



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI  
ROMA "TOR VERGATA"**

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**NUTRIZIONE CLINICA E PREVENTIVA**

**XXIV CICLO**

**"Incretine e diabete di tipo di 2 : effetti di  
Exenatide bis and die sul metabolismo glucidico e sulla  
composizione corporea (massa grassa, massa magra, peso  
corporeo, circonferenza vita, BMI, metabolismo  
energetico) in una popolazione di adulti affetti da diabete  
di tipo 2"**

**VANINA SANTINI**

**A.A. 2009/2010**

**DocenteGuida/Tutor: Prof SERGIO GAMBARDELLA  
Coordinatore: Prof.ssa MARIA ROSA BOLLEA**

# INDICE

SOMMARIO	pag 2-7
ABSTRACT	pag 8-11
PREMESSA	pag 12-30
INTRODUZIONE	pag 31
Incretine	pag 32-44
Exenatide e Liraglutide	pag 45-56
COMPOSIZIONE CORPOREA	pag 57-80
SCOPO DELLO STUDIO	pag 81
SOGGETTI	pag 82
CRITERI DI INCLUSIONE	pag 83
DISEGNO	pag 84-85
METODI	pag 85
CALCOLI	pag 87
RISULTATI	pag 89-91
DISCUSSIONE	pag 92-94
CONCLUSIONI	pag 95
BIBLIOGRAFIA	pag 96-101

## SOMMARIO

E' noto come nella patogenesi e nella progressione del diabete mellito di tipo 2 sia presente una duplice alterazione che coinvolge non solo la secrezione insulinica da parte della beta cellula ma anche la sua azione periferica.

Normalmente, infatti, è il perfetto bilancio tra questi meccanismi che garantisce la corretta omeostasi glicemica così come, al contrario, quando la secrezione insulinica non riesce più a compensare la ridotta sensibilità periferica (insulino-resistenza), il diabete di tipo 2 diviene clinicamente manifesto.

Non solo, dati della letteratura, dimostrano che alla diagnosi, ben il 50 % della funzione beta cellulare è perduta per una riduzione della massa beta cellulare principalmente conseguente ad una aumentata mortalità per apoptosi.

Di conseguenza, il declino della funzione e la riduzione della massa beta cellulare, sono eventi chiave sia per la patogenesi che per la progressione del diabete di tipo2.

Queste informazioni, nel loro insieme, permettono di affermare che le alterazioni della secrezione insulinica rappresentano l' evento precoce e determinante per la patogenesi e l'evoluzione del diabete

di tipo 2, e che sono conseguenti a difetti che coinvolgono sia il funzionamento che la massa della beta cellula.

Nella pratica clinica, i farmaci attualmente disponibili per il trattamento del diabete di tipo 2 di maggior impiego, permettono di stimolare la secrezione insulinica o di migliorare la sua resistenza periferica ma non sono in grado di preservare la beta cellula dal suo esaurimento e ancor meno dalla riduzione della sua massa .

Da qui, l'esigenza di ricercare nuove terapie.

A tal riguardo, notevole attenzione è stata posta di recente alle incretine scoperte in realtà molti anni or sono.

Le incretine, della cui famiglia il maggior rappresentante è il GLP-1 (Glucagon like peptide 1), sono dei polipeptidi gastrointestinali secreti in risposta ad un pasto ricco in carboidrati che regolano, in modo diretto ed indiretto e glucosio-dipendente, il metabolismo glucidico stimolando la secrezione dell'insulina ed inibendo quella del glucagone.

Il GLP-1 inoltre, mediante la stimolazione diretta del senso della sazietà a livello del centro della fame ed il rallentamento dello svuotamento gastrico, determina una riduzione del peso corporeo.

In vivo, infine, il GLP-1, sembra indurre la rigenerazione delle cellule beta inibendo l'apoptosi.

Per quanto finora affermato, appare ovvio considerare gli analoghi strutturali del GLP-1 come nuova ed utile frontiera terapeutica grazie al loro potenziale terapeutico che permette non

solo di ottenere un miglior compenso metabolico preservando la funzione e la massa beta cellulare ma anche un calo ponderale (effetto quasi mai ottenibile con i farmaci secretagoghi) in diabetici di tipo 2.

Al momento tutti gli studi finora pubblicati sul farmaco in questione, hanno semplicemente osservato l'associazione tra esso ed il calo corporeo motivandola come possibile conseguenza della sua azione a carico del sistema nervoso centrale non essendo ancora del tutto chiari i vari meccanismi.

In letteratura infatti, non vi sono studi che abbiano indagato una possibile associazione con variazioni a carico della composizione corporea e del metabolismo basale.

Da qui è nata la nostra ipotesi scientifica: andare a valutare se exenatide somministrato alla posologia di 5 µg bis and die nel primo mese e a 10 µg bis and die nei restanti 6 mesi, potesse indurre delle variazioni a carico della composizione corporea e del metabolismo basale su un gruppo di diabetici di tipo 2, oltre naturalmente, in accordo ai dati della letteratura, a validare il suo potenziale sul compenso metabolico.

Per questo abbiamo arruolato 16 pazienti affetti da diabete di tipo 2 in cattivo compenso metabolico ( $HbA1c \geq 9 < 12\%$ ) ed obesità ( $BMI \geq 28 \text{ Kg/m}^2$ ) (tutti inoltre, eccetto due, presentavano anche ipertensione arteriosa e dislipidemia in trattamento farmacologico) normalmente afferenti al nostro ambulatorio e li abbiamo sottoposti

a trattamento dietologico e farmacologico con exenatide 5 µg bis and die per 1 mese (in accordo alla nota AIFA) e 10 µg bis and die per i sei mesi successivi in associazione all'ipoglicemizzante assunto regolarmente.

Grazie alla collaborazione con il Professor De Lorenzo, è stato possibile sottoporre tutti i pazienti al basale, dopo 1 mese di terapia con exenatide 5 µg bis and die e dopo sei mesi di terapia con exenatide 10 µg bis and die, a DEXA per la valutazione della massa grassa e della massa magra e ad impedenziometria per il calcolo del metabolismo basale.

Nel nostro ambulatorio venivano, a scadenza settimanale, valutati gli effetti del farmaco sulla glicemia valutando il diario glicemico del paziente e l'eventuale comparsa di effetti collaterali (quali nausea, vomito, dolore addominale).

Ogni mese invece, venivano prese le misurazioni antropometriche ed il peso corporeo e veniva richiesto al paziente un prelievo ematico per valutare l'HbA1c, la funzione renale, quella epatica ed il profilo lipidico.

Alla fine dei 7 mesi di terapia, il nostro studio ha dimostrato non solo un miglioramento del compenso metabolico con riduzione statisticamente significativa della HbA1c e del peso corporeo già dopo 1 mese di terapia quando il farmaco è al dosaggio iniziale ma anche una associazione positiva tra il farmaco e la composizione corporea, vale a dire una riduzione statisticamente significativa della

massa grassa e del BMI ed un aumento (seppur non statisticamente significativo) della massa magra e del metabolismo basale.

Dopo 6 mesi di trattamento con il farmaco al dosaggio pieno i nostri presupposti sono stati ulteriormente validati dimostrando una riduzione ulteriore e con valori maggiormente significativi dell'HbA1c, del peso corporeo, del BMI e della massa grassa. Invece, sono rimasti inalterati rispetto al trattamento con 5 µg bis and die, la massa magra ed il metabolismo basale.

Il nostro studio, quindi, costituisce il primo studio che ha cercato di valutare l'esistenza di una azione diretta tra exenatide e composizione corporea, ottenendo un dato importantissimo che dimostra che il calo ponderale associato alla molecola in studio, è legato anche ad una riduzione della sola massa grassa offrendo così un ulteriore potenziale azione alla già numerosa rosa di tale categoria farmacologica.

## **ABSTRACT**

### **OBJECTIVE**

The alterations of the secretion insulinic constitute the precocious and conclusive event the patogenesis and the evolution of the diabetes type 2 and they are consequent to defects that involve both the operation and the mass of the  $\beta$  cell. Such defects motivate the why, to the diagnosis, the loss is often observed of well 50% of the function and of the mass beta cellular.

From here the search of new treatment able to preserve both the secretive ability is the mass of the  $\beta$  cell. It enjoys of these ownerships "exenatide", an incretino-mimetic agonist of the receptor of the GLP-1 able both to stimulate the function and the reproductive ability of the  $\beta$  cell both, to induce a decrease ponder her in the diabetic patients type 2.

### **AIM**

Aim of our study is that to appraise the positive effect on the metabolic remuneration and on the decrease ponder her in a population of diabetics type 2 in bad metabolic remuneration and overweight in accord to the data of the literature and to appraise if the medicine in matter also has an effect on the bodily (Mass fat-MG, mass thin-MM, metabolism energetic-me) composition so that to



hypothesize an association among decrease ponder her and possible decrease of the fat mass.

## **METHODS**

16 patient with type 2 diabetes (5M/11F) with history of diabetes from about 11 years ( $11 \pm 5$ -mean  $\pm$ DS) and aged  $57,13 \pm 7.8$  that. Inclusion criteria were: FPG  $> 200$  mg/dl, HbA1c  $> 7,5\%$  and BMI  $> 28$  Kg/m<sup>2</sup>.

To all has been assistant to the stable basal therapy from 3 months to the max dosing (Glibenclamide 2,5 mg per 3 die, Repalinide 2 Mg for 3 die; Glicazide 30 Mg 2 cp die) and to the metformina 2,5 grs die, exenatide subcutaneus and diet.

Exenatide was administered under skin to the dosage of 5  $\mu$ g bis and die for 1 month (in accord to the note AIFA) and 10  $\mu$ g bis and die for the six following months.

All the patients have been submitted to the basal, after 1 month of therapy with exenatide 5  $\mu$ g bis and die and after six months of therapy with exenatide 10  $\mu$ g bis and die, to dexa for the evaluation of the total fat mass and the lean mass and to impedenziometria for the calculation of the basal metabolism, to weekly expiration, the compliance was appraised pharmacology and dietologica, the safety on the patient investigating on the appearance of collateral (what it nausea, vomit, abdominal pain) effects and its effect on the glicemia appraising the glicemic diary of the patient.

Every month, the antropometric parameters were taken (waist/hip BMI), the body weight and glycemc parameters (Hba1c), the renal and liver function, and lipid profile.

## RESULTS

From basal, the population was homogeneous in comparison to the age, to the duration of the diabetes and the presence of hypertension and dislipidemia (14 patients on 16) and in comparison to the antropometrics parameters (weight  $89 \text{ Kg} \pm 16$ , BMI  $33 \pm 5 \text{ Kg/m}^2$ , waist  $104 \pm 11 \text{ cm}$ ) and for the energy metabolism ( $1587 \pm 197 \text{ Kcal}$ ). For the body composition, it was notable the DS and, in the detail, the lean mass to the basal one was of  $49 \text{ Kg} \pm 9,2$  and the fat  $38,2 \text{ Kg} \pm 110$ .

After 1 month of therapy, to the administration of exenatide  $5 \mu\text{g}$  bis/die, has observed: 1) decreasing statistically of the HbA1c% ( $9,1\%$  vs  $7,7\%$  with  $p = 0001$ ); 2) decreasing of 1 Kg of body weight with  $p = 0,01$  and reduction of the BMI from  $33,8\%$  to  $33,5\%$  with  $p = 0,01$ ; 3) increase of the lean mass of 1 Kg (from  $48,9 \text{ Kg}$  to  $49,6 \text{ Kg}$ ) and decreasing statistically of the fat mass of 1 Kg ( $38 \text{ Kg}$  to  $37$  with  $p = 0001$ ); 4) increase of 100 Kcal of the energetic metabolism from 1578 to 1678.

After 6 months of treatment with exenatide  $10 \mu\text{g}$  bis and die in comparison to the basal, the study shows :1) decreasing HbA1c to  $6,7\%$  ( $-3\%$  from to the basal,  $p = 0003$ ) 2) decreasing of the weight of 3 Kg,  $p=0,01$  and of the wist of 3 cm ( $105$  vs  $102$   $p=007$ ) and of

the BMI (38,9 vs 32,6 Kg/m<sup>2</sup> p=002); 3) no influence of the lean mass and the basal energy to the basal but decreasing of total fat mass (37Kg vs 35 p=001).

## CONCLUSIONS

The study show that exenatide further to induce an important improvement of the glycemic control and the body weight, in accord to the litterature, introduces a positive association with the reduction of the fat mass in patients with type 2 diabetes. Such datum, strongly innovative, could constitute a main point and further advantage in the therapy with exenatide in a population as the diabetic, often overweight and with presence of visceral obesity.

In our study we have underlined besides that these positive data are already present when the dosage of the treatment is low for then to amplify him to the most larger doses. Finally our population has never introduced such collateral effects to bring to its suspension, and, sees the benefits, its totality of the patients is almost continuing with this therapy. Our study has been the first one to appraise the presence of a potential association between exenatide and body composition and it is our intention to amplify the number of the patients to be able to offer great credibility to how much shown.

**key words** : diabetes type 2, obesity, thin mass, fat mass, index of bodily mass, incretine.

# PREMESSA

## DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

Il **diabete mellito** è una sindrome metabolica, eterogenea sia per quanto riguarda i meccanismi eziopatogenetici che per l'espressione fenotipica, comprendente un insieme di condizioni morbose caratterizzate dalla presenza di iperglicemia ed altre alterazioni metaboliche, conseguenti o ad una carenza assoluta nella produzione insulinica che caratterizza il diabete di tipo 1 o ad un'alterazione secretoria della  $\beta$ -cellula associata ad una ridotta azione insulinica periferica, nota col nome di insulino resistenza tipica del diabete di tipo 2.

Secondo la nuova classificazione dell' American Diabetes Association (ADA) del 1999, ripresa dall' Organizzazione Mondiale della Sanita' (OMS), il Diabete viene distinto i

### • DIABETE DI TIPO 1

- Immunomediato
- Idiopatico

### • DIABETE DI TIPO 2

- A Prevalente Insulino-Resistenza

- A Prevalente Alterazione Della  
Secrezione Insulinica

Mentre il diabete di tipo 1 colpisce circa il 15% dell'intera popolazione diabetica, il diabete di tipo 2 è senz'altro la forma più rappresentata, comprendendo nelle sue varie forme il restante 85% dei diabetici ed essendo soprattutto frequente nei Paesi Industrializzati, dove domina "la società del benessere".

Nel diabete di tipo 2, precedentemente definito come diabete mellito non insulino dipendente o " dell'adulto", vediamo come la secrezione pancreatica di insulina all'inizio della malattia sia normale o addirittura aumentata, espressione del tentativo compensatorio da parte del pancreas di abbassare i livelli glicemici, risultando tuttavia inefficace a causa della ridotta sensibilità dei tessuti periferici all'azione dell'ormone. Nella storia naturale della malattia si assiste ad un progressivo esaurimento della funzione della beta-cellula, condizione definita fallimento secondario alla terapia orale, che può portare il paziente alla necessità di una terapia insulinica.

L'unica forma di diabete di tipo 2 geneticamente riconosciuta e determinata è la variante **MODY: maturiry-onset diabetes of the young**, correlata a mutazioni localizzate nel gene codificante per la glucochinasi sito nel braccio corto del cromosoma 7<sup>(1)</sup>. L'età d'esordio del diabete di tipo 2 è generalmente oltre i 45 anni, anche se negli ultimi anni si sta assistendo ad un notevole aumento della sua

incidenza in giovane età. L'esordio della malattia è graduale ed asintomatico, infatti è frequente scoprire la malattia quando sono già presenti le sue complicanze croniche<sup>(2-3)</sup>.

## EPIDEMIOLOGIA DEL DIABETE

Il tasso di incidenza del diabete di tipo 1, che all'interno della popolazione diabetica colpisce il 10-15%, varia secondo l'età.

