

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE :
BASI MOLECOLARI DELL'AZIONE ORMONALE
XXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO:

“Effetti degli agonisti del recettore del Glucagon Like Peptide - 1 (rGLP-1) sull'equilibrio del sistema nervoso autonomico: studio comparativo in pazienti diabetici di tipo 2 trattati con terapia insulinica associata ad ipoglicemizzanti orali”.

Dr. Alberto Massimino

Anno Accademico 2010-2011

Docente Tutor/Coordinatore:
Prof. RICCARDO VIGNERI

Paragrafi

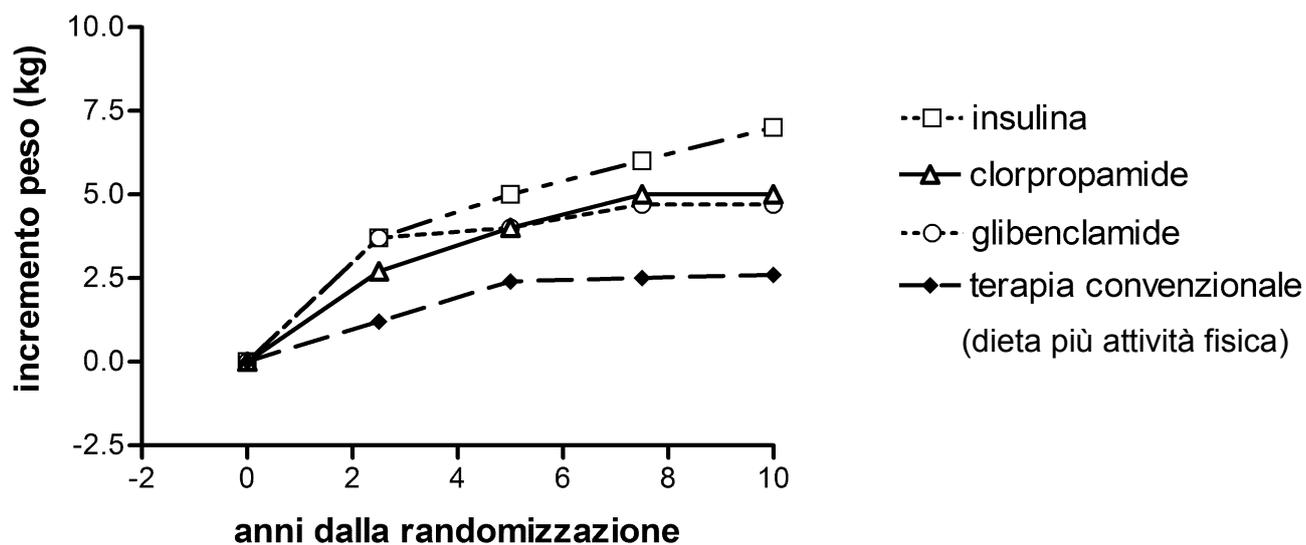
1. Introduzione	p.	3
2. Azioni dell'insulina sul Sistema Nervoso Autonomico	p.	7
3. Azione del GLP-1 (incretina) sul sistema nervoso autonomico e cardiovascolare	p.	9
4. Metodi indiretti e diretti di valutazione del sistema nervoso autonomico simpatico e parasimpatico cardiaco	p.	13
5. Scopo dello studio sperimentale	p.	18
6. Pazienti	p.	19
7. Metodi	p.	20
8 Statistica	p.	22
9. Risultati	p.	23
10. Discussione	p.	30
11. Conclusioni	p.	32
12. Bibliografia	p.	33

1. Introduzione

L'associazione tra diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica è caratterizzata dalla presenza di obesità centrale, iperglicemia, ipertensione arteriosa, elevati livelli di trigliceridi e bassi livelli di colesterolo HDL, anomalie emocoagulative, insulino resistenza ed iperinsulinemia (1-3). Questa condizione clinica si associa ad incremento dell'attività del sistema nervoso autonomo simpatico che correla con lo stato di insulino resistenza (4) e si osserva anche per livelli insulinici compresi nel range di normalità (5) ed è indipendente dall'attività adrenomedullare che nei soggetti diabetici con sindrome metabolica è normale o ridotta (7-9). L'iperattivazione simpatica ha implicazioni cliniche in quanto determina ipertrofia dei miocardiociti ed incremento della massa del ventricolo sinistro. Questo effetto si esercita indipendentemente dai livelli di pressione arteriosa essendo prevalentemente associato alla stimolazione simpatica degli adrenocettori di tipo β_3 che, in tali condizioni, non funzionerebbero adeguatamente (10-12). La sola riduzione del peso corporeo, comunque determinata, è sufficiente a ridurre il tono simpatico (13) ma spesso è necessario, per normalizzare i valori glicemici, ricorrere alla terapia ipoglicemizzante se il solo cambiamento dello stile di vita è insufficiente.

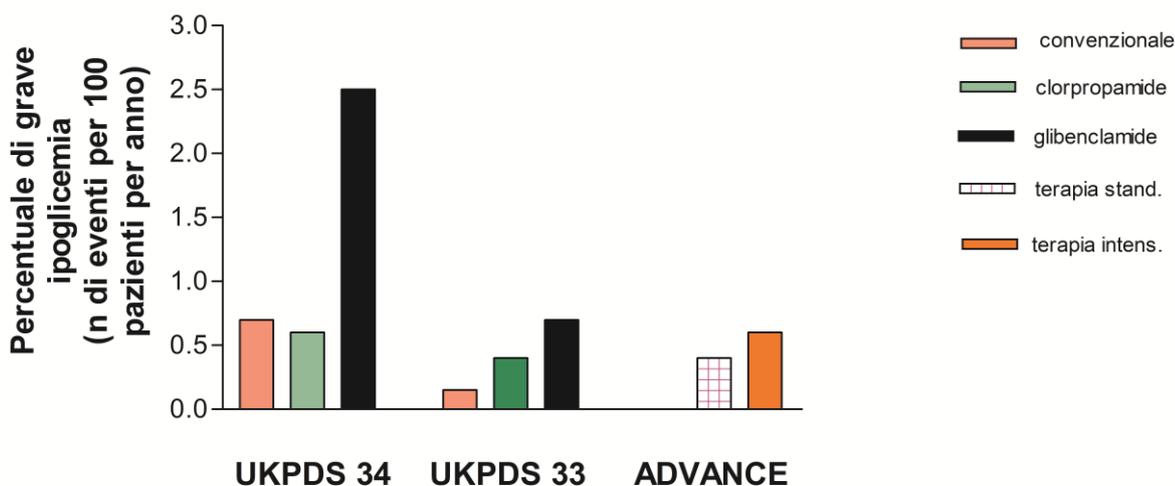
Tuttavia la terapia ipoglicemizzante per via orale o insulinica per via parenterale causa spesso effetti collaterali quali un significativo incremento di peso (14) (Fig. 1) e la possibilità di indurre episodi di grave ipoglicemia (15,16) (Fig. 2).

Fig.1



Incremento ponderale associato a differenti schemi di terapia ipoglicemizzante orale.

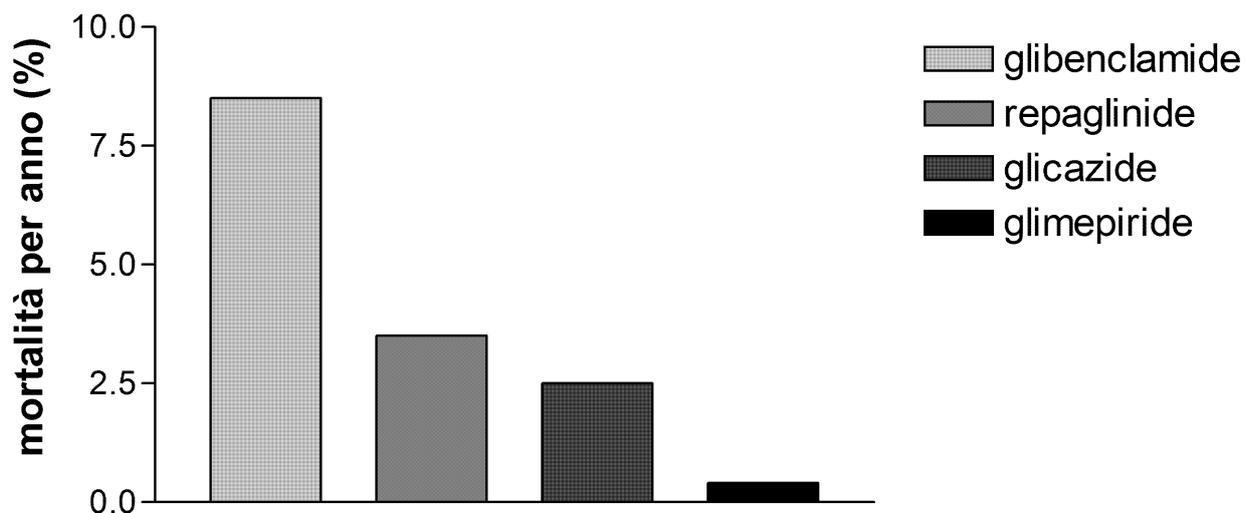
Fig. 2



Incidenza degli eventi ipoglicemici gravi negli studi UKPDS 33, UKPDS 34 ed ADVANCE durante terapia insulinica intensiva o standard, terapia dietetica (convenzionale) ed ipoglicemizzante orale

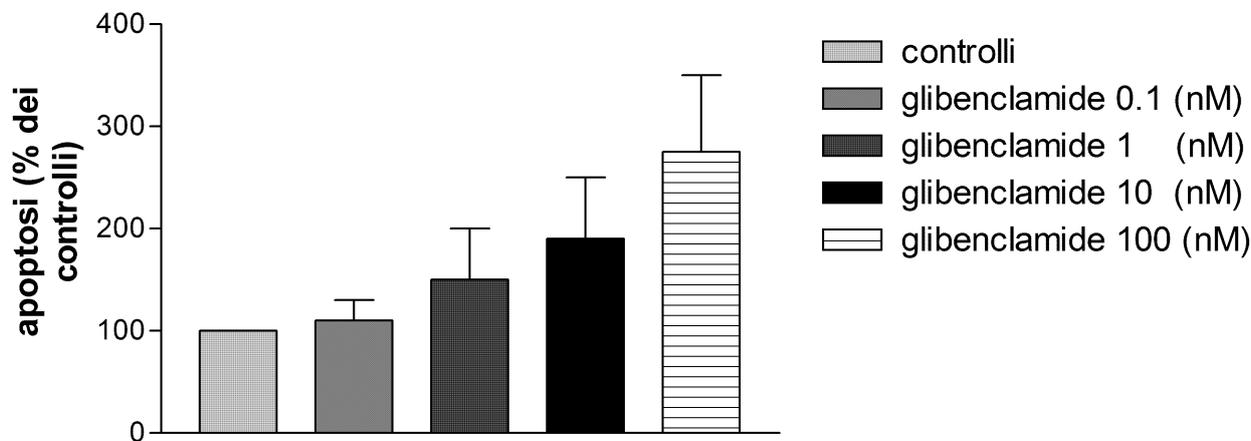
Alcuni farmaci ipoglicemizzanti, primo tra tutti la Glibenclamide, possono addirittura aumentare il rischio cardiovascolare ed accelerare l'insorgenza delle complicanze macro e microvascolari perché oltre a determinare aumento ponderale, potrebbero causare un più rapido esaurimento della capacità secretoria β cellulare (Fig. 3,4)

