



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Cardiovascolari

CICLO XXII

**Valutazione degli effetti cardiopolmonari di diversi approcci
terapeutici in soggetti insulino-resistenti**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

SCIENZE CARDIO-VASCOLARI

Presentata da

Dr Alessandro Bina

Coordinatore Dottorato

Prof. Francesco Marrosu

Relatore

Prof. Giuseppe Mercurio

Anno Accademico 2009/2010

SOMMARIO

PRIMA PARTE

Introduzione pag. 2

Insulino resistenza

Disfunzione endoteliale pag. 11

Premesse e ragioni del nostro studio pag. 19

Materiale e metodo pag. 23

Risultati pag. 30

Discussione pag. 33

Conclusioni pag. 37

SECONDA PARTE pag. 47

Introduzione

Insulino-resistenza e attività fisica pag. 49

Insulino-resistenza e metformina pag. 54

La prova da sforzo cardiopolmonare pag. 57

Premesse e ragioni del nostro studio pag. 64

Materiale e metodo pag. 67

Risultati pag. 72

Discussione pag. 73

Conclusioni pag. 75

Bibliografia pag. 82

PRIMA PARTE

Introduzione.

L'insulino resistenza

L'insulino-resistenza (o bassa sensibilità insulinica) può essere definita come una condizione in cui le normali quantità di insulina producono una risposta biologica sub-ottimale; essa può coinvolgere diversi organi e tessuti (fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo) oppure un unico tipo cellulare (ad esempio la cellula muscolare scheletrica).¹ Inoltre, nel singolo individuo il fenomeno può estendersi a numerosi processi biologici, quali la regolazione dei metabolismi glucidico, lipidico e proteico o essere limitato a poche azioni ormonali, come la regolazione della sintesi di glicogeno e/o dell'ossidazione glucidica. Quando si discute di insulino-resistenza in termini generici si allude al deficitario effetto biologico dell'insulina nel regolare il metabolismo glucidico, in sostanza ci si riferisce ad un effetto ipoglicemizzante minore di quello atteso.²

L'insulino-resistenza ha una base genetica, ma è influenzata anche da fattori acquisiti e/o ambientali. La sua prevalenza è stata stimata intorno al 25% negli USA, con una maggiore frequenza negli uomini rispetto alle donne (23% vs 12%) e un aumento con l'età (>55 anni, 34% maschi; 21% femmine). È stata inoltre evidenziata una prevalenza dell'85% in una popolazione selezionata affetta da disordini metabolici (IGT, NIDDM, dislipidemia, iperuricemia ed ipertensione).³

Eccesso ponderale, localizzazione prevalentemente centrale e, soprattutto, viscerale dell'adipe, dieta iperlipidica, scarsa attività fisica, fumo di sigaretta, alcuni farmaci (glucocorticoidi, diuretici tiazidici, beta-bloccanti) sono tutte condizioni in grado di ridurre la sensibilità insulinica. Su molti fattori è possibile esercitare un efficace intervento

terapeutico.

La resistenza all'insulina, con la conseguente iperinsulinemia, è specialmente correlata all'obesità e va aumentando con l'aumentare del grasso addominale. Concorrono a determinare resistenza insulinica la presenza di elevati livelli di acidi grassi liberi (FFA) (lipotossicità),^{4,5} l'iperglicemia, attraverso la produzione di radicali liberi (glicotossicità),⁶ nonché le citochine infiammatorie secrete dagli adipociti.⁷ L'iperinsulinemia, a sua volta, determina una serie di modificazioni dell'assetto lipidico con un aumento degli FFA e dei trigliceridi; infine, l'ipertrigliceridemia tenderebbe a sovraccaricare le HDL che verrebbero trasformate in piccole HDL attraverso un processo di idrolizzazione; queste sarebbero filtrate dai reni, con riduzione della componente HDL e delle apo-lipoproteine A. L'iperinsulinemia sarebbe poi responsabile di effetti diretti sulle cellule miocardiche, con induzione dell'ipertrofia, sia con modalità diretta che attraverso una stimolazione del sistema nervoso simpatico.

Disponiamo di numerosi test per determinare il grado d'insulino-resistenza. Tutte queste tecniche d'indagine presentano dei limiti o non sono adatte per l'uso clinico di routine. Il test considerato *gold standard* è il *clamp* euglicemico iperinsulinemico. Il principio è quello di incrementare artificialmente i livelli circolanti di insulina mantenendo l'euglicemia con un'infusione costante di glucosio. In breve, la concentrazione plasmatica di insulina viene incrementata e successivamente mantenuta stabile ad un livello di circa 100 $\mu\text{U/ml}$ per un periodo di circa 120 minuti. Parallelamente la glicemia viene mantenuta costante ad un livello basale di circa 90 mg/dl. Una volta raggiunta una condizione stabile, negli ultimi 40 minuti del test, la quantità di glucosio infusa nell'unità di tempo corrisponde

alla quantità di glucosio utilizzata dai tessuti periferici, con trasporto dipendente dall'azione dell'insulina e costituisce un indice della sensibilità dei tessuti all'azione stessa dell'ormone.⁸ La quantità di glucosio “speso” nel controbilanciare l'azione insulinemica è espressione della sensibilità periferica all'insulina. Il test è utile per studi fisiologici approfonditi su un esiguo numero di pazienti e risulta di difficile utilizzo nella pratica clinica corrente.

La relazione tra glicemia ed insulina è ben conosciuta ed ha portato all'elaborazione dell'indice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*). Matthews e coll.⁹ hanno presentato un modello matematico che permette di quantificare l'entità della presenza di resistenza insulinica calcolando l'indice di resistenza insulinica mediante HOMA (HOMA-IR) e di valutare, quindi, la funzionalità della β -cellula pancreatica. L'HOMA è un modello matematico attraverso il quale i valori della sensibilità insulinica possono essere calcolati se si conoscono le concentrazioni simultanee del glucosio plasmatico e quelle dell'insulina a digiuno; è un test semplice, risulta appropriato per grandi studi epidemiologici e fornisce una stima dell'insulino-resistenza basale, al contrario del *clamp* euglicemico che misura l'insulino-resistenza stimolata. Nei dati di letteratura l'HOMA-IR ha dimostrato una buona correlazione con i dati sperimentali ottenuti con tecniche di misurazione diretta quali il *clamp* euglicemico.

Insulino resistenza e sindrome metabolica (SM)

La SM, per quanto nosologicamente omogenea, rappresenta non un'unica entità morbosa, ma piuttosto una costellazione (*clustering*, nell'accezione anglosassone) di fattori di rischio altamente correlati i quali, agendo insieme, producono un sostanziale incremento della probabilità di sviluppare una disfunzione cardiocircolatoria.¹⁰ La definizione iniziale fu quella di "sindrome X", coniata da Gerald Reaven alla fine degli anni '80.

L'insulino-resistenza riveste un ruolo centrale nella genesi della SM; infatti, oltre al ruolo svolto nel metabolismo glucidico, l'insulina contribuisce alle regolazione del metabolismo lipidico e proteico e della pressione arteriosa, interferendo con la funzione piastrinica e con l'equilibrio tra fattori pro-trombotici e modulatori della fibrinolisi endogena. L'ormone regola, inoltre, gli stimoli proliferativi sulle cellule muscolari lisce della parete vascolare e influenza la funzione endoteliale. Tutto ciò spiega il possibile ruolo dell'insulino-resistenza nel determinismo della SM.

Per quanto la genesi della SM rimanga sconosciuta, viene sospettata come sua causa una combinazione di fattori. La condizione di insulino-resistenza è certamente influenzata da fattori genetici. Oltre 50 mutazioni sono state messe in luce da Hone J. e coll.¹¹ nel gene che codifica per il recettore dell'insulina a livello del cromosoma. Alcune variazioni a livello del gene che codifica per la proteina legante gli acidi grassi, localizzato nel cromosoma 4 sono associate ad insulino-resistenza.¹² Studiando 1028 coppie di gemelli maschi,¹³ è stata riscontrata una maggiore concordanza di dislipidemia ed ipertensione nei monozigoti rispetto agli eterozigoti. Tra i gemelli monozigoti discordanti, quello con ipertensione e dislipidemia

pesava significativamente di più, dimostrando un'interazione tra fattori genetici ed influenze ambientali sul manifestarsi della SM.¹⁴

Il caratteristico profilo della SM prevede l'accumulo di adiposità viscerale, cui si affiancano la resistenza all'insulina, l'ipertensione arteriosa ed un profilo lipoproteico aterogeno, quest'ultimo in una tipica versione a 3 componenti patogene: ipertrigliceridemia, ridotte lipoproteine ad alto peso molecolare (HDL) e presenza di lipoproteine a basso peso molecolare (LDL) piccole, dense ed altamente ossidate. Si tende, inoltre, ad includere in questa sindrome altri aspetti, quali uno stato pro-infiammatorio e trombofilico e la microalbuminuria, per quanto tali caratteri non siano stati precisati né quantificati con definiti limiti ponderali.

La SM ha ricevuto una precisa messa a punto ed una chiara collocazione nella strategia di contenimento del rischio cardiovascolare da quando essa è stata inserita nelle Linee Guida aggiornate dell'*Adult Treatment Panel III*, che ne raccomanda il trattamento, dietetico, igienico e farmacologico, in aggiunta a quello, già previsto, dei livelli elevati di LDL.¹⁵

Sono state proposte varie definizioni per l'accertamento clinico della SM:

- Per l'*Organizzazione Mondiale della Sanità*¹⁶ viene posta come componente fondamentale l'insulino-resistenza, in tutte le sue manifestazioni (IFG, IGT, diabete mellito tipo 2), con l'associazione di almeno 2 dei seguenti componenti: ipertensione arteriosa, ipertrigliceridemia, ridotte HDL (<35 mg negli uomini, <40 mg nelle donne), BMI >30 kg/m² e/o rapporto vita / fianchi >0,9 cm negli uomini, >0,85 nelle donne, albuminuria >20 µg/min.
- Per il *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III report (ATPIII)*¹⁵ l'accento è posto sull'accumulo di grasso viscerale, con una circonferenza addominale >102 cm

negli uomini e >88 cm nelle donne; trigliceridi >150 mg/dl; HDL <50 mg negli uomini e <40 mg nelle donne; ipertensione arteriosa \geq 130/85 mm Hg; glicemia a digiuno >110 mg/dl.

- Per l'*American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute*¹⁷ vale una definizione simile a quella dell'*ATPIII*, con alcune varianti: circonferenza vita (valori soglia modificati in base ai gruppi etnici di appartenenza); glicemia (valore normale ridotto a 100 mg/dl).
- Per la *Federazione Internazionale di Diabetologia (IDF)*¹⁸ la soglia della circonferenza addominale, riconosciuta come elemento fondamentale per la diagnosi di SM, viene aggiustata a seconda del gruppo etnico di appartenenza. Devono associarsi altre 2 determinanti.

Insulino resistenza e disfunzione miocardica

È ormai acquisito che l'insulina è dotata di molteplici effetti fisiologici, attivi non solo sul metabolismo glucidico, ma anche su varie strutture ed organi, quali l'endotelio vascolare, il cuore, il fegato, il tessuto adiposo e il muscolo scheletrico. L'occupazione del recettore insulinico determina l'attivazione a cascata di molteplici segnali intracellulari. Questi si possono sostanzialmente dividere in due versanti: l'uno promuove gli effetti metabolici (*uptake* del glucosio, gluconeogenesi, sintesi del glicogeno) e la produzione di NO endoteliale tramite la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K); l'altro induce effetti mitogeni, di sintesi proteica e di produzione di endotelina attraverso la mitogeno-attivata protein-chinasi (MAPK). Inoltre, l'insulina stimola l'attività del sistema nervoso simpatico a livello centrale.

A livello miocardico, l'insulina provoca un aumento della frequenza cardiaca, della contrattilità e dell'*uptake* del glucosio; provoca anche un reclutamento di capillari, con incremento del flusso.

L'effetto netto sull'omeostasi cardiovascolare e metabolica di tutte queste azioni negli individui sani è di vasodilatazione e di maggior *uptake* di glucosio a livello dei tessuti periferici. In presenza di insulino-resistenza, gli effetti mediati dal PI3K risultano alterati, all'opposto di quelli mediati dal MAPK, che permangono conservati. L'insulino-resistenza, pertanto, può compromettere tutti gli effetti emodinamici positivi, quali la vasodilatazione ed esacerbare quelli negativi (vasocostrizione), inducendo pure disfunzione endoteliale. Negli stati di insulino-resistenza vi è un'alta concentrazione di FFA che, oltre a peggiorare la resistenza all'ormone, producono effetti negativi diretti sulla cellula miocardica, tramite un accumulo di grassi al suo interno, tossici per la fibra cardiaca e una modificazione del metabolismo

cellulare, con un maggior utilizzo degli FFA ed una minore efficienza energetica.^{19,20} La già menzionata *up-regulation* del sistema adrenergico contribuisce all'insorgenza della cardiomiopatia tramite apoptosi, necrosi e fibrosi.^{21,22} Elevati livelli di catecolamine spesso presenti in individui insulino-resistenti promuovono la lipolisi incrementando ulteriormente gli FFA circolanti che a loro volta peggiorano l'insulino-resistenza.

Risulta accertato che il diabete mellito può causare disfunzione sisto-diastolica nei soggetti che ne siano affetti. D'altra parte, solo di recente la SM (soprattutto in presenza della componente di insulino-resistenza) è diventata una possibile causa di insufficienza cardiaca, tanto da essere considerata nelle ultime linee guida dell'AHA/ACC 2005²³ come un vero e proprio fattore di rischio per lo sviluppo di disfunzione miocardica al pari di ben altre note condizioni quali la malattia aterosclerotica e l'ipertensione arteriosa.

In un precedente studio abbiamo esaminato, in confronto con soggetti normali, la risposta miocardica allo stimolo farmacologico (eco-stress con dobutamina) di soggetti con SM di recente riscontro e di pazienti con diabete mellito diagnosticato da non meno di 5 anni. I risultati hanno dimostrato una riduzione della riserva contrattile statisticamente significativa presente nei pazienti con insulino-resistenza, elemento non presente nei pazienti diabetici che hanno presentato una riserva contrattile sovrapponibile a quella del gruppo di controllo di pazienti normali.²⁴

Diversamente dal caso della disfunzione miocardica diabetica, da molte decadi oggetto di studio, solo recentemente si è iniziato a guardare alla SM da un punto di vista simile a quello utilizzato per il diabete. E la SM, soprattutto in presenza della sua componente essenziale, l'insulino-resistenza, viene ormai considerata come causa possibile di insufficienza cardiaca.

L'evidenza di una marcata riduzione della riserva contrattile nei soggetti con SM da noi esaminati potrebbe essere riconducibile alla citata "ipotesi metabolica".^{25,26,27} Al contempo, l'assenza di una alterazione simile nel gruppo dei pazienti diabetici, potrebbe essere legata al vasto utilizzo di molecole sensibilizzanti verso l'insulina o capaci di aumentarne la disponibilità.

La disfunzione endoteliale

Per disfunzione endoteliale si intende una alterazione della normale funzione della tunica vascolare intima che comporti la perdita di alcune caratteristiche strutturali e/o funzionali dell'endotelio. Per attivazione endoteliale si intende invece l'acquisizione da parte dell'endotelio di nuove proprietà, come l'espressione delle molecole adesive durante l'infiammazione.

L'endotelio può essere considerato un vero e proprio organo autocrino e paracrino, capace di secernere, in risposta a una grande varietà di segnali, numerosi mediatori chimici. L'attività paracrina dell'endotelio è rivolta sia verso la parete vasale che verso il lume.

A livello parietale l'endotelio modula il tono vasale e la stessa struttura vasale, rivestendo un ruolo di primissimo piano nel rimodellamento che si osserva nell'ipertensione, nella re-stenosi dopo intervento coronarico percutaneo e nell'aterosclerosi.

A livello luminale, l'endotelio modula la coagulazione e le interazioni con le cellule ematiche, leucociti e piastrine.

Funzione paracrina dell'endotelio. In generale, i mediatori vasodilatatori possiedono anche azione anti-proliferativa, anti-trombotica e anti-aterogena, mentre le sostanze vasocostrittrici hanno azioni opposte. Le principali sostanze prodotte dall'endotelio comprendono:

- Ossido nitrico (NO);
- Prostaciclina;
- EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor);
- Endotelina-1;
- Trombossano A2;

- Prostaglandina A₂;
- PAF (Platelet Activating Factor);
- Anione superossido;
- ACE (Angiotensin-converting enzyme);
- Eparan-solfato;
- Proteina S;
- Fattore Von Willebrand;
- Fattore tessutale (TF);
- Attivatore tessutale del plasminogeno;
- PAI (Plasminogen activator inhibitor);
- I-CAM, V-CAM, E e P-selectine
- Lipoprotein-lipasi;
- Citochine; interleukine (IL-8)
- PDGF (Platelet-derived growth factor);
- FGFb (Basic fibroblast growth factor);
- Fattore di crescita insulino-simile (Insulin-like growth factor o IGF);
- TGF (Transforming growth factor);
- CSF (Colony-stimulating factor).

La compromissione della attività endocrino-paracrina dell'endotelio è responsabile della disfunzione endoteliale. I fattori che possono causare un danno funzionale dell'endotelio sono numerosi e per la maggior parte si identificano con i fattori di rischio cardiovascolare. Sebbene l'alterazione riguardi tutte le funzioni endoteliali, quella di gran lunga più studiata è la

vasodilatazione endotelio-dipendente. Infatti l'endotelio, essendo da un lato bersaglio di segnali meccanici e neuro-ormonali, dall'altro fonte di mediatori vasoattivi, svolge un ruolo fondamentale nel controllo della funzionalità delle arterie e del microcircolo. Fra questi mediatori, NO ha un'importanza preminente nel controllo fisiologico del tono delle arterie e del microcircolo, sia in condizioni basali che dopo stimolazione di vario tipo.

Nel 1980, Furchgott e Zawadzki hanno osservato che l'acetilcolina (ACh), in presenza di endotelio integro, induce vasodilatazione di arterie isolate, mentre in assenza di endotelio causa vasocostrizione per stimolazione diretta delle cellule muscolari lisce, postulando la produzione endoteliale di una sostanza vasodilatatrice, che chiamarono EDRF, *endothelium-derived releasing factor* (identificata nel 1987 da Moncada in NO). Il ruolo dell'endotelio nel modulare la risposta alle variazioni del flusso è stato evidenziato da Holtz nel 1983, che ha osservato come la dilatazione flusso-indotta sia dipendente, in vitro e in vivo, dalla integrità dell'endotelio. NO è prodotto per azione della *nitric oxide synthase* (NOS), che catalizza l'ossidazione dell'azoto contenuto nella L-arginina, producendo NO e citrullina. La NOS è costituita da un omo-dimero, nel quale ciascuna molecola presenta un dominio C-terminale ad azione reduttasica (contenente NADPH e FAD), ed un dominio N-terminale ad azione ossidasica (contenente eme), mentre in posizione centrale è situato il dominio di legame per la Ca-calmodulina (Ca-CAM). Si conoscono almeno tre isoforme di NOS:

- *Tipo I* o *nNOS*, contenuta nei neuroni e nel muscolo scheletrico;
- *Tipo II* o *iNOS*, inducibile, presente in molti tipi cellulari (leucociti, endotelio, cellule muscolari lisce, miociti cardiaci, ecc.);

- *Tipo III o eNOS*, localizzata nell'endotelio, ma anche nelle piastrine, miociti cardiaci e neuroni dell'ippocampo.

