo placebo (477, 9.6%) (HR, 0.85; 95% CI, 0.74 to 0.97; $p = 0.02$). Per quanto riguarda invece l'infarto del miocardio non fatale, l'ictus non fatale e le ospedalizzazioni per insufficienza cardiaca, i risultati non sono stati significativamente più bassi nel gruppo trattato con Liraglutide rispetto al gruppo placebo.⁴¹

Sono stati analizzati altri due marker, che vengono sempre più individuati come marcatori di rischio cardiovascolare: il peptide natriuretico cerebrale (*Brain Natriuretic Peptide*, BNP) e la proteina C reattiva ad alta sensibilità (*high sensitivity C-Reactive Protein*, hsPCR), i quali appaiono significativamente ridotti dalla Liraglutide.¹³⁴ Dopo il trattamento con la Liraglutide è stata anche individuata una riduzione del PAI-1, marker di rischio per malattie cardiovascolari. Il TNF e le elevate concentrazioni di glucosio plasmatico, in pazienti con DMT2, causano aumentati livelli di PAI-1 e delle molecole di adesione: molecola di adesione cellulare vascolare (*Vascular Cell Adhesion Molecule*, V-CAM) e molecole di adesione cellulare intercellulare (*Intercellular Cell Adhesion Molecule*, I-CAM), nelle cellule endoteliali vascolari; ciò predispone i pazienti a una precoce aterogenesi, sia in corso di DMT2 che di sindrome metabolica. Infatti il TNF e l'iperglicemia attivano la via di trascrizione di I-CAM e V-CAM attraverso la traslocazione, dal citoplasma al nucleo, del *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated β cells* (NF κ), con conseguente induzione dell'espressione dei geni.¹³⁵ Inoltre, il TNF attiva la trascrizione di PAI-1 attraverso la modulazione dell'espressione del recettore nucleare "orfano" (Nur77) e il legame al proprio sito nel promotore del gene PAI-1.

Diversi studi hanno dimostrato che elevati livelli di glucosio inducono l'espressione di PAI-1 mediante la via Rho/Rho chinasi mediata dall'attivazione di NFκβ.¹³⁶ Studi in vitro hanno dimostrato che la Liraglutide diminuisce l'espressione del mRNA Nur77 e inibisce l'espressione di PAI-1 indotta dal TNF e dall'iperglicemia. Ciò conferma un potenziale ruolo di Liraglutide nell'inibizione della disfunzione delle cellule endoteliali nella MetS e nel DMT2.

Sicurezza

L'evento avverso più temuto durante il trattamento con ipoglicemizzanti è certamente l'ipoglicemia. Soprattutto nel paziente anziano dove, per la possibile fragilità e le abituali comorbidità, un episodio ipoglicemico severo può mettere a rischio, con maggiore probabilità, la vita stessa del paziente. Durante gli studi LEAD 1-5, il rischio globale di ipoglicemia in pazienti trattati con Liraglutide è risultato particolarmente basso, probabilmente proprio per il peculiare meccanismo d'azione della molecola. In particolar modo, negli studi in cui la Liraglutide veniva utilizzato in combinazione con metformina il rischio appariva significativamente inferiore rispetto al comparatore attivo (glimepiride).¹²² Gli episodi ipoglicemici si sono verificati con maggiore frequenza quando il farmaco era somministrato in terapia combinata con le sulfaniluree, ma queste ultime sono ben note come farmaci in grado di provocare ipoglicemie. Facendo un paragone con il rischio ipoglicemico che si realizza in corso di trattamento con sulfaniluree o insulina, il minor rischio ipoglicemico della Liraglutide è uno degli aspetti che rende tale terapia estremamente maneggevole rispetto al trattamento tradizionale con secretagoghi o insulina.

Dagli studi LEAD si nota anche l'ottimo profilo di tollerabilità della Liraglutide. Complessivamente, solo il 7.8% dei pazienti trattati con tale molecola si è ritirato dagli studi a causa degli effetti collaterali.¹²⁴ Gli effetti collaterali più comunemente riportati sono eventi gastrointestinali (nausea, o raramente, vomito).⁴¹

Dal 7 al 40% dei pazienti esposti alla Liraglutide, secondo gli studi LEAD, hanno riportato nausea, tuttavia, va considerato che nella grande maggioranza dei casi si trattava di un episodio temporaneo, che cessava quasi totalmente a partire dalla terza settimana di trattamento. Nonostante ciò, solamente un numero esiguo di pazienti

(2.8% per nausea e 1.5% per vomito) ha deciso di ritirarsi dagli studi a causa degli effetti collaterali, a dimostrazione del fatto che gli effetti gastrointestinali molto raramente rappresentano una barriera al trattamento.¹²⁴ Infine, una piccola percentuale di pazienti (mediamente 8.6%) ha sviluppato anticorpi anti-Liraglutide nel corso dei trials LEAD, tuttavia non è stata registrata alcuna riduzione dell'efficacia del farmaco clinicamente valutabile; dunque, si potrebbe affermare che, anche nella piccola minoranza di pazienti in cui si manifestino, gli anticorpi non hanno alcuna azione bloccante verso la molecola e sono di scarsa o nulla rilevanza clinica.¹²⁴

Gli analoghi del GLP-1 sono stati potenzialmente associati a un aumentato rischio di sviluppare pancreatite;¹³³ durante gli studi LEAD sono stati osservati 7 casi totali di pancreatite (5 acute e 2 croniche) in pazienti trattati con Liraglutide, mentre nel braccio controllo è stato riscontrato un solo caso. È opportuno però sottolineare che nei pazienti diabetici la prevalenza di pancreatite è circa 3 volte più elevata che nella popolazione generale; difatti, il numero di pancreatiti atteso negli studi LEAD, in relazione alla numerosità del campione e della prevalenza in una popolazione analoga di soggetti con DMT2, avrebbe dovuto essere di 13 nei pazienti trattati con Liraglutide e 4 nei controlli. Quindi, è possibile dedurre che i dati LEAD non confermano un'associazione tra Liraglutide e il rischio di pancreatite, poiché in relazione al numero di casi, il risultato è inferiore a quello atteso sulla base dei dati di prevalenza in popolazioni analoghe. Secondo invece lo studio LEADER l'incidenza della pancreatite non è significativamente più bassa nel gruppo di soggetti trattati con Liraglutide rispetto al gruppo placebo.⁴¹

In fase preclinica sono stati osservati sia l'iperplasia delle cellule C della tiroide sia il carcinoma midollare tiroidei in ratti e topi (ma non in cani o primati) trattati con Liraglutide; a tal proposito, negli studi LEAD è stata dosata la calcitonina e non si è osservata nessuna evidenza di attivazione delle cellule C. infatti all'interno dei trials sono stati osservati solo 5 casi di iperplasia delle cellule C della tiroide nei pazienti trattati con Liraglutide, mentre 1 nel braccio controllo; tuttavia, 4 di questi 5 casi manifestavano livelli di calcitonina elevati già al controllo utile per l'arruolamento.¹²⁴

Per concludere, dall'analisi dei trials LEAD e LEADER, la Liraglutide si presenta come un farmaco con un'ottima tollerabilità, ma anche con un buon profilo di sicurezza.

2.1.2 Approccio chirurgico

La chirurgia bariatrica si occupa del trattamento chirurgico dei pazienti affetti da obesità; offre una notevole riduzione del rischio di sviluppare nuove comorbidità e del rischio di mortalità cardiometabolica. La chirurgia bariatrica è l'unico trattamento in grado di determinare una perdita di peso significativa nel lungo termine, ma rappresenta ad oggi uno strumento di supporto alla necessità e alla determinazione della persona obesa di perdere peso e di riuscire a mantenerlo nel lungo periodo.

La chirurgia bariatrica ha un rapporto costi/benefici molto vantaggioso e spesso consente un notevole risparmio sui costi socio-sanitari rispetto all'approccio conservativo.

La chirurgia bariatrica non è indicata per tutti i pazienti obesi e soprattutto non può essere richiesta per motivi puramente estetici (immagine negativa del proprio corpo). Il suo principale scopo è quello di prevenire e/o correggere i problemi medici associati all'obesità. Tra i requisiti principali richiesti per sottoporsi a un intervento di chirurgia bariatrica vi sono i seguenti: oltre che per motivi puramente estetici, bisogna avere un BMI maggiore o uguale a 40 kg/m² o un BMI compreso tra 35 e 39.9 kg/m² se associato a una o più malattie o complicanze correlate all'obesità (diabete mellito di tipo 2 (HbA1C <8%), malattie cardiache, ipertensione arteriosa, dislipidemia, problemi alle giunture, apnee notturne, ecc). Il paziente dovrà ovviamente astenersi dal consumo di alcolici, droghe e fumo a partire da almeno 6 settimane prima dell'intervento di chirurgia bariatrica.

I principali interventi chirurgici attualmente in uso in Italia sono di tre tipi e la loro efficacia è andata progressivamente consolidandosi in questi ultimi decenni, supportata da ampie casistiche e da periodi di osservazione post-intervento sufficientemente lunghi. La chirurgia gastrorestrittiva riduce la quantità di cibo che si può assumere in un solo pasto, in modo da percepire più precocemente il senso di sazietà e più a lungo. Si basa sulla separazione di una piccola parte alta dello stomaco

con il posizionamento di un anello gonfiabile per formare una tasca gastrica che si svuota nell'area rimanente dello stomaco attraverso un orifizio stretto e non dilatabile (bendaggio gastrico regolabile, gastroplastica verticale e sleeve gastrectomy). Gli interventi di chirurgia mista svolgono un'azione prevalentemente funzionale; abbinano la componente gastrorestrittiva a quella di ridotto assorbimento del cibo. Comprendono il bypass gastrico e le sue varianti. L'intervento prevede la creazione di una piccola tasca gastrica che non comunica con il resto dello stomaco (a differenza del bendaggio gastrico regolabile), ma viene direttamente collegata all'intestino tenue a distanza variabile dal duodeno. Il bypass determina un calo di peso corporeo riducendo di molto la quantità di cibo introdotta e inducendo un precoce senso di sazietà. Gli interventi di tipo malassorbitivo riducono drasticamente l'assorbimento del cibo e dell'energia. Le procedure chirurgiche malassorbitive comportano una riduzione irreversibile delle dimensioni dello stomaco e un marcato cambiamento del processo digestivo. Lo stomaco viene collegato alla parte terminale dell'intestino tenue; in questo modo il cibo percorre soltanto una piccola parte del tratto gastrointestinale, con conseguente notevole riduzione dell'assorbimento delle sostanze nutritive e induzione di un precoce senso di sazietà (diversione biliopancreatica).

Nei casi di diabete ed obesità (*Diabesity*),¹³⁷ la chirurgia bariatrica diventa uno strumento importante nella terapia a lungo termine dei pazienti diabetici gravi.^{138,139} Numerosi studi hanno mostrato che la chirurgia bariatrica determina un buon compenso glicemico nella maggior parte dei pazienti operati.¹⁴⁰ Le metodiche utilizzate con maggiore frequenza sono il bypass gastrico, la diversione biliopancreatica con switch duodenale, la sleeve gastrectomy. Queste tecniche determinano i loro effetti metabolici attraverso una combinazione di: restrizione del volume dello stomaco, bypass intestinale e modificazioni ormonali. I benefici della chirurgia bariatrica includono anche un miglioramento dei fattori di rischio cardiovascolare come dislipidemia e ipertensione.^{141,142}

2.2 STRATEGIE DIAGNOSTICHE

2.2.1 Strategie strumentali di diagnosi

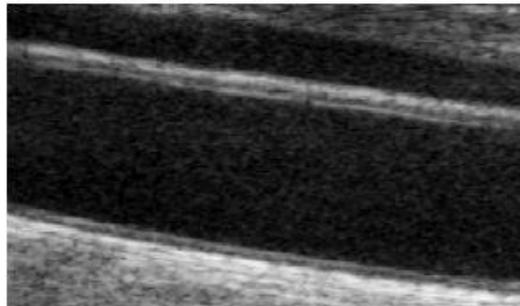
2.2.1.1 Ispessimento Medio Intimale Carotideo (carotid Intima Media Thickness, cIMT)

Sfruttando la metodica non invasiva e a basso impatto economico dell'eco-color-doppler è possibile valutare a livello carotideo la presenza non soltanto di placche ateromasiche, che possono o meno alterare il flusso sanguigno, ma anche la presenza di un aumento del cIMT.

Anatomicamente la parete vasale è composta da tre strati:

- strato esterno: avventizia;
- strato medio: media o strato muscolare;
- strato interno: intima o strato endoteliale.

Una classica immagine ultrasonografica della parete arteriosa a livello del complesso intima-media, risulta caratterizzata dalla presenza di una coppia di linee iperecogene parallele che delimitano uno spazio anecogeno. Le due linee iperecogene rappresentano lo strato esterno, l'avventizia, e lo strato interno, cioè il complesso intima-media. La sottile linea ipo-anecogena tra questi due strati, è rappresentato dallo strato medio, ossia dalla lamina elastica esterna (**Figura 11**).¹⁴³



*Figura 11. Ispessimento Medio Intimale Carotideo (cIMT) normale.*¹⁴³

A causa di alcuni problemi di ordine tecnico, le linee guida della società di diagnostica vascolare (SIDV-GIUV) consigliano di:

- misurare il cIMT sulla parete posteriore della carotide comune ad 1 cm dalla biforcazione, in un segmento di carotide di circa 1 cm, prendendo la misura

sulla parete posteriore in almeno 2-3 proiezioni e segnalando il valore medio o massimo;

- utilizzare immagini zoomate e di utilizzare software dedicati;
- di fare misurazioni ripetute o di far eseguire la misurazione da operatori indipendenti;
- di segnalare la misura dell'IMT separatamente nelle due carotidi comuni;
- di segnalare sul referto se il valore riportato è il valore medio o massimo.¹⁴⁴

Alla luce di numerosi studi effettuati, come il *Cardiovascular Health Study (CHS)*,¹⁴⁵ lo *studio Rotterdam*¹⁴⁶ e l'*Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)*,¹⁴⁷ le società europee di cardiologia e dell'ipertensione (*European Society of Cardiology/ European Society of Hypertension, ESC/ESH*), hanno inserito nelle linee guida la valutazione dello spessore medio-intimale come marker di danno d'organo sub-clinico.¹⁴⁸ Il valore soglia di questo spessore è stato identificato <0,9 mm, limite oltre il quale si definisce patologico; invece, la presenza di placche può essere definita da un cIMT ≥ 1.5 mm o da un ispessimento focale di 0.5 mm o del 50% rispetto ai valori adiacenti di cIMT.

Alcune meta-analisi,^{149,150} hanno raccolto tutti gli studi prospettici che indagavano l'associazione tra valori del cIMT basale e rischio di eventi cardiovascolari ed hanno riportato che, per una differenza assoluta del cIMT di 0.1 mm, il rischio futuro di infarto miocardico ed ictus cerebrale aumentava rispettivamente del 10-15%, e del 13-18% all'anno.

2.2.1.2 Disfunzione Endoteliale

L'endotelio vasale non è solamente un insieme di cellule che formano una barriera tra sangue e tessuti circostanti, ma rappresenta un vero e proprio organo avente la funzione di modulare il tono vasale (**Figura 12**) e la quantità di flusso ematico in risposta a stimoli umorali, nervosi e meccanici. Fisiologicamente l'endotelio partecipa ai meccanismi di angiogenesi e di mitogenesi; contribuisce, inoltre, alla fluidità ematica, alla regolazione dell'infiammazione e dell'attivazione piastrinica. Tutti questi processi sono possibili grazie al rilascio di sostanze vasodilatatrici, quali

l'NO, la prostaciclina e il peptide natriuretico di tipo C, sostanze vasocostrittrici, quali l'*Endotelina-1* (ET-1), l'angiotensina-II, il trombossano-A2 e le *specie reattive dell'ossigeno* (ROS), molecole di adesione, quali VCAM-1, ICAM-1 ed E-selectina, modulatori dell'emostasi, quali l'attivatore del plasminogeno ed il suo inibitore, il fattore tissutale, il fattore di Von Willebrand ed il fibrinogeno.¹⁵¹

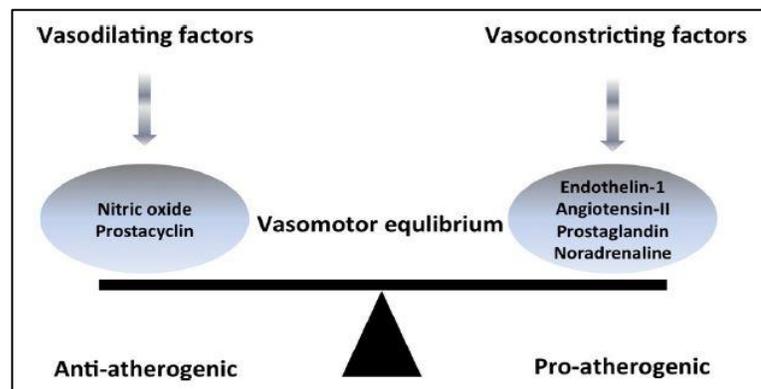


Figura 12. Lo squilibrio tra i fattori vasoregolatori induce la disfunzione endoteliale nel diabete.¹⁵¹

Quando sono presenti fattori di rischio cardiovascolare, tra cui anche il DM, il ruolo protettivo dell'endotelio si altera, andando a determinare una condizione che prende il nome di "*disfunzione endoteliale*", descritta per la prima volta nell'uomo nel 1990 in soggetti ipertesi¹⁵² e caratterizzata dalla compromissione di quell'equilibrio che è in grado di fornire l'endotelio. In questa condizione viene ad alterarsi la risposta vasomotoria ai principali stimoli vasodilatatori endotelio-dipendenti, spostando l'equilibrio verso un'attività pro-infiammatoria e pro-coagulante dell'endotelio. Inoltre è stato dimostrato che la disfunzione endoteliale può precedere le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi coronarica.¹⁵³

La funzione endoteliale può essere valutata sia a livello coronarico, sia a livello dell'avambraccio, utilizzando l'infusione di sostanze con azione vasodilatante e vasocostringente (rispettivamente Acetilcolina e L-N-monometilarginina) a dosi tali da non determinare effetti sistemici. La funzione endoteliale può essere valutata anche attraverso la risposta dell'arteria brachiale a bruschi aumenti del flusso ematico. Per ovviare a metodiche invasive come la pletismografia "*strain gauge*" nel distretto periferico, nel 1992, si cominciò a valutare la reattività vascolare dell'arteria

brachiale per mezzo dell'ultrasonografia, misurando la capacità di questo vaso di dilatarsi in seguito ad un aumento dello *shear stress* (*Flow-Mediated Dilatation, FMD*).^{154,155} Il mediatore principale di questa tecnica è il NO, per cui può realizzarsi in presenza di un endotelio integro.¹⁵⁵ Questa metodica ha il vantaggio di non essere invasiva rispetto alla valutazione della funzione endoteliale a livello coronarico ed alla pletismografia “*strain gauge*”; tuttavia presenta una variabilità intra- ed inter-operatore.^{156,157} Per ovviare a questi inconvenienti sarebbe opportuno, infatti, avere una accuratezza metodologica elevata e rispettare alcuni pre-requisiti, come mostrato in **Figura 13**. Sono considerati normali valori di FMD superiori al 10%.¹⁵³

Orario	l'esame dovrebbe essere eseguito sempre alla stessa ora del giorno
Temperatura	la valutazione ultrasonografica dovrebbe essere eseguita a temperatura costante, in un ambiente provvisto di condizionatore
Farmaci	tutti i farmaci vasoattivi dovrebbero essere sospesi la sera prima dell'esame
Caffè e tè	il giorno dell'esecuzione dell'esame il paziente dovrebbe astenersi dall'assunzione di caffè o tè
Fumo	allo stesso modo i pazienti dovrebbero astenersi dal fumo
Influenza del cibo	i pazienti non dovrebbero assumere pasti copiosi o ricchi di grassi
Diametro dell'arteria brachiale	deve essere compreso tra 2,5 e 5 mm

Figura 13. Prerequisiti e fattori che influenzano la *Flow-mediated dilatation*.¹⁵⁴

2.2.1.3 Fatty Liver Index (FLI)

La presenza di steatosi epatica è possibile valutarla attraverso un test non invasivo, detto Fatty Liver Index (FLI) che usa un algoritmo¹⁵⁸ basato sui valori di BMI, CV, TG e *Gamma Glutamyl Trasferasi* (GGT), in grado di identificare il fegato grasso con un'accuratezza del 95%.

La formula utilizzata per il calcolo del Fatty Liver Index è la seguente:

$$FLI = (e^{0.953 \times \log_e(TG)} + 0.139 \times BMI + 0.718 \times \log_e(GGT) + 0.053 \times CV - 15.745) / (1 + e^{0.953 \times \log_e(TG) + 0.139 \times BMI + 0.718 \times \log_e(GGT) + 0.53 \times CV - 15.745}) \times 100.$$

L'indice FLI può essere quindi definito come un correlato clinico e metabolico di NAFLD. Esso fornisce un quantitativo numerico di stima della steatosi epatica che va da 0 a 100. Secondo i cut-off (**Figura 14**) proposti da Bedogni et al., la steatosi

epatica può essere esclusa se l'indice FLI è < 30, mentre un indice FLI ≥ 60 predice la presenza di steatosi epatica con una sensibilità dell'87% e una specificità dell'86%.¹⁵⁸

FLI cut-point	%	SN	SP	LR+	LR-
≥10	90	98	17	1.2	0.1
≥20	74	94	44	1.7	0.1
≥30	60	87	64	2.4	0.2
≥40	53	82	72	2.9	0.3
≥50	43	70	80	3.5	0.4
≥60	36	61	86	4.3	0.5
≥70	28	49	91	5.2	0.6
≥80	18	35	96	9.3	0.7
≥90	9	18	99	15.6	0.8

Abbreviations: FLI = fatty liver index; % = number of patients with FLI ≥ cut-point; SN = sensitivity; SP = specificity; LR+ = positive likelihood ratio; LR- = negative likelihood ratio.

Figura 14. Cut-off dell'indice FLI per la valutazione della steatosi epatica.¹⁵⁸

2.2.1.4 Valutazione ecografica del grasso viscerale

L'obesità addominale è stata associata a intolleranza al glucosio, ipertensione, dislipidemia, iperinsulinemia e malattia cardiovascolare (**Figura 15**).^{159,160}

L'associazione tra obesità addominale e fattori di rischio cardiometabolico è dovuta principalmente al *tessuto adiposo viscerale in eccesso* (*Visceral Adipose Tissue*, VAT), mentre il *tessuto adiposo addominale sottocutaneo* (*Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue*, SAAT) influenza il profilo metabolico del paziente in misura minore.¹⁶¹ Il VAT è considerato più metabolicamente attivo del SAAT (**Figura 16**) e differisce, tra le altre cose, nella secrezione di adipochine/citochine, ormoni e molecole immunitarie e nella reattività lipolitica/lipo-genetica.¹⁶²

Il tessuto adiposo viscerale in eccesso causa direttamente la progressione dei fattori di rischio multipli, attraverso la secrezione di FFA in eccesso e adipochine infiammatorie, e la ridotta secrezione di adiponectina. Il contributo importante del VAT alla dislipidemia e all'insulino resistenza fornisce un legame indiretto, sebbene clinicamente importante, alla genesi e alla progressione dell'aterosclerosi e della malattia cardiovascolare. Il VAT in eccesso è tipicamente associata a elevati livelli di PCR e FFA, come pure a ridotti livelli di adiponectina. L'elevata PCR è un indicatore

di infiammazione. E' stato dimostrato che l'obesità addominale si associa alla cascata infiammatoria, poiché il tessuto adiposo esprime una quantità di citochine infiammatorie.