Fig.3



Correlazione tra mortalità e differenti tipi di ipoglicemizzanti orali ad azione secretagoga. Monami et Al. Diabetes Metab Res Rev 22:477-82, 2006

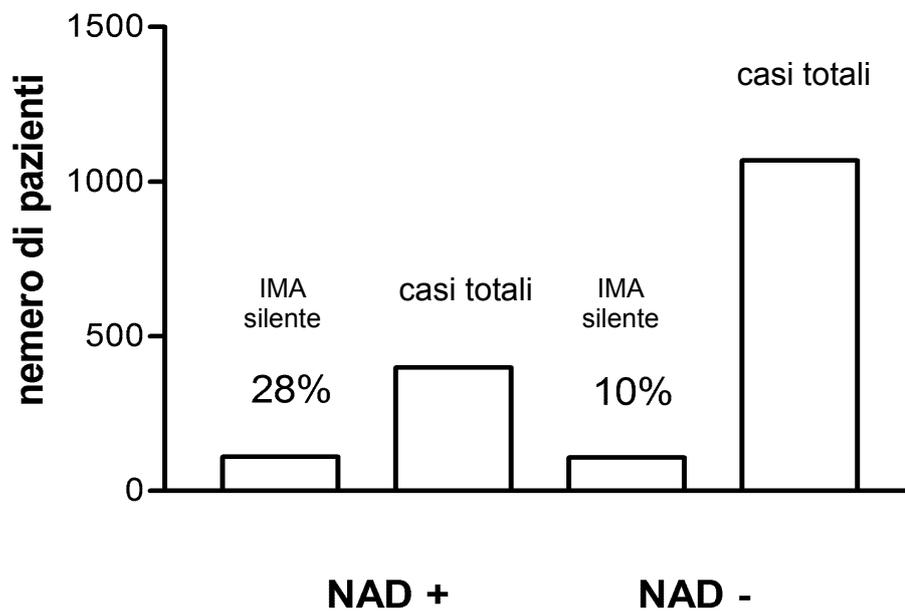
Fig. 4



Correlazione tra dosi crescenti di glibenclamide ed apoptosi cellulare. Meadier K et Al., J Clin Endocrinol Metab, 2005

L'aumento del rischio cardiovascolare può dipendere, oltre che dal compenso glicometabolico (16,17), da una alterazione della bilancia simpato-vagale, dovuta ad una riduzione del tono parasimpatico cardiaco che predispone all'ischemia, alle aritmie ed alla morte improvvisa (18) (Fig. 5)

Fig.5



*IMA = infarto miocardico; NAD = neuropatia autonoma diabetica.
Rapporto tra neuropatia autonoma e cardiopatia ischemica silente.
Metanalisi di 12 studi*

2. Azioni dell'insulina sul sistema nervoso simpatico

L'insulina stimola l'attività del sistema nervoso simpatico (SNS) anche a concentrazioni plasmatiche comprese nel range della normalità. I soggetti obesi, con o senza diabete di tipo 2, hanno una iperattività del SNS che è proporzionalmente maggiore quanto maggiore è la distribuzione dell'adipe a livello viscerale (19). Questa iperattivazione del SNS da parte dell'insulina è probabilmente dovuta al ruolo che l'insulina ed il SNS svolgono l'una come ormone anabolizzante l'altro come regolatore dell'assunzione di cibo (20). L'insulina infatti è un regolatore ipotalamico dell'attività del SNS in rapporto all'introito calorico, regolando il metabolismo del glucosio a livello di specifici neuroni ipotalamici che a loro volta modulano il tono del SNS. In condizioni di insulinoresistenza con iperinsulinemia compensatoria, l'iperattivazione del SNS determina una riduzione dell'utilizzazione periferica di energia (effetto contro regolatore sul metabolismo) (21). L'incremento acuto dei livelli di insulina, sia quando indotto farmacologicamente (mediante Clamp euglicemico) sia determinato fisiologicamente, stimola l'attività del SNS, valutata mediante la misurazione dei livelli plasmatici delle catecolamine o mediante la registrazione microneurografica dei potenziali d'azione dei nervi del SNS captati a livello dei vasi della muscolatura striata. In particolare sia l'infusione acuta che l'iperinsulinizzazione cronica inducono un re-setting del controllo autonomo dell'attività cardiaca che è principalmente legato alla iperattivazione simpatica (22-23). Mediante studi di elettrofisiologia sono state infatti evidenziate a livello cardiaco terminazioni nervose sia simpatiche che parasimpatiche che costituiscono il sistema nervoso autonomo simpatico e parasimpatico cardiaco (SNPC e SNSC). L'alterazione del controllo autonomo cardiaco è associata all'incremento della pressione arteriosa ed in generale del rischio cardiovascolare. Tale associazione è stata dimostrata

da alcuni autorevoli studi che hanno evidenziato una correlazione significativa tra il livello di insulino resistenza, l'ipertensione arteriosa ed i livelli di attività del SNS (24).

Queste evidenze supportano fortemente l'ipotesi che l'iperinsulinemia/insulino resistenza è direttamente implicata nella patogenesi della mortalità cardiovascolare associata al Diabete di tipo 2 attraverso l'iperattivazione del sistema nervoso simpatico cardiaco (25-27). Questa azione insulinica si esercita a 2 livelli: 1) sul sistema nervoso centrale (SNC), dove l'insulina attraversa la barriera ematoencefalica legandosi a specifici recettori presenti nel SNC ed a livello ipotalamico; 2) in periferia, a livello del sistema Nervoso Simpatico Cardiaco, dove l'effetto dell'insulina è mediato dagli acidi grassi non esterificati (NEFAs) e dalla via biochimica ossido nitrico/arginina (NO/arginina)(28-29). Fisiologicamente l'insulina determina un effetto vasodilatatorio agendo sulla produzione locale di NO e contemporaneamente stimolando le afferenze nervose ad effetto vasodilatatorio.

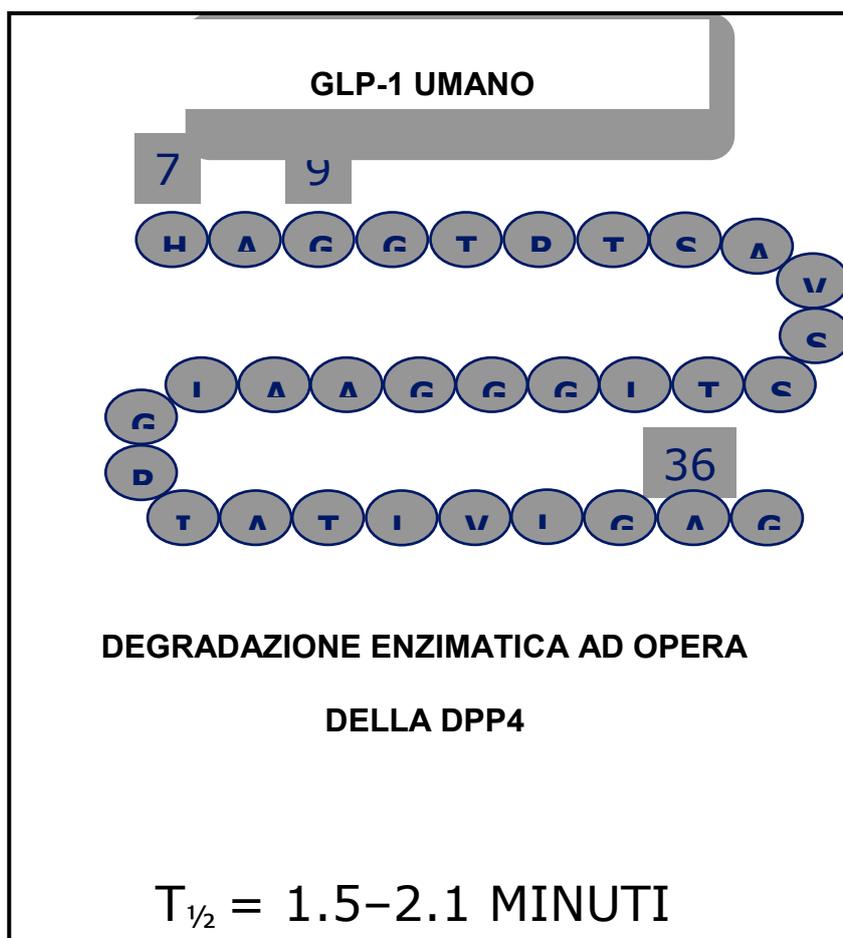
In condizioni normali esiste un equilibrio tra l'azione dell'insulina a livello centrale (SNC) simpatico-eccitatoria (mediata da peptidi del SNC) e quella periferica, inibitoria sul SNS (mediata dal rilascio di NO) dell'insulina. Tuttavia, in condizioni di insulino resistenza/iperinsulinismo l'equilibrio tra questi 2 sistemi viene perso, con conseguente riduzione della produzione di NO ed un aumento dei NEFA che determinano a loro volta un'iperattivazione del SNS (30).

In ultima analisi l'insulinoresistenza/iperinsulinismo finisce col determinare una iperattivazione del SNS ad azione vasocostrittoria e conseguentemente aumentare il rischio cardiovascolare. Questo dato è confermato da recenti studi scientifici che hanno evidenziato, mediante Power Spectral Analysis dell'intervallo R-R, un incremento del rapporto tra la componente a bassa frequenza (LF) e la componente ad alta frequenza (HF) del sistema nervoso autonomico (bilancia simpato/vagale) in pazienti con incremento dei NEFA (in fase post prandiale) (31).