Le isoforme NOS-I e NOS-III sono costitutive e calcio-sensibili, in quanto caratterizzate da una attività basale, che però viene modulata da Ca-CAM, che si comporta da *molecular switch*. Il tipo NOS-II è inducibile e calcio-insensibile, dal momento che viene espresso solo dopo attivazione cellulare ed è attivo anche a basse concentrazioni di Ca^{+2} , poiché la CAM rimane costantemente legata a NOS-II, comportandosi come una sub-unità dell'enzima. L'azione regolatrice di Ca-CAM sarebbe quella di causare una modificazione della conformazione di NOS, così da consentire l'interazione spaziale tra i domini N- e C-terminale. Una volta prodotto, NO attraversa facilmente la membrana plasmatica delle cellule muscolari lisce e attiva la guanilciclasi, a cui consegue il rilasciamento della muscolatura e la vasodilatazione. Il GMPc prodotto dalla guanilciclasi regola essenzialmente 3 classi di molecole effettrici: 1) PK-GMPc; 2) PDE (fosfodiesterasi); 3) canali ionici GMPc-*gated*. La vasodilatazione è il risultato della diminuzione della concentrazione del Ca^{+2} intracellulare, dovuta a:

1. Iperpolarizzazione della membrana plasmatica, per attivazione della pompa Na^{+} -ATPasi e dei canali del K^{+} calcio-attivati attraverso la modulazione della loro fosforilazione da parte di PKG. L'iperpolarizzazione inibisce l'ingresso di Ca^{+2} attraverso i canali VOC (voltage dipendenti).
2. Efflusso del Ca^{+2} dalla cellula ad opera della pompa Ca^{+2} -ATPasi e del $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ *exchanger*.
3. *Reuptake* del Ca^{+2} nel reticolo sarcoplasmatico, per fosforilazione PKG-dipendente delle proteine IP3R (recettori per IP3, che si comportano da canali del Ca^{+2}) e fosfolambano (proteina regolatrice della Ca^{+2} -ATPasi).

4. Ridotta sensibilità delle proteine contrattili al Ca^{+2} , mediata dall'intervento della PP-1M (protein-fosfatasi 1M), che regola la fosforilazione della catena leggera della miosina.

Ci sono evidenze che alla vasodilatazione NO-dipendente possano concorrere meccanismi GMPc-indipendenti.

Disfunzione endoteliale e insulino-resistenza

In pazienti ad alto rischio cardiovascolare, la disfunzione endoteliale si può osservare anche prima dell'insorgenza di patologia vascolare clinicamente manifesta. Inoltre ci sono numerose evidenze che indicano che la funzione endoteliale è compromessa in caso di ridotta sensibilità all'insulina endogena. Una ridotta disponibilità di NO è un fattore cruciale per lo sviluppo di disfunzione endoteliale²⁸ e sembra giocare un ruolo importante nello sviluppo di insulino-resistenza.

La eNOS regola il flusso ematico verso i tessuti insulino-sensibili (es. muscoli scheletrici, fegato, tessuto adiposo) e la sua attività è ridotta in soggetti insulino-resistenti. L'inibizione della eNOS riduce il reclutamento microvascolare e l'*uptake* muscolare di glucosio in risposta all'insulina.²⁸ In ratti, l'induzione di ipertensione in seguito alla somministrazione di N-monometil-L-arginina (L-NMMA), un inibitore della eNOS, si associa ad insulino-resistenza.²⁹

Esiste una crescente evidenza che livelli elevati di inibitore della eNOS, *asymmetric-dimethylarginine* (ADMA), contribuiscano alla disfunzione endoteliale.^{30,31} La eNOS gioca un ruolo cruciale nella regolazione del tono vascolare, nell'attivazione piastrinica, nell'adesione leucocitaria e nello sviluppo di aterosclerosi. Tutti i fattori di rischio noti per aterosclerosi (ipercolesterolemia, DM, ipertensione, fumo cronico) sono associati ad una disfunzione endoteliale secondaria ad una ridotta biodisponibilità vascolare di NO, che media la vasodilatazione flusso-dipendente. Molti studi hanno dimostrato che la riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente si verifica nelle coronarie e nei vasi periferici di conduttanza e di resistenza, rispettivamente.^{32,33} Questo correla positivamente con un

incrementato rischio di eventi cardiovascolari ed è predittore indipendente di morbilità vascolare e mortalità.

Una diffusa disfunzione endoteliale gioca, inoltre, un ruolo dinamico nei processi aterotrombotici. In parallelo, la disfunzione endoteliale in letti capillari importanti dal punto di vista metabolico può partecipare allo sviluppo di insulino-resistenza. Individui con aterosclerosi mostrano sia disfunzione vasodilatatoria endoteliale che una ridotta attività insulinica.

La disfunzione endoteliale si manifesta precocemente nell'insulino-resistenza. Gli individui affetti, notoriamente quelli con DM tipo 2 e obesità, hanno una riduzione del flusso muscolare e un ridotto *uptake* periferico di glucosio dovuto agli elevati livelli di insulina. L'effetto dell'insulina sulla vasodilatazione dei vasi muscolari scheletrici è direttamente proporzionale alla sua capacità di stimolare l'*uptake* di glucosio. In altre parole, gli individui maggiormente insulino-sensibili mostrano il più alto grado di vasodilatazione in risposta alla stessa insulina.³⁴ Per contro, individui insulino-resistenti, così come i soggetti obesi o affetti da NIDDM, mostrano una ridotta risposta vasodilatatoria all'insulina. Pinkey et al³⁵ hanno ipotizzato che la disfunzione endoteliale preceda lo sviluppo sia dell'insulino-resistenza che dell'aterosclerosi. L'insulino-resistenza è un *marker* di disfunzione endoteliale periferica. In arterie di grosso e medio calibro la disfunzione endoteliale gioca un ruolo maggiore nell'aterogenesi ma ha uno scarso impatto metabolico diretto. Per contro, la disfunzione endoteliale nel microcircolo contribuisce allo sviluppo di insulino-resistenza.

La coesistenza di disfunzione endoteliale periferica e centrale può spiegare l'osservata associazione tra aterosclerosi vascolare e insulino-resistenza. L'insulina agisce come

vasodilatatore e, negli stati di insulino-resistenza, inclusi l'obesità, il NIDDM e l'ipertensione, è stato ben descritto un ridotto flusso ematico verso la muscolatura scheletrica (indotto dall'insulina). Inoltre gli individui con insulino-resistenza hanno una ridotta capillarizzazione muscolo-scheletrica. Dunque, sia la ridotta superficie capillare che la ridotta funzione endoteliale capillare, insieme con la disfunzione vasodilatatoria insulino-mediata a livello arteriolare, possono contribuire all'insulino-resistenza a causa del rallentato trasporto di insulina a livello interstiziale, cosicché meno insulina può legarsi ai suoi recettori.^{36,37}

Premesse e ragioni del nostro studio

È noto come soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2, anche in assenza di malattie cardiovascolari, dimostrino una riduzione del consumo massimo di ossigeno ($VO_2\text{max}$) quando confrontati con individui sani. Lau et al.³⁸ hanno rilevato in pazienti diabetici e con microalbuminuria un $VO_2\text{max}$ inferiore del 40% rispetto a controlli normoalbuminurici. Inoltre, la pendenza della curva di incremento del VO_2 nel corso di un esercizio progressivo al *treadmill* è risultata attenuata in individui con diabete di tipo 2 rispetto a soggetti sani di controllo. Nel loro insieme, tali dati suggeriscono che la riduzione del $VO_2\text{max}$ in pazienti con diabete mellito di tipo 2 non è determinata esclusivamente da una precoce interruzione dell'esercizio o dal decondizionamento, ma che una riduzione significativa della performance cardiovascolare coesiste con la ridotta tolleranza all'esercizio. Regensteiner³⁹ ha dimostrato una riduzione del $VO_2\text{max}$ e della sua velocità di incremento nelle donne sedentarie con diabete mellito di tipo 2 non complicato rispetto a donne sedentarie in sovrappeso e normopeso. Le donne in premenopausa con diabete non complicato hanno una riduzione del consumo di O_2 durante un esercizio massimale e sottomassimale. Soggetti con familiarità per diabete mellito di tipo 2 e insulino-resistenza hanno maggiore obesità viscerale e una riduzione del $VO_2\text{max}$ quando confrontati con soggetti senza familiarità per diabete, nonostante BMI e massa grassa comparabili.

Sia l'obesità viscerale che la riduzione della capacità fisica sono associate e possono contribuire all'insulino-resistenza.⁴⁰

Disponiamo di evidenze in base alle quali sia fattori centrali (cardiaci) che periferici appaiono corresponsabili della riduzione della capacità di esercizio fisico nei soggetti affetti da

diabete mellito di tipo 2. L'importante relazione tra funzione endoteliale e capacità di esercizio fisico è chiaramente dimostrata, ad esempio, nelle donne in post-menopausa le quali, rispetto alle coetanee in pre-menopausa, rivelano una compromissione della funzione endoteliale ben correlata con il ridimensionamento del picco di VO_2 in corso di test al *treadmill*.

La terapia con metformina può determinare un miglioramento della funzione endoteliale in giovani donne affette da insulino-resistenza causata dalla policistosi ovarica. Inoltre sia l'ADMA che i parametri di insulino-resistenza risultano aumentati nelle donne affette da policistosi ovarica e migliorano in seguito al trattamento con metformina.⁴¹

Recenti evidenze dimostrano come l'insulino-resistenza giochi un ruolo importante nel determinare la riduzione della *performance* cardiovascolare. È stata dimostrata la presenza di una cardiomiopatia diabetica e anche di una cardiomiopatia da insulino-resistenza sulla base di alterazione cardiovascolari fini, precoci, subcliniche.

Studi epidemiologici e clinici hanno confermato, almeno in parte, gli studi sperimentali identificando un nesso fra la condizione di insulino-resistenza, le alterazioni della funzione endoteliale e quelle morfo-funzionali del ventricolo sinistro, con la possibilità di un'evoluzione fino all'insufficienza cardiaca.^{23,42}

La disponibilità di nuove metodiche, quali l'*Endo-Pat* e il *Doppler Tissue Imaging* (DTI), in grado di quantificare il grado di funzionalità/disfunzionalità dell'endotelio e del miocardio regionale, hanno rapidamente ampliato la possibilità di verifica diretta delle conseguenze vascolari e cardiache del dismetabolismo glucidico, nella sua fase preclinica ed in quella conclamata di malattia diabetica.

In un precedente studio del nostro gruppo avevamo dimostrato una riduzione della riserva contrattile miocardica nei pazienti portatori di insulino-resistenza, nei confronti dei pazienti diabetici che presentavano, viceversa, una riserva contrattile sovrapponibile a quella del gruppo di pazienti normali di controllo.²⁴

Recentemente, si è iniziato a considerare la SM, soprattutto in presenza della sua componente essenziale, l'insulino-resistenza, come causa possibile di insufficienza cardiaca. L'evidenza di una marcata riduzione della riserva contrattile nei soggetti con SM da noi esaminati potrebbe essere riconducibile alla citata "ipotesi metabolica".^{25,26} Al contempo, l'assenza di una alterazione simile nel gruppo dei pazienti diabetici da noi osservata, potrebbe essere legata al vasto utilizzo di molecole sensibilizzanti verso l'insulina o capaci di aumentarne la disponibilità.

L'ipotesi del nostro studio è stata, pertanto, quella di valutare in una popolazione che comprende soggetti pre-diabetici (insulino-resistenti) la *performance* cardiopolmonare al fine di evidenziare la presenza di parametri alterati, espressione di un danno preclinico già presente e di verificare se tali parametri alterati possano essere normalizzati dal trattamento con metformina. Inoltre, attraverso l'utilizzo di metodiche ecocardiografiche e la misurazione della riserva endoteliale, si è voluto distinguere il contributo dato a tale disfunzione da fattori centrali (disfunzione cardiaca sub-clinica) e periferici (ridotta riserva endoteliale).

A tali fini, nel nostro studio è stato previsto l'impiego del test cardiopolmonare con la misurazione dei principali parametri di *performance* cardiovascolare e della misurazione della riserva endoteliale tramite metodo pletismografico Endo-Pat. Lo studio ha ricompreso una valutazione ecocardiografica convenzionale e una valutazione della funzione sistolica e

diastolica ventricolare sinistra con TDI, *strain* (ϵ) e *strain/rate imaging* (SR); tali valutazioni sono state fatte al momento dell'arruolamento e dopo 3 mesi di terapia con metformina.

Materiali e Metodo

Popolazione studiata. Sono stati arruolati 25 individui d'ambo i sessi (9 donne e 16 uomini) normoglicemici, con alterata tolleranza glucidica (IGT), con iperglicemia a digiuno (IFG) o diabetici di nuova insorgenza con diagnosi recente di insulino-resistenza calcolata secondo l'HOMA IR (Insulina ($\mu\text{U/mL}$) x Glicemia (mmol/L)]/22).

Sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione allo studio: (1) età compresa fra 20 e 75 anni (età media 45 ± 12); (2) nessun trattamento con farmaci ipoglicemizzanti orali; (3) frazione di eiezione $>55\%$ (metodo di Simpson in eco 2D) e assenza di dissinergie ecocardiografiche a riposo; (4) accertata, normale funzionalità epatica e renale; (5) disponibilità del paziente a seguire il protocollo di studio. Sono stati esclusi gli individui: (1) affetti da cardiopatia ischemica o d'altra origine in atto o pregressa; (2) ipertesi e/o con ipertrofia ventricolare sinistra (negatività elettrocardiografica ed eco 2D); (3) portatori di *pace-maker* cardiaco; (4) affetti da fibrillazione atriale o altre aritmie maggiori; (5) affetti da patologie che a giudizio dei ricercatori potessero compromettere i risultati dello studio.

Tutti i pazienti, all'epoca dell'arruolamento, hanno eseguito esami ematochimici completi, nonché il test da carico orale di glucosio (glicemia basale e a 120' dopo un carico di 75 grammi di glucosio) e il dosaggio dell'insulinemia. Tutti sono stati sottoposti all'epoca dell'arruolamento a valutazione cardiovascolare completa: anamnesi e visita, ECG, ecocardiogramma mono-, bidimensionale e color Doppler, TDI basale (con ϵ e SR), test cardiopolmonare e valutazione della riserva endoteliale. Inoltre, sono state dosate ADMA e leptina ematiche.

A seguito dell'indagine basale, i pazienti sono stati sottoposti a trattamento con metformina per 3 mesi. Dopo tale periodo, sono state ripetute tutte le indagini strumentali e di laboratorio iniziali.

Ecocardiografia standard. È stata eseguita una valutazione ecocardiografica completa mono-, bidimensionale e color-Doppler, utilizzando un ecocardiografo Aplio CV, modello SSA 770A/CV (Toshiba) equipaggiato con una sonda di 2.5-MHz.

Sono stati misurati i volumi e gli spessori ventricolari ed è stata calcolata la frazione d'eiezione utilizzando il metodo di Simpson biplano dalla proiezione apicale quattro camere e due camere. È stato considerato anormale un valore $\leq 50\%$. È stata valutata la funzione diastolica^{43,44} registrando le velocità con il Doppler pulsato nella proiezione quattro camere apicale; il profilo di flusso mitralico è stato misurato posizionando il volume campione tra le punte dei lembi mitralici per misurare la velocità di picco in protodiastole (onda E), la velocità di picco della contrazione atriale (onda A) e il tempo di decelerazione dell'onda E. L'esame è stato eseguito tenendo presente la traccia elettrocardiografica.

Doppler tissutale. Il Doppler tissutale (DTI) è una modalità ecocardiografica che applica il principio Doppler (sia con onda pulsata che in modalità a codice di colori) per registrare le velocità tessutali. La frequenza del segnale di ritorno dell'analisi color-Doppler del cuore permette di identificare due bande principali: quella proveniente dal movimento dei globuli rossi ad alta frequenza e di bassa ampiezza (*flusso*, con velocità intorno ai 100 cm/s) e quella dovuta alle fibre miocardiche, di bassa frequenza ed alta ampiezza (*parete*, con velocità intorno ai 10 cm/s ed ampiezza intorno a 40 dB). Tradizionalmente questa seconda componente è stata considerata "rumore" ed eliminata mediante un filtro passa-alto. Al

contrario, poiché il contenuto informativo del DTI è presente nelle basse frequenze, per la sua visualizzazione è necessario utilizzare filtri attivi nella direzione di frequenza opposta. Nella suddetta modalità, l'utilizzazione del Doppler pulsato permette di studiare la parete miocardica posizionando il volume campione all'interno dello spessore. Si ottiene così una curva spettrale su cui è possibile misurare le velocità di picco di contrazione e di rilasciamento miocardico.

In base a questa tecnica, abbiamo valutato la funzione longitudinale del ventricolo sinistro analizzando le velocità di spostamento dell'*anulus* mitralico utilizzando il DTI e registrando le velocità con il Doppler pulsato. Il profilo di velocità miocardica è stato misurato posizionando il volume campione nella porzione basale del setto interventricolare. Sono stati misurati la velocità di picco sistolico (onda S), la velocità di picco in protodiastole (onda E), la velocità di picco della contrazione atriale (onda A).

Speckle tracking imaging.

Con l'analisi del movimento degli *speckles* inoltre è stato possibile valutare ulteriori parametri di funzione cardiaca come lo *Strain* (ϵ) e *Strain Rate* (SR) globali longitudinali. In particolare lo ϵ è la quantità totale di deformazione miocardica, mentre lo SR è la velocità con cui la deformazione miocardica regionale avviene.

Infatti è stata recentemente sviluppata questa nuova metodica che consente di estrapolare le informazioni di ϵ e SR a partire dalle immagini ottenute in *B-mode* in scala di grigi. Questo è reso possibile in seguito al miglioramento ottenuto nella risoluzione delle immagini 2-D con l'utilizzo della seconda armonica e l'incremento del *frame rate*. La tecnica (*speckle tracking*) si basa sul riconoscimento di gruppi di pixel all'interno della parete

miocardica con specifiche caratteristiche acustiche che appunto per le loro caratteristiche di riflettività vengono seguiti fotogramma per fotogramma durante il ciclo cardiaco. Dallo spostamento così calcolato è possibile estrarre sia le informazioni di velocità sia di ϵ e SR.