Vediamo come il rischio aumenti nella prima e nella seconda decade, per poi mantenersi stabile nella terza e nella quarta ed aumentare di nuovo in seguito, indicando la presenza di due picchi nel verificarsi della malattia;

1. a metà della seconda decade
2. tra la sesta e la settima decade

Secondo uno studio effettuato in Gran Bretagna<sup>(4)</sup> il tasso di incidenza inizia ad aumentare rapidamente verso i nove mesi d'età, continua a salire fino ai 12-14 anni per poi ridursi. Nei primi 30 anni di questo secolo il tasso di incidenza nella popolazione bianca degli Stati Uniti al di sotto dei 15 anni è risultato pressoché costante. Tuttavia negli ultimi tre decenni il tasso è quasi triplicato. Esiste una

variazione dell'incidenza tra le varie razze e Paesi, come dimostrato dal fatto che il tasso d'incidenza per età compresa tra 0 e 14 anni è più basso in Giappone, nei Caraibi e nell'Europa meridionale rispetto ai Paesi Scandinavi dove è più elevato<sup>(5)</sup>. Data la scarsità di dati relativi all'incidenza del diabete mellito di tipo 2 si parla di prevalenza come stima dell'incidenza cumulativa per descriverne la frequenza. In base ai criteri del **National Diabetes Data Group** la stima della prevalenza del diabete, sia diagnosticato che non, nella popolazione statunitense tra i 20 ed 74 anni, è risultato pari a 6,6 %, valore corrispondente ad oltre 8 milioni di individui di cui il diabete diagnosticato rende conto della metà dei casi (3-4 %). L'aumento con l'età risulta simile negli uomini e nelle donne, sia nei neri che nei bianchi, ma la prevalenza appare leggermente maggiore tra le donne rispetto agli uomini, tranne che per la fascia di età compresa tra i 65 ed i 74 anni. La prevalenza tra i neri risulta leggermente più elevata che tra i bianchi a tutte le età e per entrambi i sessi. Dati recenti dimostrano inoltre un aumento della prevalenza del diabete di tipo 2 tra i giovani adulti rispetto al decennio precedente. Importante è, inoltre, valutare come cambi la prevalenza del diabete di tipo 2 in relazione alle differenze etniche e geografiche. Studi effettuati su un campione rappresentativo di popolazione statunitense negli anni 1976-1980, di età compresa tra i 45 ed i 54 anni, hanno permesso di definire come la prevalenza sia pari al 7,7 % tra i bianchi, 11,1 tra gli

individui di colore<sup>(6)</sup> ed elevatissima tra gli indiani Pima dell'Arizona 55,5 %<sup>(7)</sup>.

In Europa la prevalenza del diabete di tipo 2 si presenta elevata, in Italia con valori intorno al 6 %, in Finlandia con valori inferiori al 5 % ed in Svezia, Danimarca e Polonia con valori di circa il 4 %. Elevata è invece la prevalenza in Arabia Saudita con valori che oscillano intorno al 10 %. Nel 1995 il continente con il più alto numero di diabetici era l'Europa con 33 milioni di pazienti seguito dalle Americhe con 31 milioni e dal Sud Est Asiatico con 28 milioni. Si ritiene che proprio nel Sud Est Asiatico si svilupperà il maggior numero di casi di diabete: nel 2025 i pazienti con tale malattia saranno 80 milioni e si tratterà soprattutto di indiani.

L'Europa passerà al 4° posto con 48 milioni di malati. Globalmente l'incremento previsto sarà del 110%, di cui il 40% nelle nazioni industrializzate ed il restante 70% in quelle in via di sviluppo. In Italia i pazienti diabetici noti sono 1.700.000, ma le proiezioni indicano che nel 2025 tale cifra salirà a 3.300.000. Tale notevole variabilità della frequenza del diabete di tipo 2 nei diversi gruppi etnici indica l'esistenza di fattori ambientali, il cui impatto è variabile da un luogo all'altro, certamente determinanti nello sviluppo della malattia. Ci sono chiare evidenze di un notevole incremento di questa malattia nelle zone in via di sviluppo. Abbiamo detto che tra i fattori ambientali predisponenti sicuramente un ruolo di primaria importanza è svolto dall'obesità, soprattutto viscerale, quale causa di insulino-



resistenza e quindi, di diabete. È interessante valutare l'andamento della patologia in relazione all'obesità. Eccellenti dati sono stati ottenuti dallo studio del **National Health and Nutrition Survey**<sup>(8)</sup>, effettuato tra gli anni 1976 e 1980 su una popolazione di pazienti, maschi e femmine, in una fascia di età compresa tra i 25 ed i 74 anni. Tale studio dimostra che esiste un aumento statisticamente significativo del peso corporeo nei pazienti di 25 anni di età che poi sono divenuti intolleranti al glucosio rispetto a quelli, di uguale età, ma normopeso, la cui tolleranza è rimasta invece, normale indipendentemente dal sesso. Per età adulte, invece, sono emerse chiare differenze tra i sessi per quel che riguarda l'associazione tra tolleranza al glucosio e peso. Negli uomini la maggiore differenza nel peso corporeo tra gruppo di tolleranti e di intolleranti al glucosio è a livello del massimo peso raggiunto in età adulta. Nelle donne l'associazione tra tolleranza al glucosio e peso corporeo è più forte.

Da questi dati si evince che l'obesità è sicuramente correlata al diabete di tipo 2 e ne è un importante fattore di rischio, tuttavia non è sufficiente da sola, in quanto non tutti gli obesi diventano diabetici, a suggerire l'importanza della presenza di una pluralità di fattori, primo fra tutti quello genetico, nel determinismo di questa malattia.

Premesso, quindi, che è fondamentale nel paziente diabetico ottenere e soprattutto mantenere un adeguato controllo metabolico, bisogna però sottolineare come questo sia soltanto un aspetto del problema, in quanto il diabete è una malattia che presenta una serie

di fattori di rischio associati, quali l'ipertensione, la dislipidemia e l'aterosclerosi. Se non si riescono a controllare adeguatamente anche tutti questi altri fattori di rischio, non si può pensare di riuscire a sconfiggere tutti i problemi di mortalità e morbilità che, ancor oggi, affliggono il paziente diabetico, soprattutto a causa delle sue complicanze croniche.

## PATOGENESI

Il diabete mellito di tipo 2 è una patologia poligenica complessa con eterogenea espressione clinica, in cui l'insulino resistenza con iperinsulinemia e successivamente il difetto  $\beta$  cellulare con ridotta secrezione insulinica sono le principali caratteristiche.

La secrezione insulinica, sia nell'uomo<sup>(9)</sup> che negli animali<sup>(10)</sup>, avviene in maniera bifasica, con una iniziale fase rapida di rilascio di insulina nei primi 10 minuti, seguita da una fase lenta, gradualmente crescente che persiste durante tutta la durata dello stimolo iperglicemico .

Si ritiene che la perdita della prima fase della secrezione insulinica rappresenti la prima anomalia individuale nei pazienti destinati a sviluppare il diabete di tipo 2<sup>(11)</sup>.

La perdita di questa prima fase ha importanti conseguenze patogenetiche, poiché questa iniziale esplosione del rilascio di insulina svolge un ruolo importante nell'innescare quei tessuti bersaglio

,specialmente il fegato, che sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi glicemica<sup>(12-13)</sup>. Tuttavia, recenti<sup>(14-15)</sup> studi hanno dimostrato che la progressione della normotolleranza verso IGT o diabete di tipo 2 è associata ad una riduzione della sensibilità tissutale all'insulina e ad un aumento della secrezione insulinica con una prima fase di secrezione intatta.

Anche se la prima fase della risposta insulinica viene caratteristicamente persa nel diabete di tipo 2 questo difetto non si verifica finchè la concentrazione glicemica a digiuno non arriva ai 115-120 mg/dl<sup>(16)</sup>. Inoltre uno stretto controllo metabolico riporta parzialmente alla norma il difetto della prima fase della secrezione<sup>(17-18)</sup>, indicando che il difetto è acquisito e non ereditario. Allo stesso modo, la prima fase della risposta insulinica è risultata normale nei parenti di pazienti affetti da diabete di tipo 2<sup>(19)</sup>.

Nel corso dell'evoluzione della malattia diabetica, la  $\beta$  cellula presenta modificazioni che sono dapprima reversibili e che esprimono un tentativo di compenso all'aumentato fabbisogno di insulina al fine del mantenimento della normoglicemia<sup>(20)</sup>. Le alterazioni che riguardano la  $\beta$  cellula in questa prima fase sono caratterizzate principalmente da ipertrofia ed iperplasia con aumento della sensibilità alle basse concentrazioni di glucosio ed elevata secrezione insulinica basale. Successivamente le alterazioni  $\beta$  cellulari diventano irreversibili e sono caratterizzate da una progressiva perdita della

responsività al glucosio fino ad una condizione conclamata di deficit secretivo  $\beta$  cellulare con conseguente iperglicemia<sup>(21)</sup>.

Il numero delle cellule  $\beta$  rappresenta un determinante critico per quanto riguarda la quantità di insulina secreta dal pancreas. Nella maggior parte<sup>(22-23)</sup>, ma non in tutti<sup>(24)</sup> gli studi è stata osservata una riduzione della massa delle cellule  $\beta$  nei pazienti con diabete di tipo 2 di lunga durata. Al momento la causa della riduzione della massa delle cellule  $\beta$  non è stata ancora definita. Affinchè si sviluppi un'insulinopenia sufficiente a causare il diabete manifesto risulta necessaria una riduzione di oltre l'80-90% della massa delle cellule  $\beta$ <sup>(25)</sup>.

Le possibili interpretazioni di tale evidenza sono varie ed hanno dato luogo a diverse ipotesi patogenetiche.

Fattori metabolici insieme alla predisposizione genetica concorrono all'eziologia del difetto beta cellulare nel diabete di tipo 2. Un aspetto patogenetico che accomuna le diverse cause metaboliche coinvolte nel danno  $\beta$  cellulare è l'incremento dei processi apoptotici, responsabili della ridotta massa beta cellulare. Mutazioni geniche responsabili del difetto secretivo beta cellulare sono state dimostrate in alcune forme più rare di diabete, come il MODY e riguardano la Glucokinasi (GK)<sup>(26)</sup> o fattori di trascrizione come l'Hepatic Nuclear Factor (HNF) 1 $\alpha$ , 4 $\alpha$ , 1 $\beta$  o l'IPF 1.

Il diabete di tipo 2, in particolare nell'obeso, dal punto di vista patogenetico si caratterizza per la presenza dell'insulino resistenza,

che risulta preesistente al diabete nella sua fase conclamata. E' stato infatti osservato che i soggetti che presentano una condizione di ridotta tolleranza ai carboidrati, che generalmente precede di diversi anni la comparsa di diabete, già presentano un' insulino resistenza. Quando si associa anche un deficit secretorio si ha il diabete conclamato.

L'insulino - resistenza si manifesta a livello di piu' organi:

epatico, dove è caratterizzata da un'esaltata produzione di glucosio a digiuno e da una ridotta soppressione della neoglucogenesi durante l'iperglicemia post- prandiale, ed una insulino-resistenza periferica, in particolare a livello del tessuto muscolare. Questa condizione è dovuta ad una alterazione dei sistemi di trasmissione del segnale a livello del recettore insulinico, dell'attività chinasi, della produzione di secondi messaggeri

( quali il diacilglicerolo e l'inositoltrifosfato ) e infine, dei sistemi di trasporto del glucosio all'interno della cellula. Da un punto di vista molecolare il legame dell'insulina con il dominio extracellulare del suo recettore, conduce all'autofosforilazione della sua porzione intracellulare<sup>(27)</sup> attraverso un'attività tirosino-chinasi. Successivamente la tirosino-chinasi recettoriale fosforila alcuni specifici substrati

citoplasmatici<sup>(28)</sup> (IRS) i quali sono così in grado di legare ed attivare altre proteine, tra le quali la fosfatidil-3-chinasi (PI-3K), iniziando una complessa cascata di interazioni proteina-proteina, che conducono alla stimolazione del trasporto di glucosio mediato dalla traslocazione di uno specifico trasportatore, il GLUT-4 (glucose transporter-4), da un pool intracellulare alla membrana citoplasmatica dove permette il passaggio del glucosio, che altrimenti, in quanto molecola idrofila, non sarebbe in grado di attraversare il doppio strato fosfolipidico della membrana stessa. Una volta all'interno della cellula, e dopo essere stato fosforilato, il glucosio (6-fosfato), può seguire due principali destini metabolici:

- 1) ossidazione attraverso la via glicolitica ed il ciclo di krebs;
- 2) immagazzinamento sotto forma di glicogeno ad opera dell'enzima glicogeno- sintetasi.

Abbiamo, quindi, visto come nel diabetico di tipo 2 sia di fondamentale importanza la predisposizione genetica, per il diabete, come è stato recentemente dimostrato da studi condotti sui figli dei pazienti diabetici di tipo 2, che presentavano una maggiore resistenza all'azione dell'insulina, in una fase di normale tolleranza glucidica, rispetto ad un soggetto senza familiarità per il diabete. Quindi questi soggetti sono fenotipicamente sani ed hanno una normale risposta dopo carico orale di glucosio, tuttavia, se

intervengono alcune condizioni favorevoli, legate soprattutto allo stile di vita, essi hanno una maggiore predisposizione a sviluppare il diabete rispetto alla popolazione generale. L'espressione fenotipica del diabete di tipo 2, infatti, non è altro che l'interazione tra i determinanti genetici della malattia ed i fattori ambientali che ne facilitano l'espressione. La penetranza dei fattori genetici e l'impatto di fattori ambientali concorrono in varia misura ad esasperare uno o entrambi i meccanismi patogenetici del diabete di tipo 2, ossia l'insulino resistenza e l'alterazione della secrezione insulinica. I parenti di primo grado di soggetti affetti da diabete di tipo 2 hanno inizialmente una normale tolleranza glucidica ed una normale risposta insulinica all'OGTT e tali possono rimanere per tutta la vita. Tuttavia, se intervengono fattori favorevoli quali, l'età, l'obesità con distribuzione viscerale del tessuto adiposo, la dieta ipercalorica, la vita sedentaria, lo stress ed una scarsa attività fisica, si può avere il passaggio dalla fase di normale tolleranza al glucosio ad una fase di ridotta tolleranza al glucosio o IGT.<sup>(29)</sup> In questa fase, pur non essendoci ancora un diabete conclamato, sono già evidenti la perdita del picco precoce della risposta insulinica all'IVGTT e l'aumento della risposta tardiva al glucosio per via orale.

Se persistono le condizioni ambientali favorevoli in presenza di determinanti genetici, il soggetto passa nella fase conclamata della malattia. In questa fase, alla riduzione della sensibilità insulinica sia

a livello muscolare, che epatico con aumentata produzione di glucosio, si aggiunge un'alterazione della secrezione insulinica.

## CLINICA DEL DIABETE

La malattia diabetica si può presentare in forme molto differenti, che possono andare da un inizio brusco con chetoacidosi e talora i segni del coma, a forme del tutto asintomatiche che vengono scoperte solo per caso o durante indagini di routine.

Quadri clinici così diversi tra loro dipendono dal grado di insufficienza insulinica, che può essere assoluta o relativa, dall'aumento degli ormoni controinsulari, dal grado di insulino-resistenza, dalla compromissione delle altre vie metaboliche e/o dalla presenza di alterazioni di organi e tessuti, implicati nella patogenesi del diabete mellito. Il modo di presentarsi della malattia diabetica può essere ricondotto a tre forme principali di manifestazioni cliniche:

**manifestazioni metaboliche** tutte ricondotte all'insulino-deficienza e/o all'iperinsulinemia, all'iperglicemia e all'iperchetonemia ove presenti sono:

- ✓ POLIURIA e NICTURIA compaiono quando l'iperglicemia supera la soglia renale, pari a 170-180 mg/dl, ed è presente glicosuria;
- ✓ POLIDIPSIA è conseguente della poliuria, ed è un meccanismo di compenso alla perdita di liquidi, da non contrastare;



- ✓ **DIMAGRIMENTO** e **POLIFAGIA** sono causati dalla perdita di glucosio e dalla mancata o alterata utilizzazione degli elementi nutritivi;
- ✓ **DISIDRATAZIONE** conseguente alla poliuria specialmente se intensa, o a volte ad un ridotto senso della sete.

In aggiunta a questi sintomi principali possono essere presenti:

- ✓ **ACETONURIA** con o senza **ALITO ACETONICO** si verifica quando, per mancata utilizzazione del glucosio, viene metabolizzato una quota eccessiva di grassi, per cui aumentano i corpi chetonici nel sangue, con comparsa nelle urine quando superano la loro soglia renale;
- ✓ **ALTERAZIONI** della **RIFRAZIONE OCULARE** che determinano una riduzione dell'acuità visiva, sono in rapporto all'iperglicemia e alle conseguenti alterazioni osmotiche del sangue;
- ✓ **SINTOMI DA SCOMPENSO ACUTO**

**manifestazioni non metaboliche** (anche se sempre riconducibili all'iperglicemia) sono:

- ✓ **MANIFESTAZIONI INFETTIVE** (dermatiti, prurito vulvare, cistopieliti, paradentosi, ecc);
- ✓ **COMPLICANZE MICROVASCOLARI**

**manifestazioni associate** (in caso di diabete secondario );

- ✓ sintomi relativi a malattie del pancreas esocrino (pancreatici, neoplasie pancreatiche, policistosi ovarica), malattie endocrine primitive ( ipo-iperfunzione) dell'ipofisi, della tiroide, del surrene, del pancreas ( cellule  $\alpha$  delle isole pancreatiche, produttori glucagone, o delle cellule  $\delta$  che producono somatostatina), delle gonadi ( ovaio policistico), malattie genetiche (celiachia, Turner, ecc.) e da fattori ambientali ( obesità, malnutrizione).