Figura 15. Effetti dell'obesità addominale sui parametri di rischio cardiometabolico.¹⁶⁰

Attualmente si ritiene che l'infiammazione gioca un ruolo nello sviluppo di aterosclerosi e diabete di tipo 2. Elevati livelli di PCR sono considerati predittivi di malattia cardiovascolare e insulino resistenza. Elevati livelli di FFA appaiono giocare un ruolo significativo nello sviluppo di insulino resistenza. E' stato suggerito che elevati FFA e lipidi intracellulari inibiscono il meccanismo di segnalazione dell'insulina, portando a una riduzione del trasporto di glucosio al muscolo. I FFA giocano anche un ruolo di mediatori tra l'insulino resistenza e la disfunzione delle B-cellule, indicando che una riduzione nel livello di FFA potrebbe essere un target terapeutico da conseguire. L'adiponectina è una proteina circolante specifica del tessuto adiposo che è coinvolta nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico. E' stato dimostrato che i livelli di adiponectina sono ridotti negli adulti con obesità e DMT2. Nei non diabetici, è stato dimostrato che ipertrigliceridemia e bassi livelli di colesterolo HDL sono associati a basse concentrazioni di adiponectina. Tutte queste componenti aiutano a spiegare perché l'adiposità addominale in eccesso è considerata una grande minaccia alla salute cardiovascolare e metabolica.

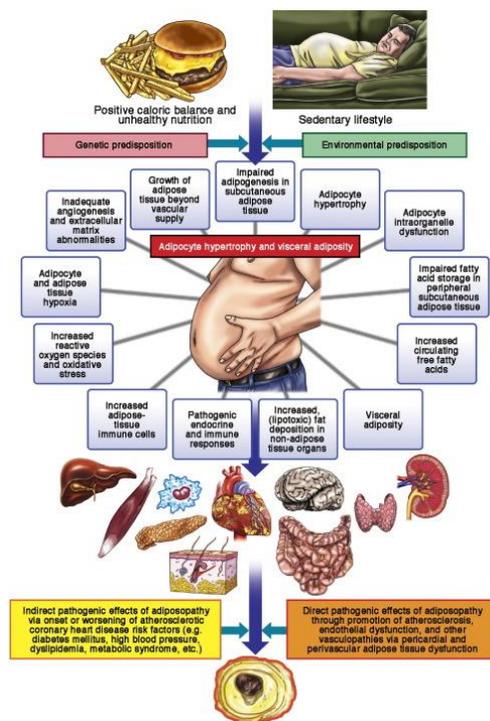


Figura 16. Effetti del tessuto adiposo viscerale in eccesso.¹⁶²

Abituamente la distinzione tra le due forme di obesità viene effettuata con le metodiche di *Tomografia Computerizzata* (TC) e di *Imaging a Risonanza Magnetica* (MRI). Queste vengono considerate il “gold standard” per la misura della distribuzione del grasso corporeo, ma sono metodiche troppo complesse e costose per un utilizzo di routine. Pertanto, è importante disporre di un metodo semplice e tollerabile per la quantificazione del VAT. La *Circonferenza Vita* (*Waist Circumference*, WC), un semplice marker antropometrico, è attualmente la misura più comunemente usata per l'obesità addominale.¹⁶³ La WC è considerata una misura surreale del VAT e ci sono dati che suggeriscono che il WC è associato al rischio di sviluppare malattie cardiovascolari (*Cardiovascular Disease*, CVD).^{164,165} Tuttavia, la WC è anche largamente influenzata dall'adiposità totale del paziente e non può essere utilizzata per distinguere il VAT dal SAAT. È stato suggerito che la WC potrebbe avere un'associazione più debole con l'aterosclerosi rispetto al VAT.^{159,166} Attualmente, l'ecografia è il metodo più semplice e conveniente per la stima del VAT.¹⁶⁷

2.2.1.5 Biopsia Epatica

Nonostante il ruolo fondamentale della ecografia addominale e dell'uso di test non invasivi, come il FLI, nel monitoraggio della struttura e della funzionalità del fegato, la biopsia epatica rimane la metodica di riferimento per la diagnosi precisa di malattie epatiche.

La conoscenza e la diagnosi delle malattie del fegato ha una storia antica in cui le patologie epatiche venivano diagnosticate in una fase molto tardiva (autopsia) e sintomatica (ittero, ascite, etc...) e una storia moderna che ha le sue origini con l'introduzione e l'uso routinario della biopsia epatica che fu formalmente utilizzata la prima volta da Paul Ehrlich nel 1883 (citato da Frerichs nel 1884) per uno studio del contenuto di glicogeno del fegato di un paziente diabetico, e nel 1895 da Lucatello in Italia che la usò in medicina tropicale per la diagnosi di ascessi epatici.¹⁶⁸

Le prime pubblicazioni sistematiche furono di Schüpfen in Francia (1907), con una tecnica che permetteva di ottenere cilindri di tessuto epatico che potessero essere valutati istologicamente e quindi utilizzati per la diagnosi di cirrosi e tumori epatici. Negli anni successivi il metodo raggiunse popolarità e durante la seconda guerra mondiale vi fu un rapido aumento dell'uso di questa metodica, in gran parte per indagare i molti casi di epatite virale non fulminante che colpivano le forze armate di entrambi gli schieramenti.¹⁶⁸ Oggi la biopsia epatica è considerata il "gold standard" per la definizione e caratterizzazione delle nuove metodiche di imaging, per la diagnosi e quantificazione della steatosi epatica e la sua progressione (infiammazione lobulare, grado di danno epatico (ballooning epatocellulare) e fibrosi) e per lo studio delle correlazioni tra gli esiti istopatologici di cura delle epatiti croniche virali e l'incidenza del carcinoma epatocellulare. Allo stesso modo la biopsia epatica è il criterio di riferimento per la diagnosi e la valutazione della risposta alla terapia delle malattie epatiche autoimmuni in attesa dello sviluppo di adeguati marcatori immunologici non invasivi che tuttora mancano. Infine la biopsia epatica rimane il criterio di riferimento per lo studio e la diagnosi di tutte le patologie ad eziologia ancora ignota. La biopsia epatica consiste nel prelevare un piccolo frammento (frustolo) di tessuto e nell'esaminarlo al microscopio dopo opportuni trattamenti e colorazioni e viene solitamente eseguita mediante agobiopsia transperitoneale sotto

controllo ecografico; quando questa metodica non può essere eseguita per mancata collaborazione del paziente, per alterazioni dell'omeostasi o in caso di fallimento di una biopsia ad ago, è indicata la biopsia per via laparoscopica (**Figura 17**).



Figura 17: Biopsia epatica in laparoscopia.¹⁶⁹

2.2.2 Strategie Biomolecolari di diagnosi

2.2.2.1 Sottoclassi delle lipoproteine plasmatiche

Si è osservato che lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi non dipendono solo dall'accumulo in grandi quantità di lipoproteine circolanti, ma dipendono dalle proprietà specifiche che esse hanno. Infatti, le lipoproteine circolanti non sono tutte uguali, ma variano in dimensioni, in densità, in composizione lipidica e *Apolipoproteica* (Apo) e possono essere suddivise in diverse classi in base ai parametri fisici e chimici.¹⁷⁰

Le lipoproteine LDL sono quelle che principalmente costituiscono il deposito lipidico della placca aterosclerotica.

Le lipoproteine HDL non sono invece aterogene ed il loro livello sierico è inversamente proporzionale al rischio aterosclerotico e cardiovascolare.^{171,172}

A sua volta, le LDL, in base alle dimensioni, densità e caratteristiche metaboliche, vengono classificate in almeno quattro diverse sottoclassi (large LDL-I, medium LDL-II, small LDL-III e very small LDL-IV). In realtà, oggi sono già note più di sette sottoclassi. Le differenze sono dovute a variazioni nel contenuto dei lipidi di superficie e a cambiamenti conformazionali di apoB-100. Anche le HDL possono essere classificate in sottoclassi e ad oggi quelle conosciute sono circa 10, ma ulteriori studi sono necessari per meglio capire il loro ruolo.^{3,4,170,172,173}

Attualmente come accennato in precedenza, vengono distinti, in base al profilo plasmatico di LDL, due principali fenotipi (**Figura 18**). Il fenotipo A è caratterizzato dalla predominanza di LDL grandi e leggere o *large buoyant* LDL (lbLDL); il fenotipo B è caratterizzato dalla prevalenza sierica di LDL piccole e dense o *small-dense* LDL (sdLDL).

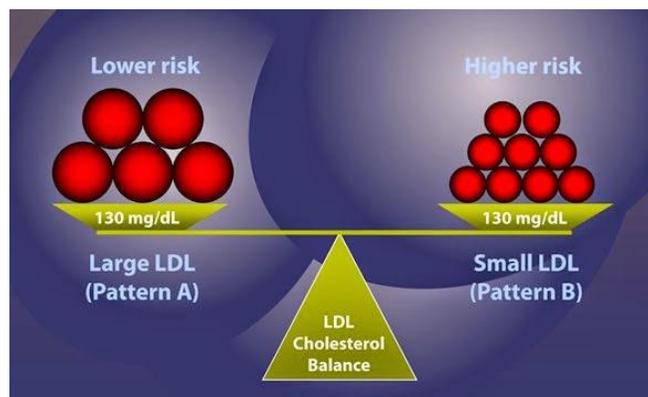


Figura 18. Fenotipo delle LDL.¹⁷⁴

Il fenotipo B è maggiormente correlato ai disturbi metabolici, all'obesità, al DMT2, all'aterosclerosi e alla malattia coronarica. Le small-dense LDL sembrerebbero dunque le più aterogene. Di fatti, a differenza delle altre LDL, le sdLDL vengono internalizzate a livello della parete arteriosa molto più facilmente grazie alla loro dimensione ridotta. Permangono in circolo per tempi prolungati, poichè presentano minore affinità per il recettore LDL; hanno una lunga emivita plasmatica ed una maggiore suscettibilità alla glicazione non enzimatica e all'ossidazione. La presenza di LDL ossidate scatena una cascata di eventi che porta alla formazione di cellule schiumose e all'evoluzione della placca ateromasica. In particolare, le LDL ossidate stimolano la produzione, da parte dei macrofagi presenti a livello intimale, di citochine proinfiammatorie che aumentano la produzione da parte delle cellule endoteliali di molecole di adesione per i monociti circolanti (*cellular adhesion molecules* o CAM: VCAM, ICAM ed E-selectina): l'effetto finale è un aumento della migrazione dal lume vasale all'interno della parete arteriosa di monociti/macrofagi, con un progressivo arricchimento di cellule infiammatorie da parte della placca ateromasica. Tutto ciò spiega il legame tra small-dense LDL e aterogenesi.¹⁷⁰⁻¹⁷³

Il NCEPATIII ha attualmente identificato le sdLDL come principale fattore di rischio dislipidemico. I livelli sierici di sdLDL sono aumentati nei pazienti con diabete e MetS ed hanno un ruolo predittivo per i futuri eventi cardio-cerebro-vascolari.^{170,173}

2.2.2.2 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)

La Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9 (PCSK9) appartiene alla famiglia delle proteine convertasi di cui oggi conosciamo 9 isoforme diverse. Le prime isoforme di convertasi sono state scoperte alla fine degli anni '90, mentre PCSK9 è stata scoperta soltanto nel 2003 in Francia nel laboratorio del dottor Seidah.¹⁷⁵ Nello stesso anno sempre in Francia il ricercatore Abifadel e i colleghi hanno visto che ci poteva essere una relazione tra questa proteina e l'ipercolesterolemia o ipocolesterolemia.

La relazione tra PCSK9 e ipercolesterolemia o ipocolesterolemia ha aumentato notevolmente l'interesse scientifico per questa molecola e attraverso studi successivi è stata scoperta la struttura di questa molecola. La PCSK9 è una proproteina costituita da 692 aminoacidi ed è codificata dal gene situato sul cromosoma 1p32.3 contenente 11 introni e 12 esoni (**Figura 19**).^{176,177}

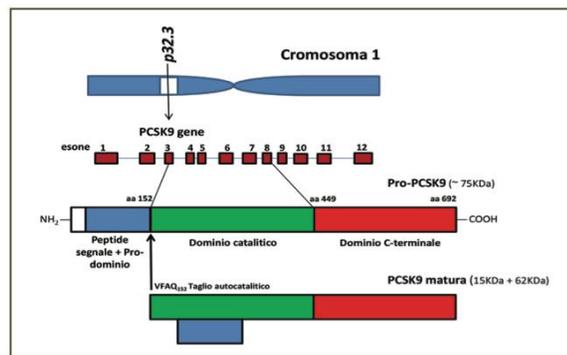


Figura 19: Localizzazione genica e struttura proteica di PCSK9.¹⁷⁷

Questo enzima è espresso principalmente nel fegato ma anche nell'intestino e nel rene, inoltre è stato trovato acido ribonucleico messaggero (messenger RiboNucleic Acid, mRNA) codificante PCSK9 in quantità abbondanti anche nella parete

dell'arteria ombelicale embrionale ed è ipotizzato si trovi anche nelle membrane embrionali e nella muscolatura liscia.¹⁷⁸

Nella struttura dell'enzima possiamo distinguere 5 zone particolarmente importanti per la sua funzione biologica (**Figura 20**). Abbiamo la zona del peptide segnale che va dall'aminoacido 1 al 30, poi abbiamo il pro-segmento che va dal 31 al 152, in seguito c'è il sito catalitico che si trova nella zona che va dall'aminoacido 153 al 407, infine abbiamo la regione cerniera che va dal 408 al 452 (VL e VH) e il dominio c-terminale ricco in cisteina e istidina (CH-CL) che va dal 453 al 692.¹⁷⁹

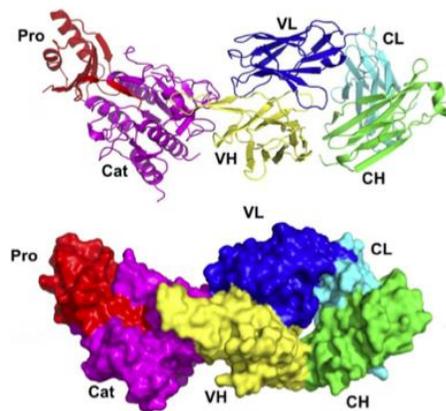


Figura 20: Struttura cristallina di PCSK9. In rosso pro-dominio, in viola sito catalitico, in giallo e blu la regione cerniera (rispettivamente VH e VL) e in celeste e verde la regione ricca di cisteina e istidina (rispettivamente CL e CH).¹⁸⁰

Conoscere queste regioni è stato molto importante per capire il meccanismo di azione di questo enzima. La sintesi di questo enzima avviene nel reticolo endoplasmatico, dove si trova sotto forma di zimogeno (struttura enzimatica inattiva che necessita di taglio catalitico per permetterne l'attivazione). A seguito della scissione autocatalitica del pro-segmento con un taglio alla posizione P1 Gln¹⁵², che si trova nella parte iniziale dell'enzima si ottiene la maturazione dell'enzima e la sua liberazione dal reticolo endoplasmatico.¹⁸¹ A differenza delle altre proteine convertasi però il c-terminale del pro-segmento forma dei legami a idrogeno con l'istidina 226, in questo modo si forma nuovamente il complesso pro-segmento – enzima che rende inattivo il sito catalitico.¹⁸¹ La secrezione di un enzima inattivo ha indirizzato gli studi degli

scienziati verso l'interazione con il recettore per le LDL per capire se l'attività enzimatica della PCSK9 non era necessaria per il legame con LDL-R.

MCNutt et al.¹⁸² nel 2007 pubblicano un articolo in cui presentano un lavoro riguardante l'attività della PCSK9, cataliticamente inattiva, nel provocare ipercolesterolemia. In conclusione scoprono che è proprio la PCSK9 inattiva che va a legarsi al LDL-R, mentre se viene rimosso il pro-segmento dal complesso si riduce l'affinità di legame tra PCSK9 e LDL-R.¹⁸²

Nei primi anni si credeva che l'attività della PCSK9 fosse solo extracellulare, mentre studi più recenti hanno dimostrato che esistono due vie utilizzate dalla proteina per esplicare la propria funzione: la via extracellulare e la via intracellulare. L'enzima una volta secreto dal reticolo endoplasmatico forma un legame non covalente con il pro-segmento che era stato tagliato autocataliticamente all'interno del reticolo endoplasmatico. A questo punto si attiva sia la via extracellulare che quella intracellulare.

La via extracellulare prevede la liberazione della pro-proteina dalla cellula epatica, in questo modo PCSK9 va a legarsi ai recettori per le LDL posti sulla membrana plasmatica. Questi recettori sono importanti in quanto sono loro che permettono l'internalizzazione del colesterolo LDL e la sua successiva degradazione. Con questo processo si riduce il colesterolo in circolo e si riduce il rischio di ossidazione delle LDL. La PCSK9 ha molta affinità per il recettore LDL e quindi va facilmente a formare un complesso con il recettore, il complesso formatosi provoca internalizzazione del recettore, attraverso vescicole rivestite di catene pesanti di clatrina e viene trasportato verso la via endosomiale. Questo è il processo che il recettore segue anche quando vi si lega il colesterolo, in quanto sono i lisosomi che provocano la degradazione del colesterolo LDL e il recettore viene recuperato e ritorna sulla membrana plasmatica per captare nuovo LDL-C. Nel caso in cui si lega la PCSK9 però avviene un processo di degradazione a livello lisosomiale del recettore, che non ritorna in superficie. Infatti si forma un legame forte tra PCSK9 e LDL-R che ne impedisce la separazione una volta arrivati nei lisosomi.¹⁸³ Quindi si ha una degradazione dell'intero complesso con conseguente riduzione della

concentrazione dei recettori LDL sulla superficie plasmatica e quindi un aumento della concentrazione di LDL-C in circolo.

Studi più approfonditi hanno analizzato la struttura cristallina del recettore e della pro-proteina riuscendo a definire il modo in cui avviene l'interazione e la formazione del complesso. In particolare è stato visto che è la zona omologa al fattore di crescita epidermico (*Epidermal Growth Factor*, EGF)-A del recettore che va a formare dei legami con i residui 367- 381 della PCSK9, in un secondo momento si formano dei legami anche tra i residui 377-379 di PCSK9 e i residui 308-310 di EGF-A.¹⁸⁴

Il legame che si forma è più forte rispetto a quello che si forma tra il colesterolo LDL e il recettore e questa maggiore forza di legame non permette al recettore di liberarsi una volta a contatto col pH del citosol.

Analizzando la struttura tridimensionale del recettore LDL-R vediamo che a pH 5.3 la conformazione cambia, infatti il recettore adotta una forma chiusa.¹⁸⁵ In pratica passando dal pH neutro al pH acido endosomiale si attiva “l'interruttore dell'istidina” che provoca la chiusura del recettore. Questo processo di “chiusura” del recettore a pH acido provoca, quando esso è legato al LDL-C, la rottura del complesso tra LDL-R e LDL-C e quindi la degradazione del LDL-C da parte dei lisosomi e il recupero di LDL-R. Se invece legato al recettore LDL abbiamo la PCSK9 la “chiusura” del recettore dovuto al pH provoca una modifica conformazionale che rafforza ulteriormente il complesso tra PCSK9 e LDL-R, in questo caso tutto il complesso seguirà la via lisosomiale e verrà degradato. La via intracellulare invece non prevede la liberazione della proproteina al di fuori della cellula ma la sua azione è quella di andare a legare i recettori per le LDL che vengono sintetizzati all'interno del reticolo ancora prima che essi vengano espressi sulla parete cellulare.

Questa attività intracellulare è dovuta alla mancanza di catene leggere di clatrina. Questa è una proteina che non media l'internalizzazione nelle vescicole ma è di fondamentale importanza nel mediare gli spostamenti delle molecole tra la rete trans-golgi e il sistema endosomiale. Fisiologicamente le catene leggere di clatrina bloccano il traffico intracellulare diretto dal trans-golgi ai lisosomi aumentando quindi la quantità di LDL-R prodotto ed espresso sulla membrana cellulare. Questo è stato visto aumentando la concentrazione intracellulare di catene leggere di

clatrina.¹⁸⁶ L'attività delle clatrine però è limitata in quanto se la produzione di PCSK9 è elevata e quindi il reticolo mette in circolo una grande quantità di LDL-R esse non riescono a tamponare questo eccesso di proteina e avviene la degradazione intracellulare dei recettori.

La PCSK9 non è espressa solo a livello epatico ma anche a livello intestinale e renale. L'attività a livello intestinale ancora non è stata stabilita, si pensa però che possa essere associato ad una maggiore secrezione di chilomicroni e che sia implicato nel controllo dell'equilibrio del colesterolo negli enterociti.¹⁸⁷

Sono stati associati a PCSK9 anche altri ruoli secondari, come:

- metabolismo dei trigliceridi e accumulo a livello del tessuto adiposo viscerale,¹⁸⁸
- omeostasi del glucosio,¹⁸⁹
- rigenerazione del fegato e suscettibilità al virus dell'epatite C.¹⁹⁰

Recentemente è stato riportato che l'assenza di PCSK9 protegge il fegato del topo dall'invasione del melanoma,¹⁹¹ suggerendo quindi una sua possibile inibizione farmacologica per ridurre il rischio di tumore al fegato.

La sintesi di PCSK9, come quella di tutte le molecole proteiche, ha una sua regolazione. Questa regolazione può avvenire su due livelli: regolazione trascrizionale e regolazione post-trascrizionale.

La regolazione trascrizionale si può ulteriormente dividere in due meccanismi diversi: regolazione tramite fattori nucleari oppure tramite recettori nucleari.

La regolazione tramite fattori nucleari avviene direttamente dentro al nucleo, attraverso legami diretti su gene che codifica per la proteina.

I geni possiedono delle zone poste prima della parte codificante dette promotor, queste zone possiedono dei motivi trascrizionali a cui vanno a legarsi delle molecole che aumentano o riducono la trascrizione del gene a valle. Un motivo importante è il motivo *Sterol Regulatory Element* (SRE), questo è sede di legame di una famiglia di proteine chiamate SREBPs (*SRE – Binding Proteins*). Questa famiglia costituisce il maggiore fattore trascrizionale nella biosintesi lipidica, quindi non implicato solo nella regolazione di PCSK9 ma anche ad esempio nella regolazione della sintesi di LDL-R. Per dimostrare questo coinvolgimento delle proteine SREBPs è stato fatto un esperimento sui topi ed è stato visto che i livelli di PCSK9 mRNA diminuiscono con

una dieta ricca di colesterolo mentre aumentano in topi transgenici in cui le proteine SREBPs risultano espresse in quantità maggiori.¹⁹² Quindi possiamo dire che i fattori SREBP-1 e SREBP-2 sono fattori che attivano la trascrizione del gene che codifica per PCSK9.

Un altro elemento che potenzia l'attivazione trascrizionale di PCSK9 è il fattore HNF-1 α (hepatocyte nuclear factor-1 α). Questo fattore lega un motivo trascrizionale posizionato 28 nucleotidi prima rispetto al motivo SRE. La regolazione tramite *Hepatocyte Nuclear Factor 1* (HNF-1) α , a differenza della regolazione SREBPs, non è espressa a livello del gene che codifica per LDL-R.¹⁹³

Il fattore HNF-1 α è stato visto essere regolato negativamente da una sostanza naturale come la berberina¹⁹³ e da attivatori di mammalian *Target Of Rapamycin Complex 1* (mTORC1),¹⁹⁴ questi composti quindi sono potenziali promotori della clearance LDL-C.