Endo-Pat2000 per lo studio della funzione endoteliale. Tradizionalmente la funzione endoteliale viene valutata a livello del circolo coronarico o di quello brachiale, utilizzando l'infusione intra-arteriosa di agonisti ed antagonisti endoteliali (es. L-NMMA) a dosi che non determinano effetti sistemici, oppure misurando la vasodilatazione flusso-indotta. Lo studio viene rivolto sia verso i vasi di calibro maggiore che verso i vasi di resistenza. Nel primo caso, vengono rilevate le variazioni di diametro delle arterie mediante angiografia quantitativa o, qualora si tratti di vasi periferici, mediante ecografia. Nel caso del microcircolo, vengono registrate le variazioni di flusso, misurato con tecnica Doppler o con pletismografia venosa a *strain-gauge* o con tomografia a fotoni. Nel nostro studio abbiamo valutato la funzione endoteliale a livello dell'estremità distale degli arti superiori utilizzando l'ENDO-PAT 2000, un apparecchio per lo studio non invasivo della riserva endoteliale che viene attualmente utilizzato in numerosi istituti di ricerca e negli studi di farmacologia clinica in oltre 40 paesi, ed è stato validato da circa 100 articoli in celebri riviste scientifiche ed *abstracts*, diventando la metodologia standard per lo studio della funzione endoteliale. L'ENDO-PAT 2000 si caratterizza per la semplicità d'uso, per non essere un metodo "operatore-dipendente" dato che i risultati del test possono essere calcolati immediatamente in modo automatico (Figura 1). Esso fornisce un reale e riproducibile indice di della funzione endoteliale in soli 25 minuti. Esso si basa sulla metodica non-invasiva PAT (*Peripheral Arterial Tonometry*), che misura i cambiamenti endotelio-mediati del tono vasale a livello delle dita delle mani attraverso dei

bio-sensori. Le modificazioni del tono vasale sono prodotte da un'occlusione dell'arteria brachiale della durata di 5 minuti (standard), che provoca una risposta iperemica. Le misurazioni rilevate sul braccio controlaterale sono utilizzate come controllo. Il risultato, automaticamente calcolato, fornisce un indice della funzione endoteliale.

Test cardiopolmonare. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un test cardiopolmonare al cicloergometro. Prima di ogni test sono state effettuate le calibrazioni del flussimetro e dei sensori dell'ossigeno e dell'anidride carbonica. I pazienti venivano valutati prima per un minuto basale e successivamente durante tre minuti di riscaldamento con un carico di 25 W. Il test è stato condotto con incremento a rampa del carico lavorativo da 10 a 20 Watt al minuto per ottenere un esercizio di circa 10 minuti per ogni paziente. È stata richiesta una pedalata costante di circa 60-65 giri al minuto. Durante il test è stata effettuato un monitoraggio costante dell'elettrocardiogramma a 12 derivazioni e la pressione arteriosa misurata ogni due minuti. I parametri respiratori sono stati raccolti in un database elettronico ed elaborati utilizzando il software "Vmax C; Sormedics, Yorba Linda, CA". Il consumo massimo di ossigeno ($VO_2\text{max}$) o di picco è stato calcolato dalla media degli ultimi 20 secondi dell'esercizio. In tutti i pazienti è stato eseguito un test massimale interrotto per esaurimento fisico. $VO_2\text{max}$ ed il consumo di ossigeno alla soglia anaerobica sono stati espressi in valore assoluto, normalizzati per il peso e in percentuale rispetto ai valori predetti in base alla formula di Wasserman et al.⁴⁵ La soglia anaerobica è stata calcolata utilizzando il metodo *V-Slope* e confrontata con i valori ottenuti dai grafici $VE/VO_2 - VE/VCO_2$ (rapporto tra ventilazione e consumo di ossigeno e tra ventilazione e produzione di anidride carbonica) e $PetO_2 - PetCO_2$ (concentrazione di O_2 e CO_2 a fine espirazione) da due operatori esperti diversi.

Al picco dell'esercizio sono stati calcolati il polso di ossigeno (consumo di ossigeno normalizzato per la frequenza cardiaca) e il quoziente respiratorio (rapporto tra CO₂ e O₂). Infine sono stati calcolati le pendenze delle curve VO₂/Work e VE/VCO₂, quest'ultima escludendo la porzione finale non lineare della curva.

Marker biochimici. L'ADMA è un inibitore endogeno, competitivo dell'ossido nitrico-sintetasi (NOS), l'enzima che sintetizza l'NO dall'arginina. Numerosi tipi di cellule elaborano l'ADMA e fra queste rientrano le cellule endoteliali umane. Studi condotti su vasi isolati e su cellule endoteliali coltivate suggeriscono che concentrazioni di ADMA comprese tra 1 e 10 µmol/L sono in grado di inibire la vasodilatazione dipendente dall'endotelio e l'attività della NOS. Livelli aumentati di ADMA sono stati riscontrati in animali ipercolesterolemici e sono stati ritenuti responsabili di disfunzione vascolare endotelio-dipendente. È stato dimostrato che l'ADMA viene metabolizzata a citrullina dall'enzima dimetil-arginina dimetil-aminoidrolasi (DDAH) e che l'inibizione della DDAH causa una graduale vasocostrizione dei segmenti vascolari che può essere antagonizzata dalla L-arginina. I livelli plasmatici di ADMA possono essere aumentati fino al doppio in soggetti portatori di fattori di rischio cardiovascolare e risultano ulteriormente aumentati (fino a 10 volte la norma) in pazienti con segni clinici di aterosclerosi. Elevate concentrazioni di ADMA sono risultate associate a ipertensione ed elevato rischio cardiovascolare. Il ruolo dell'ADMA nei pazienti ipertesi, quale *marker* sensibile di nefropatia ipertensiva, è stato evidenziato di recente.

La dimetil-arginina simmetrica (SDMA), uno stereoisomero dell'ADMA, non inibisce invece la NOS ed è presente nel plasma in concentrazioni comparabili con quelle dell'ADMA.

Per questo motivo, ogni metodo analitico deve essere in grado di distinguere le due componenti isomeriche.

La determinazione delle concentrazioni ematiche dell'ADMA è avvenuta su campioni di sangue prelevati in EDTA, subito centrifugati presso il nostro laboratorio di chimica clinica, aliquotati e conservati a -80°C. La misura di tale sostanza risulta non facile per almeno due motivi: la bassa concentrazione della molecola e la presenza delle molecole strutturalmente simili alla SDMA. A seguito di una preliminare estrazione dal plasma, si utilizzerà un processo cromatografico in grado di separare l'analita di interesse dalle altre molecole, come metodo estrattivo è stato scelto quello a scambio cationico, come metodo cromatografico abbiamo scelto un HPLC *narrow bore*, cioè associato ad una colonna particolarmente sottile (2.1 mm f int) e con rivelazione fluorimetrica (LIF o *Laser Induced Fluorescence*). Selettività e sensibilità sono garantiti a questo metodo da una rivelazione fluorimetrica successiva ad attivazione della molecola di interesse con un raggio di luce laser.

Analisi statistica. I risultati dello studio sono riportati come medie e deviazione standard. Le differenze tra i dati ottenuti in condizioni basali e dopo trattamento sono state valutate utilizzando il test di Student a due code per dati appaiati (o test di Wilcoxon per ranghi se necessario). Il test del X^2 è stato utilizzato per valutare le differenze tra le due popolazioni. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Caratteristiche della popolazione studiata. Venti pazienti con insulino-resistenza sul totale del gruppo di 25 soggetti arruolati nel nostro studio hanno portato a termine la terapia della durata di 3 mesi con metformina. Cinque pazienti sono state esclusi, una per gravidanza, in relazione ai possibili e non ancora ben conosciuti effetti teratogeni del farmaco; 2 per diarrea severa e 2 per interruzione volontaria.

La Tabella 1 sintetizza le caratteristiche di base della popolazione studiata: dati antropometrici, parametri ematochimici e fattori di rischio cardiovascolare. Tutti i pazienti hanno rivelato insulino-resistenza secondo la formula:

$$HOMA-IR = [Insulina(\mu U/mL) \times Glicemia (mmol/L)]/22,5;$$

la maggior gran parte è risultata in sovrappeso o francamente obesa (BMI 30 ± 5 ; Peso $81,5 \pm 17$) con la dimostrazione, al carico orale di glucosio, di un'alterazione del metabolismo glucidico. Solo una delle pazienti arruolate ha associato ad una iperinsulinemia uno stato normoglicemico.

Dopo i tre mesi di trattamento con metformina e attività fisica (Tabella 2), abbiamo osservato una riduzione significativa del peso ($81,5 \pm 17$ vs 78 ± 16 , $P < 0,05$) e del BMI (30 ± 5 vs 29 ± 5 , $p < 0,05$). L'aderenza alla terapia medica è stata del 100%.

Al controllo ai tre mesi di trattamento sono stati, altresì, osservati *trend* di modificazione, tutti non significativi, per la leptina (42 ± 34 vs $34,5 \pm 37$, $p = n.s.$), l'ADMA ($0,64 \pm 0,12$ vs $0,62 \pm 0,9$, $p = n.s.$). C'è stato un significativo miglioramento della Riserva Endoteliale ($1,93 \pm 0,5$ vs $2,1 \pm 0,4$, $p < 0,05$).

Ecocardiografia convenzionale e TDI. Al controllo ecocardiografico al *follow-up* dei 3 mesi non sono state osservate, rispetto ai valori basali, modificazioni dei parametri tradizionali di funzione sistolica e diastolica del ventricolo sinistro e della funzione diastolica valutata con il Doppler Tissutale (Tabella 3). Al contrario, abbiamo messo in evidenza un significativo incremento della funzione longitudinale ventricolare sinistra evidenziata da un incremento significativo dell'onda S' ($6,9 \pm 9$ vs $7,88 \pm 7,8$; $P=0,01$). Analogamente anche i sensibili indici di funzione miocardica sistolica derivati dall'analisi dello *speckle tracking imaging* come lo *strain* e lo *strain rate* sono risultati significativamente migliorati dopo la terapia con metformina. Poiché tali parametri sono indici sensibili di funzione sistolica del ventricolo sinistro, il loro incremento dopo trattamento conferma l'influenza negativa dell'insulino-resistenza già in una fase preclinica sulla funzione longitudinale del VS. Questo dato è importante perché permette di affermare che la metformina causa degli effetti negativi esclusivamente a livello periferico, cioè nel muscolo scheletrico, mentre a livello centrale determina il miglioramento della funzione sistolica.

Test cardiometabolico. I pazienti hanno mostrato un VO_2 max medio ridotto (67%) rispetto ai valori teorici di una popolazione sana di uguali caratteristiche fisiche ($21,02 \pm 4,97$ ml/Kg/min). Ugualmente ridotto è risultato il carico di lavoro ($113,50 \pm 35,32$ W; 81% del valore predetto). Il confronto tra i test effettuati al tempo basale e dopo tre mesi di terapia con metformina ha dimostrato una significativa riduzione del VO_2 . Il carico di lavoro e la pendenza della curva VO_2 /Work sono apparsi ridotti, ma in assenza di significatività statistica. Infine, è stata osservata un significativo incremento della $PetO_2$ (pressione di O_2 di fine espirazione) al picco (tabella 4).

Abbiamo rilevato una correlazione altamente significativa tra valori basali di HOMA e VO_2 di picco nell'intero gruppo di pazienti ($r=0,83$, $p<0,001$; Figura 2), identificando due differenti risposte al trattamento con metformina; una parte (gruppo A: 11 pazienti) ha mostrato un incremento del VO_2 di picco mentre la restante parte (gruppo B: 9 pazienti) ha mostrato un decremento (Tabella 5). Abbiamo rilevato una significativa correlazione tra i valori basali dell'HOMA e ΔRFE ($r=0,58$, $p<0,01$; figura 3) con un significativo incremento in ΔRFE soltanto nel gruppo A. I 2 gruppi differivano soltanto per i valori basali di HOMA (Tabella 5). I soggetti con alti valori HOMA al basale hanno mostrato un miglioramento in termini di VO_2 di picco e di RFE, mentre quelli con bassi valori di HOMA hanno manifestato una ridotta capacità fisica e nessun incremento in termini di RFE.

Discussione

I risultati del *Diabetes Prevention Program* (DPP) e altri studi analoghi hanno dimostrato che le modificazioni dello stile di vita come una adeguata dieta e l'incremento dell'attività fisica svolgono un ruolo determinante nella prevenzione e nel rallentamento della transizione dallo stato di insulino-resistenza al diabete franco^{46,47,48}. In seguito a tali evidenze, è stato prodotto un grande sforzo per migliorare l'aderenza alle indicazioni di terapia fisica e comportamentale da parte dei soggetti a rischio.^{49,50,51,52,53} Il DPP ha, inoltre, dimostrato che la metformina, un biguanide comunemente prescritto ai pazienti diabetici, ha la capacità di determinare un significativo rallentamento o addirittura una mancata progressione della condizione di IGT verso quella di diabete.^{46,47} Attualmente la metformina è uno dei farmaci più comunemente prescritti nei pazienti con diabete conclamato. Inoltre, un vasto interesse si è di recente indirizzato al suo possibile utilizzo nei pazienti a rischio metabolico glucidico al fine di prevenirne la transizione verso il diabete.^{54,55,56}

Metformina e funzione cardiopolmonare in pazienti IR.

La metformina ha dimostrato di essere in grado di ridurre il consumo di ossigeno in una popolazione di individui non insulino-resistenti rispetto a un gruppo di controllo trattato con placebo⁵⁷. Studi in vitro hanno dimostrato che la metformina ha un'azione inibitoria nei confronti del *complesso I* del sistema di trasporto mitocondriale (trasferimento di elettroni dal NADH al coenzima Q10, fig. 4).^{58,59,60,61,62} L'inibizione di tale complesso può rallentare il trasferimento di equivalenti riducenti durante il ciclo di Krebs e, potenzialmente, limitare le capacità del metabolismo ossidativo. Nei grandi gruppi muscolari esiste la possibilità di usufruire di una certa riserva mitocondriale durante l'esercizio ma, se l'inibizione del

complesso / compromette tale riserva, si avrà un decremento della prestazione cardiopolmonare. È quindi importante, sia da un punto di vista sperimentale che clinico, capire se il trattamento con metformina sia in grado di influenzare la capacità di esercizio.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare se il trattamento a breve termine con dosaggi standard di metformina influenzi il consumo massimo di ossigeno e le variabili ad esso correlate in una popolazione insulino-resistente.

La capacità massima di un individuo di eseguire un lavoro aerobico è identificata dal VO_2max , che si può esprimere, secondo l'equazione di Fick, come il prodotto della portata cardiaca per la differenza artero-venosa di ossigeno.

$$VO_2max = (FC \times GS) \times [C(a-v) O_2];$$

esso è influenzato dal sesso, dall'età, dall'allenamento fisico e dalla presenza di patologie o farmaci che influenzano alcune delle sue componenti. È stato dimostrato come un miglioramento della VO_2max sia associato a una riduzione della mortalità cardiovascolare, anche in soggetti con patologie in atto.⁶³

I dati del presente studio dimostrano che anche in pazienti insulino-resistenti la terapia con metformina non migliora il consumo di ossigeno, ma anzi ne determina una lieve, seppur non significativa, riduzione. Anche la capacità fisica globale dei pazienti risulta alterata, in misura non significativa, dopo tre mesi di terapia. A tali riscontri si associa un aumento della $PetO_2$ che sembra indicare l'incapacità della massa muscolare di utilizzare l' O_2 come substrato metabolico; l'effetto potrebbe essere mediato dal meccanismo d'azione della metformina a livello mitocondriale sopra descritto.

Mediante la significativa correlazione che abbiamo dimostrato esistere tra insulino-resistenza (HOMA-IR) prima del trattamento e variazione del VO_2 è stato possibile evidenziare lo stretto legame esistente tra questi due parametri, l'uno metabolico, l'altro funzionale: in presenza di bassi valori di insulino-resistenza la capacità fisica dei pazienti tende a ridursi.

Metformina e funzione endoteliale in pazienti IR.

Numerose segnalazioni hanno messo in evidenza nei soggetti affetti da SM una riduzione della riserva endoteliale, confermando che l'attività dell'enzima eNOS è compromessa in presenza di resistenza all'insulina.⁶⁴

Nel nostro studio la metformina influenza positivamente la tolleranza allo sforzo e l'efficienza cardiometabolica. Un analogo comportamento è stato rilevato a carico della riserva endoteliale, anch'essa strettamente correlata con i valori di HOMA-IR basali.

Le presenti evidenze sono supportate da precedenti risultati⁶⁵ che hanno dimostrato in una popolazione con SM insulino-resistente un miglioramento della riserva endoteliale dopo tre mesi di terapia con metformina.

Metformina e funzione miocardica in pazienti IR.

Le segnalazioni della letteratura in tema di SM e disfunzione cardiaca riguardano, nella maggioranza dei casi, il riscontro di una compromissione della funzione diastolica.^{66,67} Wong e coll. hanno messo in evidenza come nei pazienti con un elevato numero di fattori che contribuiscono alla sindrome metabolica possa essere presente un'alterazione preclinica anche della funzione sistolica associata a una riduzione della tolleranza all'esercizio fisico.⁶⁸ Studi epidemiologici¹⁰ hanno identificato una relazione fra insulino-resistenza e sviluppo di

insufficienza cardiaca. Per questo motivo un interesse crescente si sta indirizzando allo studio dei meccanismi metabolici operanti nel cuore insufficiente.

I dati che emergono su questo tema dal presente studio avvalorano le nostre precedenti osservazioni e l'insulino-resistenza si conferma come fattore responsabile delle alterazioni precoci della funzione sistolica dei pazienti con SM. Infatti, l'analisi ecocardiografica dei nostri pazienti ha messo in evidenza che il trattamento con metformina è in grado di produrre un incremento significativo della funzione sistolica longitudinale del ventricolo sinistro.

Conclusioni

Il presente studio evidenzia per la prima volta come, in una popolazione con alterato metabolismo glucidico e insulino-resistenza, la terapia con metformina, oltre alla efficacia dimostrata nel prevenire l'evoluzione verso un diabete conclamato, sia in grado di influenzare in maniera positiva la funzione sistolica del ventricolo sinistro e la funzione endoteliale.

Tale risultato positivo non si è però tradotto in un miglioramento della capacità fisica nella totalità dei nostri pazienti, ma solo in quelli con alti livelli di insulino-resistenza. La correlazione tra livelli basali di insulino-resistenza e parametri funzionali si è dimostrata presente anche in ambito di riserva endoteliale, che si incrementa dopo terapia con metformina solo nei soggetti con maggiore compromissione metabolica.

I nostri dati permettono di affermare, inoltre, che gli effetti negativi della metformina si manifestano solo a livello periferico (muscolo scheletrico), mentre a livello centrale la terapia determina il miglioramento dei parametri di funzione sistolica.

