
**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA**

**DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"**

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO

**ANALISI DEI DISPOSITIVI TERAPEUTICI PER IL DIABETE:
SVILUPPI RECENTI E PROSPETTIVE FUTURE**

Elaborato in
INGEGNERIA CLINICA

Relatore

Prof. Stefano Severi

Presentata da

Marco Alessandri

Anno Accademico 2018/2019

Indice

Introduzione.....	4
Capitolo 1: Il diabete	7
1.1 Il diabete mellito.....	7
1.2 Classificazione.....	10
1.3 Sintomatologia e diagnosi	12
1.4 Trattamento integrato del diabete	13
1.5 Valutazione del controllo glicemico a lungo termine.....	15
1.6 Il trattamento intensivo del diabete	15
1.7 La prima somministrazione di insulina nell'uomo	16
Capitolo 2: Dispositivi di monitoraggio della glicemia.....	17
2.1 L'automonitoraggio della glicemia	17
2.2 Misura istantanea della glicemia capillare: il glucometro	18
2.3 Accuratezza ed affidabilità dei glucometri	19
2.4 Sistemi per il monitoraggio continuo della glicemia.....	21
2.5 Dispositivi CGM minimamente invasivi	22
2.6 Il principio della glucosio-ossidasi	24
2.7 Tipologie di dispositivi CGM.....	24
2.8 Dispositivi CGM minimamente invasivi recentemente sviluppati.....	25
2.9 Dispositivi CGM non invasivi	28
2.10 Accuratezza ed affidabilità dei dispositivi CGM	29
Capitolo 3: Dispositivi di somministrazione dell'insulina	31
3.1 L'insulina.....	31
3.2 Tipologie di insulina per la terapia del diabete.....	31
3.3 Dispositivi convenzionali di somministrazione dell'insulina.....	32
3.4 Pompe per l'infusione sottocutanea continua di insulina	33
3.5 SAP: Sensor Augmented insulin Pump therapy	35

3.6 La tecnologia SmartGuard™	36
3.7 Efficacia e validità dei dispositivi di somministrazione dell'insulina.....	38
Capitolo 4: Il Pancreas Artificiale e Bioartificiale	40
4.1 Il Pancreas artificiale	40
4.2 Fisiologia delle cellule beta	42
4.3 Il controllo in catena chiusa.....	43
4.4 Algoritmi di controllo per il Pancreas Artificiale	44
4.5 Algoritmo PID (Proportional Integral Derivative)	45
4.6 Studi sperimentali in vivo con controllore PID	46
4.7 Algoritmo di controllo MPC (Model Predictive Control).....	48
4.8 Studi sperimentali in vivo con controllore MPC	49
4.9 Il futuro del Pancreas Artificiale	52
4.10 Il Pancreas Bio-Artificiale	52
4.11 La tecnologia “Islet Sheet”	52
4.12 Il futuro del Pancreas Bioartificiale.....	55
Conclusioni	56
Bibliografia.....	58

Introduzione

Il Diabete Mellito (DM) è una malattia cronica caratterizzata dall'instabilità del livello glicemico nel sangue, a causa della quale si passa da condizioni di iperglicemia (glicemia > 180 mg/dL) a condizioni di ipoglicemia (glicemia < 70 mg/dL). Responsabile di questo fenomeno è un difetto di funzionalità o di produzione di insulina, l'ormone secreto dalle isole di Langherans del pancreas e che consente all'organismo di utilizzare il glucosio per i processi energetici all'interno delle cellule.

Il diabete è una malattia di grande rilievo sociale ed esercita un notevole impatto socio-economico sui vari sistemi sanitari nazionali sia per l'entità della sua diffusione, dato il progressivo spostamento dell'insorgenza verso età giovanili, che per la gravità delle sue complicanze. Infatti, esso costituisce la principale causa di amputazioni traumatiche, infarti, ictus, disturbi della vista e dialisi. Secondo la Banca Mondiale, per far fronte alla malattia diabetica nel mondo vengono spesi 400 miliardi di dollari l'anno. In Italia, ciascun paziente diabetico costa al Servizio Sanitario Nazionale 2,589 euro l'anno e le terapie costano al Sistema Sanitario Nazionale circa il 9% del bilancio, ovvero circa 8,26 miliardi di euro ogni anno. Attraverso un'adeguata prevenzione, che consiste in un corretto stile di vita (buona alimentazione ed attività fisica regolare) e terapie di base mirate con scrupolo, è possibile ridurre il numero di nuovi casi di diabete e scongiurare l'insorgere delle complicanze (cardiache, vascolari o a carico del rene, della vista e del sistema nervoso periferico) se il diabete è già presente. Quindi, se ne deduce che il trattamento intensivo e preventivo della malattia diabetica sin dall'esordio permette di migliorare la qualità di vita del paziente ed è anche vantaggioso in termini economici.

Per raggiungere e mantenere la glicemia all'interno dell'intervallo di normalità (euglicemia, valori di glucosio nel sangue compresi tra 80-120 mg/dL) la terapia attualmente più diffusa consiste nell'automonitoraggio glicemico (SMBG – Self Monitoring of Blood Glucose) e successiva somministrazione di insulina, accompagnata da una dieta corretta ed esercizio fisico. Gli strumenti più comuni per l'automonitoraggio glicemico sono i dispositivi cosiddetti pungi-dito, grazie ai quali il

paziente, dopo essersi punto la superficie di un dito ed aver applicato la goccia di sangue su una striscia reattiva di un glucometro, legge il livello di glicemia e regola di conseguenza il bolo di insulina da iniettare. L'iniezione di insulina può essere effettuata tramite siringhe convenzionali, penne oppure mediante microinfusori (CSII – Continuous Subcutaneous Insulin Infusion). L'automonitoraggio glicemico consente di ottenere poche misurazioni, solitamente tre o quattro, nell'arco di un'intera giornata. Perciò, questi strumenti non sono in grado di rilevare eventi ipoglicemici o iperglicemici che si possono verificare tra una misurazione e l'altra.

Per questo motivo, dagli anni 2000 sono stati sviluppati dei dispositivi (CGM – Continuous blood Glucose Monitoring) che consentono un monitoraggio quasi continuo della glicemia all'interno della giornata. Grazie a questi si ottiene una misura della glicemia ogni 1-5 minuti anche per diversi giorni consecutivi e, tramite un trasmettitore wireless, le informazioni vengono inviate al ricevitore che visualizza le letture ottenute dal sensore.

La possibilità di acquisire grandi quantità di dati tramite dispositivi CGM ha aperto le porte verso lo sviluppo del Pancreas Artificiale, un sistema a circuito chiuso costituito da un dispositivo CGM, un microinfusore CSII ed un algoritmo di controllo.

Il Pancreas Bioartificiale rappresenta invece il dispositivo più innovativo che, però, è ancora in fase di sperimentazione su animali prima di poter essere testato clinicamente sull'uomo.

Lo scopo della tesi è quello di illustrare la malattia diabetica e gli sviluppi nella sua gestione attraverso strumenti sempre più innovativi.

La tesi sarà così strutturata:

Nel Capitolo 1 verrà illustrata la malattia del diabete, le cause, i sintomi e la sua classificazione. In particolare, verrà descritta la diagnosi della malattia, il trattamento intensivo del diabete e il cosiddetto trattamento integrato, ovvero la gestione della malattia diabetica attraverso una corretta alimentazione ed attività fisica. Verrà infine presentato il primo caso di somministrazione di insulina nell'uomo.

Nel Capitolo 2 verranno descritti i dispositivi di monitoraggio della glicemia. Verrà illustrato il glucometro, dispositivo per la misura istantanea della glicemia su sangue

capillare e le tecnologie utilizzate per il monitoraggio continuo della glicemia dal liquido interstiziale (CGM). Verranno elencati e descritti alcuni dei dispositivi CGM attualmente esistenti, con i vantaggi ed i problemi legati all'utilizzo di tali dispositivi.

Nel Capitolo 3 verranno illustrati i dispositivi di somministrazione dell'insulina e la validità degli stessi. Verranno quindi descritti i convenzionali dispositivi di somministrazione dell'insulina (siringhe e penne) e le recenti pompe per l'infusione sottocutanea continua di insulina (CSII). Verrà inoltre illustrata la tecnologia SAP che incorpora un dispositivo CSII ed un dispositivo CGM.

Nel Capitolo 4 verranno illustrati il Pancreas Artificiale ed il Pancreas Bioartificiale. Verrà descritto il principio di funzionamento del Pancreas Artificiale e verranno illustrati gli algoritmi di controllo che sono alla base di tale dispositivo, con relativi esempi di studi sperimentali in vivo. Verrà poi descritto il Pancreas Bioartificiale e la recente tecnologia Islet Sheet di microincapsulazione delle isole di Langherans.

Infine, verranno espone le conclusioni dell'analisi svolta e proposte delle riflessioni sui possibili sviluppi futuri nella cura e nella gestione della malattia del diabete.

Capitolo 1: Il diabete

Il termine diabete deriva dal greco *diabētēs*, derivato di *diabainō* che significa ‘scorrere attraverso’, in riferimento alla poliuria, ovvero il sintomo che prevalentemente colpì gli antichi. Infatti, i soggetti affetti da tale patologia bevevano molta acqua e producevano molta urina. Questo era solo il quadro iniziale che, se avesse colpito un giovane, in breve tempo avrebbe portato alla morte per quello che oggi è chiamato coma chetoacidotico. Esistono due tipologie di diabete, il cui nome è stato definito in base al sapore delle urine dei pazienti: il *diabete insipido*, più raro, caratterizzato dalla produzione di urine insapori, e il *diabete mellito*, la forma più frequente e caratterizzata dalla produzione di urine dolci, data l’elevata concentrazione zuccherina più alta del normale.

1.1 Il diabete mellito

Il diabete mellito, comunemente chiamato diabete, è una patologia del sistema pancreatico endocrino. Esso è costituito da un insieme di disturbi metabolici caratterizzato da concentrazioni plasmatiche di glucosio elevate (iperglicemia) causate da un’inadeguata secrezione di insulina, da un’alterata risposta delle cellule bersaglio nei confronti dell’insulina o ad entrambe le cause.

Il glucosio rappresenta la principale fonte di energia per il nostro organismo ed il suo livello di concentrazione nel sangue è regolato dal pancreas attraverso la secrezione di insulina e di glucagone. Infatti, la funzione principale del pancreas è quella di mantenere i livelli di glucosio nel sangue (glicemia) entro un limitato range di valori (70-180 mg/dL). Se i livelli di glucosio nel sangue sono troppo alti viene rilasciata insulina dalle β -cellule delle isole di Langerhans del pancreas attraverso un sistema a retroazione negativa. Infatti, i livelli circolanti di glucosio, chetoacidi, acidi grassi liberi e potassio aumentano la produzione di insulina che a sua volta riduce i livelli di queste sostanze. Invece, se i livelli di glucosio sono troppo bassi viene rilasciato glucagone, l’ormone peptidico prodotto dalle α -cellule delle isole di Langerhans. Durante il processo di digestione, i cibi assunti durante i pasti vengono trasformati in glucosio, che

può essere utilizzato come fonte di energia nei processi metabolici. La diffusione del glucosio nelle cellule attraverso la membrana cellulare è mostrata in figura 1.1. Essa è regolata dai trasportatori per il glucosio (GLUT). Quando i recettori dell'insulina presenti sulla membrana cellulare vengono attivati, si richiamano vescicole contenenti i GLUT4 che, fondendosi con la membrana cellulare, permettono il passaggio del glucosio entrando nella cellula [1].

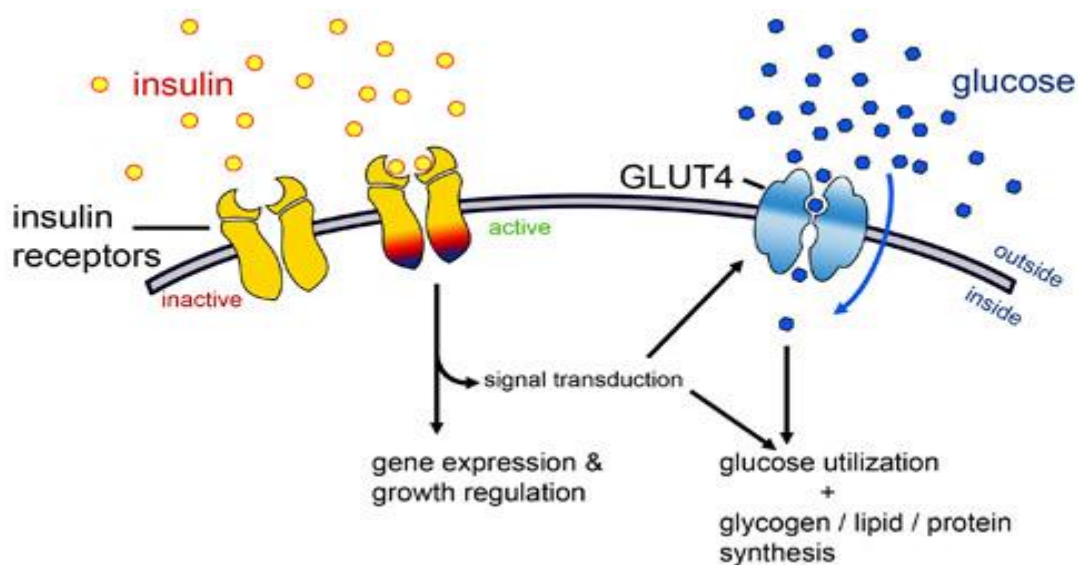


Fig. 1.1: meccanismo di diffusione del glucosio nelle cellule attraverso la membrana cellulare [2]

L'iperglicemia cronica e le anomalie metaboliche associate possono causare un danneggiamento dei vasi sanguigni, dei reni, della retina e persino del sistema nervoso.

L'International Diabetes Federation ha stabilito che la popolazione mondiale affetta da diabete supera i 400 milioni di individui (fig. 1.3). In Italia, stando alle ultime rilevazioni dell'ISTAT del 2016 (fig. 1.2), sono oltre 3 milioni 200 mila le persone affette da diabete, ovvero il 5,3 % dell'intera popolazione, di cui il 16,5 % fra le persone di 65 anni e oltre. Inoltre, la diffusione del diabete è quasi raddoppiata negli ultimi trent'anni, con un tasso di mortalità maggiore nel Mezzogiorno rispetto al Nord Italia

[3]. I fattori di rischio maggiormente rilevanti per la patologia diabetica sono la sedentarietà e l'obesità: tra i 45-64enni le persone obese che soffrono di diabete sono il 28,9% ed il 32,8% rispettivamente per gli uomini e per le donne; nella stessa classe di età il 47,5% degli uomini ed il 64,2% delle donne con diabete non praticano attività sportiva. A confermare il fatto che il diabete è una delle patologie croniche a più alta diffusione nel mondo è anche l'Organizzazione mondiale della sanità, che prevede che nel 2025 la percentuale di persone colpite possa raddoppiare.

Il diabete in Italia. Anno 2016

Istat Istituto Nazionale di Statistica

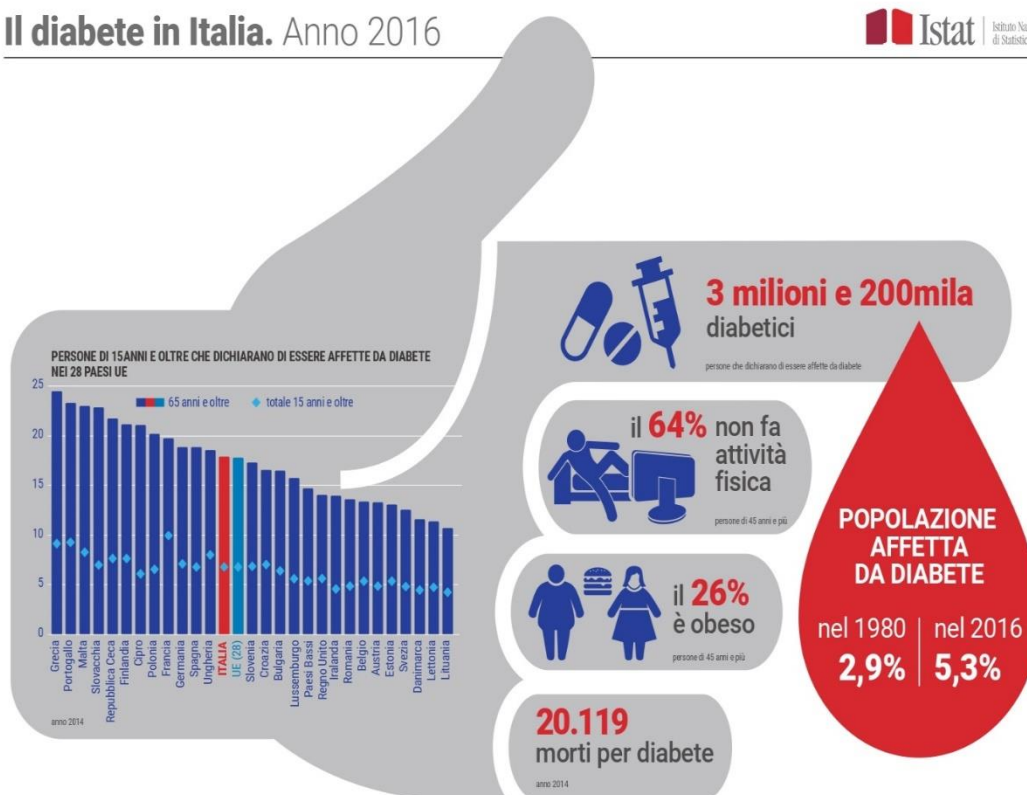


Fig. 1.2: Dati ISTAT sulla popolazione italiana affetta da diabete [3]

La tendenza di un certo paese a migliorare dal punto di vista economico porta verosimilmente a consumare i cosiddetti cibi “spazzatura”, ricchi di glucidi, grassi e vivere una vita più sedentaria: Cina ed India, in passato a bassa casistica di malattie metaboliche, oggi sono paesi ad altissimo numero di malati cronici per quanto riguarda alterazioni metaboliche prima sconosciute, come l'obesità e soprattutto il diabete. Nei

Paesi occidentali ad alto tenore di vita (es., Italia) vi è un'insorgenza più tardiva del diabete con un picco che si sposta nella penultima e terzultima decade di vita. Invece, nei paesi a tenore di vita intermedio vi è un'insorgenza più precoce, legata all'obesità. Dagli anni '80 ad oggi l'obesità degli adolescenti e l'obesità infantile è cresciuta notevolmente ed essendo un fattore di rischio importante ha causato un aumento dei casi ed un'anticipazione dell'età in cui è possibile sviluppare il diabete di tipo 2.