3. Azione del GLP-1 (incretina) sul sistema nervoso autonomo e cardiovascolare

Recentemente, le “incretine”, una nuova classe di farmaci ipoglicemizzanti derivati sintetici del Glucagon Like Peptide I (GLP-1), ha evidenziato un effetto neuro modulatore sull’attività del sistema nervoso simpatico nei pazienti con diabete di tipo 2 (32). Il GLP-1 umano è derivato dal clivaggio della molecola del Proglucagone ed è secreto dalle cellule L dell’ileo insieme al GLP-2, immediatamente dopo l’ingestione di nutrienti e per tale motivo è corretto sostenere che meccanismi sia di tipo endocrino che di tipo neurologico regolino la secrezione di incretine (32). Il GLP-1 dopo 1-2 minuti dalla sua secrezione viene degradato da parte dell’enzima Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), o adenosine deaminase complexing protein 2 o CD26 (Fig. 6)

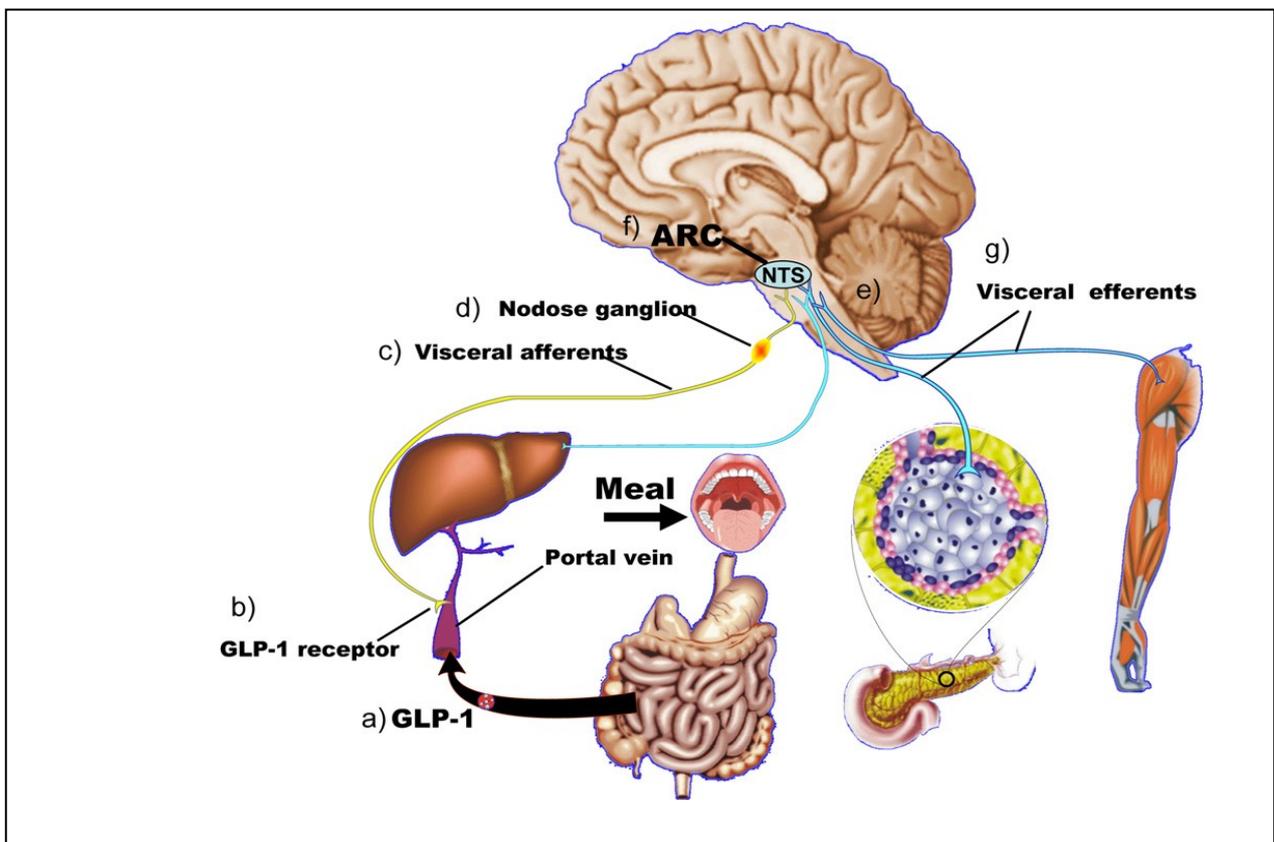
Fig. 6



Struttura ed emivita plasmatica del GLP-1 nativo

Il Glp-1, oltre alla regolazione da parte dei nutrienti, è sottoposto a meccanismi di neuro-regolazione ed è esso stesso un neuro-regolatore (33), interagendo tramite le afferenze vagali del sistema portale con specifici neuroni ipotalamici che esprimono il recettore del GLP-1. Questi neuroni a loro volta regolano la risposta del sistema nervoso autonomo all'apporto calorico interagendo con alcuni nuclei del tronco encefalico (34): nucleo Arcuato (ARC) e nucleo del Tratto Solitario (NTS) (Fig.7),

Fig. 7



Principali vie vagali afferenti ed efferenti attivate dal GLP-1. ARC = nucleo arcuato, NTS = nucleo del tratto solitario

In questo network, che riguarda sia il sistema nervoso centrale che quello periferico, il GLP-1 regola l'output del sistema nervoso autonomo simpatico sul sistema cardiovascolare.

Il ruolo del GLP-1 a livello nervoso e cardiovascolare è documentato da diverse osservazioni :

a) Il GLP-1 oltre che secreto dalle cellule L ileali è anche sintetizzato dai neuroni del nucleo del tratto solitario del SNC.

b) Sono stati riscontrati recettori per il GLP-1 a livello cardiaco ed in alcune aree del SNC che modulano il controllo del sistema nervoso autonomo (35).

c) Evidenze scientifiche supportano l'ipotesi che specifiche vie nervose formate dalle efferenze dei sistemi parasimpatico e simpatico siano capaci di mediare l'effetto periferico del GLP-1 sulla variabilità della frequenza cardiaca (HRV) (36-37).

Analisi elettrofisiologiche hanno infatti evidenziato l'attivazione dei neuroni del nucleo del nucleo del tratto solitario e dei motoneuroni del nucleo dorsale del nervo vago dopo somministrazione periferica di Exendina -4 (Ex-4) un agonista sintetico del recettore del GLP-1 (GLP-1R) (36). In alcuni roditori gli agonisti del GLP-1 hanno un effetto cronotropo e modulatore della pressione arteriosa, con effetto dose-dipendente (37). Nel modello sperimentale di cani affetti da miocardiopatia indotta farmacologicamente, la somministrazione di agonisti del GLP-1R migliora la gittata cardiaca e la pressione arteriosa (38). In pazienti con infarto acuto del miocardio la somministrazione di GLP-1, in infusione continua parenterale, migliora la funzione del ventricolo sinistro e determina vasodilatazione (Basu A, Nystrom T) (39-40). Inoltre, in particolari condizioni di iperinsulinismo/insulinorestenza in cui notoriamente la produzione di NO è ridotta a favore dell'incremento dei NEFA che iperattivano il sistema nervoso simpatico, il GLP-1 è in grado di modulare l'attività della bilancia simpatico/vagale mediante l'incremento della produzione di NO, riducendo l'attività dei NEFA e svolgendo quindi un ruolo importante nell'equilibrio simpato/vagale cardiaco (41).

I dati che legano l'attività del sistema cardiovascolare, del GLP-1 e del sistema nervoso centrale ed autonomo sono quindi complessi e non del tutto chiari, specialmente quando vengono confrontati gli studi sugli animali con gli studi sull'uomo. Per tale motivo, considerando che l'alterazione del sistema nervoso autonomo nel paziente diabetico è la causa principale della cardiopatia ischemica

silente e della morte improvvisa, gli studi di questi rapporti nei pazienti diabetici sono di grande interesse per la ricaduta clinica che possono avere.

4. Metodi indiretti e diretti di valutazione del sistema nervoso autonomico simpatico e parasimpatico cardiaco:

A- Tests di Ewing

Tra i tests di valutazione della risposta riflessa cardiovascolare i più diffusi ed i più profondamente conosciuti nelle loro basi fisiopatologiche sono:

- 1) lo studio delle variazioni della frequenza cardiaca (HRV) sotto respirazione profonda e dopo cambiamento posturale (tests del Deep Breathing e del Lying to Standing);
- 2) la variazione assoluta della pressione arteriosa dopo cambiamento posturale (test del blood pressure response to standing)(42).

Accanto a questi test tradizionali di valutazione della risposta riflessa cardiovascolare sono stati recentemente sviluppati altri metodi che, determinando i livelli plasmatici di noradrenalina e/o effettuando l'analisi spettrale delle variazioni della frequenza cardiaca (Heart Rate Variation Power Spectral Analysis), quantizzano il grado di compromissione del sistema nervoso autonomico simpatico e parasimpatico del cuore.

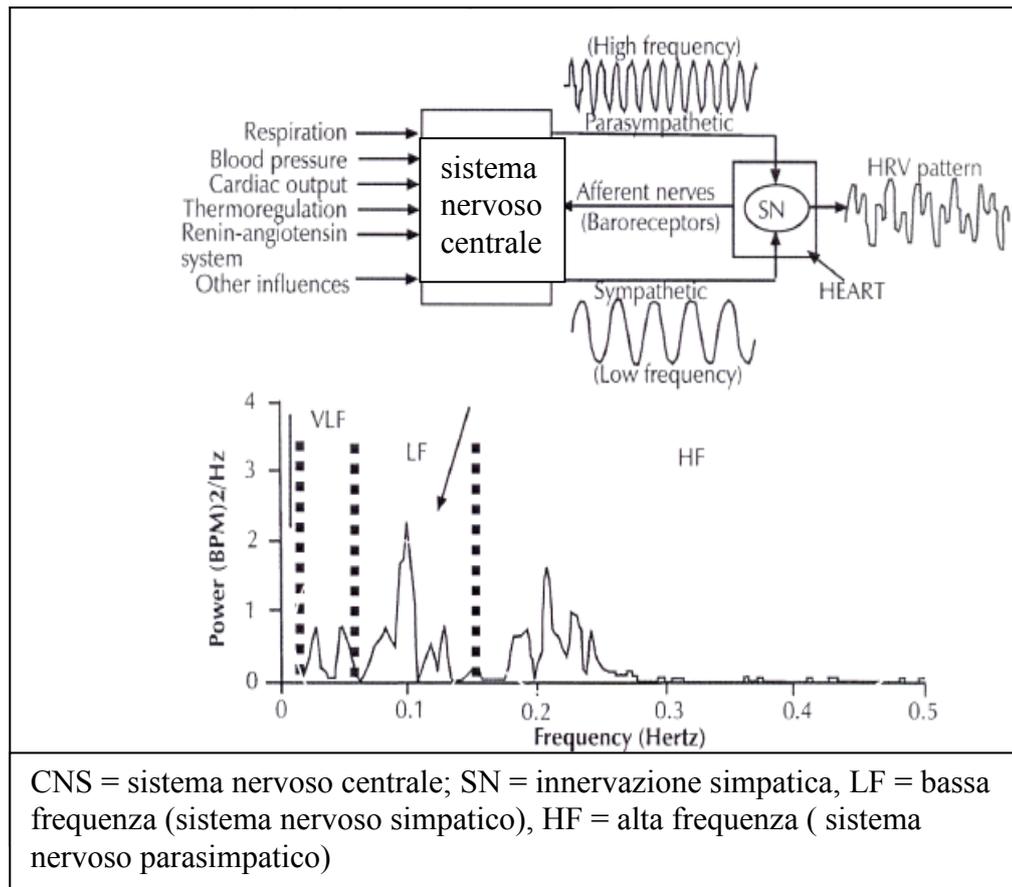
B - Studio dell' Heart Rate Variation (HRV) mediante Power Spectral Analysis