Negli anni successivi è stato visto che ci sono dei fattori esterni importanti che attivano la produzione sia di SREBP che di HNF-1 α e quindi sono fattori che aumentano la concentrazione di colesterolo libero con meccanismi indiretti. Uno di questi fattori è proprio una famiglia di farmaci che viene utilizzata per la cura dell'ipercolesterolemia, le statine.

Dubuc et al.¹⁹⁵ hanno dimostrato questo legame tra le statine e il fattore SREBP-2, infatti dai loro studi è emerso che le statine, inibendo la idrossimetilglutaril-CoA (*HydroxyMethylGlutaryl-Coenzyme A*, HMG-CoA) reductasi, hanno un meccanismo di feedback attivatore della proteina SREBP-2 e abbiamo detto che l'aumento di questi fattori in circolo provoca l'attivazione della sintesi di PCSK9 e quindi aumento del colesterolo libero per la sua azione sui recettori LDL.

In un altro studio è stato visto anche che sempre le statine sono responsabili dell'attivazione della trascrizione e quindi della sintesi di HNF- α ,¹⁹⁶ che abbiamo detto prima essere un fattore che attiva la sintesi di PCSK9. Questi due meccanismi di azione secondari delle statine ovviamente ne limitano l'effetto terapeutico, in quanto provocano un effetto contrario rispetto a quello desiderato per la cura dell'ipercolesterolemia.

L'altro meccanismo di regolazione trascrizionale è quello recettoriale, che si basa sul legame di particolari molecole ai recettori nucleari con conseguente cascata trasduzionale che porta ad interazioni di alcuni fattori con il DNA. Ci sono due recettori nucleari implicati in questo tipo di regolazione: recettore Farnesoid X e recettore PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), vediamo adesso nello specifico il funzionamento di questi recettori.

- il recettore Farnesoid X, detto anche recettore degli acidi biliari, non sappiamo in che modo è implicato nella regolazione di PCSK9, si pensa ci sia un meccanismo indiretto che è ancora sconosciuto. Comunque studi hanno dimostrato che questo recettore in colture cellulari di epatociti esposte ad acidi biliari provoca un abbattimento dei livelli di PCSK9 mRNA.¹⁹⁷

- l'interazione con la famiglia di recettori PPARs non ha dato risultati univoci riguardo la regolazione di PCSK9. Ad esempio l'attivazione dei recettori PPAR- α da parte di agonisti (es. Fenofibrato) ha mostrato una repressione del gene che codifica per PCSK9 negli epatociti umani e in quelli del topo¹⁹⁸ mentre l'agonista WY14643 non ha dato alcun effetto nei criceti.¹⁹⁹

Invece gli agonisti per il recettore PPAR- γ (es. Pioglitazone) hanno mostrato un aumento dei livelli di PCSK9 mRNA negli epatociti. Anche studi clinici nei pazienti in trattamento con fibrati hanno dimostrato che aumentano i livelli plasmatici di PCSK9 in molti casi. La ragione di questa differenza ancora non è chiara.

In qualsiasi modo bisogna vedere questi meccanismi di azione come una rete complessa di interazioni, in cui anche tra le molecole che abbiamo analizzato fino ad ora ci sono meccanismi che ne regolano l'equilibrio a livello cellulare.

Per quanto riguarda la regolazione post-trascrizionale ancora non ci sono studi che evidenziano questo meccanismo di regolazione anche se la struttura del mRNA ha una regione non codificante 3' (3'-UTR) costituita principalmente da AU. La presenza di questa isola ricca di AU determina un mRNA instabile, che potrebbe essere bersaglio di ribonucleoproteine D.

I ricercatori hanno visto che esistevano mutazioni sul gene che codifica per la PCSK9, queste mutazioni potevano essere di due tipi: LOF (*Loss of Function*) quindi

mutazioni che provocano la perdita di funzione di PCSK9 e GOF (*Gain of Function*) che portano ad un guadagno di funzione.

Le mutazioni della perdita di funzione del gene PCSK9 sono associate a colesterolo circolatorio ridotto e protezione dalle malattie cardiovascolari. Inoltre, una nuova classe di farmaci destinati a PCSK9 è ora disponibile per il trattamento dell'ipercolesterolemia grave.^{177,200}

Il rilascio di PCSK9 è controllato da segnali ormonali, insulina e digiuno.²⁰¹ Pertanto, i livelli di PCSK9 sono correlati all'*Insulino-Resistenza* (IR), al grasso epatico e ai trigliceridi VLDL.²⁰² Inoltre, è stato recentemente dimostrato che PCSK9 è regolato da citochine proinfiammatorie.²⁰³⁻²⁰⁵ I livelli di PCSK9 influenzano i livelli plasmatici di lipoproteina anche attraverso la stimolazione della lipogenesi epatica.²⁰⁶ Ruscica et al., hanno osservato per la prima volta una stretta e significativa associazione tra grasso epatico e PCSK9 circolante. Inoltre, il legame tra gravità della steatosi e PCSK9 era indipendente dalla necroinfiammazione e dal ballooning epatocellulare. Ciò suggerisce che PCSK9 non è indotto da citochine infiammatorie, ma è direttamente collegato al contenuto di trigliceridi epatocellulari e alla stimolazione della lipogenesi epatica.²⁰⁷

3. SCOPO DELLO STUDIO

Nuove conoscenze, relative al ruolo della MetS e dei suoi componenti quali il diabete, hanno modificato profondamente i nostri concetti sulla prevenzione ed il trattamento terapeutico per cui dalla nozione di rischio cardiovascolare globale si è passati al concetto moderno di *rischio cardiometabolico globale*, nel senso che siamo impegnati oggi a prevenire la mortalità dovuta alle malattie cardiometaboliche.

Nel passato l'attenzione clinica si rivolgeva alla correzione dei singoli elementi quali l'ipertensione, la dislipidemia, il diabete e il fumo di sigaretta. L'allargamento delle conoscenze ha permesso di evidenziare nuovi elementi di rischio quali l'obesità addominale, lo stato proinfiammatorio e protrombotico cronico, la disfunzione endoteliale, lo stress ossidativo. Il concetto di MetS avvalorava la necessità di individuare, in ogni soggetto, non più il singolo fattore di rischio ma la molteplicità dei determinanti che possono condurre allo sviluppo della patologia e l'approccio terapeutico personalizzato adatto al management globale del suo rischio. L'approccio terapeutico che deriva da questa visione dell'individuo esula pertanto dalla correzione del singolo fattore di rischio presente, ma si pone l'obiettivo di affrontare i problemi del soggetto nella loro globalità.

Lo scopo del progetto di dottorato è stato quello di individuare nuove strategie diagnostiche e approcci farmacologici innovativi idonei al management clinico, diagnostico e terapeutico dei pazienti ad elevato rischio cardio-metabolico.

4. STUDI CLINICI

4.1 EFFETTI DI EXENATIDE LAR IN PAZIENTI CON DIABETE MELLITO TIPO 2 CON E SENZA NAFLD

4.1.1 MATERIALI E METODI

Pazienti inclusi nello studio

Una coorte di 60 pazienti (41 uomini e 19 donne con età media di 60 ± 10 anni) è stata reclutata presso l'Unità di Diabetologia e Prevenzione Cardiovascolare (Resp. Prof. M. Rizzo), dell'Unità Operativa Complessa (U.O.C.) di Medicina Interna (Dir. Prof. G. Montalto) del Policlinico Universitario di Palermo. Tutti i soggetti coinvolti nello studio erano naïve a terapie alle terapie incretiniche e sono stati trattati con metformina per almeno 8 settimane a dosi stabili tra 1500 e 3000 mg al giorno. I criteri di inclusione dello studio erano i seguenti: 1) uomini e donne > 18 anni con DM2; 2) BMI > 25 kg/m²; 3) HbA1c che varia dal 7,5% all'8,5%. I criteri di esclusione erano i seguenti: 1) gravidanza o intenzione di restare incinta; 2) insufficienza renale o epatica da moderata a grave; 3) recente evento cerebro-cardiovascolare; 4) infezioni gravi conosciute (HIV, HBV, HCV) e neoplasie; 5) TG > 400 mg/dl e colesterolo LDL > 250 mg/dl. Le procedure utilizzate sono state conformi alla Dichiarazione di Helsinki del 1975, come modificata nel 2013. Lo studio ha ricevuto l'approvazione dal Comitato Etico ed è stato registrato su clinicaltrials.com (riferimento: NCT02380521). Tutti i pazienti hanno dato la loro approvazione e hanno firmato il consenso informato scritto.

Exenatide LAR è stato prescritto alla dose di 2 mg/settimana in aggiunta alla metformina come precedentemente descritto per 8 mesi mediante piano terapeutico dell'*Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)*, come da legislazione italiana. Le terapie cardio-metaboliche concomitanti (come gli antipertensivi, ipolipemizzanti e anti-piastrinici) sono state mantenute a dosi stabili durante lo studio. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a visita medica al basale per raccogliere dati clinici e biochimici. Valutazioni simili per ciascun paziente sono state eseguite dopo 8 mesi di follow-up.

Peso, circonferenza della vita e altezza sono stati registrati e il BMI è stato calcolato in kg/m².

Nella **Tabella 1** sono elencate le principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio e le terapie farmacologiche assunte che sono rimaste costanti per tutta la durata dello studio clinico.

Tabella 1. *Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio (n=60).*

Età (anni)	60±10
Donne, n (%)	19 (32)
Durata Diabete (anni)	9±8
Fumatori, n (%)	13 (22)
Familiarità per malattie cardiovascolari, n (%)	34 (57)
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	128±12
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	73±8
Ipertensione, n (%)	42 (70)
Obesità, n (%)	31 (53)
Dislipidemia, n (%)	36 (60)
Complicanze diabetiche, n (%)	0 (0)
Uso di farmaci anti-ipertensivi	
beta-bloccanti, n (%)	11 (18)
inibitori enzima di conversione dell'angiotensina, n (%)	17 (28)
antagonisti del recettore dell'angiotensina II, n (%)	19 (32)
calcio antagonisti, n (%)	9 (15)
diuretici, n (%)	15 (25)
Uso di farmaci ipolipemizzanti	
statine, n (%)	25 (42)
fibrati, n (%)	2 (3)
acidi grassi poli-insaturi, n (%)	7 (12)
Uso di antiaggreganti, n (%)	22 (37)

La coorte di pazienti è stata suddivisa in pazienti con steatosi (con FLI ≥60, n= 18) e senza steatosi (con FLI <60, n= 42), valutata utilizzando un indice chiamato “*Fatty Liver Index*” (FLI) frutto del calcolo di alcuni parametri comunemente valutati nei pazienti diabetici come l'indice di massa corporea, la circonferenza addominale, i trigliceridi, e la GGT che da contezza della salute del fegato.^{158,208}

Metodiche di indagine

Sono stati raccolti campioni di siero da ciascun paziente al basale e dopo il periodo di follow-up. Glucosio plasmatico, HbA1c, CT, TG e HDL-C sono stati misurati con metodi enzimatici-colorimetrici²⁰⁹⁻²¹¹ di routine mentre l'LDL-C è stato calcolato usando la formula di Friedewald (CT- (HDL-C + TG/5).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecocolor-doppler dei tronchi sovra-aortici per valutare il cIMT con sonda ecografica lineare B-mode real-time. Con la stessa sonda è stata valutata la funzione endoteliale con la tecnica della FMD dell'arteria brachiale sia al momento del reclutamento che alla fine dello studio. Queste indagini sono state eseguite al basale e dopo 8 mesi di terapia.

Determinazione ultrasonografica del cIMT

L'indagine strumentale è stata eseguita da un unico operatore (Dott. A.M. Patti) utilizzando un ecografo Medison SONOACE Pico (Samsung Medison Co., Korea) con una sonda di 7.5-10.0 MHz. L'esame ecografico è stato eseguito in modo standardizzato con angoli fissi di insonazione. I pazienti sono stati esaminati in posizione supina ed ogni porzione arteriosa è stata esaminata per identificare il sito medio-intimale. Ogni scansione della carotide comune iniziava appena sopra la clavicola mentre il trasduttore veniva spostato lungo la biforcazione della carotide e lungo l'arteria carotide interna. Sono stati identificati e misurati tre segmenti, sia sul piano anteriore che posteriore, su ciascun lato: il distale ad 1 cm dell'arteria carotide comune vicino alla biforcazione, la biforcazione stessa ed in prossimità della carotide interna.²¹² In ciascun sito di rilevazione è stato determinato il cIMT, inteso come la distanza tra la linea ecogenica che rappresenta l'interfaccia della porzione intimale dell'arteria, e la linea ecogenica rappresentante la giunzione dell'avventizia.

Determinazione ultrasonografica della funzione endoteliale

Prima di procedere con la valutazione della disfunzione endoteliale è stato chiesto ai pazienti di astenersi dall'assunzione di caffè o tè e di astenersi dal fumo; successivamente ogni singolo paziente è stato fatto distendere su un lettino cardiologico in posizione supina e, dopo essere rimasto in una stanza climatizzata per

circa 10 minuti, è stata studiata l'arteria brachiale del braccio destro in diverse scansioni longitudinali con la sonda posta sopra la piega del gomito. Una volta ottenuta la scansione longitudinale più assimilabile a un "ponte cinese", il diametro del vaso, definito come la distanza tra il margine superiore dell'eco prodotto dall'interfaccia fra lume e parete anteriore del vaso e il margine superiore dell'eco prodotto dall'interfaccia fra lume e parete posteriore del vaso, è stato misurato quattro volte nel picco massimo del flusso pulsato della curva spettrale dell'ecografo, per calcolarne poi il valore medio. Successivamente si è posto un manicotto di sfigmomanometro a circa 3-5 cm sopra la piega del gomito ed è stato gonfiato rapidamente ad una pressione maggiore di circa 25-30 mmHg rispetto a quella sistolica precedentemente misurata. È stata mantenuta tale pressione per 5 minuti e al termine di questo periodo si è proceduto a una desufflazione rapida del manicotto, comportando il fenomeno dell'iperemia reattiva e misurando il diametro dell'arteria brachiale ad intervalli di circa 20 secondi per 3 minuti, considerando che il valore massimo di dilatazione si ottiene in media tra i 60 ed i 90 secondi.²¹³ Il valore della FMD è stato calcolato come differenza percentuale tra il massimo diametro post-iperemia raggiunto ed il diametro medio basale, utilizzando la formula:

$FMD_{(\%)} = [(diámetro\ post-iperemia - diámetro\ basale) / diámetro\ basale] \times 100.$

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS (V.17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). L'analisi univariata è stata effettuata utilizzando il paired t-test. Le correlazioni lineari sono state valutate tramite il test di Spearman.

4.1.2 RISULTATI

Le caratteristiche basali dei soggetti dello studio sono riportate nella **Tabella 1**. Nessuno dei soggetti ha dovuto interrompere l'exenatide e non sono stati osservati eventi avversi significativi. Ventitre pazienti hanno avuto sintomi gastrointestinali transitori come nausea, vomito, diarrea, che non hanno portato all'interruzione della terapia.

L'effetto di exenatide LAR su diversi parametri cardio-metabolici nei 60 pazienti è riassunto nella **Tabella 2**. Abbiamo trovato una significativa riduzione di peso ($p=0.0002$), WC ($p=0.0105$), BMI ($p=0.0348$), glicemia a digiuno ($p<0.0001$) e HbA1c ($p<0.0001$). Per quanto riguarda i lipidi plasmatici, exenatide ha significativamente ridotto TC e LDL-C ($p=0.0012$ e $p<0.0001$, rispettivamente) e significativamente aumentato HDL-C ($p=0.0188$). Inoltre, cIMT e FMD sono migliorati significativamente dopo il trattamento ($p<0.0001$ per entrambi). Infine, non sono state trovate correlazioni significative tra le variazioni di cIMT e FMD e le variazioni di tutti gli altri parametri valutati.

Tabella 2. Variazioni dei parametri di rischio cardiovascolare dopo 8 mesi di trattamento con Exenatide LAR (n=60).

	Baseline	8 mesi	<i>p</i> -value ^a
Peso (kg)	89±18	86±17	0.0002
BMI (kg/m ²)	33±9	31±6	0.0348
WC (cm)	109±13	106±13	0.0105
Glicemia a digiuno (mmol/l)	8.8±2.8	7.3±2.2	<0.0001
HbA1c (%)	8.0±0.4	6.9±1.1	<0.0001
CT (mmol/l)	4.4±0.9	4.2±1.0	0.0012
TG (mmol/l)	1.5±0.7	1.5±0.6	0.9189
HDL-C (mmol/l)	1.2±0.3	1.3±0.3	0.0188
LDL-C (mmol/l)	2.5±0.8	2.2±0.9	<0.0001
FMD (%)	5.8±1.3	6.8±1.7	<0.0001
cIMT (mm)	0.98±0.14	0.87±0.15	<0.0001

BMI: Body Mass Index, indice di massa corporea; **cIMT:** carotid Intima Media Thickness; ispessimento medio intimale carotideo; **CT:** Total Cholesterol, colesterolo totale; **FMD:** Flow-Mediated Dilation, disfunzione endoteliale; **HbA1c:** Glycated Hemoglobin, emoglobina glicata; **HDL-C:** High Density Lipoprotein-Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine ad alta densità; **LDL-C:** Low Density Lipoprotein-Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine a bassa densità; **TG:** TriGlycerides, Trigliceridi; **WC:** Waist Circumference, circonferenza vita. All values expressed in mean ± standard deviation; ^a Paired T-test.

Dopo 8 mesi di exenatide LAR, i pazienti con steatosi hanno avuto un maggiore controllo cardio-metabolico rispetto a quelli senza steatosi (**Tabella 3**). Inoltre, AST (*Aspartato Amino Transferasi*) e ALT (*Alanino Amino Transferasi*) sono migliorati significativamente solo nei pazienti con steatosi (20±6 vs 24±9 mU/ml, p=0.0037 e 26±14 vs 32±16 mU/ml, p=0.0013, rispettivamente).

Tabella 3. Effetti di Exenatite LAR sui parametri cardiometabolici in pazienti diabetici con e senza steatosi (n=18 e n=42 rispettivamente).

	Senza Steatosi Prima terapia	Senza Steatosi Dopo terapia	p= (Senza Steatosi, prima vs. dopo terapia)	Con Steatosi Prima terapia	Con Steatosi Dopo terapia	p= (Con Steatosi, prima vs. dopo terapia)	p= (tra gruppi)
Peso (kg)	74±8	72±9	0.1769	95±17	92±17	0.0005	<0.0001
WC (cm)	97±5	96±8	0.8438	114±12	110±12	0.0067	<0.0001
HbA1c (%)	8.1±0.3	7.2±0.9	0.0006	8.0±0.4	6.8±1.1	<0.0001	0.2170
CT (mmol/l)	4.2±0.8	4.2±1.0	0.7719	4.5±0.9	4.2±0.9	<0.0001	0.0321
HDL-C(mmol/l)	1.4±0.2	1.3±0.2	0.4795	1.1±0.3	1.2±0.3	0.0015	0.0172
LDL-C(mmol/l)	2.3±0.7	2.3±0.9	0.6152	2.6±0.9	2.2±0.9	<0.0001	0.0398
FDW (%)	5.6±1.1	6.6±1.6	0.0018	5.8±1.4	6.9±1.7	<0.0001	0.8818
C-IMT (mm)	0.98±0.14	0.87±0.15	0.0018	0.98±0.13	0.87±0.15	<0.0001	<0.0001

BMI: Body Mass Index, indice di massa corporea; **cIMT:** carotid Intima Media Thickness; ispessimento medio intimale carotideo; **CT:** Total Cholesterol, colesterolo totale; **FMD:** Flow-Mediated Dilation, disfunzione endoteliale; **HbA1c:** Glycated Hemoglobin, emoglobina glicata; **HDL-C:** High Density Lipoprotein-Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine ad alta densità; **LDL-C:** Low Density Lipoprotein-Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine a bassa densità; **TG:** TriGlycerides, Trigliceridi; **WC:** Waist Circumference, circonferenza vita. All values expressed in mean ± standard deviation; ^aPaired T-test.

4.1.3 DISCUSSIONE

In questo studio prospettico di 8 mesi, abbiamo visto che Exenatide LAR migliora diversi fattori di rischio cardiovascolare. Segnaliamo inoltre per la prima volta che

exenatide LAR ha migliorato significativamente il CIMT e l'FMD nei pazienti con DMT2 con e senza NAFLD.

Esiste una stretta correlazione tra T2DM e sviluppo di complicanze cardiovascolari. La presenza di parametri metabolici alterati, quali l'obesità centrale, la dislipidemia e l'ipertensione, aumenta ulteriormente il rischio cardiovascolare nei pazienti con DMT2. Diversi studi in letteratura, come DURATION 1-6, hanno evidenziato che exenatide LAR ha effetti positivi sul peso corporeo e sul controllo glicemico.²¹⁴ Il nostro studio ha dimostrato che l'exenatide LAR migliorava il peso corporeo diminuendo di circa 3 kg e la circonferenza della vita ridotta di circa 3 cm. Questi risultati sono in qualche modo coerenti con gli studi precedenti del nostro gruppo, mostrando un beneficio simile sul peso corporeo e sulla circonferenza della vita con l'uso di un altro GLP-1RA, liraglutide, nei pazienti con DMT2.^{82,215}

Nello studio LEAD-6, non sono state osservate differenze significative nei pazienti con DMT2 tra il trattamento con liraglutide versus exenatide *Bis In Die* (BID) sul peso corporeo (-3,24 versus -2,87 kg, rispettivamente) dopo 26 settimane mentre, in DURATION-6, il gruppo con DMT2 in terapia con liraglutide ha avuto una maggiore perdita di peso rispetto al gruppo in terapia con exenatide LAR (-3,6 kg versus -2,68 kg, rispettivamente) dopo 26 settimane di trattamento.⁸⁸

Tuttavia, si deve considerare che studi clinici hanno dimostrato che con il proseguimento della terapia, exenatide può esercitare un effetto benefico sul peso corporeo fino a 3 anni¹⁰⁷ e 7 anni,²¹⁶ suggerendo che exenatide ha effetto sulla riduzione del peso a medio e lungo termine.

Nel presente studio abbiamo anche trovato una significativa riduzione dei lipidi plasmatici in linea con le precedenti osservazioni, riportando un miglioramento del profilo lipidico mediante exenatide e indipendentemente dall'equilibrio del glucosio e dalla perdita di peso.¹⁰⁷ Un altro studio, con un follow-up di 52 settimane, ha dimostrato che l'exenatide LAR ha aumentato il colesterolo HDL e ridotto il colesterolo LDL e i trigliceridi.²¹⁷ Questo è coerente con i dati che abbiamo trovato nel presente studio. Per quanto riguarda la glicemia plasmatica e l'HbA1c, il controllo glicemico raggiunto nel nostro studio è coerente con quanto riportato negli studi

DURATION 1-6,⁸⁸ poiché i nostri soggetti hanno ridotto l'HbA1c dell'1,1% dopo 8 mesi di terapia con exenatide LAR.