Il profilo clinico delle due forme principali di diabete tipo 1 e tipo 2 è sostanzialmente differente .

Nel diabete di tipo 1 la sintomatologia clinica è prevalentemente in rapporto alle manifestazioni metaboliche conseguenti all'insufficienza insulinica, all'iperglicemia, alla iperchetonemia e all'ipoglicemia iatrogena.

A questi sintomi successivamente si aggiungono quelli dell'iperglicemia cronica e delle alterazioni micro e macroangiopatiche responsabili delle complicanze croniche della malattia diabetica.

I sintomi da insulino-deficienza sono presenti all'esordio, a causa dell'insulino-deficienza i corpi chetonici, prodotti in grandi quantità, possono avere effetti clinicamente negativi, in particolare nausea e vomito. Possono essere presenti anche sintomi clinici di ipoglicemia causati da errori terapeutici, in particolare quando il protocollo terapeutico prevede principalmente insulina pronta o in

caso di trattamento con microinfusore ( dove viene utilizzata solo pronta).

I sintomi determinati all'iperglicemia sono poliuria con polidipsia, polifagia, dimagrimento, astenia e compromissione visiva.

L' iperchetonemia può dare sintomi a carico dell'apparato digerente (nausea, vomito, alitosi, dolore addominale, ecc) e determina un aggravamento della poliuria.

Nel diabete di tipo 2 l'esordio è insidioso e subdolo. Alla diagnosi possono essere presenti alcuni segni metabolici (poliuria, polidipsia, polifagia ecc. ) generalmente in forma lieve, frequentemente l'inizio della malattia è del tutto asintomatico. Alcune volte, l'esordio della malattia è caratterizzato da sintomi legati ad alterazioni di tessuti ed apparati (cute, denti, apparato genitourinario e/o cardiovascolare) che riconoscono come momenti eziopatogenetici diretti o indiretti quelli dell'insulino-resistenza e dell' iperglicemia e dell'iperlipemia.

La clinica del diabete di tipo 2 è strettamente legata alle fasi della sua storia naturale.

In una fase preclinica ed asintomatica del diabete si possiamo avere in questi pazienti, oltre ad una familiarità positiva per il diabete, una serie di condizioni riconducibili all'insulino-resistenza e all'iperinsulinemia, quali l'obesità, l'ipertensione e le complicanze vascolari: malattia coronaria, infarto e vasculopatie periferiche.

L'obesità, l'ipertensione e le patologie cardiovascolari possono precedere la comparsa della patologia diabetica, che contribuisce ad un loro aggravamento ed inoltre determina la comparsa e l'evoluzione delle complicanze microvascolari.

Il diabete di tipo 2 raramente evolve verso la chetosi, solo in caso di stress per iperproduzione degli ormoni controinsulari o durante episodi febbrili.

## COMPLICANZE DEL DIABETE MELLITO

La malattia diabetica presenta complicanze acute e croniche.

### COMPLICANZE ACUTE

- **ipoglicemia** da somministrazione eccessiva di insulina o ipoglicemizzante orale rispetto all'effettivo fabbisogno (iatrogena) o da esecuzione di attività fisica non programmata o mancata assunzione del pasto. Si manifesta clinicamente con sintomi adrenergici: ansietà, tachicardia, sudorazione, tremore e pallore e sintomi neuroglicopenici quali fame, nausea, cefalea, vertigini, debolezza.<sup>(32)</sup>

- **chetoacidosi** da iperafflusso di acidi grassi al fegato per iperattivazione della lipolisi da carenza assoluta di insulina e sviluppo

di corpi chetonici. Si tratta di una complicanza tipica del diabete di tipo 1 all'esordio o durante il decorso clinico per la comparsa di malattie intercorrenti che inducono un improvviso stato di insulino-resistenza.

- **iperosmolarità** tipica del diabete di tipo 2 . E' patogenicamente correlata ad eventi " stressanti" che, favorendo l'immisione in circolo di ormoni controinsulari, accentuano lo stato di resistenza periferica all'insulina provocando un cospicuo incremento dei valori glicemici e , conseguentemente, dell'osmolarità plasmatica.

## **COMPLICANZE CRONICHE**

Le complicanze croniche del diabete mellito costituiscono un problema clinico ancora più importante in quanto sono quelle che più frequentemente si verificano e che maggiormente incidono sulla qualità di vita dei pazienti, sia in termini di morbilità sia in termini di mortalità.

Tali complicanze possono essere distinte in:

### **MICROANGIOPATICHE**

1. **RETINOPATIA**
2. **NEFROPATIA**

### **3. NEUROPATIA**

#### **MACROANGIOPATIA**

- 1. VASCULOPATIA CORONARICA**
- 2. VASCULOPATIA CEREBRALE**
- 3. VASCULOPATIA PERIFERICA**

## INTRODUZIONE

È noto che nel diabete di tipo 2 si assiste ad un progressivo declino della funzione delle  $\beta$ -cellule pancreatiche e che, al momento della diagnosi, circa il 50% della funzione  $\beta$ -cellulare risulta già perduta negli anni che precedono la diagnosi (1, 2). Non solo la funzione, ma anche la massa di  $\beta$ -cellule sembra alterata nel diabete di tipo 2, così come dimostrato in studi di Butler et al (3).

Analizzando tessuti pancreatici autoptici, è stato trovato che nei soggetti diabetici sia normopeso che obesi la quantità di  $\beta$ -cellule era ridotta se confrontata ai soggetti non diabetici di eguale peso corporeo.

La riduzione della massa  $\beta$ -cellulare sembra dovuta principalmente ad un aumento della morte delle cellule per apoptosi. Il declino della funzione e la riduzione della massa  $\beta$ -cellulare rappresentano eventi chiave nella patogenesi del diabete di tipo 2 e nella sua progressione (4-7).

Normalmente secrezione insulinica e sensibilità periferica all'ormone sono fenomeni in bilancio tra loro: la secrezione aumenta al diminuire della sensibilità e viceversa, assicurando quindi all'individuo l'omeostasi glicemica (8). Quando la secrezione insulinica non è in

grado di compensare la ridotta sensibilità all'ormone (insulino-resistenza) il diabete si manifesta clinicamente.

In uno studio longitudinale, alcuni soggetti a rischio di sviluppare diabete (indiani Pima) ma ancora con normale tolleranza al glucosio sono stati seguiti per un periodo di 5 anni, misurando nel tempo la secrezione e la sensibilità insulinica (9). Alcuni di essi hanno sviluppato la malattia: erano quelli con la peggiore secrezione insulinica all'inizio dello studio e che durante i 5 anni di osservazione hanno registrato un'ulteriore riduzione della loro secrezione insulinica (9). I dati ottenuti in questi anni hanno portato alla conclusione che le alterazioni della secrezione insulinica rappresentano un evento precoce e determinante nella patogenesi della malattia e nella sua evoluzione (10, 11): sono presenti difetti sia qualitativi che quantitativi, secondari ad alterazioni di funzionamento e riduzione della massa  $\beta$ -cellulare.

Tuttavia, i farmaci attualmente disponibili in clinica per migliorare la secrezione insulinica non sono pienamente soddisfacenti per una serie di motivi. Tra questi i principali sono la stimolazione della secrezione insulinica indipendente dai livelli di glicemia (causano quindi spesso crisi ipoglicemiche talvolta molto gravi e prolungate), l'aumento del peso corporeo, l'incapacità di influenzare la progressiva perdita di funzione  $\beta$ -cellulare.

Per questi motivi continua la ricerca di nuovi farmaci in grado di stimolare la funzione e la capacità riproduttiva delle  $\beta$ -cellule.

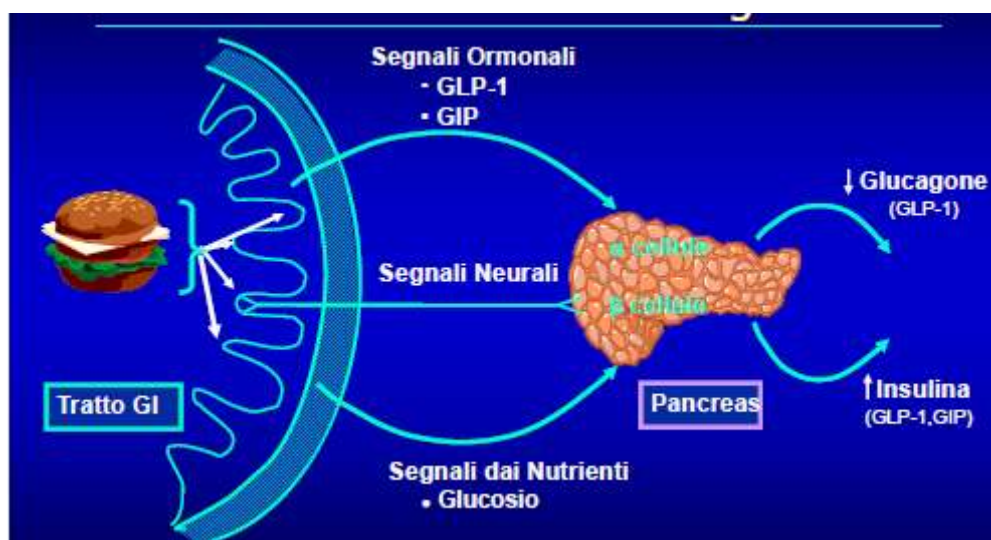


## LE INCRETINE

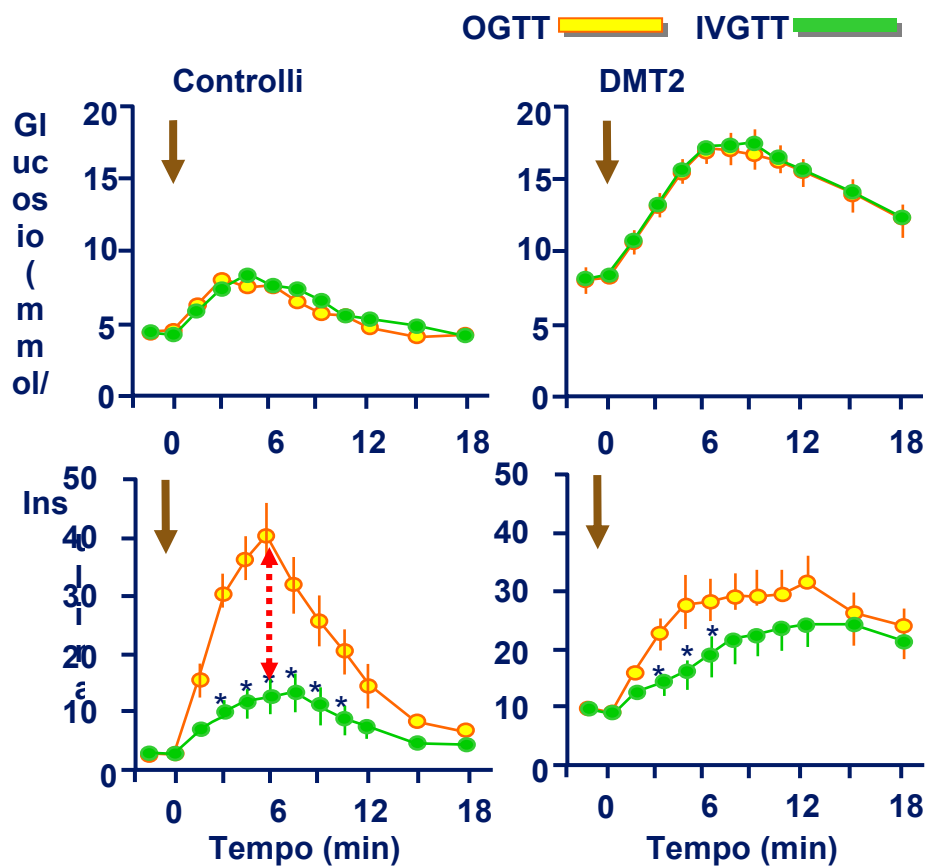
Le incretine comprendono un complesso sistema di peptidi coinvolti in modo diretto o indiretto nella regolazione di molteplici funzioni dell'apparato gastrointestinale e della secrezione degli ormoni pancreatici, in particolare insulina e glucagone.

L'esistenza di questo sistema era già stata ipotizzata negli anni '30 e successivamente confermata negli anni '60 con la dimostrazione che estratti duodenali erano in grado di stimolare la secrezione insulinica.

Per «incretina» si intende un **peptide secreto in risposta all'ingestione di un pasto e che, a concentrazioni fisiologiche, è in grado di stimolare il rilascio di insulina e di inibire quello del glucagone.**

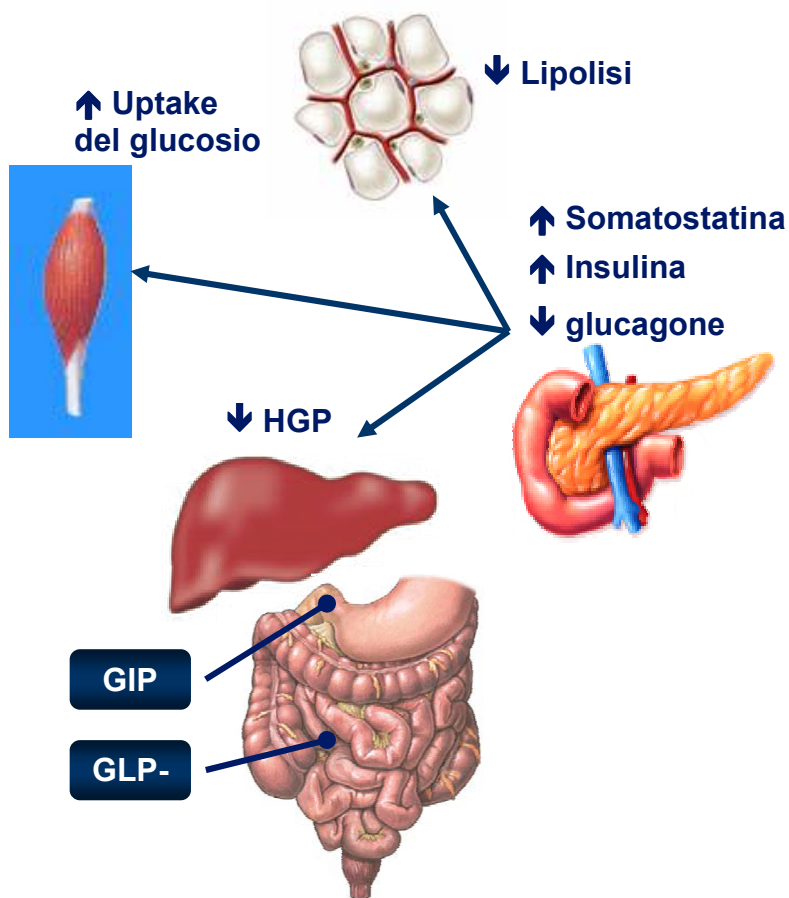


Recente è anche la dimostrazione che il rilascio delle incretine è notevolmente più elevato quando stimolato dall'assunzione orale di glucosio rispetto a quella endovenosa come dimostrato da studi che hanno comparato il così detto "effetto incretinico" indotto da OGTT versus IVGTT



Diabetologia 1986, 26 (46-52)

Un'ampia famiglia di peptidi cade sotto il termine di «incretine». A questa famiglia appartengono secretina, VIP, PACAP, glucagone, peptidi glucagonosimili (GLP-1, GLP-2, glicentina, oxyntomodulina, GIP). Ciononostante, circa l'80% dell'effetto incretinico viene attribuito a due soli ormoni(1): il *Gastric Inhibitory Polypeptide* o, più modernamente, *Glucosemediated insulinotropic polypeptide (GIP)* ed il *Glucagonlike peptide 1 (GLP-1)*



Lancet 2006, 368 (2696-2705)

Il **GIP** è una molecola di 4.984 kDa, prodotta a livello delle cellule K del duodeno, digiuno, ileo, rilasciata con l'assunzione di un pasto misto, soprattutto se ricco di carboidrati e lipidi. Le principali attività biologiche includono:

- 1) l'inibizione della secrezione acida gastrica;
- 2) la stimolazione della secrezione di insulina;
- 3) l'attività simil-insulinica sul tessuto adiposo

Il **GLP-1** è una molecola di circa 4.200 kDa, prodotta dalle cellule L dell'intestino tenue distale e del colon.