L' Heart Rate Variation Power Spectral Analysis (HRVPSA, "analisi nel dominio della frequenza R-R") è la tecnica di prima scelta per la valutazione della disfunzione autonoma cardiaca perché è economica, facile da usare e riproducibile (9,43). Questo test ha il vantaggio di valutare l'insieme delle variazioni dell'intervallo R-R, ma anche le oscillazioni di R-R osservabili a frequenze diverse ed il relativo impatto sulla variabilità della modulazione simpatica e parasimpatica a livello cardiaco, la frequenza cardiaca è infatti il risultato di una complessa interazione tra le caratteristiche del pace maker sinusale e le attività del sistema nervoso vagale e del sistema nervoso simpatico. L'analisi spettrale dell'intervallo R-R valuta 2 differenti componenti:

una è sincronizzata con gli atti del respiro (varia con la respirazione) ed è una componente ad alta frequenza (HF) oscillando all'interno di un range di frequenza che va da 0.18 a 0.40 Hz. Questa

componente è il marker dell'attività parasimpatica (vagale). L'altra componente (oscillatoria) correla con l'onda lenta della pressione arteriosa ed è descritta come componente a bassa frequenza (LF) perchè oscilla all'interno di un range di frequenza da 0.03 a 0.15 Hz (40). (Fig.8). Quest'ultima componente è associata all'attività del sistema nervoso simpatico.

Fig. 8



Stimoli periferici afferenti al sistema nervoso centrale ed elaborazione mediante power spectral analysis del successivo segnale periferico condotto al sistema cardiovascolare mediante le vie efferenti simpatico/vagali

In considerazione della reciproca influenza dei sistemi simpatico e parasimpatico è più appropriato studiare la relazione tra LF ed HF in termini di bilancia simpatico/vago (LF/HF) piuttosto che considerare le due componenti separatamente come indici di attività simpatica o di attività parasimpatica. Numerosi studi infatti confermano che la valutazione del rapporto LF/HF rivela una accettabile indicazione del controllo simpatico/vago cardiaco. Questi studi hanno

inequivocabilmente dimostrato come la prevalenza dell'attività simpatica, rivelata dallo sbilanciamento del rapporto LF/HF, determina una più alta mortalità cardiovascolare ed improvvisa nei pazienti diabetici di tipo 2 in assenza di qualsiasi preesistente patologia cardiaca (10, 25-26).

Analisi dell'HRV nel dominio temporale:

La variabilità della frequenza cardiaca viene analizzata anche utilizzando formule matematiche e tecniche computerizzate che permettono di ottenere una elaborazione statistica della variabilità. (43, 45,47)

Esistono diversi approcci per la valutazione della HRV. Questi possono essere classificati, in base della durata della registrazione della frequenza in :

- “short-term recordings”: registrazioni sul breve periodo, in genere 10-15 minuti di registrazione ECG continua. Tale tecnica è in genere associata ai test proposti da Ewing per lo studio della neuropatia autonoma (44)
- “long-term recordings”: registrazioni su più lungo periodo, con analisi effettuate sulle registrazioni dell'ECG Holter che, per il più lungo periodo di osservazione, permettono di evidenziare anche variazioni circadiane o momentanee dell'attività del sistema nervoso autonomo.

L'analisi temporale calcola un certo numero di parametri che descrivono la frequenza cardiaca ad ogni istante e l'intervallo tra cicli cardiaci successivi. In una registrazione elettrocardiografica continua vengono rilevati tutti i complessi QRS e vengono identificati gli intervalli R-R sinusali, il che equivale alla misurazione della frequenza cardiaca istantanea per tutto il periodo di registrazione. I vantaggi di questo tipo di analisi computerizzata sono la facile eseguibilità e la non necessità di collaborazione attiva del paziente.

La metodica analizza parametri semplici che tuttavia forniscono indicazioni affidabili sullo stato di attivazione del sistema nervoso autonomo (SNA) (46). I parametri presi in considerazione nella pratica clinica, sono:

- la deviazione standard di tutti gli intervalli R-R (millimetri/secondo) (the standard deviation of NN intervals: **SDNN**); (attività del sistema nervoso simpatico);
- il valore medio di tutte le deviazioni standard di tutti gli intervalli R-R (millimetri/secondo) calcolati durante un periodo di 5 minuti (the standard deviation of the average NN intervals: **SDANN**)
- la radice quadrata della differenza di 2 successivi intervalli R-R (millimetri/secondo) (the square root of the mean squared difference of successive NNs: **rMSSD**)
- la percentuale delle coppie di intervalli R-R successivi che differisce > 50 mm/s diviso il numero totale di intervalli R-R (the proportion of the number of pairs of successive NNs that differ by more than 50 divided by total number of NNs.: **pNN50**) (attività del sistema nervoso parasimpatico).

C - Q-T, Q-Tc e Q-Td

Numerosi lavori documentano che le anomalie del Q-T (distanza tra l'onda Q e T dell'elettrocardiogramma misurata in millimetri/secondo), del QTc (Intervallo Q-T corretto per la frequenza cardiaca: $Q-Tc = Q-T/\sqrt{R-R}$) e del QTd (differenza tra l'intervallo Q-T maggiore e l'intervallo Q-T minore: $Q-Td = Q-T \text{ max} - Q-T \text{ min}$ (millimetri/secondo) sono associate ad un significativo aumento della mortalità e morbilità per cause cardiovascolari e di morte improvvisa, sia nella popolazione generale che nei pazienti diabetici. Questi indici sono dipendenti dai flussi ionici nei miocardiociti durante il processo di depolarizzazione/ripolarizzazione e sono sotto il controllo dell'innervazione del sistema nervoso autonomo. In assenza di patologie quali la cardiopatia ischemica, le disonie o l'ipotiroidismo, i valori del QTc e del QTd sono linearmente correlati alla funzione e allo stato di bilanciamento del sistema nervoso autonomo cardiaco (48).

D – Tomografia ad emissione di positroni, scintigrafia con meta-iodobenzilguanidina

Per determinare il danno autonomico cardiaco possono essere applicate anche tecniche più sofisticate, tra le quali sono più studiate la tomografia ad emissione di positroni (PET) e la scintigrafia con meta-iodobenzilguanidina (MIBG(123I) entrambi capaci di fornire informazioni dirette sull'entità del danno del sistema simpatico cardiovascolare (49).

Scopo dello studio sperimentale:

La recente disponibilità di incretine per il trattamento dei pazienti diabetici e gli effetti che questi ormoni possono avere a livello cardiaco ci hanno indotto a valutare comparativamente in pazienti con diabete di tipo 2 in trattamento con ipoglicemizzanti orali l'effetto dell'aggiunta di incretina somministrata per via sottocutanea rispetto all'aggiunta di insulina, a tale scopo sono stati esaminati i seguenti parametri:

- 1- a) le variazioni dell' equilibrio simpatico-vagale del sistema nervoso autonomico e le eventuali correlazioni con le modifiche ottenute sui alcuni parametri metabolici, in particolare BMI ed HbA1c.
b) le variazioni dei parametri elettrocardiografici (SDNN, pNN50, SDANN e rMSSD) correlati con l'attività nervosa autonoma simpatica e parasimpatica, sempre in correlazione con i parametri metabolici studiati.
- 2- le variazioni dei parametri metabolici correlati con il rischio cardiovascolare (BMI ed HbA1c) indotte dai 2 differenti tipi di terapia ipoglicemizzante
- 3- le eventuali variazioni di frequenza e di conduzione cardiaca determinate dai 2 tipi di terapia ipoglicemizzante

Pazienti

Criteri di inclusione

Sono stati studiati consecutivamente 26 pazienti diabetici di tipo 2, 11 maschi e 15 femmine di età compresa tra 48 e 70 anni, con sindrome metabolica (diagnosticata secondo i criteri definiti dall'ATP III), seguiti presso il NS centro antidiabetico e con insufficiente compenso glicometabolico definito da valori di emoglobina glicosilata (HbA1c) compresi tra 7% e 9% o da valori glicemici a digiuno ≥ 140 mg/dl. Tutti i pazienti erano in terapia con ipoglicemizzanti orali: 19 pazienti assumevano solo metformina (dose ≥ 1500 mg/die).

4 pazienti assumevano metformina ≥ 1500 mg/die associata a repaglinide ≥ 4 mg/die.

3 pazienti assumevano metformina ≥ 1500 mg/die associata a pioglitazone ≥ 30 mg/die.

Criteri di esclusione

I pazienti con valori di HbA1c $> 9\%$ o con significative patologie tiroidee, neurologiche, epatiche e/o renali erano esclusi dallo studio.

Randomizzazione

I pazienti venivano assegnati random a due protocolli terapeutici in aggiunta alla terapia in corso con ipoglicemizzanti orali: in 15 pazienti (gruppo 1) terapia con Exenatide (agonista sintetico del recettore del GLP-1) somministrato 30 minuti prima di colazione e cena alla dose di 5 mcg per ogni somministrazione per i primi 30 giorni e poi alla dose di 10 mcg x 2 per il successivo periodo;

in 11 pazienti (gruppo 2) veniva assegnata terapia insulinica somministrata la sera alla dose di 0.2 – 0.3 (0.22 ± 0.1) U.I./kg.