Gli effetti riscontrati sulla capacità fisica sono particolarmente importanti perché una riduzione del VO_2 causata da incongrua terapia con metformina può influire sulla capacità di esercizio, nonché sulla *compliance* all'attività fisica che noi sappiamo essere un elemento cruciale nella gestione clinica di questi pazienti.

Questi risultati, se confermati in casistiche più numerose e dopo *follow-up* più lunghi, ci permetteranno di identificare, attraverso la valutazione degli indici di insulino-resistenza, i pazienti che si beneficeranno maggiormente da terapia con insulino-sensibilizzanti.

Tabella 1. Caratteristiche basali

	Pazienti (N=20)
Età (anni \pm DS)	45 \pm 12
Peso (Kg \pm DS)	81.5 \pm 17
BMI (Kg/m ² \pm DS)	30 \pm 5
Ipertensione	27%
Colesterolo Totale (mg/dl \pm DS)	214 \pm 16
HDL (mg/dl \pm DS)	55 \pm 16
LDL (mg/dl \pm SD)	127 \pm 20
Trigliceridi (mg/dl \pm DS)	149 \pm 60
Glicemia basale (mg/dl \pm DS)	115 \pm 15
OGTT 120 min (mg/dl \pm DS)	140 \pm 43
<i>Metabolismo Glucidico</i>	
NG	9%
IFG	72%
IGT	27%
IGT+IFG	27%
Diabete	18%
Insulinemia	19 \pm 12
HOMA (<2,7)	5 \pm 3,5

Tabella2. Parametri antropometrici e biochimici prima e dopo metformina

Caratteristiche	Basale	Controllo
Peso	81,5±17	78±16*
BMI	30±5	29±5*
ADMA	0.64±0,12	0,62±0,09
Leptina	42±34	34.5±37
Riserva endoteliale	1.93±0.5	2.10±0.4*

*P<0,05

Tabella 3.

	Basale	Dopo 3 mesi	P
<i>Ecocardiografia</i>			
LVEF	65,7% ±4,5 %	67,2% ± 5,8%	P=ns
EDV	77,5 ± 18,8	68,9 ± 13,2	P=ns
ESV	28,4 ± 9,5	22,9 ± 6,4	P=ns
DecT	0,226 ± 0,04	0,196 ± 0,02	P=ns
E/A	1,19 ± 0,4	1,19 ± 0,4	P=ns
<i>Speckle</i>			
E'	10,5 ± 2,5	10 ± 1,9	P=ns
E'/A'	1,23 ± 0,38	1,21 ± 0,41	P=ns
E/E'	8,88 ± 2,4	8,73 ± 2,8	P=ns
S'	6,9± 9	7,88 ± 7,8	P=0,01
ε	33±12	42±15	p=0,004
SR	2,32±0,39	2,65±0,65	p=0,04

Tabella 4. Parametri CPET prima e dopo 3 mesi di trattamento con metformina

	Basale	3 Mesi	P
VO₂max	1,67 ± 0,39	1,55 ± 0,36	0,02
% VO₂max	75,00 ± 7,15	69,91 ± 7,72	0,03
Work	113,50 ± 35,32	109,70 ± 31,38	0,52
% Work	81,00 ± 15,03	78,40 ± 8,44	0,55
AT	1,13 ± 0,25	1,02 ± 0,22	0,18
AT% VO ₂ peak	51,10 ± 8,17	47,11 ± 8,64	0,38
VO₂ Pulse	10,93 ± 3,17	10,63 ± 3,26	0,02
VE max	55,02 ± 12,84	54,84 ± 13,14	0,94
Pet O₂	108,29 ± 5,21	112,06 ± 4,20	0,001
RQ peak	1,11 ± 0,11	1,19 ± 0,07	0,20
VO ₂ /Work	9,46 ± 1,11	9,42 ± 0,40	0,61
VE/VO ₂	22,73 ± 2,72	23,71 ± 4,16	0,26
VE/VCO ₂	23,6 ± 2,96	24,38 ± 3,41	0,26

Tabella 5. Parametri antropometrici e funzionali prima e dopo 3 mesi di metformina

	Gruppo A	Gruppo B	P
Δ Peak VO2	+1,2 \pm 1.95	-1,48 \pm 0,59	-
BMI (Kg/m ² \pm SD)	30 \pm 4	29 \pm 6	Ns
HOMA index	7,8 \pm 3,5	3,3 \pm 0,7	p<0,001
Δ EFR	0.32 \pm 0.34	-0.05 \pm 0.45	p<0,05

Figura 1. Esempio metodica ENDO-PAT2000

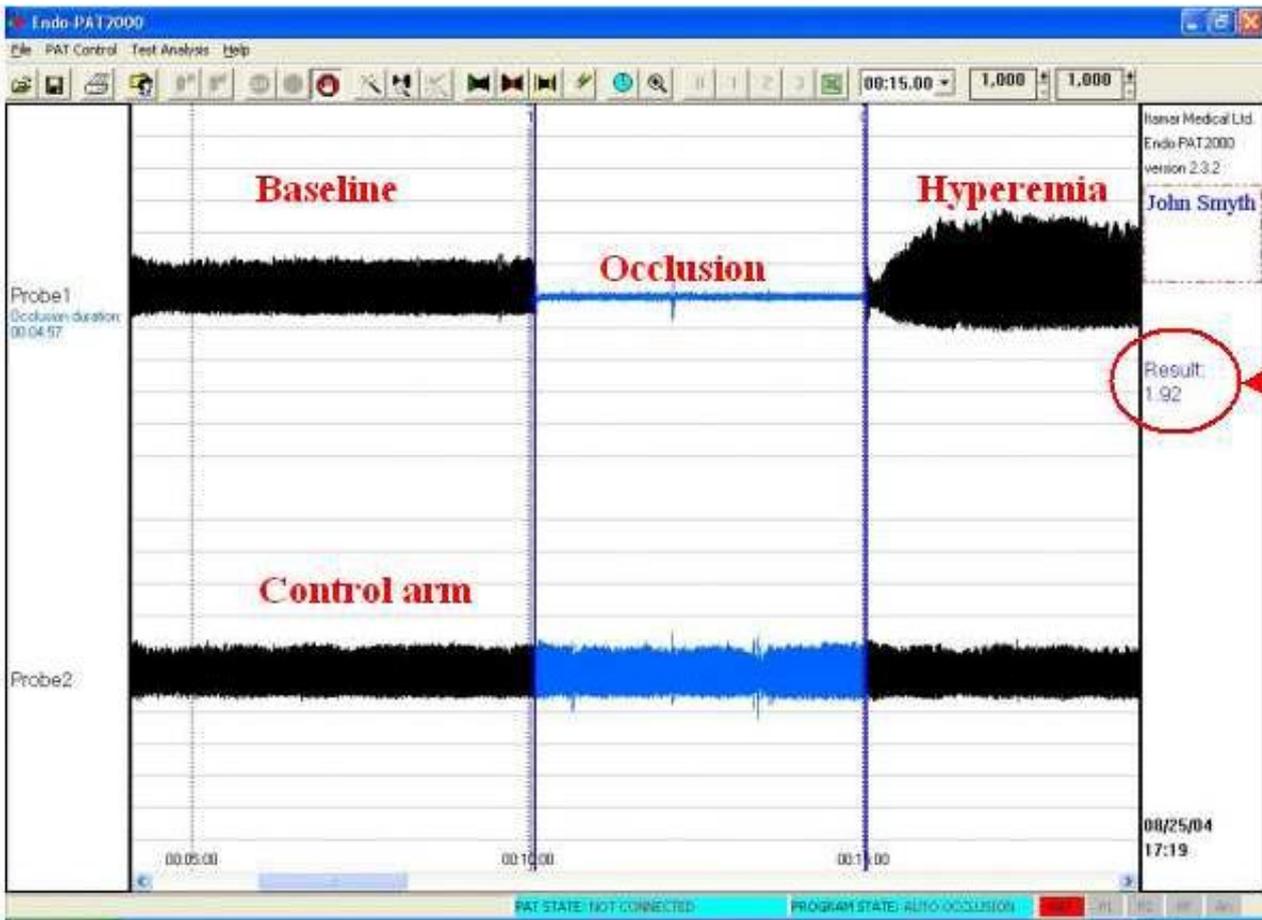


Figura 2. Correlazione tra HOMA IR e variazione della VO₂max

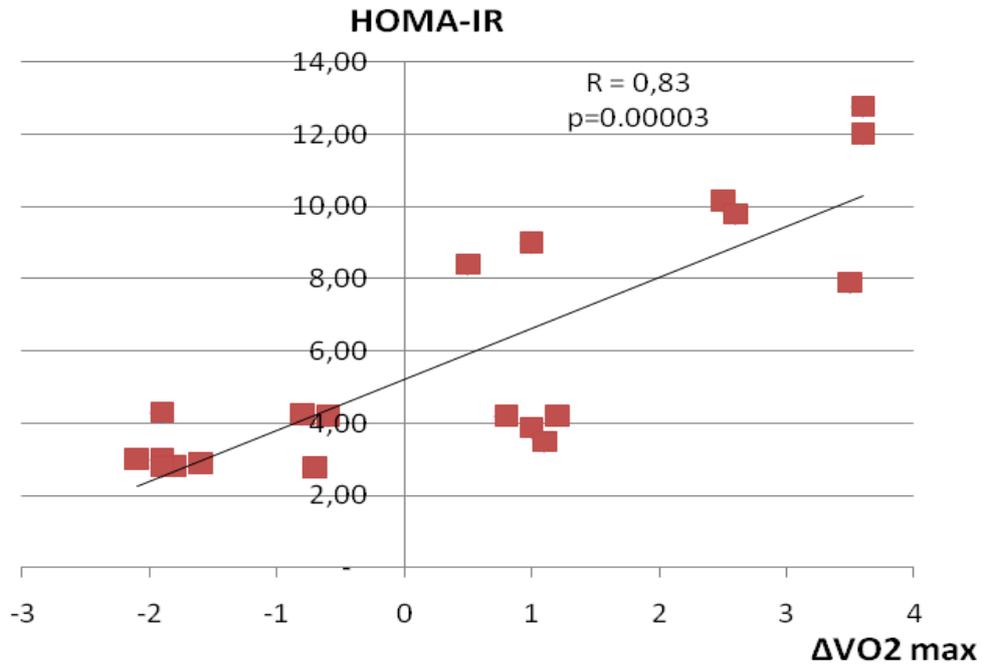


Figura 3. Correlazione tra HOMA IR e variazione della riserva endoteliale

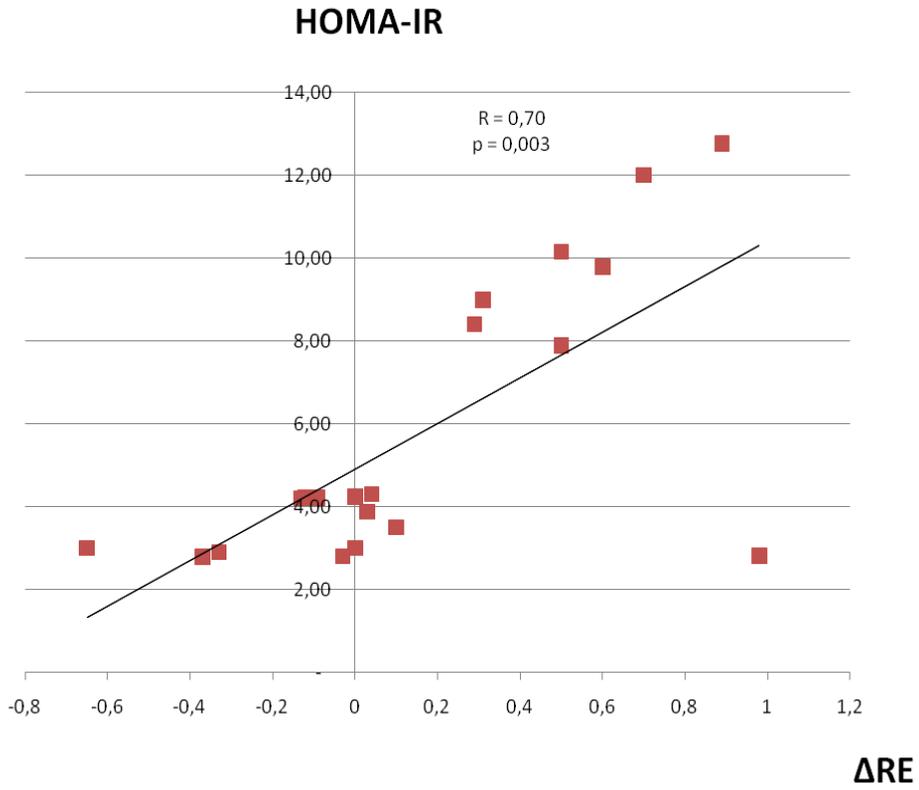
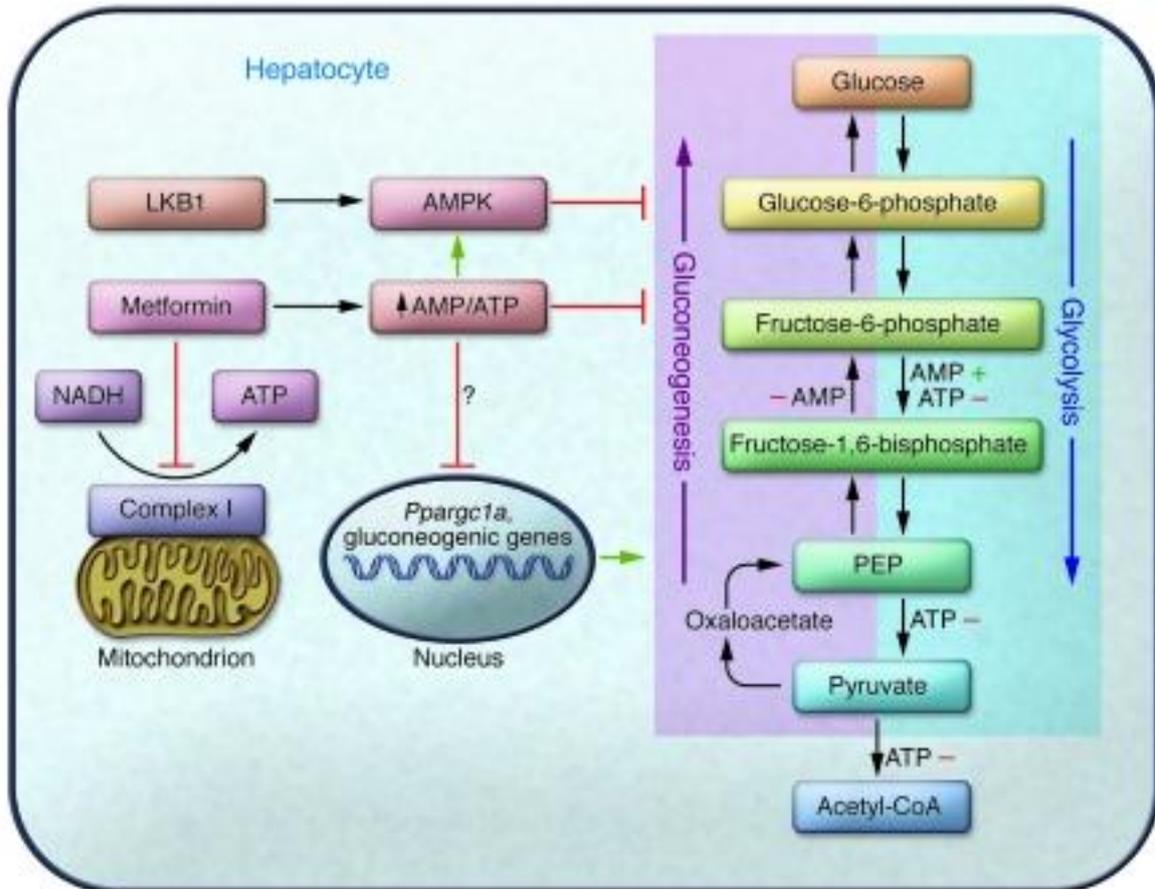


Figura 4. Meccanismo d'azione della metformina: inibizione del *Complex I* mitocondriale



SECONDA PARTE

INTRODUZIONE

Insulino-resistenza e attività fisica

In soggetti con insulino-resistenza numerosi sono i fattori metabolici ed emodinamici che possono contribuire al miglioramento dell'omeostasi glucidica che si osserva dopo esercizio fisico, sia acutamente, sia dopo allenamento protratto. Le risposte adattative all'esercizio fisico comprendono (1) un'azione facilitata dell'insulina sul sistema di trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico, (2) una ridotta stimolazione ormonale della produzione epatica di glucosio, (3) un migliorato flusso sanguigno al muscolo scheletrico e (4) la normalizzazione del profilo dei lipidi ematici.