In questo studio abbiamo anche trovato migliorato cIMT e FMD, due marker surrogati precoci aterosclerotici, dopo il trattamento con exenatide LAR. I nostri risultati sono in accordo con quelli riportati da Irace et al., che hanno riportato per la prima volta un miglioramento della FMD in un piccolo campione di soggetti con DMT2 trattati con exenatide.²¹⁸ Diversi meccanismi potrebbero essere potenzialmente coinvolti in tali effetti benefici. Exenatide LAR può migliorare la secrezione e la sensibilità dell'insulina, con conseguente miglioramento del controllo glicemico e riduzione dello stress ossidativo. Exenatide ha migliorato il potenziale antiossidante e ridotto lo stress ossidativo nei monociti/macrofagi umani in vitro diminuendo le specie reattive dell'ossigeno e i livelli di malondialdeide.²¹⁹ È stato anche riportato che exenatide aumenta l'espressione e l'attività di superossido dismutasi e glutatione reduttasi, due enzimi antiossidanti.²¹⁹ Un altro meccanismo proposto per questo effetto è un'apertura dei canali del potassio sensibili all'ATP.²²⁰ Un altro studio ha anche dimostrato che exenatide migliora la funzione diastolica e riduce la rigidità della parete arteriosa nei pazienti con DMT2.²²¹ Tuttavia, dovrebbe essere evidenziato che la durata e la gravità del DMT2, così come la presenza di comorbidità, possono influenzare l'impatto del trattamento sull'endotelio.²²² I pazienti nel presente studio erano privi sia di danni epatici e renali sia moderati che gravi, nonché senza aver subito un evento cardiovascolare maggiore, che potrebbe essere una ragione per cui una durata più lunga del trattamento con exenatide LAR non era necessaria per ottenere un impatto significativo sull'endotelio funzione e spessore della parete.

Gli effetti cardiovascolari di Exenatide LAR sono stati valutati nello studio EXSCEL,⁴⁰ in cui l'outcome cardiovascolare composito primario (morte cardiovascolare, infarto miocardico non fatale e ictus non fatale) si è verificato in 839 su 7.356 pazienti nel gruppo exenatide rispetto a 905 su 7.396 pazienti nel gruppo placebo (HR 0.91, IC 95% 0.83-1.00). Pertanto, exenatide LAR ha mostrato sicurezza cardiovascolare ($p < 0.001$ per non inferiorità), sebbene il beneficio cardiovascolare non possa essere dimostrato poiché l'analisi si avvicina alla significatività statistica

($p=0.06$ per superiorità).⁴⁰ I risultati trovati nel presente studio possono aiutare a spiegare, almeno in parte, la sicurezza cardiovascolare di exenatide LAR, come riportato di recente nello studio EXSCEL.

Una potenziale limitazione del nostro studio è l'assenza di un braccio di controllo, con pazienti solo sotto metformina. Tuttavia, i dati già presenti in letteratura indicano che la metformina non influenza significativamente il cIMT^{223,224} o l'FMD,²²⁵ ma nel migliore dei casi la metformina ha solo un effetto sulla circonferenza della vita e sul peso corporeo.^{226,227} Inoltre, la maggior parte dei nostri pazienti al momento dell'arruolamento era in terapia antiipertensiva, ipocolesterolemizzante e antiaggregante. Sebbene questi farmaci possano aver avuto un impatto sui parametri valutati, tutte queste terapie sono rimaste sostanzialmente invariate durante tutto il periodo di studio, al fine di evitare possibili distorsioni. D'altra parte, i punti di forza dello studio comprendono l'impostazione del mondo reale, le misurazioni in cieco del cIMT e del FMD, nonché un alto tasso di compliance con la terapia exenatide LAR. Questo è il primo studio che mostra una riduzione del cIMT dopo 8 mesi di trattamento con exenatide LAR in pazienti diabetici con e senza NAFLD. Inoltre, exenatide ha dimostrato di aumentare la funzione endoteliale, tuttavia, solo pochi studi hanno esaminato gli effetti di exenatide LAR su questo parametro. Per quanto a nostra conoscenza, il presente studio è il solo caratterizzato da un follow-up lungo e da una grande dimensione del campione. Inoltre per la prima volta abbiamo messo in evidenza che Exenatide LAR dà un maggiore controllo cardio-metabolico nei pazienti diabetici con steatosi piuttosto che a quelli senza. La somministrazione di exenatide migliora la resistenza all'insulina nel fegato, diminuisce la produzione di glucosio, aumenta l'assorbimento di glucosio a livello epatico e riduce la resistenza all'insulina nel tessuto adiposo, migliora l'effetto antilipolitico dell'insulina e riduce gli acidi grassi liberi nel plasma. Queste evidenze potrebbero spiegare alcuni meccanismi per cui gli agonisti del GLP-1 migliorano il metabolismo epatico nella NAFLD.²²⁸ Resta da stabilire se questi risultati si tradurranno in un'efficace prevenzione CV nei pazienti diabetici con NAFLD.

4.2 EFFETTI DI LIRAGLUTIDE IN PAZIENTI OBESI CON DIABETE MELLITO TIPO 2

4.2.1 MATERIALI E METODI

Pazienti inclusi nello studio

Nel presente studio prospettico sono stati inclusi 62 pazienti obesi con DMT2 (31 uomini e 31 donne; età: 61±9 anni), afferenti all'Ambulatorio di Diabetologia e Prevenzione Cardiovascolare (Responsabile: Prof. M. Rizzo) della Divisione di Medicina Interna (Direttore: Prof. G. Montalto) del Policlinico Universitario di Palermo, per la maggior parte in stato di scompenso glicometabolico (molti presentavano anche ipertensione arteriosa e dislipidemia in trattamento farmacologico). Nella seguente tabella (**Tabella 4**) sono elencate le principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio e le terapie farmacologiche assunte.

Il disegno dello studio ha previsto una visita medica con raccolta dei dati anamnestici, clinici e biochimici relativi a ciascun paziente sia al momento del reclutamento iniziale che dopo 4 mesi di terapia farmacologica. In particolare, sono stati valutati l'età, il sesso, il consumo giornaliero di sigarette, la familiarità per malattie cardiovascolari, comorbidità cardiovascolari, dislipidemie, ipertensione. Per ogni paziente in studio sono stati, altresì, registrati i dati antropometrici (altezza, peso, WC e BMI).

Questo studio è stato registrato in clinicaltrials.gov (NCT01715428) ed ha adottato le procedure stabilite dalla dichiarazione di Helsinki del 1975 e approvate dal comitato etico dell'Università degli Studi di Palermo. Durante la fase di reclutamento ogni singolo paziente ha visionato e firmato un consenso informato per partecipare allo studio clinico. Sono stati inclusi pazienti con DMT2, di entrambi i sessi e di età adulta, trattati con biguanide (Metformina), naïve alle terapie incretiniche e con valori di HbA1c >7.5%. Liraglutide, alle dosi di 0.6 UI per 14 giorni ed 1.2 UI dal 15° giorno fino alla fine dello studio, è stata somministrata in add on alla Metformina (1500 mg/die) come richiesto da nota AIFA. I criteri di esclusione prevedevano la

presenza di insufficienza epatica o renale severa, un pregresso evento cardiovascolare maggiore, infezioni gravi come il virus dell'HIV, dell'HBV o dell'HCV e neoplasie.

Tabella 4. Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio (n=62).

Età (anni)	61±9
Donne, n (%)	31 (50)
Durata Diabete (anni)	9±8
Fumatori, n (%)	24 (39)
Familiarità per malattie cardiovascolari, n (%)	35 (56)
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	128±18
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	77±8
Ipertensione, n (%)	45 (72)
Obesità, n (%)	36 (58)
Dislipidemia, n (%)	47 (76)
Complicanze diabetiche, n (%)	0 (0)
Uso di farmaci anti-ipertensivi	
beta-bloccanti, n (%)	22 (35)
inibitori enzima di conversione dell'angiotensina, n (%)	20 (32)
calcio antagonisti, n (%)	16 (26)
diuretici, n (%)	17 (27)
Uso di farmaci ipolipemizzanti	
statine, n (%)	31 (50)
fibrati, n (%)	4 (6)
acidi grassi poli-insaturi, n (%)	15 (24)
Uso di antiaggreganti, n (%)	11 (18)

Metodiche di indagine

Sono stati raccolti campioni di siero da ciascun paziente al basale e dopo il periodo di follow-up. Glucosio plasmatico, HbA1c, CT, TG e HDL-C sono stati misurati con metodi enzimatici-colorimetrici²⁰⁹⁻²¹¹ di routine mentre l'LDL-C è stato calcolato usando la formula di Friedewald (CT- (HDL-C + TG/5).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecocolor-doppler dei tronchi sovra-aortici per valutare il cIMT con sonda ecografica lineare B-mode real-time e sono state dosate, le sdLDL, sottofrazioni del LDL-C maggiormente aterogene. Queste analisi sono state eseguite al basale e dopo 4 mesi di terapia.

Determinazione ultrasonografica del cIMT

L'indagine strumentale è stata eseguita da un unico operatore (Dott. A.M. Patti) utilizzando un ecografo Medison SONOACE Pico (Samsung Medison Co., Korea) con una sonda di 7.5-10.0 MHz. L'esame ecografico è stato eseguito in modo standardizzato con angoli fissi di insonazione. I pazienti sono stati esaminati in posizione supina ed ogni porzione arteriosa è stata esaminata per identificare il sito medio-intimale. Ogni scansione della carotide comune iniziava appena sopra la clavicola mentre il trasduttore veniva spostato lungo la biforcazione della carotide e lungo l'arteria carotide interna. Sono stati identificati e misurati tre segmenti, sia sul piano anteriore che posteriore, su ciascun lato: il distale ad 1 cm dell'arteria carotide comune vicino alla biforcazione, la biforcazione stessa ed in prossimità della carotide interna.²¹² In ciascun sito di rilevazione è stato determinato il cIMT, inteso come la distanza tra la linea ecogenica che rappresenta l'interfaccia della porzione intimale dell'arteria, e la linea ecogenica rappresentante la giunzione dell'avventizia.

Analisi delle sottofrazioni LDL

Le sottofrazioni delle lipoproteine LDL sono state determinate e dosate con il metodo Lipoprint System © (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA), l'unico strumento diagnostico approvato dalla FDA per fornire misure quantitative del colesterolo lipoproteico (per le frazioni lipoproteiche comprese tra VLDL e HDL).²²⁹

Il sistema lipoprint (**Figura 21**) è un dispositivo che utilizza un'elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE) al 3% non-denaturante per separare, sulla base delle dimensioni (size), le frazioni e le sottofrazioni delle lipoproteine nei campioni di siero con una concentrazione di colesterolo totale maggiore di 100 mg/dl.

Il sistema lipoprint evidenzia il rischio di malattia cardiovascolare associata alla presenza di sdLDL, con una potenza superiore all'approccio convenzionale, basato sulla misurazione di CT, LDL-C, HDL-C, TG e apoB. Differenti dislipidemie e diverse distribuzioni di lipoproteine possono richiedere approcci terapeutici

differenti: una misura accurata di ciascuna sotto frazione delle lipoproteine permette di utilizzare la migliore terapia, e di monitorare puntualmente l'efficacia nel tempo.



Figura 21. Lipoprint™ Quantimetrix®: 1. Computer Mac (incluso Programma Lipoware Analysis); 2. Stampante a colori; 3. Scanner digitale (raggi UV, densitometro); 4. Camera elettroforetica; 5. Alimentatore (120V/220V); 6. Rack preparazione tubi; 7. Luce di preparazione (fotopolimerizzatore).²²⁹

In particolare, tale sistema, consente di separare le LDL in un massimo di sette sottofrazioni LDL, denominate LDL-1 costituite da particelle più grandi, fino a LDL-7 costituite da particelle più piccole. Inizialmente, i campioni di sangue intero sono stati raccolti in apposite provette (sistema vacuette) senza l'aggiunta di anticoagulante ed il siero è stato separato per centrifugazione (3000 rpm per 15 min), entro 30 minuti dal prelievo. Il siero è stato campionato in appositi tubi Eppendorf da 1,5 ml e conservato a - 80 ° C fino al momento dell'analisi, distinguendo per ciascun soggetto i campioni a tempo 0 e a 4 mese di terapia. Per ogni paziente vengono caricati 25 ul di campione con 300 ul di colorante lipofilo. Durante la fase di polimerizzazione, il colorante lipofilico si è legato in proporzione alla quantità relativa di colesterolo in ciascuna lipoproteina. Le lipoproteine premarcate sono state successivamente sottoposte ad elettroforesi verticale per 60 minuti a 36 mA (3 mA per ogni tubo presente) in una camera elettroforetica.

Durante la prima parte del processo elettroforetico, le particelle lipoproteiche sono state concentrate in una banda stretta e netta. Man mano che le particelle lipoproteiche migravano attraverso la matrice di gel di separazione, sono state risolte in bande in base alle dimensioni delle particelle che le compongono, dalle più grandi alle più piccole, in virtù dell'azione di filtrazione del gel: le HDL migravano più lontano, seguite dalle LDL piccole e dense, dalle LDL più grandi e galleggianti, dalle intermedie (costituite principalmente dalle IDL) e dalle VLDL (**Figura 22**). I chilomicroni, quando presenti, sono apparsi nella porzione superiore del gel.

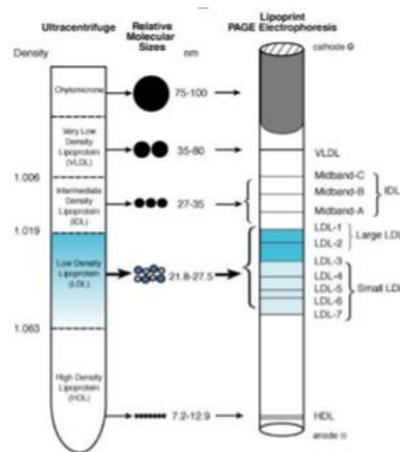


Figura 22. Relazioni tra densità, dimensioni molecolari e mobilità elettroforetica delle differenti lipoproteine.²²⁹

Un profilo Lipoprint tipico è costituito da 1 banda VLDL, 3 bande intermedie, massimo 7 bande LDL e 1 banda HDL. Al termine dell'elettroforesi, le varie frazioni lipoproteiche marcate (bande) nel campione vengono identificate in base alla loro mobilità (Rf) usando le VLDL come punto di riferimento iniziale (VLDL= 0) e HDL come punto di partenza (HDL= 1).

Per la quantificazione delle bande corrispondenti alle varie lipoproteine, è stata eseguita la scansione densitometrica (scan) dei tubi di gel, mediante uno scanner digitale collegato ad un computer Mac (Apple Computer Inc.) dotato di apposito programma (Lipoware Analysis Program).

Dopo la scansione, sono stati calcolati la mobilità elettroforetica e l'area relativa a ciascuna banda lipoproteica. Moltiplicando tale area per la concentrazione del

colesterolo totale del campione, si ottiene la quantità di colesterolo per ciascuna banda in mg/dl. La concentrazione di colesterolo totale è stata preimpostata prima di eseguire gli scan. I risultati sono riportati e stampati come grafici a colori facili da interpretare e corrispondenti al profilo lipoproteico del paziente.

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS (V.17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). Le differenze dei parametri clinici e biochimici, analizzati a tempo zero e dopo 4 mesi di terapia, sono stati valutati con il paired t-test. Le variabili sono state valutate con i coefficienti di correlazione di Spearman.

4.2.2 RISULTATI

Dopo 4 mesi di terapia con liraglutide abbiamo riscontrato significative riduzioni dei parametri antropometrici (peso da 81 ± 16 a 78 ± 14 kg, WC da 106 ± 13 a 103 ± 12 cm e BMI da 30 ± 5 a 29 ± 5 kg/m², $p < 0.0001$ per tutti), di HbA1c (da 8.4 ± 1.5 a 6.9 ± 1.1 %, e del pattern lipidico (CT da 4.7 ± 1.1 a 4.2 ± 0.9 mmol/L, $p = 0.0020$, TG da 1.9 ± 1.1 a 1.6 ± 0.7 mmol/L, $p = 0.0061$ ed LDL-C da 2.7 ± 1.1 a 2.3 ± 0.8 mmol/L, $p = 0.0089$), mentre non significativi cambiamenti sono stati trovati in HDL-C (**Tabella 5**).

Abbiamo calcolato il contenuto di colesterolo (in mmol/L) nelle sottoclassi di LDL e abbiamo riscontrato un aumento di LDL1 (da 17.4 ± 4.7 a 23.6 ± 5.6 %, $p < 0.0001$), con una riduzione concomitante di LDL3-C e LDL4-C (da 9.8 ± 4.7 a 5.3 ± 2.8 %, $p < 0.0001$ e da 3.1 ± 4.16 a 1.7 ± 2.8 %, $p = 0.0233$, rispettivamente) come si può osservare nella **Tabella 6**.

Nella **Figura 23** possiamo visualizzare uno scan delle sottoclassi di LDL-C mediante sistema Lipoprint di uno dei pazienti obesi con DMT2 prima e dopo trattamento con liraglutide; in rosso sdLDL, in giallo ed arancio LDL larghe e leggere. L'andamento è esemplificativo di quello visualizzato negli altri 61 pazienti arruolati nello studio.

Tabella 5. Variazioni dei parametri di rischio cardiovascolare dopo 4 mesi di trattamento con Liraglutide (n=62).

	Baseline	4 mesi	p-value ^a
Peso (kg)	81±16	78±14	< 0.0001
BMI (kg/m ²)	30±5	29±5	< 0.0001
WC (cm)	106±13	103±12	< 0.0001
Glicemia a digiuno (mmol/l)	9.1±4.0	7.3±2.0	0.0010
HbA1c (%)	8.4±1.5	6.9±1.1	< 0.0001
CT (mmol/l)	4.7±1.1	4.2±0.9	0.0020
TG (mmol/l)	1.9±1.1	1.6±0.7	0.0061
HDL-C (mmol/l)	1.1±0.2	1.1±0.2	0.2970
LDL-C (mmol/l)	2.7±1.1	2.3±0.8	0.0089
cIMT (mm)	1.1±0.3	0.9±0.2	< 0.0001

BMI: Body Mass Index, indice di massa corporea; **cIMT:** carotid Intima Media Thickness; ispessimento medio intimale carotideo; **CT:** Total Cholesterol, colesterolo totale; **HbA1c:** Glycated Hemoglobin, emoglobina glicata; **HDL-C:** High Density Lipoprotein-Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine ad alta densità; **LDL-C:** Low Density Lipoprotein-Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine a bassa densità; **TG:** TriGlycerides, Trigliceridi; **WC:** Waist Circumference, circonferenza vita. All values expressed in mean ± standard deviation; ^a Paired T-test.

Tabella 6. Variazioni delle lipoproteine ed in particolare delle sottofrazioni dell'LDL-C dopo 4 mesi di trattamento con Liraglutide (n=62).

	Baseline	4 mesi	p-value ^a
VLDL (%)	23.4±4.1	20.9±4.3	< 0.0001
IDL-C (%)	10.7±2.4	10.7±3.2	0.8252
IDL-B (%)	9.6±1.9	9.9±1.8	0.2806
IDL-A (%)	8.4±3.2	8.6±2.4	0.6486
LDL-1 (%)	17.4±4.7	23.6±5.6	< 0.0001
LDL-2 (%)	17.5±4.0	18.9±3.8	0.0644
LDL-3 (%)	9.8±4.7	5.3±2.8	< 0.0001
LDL-4 (%)	3.1±4.2	1.7±2.8	0.0233

IDL: Intermediate Density Lipoprotein, lipoproteine a densità intermedia; **LDL-C:** Low Density Lipoprotein, lipoproteine a bassa densità; **VLDL:** Very Low Density Lipoprotein, lipoproteine a bassissima densità.

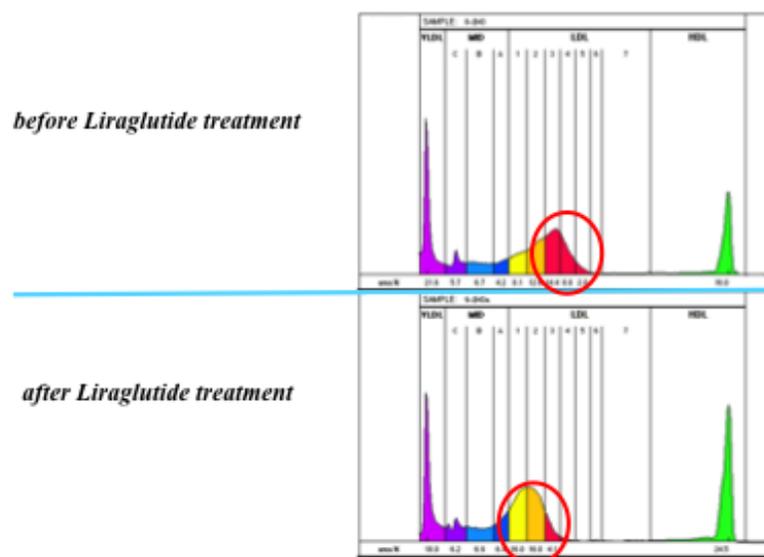


Figura 23: Scan delle sottoclassi di LDL-C mediante sistema Lipoprint di un paziente diabetico obeso prima e dopo trattamento con liraglutide; in rosso sdLDL, in giallo ed arancio LDL larghe e leggere.

Anche liraglutide ha ridotto il cIMT (da 1.13 ± 0.29 a 0.92 ± 0.24 mm, $p < 0.0001$) e una correlazione significativa è stata osservata tra le variazioni di cIMT e quelle in LDL-3 ($r = 0.501$; $p < 0.0001$). All'analisi multivariata, inclusi parametri antropometrici, glicemia, HbA1c, lipidi plasmatici e sottoclassi LDL, solo sdLDL-3 sono stati trovati predittori indipendenti di cambiamenti nel cIMT ($p < 0.0001$) (**Figura 24**).

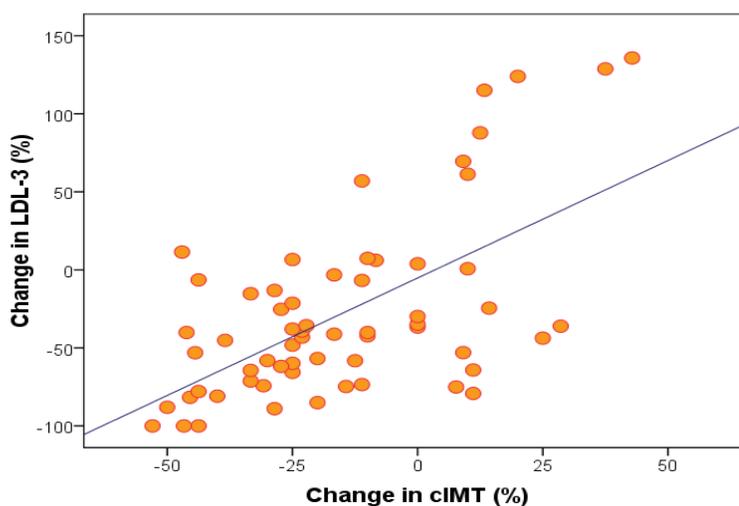


Figura 24: Correlazione lineare tra una delle sottoclassi sdLDL (sdLDL-3) e C-IMT in pazienti diabetici ed obesi ($n = 62$).