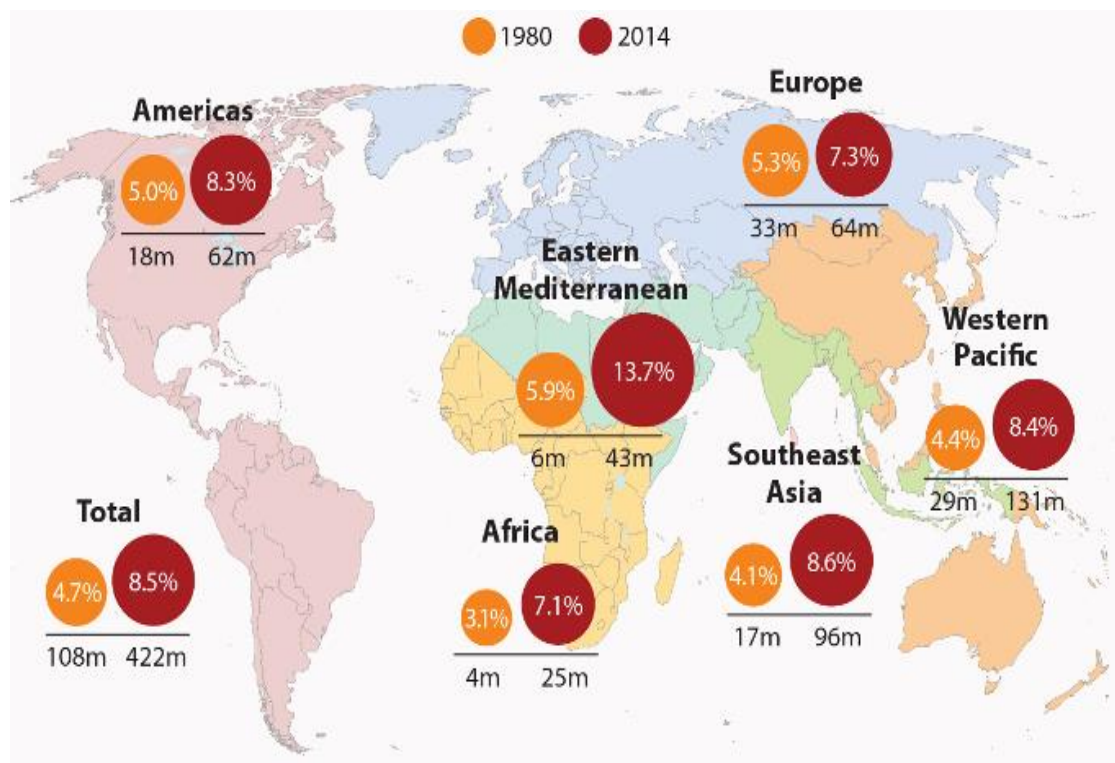


Fig. 1.3: l'epidemia diabetica nel mondo; confronto nella percentuale dei diabetici tra il 1980 ed il 2014 [4]

1.2 Classificazione

Le forme più comuni che colpiscono la maggior parte dei diabetici sono il diabete mellito tipo 1 ed il diabete mellito tipo 2. Oltre a queste esistono forme meno rare e che colpiscono una bassissima percentuale di diabetici, come il diabete che compare per la prima volta durante la gravidanza (diabete gestazionale) ed un gruppo eterogeneo che comprende le forme meno frequenti [2].

- ***Diabete mellito tipo 1 (T1DM)***

Colpisce circa il 10% dei pazienti e si sviluppa prevalentemente nell'adolescenza, con picchi evidenti tra l'età prescolare e quella della pubertà, ed è causato da una risposta autoimmune contro le cellule beta del pancreas deputate alla produzione di insulina. Pertanto, tali cellule non sono più riconosciute come proprie dall'organismo che le attacca, distruggendole, mediante globuli bianchi o anticorpi.

Tale forma presenta una variante, LADA (*Latent Autoimmune Diabetes of Adults*), che è un diabete di tipo autoimmune (come T1DM) ma che si sviluppa nell'adulto (come T2DM). La patogenesi è probabilmente una risposta autoimmune ma più lenta del T1DM, tanto da poter essere controllata a lungo senza terapia insulinica.

- ***Diabete mellito tipo 2 (T2DM)***

Risulta attualmente la forma più frequente di diabete e colpisce circa il 90% dei pazienti. Generalmente la patologia si manifesta nell'adulto e principalmente tra i soggetti obesi o sovrappeso. Tale forma è nota anche come *diabete insulino-resistente* in quanto i livelli plasmatici di insulina sono inizialmente normali o addirittura elevati, conseguentemente all'incapacità di alcuni organi di rispondere all'azione dell'insulina, che continua ad essere prodotta. Se non adeguatamente gestito attraverso una dieta bilanciata ed uno stile di vita adeguato, molti diabetici di tipo 2 possono diventare insulino-dipendenti e necessitare, quindi, di iniezioni croniche di insulina.

- ***Diabete gestazionale***

È associato al profilo ormonale tipico della gravidanza e, in quanto tale, tende a regredire dopo il parto. Tuttavia, nel 15% circa dei casi, l'iperglicemia che si verifica a seguito di tale condizione può evolvere in diabete di tipo 2. Per escludere tale possibilità, ad almeno sei settimane dal parto, occorre ripetere la curva da carico di glucosio. Il rischio di sviluppo di diabete di tipo 2 è elevato in pazienti che hanno mostrato una pregressa presenza di diabete gestazionale, motivo per il quale è importante controllare i livelli di glicemia e di emoglobina glicosilata (HbA1c) anche a distanza di anni dal parto.

○ **Diabete monogenico**

È una forma rara di diabete (1-2 % dei diabetici) ed è conseguenza di mutazioni di geni caratteristici della regolazione del metabolismo glucidico che alterano secrezione e/o azione insulinica (esempio: MODY – *Maturity Onset Diabetes of the Young*). Queste mutazioni vengono trasmesse geneticamente.

○ **Diabete secondario**

È causato da malattie che possono provocare il diabete come effetto secondario. Per esempio, malattie che interessano il pancreas (pancreatiti, traumi o asportazione chirurgica, tumori, fibrosi cistica, emocromatosi), malattie endocrine (sindrome di Cushing, acromegalia), assunzione protratta di farmaci (steroidi, farmaci per l'asma, ecc...), esposizione a sostanze chimiche.

1.3 Sintomatologia e diagnosi

I sintomi del diabete possono variare in relazione alla tipologia che si presenta. Il quadro clinico non trattato del T1DM prevede inizialmente poliuria (aumento del volume delle urine), polidipsia (aumento della sete conseguente alla disidratazione causata dalla poliuria) e polifagia (aumento della fame per incapacità delle cellule di utilizzare il glucosio ematico a scopo energetico). Successivamente, i pazienti dimagriscono: manca l'effetto anabolico dell'insulina e non potendo utilizzare il glucosio le cellule utilizzano a scopo energetico prima i lipidi e poi le proteine. I sintomi descritti possono essere meno marcati nel T2DM, che può essere diagnosticato dopo anni dalla sua insorgenza, quando le complicazioni sono presenti in forma meno evidente. Per questo un regolare controllo della glicemia, a qualsiasi età, è molto importante.

L'estrema diffusione del diabete è associata ad una facilissima diagnosi: il dosaggio della glicemia. Per valutare il diabete si effettua il controllo della glicemia a digiuno (FPG - *Fasting Plasma Glucose*):

- *glicemia* < 105 mg/dL: il soggetto è sano, non sono necessarie ulteriori indagini
- *glicemia* > 125 mg/dL: diabete conclamato, non sono necessarie ulteriori indagini
- 106 mg/dL < *glicemia* < 125 mg/dL: paziente con alterata omeostasi glucidica, va effettuato il test da carico di glucosio.

Test da carico di glucosio: Il test prevede una somministrazione di glucosio per via orale, seguito da un prelievo e da un'analisi della glicemia ogni 30 minuti fino ad ottenere la curva da carico. Questo test permette di discriminare efficacemente pazienti sani, obesi, con intolleranza al glucosio o diabetici. In alternativa alla curva da carico di glucosio si è ridotto il test della sola analisi della glicemia a 2 ore dal pasto simulato (2hrPPG - 2 hour post prandial glucose). Anche in questo caso si identificano 3 fasce di valori:

- glicemia < 140 mg/dL: soggetto sano
- glicemia > 200 mg/dL: soggetto diabetico
- 140 mg/dL < glicemia < 200 mg/dL: soggetto con intolleranza al glucosio

La condizione di intolleranza al glucosio comporta una ridotta capacità di gestire il metabolismo glucidico ed un alto rischio di diabete; è perciò importante un monitoraggio nel tempo dei livelli glicemici.

1.4 Trattamento integrato del diabete

La terapia diabetica ottimale implica, oltre alla gestione della glicemia, un trattamento integrato, ovvero l'identificazione e la gestione delle complicanze del diabete mellito e la modificazione dei fattori di rischio per le malattie ad esso associate, in modo da permettere al paziente di raggiungere uno stile di vita il più normale possibile. La cura di un individuo affetto da diabete mellito, di tipo 1 o di tipo 2, necessita di un'équipe multidisciplinare, composta dal medico di base e/o l'endocrinologo o il diabetologo, un nutrizionista ed un operatore sanitario specializzato nell'educazione del paziente sul diabete: il paziente riceve così l'istruzione necessaria sull'alimentazione, sull'attività fisica e sui farmaci che riducono la glicemia. Integrando le misurazioni glicemiche con la storia alimentare, le modificazioni terapeutiche e l'attività fisica, l'équipe multidisciplinare ed il paziente possono migliorare il programma di trattamento integrato.

○ Alimentazione

L'ADA (*American Diabetes Association*) ha stabilito la terapia medica nutrizionale (TMN) per ottenere un bilancio ottimale tra l'apporto calorico e gli altri aspetti della terapia del diabete (insulina, attività fisica, calo ponderale). Le principali misure della

TMN sono volte alla prevenzione o rallentamento dell'esordio del T2DM nei soggetti ad alto rischio, obesi o sovrappeso, attraverso la promozione della perdita di peso e la gestione delle complicanze correlate al diabete (malattia cardiovascolare, nefropatia). In generale, i componenti di una TMN ottimale sono simili per soggetti con T1DM e T2DM ed analoghi a quelli per la popolazione generale: frutta, verdure, cibi contenenti fibre e pochi grassi. Gli obiettivi della TMN nel T2DM si concentrano sulla perdita di peso e tengono conto dell'aumento della prevalenza dei fattori di rischio cardiovascolari, quali ipertensione, dislipidemia ed obesità. La maggior parte di questa popolazione è obesa ed il calo ponderale viene incoraggiato attraverso diete ipocaloriche, con assunzione ridotta di carboidrati e di grassi, l'utilizzo di dolcificanti senza valore nutritivo, un aumento del consumo di fibre alimentari solubili e, infine, un'augmentata attività fisica. L'obiettivo della TMN nell'individuo con T1DM è bilanciare e combinare l'apporto calorico con l'appropriata quantità di insulina. In base al conteggio del contenuto di carboidrati di un pasto da parte del paziente, il rapporto insulina-carboidrati determina l'effettiva dose del bolo di insulina. La TMN deve essere sufficientemente flessibile da permettere l'attività fisica ed il regime insulinico deve consentire deviazioni nell'apporto calorico [2].

- **Attività fisica**

L'esercizio fisico nei soggetti con T1DM e T2DM è utile per ridurre la glicemia, durante e dopo l'esercizio, e aumentare la sensibilità all'insulina. Per i pazienti diabetici, l'ADA raccomanda 150 min/settimana di attività fisica aerobica moderata, comprendente anche un allenamento di resistenza. Nonostante tali benefici, gli individui con T1DM sono soggetti sia all'iperglicemia, sia all'ipoglicemia durante l'esercizio fisico. Se il livello di insulina è troppo basso, l'organismo, per la produzione di energia, passa ad un metabolismo di tipo lipidico, brucia acidi grassi e trigliceridi e produce corpi chetonici che portano ad una condizione di chetoacidosi. Al contrario, se il livello circolante di insulina è eccessivo, l'organismo riduce la produzione epatica di glucosio ed aumenta l'ingresso del glucosio nel muscolo, determinando ipoglicemia. Per evitare l'iper- o l'ipoglicemia indotte dall'esercizio, i soggetti con T1DM dovrebbero controllare i livelli di glicemia prima, durante e dopo l'esercizio; ritardare l'esercizio se i livelli di glicemia sono superiori a 250 mg/dL; assumere carboidrati prima dell'esercizio se la glicemia scende sotto i 100 mg/dL. Negli individui con T2DM

l'ipoglicemia indotta da attività fisica è più rara, ma può comparire se si assume insulina o farmaci che ne inducono la secrezione [2].

1.5 Valutazione del controllo glicemico a lungo termine

La misurazione dell'emoglobina glicosilata (HbA1c) è il metodo standard per verificare il controllo glicemico a lungo termine. L'HbA1c deve essere misurata in tutti gli individui con diabete mellito durante la valutazione iniziale e come componente del trattamento integrato del diabete. Rispetto all'automonitoraggio della glicemia, che consente di controllare la glicemia in ogni momento attraverso la misurazione della stessa su sangue capillare prelevato dai polpastrelli, l'HbA1c rende conto di un effetto dell'iperglicemia che si instaura nel globulo rosso per un periodo pari alla vita del globulo rosso stesso (120 giorni). Questo esame ha perciò una capacità di valutazione molto importante rispetto al solo esame della glicemia. L'ADA ha stabilito che se si mantengono valori di glicemia a digiuno minore di 120 mg/dL e di HbA1c minore del 7%, che equivale ad un valore medio di glicemia pari a 154 mg/dL, si riduce l'intensità delle possibili complicanze associate alla malattia diabetica, il cui rischio però non svanisce del tutto. Un'HbA1c più elevata può essere appropriata per pazienti giovani o anziani, oppure con limitata aspettativa di vita. Un controllo glicemico più rigoroso (HbA1c del 6% o meno) non è salutare e può essere svantaggioso nel T2DM con alto rischio di malattia cardiovascolare [2].

1.6 Il trattamento intensivo del diabete

Il trattamento intensivo del diabete ha l'obiettivo di raggiungere livelli normali di glicemia (euglicemia), o una glicemia quasi normale. Le risorse disponibili per realizzare tale obiettivo comprendono l'educazione approfondita e continua del paziente, la registrazione delle misurazioni glicemiche e dell'apporto alimentare da parte del paziente ed un regime insulinico variabile che adatta l'apporto glucidico alla dose di insulina. La terapia insulinica di solito include regimi a componente multipla, iniezioni giornaliere multiple di insulina o dispositivi di infusione dell'insulina.

I benefici di questo trattamento intensivo comprendono una riduzione delle complicanze microvascolari e macrovascolari del diabete mellito. Inoltre, dal punto di vista psicologico il paziente sperimenta un maggior controllo della malattia diabetica e

spesso nota un miglior senso di benessere, una maggior flessibilità riguardo ai tempi e contenuto dei pasti e la capacità di modificare il dosaggio insulinico con l'attività fisica.

1.7 La prima somministrazione di insulina nell'uomo

Nel 1922, all'età di quattordici anni, Leonard Thompson divenne il primo paziente diabetico ad essere trattato con insulina. Fino a quel momento erano stati effettuati test su cani resi diabetici attraverso la rimozione del pancreas. L'insulina con cui è stato trattato Thompson venne scoperta agli inizi degli anni '20 dal fisiologo ed endocrinologo Frederick Banting e dal medico canadese Charles Best ed era una forma impura di estratto pancreatico. I primi effetti del farmaco furono parziali e, anzi, portarono ad una reazione orticarioide. Perciò, dopo appena venti giorni dalla prima somministrazione, il ragazzo venne sottoposto ad un'iniezione di insulina pura che estrasse il biochimico canadese James Collip. Questa seconda iniezione portò ad una netta ripresa e ripristinò i livelli di glicemia alla normalità, consentendo a Thompson di vivere fino all'età di ventisette anni, quando morì di polmonite [5].