Il muscolo scheletrico, che rappresenta sino al 40% della massa corporea nell'uomo e in altre specie di mammiferi, è il principale tessuto responsabile della cessione periferica di glucosio in risposta a un carico di glucosio o di insulina o durante un esercizio fisico.⁶⁹ Il trasporto del glucosio all'interno del miocita è regolato acutamente dall'insulina e da fattori insulino-simili attraverso l'attivazione di una serie di proteine intracellulari. Ciò risulta, in ultima analisi, nella traslocazione di un'isoforma proteica di un trasportatore del glucosio, chiamato GLUT-4, alla membrana plasmatica e ai tubuli T dove ha luogo il trasporto del glucosio. Le evidenze disponibili supportano l'idea che l'entità della traslocazione del GLUT-4 è proporzionale alla capacità del muscolo scheletrico di facilitare il trasporto del glucosio.⁷⁰

Il trasporto del glucosio all'interno del muscolo scheletrico è stimolato anche da un meccanismo insulino-indipendente che è attivato da (1) contrazioni,⁷¹ (2) ipossia,⁷² (3) ossido nitrico⁷³ e (4) bradichinina.⁷⁴ Tale meccanismo insulino-indipendente accadrebbe a seguito

dell'attivazione dell'AMPK, una protein-chinasi attivata dal 5'-adenosin-monofosfato, che si attiva da un decremento della carica energetica della cellula.⁷⁵

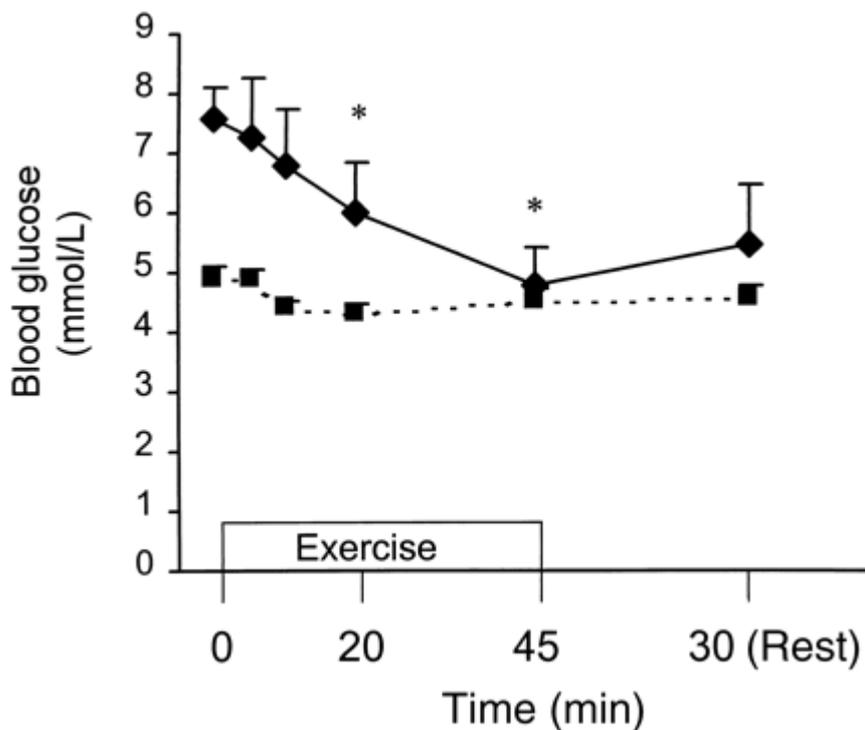
L'insulino-resistenza del trasporto del glucosio del muscolo scheletrico costituisce uno dei principali problemi nel normale mantenimento di una condizione di euglicemia. Quest'insulino-resistenza è frequentemente accompagnata da una varietà di anomalie metaboliche e cardiovascolari, come ipertensione, intolleranza glucidica, diabete tipo 2, dislipidemia, aterosclerosi e obesità centrale. L'insulino-resistenza nel diabete tipo 2 non si accompagna generalmente a ridotti livelli di GLUT-4 nel muscolo scheletrico; ciò che invece è anomalo è la normale traslocazione della proteina GLUT-4 verso la membrana plasmatica.⁷⁶

È stato ampiamente dimostrato che l'attività fisica, sia in acuto, sia come allenamento abituale, conduca all'aumento del metabolismo glucidico e pare che l'espressione della proteina GLUT-4 giochi un ruolo fondamentale;⁷⁷ l'aumentata azione dell'insulina sul trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico dopo esercizio fisico si associa a un'aumentata espressione di proteina GLUT-4 e a risposte adattative di enzimi coinvolti nella fosforilazione e ossidazione del glucosio. Sulla base di queste osservazioni si può affermare che l'esercizio fisico rappresenti una fondamentale strategia di intervento per migliorare lo stato metabolico di soggetti insulino-resistenti.

Il miglioramento dell'azione dell'insulina sul metabolismo glucidico del muscolo scheletrico di soggetti insulino-resistenti riduce la probabilità di evoluzione in diabete conclamato, e riduce la mortalità cardio-vascolare. In effetti, i risultati del *Diabetes Prevention Program* negli Stati Uniti hanno convincentemente dimostrato che l'introduzione di un programma di modificazione dello stile di vita, che comprenda almeno un 7% di riduzione del

peso corporeo e un minimo di 150 minuti di attività fisica alla settimana, dovrebbe ridurre l'incidenza di diabete, nel giro di 3 anni, del 58%.⁴⁶ Questi risultati sono perfettamente analoghi a quelli di uno studio finlandese nel quale un trattamento con dieta dimagrante e attività fisica ha ridotto l'incidenza di diabete tipo 2 in uomini sovrappeso con intolleranza glucidica.⁴⁸

ESERCIZIO ACUTO E INSULINO-RESISTENZA. È stato ampiamente dimostrato che, durante un singolo carico di attività fisica si determina un significativo abbassamento della glicemia in soggetti con diabete tipo 2. L'effetto dell'esercizio acuto sulla glicemia è probabilmente dovuto alla capacità dell'attività contrattile di attivare il trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico.



Uno dei meccanismi sottostanti questo effetto ipoglicemizzante è stato identificato in uno studio su soggetti con diabete tipo 2;⁸¹ immediatamente dopo un singolo carico di attività fisica (45-60 minuti di cyclette al 60-70% del VO₂max) si osservava un aumento del 74% del GLUT-4 sulla membrana plasmatica nel muscolo vasto laterale, in assenza di aumento di

espressione della stessa proteina GLUT-4. Perciò un singolo carico di attività fisica di intensità moderata può incrementare il trasporto del glucosio attraverso l'induzione della traslocazione sulla membrana plasmatica della proteina GLUT-4.

ESERCIZIO CRONICO E INSULINO-RESISTENZA. Il metabolismo glucidico alterato in tutto il corpo (non solo nel muscolo scheletrico) può essere ripristinato dall'attività fisica cronica. Due risposte adattative cruciali che sottostanno all'aumentata attività di trasporto del glucosio dopo esercizio fisico sono un'*up-regulation* dell'espressione della proteina GLUT-4 e un'aumentata traslocazione della stessa proteina GLUT-4 sulla membrana plasmatica.⁷⁸

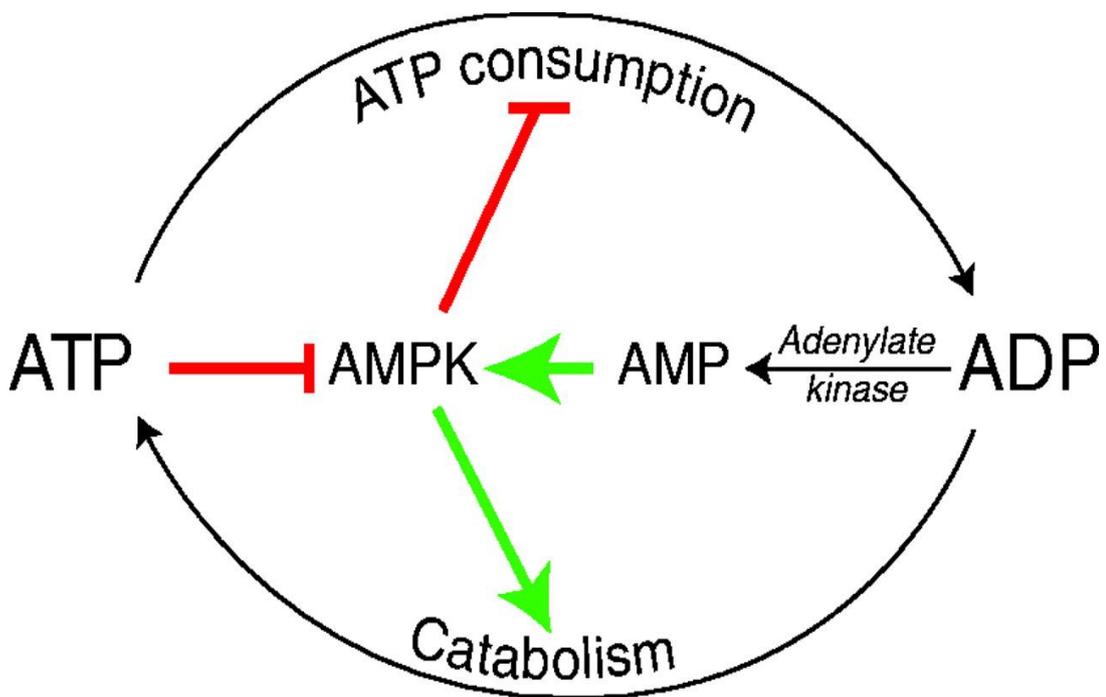
L'attività fisica incrementa la sensibilità all'insulina nel muscolo scheletrico in misura maggiore rispetto alla metformina e ha il vantaggio aggiuntivo di migliorare la prestazione cardiovascolare e respiratoria, evitando inoltre possibili effetti collaterali di una terapia farmacologica a lungo termine.

L'allenamento fisico incrementa la sensibilità all'insulina in tutto l'organismo (oltre che nel muscolo scheletrico) sia nei soggetti normali, sia nei figli di genitori diabetici, principalmente attraverso la stimolazione della sintesi di glicogeno muscolare insulino-mediata.

I meccanismi attraverso i quali l'attività fisica contrasta l'insulino-resistenza possono essere spiegati a livello molecolare, come per la metformina, con l'attivazione dell'AMPK. Ciò fu dimostrato per la prima volta da Richter et al.,⁷⁹ i quali ipotizzarono che l'AMPK stimolata dall'attività fisica agisca inibendo la via metabolica denominata TOR (target of rapamycin), che è responsabile della crescita cellulare e dell'ipertrofia. Un'altra conseguenza dell'allenamento fisico di resistenza è un incremento nella capacità ossidativa attraverso un'incrementata

biogenesi mitocondriale, fenomeno osservato per la prima volta da Holloszy nel 1967.⁸⁰ L'enzima AMPK sarebbe il sensore coinvolto nel meccanismo che rileva un deficit nella capacità ossidativa e stimola la biogenesi mitocondriale.

Il meccanismo con il quale l'attivazione dell'AMPK determini l'*up-regulation* del GLUT-4 rimane ancora non ben chiarito, anche se è stato dimostrato che sarebbe coinvolto un incremento di fattori di trascrizione per l'espressione del GLUT-4.⁸¹



Insulino-resistenza e metformina

La metformina è largamente usata per la terapia del diabete mellito tipo 2 (DM2); migliora l'iperglicemia senza stimolare secrezione di insulina, senza determinare incremento ponderale, e senza causare ipoglicemia. Inoltre ha effetti benefici sui lipidi circolanti connessi con un aumentato rischio cardiovascolare.⁸²

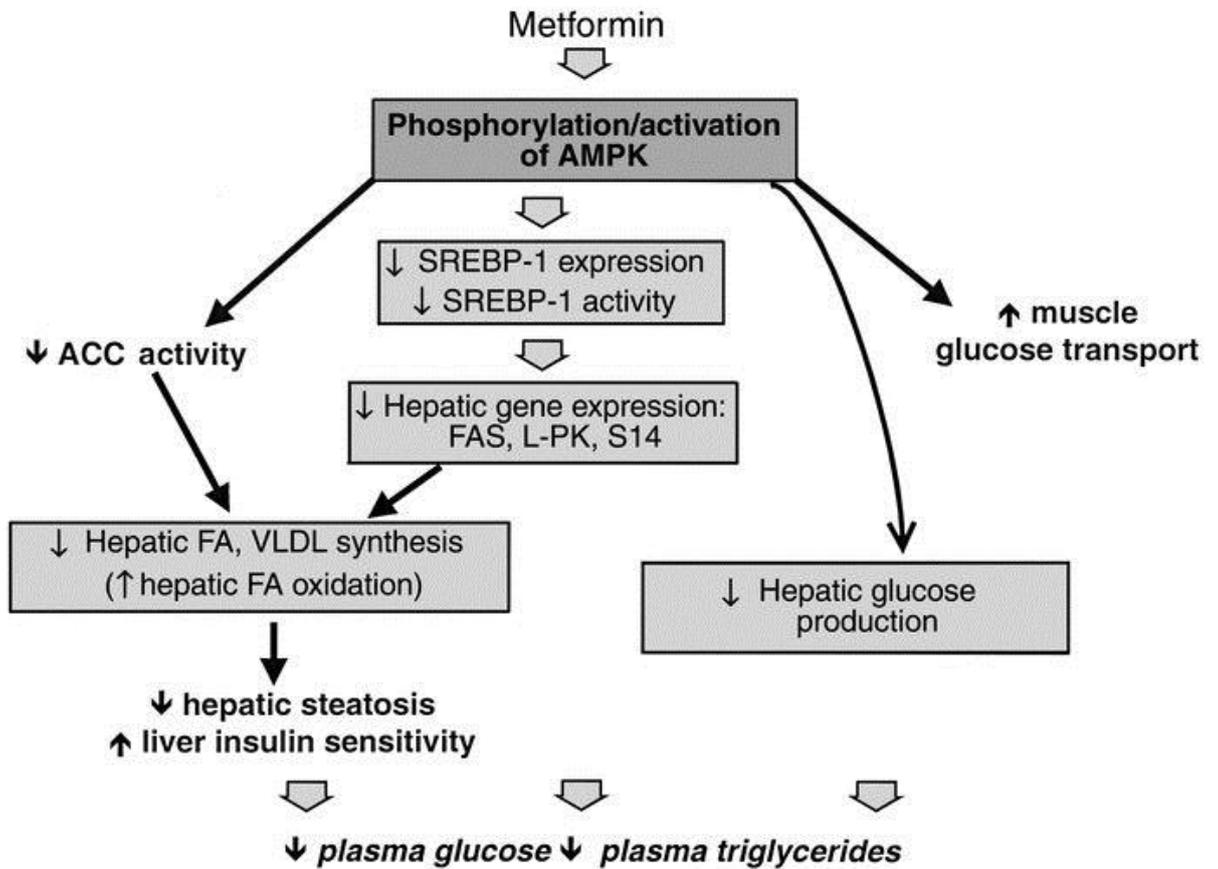
Anche se usata come farmaco fin dal 1957, i meccanismi attraverso i quali la metformina riduce i livelli di glucosio e dei lipidi rimangono ancora parzialmente ignoti. Due effetti, una ridotta produzione epatica di glucosio e un'aumentata captazione di glucosio delle cellule muscolo-scheletriche, sono stati identificati come i maggiori responsabili dell'efficacia nell'abbassamento della glicemia.⁸³

Un ruolo centrale nel meccanismo d'azione della metformina è svolto dall'AMPK, che funziona come sensore dello stato energetico nel muscolo scheletrico.

In sintesi un'aumentata fosforilazione e attivazione dell'AMPK da parte della metformina conduce agli effetti sopra menzionati sul metabolismo glucidico e lipidico (vedi figura), attraverso 4 vie:

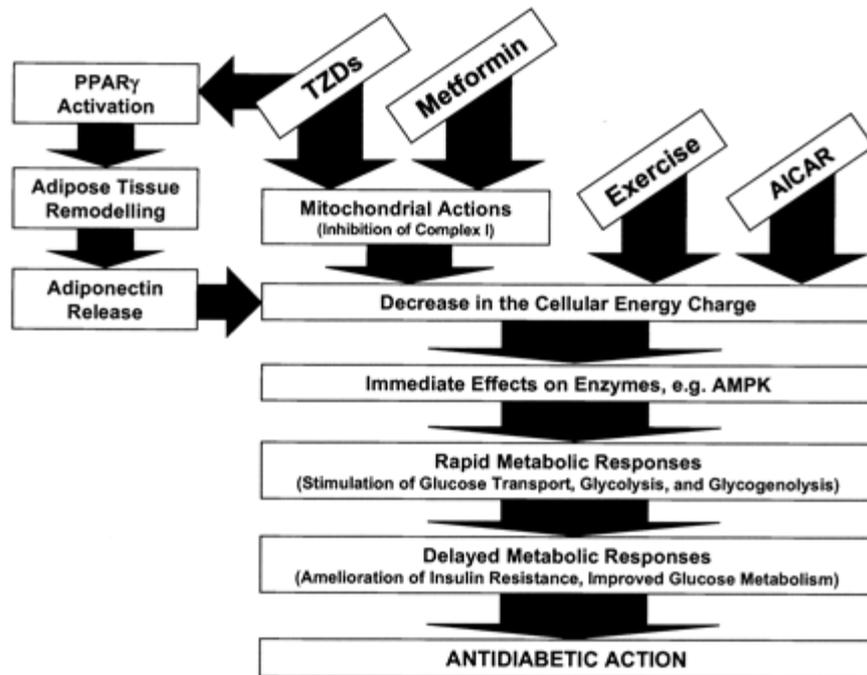
- 1) Fosforilazione e inattivazione dell'Acetil-CoenzimaA-Carbolissasi (ACC):
inibizione della lipogenesi e aumento dell'ossidazione degli acidi grassi.
- 2) Ridotta espressione e ridotta attività del SREBP-1, un importante fattore di trascrizione, stimolato dall'insulina, implicato nella patogenesi dell'insulino-resistenza, della dislipidemia e del DM2
- 3) Riduzione della produzione epatica di glucosio

4) Induzione della captazione di glucosio da parte delle cellule muscolari scheletriche, effetto che risulta additivo rispetto all'insulina.⁸⁴



Ci sono anche altri effetti metabolici, dimostrati su cuore intatto e su cellule muscolari cardiache isolate, che non implicano necessariamente un'attivazione apprezzabile dell'AMPK.

Ciò che non è stato chiarito in maniera definitiva è quale sia il *primum movens*, tuttavia l'ipotesi più accreditata l'attribuisce all'inibizione del *complex I* della catena respiratoria mitocondriale, secondo un meccanismo tempo-dipendente e auto-limitante.⁸⁵



LA PROVA DA SFORZO CARDIOPOLMONARE

La prova da sforzo è un versatile e antico strumento che fornisce informazioni diagnostiche e prognostiche su pazienti con malattie cardiovascolari e polmonari. La prova da sforzo è una metodica disponibile da più di mezzo secolo e, come molte altre procedure cardiovascolari, si è evoluta come tecnologia e come obiettivi. Quando combinate con la prova da sforzo, metodiche aggiuntive di *imaging* offrono un'ulteriore accuratezza diagnostica, informazioni sulla struttura e funzione cardiaca, e informazioni prognostiche aggiuntive. Analogamente, l'aggiunta delle misurazioni della ventilazione e dei gas espirati durante la prova da sforzo fornisce un vasto insieme di informazioni uniche e utili clinicamente, che finora sono state poco comprese e largamente sottoutilizzate dai clinici pratici. Le ragioni di ciò sono diverse e includono la necessità di apparecchiature aggiuntive (apparecchiature di test cardiopolmonare [CPET]), personale esperto nella gestione e nell'interpretazione di questi test, limitata o assente formazione di specialisti cardiologi, limitata formazione da parte di pneumologi specialisti in questa metodica, e la scarsa comprensione del valore della CPET.

Le apparecchiature attuali di CPET permettono l'analisi dei gas respirati a riposo, durante esercizio e durante recupero e forniscono delle misurazioni respiro-per-respiro del consumo di ossigeno (VO_2), della produzione di anidride carbonica (VCO_2) e della ventilazione (VE). Tali sistemi computerizzati forniscono delle elaborazioni di questi dati che sono in questo modo facili da richiamare e da archiviare, e ciò rende la CPET disponibile per un'utilizzazione la più larga possibile. Questi dati possono essere rapidamente integrati con le classiche variabili misurate durante una prova da sforzo, come la frequenza cardiaca, la pressione arteriosa, il carico lavorativo della prova, i dati elettrocardiografici e i sintomi, in modo da fornire una

valutazione completa della tolleranza allo sforzo e delle risposte allo sforzo. La CPET può anche essere effettuata unitamente a un test di *imaging*, per una valutazione diagnostica aggiuntiva. Pertanto, la CPET dà al clinico la possibilità di ottenere, oltre la prova da sforzo tradizionale, una grossa mole di informazioni che, correttamente applicate e interpretate, contribuiscono in modo determinante alla gestione di complesse malattie cardiovascolari e polmonari.⁸⁶

Fisiologia dello scambio dei gas respirati

La capacità di compiere uno sforzo è strettamente correlata con la capacità del sistema cardiovascolare di fornire O₂ ai muscoli e alla capacità del sistema polmonare di espellere la CO₂ dal sangue attraverso i polmoni. I sistemi cardiovascolare e respiratorio lavorano assieme per garantire sia un sistema di rilascio di O₂, sia un sistema di rimozione di CO₂ dai tessuti.