La terapia ipoglicemizzante costituita dall'associazione tra metformina e secretagoghi o metformina e glitazoni era ugualmente distribuita tra i 2 gruppi di pazienti.

Prima e dopo 6 mesi dall'inizio dei due protocolli alternativi di terapia ipoglicemizzante i pazienti venivano sottoposti ad un prelievo venoso per la determinazione della emoglobina glicosilata (HbA1c, dosata mediante cromatografia liquida a scambio ionico ad alta performance; Eurogenetics Italy, valori normali: 4.0 - 5,7%), della glicemia a digiuno e 2 ore dopo i pasti principali

(determinazione enzimatica), del colesterolo totale, HDL ed LDL (Sclavo Diagnostics Italia; sensibilità 2.2 mg/dl; valori normali 120-200 mg/dl), dei trigliceridi (Sclavo Italia; sensibilità 1.2 mg/dl; valori normali: 70-170 mg/dl). In tutti i pazienti veniva valutata la funzione tiroidea mediante il dosaggio dell'ormone tireostimolante (TSH), della triiodotironina libera (FT3), della tetraiodotironina libera (FT4).

Veniva misurata la circonferenza vita. Veniva valutato il Body Mass Index (BMI) ($m/(alt)^2$) prima e dopo 6 mesi dall'inizio del protocollo terapeutico. Le variazioni della HbA1c e del BMI venivano espresse come variazione percentuale $\Delta\%$. I valori di pressione arteriosa sistolica e diastolica valutati mediante bracciale di Riva-Rocci erano espressi in mmHg ed ottenuti in ciascun controllo in base alla media di 3 rilevazioni consecutive.

Metodi

Valutazione dell'attività del sistema nervoso autonomico

Tutti i pazienti venivano sottoposti a registrazione elettrocardiografica Holter (ECG Holter, Mortara Rangoni Italia) per un intervallo temporale di 24 ore (dalle ore 8:00 alle ore 8:00 del giorno successivo). Gli ulteriori test venivano effettuati in giorni diversi (con un intervallo massimo di 48 ore) valutando le variazioni dell'intervallo R-R su registrazioni elettrocardiografiche effettuate durante il passaggio dalla posizione clinostatica alla posizione ortostatica. Durante il periodo di registrazione ECG i pazienti si astenevano dal consumo di caffè, tè e/o di nicotina o di farmaci in grado di interferire con la funzione del sistema nervoso autonomico.

L'analisi spettrale dell'intervallo R-R dell' ECG (HRV Power Spectrum Analysis) è stata effettuata valutando intervalli di registrazione ECG di 24 ore. Il segnale ECG registrato veniva acquisito dopo connessione del registratore holter ECG alla porta seriale di un PC. Un software specifico (National Instruments, Texas, USA) veniva utilizzato per la elaborazione dei dati acquisiti. Le onde R erano riconosciute automaticamente e tutti gli intervalli R-R erano calcolati. La sequenza degli intervalli R-R acquisiti era riassemblata allo scopo di ottenere un segnale stabile

in rapporto ad una precisa sequenza temporale (10 rilevazioni/secondo). Questo segnale veniva ulteriormente elaborato tramite la trasformazione di Fourier (43) allo scopo di visualizzarlo sotto forma di spettro di potenza (Power Spectrum), il valore assoluto di questo spettro di potenza veniva infine espresso come rapporto tra la componente spettrale a bassa frequenza (LF) (0.04 -0.15 M/Hz) dell'intervallo R-R (correlata con l'attività del sistema nervoso simpatico) e la componente spettrale ad alta frequenza (HF) (> 0.15 M/Hz) (correlata con l'attività del sistema nervoso autonomico parasimpatico). Sono stati inoltre valutati :

- a) il numero delle coppie di intervalli RR che differivano tra di loro più di 50 millisecondi (m/s) (NN50),
- b) la proporzione di NN50 diviso il numero totale di intervalli R-R (pNN50),
- c) la deviazione standard degli intervalli R-R (SDNN),
- d) la deviazione standard della media degli intervalli R-R calcolata su una registrazione ECG di 5 minuti (SDANN).

Le grandezze di pNN50 e di SDNN sono state studiate in quanto correlate rispettivamente con l'attività del sistema nervoso autonomico parasimpatico e simpatico. I valori di pNN50 e SDNN non seguendo una distribuzione normale sono stati trasformati nelle rispettive grandezze logaritmiche (log-pNN50 e log-SDNN) ed è stata poi valutata la variazione percentuale ($\Delta\%$) di LF/HF, di log-pNN50 e log-SDNN dopo 6 mesi dall'inizio della terapia con ipoglicemizzanti orali + Exenatide (gruppo 1) o ipoglicemizzanti orali + insulina (gruppo2) mediante la seguente formula: $(X_{t1}-X_{t0})/X_{t0} \times 100$, dove X_{t0} ed X_{t1} indicano il valore di LF/LH o di log-pNN50 o di log-SDNN prima (X_{t0}) e dopo 6 mesi (X_{t1}) dall'inizio di ciascuno dei 2 schemi di terapia ipoglicemizzante. L'equilibrio simpato - vagale espresso come $\Delta\% \text{ LF/HF} \geq 20$ (valore corrispondente alla mediana del decremento percentuale di LF/HF nei pazienti del gruppo 1), ed i parametri ECG di attività parasimpatica e simpatica espressi rispettivamente da $\Delta\% \text{ log-pNN50}$ e $\Delta\% \text{ log-SDNN}$ sono stati confrontati con alcuni possibili determinanti dell'attività del sistema nervoso simpatico e

parasimpatico: terapia ipoglicemizzante con exenatide, BMI, HbA1c, fumo, sesso e durata della malattia diabetica.

Parametri di frequenza e conduzione cardiaca

Sono stati valutati su registrazione ECG i seguenti parametri:

- a) la frequenza cardiaca nelle 24 ore e durante le ore diurne e notturne;
- b) il Qt nelle 24 ore (intervallo espresso in millimetri/secondo tra onda Q ed onda T misurato su tracciato elettrocardiografico);
- c) il Qtc nelle 24 ore (Qt/\sqrt{RR} , dove RR = intervallo misurato in millimetri/secondo su tracciato ECG tra onda R e successiva onda R);
- d) il Qtd nelle 24 ore (Qt massimo – Qt minimo misurati in millimetri/secondo su tracciato ECG).

Statistica

la valutazione degli effetti dei singoli determinanti l'attivazione del sistema nervoso autonomico veniva effettuata mediante tabelle a doppia entrata applicando il test del χ^2 ; l'identificazione delle variabili indipendenti veniva effettuata mediante Stepwise Logistic Regression Analysis. La correlazione tra variabili continue è stata studiata mediante Linear Regression Analysis; le differenze tra gruppi mediante Mann Withney U Test o Wilcoxon Rank Test. Le variabili studiate sono state trasformate nelle corrispondenti grandezze logaritmiche quando non seguivano una distribuzione normale.

Risultati

Caratteristiche dei pazienti

Le caratteristiche dei pazienti all'inizio dello studio sono indicate nella tabella 1 ed indicano che i due gruppi non differivano per età, sesso, durata della malattia diabetica, BMI, valori di HbA1c, valori dei lipidi plasmatici, pressione arteriosa sistolica e diastolica, frequenza cardiaca misurata nelle 24 ore, prevalenza delle complicanze microangiopatiche e macroangiopatiche.

Tab. 1 *Caratteristiche dei pazienti all'inizio dello studio*

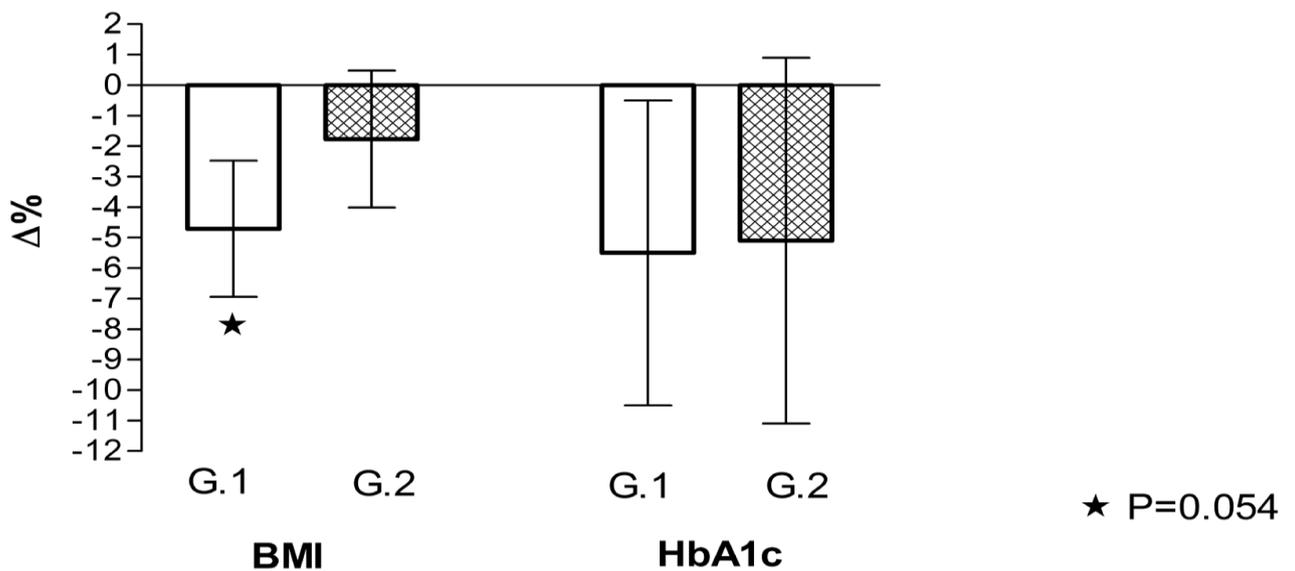
	Gruppo 1 (n 15)	Gruppo 2 (n 11)
Età (anni)	59 ± 3.4	60 ± 6
Durata Diabete (anni)	9 (2-34)	11 (3-33)
Sesso (m/f)	6/9	5/6
Fumo (n)	4	5
HbA1c(%)	7.6 ± 1.1	7.6 ± 1.1
Glicemia Diggiuno (mg/dl)	140 ± 45	140 ± 43
Glicemia Postprandiale (mg/dl)	151 ± 36	142 ± 36
Pressione massima (mmhg)	128 ± 10	134 ± 9
Pressione minima (mmhg)	79 ± 6	80 ± 5
Circonferenza vita (cm)	109 ± 11	108 ± 13
Body Mass Index (alt/m ²)	36 ± 6	35 ± 7
Frequenza cardiaca media 24 ore	76.5 ± 7.6	78.4 ± 11
Colesterolo (mg/dl)	213 ± 28	215 ± 19
HDL colesterolo (mg/dl)	45±11	48 ± 11
LDL colesterolo (mg/dl)	113±24	126 ± 27
trigliceridi (mg/dl)	138±24	120 ± 43
Creatinina (mg/dl)	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3
Azotemia (mg/dl)	39 (13-58)	37 (18-62)
filtrato glomerulare (ml/min.)	69 ± 15	63 ± 20
microalbuminuria (mg/dl)	33 (2.5-233)	8 (0.8-30)