Capitolo 2: Dispositivi di monitoraggio della glicemia

2.1 L'automonitoraggio della glicemia

L'Automonitoraggio della glicemia (AMG) è importante nella gestione del diabete e consente al paziente di controllare la glicemia in ogni momento. Nell'AMG una piccola goccia di sangue ed una reazione enzimatica facilmente rilevabile rendono possibile la rilevazione della glicemia su sangue capillare.

Fino agli anni '50 la terapia insulinica non disponeva di dispositivi in grado di misurare il valore della glicemia in tempo reale. La terapia, infatti, si basava principalmente su iniezioni di insulina ed un adeguato rapporto tra dieta ed esercizio fisico. Il grande cambiamento che ha rivoluzionato la cura del diabete, forse più di tanti progressi farmacologici e tecnologici che ci sono stati, è avvenuto all'inizio degli anni '80 ed è consistito nello sviluppo di tecniche pratiche e affidabili per la misura della glicemia capillare. In tal senso, sono stati sviluppati dispositivi che consentono al paziente di misurare il livello di glucosio nel sangue più volte nell'arco di una giornata (SMBG-*Self Monitoring of Blood Glucose*). Tali misurazioni vengono effettuate prelevando una piccola quantità di sangue (3-10 μ L) dai polpastrelli: sedi alternative per il test (es.: avambraccio) sono meno affidabili, specialmente quando la glicemia si sta modificando rapidamente come in fase post-prandiale [6].

Oggi, un gran numero di dispositivi è disponibile, e l'assistenza di una persona competente ha un ruolo fondamentale nell'aiutare il paziente a scegliere lo strumento ottimale e ad apprendere l'uso. L'automonitoraggio glicemico è, infatti, un aspetto chiave nell'educazione dei pazienti diabetici ed è parte integrante della strategia terapeutica indicata dall' *Associazione Medici Diabetologi (AMD)* e dalla *Società Italiana di Diabetologia (SID)*.

La frequenza delle misurazioni deve essere individualizzata e adattata sulla base degli obiettivi della cura del diabete.

Gli individui con **T1DM**, che richiedono quotidianamente numerose iniezioni di insulina, dovrebbero misurare in maniera continuativa la glicemia 3 o più volte al

giorno, per stimare e selezionare i boli di insulina rapida necessaria tra i pasti e per modificare le dosi dell'insulina lenta [2].

La maggior parte degli individui con **T2DM** richiede monitoraggi meno frequenti, mediamente 1-2 controlli al giorno (o meno, nei pazienti che assumono agenti orali o seguono una dieta controllata), poiché i livelli glicemici fluttuano meno in questi soggetti [2].

La maggior parte delle misurazioni negli individui con DM di tipo 1 o 2 dovrebbe essere eseguita prima dei pasti e integrata con misurazioni post-prandiali come aiuto per raggiungere gli obiettivi di glicemia post-prandiale.

L'autocontrollo glicemico permette così al paziente di:

- i. affrontare modifiche dell'alimentazione e dell'attività fisica con appropriate variazioni della terapia
- ii. identificare e trattare le urgenze (es.: ipoglicemia)
- iii. prevenire e/o controllare episodi di scompenso
- iv. gestire efficacemente situazioni a rischio (es.: malattie intercorrenti)
- v. correggere in tempo reale eventuali errori
- vi. gestire la terapia con appropriatezza

2.2 Misura istantanea della glicemia capillare: il glucometro

I glucometri sono apparecchi portatili per la determinazione rapida della glicemia su sangue capillare. Il primo dispositivo prodotto, agli inizi degli anni '80, consisteva in una striscia reattiva che cambiava colore in proporzione alla reazione fra glucosio nel sangue e l'enzima glucosio-ossidasi presente sulla striscia. Al tempo stabilito la striscia doveva essere lavata e il colore poteva essere confrontato con una scala colorimetrica.

I glucometri utilizzati al giorno d'oggi (fig. 2.1) consentono di misurare la glicemia su sangue intero, di solito sangue capillare ottenuto dalla puntura del polpastrello di un dito. La goccia di sangue viene posta su una striscia reattiva inserita nello strumento per la lettura.



Fig. 2.1: esempio di glucometro tradizionale [7]

Sono disponibili in commercio numerosi modelli caratterizzati da semplicità d'uso; tra questi sono preferibili i modelli cosiddetti "no wipe", che non richiedono di asciugare l'eccesso di sangue sulla striscia reattiva prima della lettura ed effettuano la misura senza che l'operatore debba intervenire con manovre a tempi stabiliti. Alcuni apparecchi memorizzano i valori glicemici determinati e possono essere collegati con PC mediante apposito accessorio. Altri modelli possono essere inseriti in sistemi di collegamento per il tele-autocontrollo del diabete [9].

Il principio su cui si basa la misura dei più comuni glucometri validati per uso clinico consiste nella quantificazione di una reazione enzimatica, l'ossidazione del glucosio, che risulta proporzionale alla sua concentrazione nel sangue. La reazione avviene ponendo un campione di sangue su una striscia reattiva alla glucosio-ossidasi. La misura può essere ottenuta con metodo riflettometrico (intensità di colore determinata dal cromogeno che si sviluppa dall'ossidazione del glucosio) o impedenziometrico (conducibilità elettrica del sangue indotta dalla corrente elettrica generata dall'ossidazione del glucosio). Alcuni fattori possono influenzare il risultato della misura (variazione dell'ematocrito, altitudine, temperatura e umidità dell'ambiente, ipossiemia, ipertrigliceridemia), anche se tale influenza non risulta sempre clinicamente rilevante. Al contrario, l'influenza dei farmaci assunti alle comuni dosi terapeutiche è generalmente del tutto trascurabile [8].

2.3 Accuratezza ed affidabilità dei glucometri

Tutti i modelli possiedono una sensibilità e riproducibilità dei risultati ritenute soddisfacenti in rapporto allo scopo, che è quello di fornire valori glicemici utilizzabili

per una decisione terapeutica immediata e/o una rivalutazione della terapia su base retrospettiva. La concordanza (accuratezza) tra la glicemia misurata dal glucometro e quella determinata con metodiche di laboratorio convenzionali è mediamente buona, ma risulta variabile in rapporto al livello glicemico: la concordanza è elevata nel range 50-250 mg/dL, mentre diminuisce per valori glicemici superiori o inferiori pur risultando accettabile nel range 40-500 mg/dL. Sebbene il valore ideale raccomandato per l'accuratezza sia di un errore analitico inferiore al 5%, l'imprecisione analitica dei glucometri dipende dal tipo di strumento, con un coefficiente di variazione compreso tra 4% e 20% nel range glicemico tra 130 e 350 mg/dL.

Nonostante tale imprecisione, l'affidabilità del glucometro risulta accettabile quando il suo impiego sia confinato all'automonitoraggio della glicemia, mentre per quanto concerne l'impiego per la diagnosi di diabete, di IFG (alterata glicemia a digiuno) o di IGT (ridotta tolleranza al glucosio), i glucometri non sono al momento raccomandati [6].

Questi dispositivi hanno portato ad un miglioramento nel trattamento della patologia, ma presentano alcune limitazioni, prima fra tutte l'impossibilità di individuare episodi di iperglicemia o ipoglicemia che si possono avere nell'arco della giornata in relazione alla dieta, all'attività fisica ed alla terapia farmacologica seguita. Come mostrato in figura 2.2, nell'arco di una giornata l'andamento della glicemia non è sempre confinato all'interno dell'intervallo di normalità (zona verde - "Normal Range" 70-180 mg/dL) ma può presentare delle escursioni (zone cerchiare in rosso) da questa fascia euglicemica che le semplici misurazioni con dispositivi SMBG non sono in grado di rilevare [27].

SMBG vs CGM

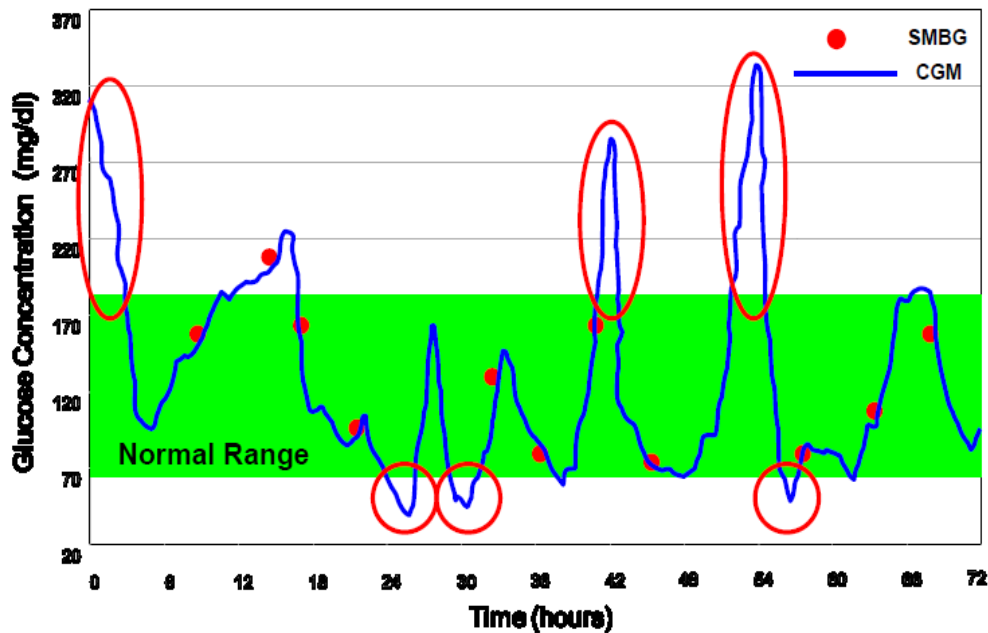


Fig. 2.2: grafico di confronto tra rilevazione glicemica con sistema SMBG (pallini rossi) e sistema CGM (linea blu) [27]

Perciò, per migliorare la terapia del diabete sono stati sviluppati, a partire dal 2000, nuovi dispositivi per monitorare in maniera quasi continua la glicemia nel sangue. Tali dispositivi riducono anche l'invasività della procedura di rilevazione ottenuta con meccanismo pungi-dito.

2.4 Sistemi per il monitoraggio continuo della glicemia

I dispositivi di monitoraggio continuo del glucosio interstiziale (CGM – *Continuous blood Glucose Monitoring*) sono un'alternativa all'automonitoraggio pluriquotidiano con glucometri a strisce reattive. Essi consentono di misurare la concentrazione di glucosio con una frequenza alta (un valore ogni 1-5 minuti) anche per diversi giorni consecutivi, permettendo di ricostruire il profilo della glicemia di un paziente diabetico con una risoluzione temporale di pochi minuti. L'uso di questi strumenti nella gestione abituale del diabete è limitato e non ha ancora condotto alla sostituzione delle misurazioni tradizionali ottenute con sistemi SMBG. Inoltre, questa

tecnologia in rapida evoluzione richiede notevole esperienza da parte del team diabetologico e del paziente [2].

Questi dispositivi forniscono in breve tempo informazioni utili sulle modalità di variazione della glicemia e hanno la capacità di rilevare prontamente gli episodi ipoglicemici; contemporaneamente, possono essere dotati di sistemi di allarme in risposta a valori soglia glicemici alti o bassi prelezionati o a rapide variazioni glicemiche. Tali attraversamenti di soglia vengono determinati tramite algoritmi predittivi. Perciò, la quantità di dati raccolta in maniera retrospettiva dà la possibilità di predire l'insorgere di episodi ipo/iperglicemici e di generare allarmi con un certo anticipo, in modo da limitare le escursioni dalla fascia euglicemica. Inoltre, l'utilizzo del CGM risulta particolarmente vantaggioso in pazienti con diabete gestazionale. I possibili vantaggi sono rappresentati dalla possibilità di raggiungere un target normoglicemico, iniziare o aggiustare la terapia insulinica, migliorare il profilo glicemico delle pazienti e ridurre di conseguenza il rischio di complicanze fetali legate al parto [9].

I modelli sviluppati recentemente sono di due tipi: minimamente invasivi e non invasivi. Entrambi questi sistemi riducono o eliminano il dolore e gli inconvenienti connessi con il prelievo di sangue capillare e con la lettura della striscia mediante glucometro.

2.5 Dispositivi CGM minimamente invasivi

I dispositivi CGM minimamente invasivi misurano la concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale, lo spazio tra le cellule ed i capillari, piuttosto che direttamente nel sangue. Nel fluido interstiziale le sostanze nutritive, tra cui il glucosio, diffondono dal vaso sanguigno prima di essere assorbite dalle cellule stesse.

Tali sistemi sono costituiti da:

- Un **sensore** “ad ago cannula” costituito da una cannula, di lunghezza di pochi mm, impiantata nel sottocute, solitamente nel braccio o in zona addominale, contenente un elettrodo in platino ed una matrice al cui interno vi è l'enzima glucosio-ossidasi. In presenza di glucosio e ossigeno, tale enzima catalizza una reazione che porta alla produzione di un segnale elettrico proporzionale ai

livelli di glucosio. Il sensore è un dispositivo monouso che ha durata media di 6-7 giorni [20].



Fig. 2.3: esempio di sensore “Dexcom Seven-Plus” [20]

- Un **trasmettitore** posizionato sul sensore per inviare le informazioni sulle concentrazioni di glucosio dal sensore al monitor. Il trasmettitore ha una durata maggiore del sensore (circa 6 mesi). Perciò, passati 7 giorni è necessario sostituire solamente il sensore [20].



Fig. 2.4: esempio di trasmettitore “Dexcom Seven-Plus” [20]

- Un piccolo **monitor** (di solito un dispositivo delle dimensioni di un telefono cellulare) che legge e visualizza i valori di glucosio nel fluido interstiziale in tempo reale o retrospettivamente. Il monitor può essere indossato su cinture o essere messo in tasca e risulta facilmente portatile [20].

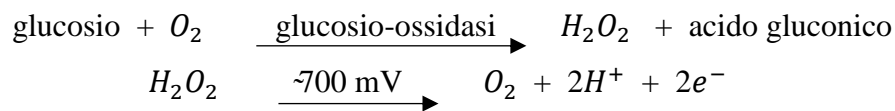


Fig. 2.5: esempio di monitor “Dexcom Seven-Plus” [20]

2.6 Il principio della glucosio-ossidasi

La misura ottenuta dai sistemi CGM minimamente invasivi non è indicativa della glicemia reale. Pertanto, il segnale acquisito è generalmente una corrente in mA, legata alla reazione enzimatica della glucosio-ossidasi, e che è proporzionale alla concentrazione di glucosio nel sito dove è impiantato il sensore.

Tale reazione è la seguente:



Il perossido di idrogeno viene ossidato da uno specifico elettrodo che causa il movimento di elettroni e un amperometro misura la corrente così generata.

Il sito di impianto del sensore è il fluido interstiziale ed è quindi necessario che il dispositivo venga calibrato in modo da convertire la misura di concentrazione nell'interstizio in una stima della concentrazione di glucosio nel plasma.

2.7 Tipologie di dispositivi CGM

Esistono due tipologie di sistemi CGM:

- *CGM off-line*: in questi dispositivi la visualizzazione del livello di glucosio avviene in modo retrospettivo. Il sistema effettua una serie di misurazioni di livelli di glucosio in un determinato periodo di tempo. Le informazioni vengono memorizzate in un monitor e possono essere scaricate dal medico specialista al termine dell'uso del sensore [10].

- *Real-Time CGM* (rt-CGM): i valori del segnale CGM sono direttamente visibili ed utilizzabili dal paziente. I dispositivi Real-Time sono in grado di registrare centinaia di letture quotidiane, così che il paziente, attraverso la lettura di tali misurazioni e sentendo gli allarmi sonori eventualmente incorporati nel sistema, riesce ad intervenire e ad evitare complicanze nel breve termine (coma da ipoglicemia o iperglicemia) e nel lungo termine (complicanze croniche che possono compromettere il corretto funzionamento di organi vitali) [10].

2.8 Dispositivi CGM minimamente invasivi recentemente sviluppati

- *Seven-Plus®* (Dexcom, San Diego, CA), che ha ricevuto l'approvazione della FDA nel Febbraio del 2009. Questo dispositivo CGM presenta, oltre alle tre componenti di sensore, trasmettitore e monitor, anche un software (DM3 – Dexcom Data Manager 3) che trasferisce i dati raccolti dal sensore al computer. All'interno di questo software è possibile corredare le misure di glicemia con informazioni relative ai pasti, all'attività fisica, all'insulina, allo stato di salute, permettendo al paziente di tener traccia in maniera completa della propria terapia. È inoltre possibile aggiungere informazioni relative all'emoglobina glicosilata HbA1c per il suo monitoraggio [20].
- *FreeStyle Navigator™* (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA), che ha ricevuto l'approvazione della FDA nel Marzo del 2008. Esso è costituito da un sensore sottocutaneo che ha durata massima di 5 giorni. Il sensore è integrato con un meccanismo di predizione che si basa su un'estrapolazione lineare degli ultimi campioni. Perciò, la tecnologia del FreeStyle Navigator consente la visualizzazione in tempo reale del trend che il segnale glicemico sta assumendo [19].