Quattro sono i processi coinvolti:

1. La ventilazione polmonare, cioè il movimento di aria dentro e fuori i polmoni;
2. La diffusione polmonare, cioè lo scambio di O₂ e CO₂ tra polmoni e sangue;
3. Il trasporto di O₂ e CO₂ nel sangue;
4. Lo scambio dei gas a livello capillare, cioè lo scambio di O₂ e CO₂ tra il sangue

capillare e i muscoli.

I primi 2 processi costituiscono la *respirazione esterna* perché coinvolge il movimento dei gas dall'aria-ambiente ai polmoni e quindi nel sangue. Il quarto passaggio è definito come la *respirazione interna* perché riguarda lo scambio dei gas tra sangue e tessuti. Questi 2 processi sono collegati tra loro dal sistema circolatorio. La CPET è utile perché, stimolando con l'esercizio i meccanismi responsabili della respirazione esterna e interna, può rivelare delle anomalie non palesi a riposo. Inoltre, i tradizionali test di funzionalità cardiaca e polmonare

effettuati a riposo non possono determinare in modo affidabile la capacità di esercizio o i particolari meccanismi che causano un'intolleranza allo sforzo in soggetti con malattia cardiaca o polmonare.

L'aumento della captazione di O_2 da parte dei muscoli coinvolti nell'esercizio è facilitato soprattutto da un aumento della portata cardiaca (frequenza cardiaca x gittata sistolica), sino a 6 volte rispetto al riposo. La portata cardiaca è anche ridistribuita dai tessuti non attivi (splancnici e renali) ai muscoli scheletrici. Contemporaneamente avviene un aumento di flusso sanguigno ai polmoni, sia per l'aumento della portata cardiaca, sia per la vasodilatazione dei vasi polmonari. Avviene inoltre un'estrazione aumentata di O_2 dal sangue, e ciò risulta in un aumento della differenza artero-venosa di O_2 .

Nei soggetti normali, la ventilazione/minuto (VE) aumenta in proporzione all'aumento del carico lavorativo. Durante l'inspirazione, soltanto una parte del volume corrente raggiunge gli alveoli, i quali sono la sede dello scambio dei gas. L'aria che rimane nelle vie respiratorie e che non partecipa allo scambio dei gas è nota come volume dello *spazio morto* (VD). Durante lo sforzo, la dilatazione delle vie respiratorie determina l'aumento del VD, ma, poiché anche il volume corrente aumenta, è garantita comunque un'adeguata ventilazione alveolare, e pertanto un adeguato scambio dei gas. Tutto questo viene definito come *normale accoppiamento ventilazione-perfusione*. Molte situazioni patologiche possono alterare l'accoppiamento tra ventilazione e perfusione. Per esempio, in molte malattie polmonari lo sforzo è limitato da uno spazio morto maggiore della norma, e quindi c'è meno tessuto polmonare col quale possa avvenire lo scambio dei gas. L'aumento della VE durante sforzo deve essere accoppiato a un incremento del flusso sanguigno. Uno dei segni più tipici di

scompenso cardiaco cronico è una ridotta risposta della portata cardiaca allo sforzo; ciò può anche portare a un disaccoppiamento tra ventilazione e perfusione, cioè la ventilazione deve aumentare sproporzionatamente ai bisogni metabolici per compensare una perfusione inadeguata.

Parametri della CPET e loro implicazioni fisiologiche

Massima capacità aerobica: VO₂max e VO₂ di picco

Il VO₂ massimale (VO₂max) è un parametro importante dato che è considerata l'unità di misura che definisce i limiti del sistema cardiopolmonare. È definito dall'equazione di Fick come il prodotto della portata cardiaca per la differenza d'ossigeno artero-venosa al picco dell'esercizio:

$$VO_{2max} = (FC \times GS) \times [C(a-v) O_2],$$

dove FC è la frequenza cardiaca e GS è la gittata sistolica.

La misurazione del VO₂max implica che il limite fisiologico di un soggetto sia stato raggiunto (denominato anche *massima capacità aerobica*). Il vero VO₂max (VO₂max fisiologico) storicamente è stato definito da un *plateau* nel VO₂ tra i 2 carichi finali è richiede che sia raggiunto e mantenuto per un dato tempo uno sforzo massimale. Poiché questa determinazione è soggettiva, può essere difficile da definire, ed è raramente osservata in pazienti con malattie cardiovascolari e polmonari, il termine VO₂ di picco è più comunemente usato clinicamente per esprimere la capacità di esercizio. Per contro, il termine VO₂max è più spesso usato per descrivere la capacità fisica in soggetti sani, nei quali è più probabile il raggiungimento di una risposta fisiologica massimale.⁸⁷

Soglia ventilatoria

Poiché molte attività della vita quotidiana non richiedono uno sforzo massimale, un parametro sotto-massimale di capacità fisica largamente utilizzato è la soglia anaerobica o ventilatoria (SA). Il termine SA significa che questo evento fisiologico è valutato mediante il gas ventilatorio espirato, definito dal livello di sforzo al quale VE inizia ad aumentare esponenzialmente rispetto all'incremento del VO_2 . La SA è ritenuta espressione della soglia anaerobica, la quale si basa sul concetto che a un dato carico di lavoro l'apporto di O_2 al muscolo non sia sufficiente. Questo sbilancio incrementa la dipendenza dalla glicolisi anaerobica, con produzione di lattato come prodotto metabolico finale (soglia del lattato).⁸⁸ Un incremento della VE è necessaria per eliminare l'eccesso di CO_2 prodotta durante la conversione di acido lattico a lattato. Anche se i termini *soglia ventilatoria*, *soglia anaerobica*, e *soglia del lattato* sono usati spesso intercambiabilmente, dovrebbero essere considerati degli eventi correlati ma differenti.

La SA solitamente si trova tra il 45% e il 65% del VO_2 di picco o del VO_{2max} di soggetti sani non allenati, ma può trovarsi a percentuali più alte della capacità di esercizio in soggetti ben allenati. L'allenamento incrementa il VO_2 alla SA di un'entità di grandezza simile a quella per la VO_2 di picco o la VO_{2max} : perciò è un parametro importante da documentare clinicamente.⁸⁹

Quoziente respiratorio

Raggiungere almeno l'85% della frequenza cardiaca massimale (rapportata all'età) è un ben riconosciuto indicatore dell'adeguatezza dello sforzo durante una CPET. Tuttavia la frequenza cardiaca massimale ha un'ampia variabilità nella popolazione generale. Il rapporto

degli scambi respiratori (RSR), definito come il rapporto tra VCO_2 e VO_2 , ottenuto esclusivamente dall'analisi dei gas ventilatori espirati, elimina il bisogno di valutare la FC nel determinare l'adeguatezza di uno sforzo. Il rapporto tra VCO_2 e VO_2 può essere usato per stimare il quoziente respiratorio (RQ). Al raggiungimento di sforzi di intensità elevata, il tamponamento dell'acido lattico contribuisce alla produzione di CO_2 , e ciò aumenta il numeratore del rapporto a una velocità più alta del denominatore. Questa risposta fisiologica allo sforzo è costante in soggetti sani e in tutti i tipi di pazienti, cosa che rende l'RQ di picco la più accurata e fattibile stima dell'entità dell'impegno nello sforzo. Un RQ di picco > 1.10 è generalmente considerato un indicatore di impegno eccellente durante la CPET, anche se non è un'indicazione all'interruzione del test.

Rapporto VE/VCO₂ (ventilazione al minuto/produzione di CO₂)

L'efficienza ventilatoria può essere stimata dalla valutazione della salita della VE in funzione del carico lavorativo, del VO_2 o del VCO_2 . L'indice di efficienza ventilatoria più largamente usato è la pendenza del rapporto VE/VCO₂. La relazione tra VE e VCO₂ durante sforzo è molto stretta, dato che la prima è modulata dalla produzione metabolica e anaerobica dell'altra. A prescindere dalle tecniche di calcolo utilizzate, un rapporto VE/VCO₂ <30 è considerato normale senza aggiustamenti per età e sesso.⁹⁰

Le risposte alla CPET come parte di una valutazione globale

La CPET presenta la caratteristica unica di valutare i gas scambiati durante uno sforzo; tuttavia il test integra anche le tradizionali misurazioni di una prova da sforzo, e ciò contribuisce a fornire una valutazione globale. I criteri elettrocardiografici, emodinamici e i

sintomi sono importanti variabili correlate con lo sforzo che completano e approfondiscono i dati degli indici dei gas scambiati.

Premesse e ragioni del nostro studio

Soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2, anche in assenza di malattie cardiovascolari, dimostrano una riduzione del consumo massimo di ossigeno ($VO_2\text{max}$) quando confrontati con individui sani. Lau et al.³⁸ hanno rilevato in pazienti diabetici e con microalbuminuria un $VO_2\text{max}$ inferiore del 40% rispetto a controlli normoalbuminurici. Inoltre, la pendenza della curva di incremento del VO_2 nel corso di un esercizio progressivo al *treadmill* è risultata attenuata in individui con diabete di tipo 2 rispetto a soggetti sani di controllo. Nel loro insieme, tali dati suggeriscono che la riduzione del $VO_2\text{max}$ in pazienti con diabete mellito di tipo 2 non è determinata esclusivamente da una precoce interruzione dell'esercizio o dal decondizionamento, ma che una riduzione significativa della performance cardiovascolare coesiste con la ridotta tolleranza all'esercizio. Regensteiner³⁹ ha dimostrato una riduzione del $VO_2\text{max}$ e della sua velocità di incremento nelle donne sedentarie con diabete mellito di tipo 2 non complicato rispetto a donne sedentarie in sovrappeso e normopeso. Le donne in premenopausa con diabete non complicato hanno una riduzione del consumo di O_2 durante un esercizio massimale e sottomassimale. Soggetti con familiarità per diabete mellito di tipo 2 e insulino-resistenza hanno maggiore obesità viscerale e una riduzione del $VO_2\text{max}$ quando confrontati con soggetti senza familiarità per diabete, nonostante BMI e massa grassa comparabili.

Sia l'obesità viscerale che la riduzione della capacità fisica sono associate e possono contribuire all'insulino-resistenza.⁴⁰

Disponiamo di evidenze in base alle quali sia fattori centrali (cardiaci) che periferici appaiono corresponsabili della riduzione della capacità di esercizio fisico nei soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2.

È ormai acclarato che l'insulino-resistenza giochi un ruolo importante nel determinare la riduzione della *performance* cardiovascolare. È stata dimostrata la presenza di una cardiomiopatia diabetica e anche di una cardiomiopatia da insulino-resistenza sulla base di alterazione cardiovascolari fini, precoci, subcliniche.

Studi epidemiologici e clinici hanno confermato, almeno in parte, gli studi sperimentali identificando un nesso fra la condizione di insulino-resistenza, le alterazioni della funzione endoteliale e quelle morfo-funzionali del ventricolo sinistro, con la possibilità di un'evoluzione fino all'insufficienza cardiaca.^{23,42}

In un precedente studio del nostro gruppo avevamo dimostrato una riduzione della riserva contrattile miocardica nei pazienti portatori di insulino-resistenza, nei confronti dei pazienti diabetici che presentavano, viceversa, una riserva contrattile sovrapponibile a quella del gruppo di pazienti normali di controllo.

Recentemente, si è iniziato a considerare la sindrome metabolica, soprattutto in presenza della sua componente essenziale, l'insulino-resistenza, come causa possibile di insufficienza cardiaca. L'evidenza di una marcata riduzione della riserva contrattile nei soggetti con sindrome metabolica da noi esaminati potrebbe essere riconducibile alla citata "ipotesi metabolica".²⁵ Al contempo, l'assenza di una alterazione simile nel gruppo dei pazienti diabetici da noi osservata, potrebbe essere legata al vasto utilizzo di molecole sensibilizzanti verso l'insulina o capaci di aumentarne la disponibilità.

Nella prima parte del nostro studio abbiamo valutato, in una popolazione di soggetti prediabetici o insulino-resistenti, la *performance* cardiopolmonare prima e dopo trattamento con metformina, e abbiamo rilevato che tale farmaco migliora la disfunzione endoteliale e la disfunzione miocardica subclinica, ma ha degli effetti potenzialmente negativi sulla *performance* cardiopolmonare; infatti in soggetti “poco” insulino-resistenti i parametri del test cardiopolmonare dopo 3 mesi di terapia apparivano, lievemente ma significativamente, peggiorati, mentre in soggetti già compromessi dal punto di vista dell’insulino-resistenza non si osservava tale peggioramento. È stato recentemente riportato che in soggetti con diabete mellito tipo 2 il trattamento combinato con rosiglitazone e attività fisica ha determinato il miglioramento della sensibilità all’insulina, del controllo glicemico e della forma fisica ben oltre i livelli attesi dalle azioni complementari dei 2 singoli trattamenti;⁹¹ pertanto l’ipotesi del nostro studio è stata quella di verificare se in una popolazione di soggetti insulino-resistenti l’azione combinata di metformina e attività fisica potesse avere effetti sinergici e maggiori della somma dei due singoli trattamenti.

A tali fini, nel nostro studio è stato previsto l’impiego del test cardiopolmonare con la misurazione dei principali parametri di *performance* cardiovascolare. Tali valutazioni sono state fatte al momento dell’arruolamento e dopo 3 mesi di terapia con metformina e attività fisica o di sola metformina.

Materiali e Metodo

Popolazione studiata. Ventisette soggetti d'ambo i sessi (18 donne e 9 uomini, età media \pm SD 45 ± 15) con diagnosi recente di insulino-resistenza calcolata secondo l'HOMA IR ($[\text{Insulina}(\mu\text{U}/\text{mL})\times\text{Glicemia}(\text{mmol}/\text{L})]/22$) ($\text{HOMA-IR}=4,92\pm 2,8$) sono stati randomizzati a 12 settimane di allenamento sorvegliato più metformina (gruppo MEx; N =13) o a 12 settimane di sola metformina (gruppo MT; N = 14). Sono stati valutati mediante CPET e SF-36 per distinguere tra le componenti fisiche e mentali.

Sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione allo studio: (1) età compresa fra 30 e 75 anni (età media 45 ± 12); (2) nessun trattamento con farmaci ipoglicemizzanti orali; (3) frazione di eiezione $>55\%$ (metodo di Simpson in eco 2D) e assenza di dissinergie ecocardiografiche a riposo; (4) accertata, normale funzionalità epatica e renale; (5) disponibilità del paziente a seguire il protocollo di studio. Sono stati esclusi gli individui: (a) affetti da cardiopatia ischemica o d'altra origine in atto o pregressa; (b) ipertesi e/o con ipertrofia ventricolare sinistra (negatività ECGgrafica ed eco 2D); (c) portatori di *pace-maker* cardiaco; (d) affetti da fibrillazione atriale o altre aritmie maggiori; (e) affetti da patologie che a giudizio dei ricercatori potessero compromettere i risultati dello studio.

Tutti i pazienti, all'epoca dell'arruolamento, hanno eseguito esami ematochimici completi, nonché il test da carico orale di glucosio (glicemia basale e a 120' dopo un carico di 75g di glucosio) e il dosaggio dell'insulinemia. Tutti sono stati sottoposti all'epoca dell'arruolamento a valutazione cardiovascolare completa: anamnesi e visita, ECG, ecocardiogramma mono-, bidimensionale e color Doppler, test cardiopolmonare.

A seguito dell'indagine basale, i pazienti sono stati sottoposti a trattamento con metformina per 3 mesi e sono stati avviati a un'attività fisica nella palestra del nostro istituto allestita esclusivamente per questo studio. Dopo tale periodo, sono state ripetute tutte le indagini strumentali e di laboratorio iniziali. È stato inoltre somministrato al termine dello studio il questionario SF-36, sulla qualità di vita.

Ecocardiografia standard. È stata eseguita una valutazione ecocardiografica completa mono-, bidimensionale e color Doppler, utilizzando un ecocardiografo Aplio CV, modello SSA 770A/CV (Toshiba) equipaggiato con una sonda di 2.5-MHz. Sono stati misurati i volumi e gli spessori ventricolari ed è stata calcolata la FE utilizzando il metodo di Simpson biplano dalla proiezione apicale quattro camere e due camere. È stato considerato anormale un valore $\leq 50\%$. È stata valutata la funzione diastolica^{43,44} registrando le velocità con il Doppler pulsato nella proiezione quattro camere apicale. Il profilo di flusso mitralico è stato misurato posizionando il volume campione tra i lembi mitralici con il PWD per misurare la velocità di picco in protodiastole (onda E), la velocità di picco della contrazione atriale (onda A) e il tempo di decelerazione dell'onda E. L'esame è stato eseguito sulla scorta della traccia elettrocardiografica.

Test cardiopolmonare. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un test cardiopolmonare al cicloergometro. Prima di ogni test sono state effettuate le calibrazioni del flussimetro e dei sensori dell'ossigeno e dell'anidride carbonica. I pazienti venivano valutati prima per un minuto (basale) e successivamente durante tre minuti di riscaldamento con un carico di 25 W. Il test è stato condotto con incremento a rampa del carico lavorativo da 10 a 20 Watt al minuto per ottenere un esercizio di circa 10 minuti per ogni paziente. È stata richiesta una

pedalata costante di circa 60-65 giri al minuto. Durante il test è stata effettuato un monitoraggio costante dell'elettrocardiogramma a 12 derivazioni e la pressione arteriosa è stata misurata ogni due minuti. I parametri respiratori sono stati raccolti in un database elettronico ed elaborati utilizzando il software "Vmax C; Sensormedics, Yorba Linda, CA". Il consumo massimo di ossigeno ($VO_2\text{max}$) o di picco è stato calcolato dalla media degli ultimi 20 secondi dell'esercizio. In tutti i pazienti è stato eseguito un test massimale interrotto per esaurimento fisico. $VO_2\text{max}$ ed il consumo di ossigeno alla soglia anaerobica sono stati espressi in valore assoluto, normalizzati per il peso e in percentuale rispetto ai valori predetti in base alla formula di Wasserman et al.⁴⁵ La soglia anaerobica è stata calcolata utilizzando il metodo V-Slope e confrontata con i valori ottenuti dai grafici $VE/VO_2 - VE/VCO_2$ (rapporto tra ventilazione e consumo di ossigeno e tra ventilazione e produzione di anidride carbonica) e $PetO_2 - PetCO_2$ (concentrazione di O_2 e CO_2 a fine espirazione) da due operatori esperti diversi.