Una volta rilasciato in risposta al pasto, soprattutto se ricco in carboidrati, il **GLP-1** esercita diverse azioni:

- 1) stimola la secrezione di insulina;
- 2) inibisce la secrezione di glucagone;
- 3) rallenta lo svuotamento gastrico;
- 4) esercita varie azioni extra-pancreatiche e
- 5) partecipa alla regolazione dell'appetito .

Piccoli pasti hanno maggiore capacità di stimolare la secrezione di **GIP** e minore capacità di stimolare la secrezione di insulina; di contro, pasti abbondanti hanno una maggiore capacità di stimolare la secrezione di insulina e di **GLP-1**(2).

Le concentrazioni plasmatiche di insulina, *GIP* e *GLP-1* aumentano prima ancora che gli alimenti giungano a contatto, nel lume intestinale, con le cellule *L* e *K*(2).

Questa fase è anche nota come «fase cefalica» e sembra essere la conseguenza di una stimolazione diretta da parte delle terminazioni nervose presenti a livello intestinale.

Nel **Diabete Mellito Tipo 2**, la secrezione di *GLP-1* dopo l'assunzione di un pasto, contestualmente ad una ridotta secrezione di insulina, è stata comunemente, ma non universalmente, descritta come ridotta mentre è normale (se non aumentata) quella di *GIP* (3).

Con la progressione della malattia diabetica, la produzione post-prandiale di *GLP-1* tende a ridursi ulteriormente, mentre la produzione di *GIP* resta pressoché inalterata(4).

Alla luce di queste osservazioni è stato ipotizzato un ruolo terapeutico del ripristino dei livelli di *GLP-1*, ma non necessariamente di *GIP*, con l'obiettivo di migliorare la funzione insulare (aumento della secrezione di insulina e riduzione di quella di glucagone) e, quindi, favorire il ripristino dell'omeostasi glucidica(5).

*GLP-1* e *GIP*, una volta secreti, vengono rapidamente degradati ad opera del Dipeptidilpeptidasi-4 (*DPP-4*).

Di conseguenza l'emivita dei due peptidi è molto breve, nell'ordine di 2 e 7 minuti,rispettivamente.

## GLI EFFETTI PANCREATICI DEL GLP-1

Gli effetti pancreatici delle incretine sono molteplici, mediati da meccanismi diretti o indiretti che coinvolgono le cellule delle isole di Langerhans, e al momento non ancora del tutto chiari. Le isole pancreatiche esprimono una notevole densità di recettori per il GLP-1, più elevata di quella riscontrabile in altri tessuti dell'organismo umano(6,7).

In condizioni sperimentali, l'aggiunta di GLP-1 o GIP nel terreno di coltura di isole pancreatiche determina un incremento glucosio-dipendente della secrezione insulinica. Questo effetto è mediato dalla depolarizzazione della membrana cellulare successiva alla chiusura dei canali del potassio ATP-dipendenti, cui consegue l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, l'ingresso di calcio e, infine, l'esocitosi dei granuli di insulina. Questi processi dipendono, primariamente, dal fatto che dopo essersi legati ai propri recettori specifici, le incretine inducono l'attivazione dell'enzima adenil-ciclastasi, cui consegue generazione di AMP ciclico ed attivazione della protein-chinasi A.

L'esposizione cronica (2-5 giorni) di isole pancreatiche alle incretine determina un significativo miglioramento della risposta insulinica a concentrazioni crescenti di glucosio(9-11) ed una migliore conservazione della morfologia delle isole con riduzione dell'apoptosi(9).

L'esposizione prolungata di isole pancreatiche (sia di soggetti normali che di pazienti con Diabete Tipo 2) a GLP-1 o exendina-4 (un agonista del GLP-1) favorisce i processi di differenziamento dei precursori delle  $\beta$ -cellule e di proliferazione delle  $\beta$ -cellule esistenti (10,12-14). Tale effetto potrebbe favorire il mantenimento o addirittura l'incremento della massa  $\beta$ -cellulare, che nel Diabete Tipo 2 è ridotta già nelle fasi iniziali della malattia. Peraltro, questi risultati attendono di essere confermati *in vivo* nell'uomo.

Per quanto in varie condizioni sperimentali si assista anche ad una riduzione del rilascio di glucagone in risposta al GLP-1, l'effetto diretto delle incretine, ed in particolare del GLP-1, sulla  $\beta$ -cellula rimane dubbio.

Infatti, il potenziamento del rilascio di insulina potrebbe essere sufficiente a ridurre, di per sé, la secrezione di glucagone. Anche le cellule delta, produttrici di somatostatina, esprimono recettori per GLP-1 suggerendo una complessa regolazione tra incretine e network endocrino dell'isola pancreatica.

*In vivo*, l'infusione di GLP-1 determina l'aumento della secrezione di insulina in maniera glucosio-dipendente e la concomitante soppressione della secrezione di glucagone.

Ne consegue un innalzamento del rapporto molare insulina:glucagone a livello del circolo portale, con una più efficace soppressione della produzione epatica di glucosio. La glucosio-dipendenza della risposta ormonale pancreatica è di particolare

interesse perché determina la diminuzione della secrezione di insulina ed il concomitante aumento di quella di glucagone con il ridursi dei valori di glicemia. Tutto ciò è fondamentale per evitare diminuzioni eccessive della glicemia durante il trattamento con analoghi del GLP-1 o inibitori del DPP-4.

## EFFETTI EXTRA-PANCREATICI DEL GLP-1

Le incretine esercitano numerosi effetti extra-pancreatici il cui significato fisiologico e le cui implicazioni cliniche non sono completamente compresi (*Tabella I pag 41*).

Gli effetti di maggiore interesse si esplicano a livello del tessuto nervoso centrale, fegato, apparato gastro-intestinale (stomaco) e cardiovascolare.

A livello del **sistema nervoso centrale**, il GLP-1 riduce l'appetito e aumenta il senso di sazietà, contribuendo alla regolazione del peso corporeo.

Il GLP-1 è probabilmente in grado di attraversare la barriera emato-encefalica a livello dell'area postrema e di attivare circuiti neuronali che modulano i centri ipotalamici, responsabili del senso di sazietà e, quindi, della regolazione dell'introito calorico. Tale effetto non dipenderebbe dal GLP-1 circolante quanto dalla frazione secreta direttamente a livello ipotalamico.



A sua volta il *GLP-1* sistemico potrebbe agire a livello di recettori periferici connessi con afferenze vagali capaci di generare una stimolazione centrale ipotalamica.

Di fatto, l'infusione di *GLP-1* nell'uomo determina riduzione dell'introito calorico e calo ponderale.

Oltre agli effetti sulla regolazione di appetito e sazietà, il *GLP-1* sembra in grado di aumentare la proliferazione/rigenerazione cellulare

e ridurre l'apoptosi delle cellule nervose oltre a limitare il deposito di amiloide (15,16), motivi per i quali è stato ipotizzato un potenziale effetto anti-Alzheimer.

A livello dell'**apparato gastro-intestinale**, il *GLP-1* esercita uno spiccato effetto inibitorio sulla motilità di parete(17).

Tale effetto è prevalente a livello gastrico, con conseguente riduzione dell'intensità e della frequenza delle onde peristaltiche e aumento del tono dello sfintere pilorico, con conseguente rallentamento dello svuotamento dello stomaco. A questo effetto è stato attribuito parte del miglioramento dell'iperglicemia post-prandiale nei pazienti diabetici di Tipo 2 trattati con analoghi del *GLP-1*.

A livello dell'**apparato cardiovascolare**, il *GLP-1* riduce i valori di pressione arteriosa e la frequenza cardiaca, migliora la

vasodilatazione endotelio-mediata ed aumenta la contrattilità miocardica nel post-infarto nell'uomo(18-21).

Nell'animale da esperimento è stato anche osservato un miglioramento del condizionamento post-ischemico.

Il significato clinico di questi effetti rimane però da verificare e chiarire.

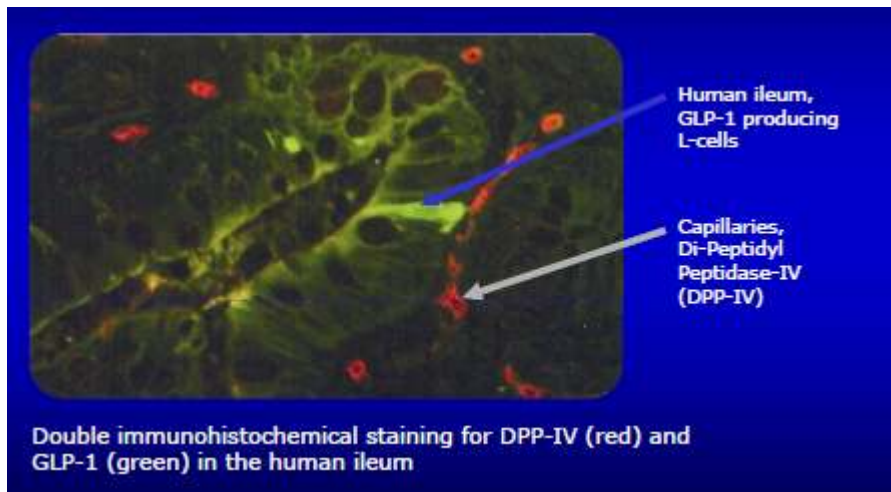
Per quanto l'azione del GLP-1 sul metabolismo glucidico sia largamente dovuta agli effetti sulla secrezione degli ormoni pancreatici, è stata postulata anche un'azione periferica diretta. Studi pre-clinici avrebbero dimostrato un aumento della captazione di glucosio in cellule muscolari scheletriche e adipose.

È stata anche osservata una riduzione della produzione epatica di glucosio ed un certo grado di miglioramento della steatosi epatica.

Questi effetti, per quanto interessanti, non hanno però ancora sicure evidenze nell'uomo, nel quale gli effetti sulla secrezione di insulina e glucagone rimangono il principale meccanismo di controllo dell'omeostasi glucidica.

## DEGRADAZIONE DEL GLP-1

Il GLP-1 secreto o infuso per via venosa viene rapidamente inattivato ad opera del Dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-4)(22,23).



Endocrinology 1999;140: 5356-5363

L'enzima, noto anche come antigene CD26 delle cellule T, fa parte di un'ampia famiglia di isoforme il cui substrato non è sempre noto e consiste in una serin-peptidasi espressa in differenti tessuti quali rene, intestino, epatociti ed endotelio, oltre ad essere presente in circolo in forma solubile. L'effetto di degradazione è rapido ed efficiente con meno del 40% di GLP-1 circolante attivo ed una emivita di circa 2 minuti.

L'utilizzo del GLP-1 nel trattamento del Diabete Tipo 2 non può, pertanto, prescindere dall'inibizione della degradazione del GLP-1.

A tal fine sono stati sviluppati analoghi del GLP-1 (incretinomimetici) resistenti all'azione dell'enzima DPP-4.

Le sostituzioni/modificazioni a livello della porzione N-terminale conferiscono resistenza all'attività di degradazione del DPP-4, mentre quelle con sostituzioni a livello della porzione C-terminale sono caratterizzate da una minore «clearance» renale(24).

Di questi analoghi l'unico attualmente disponibile a fini terapeutici è l'Exenatide (Byetta®) caratterizzato da un'emivita di circa 6-8 ore(25). Sono in corso di sviluppo formulazioni a lento rilascio (LAR) di Exenatide, mentre attiva è la ricerca di preparazioni ad emivita ancor più lunga tale da consentirne un'unica somministrazione settimanale se non bi-settimanale o mensile.

Una seconda preparazione in fase avanzata di sviluppo è Liraglutide, un analogo acilato del GLP-1 umano legato ad un acido grasso (acido palmitico) che consente il legame ed il trasporto con l'albumina. Liraglutide ha un effetto prolungato e può essere somministrato in un'unica iniezione sottocutanea giornaliera.

Il secondo approccio consiste nell'inibizione dell'enzima DPP-4 prevenendo così la degradazione del GLP-1.

Questa classe di farmaci è anche chiamata «*incretin enhancers*» e la selettività d'azione è un prerequisito necessario al fine di garantirne la sicurezza.

L'inibizione di isoforme diverse dell'enzima può infatti causare eventi avversi(26). Le molecole attualmente in commercio,

Sitagliptina (Xelevia® e Januvia®) e Vildagliptina (Galvus®), mostrano un'attività inibitoria selettiva per il DPP-4 rispetto agli altri enzimi di questa classe e non interagiscono con gli altri DPP, minimizzando così il rischio di effetti collaterali(27).

Sitagliptina e Vildagliptina hanno una lunga durata d'azione essendo il primo utilizzato in un'unica somministrazione giornaliera ed il secondo due volte al giorno.

### **INCRETINO-MIMETICI : EXENATIDE**

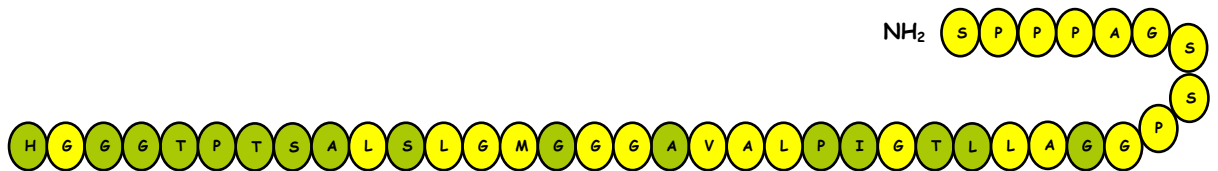
Numerosi sono i farmaci incretino-mimetici in corso di valutazione ma Exenatide è l'unico attualmente disponibile, mentre in avanzata fase di registrazione è Liraglutide.



Exenatide è una molecola di sintesi sostanzialmente simile a exendin-4, un peptide isolato dalla saliva del Gila Monster (*Heloderma suspectum*), una lucertola velenosa del sud dell'Arizona. Questa molecola ha un'omologia della sequenza aminoacidica pari al 50% del GLP-1 umano, ma è resistente alla degradazione da parte dell'enzima

DPP-4 garantendo un'emivita di 3,5-4,0 ore con concentrazioni ematiche che rimangono nel range farmacologico per circa 6 ore. L'analogo viene in larga parte eliminato per filtrazione glomerulare.

### Exendin -4



### GLP-1 Umano



Somministrato alla dose di 5µg per il primo mese e 10 µg come dose di mantenimento almeno 60 minuti prima dell'assunzione del pranzo e della cena, garantisce una riduzione della glicemia nelle successive 5-7 ore agendo principalmente sulle escursioni post-prandiali.

Liraglutide, analogo coniugato all'albumina mediante un acido grasso, che ne garantisce un lento assorbimento e un'emivita di 11-13 ore e, quindi, può essere impiegato in monosomministrazione.

Entrambe le molecole sono dotate di ottima affinità per il recettore per GLP-1.

Sia Exenatide che Liraglutide oltre al miglioramento del controllo glicemico comportano una riduzione del peso corporeo (*Tabella II pag 41*).

La somministrazione di Exenatide o Liraglutide(28-32) è seguita da una stimolazione glucosio-dipendente della funzione insulare con aumento della secrezione di insulina e riduzione di quella del glucagone.

Il trattamento prolungato è capace di migliorare la stessa dinamica della secrezione insulinica con recupero della prima fase di secrezione. L'effetto soppressivo sulla secrezione di glucagone viene a mancare per valori di glucosio plasmatico <65 mg/dl, così che il trattamento

non interferisce con le capacità contro-regolatorie del sistema in caso di ipoglicemia.

L'efficacia clinica di Exenatide è stata valutata verso placebo in studi randomizzati in doppio cieco di 30 settimane in soggetti con Diabete Tipo 2 in trattamento con metformina (n=336), sulfonilurea (n=377) o la combinazione delle due (=733)(33-35) risultando in una riduzione media della HbA1c di 0,9 punti percentuali rispetto al trattamento con placebo.

Parte dei soggetti in trattamento attivo arruolati in questi studi è stata quindi seguita «in aperto» fino al terzo anno di terapia(36). Nei soggetti nei quali il trattamento veniva mantenuto

(verosimilmente, i migliori *responders*) il beneficio sulla riduzione della emoglobina glicosilata risultava costante.

Più limitati sono i dati relativi a Liraglutide e fanno sostanzialmente riferimento a studi di 14 settimane in monoterapia rispetto al placebo(37).

La somministrazione in un'unica dose sottocutanea di 1,25 mg comportava la riduzione di circa 1 punto percentuale di HbA1c rispetto al placebo ed una sensibile riduzione delle oscillazioni giornaliere della glicemia.