Fig. 2.6: sensore, trasmettitore e monitor del FreeStyle Navigator™ [19]

- *FreeStyle Libre* (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA) che ha ottenuto il marchio CE nel Settembre 2014. Si tratta di una tecnologia avanzata di monitoraggio della glicemia definita “Flash”, che utilizza sensori che consentono di ottenere un quadro completo dei livelli di glucosio in continuo cambiamento. Perciò, è possibile attuare le migliori strategie terapeutiche per un’ottimale gestione del diabete.

Questa tecnologia si compone di un sensore e di un lettore.



Fig. 2.7: sensore e lettore del FreeStyle Libre [18]

Il sensore (35 mm x 5 mm) si applica sulla parte posteriore del braccio: è resistente all’acqua, fino ad un metro di profondità e non oltre 30 minuti, e misura automaticamente i livelli di glucosio nei fluidi interstiziali giorno e notte, grazie ad un filamento flessibile che va inserito sottocute (5 mm) e rimane fissato con un adesivo. Il sensore è progettato per rimanere applicato al corpo fino a 14 giorni.

Il lettore visualizza i dati di glucosio raccolti dal sensore. Una scansione di 1 secondo, passando il lettore sopra al sensore, mostra il valore attuale del livello di glucosio, i dati del glucosio delle ultime 8 ore e una freccia di andamento che indica se i livelli di glucosio stanno aumentando, diminuendo o variando lentamente. Il lettore, inoltre, è in grado di memorizzare i dati della glicemia fino a 90 giorni.

Con l'ausilio di un software appositamente progettato, *l'Ambulatory Glucose Profile (AGP)*, viene realizzato un report tipico del paziente. Questo viene creato usando i dati raccolti in vari giorni o settimane; dopodiché, il software aggrega le letture in un singolo periodo di 24 ore, creando una presentazione di una 'giornata tipica'. La possibilità di visualizzare i dati in questo modo consente di identificare i momenti della giornata in cui i livelli di glucosio subiscono le oscillazioni maggiori rispetto all'intervallo normoglicemico. Come si può vedere in figura 2.8, sul report è possibile visualizzare l'intervallo stabilito di glucosio (in questo caso 85-130 mg/dL), la lettura di glucosio medio giornaliero, il periodo in cui si sono raccolti i dati acquisiti e la variazione glicemica in un periodo di 24 ore. La linea continua blu indica la lettura media e le aree di colore azzurro chiaro indicano le variazioni rispetto a questa lettura media [18].

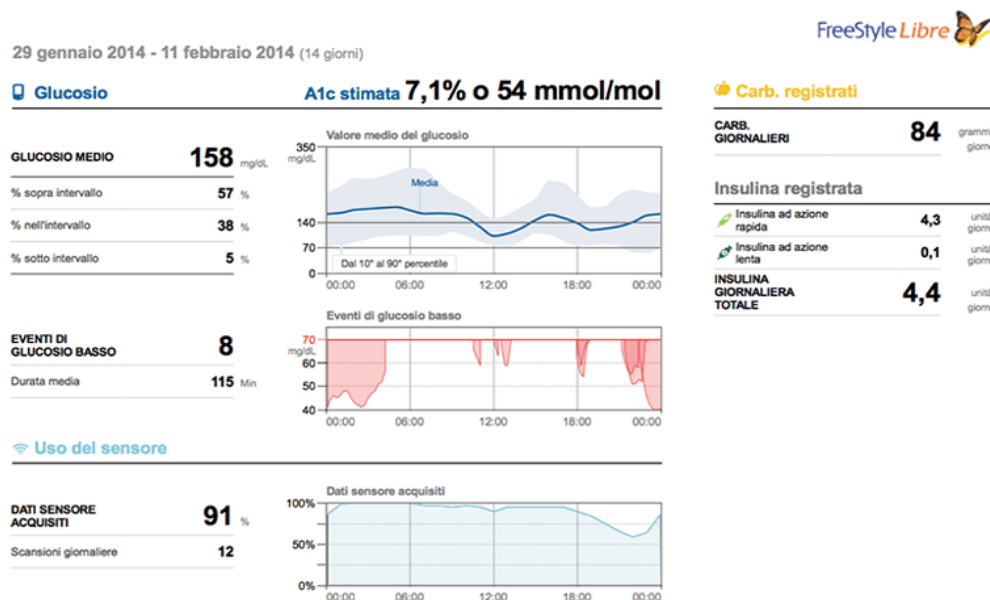


Fig. 2.8: esempio di report ottenuto col software AGP [18]

2.9 Dispositivi CGM non invasivi

I dispositivi CGM non invasivi rappresentano la frontiera più interessante nel monitoraggio in continua della glicemia. Sono tutt'ora in fase di sviluppo e ci vorranno altri anni di ricerca per arrivare ad un perfezionamento della qualità delle misure fornite.

I modelli di tipo non invasivo sono dotati di un sensore applicato alla superficie della cute: in questa sede viene misurata la glicemia con tecniche di misura transcutanea, come l'irradiazione del tessuto, analisi delle radiazioni assorbite e di scatter, metodi ottici come radiazioni infrarosse, la spettroscopia di Raman, la polarimetria, la luce scatter e la spettroscopia fotoacustica.

Di seguito un esempio di dispositivi non invasivi con il rispettivo principio di funzionamento:

- *Pendra* (Pendragon Medical, Svizzera): è stato inventato nel 2000 ed ha ottenuto il marchio CE nel 2003. Esso è considerato come il primo strumento non invasivo per il monitoraggio in continuo della glicemia anche se poi è stato ritirato dal mercato nel 2005 dopo alcuni test che mostrarono un non corretto funzionamento del dispositivo. Il Pendra utilizzava, per misurare il consumo di glucosio, una tecnologia nota come spettroscopia d'impedenza. Attraverso l'applicazione di un piccolo campo magnetico, il dispositivo era in grado di misurare il flusso di sodio attraverso la membrana mitocondriale, associabile, appunto, al consumo di glucosio, per poi ottenere il livello glicemico equivalente [21].



Fig. 2.9: Pendra [21]

- *Glucowatch G2 Biographer* (Cygnus, Inc., Redwood City, CA): approvato dalla FDA nel 2001, il dispositivo è indossato come un orologio da polso e il campione di glucosio è ottenuto direttamente attraverso la pelle intatta. Si applica una corrente a basso dosaggio sulla cute del braccio per attrarre ioni attraverso una tecnica definita come “reverse iontophoresis”. In pratica, il liquido interstiziale viene estratto attraverso la cute assieme al glucosio presente in concentrazioni minime (circa 1/1000 della concentrazione ematica). La reazione tra glucosio e l’enzima glucosio-ossidasi, contenuto in dischi di idrogel, produce una corrente elettrica che viene tradotta in un segnale equivalente al livello glicemico mediante un algoritmo di conversione dati. Tale prodotto è stato però ritirato dal mercato nel 2006 a causa dei numerosi casi di irritazioni cutanee causate dal suo utilizzo [22].



Fig. 2.10: Glucowatch G2 Biographer [22]

2.10 Accuratezza ed affidabilità dei dispositivi CGM

I dispositivi CGM non hanno ancora sostituito l’automonitoraggio glicemico con glucometro pungi-dito, nonostante riescano a fornire informazioni più complete e dettagliate. Il limite principale dei sensori CGM è rappresentato dall’accuratezza in quanto il deterioramento del sensore, dovuto al contatto con i fluidi biologici, genera misure con un errore sistematico. Durante l’impiego di questo dispositivo sono

richieste, quindi, frequenti calibrazioni che vengono eseguite correlando i valori dell'automonitoraggio SMBG con i valori forniti dal sensore CGM nei corrispondenti istanti temporali. L'accuratezza dei valori forniti dal sensore CGM è fortemente legata alla fase di calibrazione, che deve avvenire in un momento in cui la glicemia plasmatica non varia eccessivamente.

Gli standard dell'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) riferiti all'accuratezza dei sistemi per la misurazione della glicemia richiedono che un valore misurato dal sensore sia compreso nei 15 mg/dL di differenza per valori di glicemia < 75 mg/dL rispetto al sistema di riferimento e nel 20% per un valore > 75 mg/dL. Pertanto, l'accuratezza del sensore viene espressa come percentuale dei dati che rientrano in questi requisiti [9].

Inoltre, il processo di calibrazione deve tener conto della complessa dinamica plasma-interstizio per poter ottenere la corretta misurazione del segnale glicemico nel plasma, in quanto il metabolismo del glucosio è regolato in base ai livelli di glucosio nel plasma stesso. Ad esempio, quando il livello effettivo di glucosio rientra nel range ipoglicemico, una sovrastima sistematica dei livelli di glucosio dovuta alla mancanza di calibrazione può esporre il paziente a situazioni critiche. Per descrivere la dinamica plasma-interstizio sono stati utilizzati diversi modelli compartimentali in letteratura.

Un altro aspetto che limita l'affidabilità dei dispositivi CGM è la componente di rumore di misura. Questa deve essere eliminata utilizzando appositi filtri o algoritmi di filtraggio. Ad esempio, il rumore può causare picchi e oscillazioni che potrebbero innescare falsi allarmi ipo o iperglicemici, andando a compromettere la qualità delle informazioni ottenute dai dispositivi CGM.

Nonostante le limitazioni intrinseche, i dispositivi CGM sono in grado di mostrare i trend dei livelli di glicemia ed avvertire il paziente quando un picco ipo o iperglicemico si sta per verificare. Studi sull'utilità di questa funzione di allarme sono già iniziati e la prevenzione di un fenomeno ipoglicemico attraverso il bloccaggio della pompa per l'insulina è già stato sperimentato in diverse applicazioni [2].

Capitolo 3: Dispositivi di somministrazione dell'insulina

3.1 L'insulina

L'insulina è un ormone prodotto dal pancreas indispensabile per la regolazione del metabolismo dei carboidrati, dei grassi e delle proteine, ed è fondamentale per far fronte all'iperglicemia. In quanto meccanismo a retroazione negativa, l'insulina mantiene stabili le variabili controllate, ovvero i livelli di glucosio, acidi grassi liberi e potassio. La produzione di insulina, però, non è ugualmente sensibile ai livelli di tutte queste sostanze: sono proprio i livelli plasmatici di glucosio che esercitano il controllo più potente sulla sua produzione. Il glucosio, gli acidi grassi liberi e i chetoacidi costituiscono substrati energetici che finiscono nei mitocondri per la produzione di ATP, il composto ad alta energia richiesto dalla quasi totalità delle reazioni metaboliche endoergoniche del nostro organismo [2].

3.2 Tipologie di insulina per la terapia del diabete

Attualmente, nella pratica clinica, vengono usate l'insulina umana o i suoi analoghi. In passato era disponibile l'insulina animale, che oggi è stata abbandonata per la sua potenziale immunogenicità. L'insulina umana è prodotta con un processo semisintetico a partire dall'insulina suina oppure con un processo biosintetico, che si avvale della trascrizione di DNA ricombinante umano, inserito in colture batteriche di *Escherichia coli* [12]. Gli analoghi dell'insulina umana sono stati ottenuti modificando la sequenza amminoacidica della molecola dell'insulina con tecniche di laboratorio specifiche.

Le preparazioni in commercio sono principalmente di 3 tipi:

1. *Insulina a breve durata d'azione*: viene utilizzata nella terapia quotidiana del diabete insulino-dipendente e viene assunta prima dei pasti. Gli analoghi dell'insulina, rispetto all'insulina solubile, hanno un assorbimento ed un inizio d'azione più rapidi, una durata d'azione più breve, migliorano il picco iperglicemico post-prandiale e riducono gli episodi di ipoglicemia tardiva. L'insulina solubile umana è la forma indicata in caso di chetoacidosi diabetica

e di interventi chirurgici, può essere somministrata per via sottocutanea, endovenosa e intramuscolare. L'emivita, quando viene iniettata per via endovenosa, è molto breve (circa 5 minuti) e il suo effetto scompare entro 30 minuti [15].

2. *Insulina a durata d'azione intermedia*: ha effetto dopo circa 2 ore, con un picco tra le 4 e le 8 ore e una durata d'azione tra le 14 e le 16 ore. Di solito viene somministrata due volte al giorno [15].
3. *Insulina a lunga durata d'azione*: ha la caratteristica di rimanere in circolo fino a 35 ore. Queste insuline iniziano ad avere un effetto entro circa 2 ore dalla somministrazione, con un picco d'azione dopo circa 6-10 ore, esaurendosi dopo circa 16-30 ore. Gli analoghi dell'insulina umana a lunga durata d'azione sono somministrati per via sottocutanea una o due volte al giorno e hanno il vantaggio di ridurre le escursioni in senso iper o ipoglicemico [15].

3.3 Dispositivi convenzionali di somministrazione dell'insulina

L'iniezione di insulina va eseguita in zone del corpo sempre diverse, soprattutto quando la terapia è di tipo intensivo e necessita, perciò, che vengano effettuate 3-4 iniezioni al giorno, in modo da evitare possibili complicanze lipoatrofiche o lipoipertrofiche nella zona di iniezione. La sede principale per iniettare il farmaco e per garantirne un rapido assorbimento è l'addome, ad una distanza di 2-3 centimetri dall'ombelico, oppure il lato esterno del braccio, tra gomito e spalla [12]. I dispositivi convenzionali per la somministrazione di insulina sono le siringhe e gli iniettori a penna.

Le siringhe da insulina sono facilmente utilizzabili in ogni situazione e garantiscono un'alta precisione permettendo di frazionare anche le unità della dose del bolo da iniettare. La maggior parte dei pazienti si inietta l'insulina utilizzando le siringhe di plastica monouso, molto più pratiche rispetto alle siringhe di vetro che ormai non vengono più utilizzate. Prima del loro utilizzo, il paziente deve aspirare la dose necessaria di insulina da un flaconcino per poi iniettarla nel sottocute [14].

Gli iniettori a penna sono dispositivi realizzati per rendere più comoda la somministrazione a dose multipla. Essi sono dotati di una cartuccia sostituibile contenente insulina e di una scala graduata per misurare la dose da somministrare, che

viene scelta ruotando l'estremo della penna e percependo uno scatto dopo ogni dose selezionata. Per l'iniezione con la penna è necessario inserire l'ago nella cute e premere il bottone di rilascio all'estremità della penna. Questi dispositivi sono pratici e poco ingombranti, perciò sono estremamente diffusi in soggetti in trattamento intensivo e nei bambini, perché l'ago, nascosto e piccolo, rende l'iniezione meno dolorosa. Le penne sono più accurate rispetto alle siringhe per la somministrazione di dosi inferiori alle 5 unità di insulina, mentre per dosaggi superiori l'accuratezza è paragonabile [14]. Uno studio randomizzato di piccole dimensioni condotto su 42 soggetti, con un follow up limitato di 10 settimane, ha trovato che si potrebbe somministrare l'insulina attraverso i vestiti per ridurre il disagio del paziente. Dalla ricerca risulterebbe che l'iniezione attraverso i vestiti non ha causato infezioni. Tuttavia, il *Royal College of Nursing* ha messo in guardia contro questa tecnica di somministrazione perché le fibre dei tessuti possono ostruire l'ago e possono essere trasportate nel sottocute con il rischio di causare infezioni.



Fig. 3.1: Iniezione di insulina tramite iniettore a penna [14]

3.4 Pompe per l'infusione sottocutanea continua di insulina

L'infusione sottocutanea continua di insulina tramite micropompa (CSII – *Continuous Subcutaneous Insulin Infusion*) è una proposta terapeutica nata negli anni Sessanta e che, oggi, viene sempre più frequentemente presentata alle persone con

diabete di tipo 1. Le pompe per l'insulina (microinfusori) consentono l'infusione continua di insulina nel tessuto sottocutaneo [10].