Al picco dell'esercizio sono stati calcolati il polso di ossigeno (consumo di ossigeno normalizzato per la frequenza cardiaca) e il quoziente respiratorio (rapporto tra CO_2 e O_2). Infine sono stati calcolati le pendenze delle curve VO_2/Work e VE/VCO_2 , quest'ultima escludendo la porzione finale non lineare della curva.

Attività fisica. L'attività si è svolta in palestra con l'ausilio di cicloergometri specifici (Technogym e Atala). La frequenza settimanale è stata di 3 volte (giorni dispari), con una durata totale che è andata incrementandosi da 45 minuti nelle prime settimane a 90 minuti al termine delle 12 settimane di allenamento. Il programma si è sviluppato con prudenza ed è proseguito gradualmente dopo la valutazione iniziale del soggetto. Ogni seduta prevedeva una prima fase di riscaldamento cui seguiva la fase centrale di lavoro aerobico e una fase

finale di defaticamento, seguita dallo *stretching* (allungamento muscolare) sui grandi gruppi muscolari. Il protocollo di lavoro è stato suddiviso in 2 fasi, applicate in diversi momenti all'interno del protocollo stesso. Esse si articolano in maniera tale da cominciare con delle attività che determinino un condizionamento e un adattamento muscolare del soggetto (fase 1) (specie chi è da lungo tempo sedentario) sino ad arrivare alle attività aerobiche e di *cardiofitness* (fase 2). Con l'attività cardiovascolare-aerobica comincia la fase centrale del protocollo di lavoro. È caratterizzata da un lavoro continuo dei grandi gruppi muscolari per almeno 30 minuti a ritmo medio-sostenuto (equivalente al 60-75% della frequenza cardiaca massima data dalla prova da sforzo) prevalentemente sotto soglia aerobica. Si è svolta con l'ausilio degli attrezzi *cardio-fitness* metabolico, dotate di cardiofrequenzimetro, poiché è importante monitorare in maniera costante la frequenza cardiaca del soggetto. Da sottolineare la raccomandazione di non far passare più di 48 ore tra un allenamento e quello successivo. L'attività è stata svolta nella palestra del Policlinico Universitario del Reparto di Cardiologia, dotata di 4 macchinari *cardiofitness*, cardiofrequenzimetri con trasmettitore a fascia toracica e ricevitore di frequenza su polso, cicloergometri Technogym e Atala, tappetini per effettuare lavoro a terra (esercizi per i muscoli addominali e *stretching*), nonché la fase di rilassamento e di ginnastica respiratoria.

Valutazione della qualità della vita (Short-form 36).

Le misure di qualità di vita relativa alla salute vengono sempre più utilizzate sia nella pratica clinica sia in ambito di ricerca. È stato utilizzato lo *Short-Form-36* (SF-36), un questionario sullo stato di salute del paziente che è caratterizzato dalla brevità (mediamente il soggetto impiega non più di 10 minuti per la sua compilazione) e dalla precisione (lo

strumento è validato e riproducibile). È stato sviluppato a partire dagli anni '80 negli Stati Uniti d'America come questionario generico, multi-dimensionale, articolato attraverso 36 domande che permettono di assemblare 8 differenti scale. Le 36 domande si riferiscono concettualmente a 8 domini di salute: attività fisica (AF, 10 domande), limitazioni di ruolo dovute alla salute fisica (RP, 4 domande) e allo stato emotivo (RE, 3 domande), dolore fisico (BP, 2 domande), percezione dello stato di salute generale (GH, 5 domande), vitalità (VT, 4 domande), attività sociali (SF, 2 domande), salute mentale (MH, 5 domande) e una singola domanda sul cambiamento nello stato di salute. Il questionario SF-36 può essere auto-compilato oppure essere oggetto di un'intervista sia telefonica sia faccia a faccia. Tutte le domande, tranne una, si riferiscono a un periodo di 4 settimane precedenti la compilazione del questionario. La validità delle 8 scale dell'SF-36 è stata largamente studiata in gruppi noti di pazienti. Gli studi di validazione hanno inoltre dimostrato che l'SF-36 ha capacità discriminanti nei confronti di popolazioni con problemi psichiatrici o problemi fisici e di discriminare tra gruppi di popolazioni con condizioni mediche severe da gruppi di popolazioni moderatamente malate o sane.

Analisi statistica. I risultati dello studio sono riportati come medie e deviazione standard. Le differenze tra i dati ottenuti in condizioni basali e dopo trattamento sono state valutate utilizzando il test di Student a due code per dati appaiati (o test di Wilcoxon per ranghi se necessario). Il test del X^2 è stato utilizzato per valutare le differenze tra le due popolazioni. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Le caratteristiche delle due popolazioni sono rappresentate nella tabella 1.

All'arruolamento, tutti i soggetti mostravano in media un ridotto VO_2 di picco (67% dei valori teorici di una popolazione sana di confronto). L'indice di massa corporea era significativamente ridotto sia nel gruppo Met+Ex ($31,5 \pm 3,9$ vs $29,5 \pm 3,9$; $p < 0,05$) sia nel gruppo MET ($30,1 \pm 5,1$ vs $28,2 \pm 5,1$; $p < 0,05$; fig. 1). CPET ha mostrato una significativa riduzione nel VO_2 di picco ($1,71 \pm 0,27$ l/min. vs $1,57 \pm 0,41$ l/min.; $p < 0,05$) nel gruppo MET e un significativo incremento nel gruppo Met+Ex ($1,46 \pm 0,48$ l/min. vs $1,62 \pm 0,43$ l/min.; $p < 0,05$, fig. 2), con una significativa differenza tra i 2 gruppi (ΔVO_2 $-0,9 \pm 0,17$ l/min. vs $0,21 \pm 0,22$ l/min.; $p < 0,05$). Conformemente abbiamo evidenziato una riduzione non significativa del carico effettuato nel gruppo MET ($115,5 \pm 31,3$ vs $112,1 \pm 29,4$; $p = \text{ns}$) in contrapposizione con un incremento significativo del carico effettuato nel gruppo Met+Ex ($101,8 \pm 32,8$ vs $118,6 \pm 35,3$; $p < 0,05$) con una significativa differenza tra i 2 gruppi (ΔWork : $-4,5 \pm 0,1$ W vs $23 \pm 0,3$ W; $p < 0,05$). Il questionario SF-36 ha evidenziato un significativo incremento del PSC, *Physical Summary Component*, cioè la sommatoria delle componenti fisiche del questionario ($56,66 \pm 19,09$ vs $75,77 \pm 14,91$ $p < 0,001$) e del MSC, *Mental Summary Component*, cioè la sommatoria delle componenti mentali ($58,77 \pm 19,11$ vs $73,22 \pm 17,63$ $p < 0,01$) soltanto nel gruppo Met+Ex, senza variazioni significative nel gruppo MET (tabella 3; figura 3).

Discussione

I risultati mostrano che l'aggiunta di un programma sorvegliato e controllato di allenamento fisico in soggetti con insulino-resistenza è cruciale nel far regredire gli effetti negativi della MET sul consumo di O₂, consentendo così anche di incrementare la *compliance* alla terapia. I benefici aggiuntivi di accrescere la tolleranza allo sforzo e di migliorare la qualità di vita permettono di affermare che l'allenamento sorvegliato e controllato è una componente efficace e affidabile nei trattamenti di una popolazione insulino-resistente.

L'insulino-resistenza precede l'insorgenza del diabete mellito tipo 2 di alcune decadi e attraverso l'esercizio possiamo migliorare la sensibilità all'insulina. I risultati del Diabetes Prevention Program (DPP) e altri studi analoghi hanno dimostrato che le modificazioni dello stile di vita come una adeguata dieta e l'incremento dell'attività fisica svolgono un ruolo determinante nella prevenzione e nel rallentamento della transizione dallo stato di insulino-resistenza al diabete franco.^{46,47,48} In seguito a tali evidenze, è stato prodotto un grande sforzo per migliorare l'aderenza alle indicazioni di terapia fisica e comportamentale da parte dei soggetti a rischio.^{49,50,51} Il DPP ha, inoltre, dimostrato che la metformina, un biguanide comunemente prescritto ai pazienti diabetici, ha la capacità di determinare un significativo rallentamento o addirittura una mancata progressione della condizione di IGT verso quella di diabete.^{46,47} Attualmente la metformina è uno dei farmaci più comunemente prescritti nei pazienti con diabete conclamato. Inoltre, un vasto interesse si è di recente indirizzato al suo possibile utilizzo nei pazienti a rischio metabolico glucidico al fine di prevenirne la transizione verso il diabete.^{54,55,56}

Per contro la metformina presenta lo svantaggio di ridurre il consumo di ossigeno in una popolazione di individui non insulino-resistenti rispetto a un gruppo di controllo trattato con placebo.⁵⁷ Studi in vitro hanno dimostrato che la metformina ha un'azione inibitoria nei confronti del *complesso I* del sistema di trasporto mitocondriale (trasferimento di elettroni dal NADH al coenzima Q10).^{58,59,60,61,62} L'inibizione di tale complesso può rallentare il trasferimento di equivalenti riducenti durante il ciclo di Krebs e, potenzialmente, limitare le capacità del metabolismo ossidativo. Nei grandi gruppi muscolari esiste la possibilità di usufruire di una certa riserva mitocondriale durante l'esercizio ma, se l'inibizione del *complesso I* compromette tale riserva, si avrà un decremento della *performance* cardiopolmonare. Nella prima parte del nostro studio abbiamo dimostrato come il trattamento con metformina determini, seppur lievemente, un peggioramento della capacità di esercizio; dato che la metformina, sempre secondo i dati della prima parte del nostro studio, determina un miglioramento sia della funzione miocardica, sia della riserva di flusso endoteliale e manifesta effetti negativi a livello del muscolo scheletrico, possiamo affermare come corollario che il "punto debole" di tale farmaco si realizzi a livello periferico, attraverso i meccanismi a livello mitocondriale sopra citati. Pertanto scopo del nostro studio è stato quello di valutare se il trattamento a breve termine con attività fisica sorvegliata in aggiunta alla metformina permettesse di ovviare all'effetto negativo periferico di tale farmaco in una popolazione insulino-resistente e non diabetica, tenendo come confronto un gruppo trattato con la sola metformina.

Si ritiene che l'attività fisica incrementi la sensibilità all'insulina di circa un 40%, mentre il miglioramento dato dalla metformina è dell'ordine del 20%; l'esercizio presenta i vantaggi

addizionali di migliorare la *performance* cardiovascolare e respiratoria, evitando possibili effetti collaterali di una terapia farmacologica a lungo termine.

I dati del presente studio dimostrano, ancora una volta, che in pazienti insulino-resistenti la terapia con la sola metformina non migliora il consumo di ossigeno, ma anzi ne determina una lieve riduzione. Per contro, un programma di attività fisica sorvegliato e controllato, in aggiunta a un trattamento *standard* con metformina permette di ottenere un miglioramento dei parametri più significativi cardiopolmonari dopo soli 3 mesi.

Ai dati oggettivi dei miglioramenti strumentali si sono aggiunti i dati soggettivi di una percezione di una migliore qualità di vita, valutata mediante il questionario SF-36.

Conclusioni

Il presente studio evidenzia per la prima volta come, in una popolazione con alterato metabolismo glucidico e insulino-resistenza, la terapia combinata di attività fisica e metformina, oltre alla efficacia dimostrata nel prevenire l'evoluzione verso un diabete conclamato, sia in grado di migliorare la capacità fisica. L'attività fisica pertanto consente di eliminare gli svantaggi che un trattamento con la sola metformina determina nei confronti della prestazione cardiopolmonare. Tale risultato positivo si è anche accompagnato ad un miglioramento della qualità di vita valutato tramite questionario SF-36.

Tabella 1. Caratteristiche basali

	MET + EX	MET
Età (anni \pm DS)	44 \pm 18	45 \pm 14
Peso (Kg \pm DS)	85 \pm 16	82 \pm 15
BMI (Kg/m ² \pm DS)	28 \pm 9,8	31 \pm 6,8
Ipertensione	15%	28%
Colesterolo Totale (mg/dl \pm DS)	214 \pm 40	216 \pm 30
HDL (mg/dl \pm DS)	59 \pm 10	54 \pm 9
LDL (mg/dl \pm DS)	133 \pm 20	125 \pm 25
Trigliceridi (mg/dl \pm DS)	108 \pm 57	150 \pm 32
Glicemia Basale (mg/dl \pm DS)	111 \pm 11	112 \pm 16
OGTT 120 min (mg/dl \pm DS)	107 \pm 29	137 \pm 40
Metabolismo Glucidico		
NG	10%	14%
IFG	70%	71%
IGT	20%	28%
IGT+IFG	0%	28%
Diabete	0%	7%
Insulinemia	18 \pm 12	19 \pm 13
HOMA (<2,7)	4,8 \pm 2,8	5,1 \pm 3,6

Tabella 2. Parametri CPET

	Met	Met+Ex	P value
Δ VO ₂ max	0,19 ± 0,3	-0,01 ± 0,14	<0,05
Δ % VO ₂ max	8,0 ± 16,1	-2,1 ± 6,8	<0,05
Δ Work	23,0 ± 22,2	-2,1 ± 6,8	<0,05
Δ % Work	17,9 ± 22,0	-3,5 ± 11,7	<0,05
Δ AT	0,03 ± 0,2	-0,8 ± 0,22	Ns
Δ VO ₂ Pulse	0,97 ± 0,7	0,25 ± 4,3	Ns
Δ VE max	2,9 ± 9,7	-3,1 ± 15	<0,05
Δ Pet O ₂	-3,65 ± 5,8	12,98 ± 4,2	Ns
Δ RQ peak	-0,02 ± 0,1	-0,1 ± 0,4	Ns
Δ VO ₂ /Work	-0,06 ± 1,8	-1,22 ± 4,1	Ns
Δ VE/VO ₂	-4,7 ± 8,2	-5,36 ± 10,0	Ns

Figura 1. Caratteristiche: Peso e Indice di Massa Corporea (BMI)

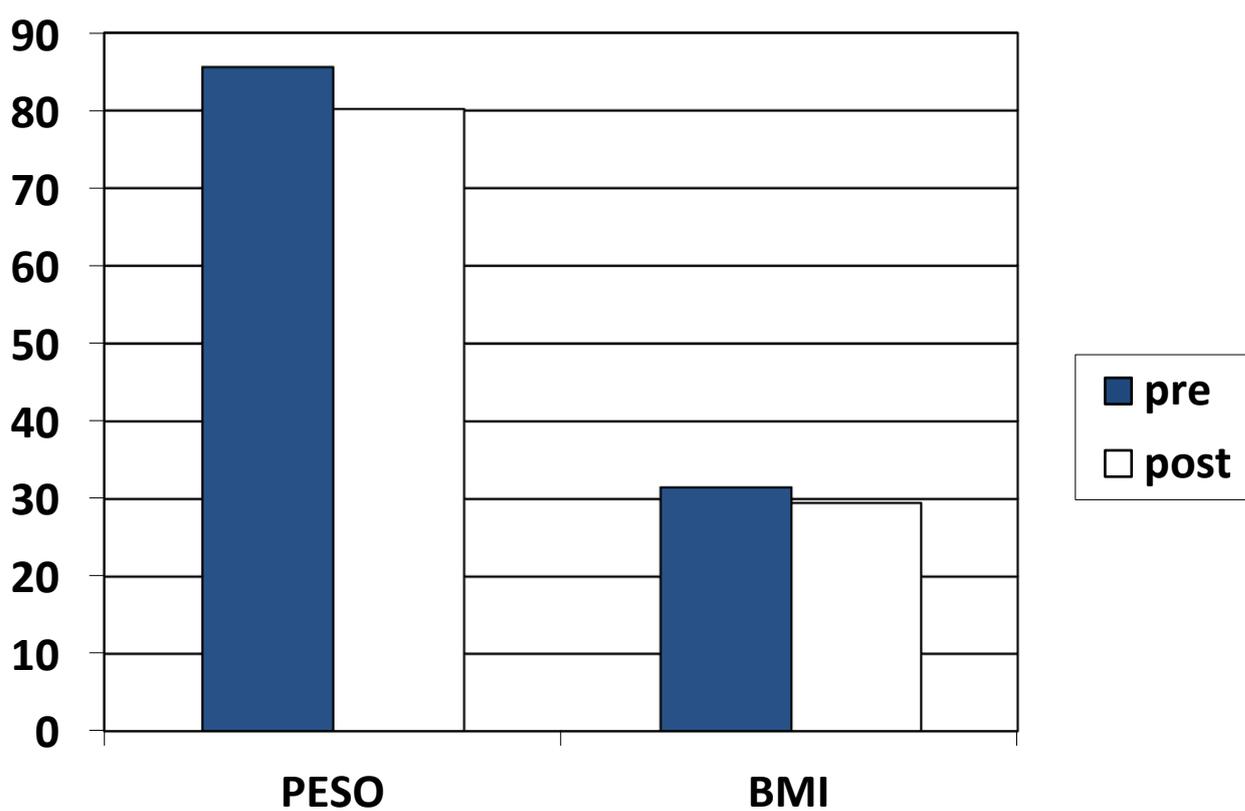


Figura 2 Parametri della Prova da Sforzo Cardiopolmonare

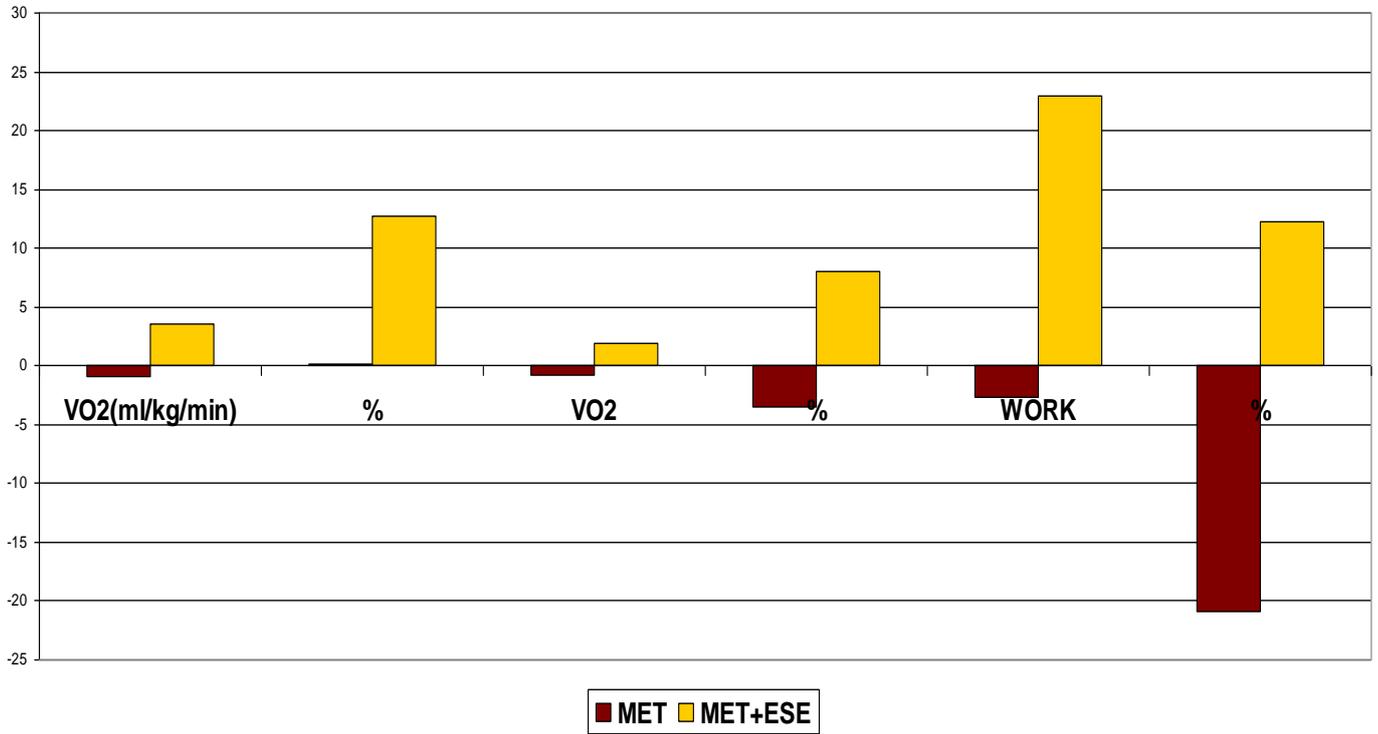


Tabella 3. Questionario Short-Form 36

ITEM	PRE-TRAINING	POST-TRAINING	P
ATTIVITÀ FISICA	68	85	p< 0,01**
LIMITAZIONI RUOLO FISICO	68	85	p< 0,01**
DOLORE FISICO	55	82	p< 0,01**
PERCEZIONE DELLO STATO DI SALUTE GENERALE	60	69	p< 0,05*
VITALITÀ	51	62	p< 0,01**
ATTIVITÀ SOCIALI	58	79	p< 0,005****
LIMITAZIONI RUOLO EMOTIVO	59	85	p< 0,01**
SALUTE MENTALE	65	74	p< 0,01**
INDICE BENESSERE FISICO	57	76	p<0,001****
INDICE BENESSERE MENTALE	59	73	p<0,01**