4.2.3 DISCUSSIONE

Le particelle LDL sono un importante fattore predittivo della progressione della malattia coronarica e la predominanza delle LDL piccole e dense è stata accertata, dal National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III,⁴⁸ come un fattore di rischio emergente per la patologia cardiovascolare. Lo studio Atherosclerosis Risk in Communities²³⁰ in cui sono stati inclusi 11.419 partecipanti, ha messo in evidenza che la concentrazione delle lipoproteine piccole e dense è più elevata nei pazienti diabetici rispetto alla popolazione generale ed è fortemente associata al profilo lipidico aterogenico, confermando il ruolo primario che rivestono queste sottoclassi di lipoproteine nei pazienti diabetici.¹²⁷ Ciò è stato altresì confermato in questo studio, in cui i pazienti con DMT2 esaminati hanno mostrato un miglioramento statisticamente significativo dei lipidi plasmatici, tra cui il colesterolo totale e LDL-C e come evidenziato dal sistema Lipoprint[®], è risultato significativo la riduzione dei livelli di particelle LDL piccole e dense. Inoltre una correlazione significativa è stata osservata tra le variazioni in sdLDL in particolare la sottoclasse LDL-3 e quelle del cIMT ($r=0.501$; $p<0.0001$) in modo indipendente dagli altri parametri clinici esaminati.²³¹ Gli studi clinici, in cui sono stati esaminati gli analoghi del GLP-1 (Liraglutide e Exenatide), hanno mostrato significativi miglioramenti in diversi parametri metabolici come il peso corporeo, la pressione arteriosa, il pattern lipidico e l'aterosclerosi subclinica (cIMT);^{82,215,231} tuttavia l'effetto della Liraglutide sulle sottoclassi LDL risulta in gran parte sconosciuto. Yanai et al. nel loro studio pilota²³² hanno dimostrato che Liraglutide riduce i livelli di LDL piccole e dense, oltre che di chilomicroni, VLDL e IDL solo dopo 15 giorni di trattamento; ma tale riduzione non era statisticamente significativa, probabilmente per il piccolo numero di soggetti inclusi. Dai risultati riportati nel suddetto studio si evincono, solo dopo 4 mesi di terapia, i potenziali effetti non glicemici di Liraglutide sulle sottoclassi LDL in pazienti con DMT2 fortemente associate all'aterosclerosi carotidea (cIMT) e al rischio CV.

La nostra ipotesi è che Liraglutide eserciti effetti significativi nella fase iniziale dell'aterosclerosi, influenzandone la formazione e la progressione della placca ateromasica (**Figura 25**).²³³ È noto che il danno endoteliale è presente nei soggetti

con DMT2.²³⁴ Le particelle di LDL circolanti vengono trasportate dallo spazio vascolare nella parete arteriosa e trattenute nella matrice extracellulare, dove sono soggette ad ossidazione, formando LDL ossidate (ox), un evento precoce nell'aterosclerosi, che contribuisce ulteriormente alla formazione della placca aterosclerotica.²³⁵ La riduzione della clearance di LDL-R, l'aumento dell'ingresso arterioso e l'aumento dell'ossidazione sono evidenti, ma come principali meccanismi sono stati proposti disfunzione endoteliale, formazione di cellule schiumose, migrazione e proliferazione di queste e induzione dell'adesione e aggregazione piastrinica.

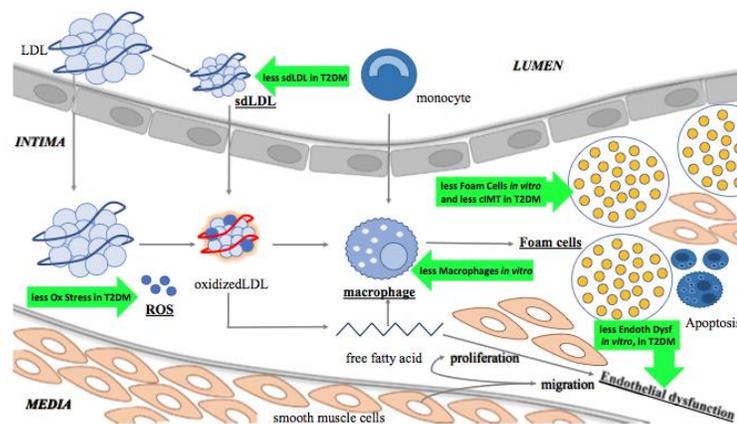


Figura 25: Potenziale meccanismo di liraglutide sulla formazione e progressione dell'aterosclerosi.²³³

La modulazione favorevole delle lipoproteine aterogene era indipendente da diversi parametri incluso il controllo glicemico. Questi risultati possono contribuire a spiegare l'effetto positivo di liraglutide sull'esito CV. Riducendo sdLDL, c'è meno substrato disponibile per essere ossidato e i processi aterosclerotici possono essere arrestati in una fase precoce. Inoltre, negli individui obesi trattati per 1 anno con liraglutide, i livelli di marcatore aterogenico apoB sono stati ridotti nonostante un simile mantenimento del peso corporeo rispetto a una dieta a basso contenuto calorico di 8 settimane.²³⁶ Infine, anche gli effetti di liraglutide sullo stato pro-infiammatorio e sulle bio-citochine sono ben documentati. È noto che le citochine e altri mediatori dell'infiammazione, associati alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, sono strettamente collegate alla stabilità della placca e alla sua

istologia.²³⁷ Il nostro gruppo è stato il primo a dimostrare che liraglutide riduce lo stress ossidativo e ripristina l'eme ossigenasi-1 (HO-1) in soggetti con T2DM dopo soli 2 mesi di trattamento,²³⁸ il che significa che liraglutide è in grado di ridurre potenzialmente il substrato per l'ossidazione delle particelle LDL che sono penetrate all'interno dell'arteria dal sangue. Oltre l'azione diretta di liraglutide sulla formazione di aterosclerosi, ci sono sempre più prove che liraglutide può contrastare la sua progressione. Ciò è anche legato al fatto che il 18% dei soggetti inclusi nello studio LEADER era in prevenzione secondaria CV e il rischio di un altro evento futuro era ridotto.⁴¹ Quando le placche aterosclerotiche sono già presenti, tutti i dati clinici sono coerenti con le osservazioni precliniche in modelli animali che liraglutide può contribuire a rendere le placche più stabili, riducendo l'infiammazione, migliorando la funzione endoteliale e riducendo il numero di cellule schiumose.²³⁹ Un potenziale limite di questo studio potrebbe essere la mancanza di un gruppo controllo, così come la possibile influenza da parte di terapie concomitanti per la prevenzione cardiovascolare (compresi gli agenti anti-ipertensivi, statine e aspirina) sui parametri clinici misurati. Tuttavia, per evitare potenziali fattori confondenti, le dosi di questi farmaci co-somministrati sono stati mantenuti costanti durante i 4 mesi di follow-up. In ogni caso, le significative variazioni dei parametri esaminati dopo la terapia con liraglutide riducono la possibilità che questi risultati si siano verificati in maniera casuale.

4.3 ESPRESSIONE DI PCSK9 A LIVELLO EPATICO IN PAZIENTI OBESI CON NAFLD CON E SENZA DIABETE

4.3.1 MATERIALI E METODI

Pazienti inclusi nello studio

Sono stati arruolati 65 pazienti (21 uomini e 44 donne; età: 39±11 anni) affetti da obesità severa (BMI 46±7 kg/m²) presso l'Unità Operativa Semplice (U.O.S) di Chirurgia Bariatrica (Responsabile: Prof. G. Pantuso) dell'U.O.C. di Chirurgia Oncologica (Direttore: Prof. M. A. Latteri) del Policlinico di Palermo per sottoporsi all'intervento chirurgico di by-pass gastrico. I criteri di inclusione dello studio erano

i seguenti: 1) uomini e donne > 18 anni; 2) BMI > 35 kg/m²; 3) presenza NAFLD con diversi gradi di malattia diagnosticata ecograficamente. I criteri di esclusione erano i seguenti: 1) cirrosi avanzata (Child-Turcotte-Pugh C); 2) carcinoma epatocellulare; 3) altre cause di malattia epatica o eziologie miste (consumo eccessivo di alcol, l'epatite B e C, malattia autoimmune del fegato, malattia di Wilson, emocromatosi, o deficit di alfa1-antitripsina; 4) infezione da virus dell'immunodeficienza umana; 5) precedente trattamento con terapia antivirale e farmaci immunosoppressori; 6) dipendenza attiva droghe per via endovenosa; 7) NAFLD a causa di esposizione professionale all'inquinamento. Le procedure utilizzate sono state conformi alla Dichiarazione di Helsinki del 1975, modificata nel 2013. Lo studio ha ricevuto l'approvazione dal Comitato Etico come studio spontaneo in data 23 giugno 2014, verbale n° 7/2014. Tutti i pazienti hanno dato la loro approvazione e hanno firmato il consenso informato. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a visita medica (valutazione delle condizioni cliniche pre-intervento, peso e BMI), prelievo ematochimico per le analisi di routine (emocromo, assetto lipidico, profilo glicemico, funzione renale ed epatica, indici di coagulazione ed infiammazione) ed ecografia dell'addome superiore per la stadiazione della steatosi secondo i criteri di Joseph (grado 1 lieve, grado 2 moderato, grado 3 severo). Durante la procedura chirurgica è stata effettuata la biopsia epatica come da protocollo per la stadiazione istologica della steatosi che valuta il grado assegnando un punteggio separato per entità steatosi, ballooning epatocitario e infiammazione lobulare, e lo stadio in base all'entità della fibrosi secondo il sistema di punteggio di Kleiner²⁴⁰ effettuata dalla Prof. D. Cabibbi, del Dipartimento di Patologia Umana (Dir. Resp. V. Franco), dell'Università di Palermo, Italia. Dei 65 pazienti arruolati solo su 20 pazienti (6 uomini e 14 donne; età: 37±8 anni) e su un pool di 9 pz controllo con fegato sano (pool di total RNA da 5 fegati normali da soggetti maschi età 20, 24, 27, 29, 69 "BioChain Institute Inc. Newark, CA, USA" più pool di total RNA da 4 fegati normali da soggetti maschi e femmine età 26-78 "Takara Bio USA, Inc; Mountain View, CA, USA") è stata effettuata l'analisi molecolare di espressione di alcuni geni coinvolti nello stress dell'ER, della lipidogenesi e della β-ossidazione degli acidi grassi. Dei 20 pazienti solo 12 erano pluripatologici in trattamento farmacologico e solo 15 hanno aderito ad un

programma dietetico consigliato per una minore durata dell'intervento in laparoscopia, una riduzione della degenza ospedaliera e un minor rischio di complicanze, un mese prima dell'intervento chirurgico. Le caratteristiche di questi 20 pazienti (parametri antropometrici, biochimici e della stadiazione della NAFLD e della sua gravità) sono riportate in **Tabella 7**.

Tabella 7: Caratteristiche dei pazienti obesi al baseline (n=20).

	NAFLD (n=10)	NASH (n=10)	p=
Sesso, donne/uomini (n)	8/2	6/4	<i>n.s.</i> ^a
Età (anni)	39 [24-53]	37 [25-49]	<i>n.s.</i> ^a
Peso (kg)	120 [102-140]	139 [92-152]	<i>n.s.</i> ^a
BMI (kg/m ²)	44.9 [34.3-52.9]	45.0 [34.6-58.6]	<i>n.s.</i> ^a
Diabetici (n)	3	3	<i>n.s.</i> ^b
ALT (IU/L)	26 [13-74]	36 [18-104]	<i>n.s.</i> ^a
AST (IU/L)	19 [10-60]	27 [12-57]	<i>n.s.</i> ^a
GGT (IU/L)	18 [8-38]	32 [14-45]	<i>n.s.</i> ^a
Fosfatasi alcalina (IU/L)	66 [49-110]	71 [46-91]	<i>n.s.</i> ^a
Bilirubina totale (mg/dL)	0.40 [0.23-0.47]	0.36 [0.25-0.88]	<i>n.s.</i> ^a
Bilirubina coniugata (mg/dL)	0.15 [0.10-0.24]	0.14 [0.13-0.57]	<i>n.s.</i> ^a
Glicemia a digiuno (mg/dL)	90 [68-107]	92 [75-115]	<i>n.s.</i> ^a
HbA1c (%)	5.6 [5.1-6.3]	5.9 [5.3-7.2]	<i>n.s.</i> ^a
Insulinemia (mIU/L)	15.8 [7.2-46.4]	23.7 [12.2-118.5]	<i>n.s.</i> ^a
HOMA-IR	3.9 [1.9-8.6]	6.7 [2.5-24.0]	<i>n.s.</i> ^a
TC (mg/dL)	206 [168-219]	191 [132-266]	<i>n.s.</i> ^a
TG (mg/dL)	123 [56-169]	121 [63-350]	<i>n.s.</i> ^a
HDL-C (mg/dL)	47 [35-67]	45 [29-64]	<i>n.s.</i> ^a
LDL-C (mg/dL)	127 [104-142]	106 [49-194]	<i>n.s.</i> ^a
Grado di steatosi			
basso grado, 0-1 (n)	5	0	
alto grado, 2-3 (n)	5	10	<i>n.s.</i> ^b
Infiammazione lobulare			
bassa infiammazione, 0-1 (n)	9	6	
alta infiammazione, 2-3 (n)	1	4	<i>n.s.</i> ^b
Ballooning epatocellulare			
ballooning score, 0 (n)	6	0	
ballooning score, 1 (n)	4	6	
ballooning score, 2 (n)	0	4	<i><0.0001</i> ^c

☒

ALT: ALanine Transaminase; **AST:** ASpartate Transaminase; **BMI:** Body Mass Index; **γGT:** Gamma Glutamyl Transferase; **HbA1c:** Glycated hemoglobin A1c; **HDL:** High-Density Lipoprotein; **HOMA-IR:** HOmeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; **LDL:** Low Density Lipoprotein; **NAFLD:** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; **NASH:** Non-Alcoholic SteatoHepatitis. L'analisi univariata è stata eseguita utilizzando il test ManneWhitney non parametrico per variabili numeriche^a, mentre le differenze nella prevalenza per le variabili nominali sono state analizzate dal test di Fisher^b. L'analisi statistica per il punteggio di ballooning epatocellulare è stata eseguita utilizzando il test di Spearman^c. Nella tabella i dati sono presentati come mediana e intervallo [valori minimo e massimo].

Metodiche di indagine

Glucosio plasmatico, insulinemia, HbA1c, indici epatici (AST, ALT, GGT, fosfatasi alcalina), pattern lipidico (CT, TG e HDL-C) sono stati misurati con metodi di laboratorio di routine mentre l'LDL-C è stato calcolato usando la formula di Friedewald ($CT - (HDL-C + TG/5)$) e l'HOMA-IR con la formula "glicemia a digiuno (espressa in mg/dl) moltiplicata per l'insulinemia a digiuno (espressa in mUI/L) diviso 405".

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a biopsia epatica in laparoscopia. Il frustolo di fegato veniva diviso in tre pezzi piccoli in condizioni di sterilità e congelati direttamente in azoto liquido. Uno dei pezzi veniva inviato per la valutazione immunoistochimica effettuata dalla Prof. D. Cabibbi, del Dipartimento di Patologia Umana (Dir. Resp. V. Franco), dell'Università di Palermo, Italia; gli altri due frustoli di fegato venivano dedicati all'estrazione dell'RNA e di proteine per analisi biochimiche e molecolari effettuate presso l'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare "Alberto Monroy", del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Palermo, Italia, dall'equipè del Dott. M. Cervello.

Valutazione dell'espressione genica epatica

L'RNA totale è stato estratto con Invitrogen™ TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA USA) come da protocollo, dopo omogeneizzazione meccanica del frustolo di fegato in azoto liquido con l'ausilio di un mortaio. Il cDNA è stato sintetizzato usando 1 microg di RNA totale, con il kit di sintesi del cDNA "QuantiTect Reverse Transcription Kit" (Qiagen, Hilden, Germania). I geni che codificano per la PCSK9 epatica, la proteina responsabile della regolazione dei geni necessari per la de novo lipogenesi (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c, SREBP-1c), l'enzima coinvolto nella lipogenesi (Fatty Acid Synthase, FASN), la proteina chaperone importante per il controllo della qualità delle proteine del reticolo endoplasmatico (Glucose-regulated protein 78, GRP78) e quella coinvolta nella risposta allo stress del reticolo (C/EBP Homologous Protein, CHOP), il recettore sensore di lipidi endogeni (Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa, PPAR- α)

e l'enzima coinvolto nella β -ossidazione degli acidi grassi (Carnitina Palmitoil Transferasi 1, CPT1) sono stati analizzati mediante quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). Le condizioni di ciclizzazione della PCR erano le seguenti: 94°C per 10 minuti, 40 cicli a 94°C per 10 s e 60 °C per 1 min. Ogni reazione è stata allestita in duplicato per ciascun gene. L'espressione genica è stata valutata con la quantizzazione comparativa ($\Delta\Delta C_t$) utilizzando il gene endogeno 18S come controllo per normalizzare il segnale.

4.3.2 RISULTATI

Le caratteristiche al baseline dei 20 soggetti considerati per le analisi dei profili di espressione genica epatica sono riportate nella **Tabella 7**. La suddivisione dei pazienti in due gruppi, quelli con NAFLD (n=10) e quelli con NASH (n=10), è basata sul NAFLD Activity Score (NAS)²⁴¹ assegnando un punteggio dopo la valutazione dell'entità della steatosi, del ballooning epatocitario e dell'infiammazione lobulare.^{240,241}

L'espressione epatica dell'mRNA di PCSK9 è up-regolato nel 95% dei pazienti (19 su 20 pazienti totali NAFLD e NASH) rispetto al pool dei 9 pazienti con fegato normale (Normal Liver, NL) (**Figura 26**).

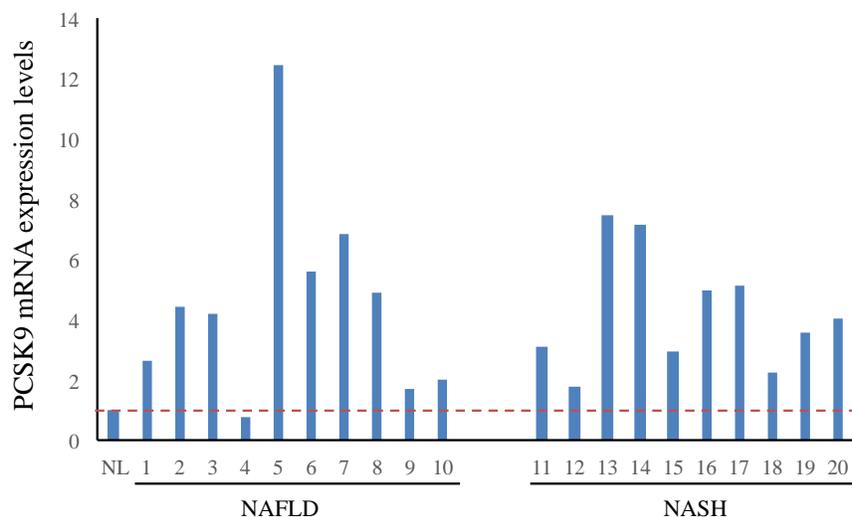
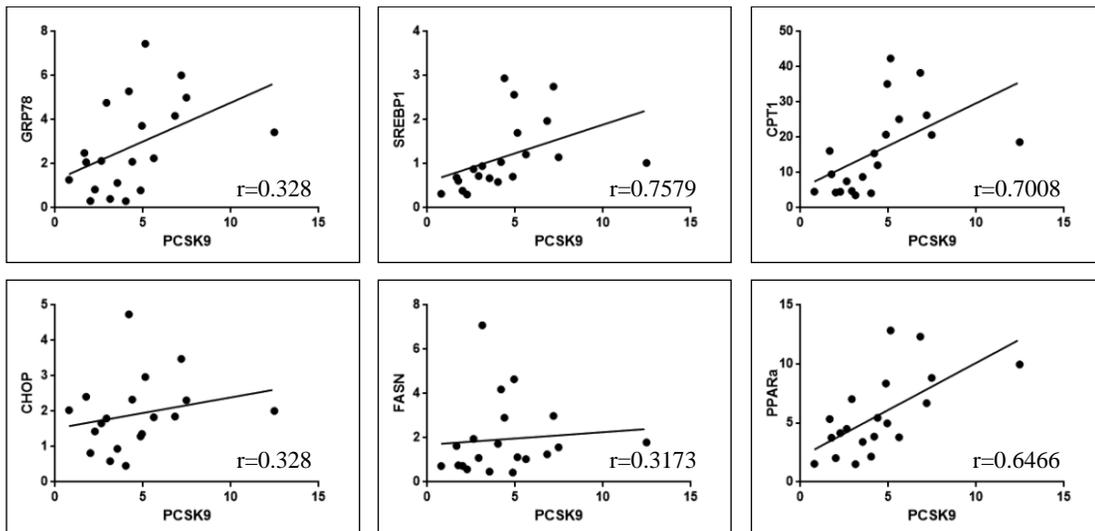


Figura 26: Istogramma sull'espressione dell'mRNA di PCSK9 nel pool di soggetti con fegato sano (NL n=9) e nei pazienti obesi (NAFLD n=10, NASH n=10). **NAFLD:** Non-alcoholic fatty liver disease; **NASH:** Non-Alcoholic Steatohepatitis; **NL:** Normal Liver.

L'analisi di correlazione per ranghi di Spearman rivela che il livello di espressione di mRNA PCSK9 è positivamente associato all'espressione del gene di ER stress GRP78 e all'espressione di geni coinvolti sia nella lipogenesi (come SREBP1) che nella beta ossidazione lipidica, come PPAR α e CPT1 (**Tabella 8**) nei 20 pazienti totali.

Tabella 8: Correlazioni tra l'espressione di mRNA di PCSK9 e geni del metabolismo lipidico e dello stress del reticolo endoplasmatico nei 20 pazienti totali.

Morbidly Obese Patients (MOP) (n=20)		
	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>PCSK9 vs GRP78</i>	0.3281	0.0160
<i>PCSK9 vs CHOP</i>	0.3281	ns
<i>PCSK9 vs FASN</i>	0.3173	ns
<i>PCSK9 vs SREBP1</i>	0.7579	0.0001
<i>PCSK9 vs CPT1</i>	0.7008	0.0006
<i>PCSK9 vs PPARα</i>	0.6466	0.0021



CHOP: C/EBP Homologous Protein; **CPT1:** Carnitina Palmitoil Transferasi 1; **FASN:** Fatty Acid Synthase; **GRP78:** Glucose-regulated protein 78; **PCSK9:** Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9; **PPAR- α :** Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa; **SREBP-1c:** Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c.

Abbiamo osservato un leggero trend di riduzione dei livelli di espressione nel fegato dell'mRNA di PCSK9 nei pazienti NASH rispetto ai pazienti con NAFLD anche se non raggiunge la significatività statistica (**Figura 27 A**).

Nella **Figura 27 (A)**, sono mostrati i box plot dell'espressione genica dei vari geni studiati nei pazienti obesi divisi in base allo stato di malattia del fegato in NAFLD (n = 10) e NASH (n = 10).