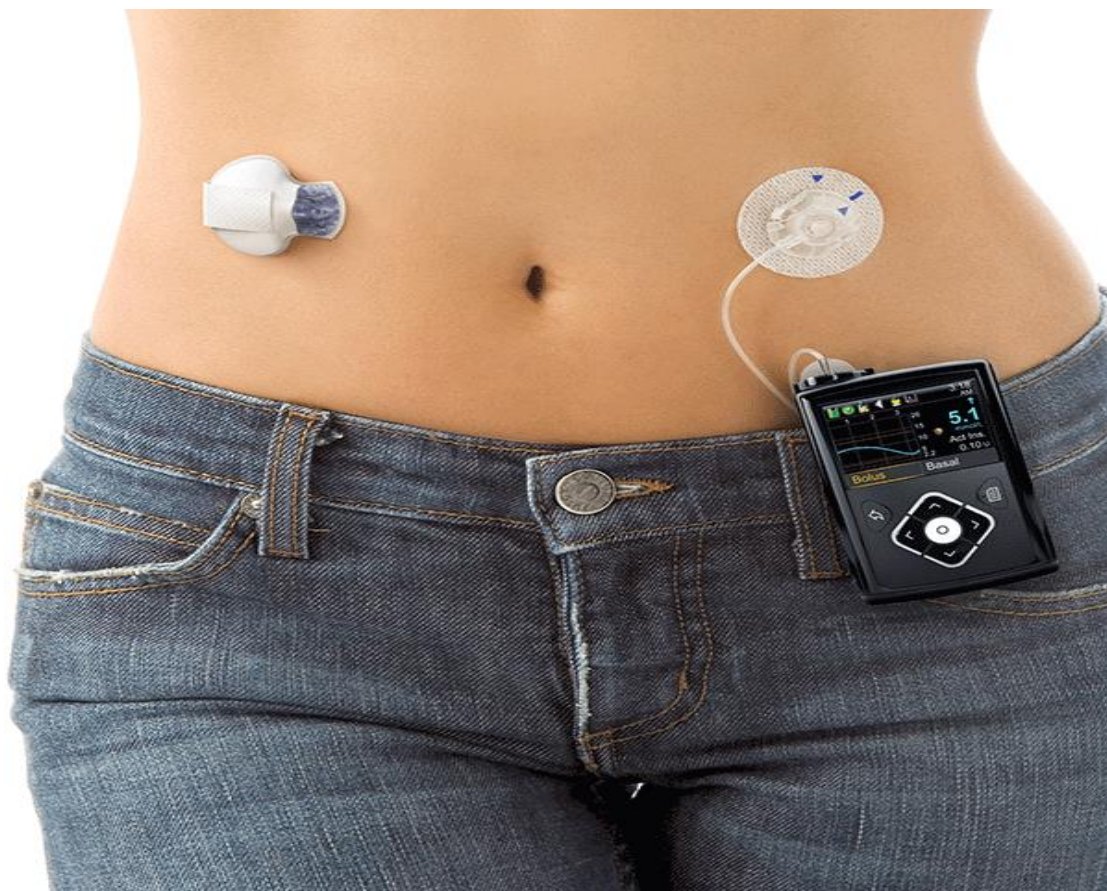


Fig. 3.2: microinfusore “MiniMed™ 640G” con relativo set di infusione (parte destra della della figura) e sensore di monitoraggio della glicemia “Enlite™” (parte sinistra della figura) [17]

Il microinfusore ha uno scomparto in cui alloggiare il serbatoio riempito con insulina. L'insulina presente nel serbatoio del microinfusore viene infusa nel corpo tramite un set di infusione; questo comprende un sottile catetere di plastica che trasporta l'insulina dalla pompa al corpo e, al termine di questo, un ago-cannula inserito sottocute in un punto come l'addome, la coscia o i glutei. Un adesivo mantiene il set di infusione in posizione. Il set di infusione ed il serbatoio devono essere sostituiti ogni 2-3 giorni.

I microinfusori rilasciano sia insulina basale che insulina pre-prandiale. L'insulina basale agisce lentamente e viene distribuita in micro-dosi durante il giorno; questa imita la produzione basale di insulina effettuata dal pancreas per supportare le normali

funzioni di base del corpo, esclusa l'assunzione di cibo. L' insulina pre-prandiale (“bolo”) è, invece, ad azione rapida e serve a correggere gli sbalzi glicemici che si possono avere dopo un pasto. L'insulina pre-prandiale viene rilasciata sulla base di un algoritmo personalizzato per il paziente che incorpora la glicemia pre-prandiale e l'apporto stimato di carboidrati per poter calcolare automaticamente il bolo insulinico. Attraverso questa funzione, avendo correttamente preimpostato i parametri della terapia intensiva (obiettivo glicemico, fattore di sensibilità, rapporto insulina/carboidrati) e fornendo il valore della glicemia e la quantità di carboidrati che si prevede verranno assunti, si ottiene la precisa quantità di insulina da infondere con il bolo [10].

I microinfusori possono rilasciare accuratamente piccole dosi di insulina (microlitri per ora) e presentano numerosi vantaggi. Infatti, quote multiple di infusione basale possono essere programmate per aggiustare le necessità di insulina basale notturna rispetto a quella giornaliera e le infusioni di insulina basale possono essere modificate durante i periodi di esercizio fisico [2]. Inoltre, grazie all'impiego degli algoritmi programmati, vengono considerati sia la precedente somministrazione di insulina che i valori della glicemia nel calcolo della dose di insulina, che così viene meglio combinata anche rispetto alla composizione dei pasti.

Come è facilmente intuibile, l'utilizzo di questi dispositivi non può avvenire senza che il paziente abbia ricevuto l'istruzione da parte di un sanitario con considerevole esperienza specifica. La terapia con utilizzo di microinfusore richiede una notevole interazione del paziente con il gruppo di lavoro per la cura del diabete. Inoltre, i microinfusori presentano pericoli peculiari, come l'iperglicemia inspiegata dovuta all'ostruzione del dispositivo di infusione o la chetoacidosi diabetica se la pompa si disconnette. Quindi, per l'utilizzo sicuro dei dispositivi di infusione è essenziale l'educazione del paziente sul funzionamento della pompa e su un frequente automonitoraggio glicemico [13].

3.5 SAP: Sensor Augmented insulin Pump therapy

La SAP rappresenta la nuova modalità terapeutica di integrazione che incorpora la terapia insulinica per via sottocutanea con microinfusore ed il monitoraggio glicemico in continua con dispositivo CGM real-time [9]. L'interazione tra questi due sistemi rappresenta un terreno fertile sia per lo sviluppo di componenti tecnologiche di

automazione dell'interazione che per l'approfondimento di aspetti di autogestione avanzata della terapia insulinica.

La valutazione predittiva della terapia insulinica è resa complessa da numerosi fattori, come l'attività fisica e l'apporto di carboidrati durante i pasti. Attraverso la registrazione real-time del pattern glicemico è possibile supportare l'algoritmo del microinfusore personalizzato per il paziente per ottenere una progressiva interazione automatica tra CSII e CGM.

I sistemi integrati presentano quindi le potenzialità per migliorare la gestione della terapia insulinica, in particolare con la possibilità di aiutare a prevedere e prevenire gli episodi ipoglicemici e meglio sfruttare il calcolatore di bolo. I recenti trial clinici, molti dei quali sono stati pubblicati dal *Diabetes Research in Children Network*, dimostrano come la disponibilità dei due sistemi integrati porti ad una riduzione dell'emoglobina glicosilata (riduzione media di HbA1c -0,7%). Questo deriva dal mantenere attivo il monitoraggio glicemico con CGM ed apre la strada alla realizzazione di algoritmi decisionali gestiti dal paziente, nati dall'esperienza clinica stessa. Ancora una volta viene quindi valorizzata l'educazione terapeutica per aumentare il grado di autonomia del paziente.

3.6 La tecnologia SmartGuard™

Medtronic, azienda leader mondiale nello sviluppo di dispositivi medici, ha recentemente introdotto sul mercato la tecnologia *SmartGuard* [17] per il sistema integrato che si avvale del microinfusore "MiniMed™ 640G", del dispositivo CGM "Enlite™" e del trasmettitore "Guardian™ 2 Link" che si collega al sensore del glucosio ed invia le letture glicemiche al microinfusore.



Fig. 3.3: componenti del sistema integrato “MiniMed® 640G System” [17]

SmartGuard riproduce alcune funzioni di un pancreas sano ed offre una maggiore protezione dagli eventi ipoglicemici. Questa tecnologia è in grado di prevenire l'avvicinarsi del valore di glucosio del sensore al limite dell'ipoglicemia con 30 minuti di anticipo, di interrompere automaticamente l'erogazione di insulina prima di un evento ipoglicemico e di riavviare automaticamente l'erogazione di insulina quando i livelli di glucosio del sensore si sono stabilizzati.

Come è mostrato in figura 3.4, la funzione sospende l'erogazione di insulina se il valore di glucosio rilevato dal sensore Enlite™ si trova a non più di 70 mg/dL al di sopra del limite di glucosio basso e se si stima che, entro 30 minuti, il livello di glucosio si troverà a non oltre 20 mg/dL al di sopra del limite di glucosio basso. L'erogazione di insulina basale sarà riavviata automaticamente una volta che i valori di glucosio rilevati dal sensore sono al di sopra del limite di glucosio basso e tendono al rialzo.

COME FUNZIONA SMARTGUARD™

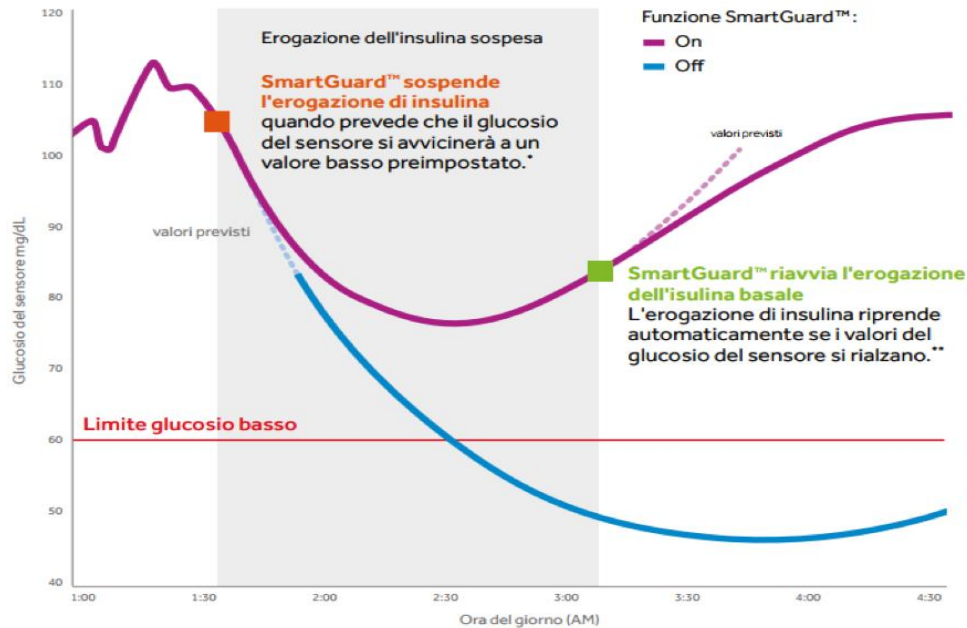


Fig. 3.4: funzione di sospensione automatica dell'erogazione di insulina [17]

Il software CareLink™ organizza tutti i dati provenienti dal microinfusore e dal sensore di glucosio in facili report (grafici, tabelle e diagrammi) che vengono poi trasferiti verso un sito protetto online. I report consentono di analizzare i rapporti causa-effetto tra insulina, cibo e attività fisica e gli effetti del comportamento del paziente sul controllo glicemico. Il tutto è accessibile dal medico curante, che può definire le impostazioni ottimali del sistema, ottimizzando così i risultati della terapia.

3.7 Efficacia e validità dei dispositivi di somministrazione dell'insulina

La gestione dell'ipoglicemia con il microinfusore rappresenta la principale criticità della terapia insulinica. Il vantaggio derivante dalla possibilità di ridurre l'insulinizzazione attraverso la sospensione dell'erogazione di insulina va di pari passo con il rischio di iperglicemia conseguente alla sospensione stessa. Diversi trial clinici hanno analizzato il comportamento del glucosio ematico dopo la sospensione dell'erogazione di insulina, con l'intento di confrontare i livelli di glicemia dopo l'interruzione per un tempo variabile tra i 30 minuti e le 8 ore, con successiva erogazione con insulina umana o con analoghi ad azione rapida. I risultati hanno mostrato come

una sospensione non superiore alle 2 ore non comporti un eccessivo incremento della glicemia e che sia facilmente correggibile.

Nell'ottobre del 2015, l'*Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari Regionali* ha pubblicato un report sull'efficacia di questi dispositivi innovativi nei bambini e negli adulti [13]:

- Nei soggetti con T1DM in età pediatrica e adolescenziale, l'utilizzo dei microinfusori e della modalità terapeutica SAP è raccomandabile se vi è il rischio di ipoglicemie frequenti, in particolar modo se notturne e inavvertite, in modo da correggere la terapia insulinica. Fanno eccezione i bambini fino a 6 anni di età ai quali è raccomandato preferibilmente l'utilizzo di microinfusori, per il vantaggio offerto nel dosaggio di piccole quantità di insulina.
- Nei soggetti adulti con T1DM, la terapia con sistema integrato è indicata per quei pazienti con sindrome da ipoglicemie inavvertite (unawareness), con documentati episodi di ipoglicemia ricorrente che interferiscano negativamente con la qualità di vita e/o con episodi di ipoglicemia severa (≥ 1 episodio/anno).

La terapia con microinfusore, eventualmente integrato con CGM, è l'opzione terapeutica *gold standard* della terapia insulinica intensiva. In Italia la sua diffusione, pur essendo in progressivo aumento, rimane mediamente inferiore a quella degli USA e degli altri stati europei. Una delle barriere che si frappone alla diffusione della terapia insulinica con microinfusore, oltre ai costi elevati e le insufficienti risorse dei centri specialistici, è quella rappresentata dal timore del clinico e del paziente che vivere la propria giornata indossando continuamente un dispositivo esterno possa compromettere la qualità della vita [11].

Perciò, lo sviluppo dei microinfusori è tuttora volto alla realizzazione e commercializzazione di pompe con dimensioni e forme differenti, che siano meno intrusive ed invadenti e che si presentino con costi più favorevoli rispetto alle attuali.

Capitolo 4: Il Pancreas Artificiale e Bioartificiale

Nel corso degli anni sono state valutate diverse modalità non invasive di somministrazione dell'insulina, quali la via orale, intranasale, polmonare e rettale. Queste modalità non hanno dato riscontri pienamente positivi per quanto riguarda la biodisponibilità dell'insulina rilasciata; solo la via polmonare ha mostrato una risposta glicemica simile a quella ottenuta con iniezioni sottocutanee.

D'altra parte, la terapia convenzionale, come già sottolineato nei capitoli precedenti, non è in grado di fornire un controllo glicemico accurato e frequente, che consenta di prevenire le situazioni di iper o ipo glicemia, soprattutto nel periodo notturno in cui il paziente non può monitorare i propri livelli glicemici. Inoltre, il trattamento insulinico può portare a complicanze quali reazioni locali all'insulina stessa (caso molto raro), comparsa di anticorpi anti-insulina e allergia all'insulina.

La ricerca scientifica si è focalizzata sullo sviluppo di dispositivi che, in modo totalmente autonomo e automatico, potessero sostituire la funzione endocrina del Pancreas e, quindi, riuscissero a controllare i livelli di glucosio 24 ore al giorno, 7 giorni su 7, ed erogare l'esatta quantità di insulina necessaria. Due di questi sono il Pancreas Artificiale ed il Pancreas Bioartificiale.

4.1 Il Pancreas artificiale

Il pancreas artificiale (AP), conosciuto in diabetologia anche come controllo a circuito chiuso del glucosio nel sangue, è un sistema che combina un sensore per il glucosio, un algoritmo di controllo, e un infusore di insulina, il cui schema generale è riportato in figura 4.1 [23].

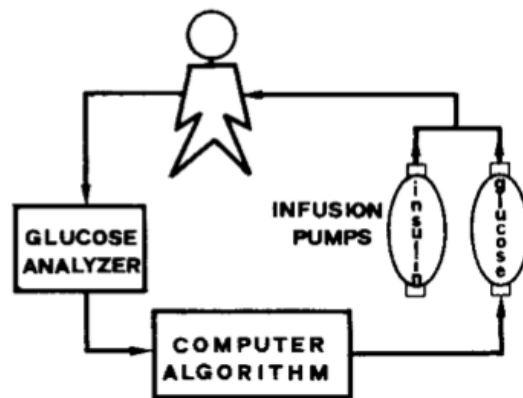


Fig. 4.1: schema generale a circuito chiuso del Pancreas Artificiale [23]

I primi sviluppi del pancreas artificiale possono essere ricondotti a 50 anni fa, quando la possibilità per il controllo esterno del glucosio nel sangue fu individuata da studi su individui con diabete di tipo 1 tramite l'utilizzo di misurazioni intravenose di glucosio e infusioni intravenose di insulina e glucosio. Le pompe per l'infusione di insulina ed i sensori di controllo della glicemia sono innovazioni tecnologiche recenti, ma gli algoritmi di controllo per il pancreas artificiale sono stati sviluppati sin dal 1964, quando Arnold Kadish propose il primo algoritmo predittivo per la modulazione dell'infusione di insulina. Successivamente, nel 1977, il lavoro di cinque team portò alla realizzazione del primo prototipo di sistema di controllo a circuito chiuso, il *Biostator*, seguito dalla realizzazione di un altro dispositivo per il controllo del glucosio nel sangue, il *Nikkiso STG-22*, tuttora in uso in Giappone [23]. Questi macchinari erano inutilizzabili dai pazienti al di fuori dell'ospedale, a causa del loro ingombro e dell'assistenza tecnica necessaria che veniva fornita solamente nei reparti di terapia intensiva. Tuttavia, essi dimostrarono la possibilità del controllo esterno del glucosio ed incentivarono successivi sviluppi tecnologici, che sono stati possibili grazie all'utilizzo di modelli matematici e simulazioni tramite computer.