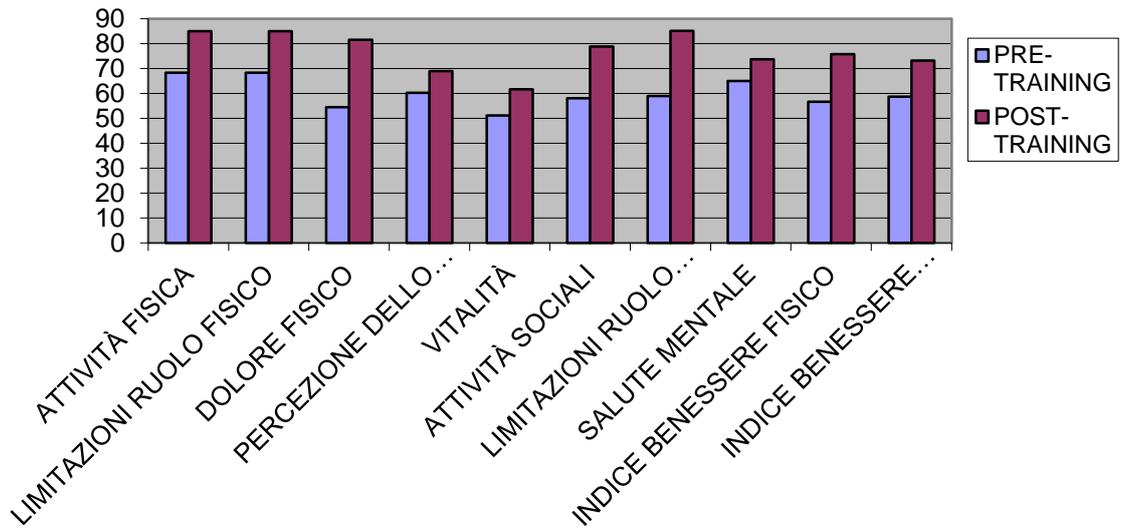


Figura 3. Qualità di vita mediante SF-36

Bibliografia

- ¹ Rapporti fra insulino-resistenza, diabete mellito tipo 2 e malattie cardiovascolari. Società Italiana di Diabetologia. Documento del Gruppo di Studio SID su “Insulino-resistenza” (GISIR). *Il Diabete* 1998
- ² Muggeo M, Bonadonna R. La diagnosi di Diabete. *Annali sanità pubblica*. 2002
- ³ Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Meigs JB, Bonadonna RC, Muggeo M. Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in white individuals: the Bruneck study. *Diabetes* 2004 Jul;53(7):1782-9.
- ⁴ Wyne KL. Free fatty acids and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 2003;115(Suppl 8A):29S-36S.
- ⁵ Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996;97:2859–65.
- ⁶ Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 2001;108:1341–8.
- ⁷ Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96:939–49.
- ⁸ Acosta AM, Escalona M, Maiz A, Pollak F, Leighton F. O. Determinacion del indice de resistencia insulinica mediante HOMA en una poblacion de la Region metropolitana de Chile. *REV MED CHILE* 2002;130(11):1227-1231.

-
- ⁹ Matthews DR, Hosker JP. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9
- ¹⁰ Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-age men. *JAMA* 2002;288:2709-16.
- ¹¹ Hone J, Accilli D, Al-Gazali LI, Lestringant G, Orban T, Taylor SI. Homozygosity for a new mutation (Ile 119→Met) in the insulin receptor gene in 5 sibs with familial insulin resistance. *J Med Genet* 1994;31:715-6.
- ¹² Muller-Wieland D, Taub R, Tewari DS, Kriauciunas KM, Sethu S, Reddy K, Kahn CR. Insulin-receptor gene and its expression in patients with insulin resistance. *Diabetes* 1989;38:31-8.
- ¹³ Selby JV, Newman B, Quiroga J, Christian JC, Austin MA, Fabsitz RR. Concordance for dyslipidemic hypertension in male twins. *JAMA* 1991;265:2079–84.
- ¹⁴ Bouchard C. Genetics and the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19(Suppl 1):S52–9.
- ¹⁵ Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–97.
- ¹⁶ World Health Organization. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO 1999.

¹⁷ Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/National heart, Lung and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005;112:e285-90.

¹⁸ Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-62.

¹⁹ Fang ZY, Yuda S, Anderson V, Short L, Case C, Marwick TH. Echocardiographic detection of early diabetic myocardial disease. *JACC* 2003;41:611-7.

²⁰ Vinereanu D, Nicolaides E, Tweddel AC, Mädler CF, Holst B, Boden LE, Cinteza M, Rees AE, Fraser AG. Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic patients with type II diabetes mellitus, related to serum lipids and glycated haemoglobin. *Clinical Science* 2003;105:591-9.

²¹ Galderisi M, De Simone G, Innelli P, Turco A, Turco S, Capaldo B, Riccardi G, de Divitiis O. Impaired inotropic response in type 2 diabetes mellitus: a strain rate imaging study. *Am J Hypertension* 2007;20:548-55.

²² Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001;108:437-46.

²³ Ilercil A, Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Howard BV. Associations of insulin levels with left ventricular structure and function in American Indians: the Strong Heart Study. *Diabetes* 2002;51:1543-7.

-
- ²⁴ Piano D, Cadeddu C, Deidda M, Piras A, Binaghi G, Cossu E, Manconi E, Mercurio G. Riduzione della riserva contrattile nei soggetti con sindrome metabolica. Confronto con diabetici tipo 2 ed individui sani. *G Ital Cardiol* 2008;9:Suppl.1-12:C296
- ²⁵ An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1489–506.
- ²⁶ Witteles RM. Insulin-resistant cardiomyopathy. Clinical evidence, mechanisms and treatment options. *JACC* 2008;51:93-102.
- ²⁷ Cooke JP. The endothelium: a new target for therapy. *Vasc Med* 2000;5:49-53.
- ²⁸ Vincent MA, Barrett EJ, Lindner JR, Clark MG, Rattigan S. Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E123-9.
- ²⁹ Baron AD, Zhu JS, Marshall S, Irsula O, Brechtel G, Keech C. Insulin Resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats. *Am J Physiol* 1995;269:E709-15.
- ³⁰ Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-75.
- ³¹ Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-59.

-
- ³² Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, Hoyer MM, Haller H, Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004;109:172-77.
- ³³ Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-42.
- ³⁴ Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13176-81.
- ³⁵ Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1997;46(Suppl 2):S9-13.
- ³⁶ Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes* 1992;41:1076-83.
- ³⁷ Miles PD, Levisetti M, Reichart D, Khoursheed M, Moossa AR, Olefsky JM. Kinetics of insulin action in vivo. Identification of rate-limiting steps. *Diabetes* 1995;44:947-53.
- ³⁸ Lau AC, Lo MK, Leung GT, Choi FP, Yam LY, Wasserman K. Altered exercise gas exchange as related to microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Chest* 2004 Apr;125(4):1292-8.
- ³⁹ Regensteiner JG, Bauer TA, Reusch JE, Quaife RA, Chen MY, Smith SC, Miller TM, Groves BM, Wolfel EE. Cardiac dysfunction during exercise in uncomplicated type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc* 2009 May;41(5):977-84.

-
- ⁴⁰ Nyholm B, Nielsen MF, Kristensen K, Nielsen S, Østergård T, Pedersen SB, Christiansen T, Richelsen B, Jensen MD, Schmitz O. Evidence of increased visceral obesity and reduced physical fitness in healthy insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Eur J Endocrinol*. 2004 Feb;150(2):207-14.
- ⁴¹ Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, De Simone B, Manguso F, Savastano S, Russo T, Tolino A, Zullo F, Lombardi G, Azziz R, Colao A. Improvement in endothelial structure and function after metformin treatment in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome: results of a 6-month study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Nov;90(11):6072-6. Epub 2005 Aug 23.
- ⁴² Ingelsson E, Sundstrom J, Arnlov J, Zethelius B, Lind L. Insulin resistance and risk of congestive heart failure. *JAMA* 2005;294:334-41.
- ⁴³ Dorup I, Levitt G, Sullivan I, Sorensen K. Prospective longitudinal assessment of late anthracycline cardiotoxicity after childhood cancer: the role of diastolic function. *Heart* 2004;90(10):1214-16.
- ⁴⁴ Bu'Lock FA, Mott MG, Oakhill A, Martin RP. Left ventricular diastolic function after anthracycline chemotherapy in childhood: relation with systolic function, symptoms, and pathophysiology. *Br Heart J* 1995;73:340-50.
- ⁴⁵ Wassermann K, Hansen JE, Sue DY, Whipp BJ 1987 Normal values. In: Wassermann K, Hansen JE, Sue DY, Whipp BJ, eds. *Principles of exercise testing and interpretation*. Philadelphia: Lea, Febiger; 72-85.
- ⁴⁶ Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New Engl J Med* 2002;346(6):393-403.

⁴⁷ Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, Fowler S; Diabetes Prevention Program Research Group. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 2005;142:611-619.

⁴⁸ Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *New Engl J Med* 2001;344(18):1343-50

⁴⁹ Bethel MA, Califf RM. Role of lifestyle and oral anti-diabetic agents to prevent type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2007;99(5):726-31.

⁵⁰ Dasgupta K, Grover SA, Da Costa D, Lowensteyn I, Yale JF, Rahme E. Impact of modified glucose target and exercise interventions on vascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;72(1):53-60. Epub 2005 Oct 26

⁵¹ Hamman RF, Wing RR, Edelstein SL, Lachin JM, Bray GA, Delahanty L, Hoskin M, Kriska AM, Mayer-Davis EJ, Pi-Sunyer X, Regensteiner J, Venditti B, Wylie-Rosett J. Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(9):2102-7.

⁵² Kriska AM, Edelstein SL, Hamman RF, Otto A, Bray GA, Mayer-Davis EJ, Wing RR, Horton ES, Haffner SM, Regensteiner JG. Physical activity in individuals at risk for diabetes: Diabetes Prevention Program. *Med Sci Sports Exerc.* 2006;38(5):826-32.

⁵³ Manson JE, Spelsberg A. Primary prevention of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Am J Prev Med* 1994;(3):172-84.

-
- ⁵⁴ Anderson DC, Jr. Pharmacologic prevention or delay of type 2 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother.* 2005;39(1):102-9.
- ⁵⁵ Lusignan S, Sismanidis C, Carey IM, DeWilde S, Richards N, Cook DG. Trends in the prevalence and management of diagnosed type 2 diabetes. *BMC Fam Pract.* 2005 Mar 22;6(1):13.
- ⁵⁶ Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Häring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6):585-618.
- ⁵⁷ Johnson ST, Robert C, Bell GJ, Bell RC, Lewanczuk RZ, Boulé NG. Acute effect of metformin on exercise capacity in active males. *Diabetes Obes Metab.* 2008 Sep;10(9):747-54. Epub 2007 Oct 26.
- ⁵⁸ Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve XM. The ROS production induced by a reverse electron flux at respirator-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr.* 2006 Feb;38(1):33-42.
- ⁵⁹ El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylguanide inhibits cell respiration via indirect effect targeted on the respiratory chain complex. *J Biol Chem.* 2000 Jan 7;275(1):223-8.
- ⁶⁰ Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, Leverve X. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J.* 2004 Sep 15;382(Pt 3):877-84.
- ⁶¹ Leverve XM, Guigas B, Detaille D, Batandier C, Koceir EA, Chauvin C, Fontaine E, Wiernsperger NF. Mitochondrial metabolism and type 2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes Metab.* 2003 Sep;29(4 Pt 2):6S88-94.

⁶² Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its antidiabetic effect through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000 Jun 15;348 Pt 3:607-14.

⁶³ Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 2002;346:793–80.

⁶⁴ Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*. 2006;116:1071-80.

⁶⁵ Vitale C, Mercurio G, Cornoldi A, Fini M, Volterrani M, Rosano GM. Metformin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *J Intern Med*. 2005; 258(3):250-6

⁶⁶ Masugata H, Senda S, Goda F, Yoshihara Y, Yoshikawa K, Fujita N, Daikuhara H, Nakamura H, Taoka T, Kohno M. Left ventricular diastolic dysfunction as assessed by echocardiography in metabolic syndrome. *Hypertens Res* 2006;29:897-903.

⁶⁷ de las Fuentes L, Brown AL, Mathews SJ, Waggoner AD, Soto PF, Gropler RJ, Dávila-Román VG. Metabolic syndrome is associated with abnormal left ventricular diastolic function independent of ventricular mass. *European Heart Journal* 2007;28:553-9.

⁶⁸ Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Fang ZY, Haluska B, Leano R, Marwick TH. Myocardial and vascular dysfunction and exercise capacity in the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2005;96:1686-91

-
- ⁶⁹ Baron AD, Brechtel G, Wallace P, Edelman SV. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1988;255: E769–E774.
- ⁷⁰ Holloszy JO, Hansen PA. Regulation of glucose transport into skeletal muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1996;128:99-193.
- ⁷¹ Neshler R, Karl IE, Kipnis DM. Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol*. 1985 Sep;249(3 Pt 1):C226-32.
- ⁷² Azevedo JL Jr, Carey JO, Pories WJ, Morris PG, Dohm GL. Hypoxia stimulates glucose transport in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes*. 1995 Jun;44(6):695-8.
- ⁷³ Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1997 Jan;82(1):359-63.
- ⁷⁴ Taguchi T, Kishikawa H, Motoshima H, Sakai K, Nishiyama T, Yoshizato K, Shirakami A, Toyonaga T, Shirontani T, Araki E, Shichiri M. Involvement of bradykinin in acute exercise-induced increase of glucose uptake and GLUT-4 translocation in skeletal muscle: studies in normal and diabetic humans and rats. *Metabolism*. 2000 Jul;49(7):920-30.
- ⁷⁵ Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*. 1999 Aug;48(8):1667-71.

⁷⁶ Zierath JR, He L, Gumà A, Odegaard Wahlström E, Klip A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996 Oct;39(10):1180-9.

⁷⁷ Henriksen EJ, Halseth AE. Early alterations in soleus GLUT-4, glucose transport, and glycogen in voluntary running rats. *J Appl Physiol*. 1994 May;76(5):1862-7.

⁷⁸ Brozinick JT Jr, Etgen GJ Jr, Yaspelkis BB 3rd, Kang HY, Ivy JL. Effects of exercise training on muscle GLUT-4 protein content and translocation in obese Zucker rats. *Am J Physiol*. 1993 Sep;265(3 Pt 1):E419-27.

⁷⁹ Richter EA, Garetto LP, Goodman MN, Ruderman NB. Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. *J Clin Invest* 1982;69(4):785-93.

⁸⁰ Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1967;242(9):2278-82.

⁸¹ Oshel KM, Knight JB, Cao KT, Thai MV, Olson AL. Identification of a 30-base pair regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2000 Aug 4;275(31):23666-73.

⁸² Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G and Gerich, JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;333:550–554.

⁸³ Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:2063–2069.

⁸⁴ Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999;277:E1–E10.

⁸⁵ Owen MR, Doran E, Halestrap AP. *Biochem J.* 2000 Jun 15;348 Pt 3:607-14. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain.

⁸⁶ Myers JN. *Essentials of Cardiopulmonary Exercise Testing.* Champaign, Ill: Human Kinetics; 1996.

⁸⁷ Miyamura M, Honda Y. Oxygen intake and cardiac output during maximal treadmill and bicycle exercise. *J Appl Physiol.* 1972;32:185–188.

⁸⁸ Wasserman K, Beaver WL, Whipp BJ. Gas exchange theory and the lactic acidosis (anaerobic) threshold. *Circulation.* 1990;81(suppl):II- 14–II-30.

⁸⁹ Santos EL, Giannella-Neto A. Comparison of computerized methods for detecting the ventilatory thresholds. *Eur J Appl Physiol.* 2004;93:315– 24.

⁹⁰ Mezzani A, Corra U, Bosimini E, Giordano A, Giannuzzi P. Contribution of peak respiratory exchange ratio to peak $\dot{V}O_2$ prognostic reliability in patients with chronic heart failure and severely reduced exercise capacity. *Am Heart J.* 2003;145:1102–1107.

⁹¹ Kadoglou NP, Iliadis F, Liapis CD, Perrea D, Angelopoulou N, Alevizos M. Beneficial effects of combined treatment with rosiglitazone and exercise on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007 Sep;30(9):2242-4.