Parametri metabolici correlati con il rischio cardiovascolare

In entrambi i gruppi di pazienti si osservava dopo i 6 mesi di trattamento, un riduzione della HbA1c espressa come $\Delta\%$ rispetto il valore ottenuto all'inizio dello studio: - 5.8% e - 5%. Tuttavia tale dato non era significativamente differente tra i 2 gruppi di pazienti (p = ns, rispettivamente gruppo

1 vs gruppo 2). Come atteso la variazione percentuale del BMI ($\Delta\%$ BMI) era significativamente maggiore nei pazienti trattati con Exenatide (gruppo 1) - 4.7% rispetto a -1.8% nel gruppo 2 ($p = 0.054$) (Fig.9). Non si riscontravano significative differenze delle variazioni del profilo lipidico e dei valori di pressione arteriosa nei 2 gruppi di pazienti.

Fig. 9



Riduzione percentuale dell'HbA1c e del BMI nei 2 gruppi di pazienti (G1 = exenatide + ipoglicemizzanti orali, G2 = insulina + ipoglicemizzanti orali)

Variazioni dell' equilibrio simpato-vagale valutate mediante Power Spectral Analysis (LF/HF)

La riduzione percentuale di LF (attività simpatica) /HF (attività parasimpatica) ($\Delta\%$ LF/HF) (Tab. 2) era significativamente maggiore nel gruppo dei pazienti trattati con ipoglicemizzanti orali ed exenatide rispetto ai pazienti trattati con ipoglicemizzanti orali ed insulina: - 23 (- 80 -- + 124) vs 29 (- 29 -- + 309), $p = 0.009$, gruppo 1 vs gruppo 2 (Tab.2 e Fig.10).

Tab 2 Variazione percentuale del rapporto LF/HF (bilancia simpatico/vagale) nei 2 gruppi di pazienti

	Gruppo 1	Gruppo 2
	$\Delta\%$ range	$\Delta\%$ range
LF/HF 24 ore	- 23 (- 80 -- + 124)**	29 (-29 -- +309)
LF/HF clinostatismo 10'	- 13 (- 89 -- + 68)	32 (- 27 -- + 1734)
LF/HF seduto 10'	-33 (- 84 -- +669)	29 (-57 -- +527)
LF/HF clinostatismo/seduto 10' ($\Delta\%$)	27(- 309 -- +353)	- 30 (-503 -- +1803)

dati espressi come mediana e range tra parentesi

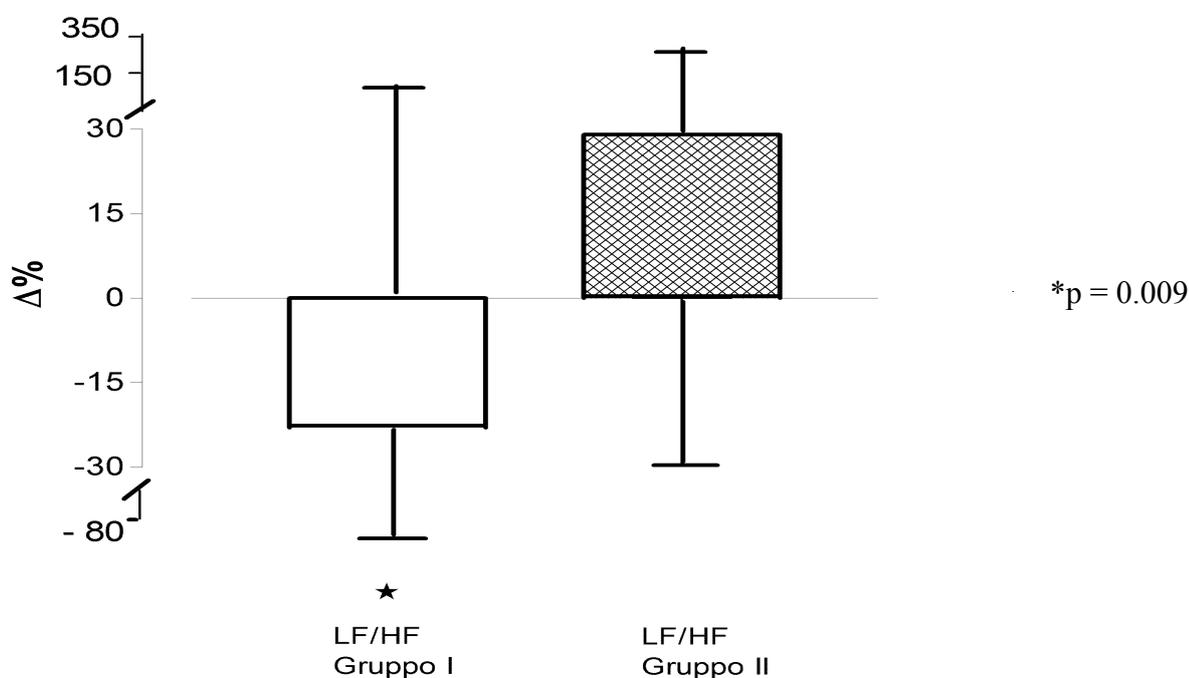
$\Delta\%$ = *variazione percentuale rispetto al basale*

LF = *low frequency*

HF = *high frequency*

** $p = 0.009$ *group 1 vs group 2*

Fig. 10



Decremento percentuale del rapporto LF/HF in ciascun gruppo di pazienti. Gruppo I = Exenatide + ipoglicemizzanti orali; Gruppo II = Insulina + ipoglicemizzanti orali

Quando venivano valutati la riduzione percentuale del BMI, della HbA1c, il sesso, il fumo, la durata della malattia diabetica e la terapia con Exenatide come possibili determinanti di $\Delta\%$ LF/HF ≥ 20 , solo la terapia con exenatide manteneva un effetto statisticamente significativo: $p = 0.012$, RR 1.38 (95% C.I = 1 – 11) (Tab. 3 e Tab. 4). Non si rilevavano differenze significative di LF/HF durante le misurazioni effettuate per intervalli temporali di 10' in posizione clinostatica, ortostatica e durante il cambiamento di postura (passaggio dalla posizione clinostatica alla posizione ortostatica). Tuttavia si osservava un trend di riduzione di LF/HF nei pazienti del gruppo 1 rispetto i pazienti del gruppo 2.

Tab. 3 determinanti della variazione percentuale di LF/HF

	n	.F/HF 24 ore ($\Delta\% \geq 20$)
Exenatide (20 μ g/die)	15	0.018
$\Delta\%$ HbA1c ≥ -5	13	ns
$\Delta\%$ BMI ≥ -5	9	0.055
Durata malattia (≥ 10 anni)	11	ns
Fumo	9	ns
Sesso (m/f)	11/15	ns

Tab.4 Stepwise Logistic Regression Analysis dei possibili determinanti di $\Delta\%$ LF/HF

Possibili determinanti		
Exenatide	vs $\Delta\%$ LF/HF > 20	$p=0.012$ RR = 1.38 (1.1 -11) 95% C.I.
Fumo	vs $\Delta\%$ LF/HF > 20	$p=ns$
Sesso	vs $\Delta\%$ LF/HF > 20	$p=ns$
$\Delta\%$ BMI > -5	vs $\Delta\%$ LF/HF > 20	$p=ns$
$\Delta\%$ HbA1c > -5	vs $\Delta\%$ LF/HF > 20	$p=ns$
Durata Malattia > 10	vs $\Delta\%$ LF/HF > 20	$p=ns$

I valori di $\Delta\%$ LF/HF > 20, di $\Delta\%$ BMI > -5% e di $\Delta\%$ HbA1c > 5% corrispondono alla mediana della riduzione percentuale delle singole variabili. Lo stesso criterio è stato applicato per la scelta del cut-off della durata di malattia diabetica.

Comportamento dei singoli parametri elettrocardiografici di attivazione dei sistemi simpatico e parasimpatico

Paragonando i valori della trasformazione logaritmica di pNN50 (log - pNN50) (parametro di correlazione diretta con l' attivazione parasimpatica) all'inizio del protocollo e dopo 6 mesi di terapia nei 2 gruppi, si osservava una riduzione significativa nei pazienti del gruppo 2 (pazienti in terapia con ipoglicemizzanti orali più insulina) ($p = 0.018$), ma non nel gruppo 1. (Tab.5) Analogamente log - SDNN (parametro di correlazione inversa con l'attività simpatica) si riduceva significativamente nei pazienti del gruppo 2, ($p= 0.026$) dopo 6 mesi di terapia, (Tab. 5).