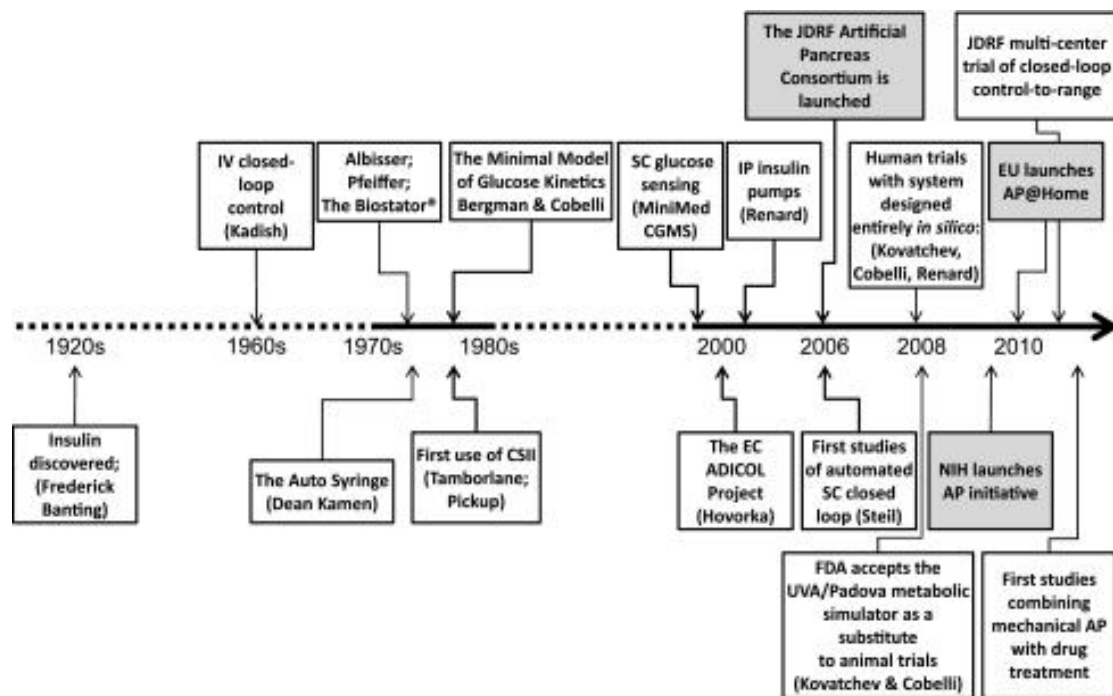


Fig. 4.2: principali tappe nello sviluppo del Pancreas Artificiale [23]

La terapia con pancreas artificiale intende assestare i livelli di glicemia entro la fascia normoglicemica, realizzare versioni portatili e impiantabili di poco ingombro e garantire l'affidabilità del dispositivo per un periodo pari all'aspettativa di vita del paziente, il tutto tenendo conto della variabilità delle caratteristiche metaboliche tra diversi pazienti.

4.2 Fisiologia delle cellule beta

Per stabilire come l'algoritmo di controllo per l'infusione dell'insulina debba agire bisogna comprendere la funzionalità delle cellule beta.

Quando la glicemia si assesta in fascia normoglicemica, la secrezione di insulina è minima (livello basale), all'incirca 25 ng/min/kg di peso corporeo. Se la glicemia sale bruscamente a un livello 2-3 volte superiore a quello normale, per esempio in fase post-prandiale, la secrezione di insulina aumenta secondo una risposta bifasica:

1. Il primo aumento nella secrezione di insulina si verifica entro 3-5 minuti dal picco glicemico, quando le cellule β secernono insulina preformata. Tale aumento si dimezza nei 5-10 minuti successivi.

2. Se lo stimolo iperglicemico persiste, si ha una seconda fase di secrezione che si verifica dopo circa 15 minuti. Questo secondo aumento nella secrezione è dovuto sia alla liberazione di altra insulina preformata da parte delle cellule β , sia al sistema enzimatico, che innesca un processo di sintetizzazione dell'insulina e ne provoca la liberazione dalle cellule pancreatiche.

La secrezione di insulina preformata dovuta alla prima fase è indispensabile in quanto dopo il picco glicemico, senza di essa, sarebbe necessaria una dose di insulina maggiore per raggiungere la fascia normoglicemica.

La seconda fase, invece, ha un comportamento di tipo derivativo: l'andamento della glicemia nel tempo è la derivata matematica dell'andamento linearmente crescente della secrezione di insulina. Infatti, se una data quantità di insulina non fa abbassare il picco glicemico, le cellule β aumentano in modo significativo la velocità di secrezione dell'insulina.

Questo modello di risposta bifasica della secrezione di insulina è alla base di alcuni algoritmi di controllo per il pancreas artificiale.

4.3 Il controllo in catena chiusa

Il controllo della concentrazione di glucosio in catena chiusa agisce secondo un meccanismo a feedback. I valori assunti dalla variabile di uscita (concentrazione di glucosio sottocutanea misurata con sensori CGM) in ogni istante vengono riportati all'ingresso del controllo per essere confrontati con il segnale di riferimento (infusione di insulina sottocutanea tramite CSII), dopo che sono passati attraverso un'opportuna funzione di trasferimento che tiene conto di tutti gli elementi (pasti, esercizio fisico, ecc...) che interagiscono con il sistema glucosio-insulina come variabili di disturbo. Da questo confronto deriva un segnale che sarà il nuovo input per il blocco del sistema che caratterizza il controllo.

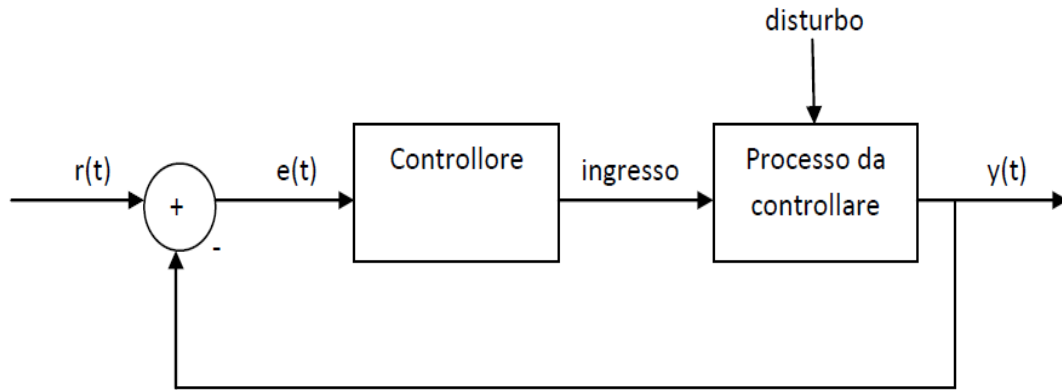


Fig. 4.3: schema del controllo in catena chiusa con retroazione negativa. La retroazione negativa calcola la differenza tra il segnale di output ($y(t)$) ed il riferimento ($r(t)$). Si ottiene così l'errore ($e(t)$) che viene applicato in ingresso al blocco di controllo [28]

La progettazione degli algoritmi di controllo parte dalla modellizzazione del sistema che è oggetto del controllo, ovvero il metabolismo del glucosio e l'azione dell'insulina, e procede fino quando non si è ottimizzato l'algoritmo sulla base dell'output che vogliamo ottenere, quindi fino a che non si limita l'escursione glicemica e si mantiene la glicemia all'interno del range di valori fisiologici. Nella fase di ottimizzazione dell'algoritmo bisogna tener conto di altre variabili, come l'effetto mitogeno dell'insulina, per il quale si può verificare la mitosi cellulare: se non si ha il giusto riguardo alla quantità di insulina infusa per raggiungere la fascia normoglicemica, potrebbero insorgere problemi di obesità o di ipertensione.

La validità di questi modelli è stata testata in vivo e tramite esperimenti in silico: tutto ciò ha permesso di effettuare le simulazioni dei processi di metabolismo di glucosio su un gran numero di pazienti.

4.4 Algoritmi di controllo per il Pancreas Artificiale

La relazione tra secrezione di insulina da parte del pancreas e concentrazione di glucosio nel sangue può essere approssimabile con una legge del tipo:

$$SR(t) = a \cdot G(t) + b \cdot \frac{dG(t)}{dt} + c$$

dove:

- $SR(t)$ è la secrezione pancreatica di insulina
- $G(t)$ è la concentrazione di glucosio nel sangue
- a, b, c sono opportuni parametri

Quindi, come si può notare dal secondo termine della legge scritta sopra, la secrezione pancreatica di insulina dipende anche dalla velocità di variazione del glucosio, realizzando così un controllo di tipo proporzionale-derivativo [29].

Nell'applicazione del Pancreas Artificiale le due strategie di controllo che garantiscono buone performance sono il controllo PID ed il controllo MPC.

4.5 Algoritmo PID (Proportional Integral Derivative)

L'algoritmo di controllo PID è in grado di modellare la risposta bifasica delle cellule β . Il PID regola l'uscita del blocco del sistema di controllo in base all'azione *proporzionale* (il valore del segnale di errore), all'azione *integrale* (i valori passati del segnale di errore) ed all'azione *derivativa* (quanto velocemente il segnale di errore varia). La legge che regola la quantità di insulina da infondere prevista dal controllore di tipo PID è la seguente:

$$PID(t) = K_P \cdot (G - G_b) + K_I \cdot \int (G - G_b) dt + K_D \cdot \frac{dG}{dt}$$

I parametri K_P, K_I, K_D sono rispettivamente i coefficienti proporzionale, integrale e derivativo. G e G_b rappresentano la glicemia attuale e quella basale. La quantità totale di insulina rilasciata dal controllore PID è data dalla somma delle tre componenti. Infatti, la componente proporzionale aumenta il rilascio di insulina quando la glicemia attuale è superiore a quella basale, diminuisce il rilascio di insulina quando la glicemia attuale è inferiore a quella basale, non applica alcuna azione quando il valore di glucosio attuale equivale a quello basale; la componente integrativa aumenta il rilascio di insulina quando l'integrale della differenza dei valori di glucosio attuale e basale è positivo, mentre diminuisce il rilascio quando l'integrale è negativo; la componente derivativa aumenta il rilascio di insulina se i valori di glucosio ematico aumentano nel

tempo, mentre diminuisce il rilascio se tali valori stanno invece diminuendo [25]. Un esempio di risposta del controllore PID ad un picco glicemico è mostrato in figura 4.4.

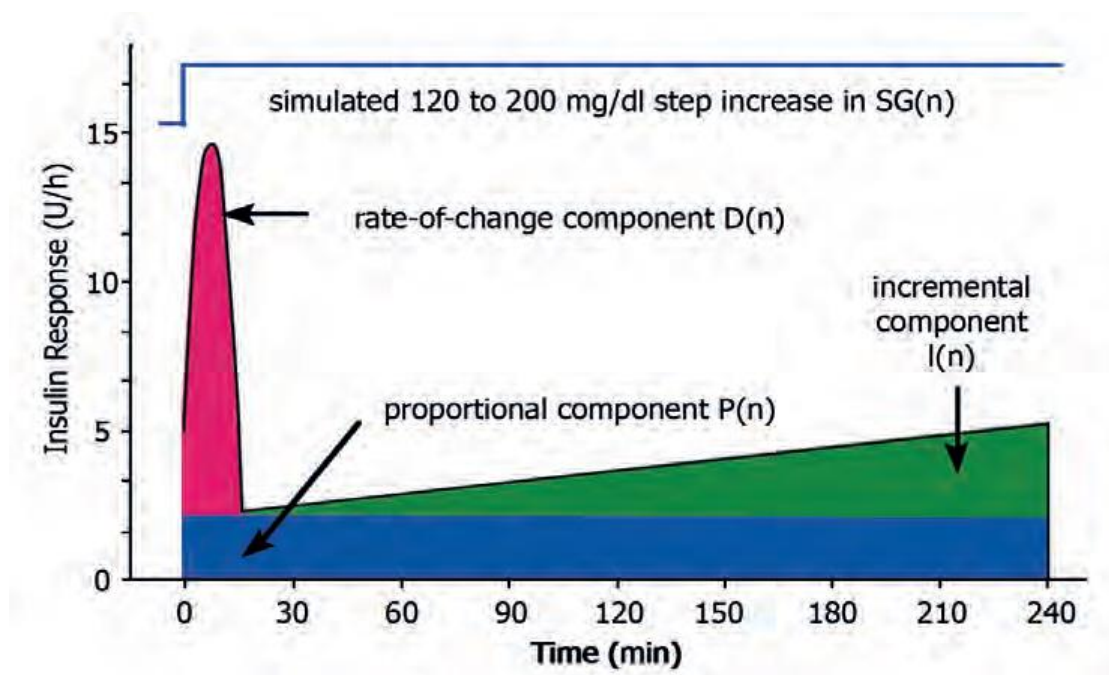


Fig. 4.4: simulazione della risposta del controllore PID ad un picco glicemico (aumento da 120 a 200 mg/dL) [25]

4.6 Studi sperimentali in vivo con controllore PID

Uno dei primi studi in vivo che ha visto l'utilizzo del controllo PID in catena chiusa è stato effettuato dal *National Institutes of Health* presso l'Università di California (Los Angeles Clinical Research Center) [25]. I soggetti presi in esame sono 10, tutti con diabete di tipo 1 (2 uomini e 8 donne, età media 43.4 ± 11.4 anni, durata del diabete 18.2 ± 13.5 anni). Il controllo in catena chiusa è stato valutato per una durata di 30 ore ed i risultati sono stati confrontati sia con quelli effettuati da uno studio simile su pazienti sani sia con quelli relativi a pazienti con diabete di tipo 1 monitorati per 3 giorni attraverso il classico controllo in catena aperta con infusione di insulina tramite CSII. Dai risultati del controllo in catena chiusa, la glicemia a digiuno risultava essere di 160 ± 66 mg/dL all'inizio della somministrazione di insulina (7:00 a.m. – fig. 4.5-A); ciò indica che in alcuni soggetti, la notte, il tasso di insulina basale era insufficiente a mantenere costante la normoglicemia. I valori di glucosio prima di pranzo (1:00 p.m.) erano inferiori al livello target di 71 ± 19 mg/dL, mentre i successivi livelli pre-prandiali a colazione, spuntino e cena rientravano nel range di valori fisiologici. I livelli glicemici

post-prandiali di due ore sono risultati più alti di quelli misurati in soggetti non diabetici, studiati in condizioni simili. Ci sono stati 13 casi di ipoglicemia, di cui soltanto uno è risultato sintomatico, con 8 di questi che si sono verificati tra le 11:00 a.m. e l'1:00 p.m. (fig. 4.5-B - tutti trattati con supplemento di carboidrati). I livelli di glucosio pre-prandiali sono scesi sotto i 60 mg/dL in tre occasioni. La glicemia due ore dopo pranzo, spuntino e cena era sopra i 180 mg/dL un terzo delle volte (fig. 4.6). La concentrazione media di glucosio (fig. 4.7) era simile a quella ottenuta tramite controllo in catena aperta, ma la varianza era significativamente ridotta nel controllo in catena chiusa, dove la glicemia è stata mantenuta nel range 70-180 mg/dL il 75% delle volte, contro solo il 63% delle volte nel controllo in catena aperta.