Oltre al miglioramento del controllo glicemico, i *trial* clinici dimostrano un effetto di riduzione ponderale nei soggetti con Diabete Mellito Tipo 2.

Negli studi registrativi, dopo 30 settimane di trattamento con Exenatide il calo del peso corporeo era di 2,5-3,0 kg con un effetto particolarmente evidente quando il farmaco veniva somministrato con metformina ed effetto meno evidente in combinazione con sulfonilurea.

Il *follow-up* «in aperto» di pazienti trattati con

Exenatide arruolati nei trial registrativi dimostra (con tutte le limitazioni di uno studio non controllato) un calo ponderale persistente e continuo fino al 3° anno di *follow-up* con una perdita di peso complessiva di circa 5 Kg(36).

Un calo ponderale è stato osservato anche con Liraglutide, con effetto che pare essere di tipo dose-dipendente ai dosaggi che



verranno verosimilmente proposti per l'uso clinico (2,5-3 Kg dopo 3-4 mesi di trattamento con 1,20-1,80 mg/die in monosomministrazione di Liraglutide)(37).

Il calo ponderale associato al trattamento con incretino-mimetici non sembra collegato agli effetti indesiderati gastro-intestinali (nausea e, in qualche caso, vomito, vedi appresso) in quanto una riduzione di peso

si verifica in egual misura sia nei pazienti che presentano gli effetti collaterali sia in quelli che non li presentano.

Al contrario, il calo ponderale viene attribuito ad un effetto centrale degli incretino-mimetici con riduzione dell'appetito e aumento del senso di sazietà(37).

Il trattamento con Exenatide è stato anche confrontato con la terapia con insulina glargine (in monosomministrazione giornaliera) o a formulazione premiscelate di analoghi dell'insulina (in duplice somministrazione giornaliera).

Il trattamento con Exenatide risultava non inferiore rispetto ai regimi insulinici testati per quanto concerneva il controllo glicemico (HbA1c).

La terapia con incretino-mimetico era seguita da un miglior compenso della glicemia post-prandiale mentre le glicemie a digiuno risultavano più basse con la terapia insulinica.

Da sottolineare il fatto che escursioni glicemiche e numero degli episodi di ipoglicemia erano minori in corso di trattamento con Exenatide, trattamento cui si associava calo ponderale contrariamente all'incremento di peso registrato con il trattamento insulinico.

Alcuni dati iniziali e sporadici suggeriscono che Exenatide e Liraglutide potrebbero indurre una riduzione dei trigliceridi, del PAI-1 e della pressione arteriosa.

Al momento attuale, peraltro, non è possibile discernere quanto questo effetto sia dovuto direttamente al trattamento e quanto al calo ponderale.

Infine, dati preliminari sembrano suggerire che la terapia basata su Exenatide(38) o su Liraglutide(37) possa migliorare la sensibilità della  $\beta$ -cellula al glucosio, offrendo un supporto all'ipotesi che la terapia con incretino- mimetici possa contribuire a «conservare» la funzione  $\beta$  -cellulare del soggetto diabetico. Questa affascinante ipotesi necessita però di valutazioni dirette tuttora carenti *in vivo*, nell'uomo.

## **SICUREZZA E LA TOLLERABILITÀ DEGLI INCRETINO- MIMETICI**

Gli incretino-mimetici sono caratterizzati da un favorevole rapporto efficacia-sicurezza. I principali effetti collaterali sono a

carico dell'apparato gastro-intestinale con frequenza piuttosto elevata (il 40-50% dei pazienti in trattamento con Exenatide riferisce almeno un episodio di nausea(39) senza che questo corrisponda ad una significativa caduta della *compliance*.

Più raramente viene segnalato vomito, diarrea, vertigini, cefalea o malessere generalizzato(39).

L'incidenza di questi effetti collaterali sembra essere dose-dipendente, è maggiore nelle prime 4-8 settimane di trattamento ma tende comunque a diminuire con il prosieguo del trattamento(39).

Il rischio di ipoglicemia è sostanzialmente equivalente a quello del trattamento con placebo quando Exenatide è stata impiegata in monoterapia o in associazione a metformina, mentre episodi lievi sono stati riportati in combinazione con sulfoniluree, motivo per il quale la dose di questi ultimi farmaci dovrebbe essere ridotta con l'inizio della terapia con incretino-mimetici.

Il numero di ipoglicemie, soprattutto notturne, è nettamente inferiore

rispetto al trattamento con insulina glargine(40).

Gli incretino-mimetici non sembrano esercitare tossicità epatica, renale o cardiovascolare.

L'impiego di Exenatide viene comunque sconsigliato in pazienti con insufficienza renale cronica (clearance della creatinina <30 ml/min), dal momento che l'eliminazione della molecola intera è

prevalentemente renale; non sussistono controindicazioni all'impiego del farmaco in pazienti con epatopatia cronica.

Non essendo disponibili studi clinici in età pediatrica, gravidanza o allattamento, l'uso di incretino-mimetici non è indicato in queste condizioni.

Inoltre, dati gli scarsi dati clinici su popolazioni di pazienti anziani, viene raccomandata cautela nell'uso del farmaco in tali soggetti. Recentemente sono stati segnalati rari casi di pancreatite acuta in soggetti in trattamento con Exenatide. La prevalenza di questi eventi è, comunque, molto bassa rispetto al numero di soggetti trattati e tutti i casi si sono verificati in portatori di classici fattori di rischio per pancreatite(41).

Cionondimeno, è opportuno porre attenzione a sintomi suggestivi di pancreatite in soggetti in trattamento con Exenatide, per quanto occorra sottolineare che tali sintomi (dolore addominale, nausea e vomito) possono essere più frequenti in soggetti in trattamento con Exenatide come più sopra ricordato.

Il rallentato svuotamento gastrico indotto dagli incretino-mimetici può ridurre il grado e la velocità di assorbimento di farmaci somministrati per via orale.

Pertanto, l'assunzione della terapia per via orale dovrebbe essere anticipata di almeno 1 ora rispetto alla somministrazione di Exenatide. Peraltro, non si sono osservati effetti clinici rilevanti sulla farmacocinetica di metformina o di sulfoniluree.

Exenatide, infine, induce la comparsa di anticorpi nel 40-50% dei pazienti.

Questa percentuale si riduce a meno del 10% dei pazienti trattati con Liraglutide.

Questi anticorpi, tuttavia, non sembrano influenzare in alcun modo l'efficacia del trattamento.

### **INCRETINO-MIMETICI E INIBITORI DEL DPP-4, differenze terapeutiche**

La principale differenza tra incretino-mimetici ed inibitori di DPP-4 risiede, ovviamente, nella via di somministrazione: per via iniettiva i primi, per os i secondi.

Ai primi, quando impiegati in monosomministrazione, viene anche attribuito un calo della HbA1c moderatamente maggiore (0,8-1,2% vs 0,6-1,0%).

Peraltro, in terapia combinata con altri farmaci, così come vogliono le attuali indicazioni, le differenze sono praticamente inesistenti.

La somministrazione di un analogo risulta in concentrazioni di GLP-1 molto più elevate di quanto si ottenga con gli inibitori DPP-4.

Questi ultimi, però, comportano la persistenza in circolo non solo di GLP-1 ma anche di GIP, ma non è chiaro se questo «doppio» effetto si traduca in un qualche significato clinico.

Alle più elevate concentrazioni di *GLP-1* che si ottengono con la somministrazione di analoghi viene attribuito l'effetto di calo ponderale. L'effetto degli inibitori *DPP-4* sul peso corporeo è, invece, sostanzialmente neutro(39).

La natura esogena e la modificazione della sequenza aminoacidica comportano un certo grado di immunogenicità degli analoghi del *GLP-1* senza, peraltro, che siano stati sinora osservati effetti di tachifilassi.

Il mantenimento del *GLP-1* endogeno è, secondo alcuni, in grado di attivare in modo diretto il sensore portale del glucosio, un meccanismo omeostatico in grado di regolare il metabolismo epatico del glucosio.

Entrambe le forme di trattamento comportano un miglioramento della funzione  $\beta$ -cellulare forse con un effetto più spiccato per gli analoghi del *GLP-1*, mentre comparabile risulta l'effetto inibitorio sulla secrezione di glucagone.

Grazie alla glucosio-dipendenza che i due trattamenti esercitano sulla secrezione ormonale pancreatica il profilo di sicurezza è sovrapponibile,

con un rischio di ipoglicemia pressoché nullo.

Gli analoghi del *GLP-1* riducono la velocità di svuotamento gastrico in modo più marcato di quanto si possa osservare con gli inibitori *DPP-4*, un effetto che si traduce in un maggior rischio di nausea e vomito

con i primi.

Studi pre-clinici confermano per entrambe le strategie terapeutiche un'azione di protezione della  $\beta$ -cellula, ma per nessuna

<b>AZIONI</b>	<b>Glp1 nativo</b>	<b>Exenatide Liraglutide</b>	<b>Inibitori DPP-4</b>
<b>Secrezione Insulinica</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>Risposta postprandiale</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>Aumento sintesi proinsulina</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>Soppressione glucagone</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>Rallentamento svuotamento gastrico</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>EFFETTO MARGINALE</b>
<b>Calo ponderale</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>EFFETTO MARGINALE</b>

delle due è stato possibile confermarne l'effetto clinico a lungo termine.

<b>Caratteristiche Farmacologiche</b>	<b>Exenatide</b>	<b>Liraglutide</b>	<b>Sitagliptina</b>
<b>Somministrazione</b>	<b>Sottocutanea</b>	<b>Sottocutanea</b>	<b>Orale</b>
<b>Frequenza di somministrazione</b>	<b>Due volte</b>	<b>Una volta</b>	<b>Una volta</b>
<b>Dose</b>	<b>5-10</b>	<b>0,5-2</b>	<b>100 mg</b>
<b>Riduzione HbA1c %</b>	<b>↓0,4-1,0</b>	<b>↓0,75-0,8</b>	<b>↓0,7-0,8</b>
<b>Riduzione calo ponderale</b>	<b>↓0,6-2,8 Kg</b>	<b>0,6-1,5</b>	<b>Neutro</b>
<b>Eventi avversi</b>	<b>Nausea, vomito</b>	<b>Nausea, vomito</b>	<b>No</b>



## MISURA DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA

I modelli di studio della composizione corporea si basano sulla suddivisione, proposta da Magnus-Levy del corpo umano in due compartimenti principali noti come *massa magra* o *massa libera dal grasso* (FFM, Fat Free Mass) e *massa grassa* (FM, Fat Mass) 76.

La massa grassa è costituita prevalentemente da lipidi, mentre la massa magra comprende il glicogeno ed i sali minerali, le proteine e l'acqua totale corporea (TBW, Total Body Water).

La FM è il grasso corporeo che non contiene potassio, ha una densità di circa 0.9 g/ml ed appare distribuito nel tessuto adiposo sottocutaneo ed intracorporeo.

La FFM include il resto del corpo con una *densità* quasi costante pari a 1.099-1.100 g/ml (comprendente la densità dell'osso 3g/ml, delle proteine 1.34 g/ml e dell'acqua 0.993 g/ml), un contenuto di potassio di 69 mEq/kg nei maschi (10% in meno nelle femmine) e di acqua intorno a 72-73%.

Più recentemente, sono stati sviluppati modelli di composizione corporea multicompartimentali, derivati dalle componenti della FFM e 30 della FM e utilizzabili in quelle condizioni in cui la composizione della FFM risulta modificata rispetto agli standard.

Il modello "a cinque livelli", proposto in "step" consecutivi, è risultato finora quello più completo ed innovativo<sup>77</sup>. Le diverse

componenti vengono interpretate negli aspetti della composizione tissutale.

Risulta evidente l'associazione ad ogni aspetto della metodica che specificamente ne permette la valutazione.

Il *I livello* o atomico si riferisce ai principali elementi corporei (idrogeno, azoto, ossigeno, carbonio) valutabili con tecniche quali la misurazione del bilancio dell'azoto e tecniche di diluizione isotopica.

Il *II livello* o molecolare considera componenti come l'acqua, le proteine, la componente minerale nel suo insieme; (Una metodica che ci consente di misurare l'acqua corporea totale, presente quasi esclusivamente nella massa magra, è l'impedenzometria-BIA).

Il *III livello* o cellulare si riferisce alla componente cellulare, correlata alla massa cellulare metabolicamente attiva in quanto responsabile del metabolismo corporeo e valutabile, ad esempio, con la misurazione del potassio totale corporeo; alla massa extracellulare (solida e liquida) ed alla massa grassa.

Nel *IV livello* trovano definizione il tessuto adiposo (sottocutaneo e viscerale), la muscolatura scheletrica, i visceri, la massa ossea ed il sangue, valutabili mediante misurazioni dirette di indici biumorali o metodiche antropometriche indirette.

Il *V livello* o corporeo totale, più complesso, può essere analizzato mediante tecniche semplici e non invasive (antropometrica) o metodiche accurate e/o invasive (es. densitometria a doppio raggio fotonico-DXA, che consente la

valutazione del contenuto e della densità minerale ossea e la misura diretta delle parti molli, FM e FFM; Risonanza Magnetica Nucleare permette di valutare gli organi interni e la massa muscolare).

## TECNICHE DI RILEVAMENTO DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA

### *Antropometria*

Considerando il corpo umano come l'insieme di due comparti (FM e FFM), la determinazione del solo peso corporeo e della statura non risulta informativa dei rapporti relativi fra le due componenti<sup>78</sup>. Si ricorre all'utilizzo di indici peso corporeo/statura che, utilizzando i predetti parametri, possono rappresentare misure di riferimento circa la composizione corporea degli individui.

Tra gli indici di peso-statura, l'indice di Quetelet o indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI), ottenuto dal rapporto fra il peso corporeo in chilogrammi ed il quadrato della statura in metri ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), è considerato avere la migliore validità come indicatore dell'obesità, in quanto meno correlato con la statura rispetto ad altri, in particolare in corrispondenza dei due estremi della distribuzione (150 cm, 180 cm).

Il BMI è correlato con la massa grassa e ne spiega la 32 variabilità solo nella misura del 60-80%. Rappresenta inoltre un indicatore della massa magra. Dal confronto fra i valori di BMI e le

percentuali di massa grassa è emerso che il BMI risulta significativamente correlato con la quantità di massa grassa per le popolazioni, mentre il confronto per singolo individuo risulta scarsamente predittivo<sup>79</sup>.

In aggiunta, gli svantaggi di questa formula di predizione sono la non applicabilità in alcuni gruppi di soggetti per i quali la quota relativa di massa grassa risulta sovrastimata (donne in gravidanza, atleti) o sottostimata (soggetti disidratati) e la non affidabilità di applicazione nelle popolazioni pediatriche (assenza di parametri di riferimento e limitata possibilità di confronto tra popolazioni etnicamente diverse).

Per tali motivi viene impiegato principalmente negli studi di popolazione e come indagine di screening per la valutazione dell'obesità.

La misurazione delle circonferenze corporee in particolari distretti fornisce informazioni in merito alla quota ed alla distribuzione della massa muscolare e della massa grassa, sia regionalmente, sia a livello dell'intero corpo. Il valore del rapporto circonferenza vita-circonferenza fianchi fornisce informazioni sulla distribuzione del grasso a livello addominale così da poter classificare l'obesità come ginoide o androide.

Tale indice, facilmente ottenibile, poco dispendioso e non invasivo è diffusamente considerato nella pratica clinica un valido

indice di distribuzione della 33 massa grassa corporea ed un buon predittore delle complicanze correlate all'obesità.

La tecnica più frequentemente utilizzata per caratterizzare la valutazione della massa grassa è la *plicometria*.

Questa consente la misurazione dello spessore del tessuto adiposo sottocutaneo in determinati "punti di repere" del corpo per mezzo del plicometro di Harpenden o di Holtain che esprime in millimetri lo spessore della plica cutanea. La plicometria è la tecnica non invasiva di valutazione della massa lipidica distrettuale e totale più diffusa in clinica. Le misurazioni vengono effettuate in genere a livello bicipitale, tricipitale, sottoscapolare e sovrailiaco.

I dati ottenuti vengono introdotti in formule validate al fine di determinare la densità corporea totale e, quindi, la quantità di grasso sia distrettuale che totale.

I limiti principali della plicometria sono rappresentati dall'assunzione che la quantità del grasso sottocutaneo rispecchi quella del grasso viscerale e dalla difficoltà di effettuare le misure con errori che rientrino all'interno dell'errore standard del 5%.

Un'altra metodica di valutazione del tessuto adiposo è rappresentata dalla *ultrasonografia*, che consente la misurazione dello spessore del tessuto adiposo sottocutaneo<sup>80</sup>.