Tab. 5 Parametri di funzione cardiaca correlati con l'attività dei sistemi simpatico e parasimpatico

	Gruppo I		Gruppo II	
	I valutazione	II valutazione	I valutazione	II valutazione
SDNN(log)	2.16 ± 0.22 (1.81-2.64)	2.09 ± 0.16 (1.86-2.45)	2.11 ± 0.17 (1.89 - 2.46)	2.04 ± 0.1 (1.89-2.3)¶¶
SDANN(log)	2.04 ± 0.25 (1.65-2.61)	1.97 ± 0.12 (1.76-2.13)	1.99 ± 0.11 (1.83 - 2.17)	1.99 ± 0.11 (1.79-2.33)
pNN50(log)	0.60 (-0.18-1.29)	0.50 (-0.19 - 1.27)	0.75 (-0.25 - 1.41)	0.46 (-0.96 -1.26)***
RMSSD(log)	1.7 ± 0.4 (1.22 - 2.5)	1.7 ± 0.4 (1.33 - 2.46)	1.5 ± 0.3 (1.2-2.1)	1.5 ± 0.2 (1.1-1.9)

SDNN(log) = logaritmo della deviazione standard degli intervalli R-R normali

SDANN(log) = logaritmo della deviazione standard delle medie degli intervalli R-R/24h di tutti i segmenti di 5 minuti

pNN50(log) = logaritmo della percentuale delle differenze tra intervalli R-R consecutivi in 50 ms

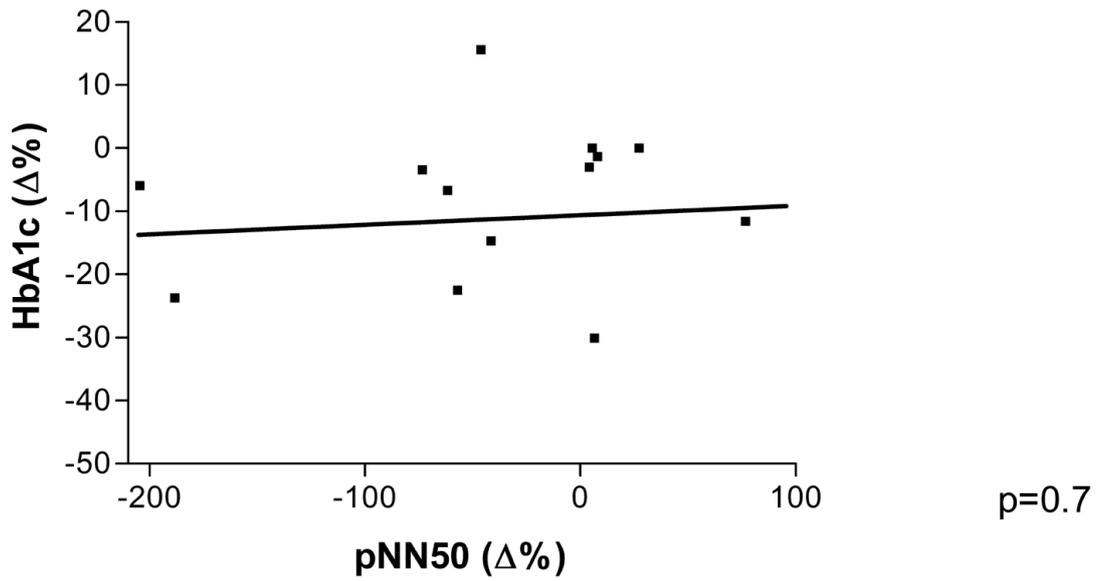
RMSSD(log) = logaritmo della radice quadrata della media dei quadrati delle differenze di intervalli R-R consecutivi

¶¶ $P= 0.026$ SDNN Gruppo 2 II controllo vs I controllo

*** $P=0.018$ pNN50 Gruppo 2 II controllo vs I controllo

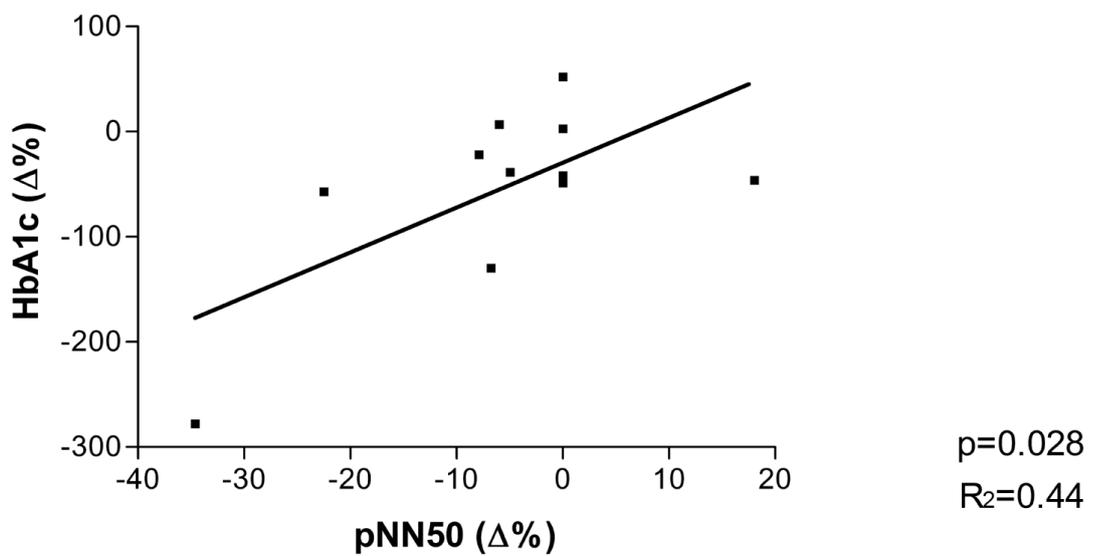
Nei pazienti del Gruppo 2 il decremento percentuale di log-pNN50 ($\Delta\%$ log -pNN50) correlava significativamente con il decremento percentuale della HbA1c ($\Delta\%$ HbA1c), $p = 0.028$, $R^2 = 0.44$ (Fig.12). Tale correlazione non era osservabile nei pazienti del gruppo 1 (Fig.11).

Fig. 11



Correlazione tra decremento percentuale dell'HbA1c e del pNN50 (attività vagale) nel gruppo I

Fig 12



Correlazione tra decremento percentuale dell'HbA1c e del pNN50 (attività vagale) nel gruppo II

Parametri di frequenza e conduzione cardiaca

Nei 2 gruppi di pazienti non si osservavano significative variazioni della frequenza cardiaca valutata con holter nelle 24 ore o anche durante i periodi diurno e notturno, né del QTc e del QTd (Tab. 6).

Tab. 6 Parametri di frequenza e conduzione cardiaca prima e dopo terapia ipoglicemizzante nei 2 gruppi di pazienti

	Gruppo I		Gruppo II	
	I valutazione	II valutazione	I valutazione	II valutazione
F. C. 24 h	77 ± 8 (65-91)	78 ± 7 (65-88)	78 ± 10 (61-96)	81 ± 10 (68-99)
F. C.d.	80 ± 9 (68-100)	82 ± 9 (69-99)	82 ± 13 (59-104)	87 ± 11 (70-109)
F. C.n.	71 ± 9 (58-90)	72 ± 8 (69-99)	73 ± 10 (57-86)	74 ± 9 (59-86)
QT c	0.44 ± 0.016 (0.41-0.48)	0.44 ± 0.018 (0.41-0.47)	0.45 ± 0.01 (0.44-0.47)	0.45 ± 0.01 (0.43-0.47)
QTd	0.038 ± 0.007 (0.03-0.05)	0.035 ± 0.007(0.02-0.04)	0.027 ± 0.013 (0.01-0.05)	0.025 ± 0.01 (0.02-0.05)

F.C = frequenza cardiaca, F.C.d. = frequenza cardiaca diurna, F.C. n. = frequenza cardiaca notturna

RR = intervallo onda R onda R, QT = intervallo onda Q onda R, QTc = QT/\sqrt{RR} , QTd = QT max - QT min

Discussione

La possibilità di utilizzare farmaci ipoglicemizzanti in grado, a differenza di insulina e sulfoniluree, di ridurre oltre la glicemia anche il peso corporeo ed anche altri fattori di rischio cardiovascolare deve essere considerato un importante avanzamento nella terapia del paziente diabetico di tipo 2, infatti il compenso glicemico stringente raggiunto con la terapia insulinica intensiva o con le tradizionali terapie ipoglicemizzanti orali associate o meno alla terapia insulinica, viene ottenuto a discapito di una molto più elevata incidenza di episodi di ipoglicemia e di un aumento di peso che, in circa il 30% dei pazienti può superare i 10 kg. Questi effetti sono considerati responsabili dell'aumentata mortalità dei pazienti diabetici nonostante il migliorato compenso metabolico (17). È stato inoltre ampiamente documentato che nessuna delle classi farmacologiche tradizionali produce un beneficio rilevante in termini di protezione cardiovascolare, ad eccezione di un modesto effetto esercitato dalla metformina.

Il GLP-1 riduce la glicemia ed inibisce la secrezione acida dello stomaco rallentando lo svuotamento gastrico, con un meccanismo che sembra coinvolgere, sia nell'uomo che negli animali, le afferenze vagali. Probabilmente, il GLP-1 interagisce con le afferenze vagali localizzate nella sottomucosa ed esprime il GLP-1R nello stesso modo in cui la colecistochinina modula lo svuotamento gastrico (50). Il GLP-1 inoltre migliora la funzione endoteliale e determina vasodilatazione mediata dall'incremento del monossido di azoto (NO). Tale effetto è determinato dall'internalizzazione nelle stesse cellule endoteliali del metabolita GLP-1 (9-36), e si esercita anche in topi che non possiedono il recettore del GLP-1 (GLP-1R^{-/-}) suggerendo che questo ed altri effetti cardiovascolari possono essere mediati da vie indipendenti dal recettore e mediate dai metaboliti di degradazione del GLP-1 (51). In condizioni di insulinoresistenza/ipeinsulinemia la produzione di NO è aumentata ed inibisce l'attività del SNS ad azione vasocostrittoria.

Noi abbiamo studiato pazienti diabetici di tipo 2 con sindrome metabolica, quindi con una condizione di insulino resistenza. Questa condizione deprime la produzione di NO (che inibisce

l'attività del SNS e la sua azione vasocostrittrice) e favorisce la produzione di NEFA che determinano iperattivazione del SNS e conseguentemente peggiorano le condizioni di insulino-resistenza. Quindi in questi pazienti insulino-resistenti si ha una iperattivazione del sistema simpatico con duplice meccanismo. Quando questi pazienti sono stati sottoposti a terapia con Exenatide (in aggiunta agli ipoglicemizzanti orali) hanno mostrato una riduzione significativa della bilancia simpatico vagale a favore dell'attività vagale, in assenza di modificazione significative della frequenza o della conduzione cardiaca. Questi effetti non si evidenziavano nei pazienti in terapia con ipoglicemizzanti orali ed insulina.

Da queste osservazioni possiamo concludere che la somministrazione della terapia insulinica aggiuntiva alla terapia con ipoglicemizzanti orali e con associata opportuna deprivazione calorica determina, come atteso, un miglioramento significativo del compenso glicometabolico ma non ha alcun effetto sulla condizione di iperattivazione del SNS e lo sbilanciamento dell'attività simpatico/vagale rimane invariato. Invece l'aggiunta della Exenatide ha un significativo effetto nel ridurre lo sbilanciamento dell'attività simpatico-vagale. Questo effetto dell' Exenatide è indipendente dagli effetti metabolici di decremento ponderale e riduzione della HbA1c. Infatti la riduzione di HbA1c determinava riduzione dell'attività parasimpatica cardiaca (espressa dai valori di pNN50) solo nei pazienti in terapia insulinica mentre nei pazienti in terapia con exenatide l'attività parasimpatica resta indipendente dalla riduzione dei valori di HbA1c. I nostri dati rafforzano quindi le evidenze che dimostrano che i meccanismi di azione del GLP-1 a livello del sistema nervoso centrale e di quello periferico autonomico cardiovascolare sono diretti o comunque indipendenti dal controllo glicemico e dalla produzione di insulina da parte delle beta cellule.