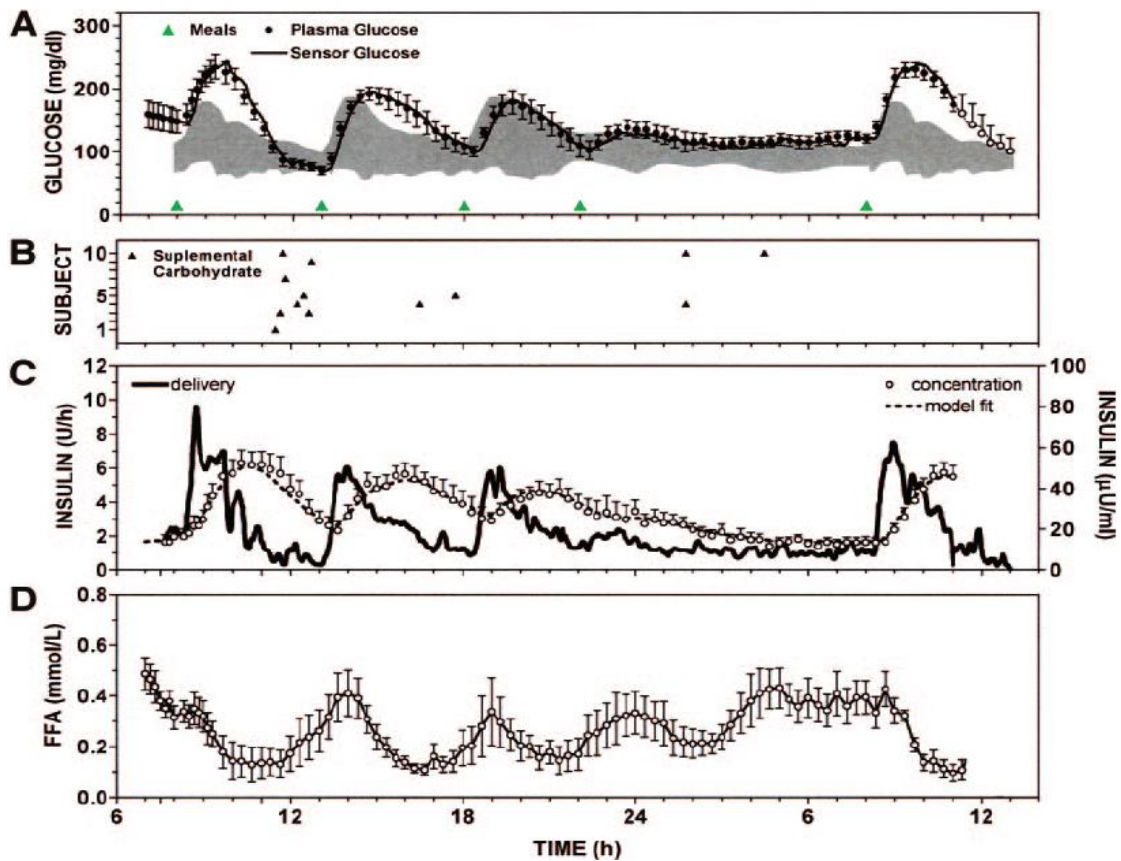


Fig. 4.5: A: livelli plasmatici di glucosio misurati con controllo in catena chiusa confrontati con quelli misurati in pazienti non diabetici (curva piena). B: istanti di tempo in cui viene somministrato glucosio aggiuntivo (il glucosio veniva somministrato ogni volta che la glicemia scendeva al di sotto di 60 mg/dL). C: curva del rilascio di insulina (curva nera) e concentrazione di insulina plasmatica (cerchi vuoti). D: livelli di acidi grassi liberi (FFA) [25]

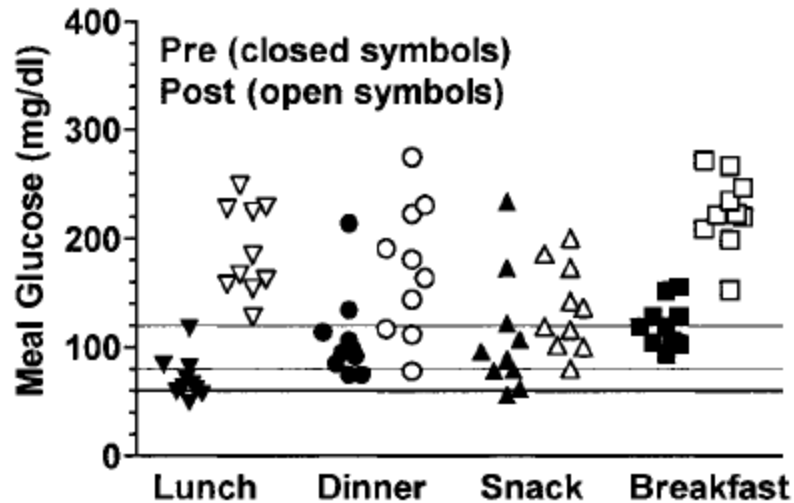


Fig. 4.6: livelli di glucosio pre e post prandiali misurati nel sistema in catena chiusa [25]

Questo studio ha dimostrato come i livelli medi di glicemia durante il controllo a circuito chiuso risultino simili a quelli ottenuti mediante terapia insulinica standard, ma la varianza rispetto al valor medio è stata significativamente ridotta. I casi di ipoglicemia sono rari, con un'incidenza simile a quella osservata in controllo in catena aperta; in entrambi i casi, l'ipoglicemia è stata rilevata dal sensore di glucosio che ha portato ad una sospensione dell'erogazione di insulina. Tuttavia, i livelli post-prandiali di glicemia nei pazienti diabetici erano più alti dei livelli fisiologici, anche a causa dell'aver scelto un target glicemico elevato (120 mg/dL) per diminuire il rischio di ipoglicemia. Per migliorare il controllo glicemico post-prandiale e diminuire i rispettivi valori glicemici si può "potenziare" la componente derivativa del controllore PID, scegliendo in maniera opportuna il relativo coefficiente. Un altro approccio per ridurre i livelli di glicemia post-prandiale consiste nel somministrare al paziente un bolo di insulina prima dei pasti.

4.7 Algoritmo di controllo MPC (Model Predictive Control)

Nonostante gli importanti sviluppi nella tecnologia dei sensori CGM e dei microinfusori, il Pancreas Artificiale deve far fronte ai ritardi ed alle imprecisioni sia nel rilevamento del glucosio che nella somministrazione di insulina. Un primo ritardo (variabile tra i 90 ed i 150 minuti) è causato dal tempo necessario per l'assorbimento di insulina: prima di entrare in azione, l'insulina iniettata nel sottocute deve passare

attraverso il plasma e poi attraverso il liquido interstiziale. Un secondo ritardo (variabile tra i 10 e i 15 minuti) è dovuto al fatto che i sensori CGM per la rilevazione della glicemia ed i microinfusori agiscono nel sottocute e non direttamente nel plasma. Ciò è particolarmente evidente quando si verifica un disturbo del sistema, ad esempio dopo un pasto o dopo aver svolto attività fisica, in cui la regolazione della glicemia non avviene immediatamente, ma dopo diversi minuti.

L'algoritmo di controllo MPC è definito di tipo "predittivo" in quanto riesce a prevedere, sulla base dei valori forniti dalle misure acquisite, l'andamento della glicemia negli istanti temporali successivi e, quindi, scegliere se confermare o modificare la quantità di insulina da infondere per mantenere la glicemia nell'intervallo fisiologico. Gli ingressi del blocco di controllo vengono calcolati in modo da minimizzare gli scarti tra la risposta desiderata e quella predetta [28].

Il controllo MPC utilizza un modello dinamico del sistema metabolico del paziente e, di conseguenza, appare più adatto per limitare i ritardi dovuti al rilevamento di glucosio ed all'infusione di insulina. Questo tipo di controllo è un ottimo strumento per quanto riguarda la previsione sugli effetti dei pasti e consente l'introduzione di vincoli sulla velocità di erogazione di insulina che ne evitano il sovradosaggio e fluttuazioni estreme dei livelli di glucosio nel sangue. Inoltre, l'algoritmo MPC può avere la capacità di "apprendimento": è stato infatti dimostrato che la classe di algoritmi predittivi di cui fa parte l'algoritmo MPC, nota come controllo *run-to-run*, è in grado di apprendere le specifiche nella routine quotidiana dei pazienti, ad esempio i tempi dei pasti, ed ottimizzare di conseguenza la risposta ad un pasto successivo usando queste informazioni [28].

4.8 Studi sperimentali in vivo con controllore MPC

Uno studio in vivo con controllore MPC è stato eseguito presso il *William Sansum Diabetes Centre* (Santa Barbara, California), su un totale di 20 pazienti con diabete di tipo 1 diagnosticato da più di un anno, età tra i 21 ed i 65 anni, utilizzo della terapia insulinica con pompa per infusione sottocutanea continua per almeno 6 mesi e HbA1c compresa tra il 5,0% (31 mmol/mol) e 10,0% (86 mmol/mol) [26]. In questo studio della durata di 27,5 ore a circuito chiuso, inoltre, sono state valutate e confrontate direttamente le prestazioni degli algoritmi di controllo MPC e PID per il pancreas artificiale. I pazienti, scelti in maniera casuale per il controllo MPC o PID, sono stati

studiati in condizioni identiche durante la notte dopo una cena da 65 g, dopo una colazione da 50 g e dopo un pasto di 65 g “non annunciato”, ovvero non previsto all’interno della giornata. L’obiettivo primario del controllo a circuito chiuso eseguito da entrambi i controllori era quello di valutare il tempo in cui i livelli glicemici dei pazienti si assestavano all’interno del normale range fisiologico (70-180 mg/dL). Gli obiettivi secondari includevano il tempo trascorso nell’intervallo ipoglicemico (< 70 mg/dL) ed il tempo trascorso nell’intervallo iperglicemico (> 180 mg/dL). I soggetti indossavano il sistema CGM e microinfusore CSII, connessi via wireless tramite un sistema portatile per Pancreas Artificiale (pAPS - *portable artificial pancreas system*).

La distribuzione cumulativa dei livelli di glucosio con controllore MPC e PID sono mostrati in figura 4.7-A. Il controllo MPC ha mostrato un tempo di permanenza nell’intervallo normoglicemico maggiore rispetto al controllo PID (74,4 % vs 63,7 %). I valori medi di glucosio per ciascun soggetto erano statisticamente più bassi per il controllore MPC rispetto al PID (138 mg/dL vs 160 mg/dL). Il controllo durante la notte è risultato buono per entrambi i controllori, mostrando tempi simili di permanenza nell’intervallo normoglicemico (89,1 % vs 83,7 %).

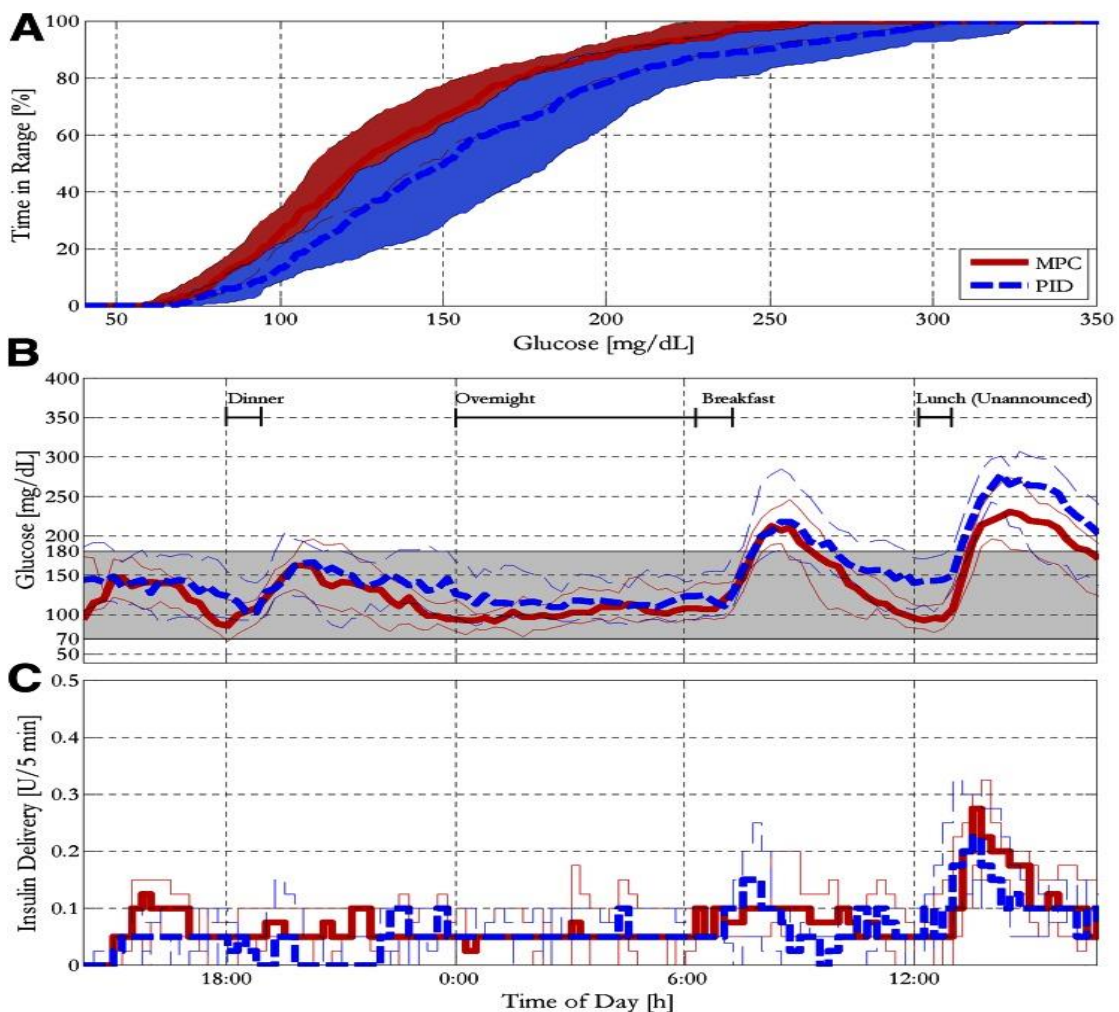


Fig. 4.7: A: distribuzione cumulativa nel tempo dei livelli di glucosio. B: livelli complessivi di glucosio. C: tracce(unità) di insulina nel tempo. Il tutto è stato ottenuto sia con controllore MPC che con controllore PID [26]

Entrambi i controllori a circuito chiuso hanno ridotto al minimo sia la percentuale degli eventi ipoglicemici, sia la durata degli stessi. L'analisi dei livelli glicemici post-prandiali per la cena non ha mostrato differenze significative tra i controllori. Sebbene il tempo nell'intervallo 70-180 mg/dL è risultato simile anche dopo la colazione da 50 g, il tempo nell'intervallo normoglicemico ristretto (80-140 mg/dL) è risultato statisticamente maggiore per MPC rispetto al PID (38,1% vs 20,9%). Dopo il pasto non previsto di 65 g, la glicemia media durante il periodo post-prandiale di 5 ore era di 181 mg/dL per MPC e 220 mg/dL per PID, e la somministrazione totale di unità di insulina è risultata simile per i due controllori.

Non ci sono stati imprevisti durante lo studio. Per un solo paziente si è verificato un caso di iperglicemia prolungata, a causa del pasto non annunciato ad alto contenuto di carboidrati; la sessione di studio è stata prontamente interrotta ed un bolo di insulina è stato somministrato in maniera manuale.

Questo studio che confronta le prestazioni dei controllori MPC e PID a circuito chiuso ha mostrato che entrambi hanno ottenuto buoni risultati, anche dopo il pasto non annunciato e con bassi tassi di ipoglicemia. In particolare, il controllore MPC ha mostrato un miglioramento nel controllo del glucosio rispetto al PID, con un tempo di permanenza nella fascia normoglicemica ristretta maggiore durante l'intera durata dello studio.

Tuttavia, la durata della sessione di 27,5 ore a circuito chiuso è ancora troppo breve per poter determinare in modo definitivo come potrebbero funzionare gli algoritmi per periodi di tempo prolungati. Inoltre, altre variabili, come l'esercizio fisico, non sono state considerate.

Si conclude che il controllore MPC ha eguagliato e sovraperformato il controllore PID su tutti i parametri clinici di controllo presi in esame, sebbene entrambi abbiano fornito una gestione glicemica sicura ed efficace e sembrano adatti per future applicazioni del pancreas artificiale. Gli studi futuri dovrebbero continuare a riportare i risultati in condizioni non ideali (per esempio, sotto sforzo fisico continuato), in modo

da poter verificare a livello clinico la validità del controllo a circuito chiuso per un suo uso diffuso.

4.9 Il futuro del Pancreas Artificiale

Lo sviluppo futuro del Pancreas Artificiale sarà notevolmente accelerato utilizzando la modellazione matematica e la simulazione al computer. Negli ultimi decenni sono stati proposti tantissimi modelli di simulazione che sono stati utilizzati per valutare le prestazioni degli algoritmi di controllo. Tuttavia, questi modelli sono solo in grado di simulare la dinamica della popolazione media, ma non la variabilità interindividuale dei parametri metabolici. La conoscenza della variabilità intersoggettiva è cruciale per la progettazione di controllori affidabili, in quanto fornisce preziose informazioni sulla loro sicurezza e sui loro limiti. Perciò, il passo successivo sarà quello di realizzare dei simulatori che descrivano virtualmente la variabilità metabolica intersoggettiva.

4.10 Il Pancreas Bio-Artificiale

Il Pancreas Bioartificiale è un dispositivo che replica il normale funzionamento di un pancreas sano grazie all'incapsulamento delle isole di Langerhans mediante delle membrane artificiali che le proteggono dall'attacco immunitario. Le isole, che vengono donate da un pancreas sano, sono rivestite con una membrana semipermeabile che blocca le cellule e le molecole del sistema immunitario ospite, ma che è permeabile ai nutrienti essenziali, al glucosio e all'insulina. Diversi studi sperimentali condotti su ratti e cani hanno dimostrato che la microincapsulazione delle Isole di Langerhans è fattibile. Tuttavia, il tempo di vita limitato delle isole microincapsulate ed il rischio di un insufficiente apporto di ossigeno alle stesse sono ostacoli che devono ancora essere superati per rendere questo approccio clinicamente valido.

4.11 La tecnologia “Islet Sheet”

Il metodo recentemente sviluppato che consente l'isolamento delle Isole di Langerhans prende il nome di “Islet Sheet technology” e prevede l'utilizzo di foglietti biocompatibili di alginato, un polisaccaride carboidrato dell'acido manuronico e guluronico estratto dall'alga bruna. Per consentire la diffusione di ossigeno, glucosio,

insulina e metaboliti è necessario che la barriera immunoprotettiva non sia troppo spessa. Generalmente le dimensioni di una Islet Sheet sono 4cm x 8cm x 250µm. Il processo di produzione delle Islet Sheet è altamente riproducibile e offre molte opportunità per misure di controllo di qualità del tutto che contribuiranno a ulteriori sviluppi clinici.