L'ultrasonografia "B mode" produce immagini bidimensionali in tempo reale che consentono di visualizzare e misurare l'interfaccia massa lipidica-muscolo. Studi sulle misure dello spessore della

massa lipidica sottocutanea e viscerale addominale mediante metodica ultrasonografica, confrontate con quelle ottenute per mezzo di scansioni tomografiche (TC), hanno validato la metodica ultrasonografica per la determinazione della massa lipidica. Più specificamente lo spessore della massa lipidica intraddominale misurata con ultrasonografia ha mostrato una buona correlazione con l'area lipidica intraddominale misurata con metodica TC, a supporto di una possibile utilizzazione della tecnica ultrasonografica nella valutazione diretta e non invasiva dei depositi lipidici intraddominali.

Nell'ambito della definizione della massa lipidica addominale le misure ottenute utilizzando tale metodica danno una migliore informazione rispetto alla plicometria e alla misura delle circonferenze corporee.

Al contrario, la metodica risulta di seconda scelta rispetto alla plicometria nella misura della massa grassa totale corporea.

Metodiche più recenti utilizzano l'interazione dei raggi infrarossi (*Near- Infrared Interactance, NIR*) per sviluppare equazioni di predizione per il calcolo della massa lipidica<sup>81</sup>. Un "probe" a fibre ottiche è connesso ad un analizzatore digitale che misura indirettamente la composizione tessutale (lipidi e acqua) in vari punti del corpo.

La metodica si basa sul principio che la densità ottica è correlata in modo lineare alla massa lipidica sottocutanea e alla massa lipidica totale.

Il punto bicipitale è quello più spesso utilizzato come singolo punto per la misura della massa lipidica con la suddetta metodica.

Il raggio vicino allo spettro dell'infrarosso penetra i tessuti molli (lipidi e muscolo) e viene riflesso dall'osso verso il rilevatore.

Successivamente i dati ottenuti vengono inseriti in una equazione di predizione in associazione ad altri parametri (statura, peso corporeo, livello di attività) per ottenere la stima della percentuale della massa lipidica corporea. L'errore di misura riportato per la massa lipidica risulta pari al 3,2%. La metodica è semplice, può essere eseguita velocemente, non è invasiva e la strumentazione è relativamente poco costosa.

Tuttavia i dati riguardanti l'errore nella misura (si assume che l'idratazione della massa priva di lipidi sia costante intorno al 73% del peso corporeo) ed il rapporto vantaggi/svantaggi risultano ancora incompleti. Sono quindi necessari ulteriori studi per verificare la validità, l'accuratezza e l'applicabilità della metodica.

### ***Misura della densità corporea***

La massa lipidica corporea può essere valutata con precisione mediante la misurazione della ***densità corporea***. La più nota ed affidabile metodica per la sua determinazione è rappresentata dalla ***Pesata Idrostatica***, che richiede l'immersione totale o quasi totale (metodica dell'individuo con il capo non immerso) in acqua<sup>82</sup>. Il calcolo

della densità totale corporea viene effettuato partendo dalla conoscenza del volume di acqua spostato e/o del peso corporeo del soggetto immerso, in combinazione con il peso del soggetto misurato su bilancia.

L'errore di questa metodica nella misura della massa lipidica è stato valutato complessivamente pari a circa il 3% del peso corporeo ed è principalmente dovuto all'assunto che la massa priva di lipidi abbia una densità costante (1.100 kg/L) in ogni singolo soggetto. La tecnica della pesata idrostatica è stata di recente sostituita dalla *pletismografia a spostamento d'aria* (ADP, *Air-Displacement Plethysmography*), che richiede la permanenza del soggetto in un ambiente chiuso, contenente aria<sup>83</sup>.

La tecnica comporta la presenza di due ambienti, uno ospitante il soggetto e l'altro delimitante uno spazio che costituisce il volume di riferimento; i due ambienti o camere, all'interno di una cabina, sono separati da un diaframma sensibile alle variazioni di pressione della camera in cui si trova il soggetto e che vengono rilevate nell'altra come variazioni di volume.

Il vantaggio di tale metodica rispetto alla pesata idrostatica consiste nell'evitare l'immersione del soggetto in acqua. Studi effettuati per dimostrare una maggiore accuratezza della ADP rispetto ad altre metodiche nella misura del grasso corporeo incoraggiano l'utilizzazione di questa metodica per lo studio dell'adiposità nel bambino. 37



## ***Comparti idrici: metodi di diluizione isotopica e di conduttanza***

La massa lipidica corporea può essere anche determinata mediante la ***misurazione dell'acqua totale corporea*** o dei suoi componenti per sottrazione dal peso corporeo totale della massa priva di lipidi, la cui misura si basa sulla quantificazione dell'acqua corporea.

In un adulto sano l'acqua totale corporea (TBW) costituisce circa il **72,4%** (69,4-73,2%) della sua massa alipidica e circa il 60% del peso corporeo. Tale frazione non è tuttavia costante nel corso dell'accrescimento e dell'invecchiamento del corpo, così come in molte condizioni di malattia.

Mentre nell'infanzia, a livello precoce, l'acqua costituisce circa l'80-83% della massa alipidica, con l'avanzare dell'età questa frazione diminuisce notevolmente.

La metodica diretta più precisa per determinare in vivo i compartimenti idrici è quella della ***diluizione isotopica***<sup>84</sup>. Tale metodica, invasiva, si basa sul principio del bilanciamento delle masse per cui la concentrazione iniziale ( $C_i$ ) per il volume iniziale ( $V_i$ ) è uguale alla concentrazione finale ( $C_f$ ) per il volume finale ( $V_f$ ), ed è espresso dalla seguente equazione:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Tale equazione si applica dopo la somministrazione di una quantità nota di un tracciante per via orale o endovenosa al soggetto. Si attende un periodo di tempo sufficiente perché il tracciante possa distribuirsi nel comparto che si vuole esaminare. Dopo la correzione per eventuali perdite<sup>38</sup> (urine, saliva, sudore), si calcola il volume di distribuzione del tracciante che corrisponde al  $V_f$  (volume finale), cioè al volume del comparto idrico che si vuole determinare (acqua totale, acqua intra o extracellulare).

Si sceglie un tracciante (inerte) che si distribuisca uniformemente solo nel distretto che si intende valutare e che non interagisca con molecole diverse (figura 4).

*L'acqua totale corporea (TBW)* può essere misurata utilizzando un tracciante dell'acqua marcata (es. il trizio, il deuterio, o l'ossigeno 18), prelevando due campioni di fluidi corporei (sangue, urine o saliva): uno prima di iniettare il tracciante, l'altro dopo il tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio di distribuzione (2-3 ore).

La metodica di analisi dipende dalla scelta del tracciante: il beta counting per il trizio, lo spettrometro di massa per l'<sup>18</sup>O, ed il rilevatore di raggi infrarossi, il gas cromatografo, o lo spettrometro di massa per il deuterio. Per ognuno di questi traccianti la stima dell'errore è inferiore ad 1 kg per l'acqua totale corporea (TBW). Questa metodica è considerata di riferimento e l'errore raggiunge il 10% per la determinazione della massa lipidica corporea.<sup>39</sup>

La capacità del corpo umano di condurre corrente elettrica ha permesso l'utilizzazione della metodica *Impedenza bioelettrica (BIA)* per la valutazione dei distretti corporei, sfruttando le caratteristiche elettriche dei tessuti al passaggio di corrente alternata (la corrente non può essere erogata in modo continuo per i fenomeni di elettrolisi)<sup>85,86,87</sup>.

Si considerano i tessuti biologici come costituiti da due distretti fluidi: extracellulari (ECW) ed intracellulari (ICW).

Il comportamento elettrico dei tessuti corporei è equiparabile a quello di un circuito elettrico costituito da una resistenza ed un condensatore in parallelo, in cui il comparto intracellulare (ICW) funge da condensatore e quello extracellulare (ECW) da resistenza. La corrente (I) attraverserà il tratto capacitivo ICW (IICF) e, preferenzialmente, il tratto resistivo ECW (IECF).

Il tratto resistivo esplicherà il suo effetto oppositivo in modo continuo e costante nel tempo e proporzionalmente alla quantità di elettroliti presenti nel comparto ECW. Il tratto ICW, ossia il condensatore, permetterà un buon passaggio di corrente da una certa frequenza di corrente in poi (>5 khertz), determinando uno sfasamento del flusso di corrente in uscita.

Tale effetto si chiama reattanza capacitiva ( $X_c$ ).

L'impedenza ( $Z$ ), rappresentata in forma vettoriale, esprime l'impedimento totale al passaggio di corrente in quanto corrisponde alla somma degli effetti della resistenza ( $R$ ) e capacitanza ( $X_c$ ). Il

corpo umano viene assimilato ad un cilindro conduttore in cui  $R=\rho L/S$  (dove R: resistenza, L: lunghezza del conduttore, S: sezione del conduttore). Da qui:  $V=\rho H^2/R$  (equazione che relaziona il volume del cilindro con il valore della resistenza).

Tale equazione risulta alla base delle formule per la determinazione della TBW o della FFM. In particolare  $TBW = a(H^2/R)+b$  (equazione di tipo lineare, dove i coefficienti a e b sono calcolati su popolazioni specifiche) pone in relazione il volume di acqua totale corporea (TBW) e l'indice BIA ( $H^2/R$ ).

Quindi dopo la misura dell'impedenza corporea (Z) con l'apposito strumento (Impedenziometro), essa viene inserita in apposite formule per la determinazione della TBW o della FFM<sup>88</sup>. 41

Attualmente vengono utilizzati anche impedenziometri che lavorano a più frequenze, detti multifrequenziali. Si è infatti visto che mentre a bassa frequenza il contributo resistivo è massimalmente dovuto al comparto extra-cellulare, ad alta frequenza anche il tratto capacitivo fa sentire la sua influenza man mano che i vari condensatori si "attivano", sfasando più o meno la corrente di uscita.

In tal modo da una serie di misure di resistenza (R), reattanza ( $X_c$ ), angolo di fase (f) e impedenza (Z), ottenute a varie frequenze di corrente erogata, è possibile determinare la cosiddetta frequenza caratteristica ( $F_c$ ).

Tale valore, introdotto in formule più complesse di quella fondamentale, permette la determinazione di valori più accurati di TBW, ICW, ECW, e quindi FFM.

Il metodo *spettroscopico (Bioimpedenza spettroscopica, BIS)* consente di analizzare, nell'ambito di un intervallo di frequenze erogate (1kHz-1MHz), uno spettro di valori di resistenza (R) e reattanza ( $X_c$ ) utile per la determinazione della frequenza caratteristica ( $F_c$ ), della resistenza del comparto ECW (RECW) e della resistenza del comparto ICW (RICW) 89.

Ad un modello tissutale evoluto corrisponde un modello elettrico (Cole-Cole) che tiene conto della diversificazione cellulare. Nella misurazione delle impedenze è possibile determinare una circonferenza (equazione di Hanai) con la quale risulta possibile stimare per interpolazione la Resistenza del comparto ECW a frequenza 0 ( $R_{fo}$ ), la Frequenza 42 caratteristica ( $F_c$ ) alla più alta reattanza, e la Resistenza del comparto ICW (RICW)90,.

La metodica finora si serve di elettrodi applicati in particolari punti di repere sulla mano e sul piede (figura 5).

### **Tecnica dell'impedenza bioelettrica**

L'analisi dell'impedenza corporea consente misure più accurate dell'adiposità rispetto alle metodiche antropometriche (psicomtria e circonferenze corporee), sebbene queste ultime possano fornire utili informazioni relative alla distribuzione della massa lipidica corporea.

In aggiunta, l'impedenziometria può essere più facilmente standardizzata e trova applicazione nei programmi di trattamento (per produrre un bilanciato calo ponderale) degli obesi a lungo termine.

Recentemente in un ampio campione di popolazione di razza caucasica, sottoposto a misure impedenziometriche e suddiviso in percentili di massa lipidica, è stato osservato un aumento progressivo della quota di massa lipidica con l'avanzare dell'età: tali dati costituiscono inoltre valori di riferimento per 43 la misura della massa lipidica totale mediante metodica BIA.

L'errore di misura della metodica impedenziometrica sulla percentuale di massa lipidica corporea è risultato pari a circa il 10% del peso corporeo.

La misura della *conduttività elettrica corporea totale (TOBEC, Total Body Electrical Conductivity)* si basa sulle differenti proprietà elettriche della massa lipidica (FM) e della massa magra (FFM).

Il soggetto viene introdotto in un solenoide, in cui si misurano le variazioni che si producono nel campo elettromagnetico del soggetto in funzione dell'applicazione di una corrente elettrica alternata al solenoide.

Questa metodica, come quella dell'impedenza bioelettrica, consente la formulazione di equazioni per il calcolo della FFM. La misura della massa lipidica (FM) viene derivata in maniera indiretta dalla differenza fra il peso corporeo totale e la FFM stimata. Le

limitazioni della metodica (rappresentate dall'elevato costo e dalle dimensioni dell'apparecchiatura, che richiede quindi molto spazio) la collocano ad una prevalente utilizzazione nel campo della ricerca.

### **Densitometria a doppi raggio X (Dual energy X-ray Absorptiometry; DXA)**

La **Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA)** è una tecnica relativamente nuova, inizialmente utilizzata per la determinazione della densità minerale ossea e successivamente impiegata anche nell'analisi dei 44 tessuti molli, della massa lipidica (FM) e della massa magra (FFM)<sup>91,92</sup>.

L'attenuazione che un tessuto biologico oppone ad un fascio incidente di radiazioni è funzione dello spessore, della densità e della composizione chimica del tessuto stesso. La metodica DXA per lo studio della massa lipidica ed in generale dei tessuti molli si basa sul principio che tali tessuti determinano una attenuazione costante alla emissione di due definite radiazioni energetiche di 40 kV e 70 kV (raggi X).

Il fenomeno dell'attenuazione si basa sull'effetto fotoelettrico e sull'effetto Compton.

Nella realtà il fenomeno della attenuazione non è lineare, tuttavia assumendo che sia costante si ha per un tessuto costituito da sola massa grassa  $R_f=1,21$ , e per un tessuto costituito dal sola

massa magra  $RI=1,399$ ; l'attenuazione per il tessuto osseo risulterebbe molto più alta.

Poiché nell'organismo umano ogni tessuto è costituito da più componenti in proporzioni diverse, l'attenuazione energetica risultante corrisponde ad un valore medio.

Il sistema DXA consta di un piano di rilevazione in cui sono inseriti i sensori per il rilevamento dell'attenuazione.

A tale piano viene applicato un carrello mobile che scorre longitudinalmente e che trasporta l'emettitore di energia che a sua volta può scorrere su binari in modo trasversale mediante un motore di precisione.

Per mezzo di un computer idoneo si determina il moto longitudinale e trasversale dell'emettitore, l'acquisizione dei dati di attenuazione rilevati e la successiva elaborazione dei dati per la stampa o la lettura dei risultati della composizione corporea .

I valori misurati con metodica DXA per la massa ossea, massa magra e massa lipidica sono stati comparati con misure effettuate con altre tecniche.

In particolare, il confronto con misure derivate dall'analisi dell'attivazione neutronica (NAA) ha dato una buona correlazione per il calcio totale corporeo (2-3% di variabilità). L'errore di tale metodica è stato valutato intorno al 3-4% per la massa lipidica corporea e dipende prevalentemente da stati di alterata idratazione



e dallo spessore anteroposteriore corporeo (questo ultimo se maggiore di 20 cm comporta un errore superiore a quello definito).

La riproducibilità della misura dipende invece dalla risoluzione adottata (numero di punti di scansione per cm<sup>2</sup> di 46 area corporea); tale riproducibilità risulterebbe ottimale per misurazioni che consentono l'analisi di 5-10 punti per cm<sup>2</sup>.

La tecnica DXA risulta un metodo preciso ed accurato per la misura della massa lipidica corporea totale e distrettuale. La misura della massa lipidica distrettuale risulta più accurata e precisa in soggetti adulti con peso corporeo inferiore a 100 kg.

La misura della massa lipidica corporea a livello intraddominale è stata studiata con la **metodica tomografica** (TC, metodica di riferimento) e confrontata con le determinazioni ottenute mediante antropometria (plicometria) e DXA.

Le misure della massa lipidica addominale ottenute con metodica DXA risultano valide ed il valore predittivo viene migliorato dalla combinazione con le misure antropometriche.

Quindi la bassa invasività (circa 0,06 mrem) rispetto alle metodiche di immagine (es: Tomografia Computerizzata) e la possibilità di ottenere misure segmentali corporee (tessuto adiposo intraddominale), consigliano l'utilizzo di tale tecnica a scopo prognostico e diagnostico per il paziente obeso.