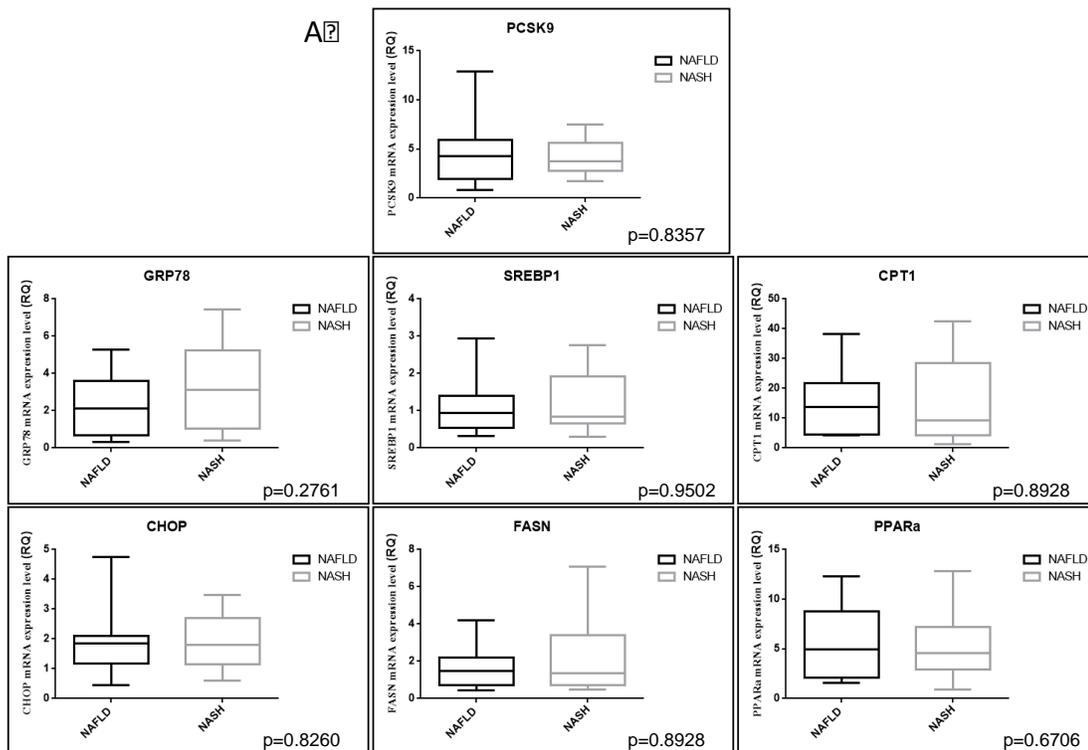


Figura 27 (A): Analisi di espressione genica in pazienti con NAFLD (n=10) e NASH (n=10). **NAFLD:** Non-alcoholic fatty liver disease; **NASH:** Non-Alcoholic Steatohepatitis; **CHOP:** C/EBP Homologous Protein; **CPT1:** Carnitina Palmitoil Transferasi 1; **FASN:** Fatty Acid Synthase; **GRP78:** Glucose-regulated protein 78; **PCSK9:** Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9; **PPAR-α:** Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa; **SREBP-1c:** Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c.

Nella **Figura 27 (B)**, sono mostrati i box plot dell'espressione genica dei vari geni studiati nei pazienti obesi con NAFLD classificati sulla base della gravità della steatosi in due gruppi: basso grado 0-1 (n=5) e grado elevato 2-3 (n=15).

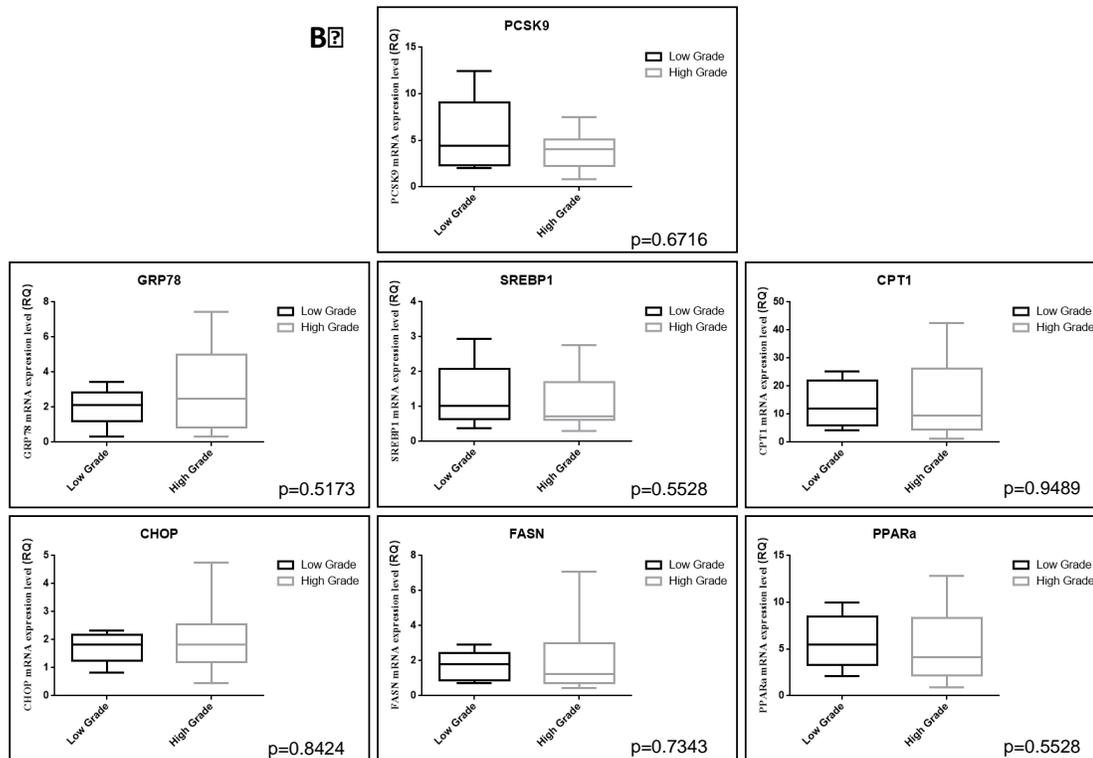


Figura 27 (B): Analisi di espressione genica in pazienti con basso grado 0-1 (n=5) ed alto grado 2-3 (n=15) di steatosi. **NAFLD:** Non-alcoholic fatty liver disease; **NASH:** Non-Alcoholic Steatohepatitis; **CHOP:** C/EBP Homologous Protein; **CPT1:** Carnitina Palmitoil Transferasi 1; **FASN:** Fatty Acid Synthase; **GRP78:** Glucose-regulated protein 78; **PCSK9:** Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9; **PPAR-α:** Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa; **SREBP-1c:** Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c.

Nessuna alterazione significativa nell'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico e nello stress del reticolo nei 20 pazienti divisi in base al grado di steatosi (**Figura 27 B**) e in base all'infiammazione (**Figura 27 C**). In realtà dal confronto di espressione genica nei pazienti obesi suddivisi in base al punteggio di infiammazione, mRNA di PCSK9 e PPARα tendono ad aumentare nell'alto grado di infiammazione rispetto al basso grado non raggiungendo per poco la significatività statistica (PCSK9 p=0.0806; PPARα p=0.0526).

Nella **Figura 27 (C)**, sono mostrati i box plot dell'espressione genica dei vari geni studiati nei pazienti obesi suddivisi in sottogruppi in base al punteggio di infiammazione, basso grado 0-1 (n=15), alto grado 2-3 (n=5).

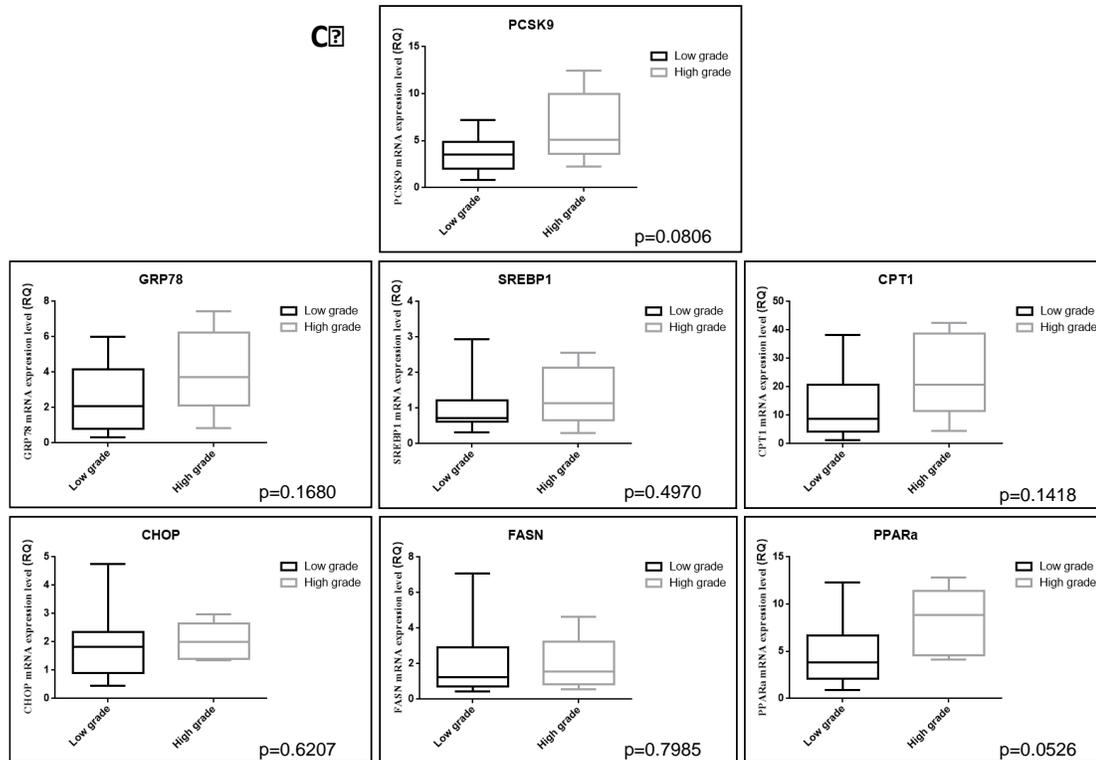
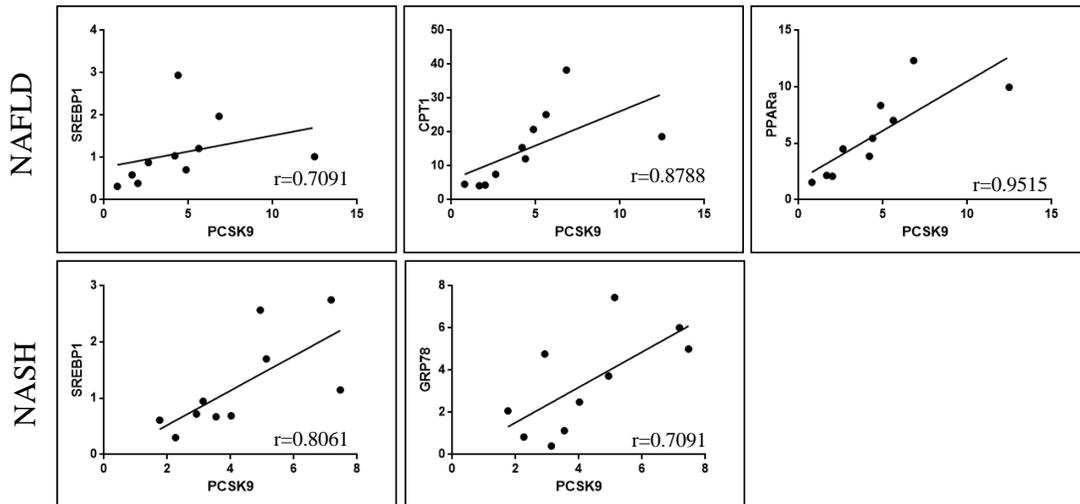


Figura 27 (C): Analisi di espressione genica in pazienti con basso grado 0-1 (n=15) ed alto grado 2-3 (n=5) di infiammazione. **NAFLD:** Non-alcoholic fatty liver disease; **NASH:** Non-Alcoholic Steatohepatitis; **CHOP:** C/EBP Homologous Protein; **CPT1:** Carnitina Palmitoil Transferasi 1; **FASN:** Fatty Acid Synthase; **GRP78:** Glucose-regulated protein 78; **PCSK9:** Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9; **PPAR-α:** Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa; **SREBP-1c:** Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c.

Il livello di espressione di mRNA PCSK9 era correlato con il livello di espressione di mRNA di diversi geni coinvolti nella risposta allo stress dell'ER, come CHOP e GRP78, e geni coinvolti nel metabolismo lipidico, come FASN, SREBP1, PPARα e CPT1 in base anche ai gradi di steatosi ed infiammazione (vedi **Tabelle 9-11**).

Tabella 9: Correlazioni tra l'espressione di mRNA di PCSK9 e geni del metabolismo lipidico e dello stress del reticolo endoplasmatico nei 20 pazienti divisi in base allo stato di malattia del fegato in NAFLD (n = 10) e NASH (n = 10).

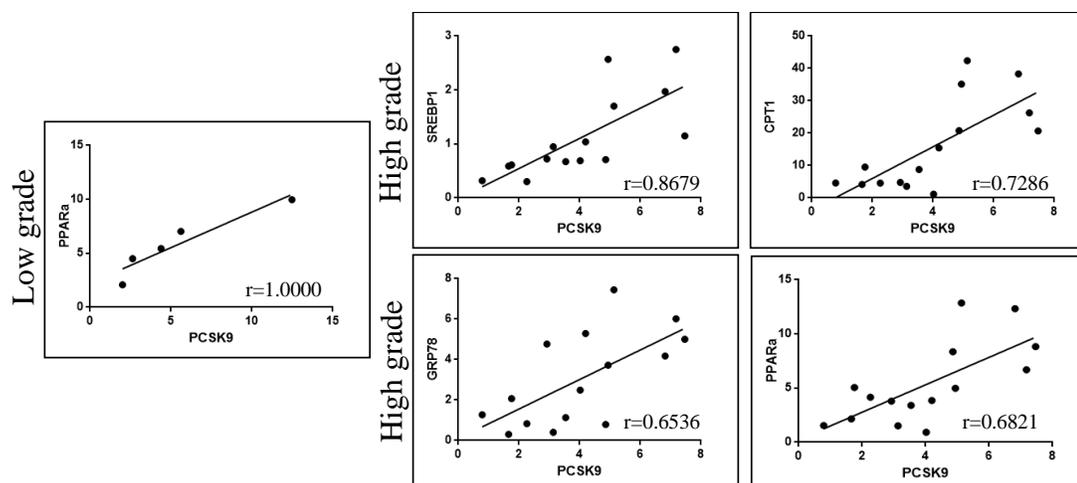
	<i>NAFLD (n=10)</i>		<i>NASH (n=10)</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>PCSK9 vs FASN</i>	0.1273	ns	0.4667	ns
<i>PCSK9 vs SREBP1</i>	0.7091	0.0268	0.8061	0.0072
<i>PCSK9 vs CPT1</i>	0.8788	0.0016	0.5515	ns
<i>PCSK9 vs PPARα</i>	0.9515	0.0001	0.4788	ns
<i>PCSK9 vs CHOP</i>	0.2242	ns	0.3167	ns
<i>PCSK9 vs GRP78</i>	0.6242	ns	0.7091	0.0268



NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease; *NASH:* Non-Alcoholic Steatohepatitis; *CHOP:* C/EBP Homologous Protein; *CPT1:* Carnitina Palmitoil Transferasi 1; *FASN:* Fatty Acid Synthase; *GRP78:* Glucose-regulated protein 78; *PCSK9:* Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9; *PPAR-α:* Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa; *SREBP-1c:* Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c.

Tabella 10: Correlazioni tra l'espressione di mRNA di PCSK9 e geni del metabolismo lipidico e dello stress del reticolo endoplasmatico nei 20 pazienti divisi sulla base della gravità della steatosi: basso grado 0-1 (n=5) e grado elevato 2-3 (n=15).

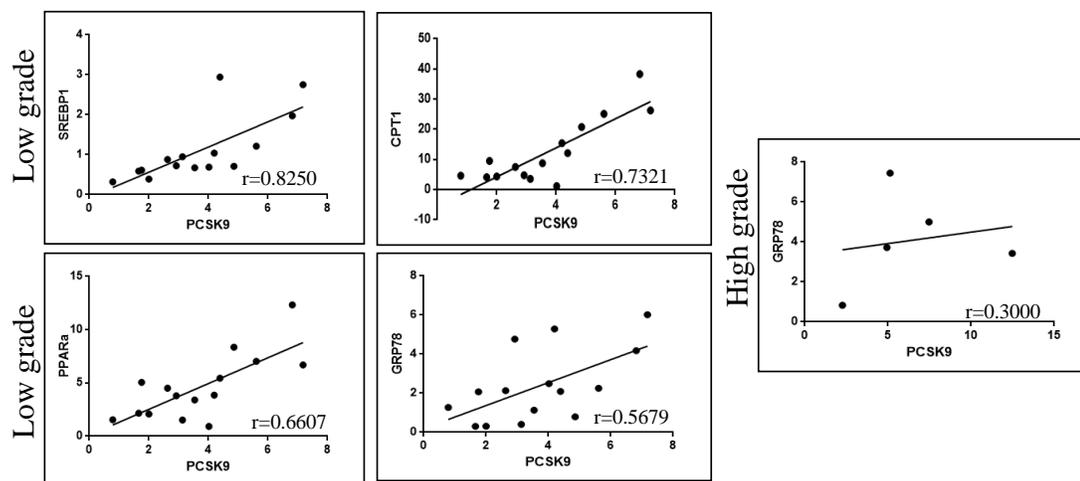
	<i>Low grade (n=5)</i>		<i>High grade (n=15)</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>PCSK9 vs FASN</i>	0.2000	ns	0.2821	ns
<i>PCSK9 vs SREBP1</i>	0.6000	ns	0.8679	< 0.0002
<i>PCSK9 vs CPT1</i>	0.9000	ns	0.7286	0.0029
<i>PCSK9 vs PPARα</i>	1.0000	0.0167	0.6821	0.0064
<i>PCSK9 vs CHOP</i>	0.7000	ns	0.3670	ns
<i>PCSK9 vs GRP78</i>	0.9000	ns	0.6536	0.0099



CHOP: C/EBP Homologous Protein; **CPT1:** Carnitina Palmitoil Transferasi 1; **FASN:** Fatty Acid Synthase; **GRP78:** Glucose-regulated protein 78; **PCSK9:** Proteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9; **PPAR- α :** Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa; **SREBP-1c:** Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c.

Tabella 11: Correlazioni tra l'espressione di mRNA di PCSK9 e geni del metabolismo lipidico e dello stress del reticolo endoplasmatico nei 20 pazienti divisi in base al punteggio di infiammazione: basso grado 0-1 (n=15) e alto grado 2-3 (n=5)

	<i>Low grade (n=15)</i>		<i>High grade (n=5)</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>PCSK9 vs FASN</i>	0.2214	ns	0.4000	ns
<i>PCSK9 vs SREBP1</i>	0.8250	0.0030	0.0000	ns
<i>PCSK9 vs CPT1</i>	0.7321	0.0027	0.1000	ns
<i>PCSK9 vs PPARα</i>	0.6607	0.0089	0.7000	ns
<i>PCSK9 vs CHOP</i>	0.3363	ns	0.5000	ns
<i>PCSK9 vs GRP78</i>	0.5679	0.0297	0.3000	0.0099



CHOP: C/EBP Homologous Protein; **CPT1:** Carnitina Palmitoil Transferasi 1; **FASN:** Fatty Acid Synthase; **GRP78:** Glucose-regulated protein 78; **PCSK9:** Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9; **PPAR-α:** Peroxisome Proliferator Activated Receptor alfa; **SREBP-1c:** Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c.

Sono in corso le analisi di Western blot sulle proteine codificate dai geni presi in esame. Sembrerebbe che l'espressione della proteina PCSK9 sia ridotta nel fegato dei soggetti obesi rispetto al fegato sano. In corso sono anche le analisi immunohistochimiche di localizzazione della PCSK9 a livello epatico ed i dosaggi di PCSK9 circolante tramite Enzyme Linked Immunosorbent Ssay (ELISA).

4.3.3 DISCUSSIONE

La Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) rappresenta una vasta gamma di malattie croniche del fegato, con un picco di incidenza tra i 30 e i 60 anni, che vanno dalla semplice steatosi alla steatoepatite (NASH), che può evolvere in cirrosi e quindi nel cancro del fegato. La NAFLD è frequentemente associato all'obesità (60-90%), alla dislipidemia (27-92%), al diabete (28-55%) e all'ipertensione arteriosa (22%), tanto che è stata considerata una manifestazione epatica della sindrome metabolica.²⁴² L'insulino-resistenza è alla base dello sviluppo di NAFLD, a sua volta l'accumulo di lipidi a livello epatico favorisce insulino-resistenza, creando un vero e proprio circolo vizioso. L'aumento dei livelli lipidici all'interno degli epatociti nei pazienti con NAFLD risulta da uno squilibrio tra l'*uptake* degli acidi grassi, la *de novo* sintesi dei trigliceridi ed il loro *release* tramite le *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL),⁵² e dalla relativa riduzione della beta-ossidazione mitocondriale.^{243,244}

La simultanea presenza di NAFLD/NASH aumenta il rischio di mortalità per malattie epatiche e per malattie cardiovascolari sia perchè fattore indipendente di rischio ma anche perchè molto spesso associato alla presenza di altri fattori metabolici.²⁴⁵

Secondo le evidenze disponibili, la NAFLD dovrebbe essere presa in considerazione perchè la sua identificazione consente una migliore stratificazione del rischio cardiometabolico sia nella prevenzione primaria che secondaria. In prevenzione primaria, la NAFLD deve essere ricercata per un'ottimale e completa stima del rischio cardiovascolare (anche se ancora i dati sono scarsi e il rapporto costo-efficacia resta da definire), essenzialmente perchè può essere considerata un "fattore modificabile". In prevenzione secondaria, invece, si deve ricercare la NAFLD non per stimare il rischio cardiovascolare, ma per un'ottimale personalizzazione della strategia terapeutica, che tenga conto anche di questa patologia, potenzialmente reversibile.

Alla luce del concetto di prevenzione è opportuno trovare degli strumenti validi e innovativi di management di questa condizione epatica e del corollario di patologie ad essa associata. La scoperta di un aumento anche minimo del contenuto di grassi

dovrebbe suggerire di valutare la coesistenza di fattori di rischio e di adattare il regime terapeutico appropriato al fine di arginare i possibili danni.

La Proteina Convertase Subtilisin / Kexin tipo 9 (PCSK9), espressa e secreta principalmente dagli epatociti,²⁴⁶ svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della concentrazione delle lipoproteine a bassa densità circolanti (LDL) migliorando l'internalizzazione e la degradazione lisosomiale del recettore LDL epatico (LDLR). Il rilascio di PCSK9 è controllato da segnali ormonali, insulina e digiuno.²⁴⁷ Pertanto, i suoi livelli sono correlati all'insulino-resistenza, al grasso epatico e ai trigliceridi VLDL.²⁴⁸ Grande attenzione è rivolta allo studio molecolare del PCSK9 ma il suo ruolo in pazienti obesi con NAFLD non è chiaro e per certi versi controverso. Ruscica et al. hanno dimostrato che nei pazienti obesi con NAFLD i livelli di espressione di PCSK9 epatico sono in correlazione con l'espressione epatica di geni coinvolti nella de novo lipogenesi, come SREBP1 e FASN ($p=0.047$ e $p=0.001$ rispettivamente).²⁰⁷ Nel nostro studio, su una coorte di 20 pazienti obesi ($BMI=45\pm 9$ kg/m²) con NAFLD, abbiamo confermato la correlazione tra PCSK9 e SREBP1 ($p=0.0001$) ma siamo andati oltre analizzando un numero maggiore di geni e trovando delle correlazioni positive tra PCSK9 e il gene che codifica per la proteina chaperone importante per il controllo della qualità delle proteine del reticolo endoplasmatico GRP78 ($p=0.0160$) ma anche con geni coinvolti nella beta ossidazione lipidica quali CPT1 ($p=0.0006$) e PPAR α ($p=0.0021$). Le correlazioni tra i geni dello stress del reticolo quelli della lipidogenesi e della beta ossidazione continuano ad essere altamente significative se aumenta la gravità della steatosi (GRP78 $p=0.0099$, SREBP1 $p<0.002$, CPT1 $p=0.0029$ e PPAR α $p=0.0064$). I livelli di mRNA di PCSK9 epatico hanno mostrato un andamento positivo non solo con l'aumentare della gravità della steatosi ma sono stati significativamente associati anche con grado di infiammazione in particolare con il basso grado (GRP78 $p=0.0297$, SREBP1 $p=0.0030$, CPT1 $p=0.0027$ e PPAR α $p=0.0089$).