Conclusioni:

In pazienti con diabete di tipo 2 e sindrome metabolica trattati con terapia ipoglicemizzante orale l'aggiunta di terapia con Exenatide per via parenterale migliora l'equilibrio simpatico-vagale a favore dell'attività parasimpatica. Questa azione è indipendente dal miglioramento metabolico indicato dalla riduzione del BMI e della HbA1c. Questo dato è confermato dalla correlazione lineare tra il decremento del tono parasimpatico ed il decremento della HbA1c osservata nel gruppo dei pazienti trattati con insulina ma non in quelli trattati con exenatide.

Nessuno dei 2 schemi terapeutici studiati ha determinato variazioni significative della frequenza cardiaca e/o dei tempi di conduzione cardiaca valutati mediante ECG. In considerazione degli effetti rilevati in questo studio e delle recenti evidenze sugli effetti neuroprotettivi del GLP-1 in ratti diabetici, la terapia con questi farmaci presenta dei vantaggi cardiometabolici specifici e dovrebbe essere iniziata precocemente nei pazienti diabetici di tipo 2 specie se con parametri di rischio cardiovascolare.

BIBLIOGRAFIA

1. Grassi G, Dell'Oro R, Quarti-Trevano F et al (2005) Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome. *Diabetologia* DOI 10.1007/s00125-005-1798-z
2. Hansen BC (1999) The metabolic syndrome X. *Ann NY Acad Sci* 892:1–24
3. Landsberg L (2004) The metabolic syndrome: diabetes, obesity and hypertension. In: Birkenhäger WH, Robertson JJS, Zanchetti A (eds) *Handbook of hypertension*, vol. 22. Elsevier, Amsterdam, pp 245–261
4. Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L (1981) Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* 30:219–225
5. Hausberg M, Mark AL, Hoffman RP, Sinkey CA, Anderson EA (1995) Dissociation of sympathoexcitatory and vasodilator actions of modestly elevated plasma insulin levels. *J Hypertens* 13:1015–1021
6. Landsberg L, Young JB (1985) Insulin-mediated glucose metabolism in the relationship between dietary intake and sympathetic nervous system activity. *Int J Obes* 9:63–68
7. Ward KD, Sparrow D, Landsberg L, Young JB, Vokonas PS, Weiss ST (1994) The relationship of epinephrine excretion to serum lipid levels: the normative aging study. *Metabolism* 43:509–513
8. Brunner EJ, Hemingway H, Walker BR et al (2002) Adrenocortical autonomic and inflammatory causes of the metabolic syndrome. *Circulation* 106:2659–2665
9. Kingwell BA, Thompson JM, Kaye DM et al (1994) Heart rate spectral analysis, cardiac norepinephrine spillover and muscle sympathetic nerve activity during human sympathetic nervous activation and failure. *Circulation* 90:234–240 1364
10. Eckberg DL (1997) Sympathovagal balance: a critical appraisal. *Circulation* 96:3224–3232
11. Deng XF, Rokosh DG, Simpson PC (2000) Autonomous and growth factor-induced hypertrophy in cultured neonatal mouse cardiac myocytes. Comparison with rat. *Circ Res* 87:781–788
12. Hoffstedt J, Wahrenberg H, Thorne A, Lonnqvist F (1996) The metabolic syndrome is related to β 3-adrenoceptor sensitivity in visceral adipose tissue. *Diabetologia* 39:838–844

13. Grundy SM, Hansen B, Smith SC et al (2004) Clinical management of metabolic syndrome. Report of the American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute/ American Diabetes Association Conference on Scientific issues related to management. *Circulation* 109:551–556
14. Druker DJ et Al. (2006) *Lancet* 368: 1696-1705
15. Nauk MA et al. (2007) *Diabetes Obes Metab* 9: 194-205
16. ADVANCE collaborative group (2008) *New England Journal of Medicine* 358: 2560-2572
17. ACCORD (2008) *New England Journal of Medicine*
18. Witte DR et al. (2005) *Diabetologia* 48:164-167
19. Grassi G, Dell’Oro R, Facchini A, Trevano FQ, Bolla GB, Mancia G (2004) Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens* 22: 2363–2369
20. Young JB, Landsberg L (1977) Suppression of sympathetic nervous system during fasting. *Science* 196:1473–1475
21. Young JB, Landsberg L (1977) Stimulation of the sympathetic nervous system during sucrose feeding. *Nature* 269:615–617
22. Landsberg L (2001) Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). *J Hypertens* 19:523–528
23. Landsberg L, Young JB (1985) Insulin-mediated glucose metabolism in the relationship between dietary intake and sympathetic nervous system activity. *Int J Obes* 9:63–68
24. Landsberg L (1986) Diet, obesity and hypertension: a hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. *Q J Med* 236:1081–1090
25. Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Moss AJ. (1987) Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 59: 256-262
26. Eckberg DL, Drabisky M. and Brunwald E. Defective cardiac parasympathetic response in patients after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1972 285, 877-883
27. Bellavere F, Cacciatori V, Moghetti P. et al. (1996). Effect of insulin on autonomic regulation of cardiovascular system: a study by heart rate spectral analysis. *Diabetes Med.* 13: 709-714
28. Sauter et al. (1983) Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Res* 260: 330-333
29. Muntzel et al. (1994) Anteroventral third ventricle lesion abolish lumbar sympathetic responses to insulin. *Hypertension* 23: 1050-1062
30. Sobrevia et al. (1996) Activation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J. Physiol* 490: 775-781

31. Manzella D, Grella R, Marfella R, Giugliano D. and Paolisso (2002). Elevated post-prandial free fatty acids are associated with cardiac sympathetic overactivity in type II diabetic patients. *Diabetologia* 45: 1737-1738
32. Dube PE, Brubaker PL. (2004) Nutrient, neural and endocrine control of glucagon-like peptide secretion. *Horm Metab Res* 36 :755–760.
33. Drucker DJ. (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3:153– 165.
34. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. Distribution of glucagonlike peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* 1997; 77:257–270.
35. Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P. (1999) Distribution of pre-pro glucagon and glucagon like peptide -1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J comp. neurol* 403: 261-280
36. Yamamoto H, Kishi T, Lee CE, Choi BJ, Fang H, Hollenberg AN, Drucker DJ, Elmquist JK. (2002) Glucagon like peptide -1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest* 110: 43-52
37. Barragan JM, Eng J, Rodriguez R, Blazquez E. (1999) Neural contribution to the effect of glucagon like peptide 1 (7-36) amide on arterial blood pressure in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 277: E784-E791
38. Nikolaidis LA, Elhai D, Shen YT, Shannon RP. (2005) Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improve left ventricular performance in conscious dog with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2401-H2408.
39. Basu A, CharKoudian N, Schrage W, Rizza RA, Basu R, Joyner MJ. (2007) Beneficial effects of GLP-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism* 293: E1289-E1295
40. Nistrom T, Gutniak MK, Zhang F, Holst JJ, Aheren B, Sjolholm A. (2004) Effect of glucagon like peptide 1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E1209-E1215
41. Adil E, et al. (2008) Effects of glucagon like peptide -1, yohimbine, and nitric modulation on sympathetic and parasympathetic activity in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2: 874-880
42. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clark BF. (1985) The value of autonomic function tests: 10 years experiences in diabetes. *Diabetes Care* 8: 491-498
43. Bloomfield P. *Fourier analysis of time series. An introduction* John Wiley and sons, New York (2000).
44. Akselrod et al (1981) Power Spectral Analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213: 220-222

45. Ewing DJ Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy (1982) *Br Med J* 285: 916-918
46. Chessa M, et al. Role of heart rate variability in the early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy in children (2002) *Herz.* 27:785-90
47. Laitinen T et al (1999) Power spectral analysis of heart rate variability during hyperinsulinemia in non diabetic offspring of type 2 diabetic patients: evidence for possible early autonomic dysfunction in insulin-resistant subjects. *Diabetes* 48: 1295-1299
48. Lykke JA et al A combined abnormality in heart rate variation and QT corrected interval is a strong predictor of cardiovascular death in type 1 diabetes. (2008) *Scand J Clin Lab Invest* 68: 654-659.
49. Task force of the european society of cardiology and north american society of pacing and electrophysiology (1996). Heart rate variability. standard of measurements, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93, 1043-1065
50. Neşe İmeryüz, Berrak Ç. Yeğen, Ayhan Bozkurt, Tamer Coşkun, Maria L. Peñacarrillo, and Nefise B. Ulusoy. (1997) Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol* 273-920-7
51. Benedikt Aulinger and David D'Alessio. Glucagon-like peptide 1 (2007) continued advances, new targets and expanding promise as a model therapeutic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:68–73.

Tab. 4 Parametri di frequenza e conduzione cardiaca prima e dopo terapia ipoglicemizzante nei 2 gruppi di pazienti

	Gruppo I		Gruppo II	
	I valutazione	II valutazione	I valutazione	II valutazione
F. C. 24 h	77 ± 8 (65-91)	78 ± 7 (65-88)	78 ± 10 (61-96)	81 ± 10 (68-99)
F. C.d.	80 ± 9 (68-100)	82 ± 9 (69-99)	82 ± 13 (59-104)	87 ± 11 (70-109)
F. C.n.	71 ± 9 (58-90)	72 ± 8 (69-99)	73 ± 10 (57-86)	74 ± 9 (59-86)
QT c	0.44 ± 0.016 (0.41-0.48)	0.44 ± 0.018 (0.41-0.47)	0.45 ± 0.01 (0.44-0.47)	0.45 ± 0.01 (0.43-0.47)
QTd	0.038 ± 0.007 (0.03-0.05)	0.035 ± 0.007(0.02-0.04)	0.027 ± 0.013 (0.01-0.05)	0.025 ± 0.01 (0.02-0.05)

F.C = frequenza cardiaca, F.C.d. = frequenza cardiaca diurna, F.C. n. = frequenza cardiaca notturna

RR = intervallo onda R onda R, QT = intervallo onda Q onda R, QTc = QT/√RR, QTd = QT max - QT min