## *La misura della massa cellulare metabolicamente attiva (BMC)*

Il comparto *massa cellulare corporea* (BCM, Body Cell Mass) risulta concettualmente legato alla distribuzione del potassio nel corpo umano.

In realtà, la BCM è un distretto funzionale corporeo comprendente tutti i 47 tessuti ricchi di potassio, che consumano ossigeno e ossidano substrati energetici, ed è quindi la componente metabolicamente attiva della FFM93.

E' un compartimento funzionale fondamentale nel determinare il dispendio energetico, le necessità proteiche e la risposta metabolica dell'organismo agli stimoli fisiologici e patologici.

Il consumo di ossigeno ed il dispendio energetico risultano strettamente correlati con la BCM.

In particolare, il consumo di ossigeno varia da 8 a 10 ml per kg di BCM, mentre il dispendio energetico è di 2,7-3,6 kcal per ora per kg di BCM.

La BCM può essere, inoltre, considerata come l'insieme delle cellule "fat-free" dei muscoli, degli organi interni e del sistema immunitario.

La BCM può essere quantificata attraverso la misura del potassio totale corporeo (Total Body K, TBK). Per determinare la quantità di potassio nell'organismo sono disponibili la tecnica della

diluizione isotopica con il  $^{42}\text{K}$ , usata in combinazione con il sodio scambiabile e l'acqua totale corporea (TBW).

Si calcola la differenza fra TBW e l'acqua extra cellulare (ECW) usando isotopi multipli (tecnica che attualmente è raramente impiegata) oppure il "counting" del  $^{40}\text{K}$ , isotopo naturale presente in proporzioni costanti nel corpo umano (0.012% del potassio totale) ed emettente caratteristiche radiazioni gamma a 1.46 MeV.

Tali radiazioni gamma vengono rilevate in "Whole Body Counters" (WBC), apparecchiature che si differenziano per la posizione dei detettori intorno al corpo, per la posizione spaziale del 48 corpo stesso, per il tempo necessario ad effettuare la misura, ed anche per l'efficienza di registrazione delle radiazioni. La metodica consiste nel determinare la quantità di potassio corporeo comparandola alle radiazioni gamma provenienti da un fantoccio che ne contiene una quantità standard.

Attualmente si dispone di WBC con caratteristiche di risoluzione, sensibilità, efficienza e schermatura del background dei raggi cosmici, tali da rendere possibile la misurazione del TBK con un errore del 5%.

Tuttavia, queste metodiche per l'alto costo (counting del  $^{40}\text{K}$ ) o per l'invasività (metodica della diluizione isotopica) non sono spesso facilmente applicabili nella pratica clinica per la determinazione della BCM.

In alternativa, si è ricorso ad altre metodiche di misura. In particolare, nella definizione della BCM è implicita l'assimilazione della massa metabolicamente attiva con una componente che è identificabile nei fluidi intracellulari (ICW), ricchi in potassio (la concentrazione di ioni potassio è di circa 150 mEq/L) e sede delle reazioni ossido-riduttive.

Partendo dal presupposto che la cellula abbia un contenuto di acqua pari al 66% del suo peso, la BCM può essere considerata come il prodotto della concentrazione del potassio intracellulare per un fattore numerico (0.00833).

In tale contesto, la BCM può essere determinata a partire dalla ICW, a sua volta derivata della relazione TBW - ECW; od anche dalla misura della Resistenza R intracellulare ottenuta mediante 49 impedenziometria spettroscopica (BIS, Bio Impedenza Spettroscopica).

Alternativamente, la BCM può essere stimata dalla misurazione della capacitance corporea totale (TBC, Total Body Capacitance). Molti studi, utilizzando l'impedenza monofrequenziale, hanno riportato una predizione della BCM, ma l'associazione fra l'impedenza (Z) e la BCM dovrebbe essere preceduta dalla determinazione dei fluidi intracellulari (ICW).

Poiché le membrane cellulari sottoposte a correnti elettriche alternate si comportano come capacitori elettrici, la capacitance, ottenuta con misure impedenziometriche spettroscopiche (BIS),

risulta proporzionale al numero di cellule e, quindi, alle dimensioni della BCM.

Studi di comparazione della misura della BCM con le tecniche della quantificazione del TBK e della TBC hanno dimostrato una valida correlazione.

### ***Tomografia computerizzata (TC) e Risonanza magnetica Nucleare (RMN)***

La ***tecnica tomografica computerizzata (TC)*** utilizza radiazioni X per produrre immagini dei distretti corporei e consente la misura distrettuale e totale della massa lipidica<sup>78</sup>.

Le radiazioni X vengono attenuate dal passaggio attraverso i tessuti a seconda della densità del tessuto stesso; i rilevatori registrano l'attenuazione del fascio energetico.

Viene utilizzata la scala di Hounsfield che assegna all'acqua un valore di attenuazione pari a zero, ed all'osso ed all'aria rispettivamente valori minimi e massimi della 50 scala.

La metodica risulta unica nella differenziazione delle masse lipidiche sottocutanee e viscerali.

Una singola scansione assiale a livello ombelicale (L2-L3) è predittiva del grado di massa lipidica totale viscerale.

Le immagini anatomiche fornite sono simili a quelle ottenute con la metodica di Risonanza Magnetica Nucleare (RMN). La ricostruzione della massa totale corporea e la separazione degli organi è associata

ad una elevata accuratezza (<1% di errore) e precisione (<1% di errore).

Le immagini prodotte fanno sì che la metodica, insieme a quella della RMN, sia inclusa nel quarto livello del modello multicompartimentale della composizione corporea<sup>6</sup>.

Le immagini ottenute con scansioni TC sono più accurate nella determinazione della massa lipidica viscerale rispetto a quelle RMN e richiedono un minor tempo di esecuzione<sup>94</sup>.

La limitazione è rappresentata dall'invasività dovuta alla utilizzazione di radiazioni X per un tempo comunque elevato.

Sono in studio apparecchiature TC che consentirebbero l'uso di radiazioni paragonabili a quelle della metodica DXA.

La massa lipidica (FM) misurata con metodica TC rappresenta l'insieme dei trigliceridi di deposito e degli adipociti, cioè di lipidi e di costituenti cellulari; al contrario, altre metodiche di misura della composizione corporea inseriscono gli elementi cellulari nella misura della massa alipidica (FFM). Infine i risultati dell'esame TC si riferiscono a 51 volumi compartimentali, che possono essere convertiti in masse assumendo una densità media tissutale in vivo.

La tecnica della **Risonanza Magnetica Nucleare (RMN)** si basa sulla capacità dei protoni delle molecole di idrogeno di un organismo umano di orientarsi in una stessa direzione se sottoposti ad un campo magnetico.

L'inserimento e la cessazione di un secondo campo magnetico provocano un nuovo orientamento spaziale od il ritorno allo stato precedente.

Durante quest'ultimo, i protoni degli atomi di idrogeno corporei generano un proprio piccolo campo magnetico che può essere rilevato.

La diversa densità delle molecole di idrogeno nei diversi tessuti (in particolare fra massa lipidica e massa magra) consente la distinzione degli organi e delle strutture corporee<sup>78</sup>.

La misura della massa lipidica totale e distrettuale (viscerale e sottocutaneo) ottenuta con tale metodica è stata confrontata con quella ottenuta da studi anatomici su cadaveri.

E' stato stabilito che l'errore per la misura della massa lipidica si aggira intorno al 6%.

La tecnica risulta utile nella definizione di alcune patologie che riguardano la massa adiposa, come è stato dimostrato recentemente in casi di sindrome simil-lipodistrofica in soggetti affetti da AIDS (la tecnica ha confermato la significativa riduzione di massa lipidica degli arti e sottocutanea, con il contemporaneo incremento dei depositi lipidici viscerali). <sup>52</sup>

Sono state sviluppate numerose equazioni per il calcolo della massa lipidica totale e distrettuale a partire da dati RMN.

La capacità di fornire immagini simili a quelle della metodica TC (separazione dei tessuti adiposi da quelli non adiposi) in assenza di assorbimento di radiazioni ionizzanti, consente di utilizzare la tecnica

di RMN in soggetti in età pediatrica, donne in gravidanza e giovani adulti.

Gli svantaggi di tale metodica sono l'elevato costo, i lunghi tempi di scansione, la minore precisione nella misurazione della massa lipidica viscerale, soprattutto addominale per la presenza inevitabile di movimenti che alterano le immagini e la scarsa accessibilità alla strumentazione per i grandi obesi.

Nella pratica clinica, tuttavia, le tecniche di immagine (TC e RMN) vengono usualmente impiegate per lo studio di determinate regioni del corpo; raramente vengono impiegate ad esempio per la misura della massa lipidica totale, o a causa di elevati costi, tempi di scansione e invasività. 53



## **SCOPO DELLO STUDIO**

Scopo del nostro studio è quello di valutare l'effetto positivo di exenatide sul compenso metabolico (HbA1c) e sul calo ponderale in una popolazione di diabetici di tipo 2 in cattivo compenso metabolico e sovrappeso confermando i dati presenti in letteratura e di valutare l'esistenza di una potenziale azione di exenatide anche sulla composizione corporea in modo da ipotizzare un'associazione diretta tra calo ponderale ed eventuale calo della massa grassa.

## SOGGETTI

Sono stati studiati 16 soggetti, 5 maschi e 11 femmine, affetti da diabete mellito di tipo 2, obesità, ipertensione, dislipidemia e scompenso metabolico ( $HbA1c > 7.5 \% < 12\%$ ) per 25 settimane.

Di essi, 15 erano sia ipertesi che dislipidemicici, solo un paziente presentava le complicanze microangiopatiche (Retinopatia diabetica non proliferativa e microalbuminuria), e solo uno le macroangiopatiche (angina stabile), mentre la restante popolazione si presentava scevra da ogni tipo di alterazione del micro e del macro circolo.

Tutti i soggetti studiati presentavano un età media di 56 anni ( $56 \pm 6,7$ ) con una storia di diabete DI TIPO 2 in media di 11.9 anni ( $\pm 5,7$ ), ed erano in terapia, per quanto riguarda il diabete, con dieta e secretagogo (glibenclamide o repaglinide o glicazide) ai massimi dosaggi stabili da almeno 3 mesi e metformina 1000 mg per 2.

Per l'ipertensione e la dislipidemia assumevano una statina e uno o due farmaci ipotensivi (ACE-I, Sartani e diuretici).

Tutti i soggetti erano in possesso di una dieta normocomposta per il trattamento del diabete, della dislipidemia e dell'ipertensione in accordo alle linee guida ADA 2008 da noi già fornita la prima volta che erano stati sottoposti alla visita.

## CRITERI DI INCLUSIONE

Venivano inclusi nello studio i pazienti che presentavano al controllo ambulatoriale, una glicemia a digiuno maggiore di 200 mg/dl, una emoglobina glicata compresa tra 7.7 e 12 % ed un BMI compreso tra 28-35 Kg/m<sup>2</sup> dopo essere stati informati ed aver firmato un consenso informato.

Tutti i pazienti presentavano valori stabili sia di BMI che di HbA1c da almeno 3 mesi e non presentavano patologie cardiache diagnosticate da almeno 2 mesi precedenti, insufficienza renale o epatica o respiratoria.

Non presentavano alterazioni delle transaminasi e dolore addominale al momento di ingresso allo studio.

Infine non erano presenti neoplasie.

## DISEGNO DELLO STUDIO

Il nostro studio è durato 25 settimane in accordo ai grandi trials presenti in letteratura, (tutti i trials di ricerca fino ad oggi pubblicati presentano un disegno di visite analogo al nostro).

All'ingresso dello studio la dieta dei pazienti veniva rivista e le kilocalorie venivano rivalutate in base all'attuale peso ed allo stile di vita del paziente.

Al momento dell'inclusione, veniva aggiunto al secretagogo ed alla metformina il farmaco in studio : **exenatide** al dosaggio di 5 microgrammi 2 volte al giorno (ai pasti principali) sottocute che il paziente si somministrava a distanza di almeno 6 ore l'una dall'altra.

Dopo 1 mese si passava, in accordo a quanto sottolineato dalla nota AIFA, al dosaggio terapeutico massimo di 10 microgrammi 2 volte al giorno.

Il paziente continuava ad assumere tale terapia secondo questa modalità per tutta la durata dello studio.

Dei 16 pazienti, 16 hanno completato lo studio.

Nessuno durante il decorso della ricerca ha dovuto sospendere il farmaco per la comparsa di effetti collaterali importanti quali la pancreatite o il dolore addominale di altra natura.

Non abbiamo mai osservato casi di ipoglicemie importanti (<70 mg/dl).

Quasi tutti i pazienti hanno manifestato la nausea che si presentava forte nella prima settimana e poi, andava a scomparire.

Abbiamo monitorato per la sicurezza del paziente, dopo un mese e dopo 3 mesi le transaminasi che non si sono mai mosse oltre il range di sicurezza.

In 8 pazienti, dopo circa 2 mesi, è stato necessario ridurre l'ipoglicemizzante orale e passare alla sola metformina in associazione ad exenatide.

il disegno dello studio prevedeva 3 visite principali :

- Una prima visita
- Una seconda dopo un mese dalla precedente
- Una terza dopo 6 mesi dalla prima

## MATERIALI E METODI

Durante lo studio, tutti i pazienti venivano sottoposti alle seguenti procedure al momento dell'ingresso (Visita 1), dopo 1 mese (visita2) e dopo 6 mesi (visita 3) durante le quali venivano effettuate:

- ◆ **accurata anamnesi familiare** con particolare attenzione al diabete di tipo 2, ipertensione e malattie cardiovascolari.

- ◆ **misurazione dei parametri antropometrici e della composizione corporea:** indice di massa corporea, rapporto vita/fianchi, composizione corporea valutata mediante impedenziometria e dexa.

- ◆ **esami ematochimici** di routine e per la valutazione del compenso glicometabolico .

I pazienti, inoltre, tornavano in ambulatorio ogni mese e venivano valutati: l'aderenza alla dieta ed alla terapia, il diario glicemico con apporto, se necessario, di variazioni terapeutiche per quanto concerne le solfaniluree, il peso corporeo.

Si monitorava con attenzione l'eventuale comparsa di effetti indesiderati.

## CALCOLI

L'analisi statistica è stata valutata attraverso lo Student's T-test per dati appaiati all'interno dello stesso gruppo.

Sono inoltre state calcolate la media, la deviazione standard ed la SEM.

Mediante la metodica gold standard per la valutazione della composizione corporea, la DEXA, abbiamo analizzato la massa grassa in grammi ed in percentuale e la massa magra in grammi da sola ed unitamente al BMC.

Abbiamo inoltre calcolato il metabolismo energetico mediante l'impedenziometria.

Tutte queste valutazioni sono state eseguite 3 volte durante tutta la durata dello studio (all'inizio, dopo 1 mese di terapia e dopo 6 mesi).

Alle tre visite principali, abbiamo pesato i pazienti sempre sulla stessa bilancia calibrandola ogni volta, preso la circonferenza vita e fianchi nei punti di repere, calcolato il BMI, valutato il compenso metabolico attraverso l'HbA1c ed il diario glicemico.

Durante la 1 visita abbiamo somministrato al paziente exenatide al dosaggio di 5 microgrammi due volte al giorno e dopo 1 mese, in accordo con l'AIFA, abbiamo aumentato il dosaggio a 10 bis and die.

Ogni volta abbiamo intervistato i pazienti sull'eventuale comparsa di effetti collaterali o ipoglicemie e l'unico comune a tutti era una leggera nausea che tendeva a migliorare dopo le prime settimane ma che non ha mai comportato l'uscita dallo studio.

Nessuno dei nostri pazienti ha dovuto interrompere il trattamento per coliche addominali e o pancreatiti o rialzo delle transaminasi (controllate dopo 1 mese e dopo 3 mesi).

Tutti i pazienti hanno terminato lo studio tranne uno che è uscito per non aderenza al trattamento.

Non solo, 14 pazienti ancora oggi continuano ad assumere exenatide con mantenimento del compenso glicometabolico e del peso raggiunto.

Inoltre, tanto è stato l'effetto sulla glicata, che a 8 pazienti sono state tolte le solfaniluree.



## RISULTATI

All'inizio dello studio la popolazione si presentava in cattivo compenso metabolico (HbA1c pari a  $9\pm 1\%$ ) ed in sovrappeso ( $BMI > 28 \text{ Kg/m}^2$ ).