I nostri dati suggeriscono che PCSK9 è direttamente collegato al contenuto di trigliceridi epatocellulari e alla stimolazione della lipogenesi epatica e che l'espressione epatica di PCSK9 può essere coinvolta non solo nel controllo della sintesi ma anche nella degradazione degli acidi grassi nei pazienti obesi con NAFLD.

Tuttavia, a causa del numero limitato di pazienti studiati, sono necessarie ulteriori indagini per comprendere meglio il ruolo/i preciso/i di PCSK9 nella regolazione del metabolismo lipidico epatico e l'impatto che può avere sul rischio cardiometabolico di questi pazienti.

In corso sono le analisi immunostochimiche di localizzazione della PCSK9 a livello epatico ed i dosaggi di PCSK9 circolante che il gruppo di Ruscica et al.²⁰⁷ ha visto aumentare con l'accumulo di grasso epatico e correlare con la gravità della steatosi, indipendentemente dai fattori confondenti metabolici e dal danno epatico, compresa la gravità della necroinfiammazione e della fibrosi, ipotizzando che la sintesi ed il rilascio della PCSK9 possano essere coinvolti nella patogenesi della NAFLD con potenziali implicazioni terapeutiche. Questo dato è smentito da un lavoro pubblicato di recente da Wargny et al. che non trova nessuna correlazione con la steatosi o i parametri di NASH (NASH activity score (p=0.082), infiammazione lobulare (p=0.22) o quella portale (p=0.27), ballooning (p=0.70) e fibrosi (p=0.12).²⁴⁹

Sono necessari ulteriori studi per trarre una conclusione univoca. I nostri dati sui modelli in vitro (dati non pubblicati, **Figura 28**) dimostrano che negli epatociti gli

HepG2 in DMEM high glucose 0% FCS 24 h
qPCR

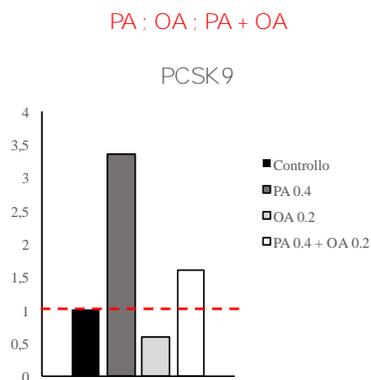


Figura 28: Effetto di Acido Palmitico (Palmitic Acid, PA) e Acido Oleico (Oleic Acid, OA) sulla espressione di PCSK9,

acidi grassi (*Acido Palmitico*, PA e *Acido Oleico*, OA) regolano l'espressione dell'mRNA di PCSK9, lasciando quindi ipotizzare un possibile ruolo nella steatogenesi.

5. CONCLUSIONI

Alla luce delle evidenze presentate in questa tesi, si evince che ci sono ampi margini per proteggere i pazienti ad elevato rischio cardiometabolico. È di grande importanza definire quali di queste strategie diagnostiche e terapeutiche siano adeguate per la prevenzione in questi pazienti. Oggi la comunità scientifica sta emanando numerose linee guida che mettono come caposaldo le modifiche dello stile di vita in prevenzione primaria, ed in alternativa, qualora ci trovassimo in prevenzione secondaria, l'utilizzo di farmaci innovativi che al momento sono utilizzati solo come ipoglicemizzanti ma che in realtà per i loro effetti pleiotropici vengono utilizzati per la cura della MetS. Le incretine (giornaliere o settimanali) hanno rivoluzionato l'armamentario farmacologico dei pazienti diabetici testimoniando la superiorità e/o la non inferiorità nella riduzione del rischio cardio-metabolico e sono entrate piano piano nella pratica clinica quotidiana migliorando i vari fattori di rischio insiti in questi pazienti. Per i soggetti ad elevato BMI, la chirurgia bariatrica, qualora il trattamento nutrizionale e l'utilizzo di terapie farmacologiche ad essa deputate (incretine, inibitori centrali del senso di sazietà, anticolinergici, etc.) non avesse raggiunto il goal terapeutico, sembrerebbe il trattamento di elezione in questi pazienti per la perdita di peso associata alla riduzione della componente infiammatoria e metabolica.

Per quanto riguarda le strategie diagnostiche, le indagini di secondo e terzo livello (ecocolorDoppler dei tronchi arteriosi sovraortici, disfunzione endoteliale mediante flow mediate dilation, ecografia addominale) sono spesso affiancate ad indagini mirate alla componente più intrinseca del rischio cardiovascolare (sdLDL-C); ma ancora ci sono dei limiti: il sistema Lipoprint non rientra nelle indagini diagnostiche validate per la diagnosi del rischio metabolico nella pratica clinica quotidiana ma è spesso citato nelle varie consensus come una delle metodiche laboratoristiche fondamentali e necessarie per la valutazione del rischio cardio-metabolico; di contro a livello tissutale è importante la valutazione diretta di enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico (PCSK9) e come questi possano variare in correlazione ad altri fattori metabolici in soggetti già epaticamente compromessi ma i dati non sono univoci. Pertanto è utile gestire il paziente in maniera sartoriale e ridurre il più

possibile gli eventi vascolari maggiori a cui molti di questi pazienti sono predisposti. La ricerca scientifica sta facendo passi da gigante ma ancora tanta strada deve essere fatta per eliminare il rischio cardiometabolico compreso quello residuo; speriamo che in un futuro prossimo vengano validate metodiche laboratoristiche ancora in corso di validazione e che possano essere sempre più risolutive nella pratica clinica.

6. ABBREVIAZIONI

ADA	American Diabetes Association
ADOPT	A Diabetes Outcome Progression Trial
AIFA	Agenzia Italiana del Farmaco
ALT	Alanino Amino Transferasi
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
APO	Apolipoproteina
AST	Aspartato Amino Transferasi
ATP	Adenosina Trifosfato
BAT	Brown Adipose Tissue, Tessuto Adiposo Bruno
BID	Bis In Die
BMI	Body Mass Index
BNP	Brain Natriuretic Peptide, peptide natriuretico cerebrale
CHD	Coronary Heart Disease, malattia coronarica
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CHS	Cardiovascular Health Study
CI	Confidence Interval
cIMT	carotid Intima Media Thickness, ispessimento medio intimale carotideo
CPT1	Carnitina Palmitoil Transferasi 1
CT	Total Cholesterol, Colesterolo Totale
CV	Cardiovascolare
CVD	Cardiovascular Disease, malattie cardiovascolari
DAG	Dicilgliceroli
DBP	Pressione Diastolica
DM	Diabete Mellito
DMG	Diabete Mellito Gestazionale
DMT1	Diabete Mellito di Tipo 1
DMT2	Diabete Mellito di Tipo 2
DNA	Acido DeossiriboNucleico
DNL	De Novo Lipogenesi

DPP-4	Dipeptidil-Peptidasi IV
DURATION-6	Exenatide once weekly versus liraglutide once daily in patients with type 2 diabetes
EASD	European Association for the Study of Diabetes
EDTA	Acido Etilendiamminotetraacetico
EGF	Epidermal Growth Factor, fattore di crescita epidermico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Sssay
ELIXA	Evaluation of Lixisenatide in Acute Coronary Syndrome study
ESC	European Society of Cardiology
ESH	European Society of Hypertension
ET-1	Endotelina-1
EUREXA	Europe Exenatide Study
EXSCEL	Exenatide Study of Cardiovascular Event Lowering
FASN	Fatty Acid Synthase
FDA	Food and Drug Administration
FFA	Free Fatty Acid, Acidi Grassi Liberi
FLI	Fatty Liver Index
FMD	Flow-Mediated Dilation, disfunzione endoteliale
GGT	Gamma Glutamil Trasferasi
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GLUT4	GLUcose Transporter type 4
GOF	Gain of Function
GRP78	Glucose-regulated protein 78
HARMONY	Albiglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease
HbA1c	Glycated Hemoglobin, Emoglobina Glicata
HBV	Virus dell'Epatite B
HCV	Virus dell'Epatite C
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine ad alta densità
HIV	Virus dell'Immunodeficienza Umana
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMG-CoA	HydroxyMethylGlutaryl-Coenzyme A, idrossimetilglutaril-CoA
HNF-1 α	Hepatocyte Nuclear Factor-1 alfa
HO-1	Eme Ossigenasi-1
HOMA-IR	Homeostasis Model Assesment for Insulin Resistance
HR	Hazard Ratio
hsPCR	high sensitivity C-Reactive Protein, la proteina C reattiva ad alta sensibilità

I-CAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule, molecole di adesione cellulare intercellulare
IDF	International Diabetes Foundation, Fondazione Internazionale del Diabete
IDL	Intermediate Density Lipoprotein, lipoproteine a densità intermedia
IGT	Impaired Glucose Tolerance
IR	Insulino Resistenza
IL-1	InterLeuchine 1
IL-6	InterLeuchine 6
ITT	Intent-To-Treats
LADA	Diabete Autoimmune Latente dell'Adulto, Latent Autoimmune Diabetes in Adults
LAR	Long Acting Release
lbLDL	Large buoyant LDL, LDL larghe e leggere
LDL-C	Low Density Lipoprotein Cholesterol, colesterolo delle lipoproteine a bassa densità
LEAD-6	Liraglutide Effect and Action in Diabetes
LEADER	Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results
LEAN	Liraglutide Safety and Efficacy in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis
LOF	Loss of Function
MACE	Major Adverse Cardiac Event
MetS	Metabolic Syndrome, Sindrome Metabolica
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young, Diabete di Tipo Adulto a Esordio Giovanile
MRI	Imaging a Risonanza Magnetica
mRNA	messenger RiboNucleic Acid, acido ribonucleico messaggero
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NADPH	Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease, Steatosi Epatica non Alcolica
NAS	NAFLD Activity Score
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NCEPATPIII	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NF- κ β	Nuclear factor κ chain transcription in β cells
NL	Normal Liver
NO	Ossido Nitrico
OA	Oleic Acid, Acido Oleico
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
PA	Palmitic Acid, Acido Palmitico
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cell, Cellule Mononucleate del Sangue Periferico
PCR	Proteina C-Reattiva
PCSK9	Proproteina Convertasi Subtilisna/Kexina di tipo 9
PGC-1	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
PI3-K	Fosfatidilinositolo-3-Chinasi
PKC ϵ	Proteina Chinasi C ϵ
PPAR- α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alfa
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
RE	Reticolo Endoplasmatico
RNA	Acido RiboNucleico
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno
SAAT	Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue, Tessuto Adiposo Addominale Sottocutaneo
SBP	Pressione Sistolica
sdLDL	small dense LDL, LDL piccole e dense
SE	Standard Error
SRE	Sterol Regulatory Element
SREBPs	SRE – Binding Proteins
SUSTAIN-6	Long-term Outcomes with Semaglutide in Subjects with Type 2 Diabetes Study
TC	Tomografia Computerizzata
TG	Tryglicerides, Trigliceridi
TIA	Transient Ischemic Attack
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNF- β	Tissue Necrosis Factor- β
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VAT	Visceral adipose tissue, Tessuto Adiposo Viscerale in Eccesso
VCAM	Vascular Cell Adhesion Protein, molecola di adesione cellulare vascolare
VLDL	Very Low Density Lipoprotein, lipoproteine a bassissima densità
WAT	White Adipose Tissue, Tessuto Adiposo Bianco
WC	Waist Circumference, Circonferenza Vita
WHR	Waist to Hip Ratio, Rapporto Vita-Fianchi

7. BIBLIOGRAFIA

1. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol.* 2005;4:198-203.
2. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486-2497.
3. Mikhailidis DP, Elisaf M, Rizzo M, et al. "European panel on low density lipoprotein (LDL) subclasses": a statement on the pathophysiology, atherogenicity and clinical significance of LDL subclasses: executive summary. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011;9:531-532.
4. Mikhailidis DP, Elisaf M, Rizzo M, et al. "European panel on low density lipoprotein (LDL) subclasses": a statement on the pathophysiology, atherogenicity and clinical significance of LDL subclasses. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011;9:533-571.
5. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, et al. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.* 2011;9:48.
6. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, et al. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14:741-751.
7. Mansego ML, Redon J, Martinez-Hervas S, et al. Different impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2011;12:6146-6163.
8. Stern MP, Williams K, González-Villalpando C, et al. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care.* 2004;27:2676-2681.
9. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014; 2014:943162.
10. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al.; INTERHEART Study Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet.* 2005;366:1640-1649.
11. "WHO progress report on the implementation of the European Charter on Counteracting Obesity" Brussels, Belgium 2010 Dec - www.euro.who.int.

12. No authors listed. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:1-253.
13. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al.; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 91 million participants. Lancet. 2011;377:557-567.
14. Friedman JM. Obesity in the new millennium. Nature. 2000;404:632-634.
15. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32:2052-2059.
16. Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. Endocrinology. 2003;144:2195-2200.
17. Kralisch S, Klein J, Lossner U, et al. Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. J Endocrinol. 2005;185:R1-8.
18. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006;444:860-7.
19. Batra A, Siegmund B. The role of visceral fat. Dig Dis. 2012;30:70-74.
20. Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. J Endocrinol Invest. 2002;25:823-835.
21. Symonds ME. Brown adipose tissue growth and development. Scientifica. 2013;2013:305763.
22. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011;301:E567-584.
23. Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, et al. Adiponectin receptor signalling in the brain. Br J Pharmacol. 2012;165:313-327.
24. Kishida K, Kim KK, Funahashi T, et al. Relationships between circulating adiponectin levels and fat distribution in obese subjects. J Atheroscler Thromb. 2011;18:592-595.
25. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:2563-2568.
26. No authors listed. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Am J Clin Nutr. 1992;55:S615-619.

27. Wing RR, Koeske R, Epstein LH, et al. Long-term effects of modest weight loss in type II diabetic patients. *Arch Intern Med.* 1987;147:1749-1753.
28. Dattilo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 1992;56:320-328.
29. Björntorp P, Rosmond R. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:S80-85.
30. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2006. *Diabetes Care.* 2006;29:S4-42.
31. Szabo M, Máté B, Csép K, et al. Genetic Approaches to the Study of Gene Variants and Their Impact on the Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Biochem Genet.* 2018;56:22-55.
32. Dodds S. The How-To for Type 2: An Overview of Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Nurs Clin North Am.* 2017;52:513-522.
33. Caspard H, Jabbour S, Hammar N, et al. Recent Trends in the Prevalence of Type 2 Diabetes and the Association With Abdominal Obesity Lead to Growing Health Disparities in the United States. *Diabetes Obes Metab.* 2018;20:667-671.
34. Roden M. Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes. *Int J Obes.* 2005;29:S111-115.
35. Liu C, Lin JD. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2011;43:248-257.
36. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40-50.
37. Barrett EJ, Liu Z, Khamaisi M, et al. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:4343-4410.
38. Reaven, G. M. HOMA-beta in the UKPDS and ADOPT. Is the natural history of type 2 diabetes characterised by a progressive and inexorable loss of insulin secretory function? Maybe? Maybe not? *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease.* 2009;6:133-138.
39. Pfeffer MA, Claggett B, Diaz R, et al.; ELIXA Investigators. Lixisenatide in patients with type 2 diabetes and acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2015;373:2247-2257.

40. Holman RR, Bethel MA, Mentz RJ, et al.; EXSCEL Study Group. Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017;377:1228-1239.
41. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al.; LEADER Trial Investigators. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375:311-322.
42. Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al.; SUSTAIN-6 Investigators. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375:1834-1844.
43. Rugarli C. *Medicina interna sistematica 6°Ed*. Masson. 2014;68:1561-1576.
44. “Epicentro: il portale dell’Epidemiologia per la Sanità Pubblica”. <http://www.epicentro.iss.it/problemi/colesterolo/epid.asp>.
45. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM*. 2006;99:1-14.
46. Berneis K, Rizzo M. LDL size: does it matter? *Swiss Med Weekly*. 2004;134:720-724.
47. Austin MA. Genetic epidemiology of low-density lipoprotein subclass phenotypes. *Ann Med*. 1992;24:477-481.
48. National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of High Blood Cholesterol in Adult (Adult Treatment Panel II). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143-3421.
49. De Graaf J, Swinkels DW, Demacker PN, et al. Differences in the low density lipoprotein subfraction profile between oral contraceptive users and controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:197-202.
50. Bjornheden T, Babyi A, Bondjers G, et al. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis*. 1996;123:43-56.
51. Carlsson R, Lindberg G, Westin L, et al. Serum lipids four weeks after acute myocardial infarction are a valid basis for lipid lowering intervention in patients receiving thrombolysis. *Br Heart J*. 1995;74:18-20.

52. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013;5:1544-1560.
53. Fracanzani AL, Petta S, Lombardi R, et al. Liver and Cardiovascular Damage in Patients With Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease, and Association With Visceral Obesity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15:1604-1611.
54. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61:1547-1554.
55. Bedossa P. Histological Assessment of NAFLD. *Dig Dis Sci*. 2016;61:1348-1355.
56. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol*. 2013;59:550-556.
57. Asrih M, Jornayvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol*. 2015;418:55-65.
58. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004;279:32345-32353.
59. Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996;97:2859-2865.
60. Shubham K, Vinay L, Vinod PK. Systems-level organization of non-alcoholic fatty liver disease progression network. *Mol Biosyst*. 2017;13:1898-1911.
61. Jung U, Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15:6184-6223.
62. Petta S, Wong VW, Cammà C, et al. Serial combination of non-invasive tools improves the diagnostic accuracy of severe liver fibrosis in patients with NAFLD. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46:617-627.
63. Minutolo A, Conti B, Grelli S, et al. Lymphocytes as liver damage mirror of HCV related adipogenesis deregulation. *PLoS One*. 2014;9:e92343.
64. Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol*. 1902;28:325-353.

65. La Barre J, Still EU. Studies on the physiology of secretin. *Am J Physiol.* 1930;91:649-653.
66. La Barre J. Sur les possibilites d'un traitement du diabète par l'incrétine. *Bull Acad R Med Belg.* 1932;12:620–634.
67. Loew ER, Gray JS, Ivy AC, et al. Is a duodenal hormone involved in carbohydrate metabolism? *Am J Physiol.* 1940;270:659-663.
68. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63:492-498.
69. Whitaker GM1, Lynn FC, McIntosh CH, et al. Regulation of GIP and GLP1 receptor cell surface expression by N-glycosylation and receptor heteromerization. *PLoS One.* 2012;7:e32675.
70. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 2006;368:1696-1705.
71. Pfeifer MA, Halter JB, Porte D Jr. Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am J Med.* 1981;70:579-588.
72. Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, et al. Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1984;74:1318-1328.
73. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:E671-678.
74. Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia.* 1985;28:574-578.
75. Lefebvre PJ, Luyckx AS. Glucagon and diabetes: a reappraisal. *Diabetologia.* 1979;16:347-354.
76. Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet.* 1975;1:14-16.
77. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, et al. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2001;50:609-613.
78. Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, et al. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia.* 2002;45:1111-1119.

79. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3717-3721.
80. Grieve DJ, Cassidy RS, Green BD, et al. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control?. *Br J Pharmacol.* 2009;157:1340-1351.
81. Rizzo M, Rizvi AA, Spinass GA, et al. Glucose lowering and anti-atherogenic effects of incretin-based therapies: GLP-1 analogues and DPP-4-inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18:1495-1503.
82. Rizzo M, Nikolic D, Banach M, et al. The effects of liraglutide on glucose, inflammatory markers and lipoprotein metabolism: current knowledge and future perspectives. *Clin Lipidol.* 2013;8:173–181.
83. Tate M, Chong A, Robinson E, et al. Selective targeting of glucagon-like peptide-1 signalling as a novel therapeutic approach for cardiovascular disease in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2015;172:721-736.
84. Cernea S, Raz I. Therapy in the early stage: incretins. *Diabetes Care.* 2011;34:S264-271.
85. Robinson E, Tate M, Lockhart S, et al. Metabolically-inactive glucagon-like peptide-1(9-36)amide confers selective protective actions against post-myocardial infarction remodelling. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:65.
86. Rizzo M, Nikolic D, Banach M, et al. Incretin-based therapies, glucometabolic health and endovascular inflammation. *Curr Pharm Des.* 2014;20:4953-4960.
87. Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, et al. A study of two glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: liraglutide once daily compared with exenatide twice daily in a randomised, 26-week, openlabeltrial (LEAD-6). *Lancet.* 2009;374:39-47.
88. Buse JB, Nauck M, Forst T, et al. Exenatide once weekly versus liraglutide once daily in patients with type 2 diabetes (DURATION-6): a randomised, open-label study. *Lancet.* 2013;381:117-124.
89. Aulinger BA, Vahl TP, Prigeon RL, et al. The incretin effect in obese adolescents with and without type 2 diabetes: impaired or intact?. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016; 310: E774–781.
90. US Food and Drug Administration. Guidance for industry: diabetes mellitus: evaluating cardiovascular risk in new antidiabetic therapies to treat type 2 diabetes. US Department of Health and Human Services, FDA and Center for

91. Hernandez AF, Green JB, Janmohamed S, et al. Albiglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease (Harmony Outcomes): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2018;pii: S0140-6736(18)32261-X. [Epub ahead of print]
92. DeYoung MB, MacConell L, Sarin V, et al. Encapsulation of exenatide in poly-(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres produced an investigational long-acting once-weekly formulation for type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2011;13:1145–1154.
93. Fineman M, Flanagan S, Taylor K et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of exenatide extended-release after single and multiple dosing. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50:65–74.
94. Kayaniyil S, Lozano-Ortega G, Bennett HA, et al. A Network Meta-analysis Comparing Exenatide Once Weekly with Other GLP-1 Receptor Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Ther*. 2016;7:27-43.
95. Drucker DJ, Buse JB, Taylor K, et al. DURATION-1 Study Group. Exenatide once weekly versus twice daily for the treatment of type 2 diabetes: a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet*. 2008; 372:1240–1250.
96. Blevins T, Pullman J, Malloy J, et al. DURATION-5: exenatide once weekly resulted in greater improvements in glycemic control compared with exenatide twice daily in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1301–1310.
97. Bergenstal RM, Wysham C, Macconell L, et al. DURATION-2 Study Group. Efficacy and safety of exenatide once weekly versus sitagliptin or pioglitazone as an adjunct to metformin for treatment of type 2 diabetes (DURATION-2): a randomised trial. *Lancet*. 2010;376:431–439.
98. Diamant M, Van Gaal L, Guerci B, et al. Exenatide once weekly versus insulin glargine for type 2 diabetes (DURATION-3): 3-year results of an open-label randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2:464–473.
99. Taylor K, Gurney K, Han J, et al. Exenatide once weekly treatment maintained improvements in glycemic control and weight loss over 2 years. *BMC Endocr Disord*. 2011;11:9.
100. Diamant M, Van Gaal L, Stranks S, et al. Safety and efficacy of once-weekly exenatide compared with insulin glargine titrated to target in patients with type 2 diabetes over 84 weeks. *Diabetes Care*. 2012;35:683-9.