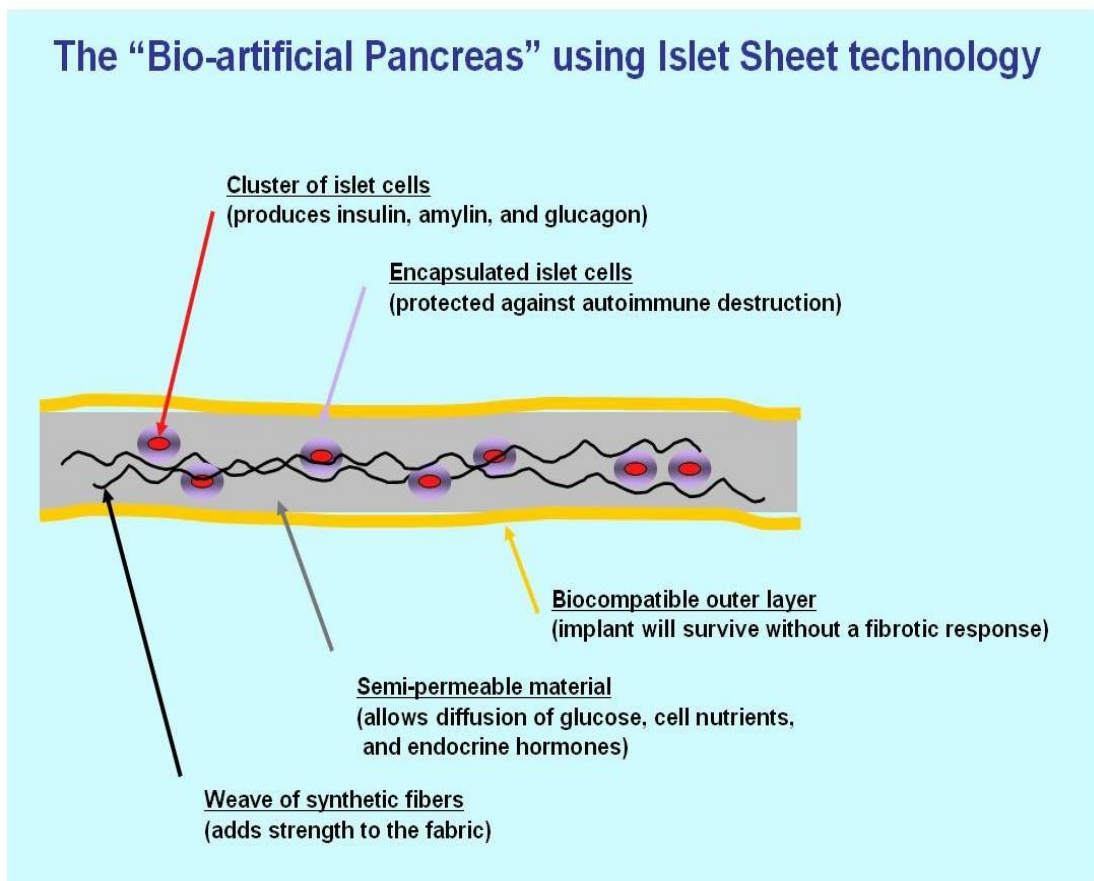


Fig. 4.8: sezione di una Islet Sheet. Due strati di alginato, con funzione immunoprotettiva, racchiudono fino al 40% in volume di isole, che sono legate tramite un materiale polimerico che ha la funzione di rinforzo fisico [24]

Le difficoltà che si riscontrano nell'utilizzo di questa tecnologia sono diverse: innanzitutto, l'ossigeno trova difficoltà a permeare completamente il dispositivo bioartificiale ed un suo insufficiente apporto alle isole causa la morte delle stesse per ipossia. Inoltre, come per qualunque dispositivo bioartificiale da impianto, la superficie delle membrane può provocare una reazione da corpo estraneo con conseguente formazione di una capsula fibrotica che impedisce ai nutrienti di permeare la

membrana ed accedere alle isole. Un altro problema è il danneggiamento delle isole durante la fase di preparazione. Gli approcci sperimentali utilizzati per superare il problema della morte delle isole per ipossia includono la stimolazione dei vasi sanguigni attorno ai dispositivi impiantati, la maggior permeabilità all'ossigeno dei foglietti di alginato, la generazione di ossigeno in situ biologico, vicino alle isole, mediante un processo elettrochimico o di fotosintesi locale. Tuttavia, nessuno di questi metodi è abbastanza efficiente da mantenere condizioni fisiologiche vitali per un lungo periodo di tempo.

I risultati più incoraggianti sono stati ottenuti da uno studio su ratti resi diabetici tramite l'utilizzo di streptozotocina (STZ), un agente alchilante presente in natura altamente tossico per le cellule β . Dopo l'impianto nei roditori delle isole incapsulate, i livelli di glucosio sono stati mantenuti stabili in fascia normoglicemica durante l'intero periodo di studio di 90 giorni. Dopo l'espianto della Islet Sheet, i ratti sono ritornati immediatamente allo stato diabetico [24].

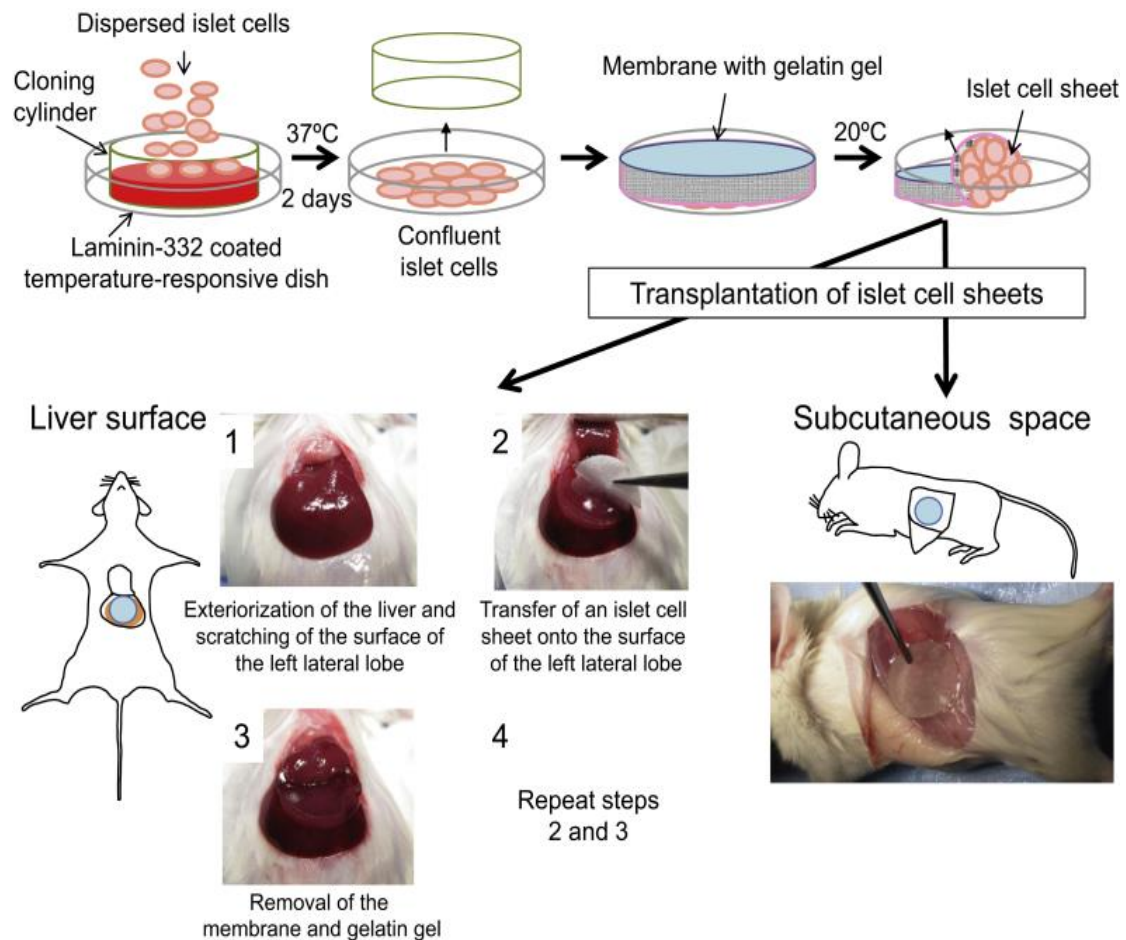


Fig. 4.9: schema del recupero e del trapianto di una Islet Sheet. Le cellule incapsulate nei foglietti biocompatibili sono state coltivate per due giorni a 37 °C; successivamente, la Islet Sheet è stata trapiantata sulla superficie del fegato o negli spazi sottocutanei dei topi resi diabetici tramite streptozotocina [24]

4.12 Il futuro del Pancreas Bioartificiale

I risultati della ricerca sull'impianto delle isole immunoprotette su animali progrediscono di anno in anno, ma la ricerca non è ancora matura per una sperimentazione sugli esseri umani. Quindi, si è ancora lontani dal traguardo di un possibile utilizzo del Pancreas Bioartificiale sull'uomo. Una volta raggiunto tale traguardo si dovrà comunque tener conto della generale carenza di organi donatori.

Conclusioni

Nel corso dell'ultimo decennio sono state sviluppate nuove tecnologie per la terapia del diabete che hanno consentito una gestione efficace e sicura della patologia. Infatti, l'obiettivo di questo sviluppo tecnologico è volto a migliorare la qualità di vita del paziente. L'introduzione sul mercato dei dispositivi CGM ha portato ad un miglioramento significativo nella gestione della malattia poiché, rispetto all'SMBG, essi permettono di individuare un numero maggiore di eventi ipo/iperglicemici e consentono un'analisi retrospettiva dell'andamento glicemico, in base al quale è possibile aggiustare la terapia. I dispositivi CGM riescono, infatti, a prevedere questi eventi indesiderati generando per esempio un allarme con 20/30 minuti di anticipo. I dispositivi di ultima generazione attualmente disponibili incorporano in un unico sistema il monitoraggio continuo della glicemia e l'infusione sottocutanea di insulina.

L'innovazione più importante nel monitoraggio della glicemia è il controllo a circuito chiuso. Fin dagli anni '70 sono stati proposti modelli di controllo in catena chiusa, che differiscono dal generale controllo in catena aperta perché dispongono dell'azione correttiva apportata dal feedback. Questi, generalmente indicati col nome di Pancreas Artificiale, offrono maggiori garanzie di successo nel controllo glicemico. Nel presente elaborato sono stati analizzati due algoritmi di controllo per il Pancreas Artificiale: il controllore PID e il controllore MPC. Dal confronto tra studi sperimentali in vivo presenti in letteratura è emerso che entrambi garantiscono una buona affidabilità nel controllo in catena chiusa, ma il controllore MPC ha mostrato un maggior tempo di permanenza in fascia euglicemica. Lo sviluppo futuro nella tecnologia del Pancreas Artificiale riguarda principalmente questi algoritmi di controllo alla base del sistema; infatti, si andrà a testare la funzionalità degli algoritmi predittivi in condizioni fisiologiche che possono esulare dal normale contesto quotidiano, ovvero in concomitanza di pasti più variegati e "non annunciati", condizioni di stress e di intensa attività fisica.

Infine, il Pancreas Bioartificiale si propone come la tecnologia più interessante nella terapia del diabete. La possibilità di incapsulare le isole di Langherans del

pancreas pone le basi per una possibile cura della patologia. Tuttavia, la presenza di variabili non ancora risolte, quali il limitato tempo di vita delle isole microincapsulate, la bassa permeabilità all'ossigeno del dispositivo, la possibilità di formazione di una capsula fibrotica e l'elevato rischio di danneggiamento delle isole durante la fase di preparazione, rendono questa recente tecnologia non ancora pronta per essere utilizzata sull'uomo.

Bibliografia

- [1] Dee Unglaub Silverthorn. *Fisiologia Umana*, Pearson editore, 788-801.
- [2] Longo, Fauci, Kasper, Hauser, Jameson, Loscalzo. *Principi di medicina interna*, CEA editore, 1735-1741, 2962-2973.
- [3] <https://www.istat.it/it/archivio/202600> (estratto il 28/03/2019): Dati Istat sulla popolazione italiana affetta da diabete.
- [4] <http://www.treccani.it/enciclopedia/tag/diabete/> (estratto il 28/03/2019): Percentuale totale di diabetici nel mondo.
- [5] <http://www.storiadellamedicina.net/leonard-thompson-primo-paziente-curato-linsulina/> (estratto il 03/04/2019): Leonard Thompson, primo paziente curato con insulina.
- [6] P. Cavallo Perin, S. Lostia, A. Maldonato, N. Musacchio, F. Purrello, G. Vespasiani (2003). *Raccomandazioni sull'uso dell'autocontrollo domiciliare della glicemia*, Associazione Medici Diabetologi – Società Italiana di Diabetologia.
- [7] Dipartimento di Scienze della Salute, Università Magna Grecia, Catanzaro (2017). *Accuratezza dell'automonitoraggio glicemico (SMBG)*, Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo, 37: 194-201.
- [8] P. Di Bartolo, S. Gentile, G. Grassi, D. Iafusco, A. Maran (2010). *Nuove tecnologie nella cura del diabete: recenti sviluppi e prospettive future*, Collana editoriale AMD.

[9] A. Brambilla, R. Bonadonna, I. Cacciapuoti, M. C. Camicchi, A. Dei Cas, P. Di Bartolo, S. Di Mario, V. Manicardi, R. Stara (2015). *Linee di indirizzo regionali per un uso appropriato dei dispositivi medici per l'autocontrollo e l'autogestione nel diabete mellito*, Comitato di Indirizzo Regionale per la Malattia Diabetica, Regione Emilia-Romagna.

[10] L. Vignatelli, F. Trimaglio, M. Camerlingo, A. Negro, S. Maltoni, L. Ballini (2014). *Dispositivi per il monitoraggio continuo del glucosio e l'infusione continua di insulina nel diabete mellito. Sintesi comparativa delle linee guida internazionali*. Dossier n. 248 - Osservatorio regionale per l'innovazione, Agenzia sanitaria e sociale regionale, Regione Emilia-Romagna.

[11] S. Maltoni, A. Negro, F. Trimaglio, L. Vignatelli, L. Ballini (2012). *Dispositivi medici innovativi nella gestione del diabete*. Short Report n. 6 - Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale - Regione Emilia-Romagna, Bologna.

[12] M. G. Baroni, A. Giaccari, A. De Micheli, M. Gallo, A. Franzese, S. Zucchini (2017). *Analoghi rapidi dell'insulina*.

[13] D. Bruttomesso, A. Pianta, D. Crazzolaro, A. Girelli, A. Tiengo (2003). *Stato attuale della terapia con microinfusori in Italia*.

[14] M. Miselli (1997). *Dispositivi per la somministrazione di insulina*.

[15] N. Scarpa, L. Pais dei Mori (2007). *Somministrazione dell'insulina*. Dossier InFad n. 25.

[16] A. Girelli, P. Di Bartolo (2018). *La terapia con microinfusore oggi: cosa considerare per una scelta appropriata dello strumento?*. Rivista Media, 18: 102-108.

[17] Medtronic, *Guida introduttiva al Sistema MiniMed™ 640G*. Depliant scheda tecnica

[18] <http://www.freestylelibre.it> (estratto il 18/05/2019): FreeStyle Libre, Abbott Diabetes Care, scheda tecnica.

[19] <https://freestylediabetes.co.uk/our-products/other-meters/freestyle-navigator-2> (estratto il 16/05/2019): FreeStyle Navigator™, Abbott Diabetes Care, scheda tecnica.

[20] <https://www.dexcom.com/media/dexcom-seven-plus> (estratto il 15/05/2019): Dexcom Seven-Plus®, Dexcom, scheda tecnica.

[21] S. A. Weinzimer (2004). *PENDRA: the once and future noninvasive continuous glucose monitoring device*. *Diabetes Technology & Therapeutics*, Vol. 6, No. 4.

[22] E. Tsalikian, R. Beck, W. Tamborlane, H. Peter Chase, B. Buckingham, S. Weinzimer, N. Mauras, K. Ruedy, C. Kollman, D. Xing (2004). *Accuracy of the GlucoWatch G2 Biographer and the Continuous Glucose Monitoring System During Hypoglycemia*. *Diabetes Care*, 27(3): 722-726.

[23] C. Cobelli, E. Renard, B. Kovatchev (2011). *Artificial Pancreas: Past, Present, Future*. *Diabetes Journal*, 60(11): 2672–2682.

[24] Fujita, R. Utoh, M. Yamamoto, T. Okano, M. Yamato (2018). *The liver surface as a favorable site for islet cell sheet transplantation in type 1 diabetes model mice*. *Regenerative Therapy*, 8: 65–72.

[25] G. M. Steil, K. Rebrin, C. Darwin, F. Hariri, M. F. Saad (2007). *Feasibility of Automating Insulin Delivery for the Treatment of Type 1 Diabetes*. *Diabetes*, vol. 55.

[26] J. E. Pinsker, J. Bok Lee, E. Dassau, D. E. Seborg, P. K. Bradley, R. Gondhalekar, W. C. Bevier, L. Huyett, H. C. Zisser, F. J. Doyle (2016). *Randomized Crossover Comparison of Personalized MPC and PID Control Algorithms for the Artificial Pancreas*. *Diabetes Care*, 39(7): 1135–1142.

[27] E. Trifoglio. Tesi: *Il monitoraggio continuo del glucosio: sviluppo di una metodologia per il confronto e l'ottimizzazione di algoritmi predittivi.*

[28] G. Acciaroli. Tesi: *Algoritmi di controllo per il Pancreas Artificiale.*

[29] G. Minozzi. Tesi: *Il sistema di controllo glucosio-insulina e Pancreas Artificiale.*