Era omogenea rispetto all'età, alla durata del diabete ed alla presenza di ipertensione e dislipidemia (14 pazienti su 16) e rispetto alle caratteristiche antropometriche, quali peso (valore medio  $89 \text{ Kg} \pm 16$ ), indice di massa corporea ( $BMI \text{ Kg/m}^2 \ 33\pm 5$ ), circonferenza vita ( $104 \pm 11$ ) e per il metabolismo energetico ( $1587\pm 197$ ).

Per la composizione corporea, era notevole la DS e, nel dettaglio, la massa magra al basale era di  $49 \text{ Kg} \pm 9,2$  e la grassa  $38,2 \text{ Kg} \pm 11,0$ .

**Dopo 1 mese di terapia**, alla somministrazione di exenatide  $5 \mu\text{g}$  bis/die, abbiamo osservato:

1) riduzione statisticamente significativa dell'HbA1c del 2% ( $9,1\%$  vs  $7,7\%$  con  $p = 0,001$ );

2) riduzione di 1 Kg di peso corporeo ( $90 \text{ Kg}$  vs  $89 \text{ Kg}$  con  $p = 0,01$ ) e riduzione del BMI da  $33,8\%$  a  $33,5\%$  con  $p = 0,01$ ;

3) aumento della massa magra di 1 Kg (passaggio da 48,9 Kg a 49,6 Kg) e riduzione statisticamente significativa della massa grassa di 1 Kg (da 38 Kg a 37 con  $p = 0,001$ );

4) aumento di 100 Kcal del metabolismo energetico da 1578 a 1678.

Terminato il primo mese dall'inizio dello studio, **dopo 6 mesi** di trattamento con exenatide sc 10 mg bis and die, abbiamo notato rispetto al basale una ulteriore riduzione con significatività statistica di :

1) HbA1c scesa a 6,7 % (-3 % rispetto al basale,  $p = 0,003$ )

2) una riduzione del peso di 3 Kg,  $p = 0,01$  , della circonferenza vita di 3 cm (105 cm vs 102 cm,  $p = 0,07$ ) e del BMI del 2 % (38,9 vs 32,6;  $p = 0,02$ );

3) mantenimento della massa magra a 49 Kg e riduzione ulteriore e statisticamente significativa della massa grassa (37 Kg vs 35 Kg,  $p = 0,01$ ). Il metabolismo basale, infine, è rimasto invariato e pari a 1600 in media.

## DISCUSSIONE

Il diabete mellito di tipo 2 costituisce un'importante patologia ad elevato rischio cardiovascolare la cui incidenza non solo ad oggi è notevolmente elevata ma è destinata a crescere.

Da qui deriva l'esigenza non solo di insistere sullo stile di vita, cardine fondamentale nel trattamento del diabete di tipo 2, ma di trovare farmaci sempre più in grado di correggere le alterazioni basilari della malattia.

Da qui l'esigenza di ricercare terapie in grado di migliorare la secrezione insulinica preservando il più possibile la beta cellulare dal suo esaurimento e di ridurre l'insulino-resistenza migliorando il peso corporeo.

Per questo, l'introduzione in commercio degli analoghi del GLP-1, offre una valida alternativa non solo agli ipoglicemizzanti orali (mantenendo inalterata la capacità secretiva della b cellula e migliorandola - come è stato dimostrato in studi sui topi-) ma all'insulina quando vi è il sospetto di una secondary failure.

In tal caso, infatti, exenatide, permette di aumentare la produzione endogena di insulina e di bloccare la gluconeogenesi epatica interagendo con il glucagone da un lato e dall'altro di indurre un calo ponderale agendo sia a livello centrale sul centro della fame

sia a livello gastrico rallentando il passaggio di cibo e quindi lo svuotamento.

Nel nostro studio, abbiamo confermato tale azione di exenatide confermando i dati della letteratura,

Infatti, abbiamo riscontrato un effetto benefico non solo sul compenso metabolico, inteso come riduzione dell'HbA1c già dopo 1 mese di trattamento con il dosaggio iniziale di 5 microgrammi bis and die sotto cute e mantenimento dopo il passaggio al dosaggio terapeutico di 10 microgrammi bis and die, ma anche sul peso corporeo.

Novità del nostro lavoro, è stata quella di dimostrare una azione diretta di exenatide sul grasso corporeo totale che si riduce in modo statisticamente significativo già a dosaggi bassi di farmaco e continua ad abbassarsi sempre secondo una significatività statistica al dosaggio massimo di 10 microgrammi bis and die.

Questo dato è altamente innovativo in quanto finora mai dimostrato in nessuno studio pubblicato eccetto lavori iniziati nel 2002 e pubblicati nel 2004 su *Diabetes Care* (27, N 8) e poi continuati fino ad un ultimo pubblicato il 30 settembre 2009 su *Diabetes Obes, Metabolism* in cui però, è stato analizzato il potenziale effetto della Liraglutide sulla composizione corporea.

In questi studi gli autori hanno notato una azione sulla massa grassa che, seppur non raggiunge la significatività statistica, viene ritenuta come dato altamente importante vista la possibilità di

interagire e ridurre il grasso corporeo spesso ben rappresentato nei pazienti diabetici.

Jendle, autore svedese che negli ultimi anni si è dedicato allo studio della liraglutide sulla body composition, ha notato nel suo studio pubblicato nel 2009 su *Diabetes Obes, Metabolism*, la riduzione statisticamente significativa della massa grassa in tutta la popolazione studiata (160 diabetici) con i 3 diversi dosaggi terapeutici.

L'autore ritiene che, probabilmente, tale effetto sia legato alla riduzione dell'insulino resistenza che, come è noto dalla letteratura, è legata fortemente all'obesità viscerale.

Potremmo affermare che anche nel nostro studio, la riduzione della massa grassa sia conseguente alla riduzione dell'insulino-resistenza secondaria all'uso di exenatide.

Infine, potremmo motivare il seppur lieve aumento del metabolismo basale, come probabile conseguenza all'azione di exenatide a livello ipotalimico.

## CONCLUSIONI

In conclusione il nostro studio ha dimostrato che il trattamento per 25 settimane con exenatide in associazione a segretagoghi, metformina e ad un corretto stile di vita, offre un miglioramento statisticamente significativo del compenso metabolico, dei parametri antropometrici e della composizione corporea con riduzione statisticamente significativa della massa grassa, in una popolazione di diabetici di tipo 2.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kurt J. Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper : **Principi di Medicina Interna.**
2. 3. Giacomo Faglia : **Malattie del sistema endocrino e del metabolismo.**
4. James H. Warram, Stephen S. Rich, Andrey S. Krolewski : Epidemiologia ed aspetti genetici del diabete.
5. Gamble DR. : The epidemiology of insulin-dependent diabetes, with particular reference to the relationship of virus infection to its etiology. **Epidemiol Rev** 1980, 2: 49-70.
6. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes** 1979, 28: 1039- 1057.
7. Degnbol B, Grenn A. diabetes mellitus among first- and second- degree relatives of early onset diabetics. **Ann Hum Genet** 1978, 42:25-47.
8. Allen C, Palta M, D'alessio Dj. Risk of diabetes in sblings and other relatives of diabetes mellitus insulin-dependent. **Diabetes** 1991, 40: 831-836.
9. De Fronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique : a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am J Physiol** 1979 6 : E214-23.
10. Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM , Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology** 1968; 83: 572-84.
11. Cerasi E, Luft R, Efendic S, Decreased sensitivity of the pancreatic beta cells to glucose in pre-diabetic and diabetic subjects. **Diabetes** 1972; 21: 224-34.
12. Calles - Escandon J, Robbins DC, loss of early phase of insulin release in humans impairs glucose tolerance and blunts thermic effect of glucose. **Diabetes** 1987; 36:1167-72.

13. Luzi L. Effect of the loss of first phase insulin secretion on glucose production and disposal in man. **Am J Physiol** 1989; 31: 964-72.
14. Lilliojia S, Mott DM, Howard BV et al. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. **New Engl J Med** 1988; 318: 1217-25.
15. Warram JH, Martin BC, Gleason RE, Soeldner JS. Slow glucose removal rate but not insulin secretion predicts development of NIDDM in offspring of two NIDDM parents. **Diabetes** 1987; 36 (suppl. 1): 14A.
16. Brunzell JD, Robertson RP, Iler RL, Hazzard WR, Ensinck JW, Bierman EL, Porte D, Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. **J Clin Endocrinol** 1976; 46: 222-9.
17. Vague P, Moulin J-P. The defective glucose sensitivity of the B cell in insulin dependent diabetes. Improvement after twenty hours of normoglycaemia. **Metabolism** 1982; 31: 139-42.
18. Kosaka K, Kuzuya T, Akanuma Y, Hagura R. Increase in insulin response after treatment of overt maturity onset diabetes mellitus is independent of the mode of treatment. **Diabetologia** 1980; 18: 23-8.
19. O' Rahilly S, Turner RC, Matthews DR. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin dependent diabetes. **New Engl J Med** 1998; 318: 1225-30.
20. Kahn BB: Type 2 diabetes : when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. **Cell** 92:593-596, 1998.
21. Leahy JL : $\beta$  cells dysfunction with chronic hyperglycemia: the overworked  $\beta$  cell hypothesis. **Diabetes** 1996; 45: 298-319.



22. Westermarck P, Wilander E. The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity-onset diabetes mellitus. **Diabetologia** 1978; 31:355-60
23. Clark A, Wells CA, Buley ID et al. Islet amyloid, increased alpha-cells, reduced beta-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. **Diabetes Res** 1988; 9:151-9
24. Stefan Y, Orei L, Malaisse-Lagas F, Perrelet A, Patel Y, Unger R. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of non-diabetic and diabetic humans. **Diabetes** 1982; 31: 694-700.
25. Eisenbarth GS, Connelly J, Soeldner JS, the natural history of type 1 diabetes. **Diabetes Metab Rev** 1987; 3:873-91.
26. Matschinsky FM: Perspective in diabetes: glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic  $\beta$  cells and hepatocytes. **Diabetes** 39:647-652, 1990.
27. Saltiel AR. Second messengers of insulin action. **Diabetes care**.1990; 13: 262-75.
28. Denton RM, Early events in insulin actions. *Adv Cyclic Nucleot Phosphor Res* 1986; 26: 293-341.
29. Kurt J. Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L Kasper : **Principi di Medicina Interna**.
30. Matschinsky FM: Perspective in diabetes: pancreatic  $\beta$  cell glucokinase. Closing the gap between theoretical concepts and realities. **Diabetes** 1998; 47: 307-315.
31. Ferrannini E, Smith JD, Cobelli C, Toffalo G, Pilo A, DeFronzo RA. The effect of insulin on the distribution and disposition of glucose in man. Insights from physiologic modeling. **J Clin Invest** 1986;76: 357-64.
32. **Robbins**. Le basi patologiche delle malattie.
33. **Robbins**. Le basi patologiche delle malattie.
34. **Aggiornamenti in Diabetologia**: Le complicanze croniche del diabete. G de Mattia, S Frontoni, S Gambardella. 123-144, 1998.

35. Frank NR, Hoffman WH, Podgor MJ, et al. **Diabetes** 31:874-882, 1992.
36. The diabetes control and complication (DCCT) Research Group: Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in diabetes control and complication trial. **Kidney Int** 47: 1703-1720, 1995.
37. 38. Bangstad HJ, Osterby R, Dhal-Jorgensen K, Berg KJ, Hartmann A, Hansenn KF: Improvement of blood glucose control in IDDM patients retards the progression of morphology change in early diabetic nephropathy. **Diabetologia** 37: 483-490, 1994.
39. Kurt J. Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L Kasper : **Principi di Medicina Interna**.
40. Walker JD, Dodds RA, Murrels TJ, Bending JJ, Mattock MB, Keen H, Viberti GC : Restriction of dietary protein and progression of renal failure in diabetic nephropathy. **Lancet** 16:1411-1415, 1989.
41. G. Menzinger, V. Spallone, Diabete mellito e complicanze neurologiche.
42. Allan Sniderman, C. Michel, Normand Racine. La cardiopatia nel diabete. Cap. 14: 206-215.
43. Kannel WB, McGree DL: Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: The Framingham study. **Diabetes Care** 1979; 2: 120-126.
44. Caponi F, Bonora E, Consoli A, Del Prato S, Manucci E, Rotella CM, Trischitts V. Diabete di tipo 2 e rischio cardiovascolare.
45. Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, et al. : Evidence for cardiomyopathy in familiar diabetes mellitus. **J Clin Invest** 1977, 60: 885-899.
46. Ewing DJ, Campbell UJW, Clark BF. :Assessment of cardiovascular effects in diabetic autonomic neuropathy and prognostic implications. **Ann. Inter Med** 1980; 92: 308-311.

47. Ewing DJ: Cardiovascular reflex and autonomic neuropathy. **Clin Sci Mol Med** 1978, 55: 321-327.
- 48.49 Ewing DJ, Campbell UJW, Clark BF. :Assessment of cardiovascular effects in diabetic autonomic neuropathy and prognostic implications. **Ann. Inter Med** 1980; 92: 308-311.
50. Zipes DP: Influence of myocardial ischemia and infarction on autonomic innervation of the heart, **Circulation** 1990; 82: 1095-1105.
- 51.52. Kahnal JK, Sisson JC, Vinik AI: QT interval prolongation and sudden cardiac death in diabetic autonomic neuropathy. **J Clin Endocrinol Metab** 1987; 64: 751-754.
53. Muller JE, Ludmer PL, Willch SN, Tofler GH, Aylmer G, Klango I: Circadian variation in the frequency of sudden cardiac death. **Circulation** 75; 131-138, 1987.
54. Verdecchia P, Schillaci G, Guerrieri M: Circadian blood pressure and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. **Circulation** 81: 528-536. 1990.
55. Shimada K, Kawamoto A, Matsubayaschi K, Nishinaga M, Rimura S, Ozawa T: Diurnal blood pressure variations and silent cerebrovascular damage in elderly patients with hypertension. **J Hypertens** 10: 875-878. 1992.
56. Feskens EJ, Kromhout D. Glucose tolerance and risk of cardiovascular disease, the Zutphen Study, **J Clin Epidemiol** 1992,45: 1327-1334.
57. Birkeland KI, Kilhovd B, Thorsby P, Torgersen PA, Ganss R, Vaaler S, Hanseen KF, Heterogeneity of non-insulin-dependent diabetes expressed as variability in insulin sensitivity, beta-cell function and cardiovascular risk profile. **Diabet Med** 2003, 20: 37-45.
58. Zavaroni I, Bonora E, Pagliera M, Lucchetti L, Buonanno G, Bonati PA, Bergonzani M, Passeri M, Reaven GM. Risk factors for coronary artery disease in healthy person with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. **N Engl J Med** 1989, 320: 702-706.
59. Balati B, Varro A, Papp JG (1998) Comparison of the cellular electrophysiological characteristics of canine left

ventricular epicardium, M cells, endocardium and Purkinj fibres. **Acta Physiol Scand** 164: 181-190.

60. Canali ionici voltaggio-dipendenti: Andrea Volterra e Emanuele Sher.

61: Albert C.M. et al. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JA-MA* 1998; 279: 23-28.

62. Farmaci e intervallo QT: Ricerca e Sanita' Vol.1 N.1 2000

63. Elming H, Sonne J, Lublin HKF. The importance of the QT interval: a review of the literature. **Acta Psychiatr Scand** 2003;107: 96-101.

64. Smetana P, Velislav B, Katerina H, A John Camm, and Marek M.

Circadian Rhythm of the corrected QT interval. *PACE* 2003; 26: 383-386

65. Bonnemeier, H, et al . Circadian Profile of QT interval variability in 172 healthy volunteers.

66. Dota, C,D, et al. inter- and intraday variability in major electrocardiogram intervals and amplitudes in healthy men and women.

67. Steven J, Compton e Jay W. Mason Syndrome del Qt lungo

68. Farmaci e intervallo QT: Ricerca e Sanita' Vol.1 N.1 2000

69. Stamler J, Vaccaio O, Necton D, Wentworth D for the multiple risk factor intervention trial research group diabetes, other risk factors and 12 cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk intervention trial. **Diabetes care** 16; 434-444: 1993.

70. Dekker JM, Schouten EG, Kromhout D, Pool J,(1994) Qtc prolongation predicts coronary heart disease in middleaged and elderly men: **Circulation** 90: 779-785.

71. Schouten EG, Dekker JM, Pool Qt-interval prolongation predicts cardiovascular mortality in an apparently healthy population. **Circulation** 83. 1516-1523.

72. R. Marfella, F. Nappo, L.De Angelis, M. Siniscalchi, F. Rossi, D. Giuliano. The effect of acute hyperglycaemia on QTc duration in healthy man .