101. Amori RE, Lau J, Pittas AG. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes. Systematic review and metaanalysis. *JAMA*. 2007;298:194-206.
102. Mannucci E, Rotella CM. Future perspectives on glucagon-like peptide-1, diabetes and cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18:639-645.
103. Katout M, Zhu H, Rutsky J, et al. Effect of GLP-1 mimetics on blood pressure and relationship to weight loss and glycemia lowering: results of a systematic meta-analysis and meta-regression. *Am J Hypertens*. 2014;27:130-139.
104. Yoo BK, Triller DM, Yoo DJ. Exenatide: a new option for the treatment of type 2 diabetes. *Ann Pharmacother*. 2006;40:1777-1784.
105. Klonoff DC, Buse JB, Nielsen LL, et al. Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr Med Res Opin*. 2008;24:275-286.
106. Chiquette E, Toth PP, Ramirez G, et al. Treatment with exenatide once weekly or twice daily for 30 weeks is associated with changes in several cardiovascular risk markers. *Vasc Health Risk Manag*. 2012;8:621-629.
107. Bergenstal RM, Li Y, Porter TK, et al. Exenatide once weekly improved glycaemic control, cardiometabolic risk factors and a composite index of an HbA1c 7%, without weight gain or hypoglycaemia, over 52 weeks. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15:264-271.
108. Robinson LE, Holt TA, Rees K, et al. Effects of exenatide and liraglutide on heart rate, blood pressure and body weight: systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15:264-271.
109. Gallwitz B, Guzman J, Dotta F et al. Exenatide twice daily versus glimepiride for prevention of glycaemic deterioration in patients with type 2 diabetes with metformin failure (EUREXA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;379:2270-2278.
110. Zhou Y, He X, Chen Y, et al. Exendin-4 attenuates cardiac hypertrophy via AMPK/mTOR signaling pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015;468:394-399.
111. Wang Y, Parlevliet ET, Geerling JJ, et al. Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration. *Br J Pharmacol*. 2014;171:723-734.
112. Guo X, Yang Q, Dong J, et al. Tumour risk with once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes mellitus patients: a systematic review. *Clin Drug Investig*. 2016;36:433-441.

113. Chia CW, Egan JM. Incretin-based therapies in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3703-3716.
114. “Struttura della Liraglutide” <http://www.glucagon.com/liraglutide.html>.
115. Marre M, Shaw J, Brändle M, et al. Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, added to a sulphonylurea over 26 weeks produces greater improvements in glycaemic and weight control compared with adding rosiglitazone or placebo in subjects with Type 2 diabetes (LEAD-1 SU). *Diabet Med.* 2009;26:268-278.
116. Garber A, Henry R, Ratner R, et al. Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial. *Lancet.* 2009;373:473-481.
117. Nauck M, Frid A, Hermansen K, et al. Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study. *Diabetes Care.* 2009;32:84-90.
118. Zinman B, Gerich J, Buse JB, et al. Efficacy and safety of the human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in combination with metformin and thiazolidinedione in patients with type 2 diabetes (LEAD-4 Met+TZD). *Diabetes Care.* 2009;32:1224-1230.
119. Russell-Jones D, Vaag A, Schmitz O, et al. Liraglutide vs insulin glargine and placebo in combination with metformin and sulphonylurea therapy in type 2 diabetes mellitus (LEAD-5 met+SU): a randomised controlled trial. *Diabetologia.* 2009;52:2046-2055.
120. Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, et al. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet.* 2009;374:39-47.
121. Davidson JA, Brett J, Falahati A, et al. Mild renal impairment and the efficacy and safety of liraglutide. *Endocr Pract.* 2011;17:345-355.
122. Madsbad S. Liraglutide Effect and Action in Diabetes (LEADTM) trial. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2009;4:119-129.
123. Retnakaran R, Kramer CK, Choi H, et al. Liraglutide and the preservation of pancreatic β -cell function in early type 2 diabetes: the LIBRA trial. *Diabetes Care.* 2014;37:3270-3278.

124. Davies MJ, Kela R, Khunti K. Liraglutide - overview of the preclinical and clinical data and its role in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13:207-220.
125. Kim SH, Abbasi F, Lamendola C, et al. Benefits of liraglutide treatment in overweight and obese older individuals with prediabetes. *Diabetes Care.* 2013;36:3276-3282.
126. Kesavadev J, Shankar A, Krishnan G, et al. Liraglutide therapy beyond glycemic control: an observational study in Indian patients with type 2 diabetes in real world setting. *Int J Gen Med.* 2012;5:317-322.
127. Rizzo M, Rini GB, Berneis K. The clinical relevance of LDL size and subclasses modulation in patients with type-2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007;115:477-482.
128. Suzuki D, Toyoda M, Kimura M, et al. Effects of liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on body weight, body fat area and body fat-related markers in patients with type 2 diabetes mellitus. *Intern Med.* 2013;52:1029-1034.
129. Jendle J, Nauck MA, Matthews DR, et al. Weight loss with liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide-1 analogue for type 2 diabetes treatment as monotherapy or added to metformin, is primarily as a result of a reduction in fat tissue. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11:1163-1172.
130. Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Metformin and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: molecular mechanisms and clinical implications. *G Ital Cardiol.* 2015;16:225-231.
131. Kernan WN, Viscoli CM, Furie KL, et al. Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med.* 2016;374:1321-1331.
132. Marso SP, Lindsey JB, Stolker JM, et al. Cardiovascular safety of liraglutide assessed in a patient-level pooled analysis of phase 2: 3 liraglutide clinical development studies. *Diab Vasc Dis Res.* 2011;8:237-240.
133. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al.; ADVANCE Collaborative Group. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;370:829-840.
134. Courrèges JP, Vilsbøll T, Zdravkovic M, et al. Beneficial effects of once-daily liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2008;25:1129-1131.

135. Liu H, Dear AE, Knudsen LB, et al. A long-acting glucagon-like peptide-1 analogue attenuates induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules. *J Endocrinol.* 2009;201:59-66.
136. Iwasaki H, Okamoto R, Kato S, et al. High glucose induces plasminogen activator inhibitor-1 expression through Rho/Rho-kinase-mediated NF-kappaB activation in bovine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2008;196:22-28.
137. Farag YM, Gaballa MR. Diabetes: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:28-35.
138. Arroyo K, Kini SU, Harvey JE, et al. Surgical therapy for diabetes. *Mt Sinai J Med.* 2010;77:418-430.
139. Shukla AP, Ahn SM, Patel RT, et al. Surgical treatment of type 2 diabetes: the surgeon perspective. *Endocrine.* 2011;40:151-161.
140. Pories WJ, Mehaffey JH, Staton KM. The surgical treatment of type two diabetes mellitus. *Surg Clin North Am.* 2011;91:821-836.
141. Busetto L, Sbraccia P, Frittitta L, et al. The growing role of bariatric surgery in the management of type 2 diabetes: evidences and open questions. *Obes Surg.* 2011;21:1451-1457.
142. Kashyap SR, Louis ES, Kirwan JP. Weight Loss as a Cure for Type 2 Diabetes? Fact or Fantasy. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011;6:557-561.
143. Michele Liscio. Lo spessore medio-intimale come marker di rischio cardiovascolare. Qual è il suo significato clinico e come si misura. http://www.medicinretebusnago.org/index_8_75960802.pdf.
144. Società Italiana di Diagnostica Vascolare SIDV-GIUV: Procedure operative per indagini diagnostiche e vascolare 2007. http://www.sidv.net/linee_guida.html.
145. Fried LP, Borhani NO, Enright P, et al. The Cardiovascular Health Study: Design and Rationale. *Ann Epidemiol.* 1991;1:263-276.
146. Hofman A, Brusselle GGO, Darwish Murad S et al. The Rotterdam Study: 2016 objectives and design update. *Eur J Epidemiol.* 2015;30:661-708.
147. No authors listed. The ARIC Investigators. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. *Am J Epidemiol.* 1989;129:687-702.
148. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. Linee guida 2013 ESH/ESC per la diagnosi ed il trattamento dell'ipertensione arteriosa. *Supplemento ipertensione e prevenzione cardiovascolare.* 2013 | vol. 20 | n. 2-3.

149. Eikendal AL, Groenewegen KA, Anderson TJ et al. Common carotid intima-media thickness relates to cardiovascular events in adults aged <45 years. *Hypertension*. 2015;65:707-713.
150. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, et al. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007;115:459-467.
151. Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38:S3-6.
152. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE jr, et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990;323:22-27.
153. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.
154. Oliviero U, Apuzzi V, Bosso G, et al. "Non-invasive assessment of endothelial function: the Flow-mediated dilation". *Cardiologia ambulatoriale* 2007;2-3:68-75.
155. Harris RA, Nishiyama SK et al. Ultrasound assessment of Flow-mediated dilation: a tutorial". *Hypertension*, 2010 May;55(5):1075–1085.
156. Byström S, Jensen B, Jensen-Urstad M, et al. Ultrasound-Doppler technique for monitoring blood flow in the brachial artery compared with occlusion plethysmography of the forearm. *Scand J Clin Lab Invest*. 1998;58:569-576.
157. González AS, Kostine A, Gómez-Flores JR, et al. Non-invasive assessment of endothelial function. Intra and inter-observer variability. *Arch Cardiol Mex*. 2006;76:397-400.
158. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
159. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1039-1049.
160. Sharma AM. Adipose tissue: a mediator of cardiovascular risk. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:S5-7.
161. Smith JD, Borel AL, Nazare JA, et al. Visceral adipose tissue indicates the severity of cardiometabolic risk in patients with and without type 2 diabetes:

- results from the INSPIRE ME IAA study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:1517-1525.
162. Bays HE. Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:2461-2473.
163. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, et al. Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; American Society for Nutrition; American Diabetes Association. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:1197-1202.
164. Balkau B, Deanfield JE, Després JP, et al. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation.* 2007;116:1942-1951.
165. Siren R, Eriksson JG, Vanhanen H. Waist circumference a good indicator of future risk for type 2 diabetes and cardiovascular disease. *BMC Public Health.* 2012;12:631.
166. Kim SK, Park SW, Kim SH, et al. Visceral fat amount is associated with carotid atherosclerosis even in type 2 diabetic men with a normal waist circumference. *Int J Obes.* 2009;33:131-135.
167. Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, et al. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol.* 2012;85:1-10.
168. Sherlock S. Needle biopsy of the liver: a review. *J Clin Pathol.* 1962;15:291-304.
169. Lidbury JA. Getting the Most Out of Liver Biopsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2017;47:569-583.
170. Gerber PA, Nikolic D, Rizzo M. Small, dense LDL. *Curr Opin Cardiol.* 2017;32:454-459.
171. Nikolic D, Katsiki N, Montalto G, et al. Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: Clinical significance and therapeutic approaches. *Nutrients.* 2013;5:928-948.
172. Garcia-Rios A, Nikolic D, Perez-Martinez P, et al. LDL and HDL Subfractions, Dysfunctional HDL: Treatment Options. *Curr Pharm Des.* 2014;20:6249-6255.

173. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, et al. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1273042.
174. Gentile M, Panico S, Jossa F, et al. Small dense LDL particles and metabolic syndrome in a sample of middle-aged women. Findings from Progetto Atena. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2007;388:179-183.
175. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:928-933.
176. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med*. 2007;85:685-696.
177. Tibolla G, Norata GD, Catapano AL. PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition. *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi* 2014;5:47-66.
178. Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, et al. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ Res*. 2014;114:1022-1036.
179. Seidah NG. The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol Biol*. 2011;768:23-57.
180. Ni YG, Di Marco S, Condra JH, et al. A PCSK9-binding antibody that structurally mimics the EGF(A) domain of LDL-receptor reduces LDL cholesterol in vivo. *J Lipid Res*. 2011;52:78-86.
181. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:413-419.
182. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2007;282:20799-20803.
183. Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2069-2074.
184. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*. 2007;282:18602-18612.

185. Rudenko G, Henry L, Henderson K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 2002;298:2353-2358.
186. Poupon V, Girard M, Legendre-Guillemain V, et al. Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:168-173.
187. Levy E, Ben Djoudi Ouadda A, Spahis S, et al. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*. 2013;227:297-306.
188. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:785-791.
189. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Lett*. 2010;584:701-706.
190. Seidah NG, Sadr MS, Chrétien M, et al. The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *J Biol Chem*. 2013;288:21473-21481.
191. Sun X, Essalmani R, Day R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia*. 2012;14:1122-1131.
192. Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, et al. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res*. 2003;44:2109-2119.
193. Li H, Dong B, Park SW, et al. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem*. 2009;284:28885-28895.
194. Ai D, Chen C, Han S, et al. Regulation of hepatic LDL receptors by mTORC1 and PCSK9 in mice. *J Clin Invest*. 2012;122:1262-1270.
195. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1454-1459.
196. Dong B, Wu M, Li H, Kraemer FB, et al. Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to

- LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. *J Lipid Res.* 2010;51:1486-1495.
197. Langhi C, Le May C, Kourimate S, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008;582:949-955.
198. Lambert G, Ancellin N, Charlton F, et al. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin Chem.* 2008;54:1038-1045.
199. Wu M, Dong B, Cao A, et al. Delineation of molecular pathways that regulate hepatic PCSK9 and LDL receptor expression during fasting in normolipidemic hamsters. *Atherosclerosis.* 2012;224:401-410.
200. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet.* 2005;37:161-165.
201. Da Dalt L, Ruscica M, Bonacina F, et al. PCSK9 deficiency reduces insulin secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor. *Eur Heart J.* 2018. [Epub ahead of print]
202. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23:205-215.
203. Ruscica M, Ricci C, Macchi C, et al. Suppressor of Cytokine signaling-3 (SOCS-3) induces proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) expression in hepatic HepG2 cell line. *J Biol Chem.* 2016;291:3508-3519.
204. Cariou B, Langhi C, Le Bras M, et al. Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. *Nutr Metab.* 2013;10:14.
205. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, et al. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2537-2543.
206. Tavori H, Giunzioni I, Predazzi IM, et al. Human PCSK9 promotes hepatic lipogenesis and atherosclerosis development via apoE - and LDLR-mediated mechanisms. *Cardiovasc Res.* 2016;110:268-278.
207. Ruscica M, Ferri N, Macchi C, et al. Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9. *Ann Med.* 2016;48:384-391.
208. Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, et al. Ultrasonographic fatty liver indicator detects mild steatosis and correlates with metabolic/histological parameters in various liver diseases. *Metabolism.* 2017;72:57-65.

209. Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974 Apr;20(4):470-5.
210. Nagele U, Hagele EO, Sauer G, et al. Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1984 Feb;22(2):165-74.
211. Warnick GR, Nguyen T, Albers JJ. Comparison of improved precipitation methods for quantification of high density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem.* 1985;31:217-222.
212. Corrado E, Rizzo M, Tantillo R, et al. Markers of inflammation and infection influence the outcome of patients with baseline asymptomatic carotid lesions: a 5-year follow-up study. *Stroke.* 2006;37:482-486.
213. Peretz A, Leotta DF, Sullivan JH, et al. Flow mediated dilation of the brachial artery: an investigation of methods requiring further standardization. *BMC Cardiovasc Disord.* 2007;7:11.
214. Grimm M, Han J, Weaver C, et al. Efficacy, safety, and tolerability of exenatide once weekly in patients with type 2 diabetes mellitus: an integrated analysis of the DURATION trials. *Postgrad Med.* 2013;125:47-57.
215. Rizzo M, Rizvi AA, Patti AM, et al. Liraglutide improves metabolic parameters and carotid intima-media thickness in diabetic patients with the metabolic syndrome: an 18-month prospective study. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:162.
216. Henry RR, Klein EJ, Han J, et al. Efficacy and Tolerability of Exenatide Once Weekly Over 6 Years in Patients with Type 2 Diabetes: An Uncontrolled Open-Label Extension of the DURATION-1 Study. *Diabetes Technol Ther.* 2016;18:677-686.
217. Giorgino F, Natalicchio A, Leonardini A, et al. Exploiting the pleiotropic actions of GLP-1 for the management of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;78:S59-67.
218. Irace C, De Luca S, Shehaj E, et al. Exenatide improves endothelial function assessed by flow mediated dilation technique in subjects with type 2 diabetes: results from an observational research. *Diab Vasc Dis Res.* 2013;10:72-77.
219. Buldak L, Labuzek K, Buldak RJ, et al. Exenatide (a GLP-1 agonist) improves the antioxidative potential of in vitro cultured human monocytes/macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015;388:905-919.

220. Ha SJ, Kim W, Woo JS, Kim JB, Kim SJ, Kim WS, et al. Preventive effects of exenatide on endothelial dysfunction induced by ischemia-reperfusion injury via KATP channels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:474-480.
221. Scalzo RL, Moreau KL, Ozemek C, Herlache L, McMillin S, Gilligan S, et al. Exenatide improves diastolic function and attenuates arterial stiffness but does not alter exercise capacity in individuals with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2017;31:449-455.
222. Hopkins ND, Cuthbertson DJ, Kemp GJ, et al. Effects of 6 months glucagon-like peptide-1 receptor agonist treatment on endothelial function in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15:770-773.
223. Katakami N, Yamasaki Y, Hayaishi-Okano R, et al. Metformin or gliclazide, rather than glibenclamide, attenuate progression of carotid intima-media thickness in subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2004;47:1906-1913.
224. Sahin Y, Unluhizarci K, Yilmazsoy A, et al. The effects of metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.* 2007;67:904-908.
225. Shigiyama F, Kumashiro N, Miyagi M, et al. Effectiveness of dapagliflozin on vascular endothelial function and glycemic control in patients with early-stage type 2 diabetes mellitus: DEFENCE study. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16:84.
226. Lim SS, Norman RJ, Clifton PM, et al. The effect of comprehensive lifestyle intervention or metformin on obesity in young women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21:261-268.
227. Esteghamati A, Ghasemiesfe M, Mousavizadeh M, et al. Pioglitazone and metformin are equally effective in reduction of chemerin in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig.* 2014;5:327-332.
228. Fan H, Pan Q, Xu Y, et al. Exenatide improves type 2 diabetes concomitant with non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57:702-708.
229. Lipoprint System© (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA). <http://www.polymed.it/diagnosi-cardiovascolare/sistema-lipoprint>.
230. Hoogeveen RC1, Gaubatz JW, Sun W, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1069-1077.

231. Rizzo M, Chandalia M, Patti AM, et al. Liraglutide decreases carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes: 8-month prospective pilot study. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:49.
232. Yanai H, Hamasaki H, Adachi H, et al. Effects of Liraglutide, a Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog, on Glucose/Lipid Metabolism, and Adipocytokines in Patients With Type 2 Diabetes. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011;1:149-151.
233. Rizzo M, Nikolic D, Patti AM, et al. GLP-1 receptor agonists and reduction of cardiometabolic risk: Potential underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864:2814-2821.
234. Costantino S, Paneni F, Battista R, et al. Impact of Glycemic Variability on Chromatin Remodeling, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Patients With Type 2 Diabetes and With Target HbA1c Levels. *Diabetes*. 2017;66:2472-2482.
235. Chen C, Khismatullin DB. Oxidized low-density lipoprotein contributes to atherogenesis via co-activation of macrophages and mast cells. *PLoS One*. 2015;10:e0123088.
236. Engelbrechtsen L, Lundgren J, Wewer Albrechtsen NJ, et al. Treatment with liraglutide may improve markers of CVD reflected by reduced levels of apoB. *Obes Sci Pract*. 2017;3:425-433.
237. Moss JW, Ramji DP. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med Chem*. 2016;8:1317-1330.
238. Rizzo M, Abate N, Chandalia M, et al. Liraglutide reduces oxidative stress and restores heme oxygenase-1 and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes: a prospective pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:603-606.
239. Gaspari T, Welungoda I, Widdop RE, et al. The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE(-/-) mouse model. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;10:353-360.
240. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-1321.
241. Santiago-Rolón A, Purcell D1, Rosado K1, et al. A Comparison of Brunt's Criteria, the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score (NAS), and a Proposed NAS Scoring that Includes Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Staging. *P R Health Sci J*. 2015;34:189-194.

242. Adams LA, Angulo P. et al. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med.* 2005;22:1129-1133.
243. Rametta R, Mozzi E, Dongiovanni P, et al. Increased insulin receptor substrate 2 expression is associated with steatohepatitis and altered lipid metabolism in obese subjects. *Int J Obes.*2013;37:986–992.
244. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia.* 2005;48:634–642.
245. Hagström H, Nasr P, Ekstedt M, et al. Cardiovascular risk factors in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2018. [Epub ahead of print]
246. Ferri N, Corsini A, Macchi C, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and high-density lipoprotein metabolism: experimental animal models and clinical evidence. *Transl Res.* 2016;173:19-29.
247. Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11:367–83.
248. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPARc agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23:205–215.
249. Wargny M, Ducluzeau PH, Petit JM, et al. Circulating PCSK9 levels are not associated with the severity of hepatic steatosis and NASH in a high-risk population. *Atherosclerosis.* 2018;278:82-90.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo percorso vorrei ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione di questo progetto di ricerca. Questi tre anni di dottorato sono stati l'espressione di un'esperienza umana e scientifica data dall'incontro con tante persone alcune volte piacevoli e disponibili e altre volte no ma pur sempre che mi hanno aiutato a crescere in un mondo che non è sempre come stare in famiglia. Tanti Maestri ho incontrato in questo percorso; ciascuno di loro mi ha dedicato tempo prezioso, speso per la mia crescita e per discutere e trovare risposte ai miei interrogativi con l'affetto sincero di padri con i loro figli.

Ringrazio il Prof. Giuseppe Montalto per avermi trasmesso parte della sua esperienza clinica e scientifica nella gestione dei pazienti.

Ringrazio il Prof. Manfredi Rizzo, da cui ho appreso il metodo scientifico, la passione per la ricerca e la forza di combattere per raggiungere gli obiettivi.

Ringrazio il mio Tutor Prof. Maurizio Soresi per la disponibilità e per il prezioso aiuto scientifico.

Ringrazio la Dott.ssa Lydia Giannitrapani per il supporto e la presenza continua e costante.

Ringrazio affettuosamente il Dr. Melchiorre Cervello del Centro Nazionale delle Ricerche di Palermo per aver condotto gli esami molecolari previsti nel progetto di ricerca grazie al lavoro del suo gruppo ma soprattutto per la sua guida sapiente e per essersi preso cura della mia formazione professionale e di laboratorio in questi tre anni di dottorato.

Ringrazio Il Prof. Gianni Pantuso e tutto lo staff della U.O.C. di Chirurgia Oncologica del Policlinico Universitario di Palermo per la preziosa collaborazione.

Un sentito ringraziamento va a tutti i componenti dell'Ambulatorio di Diabetologia e Prevenzione Cardiovascolare (Resp. Prof. Manfredi Rizzo) del Policlinico Universitario di Palermo, di cui faccio parte e con cui ho condiviso questa crescita umana, scientifica e professionale.

Ringrazio la mia famiglia ed i miei suoceri per non avermi mai fatto mancare il proprio sostegno morale e spesso anche materiale e senza il quale nulla sarebbe stato possibile.

Un ringraziamento speciale va ad Angelo, persona unica e speciale nella mia vita e la mia piccola Caterina che è nata durante questo percorso e a cui dedico la tesi come simbolo di augurio per la prosecuzione del mio percorso formativo.

Infine desidero ringraziare tutti i pazienti ed i loro familiari per l'affetto e la fiducia incondizionata che mi hanno dimostrato durante lo svolgimento di questo progetto.