

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**XIX CICLO DI DOTTORATO IN FISIOPATOLOGIA
SPERIMENTALE**

TESI DI DOTTORATO

***CARATTERIZZAZIONE CLINICA, METABOLICA E
INFIAMMATORIA DI UNA POPOLAZIONE DI CORONAROPATICI
SENZA APPARENTI DISTURBI DEL METABOLISMO GLICIDICO.
STUDIO MIDIAB***

RELATORE
Prof. RENATO LAURO

DOTTORANDO
STEFANO RIZZA

I N D I C E

1.	Introduzione.....	pag. 4
2.	Metodi.....	pag. 8
2.1	Soggetti.....	pag. 8
2.2	Metodi di laboratorio.....	pag. 8
2.3	Angiografia e MSTC coronarica.....	pag. 10
2.4	Modulazione della disfunzione del tessuto adiposo.....	pag. 10
2.5	Valutazione del metabolismo glucidico.....	pag. 11
2.6	Valutazione della funzione endoteliale.....	pag. 11
2.5	Analisi statistiche.....	pag. 12
3.1	Risultati.....	pag. 14
3.1	Analisi del metabolismo glucidico e dello stato infiammatorio dei pazienti coronaropatici con pregresso IMA e senza disturbi metabolici conosciuti.....	pag. 14
3.2	Effetti dell'attivazione del recettore PPRA-gamma sull'insulino resistenza e sulla funzione endoteliale nei soggetti affetti da IGT	pag. 23
4.	Discussione.....	pag. 26
5.	Bibliografia.....	pag. 32

E L E N C O D E L L E T A B E L L E

1.	Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione dello studio..	pag. 14
2.	Analisi di regressione con metodica automatica stepwise con glicemia a 2 ore come variabile dipendente.....	pag. 21
3.	Regressione lineare multivariata con AUC come variabile dipendente e IGI, età, sesso, vita e Indice di Matsuda come variabili esplicative.....	pag. 22

E L E N C O D E L L E F I G U R E

1.	Prevalenza degli stati di intolleranza glicidica non Diagnosticati.....	pag. 16
2.	Correlazione della 2hG con glicemia a digiuno,	

	Insulinemia a digiuno, HbA1c e Quicki.....	pag. 18
3.	Correlazione della 2hG con TNF- α e Adiponectina.....	pag. 19
4.	Correlazione tra il grado di severità della coronaropatia e la classe di intolleranza glucidica.....	pag. 23
5.	Effetto del trattamento con Pioglitazone (30 mg/dì) per 12 settimane su 13 soggetti CAD/IGT sulla sensibilità insulinica, la funzione endoteliale e i parametri biochimici.....	pag. 24
6.	Effetto del trattamento con Pioglitazone (30 mg/dì) per 12 settimane su 13 soggetti CAD/IGT sulle isoforme di Adiponectina (HMW, MMW e LMW).....	pag. 25

1. Introduzione

Il Diabete (DM) costituisce il fattore di rischio principale per morbilità e mortalità cardiovascolare ¹. Attualmente ne sono affetti circa 160 milioni di soggetti nel mondo. La prevalenza del DM in tutti i paesi industrializzati è tuttora molto elevata, tuttavia nel prossimo futuro la maggior parte dei soggetti affetti da DM risiederà nei paesi in via di sviluppo, dove il tasso di crescita della malattia è maggiore che nei paesi sviluppati. Le proiezioni globali di incidenza della malattia prevedono la triplicazione dei casi di DM dal 1994 al 2010. Per l'Europa occidentale è stato previsto un aumento dei casi di DM del 27.5 % dal 1994 al 2000 e del 54.9 % dal 1994 al 2010 ².

La malattia coronarica (CAD) è la causa di decesso di più del 60% dei soggetti affetti da DM, ed è almeno due volte più frequente nei diabetici rispetto ai non diabetici ³. Inoltre la malattia diabetica predispone ad un maggior numero di interventi di rivascolarizzazione miocardica e di eventi cardiovascolari maggiori ^{4,5}. Per tale motivo nei pazienti diabetici è fondamentale un meticoloso controllo metabolico, poiché tale approccio senza alcun dubbio è in grado di diminuire l'incidenza di cardiopatia ischemica e nel caso di sua presenza, ne migliora la prognosi. In tal senso, lo studio DIGAMI (Diabetes and Insulin-Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) ha riportato una diminuzione relativa del 30% della mortalità a 1 anno nei diabetici con infarto del miocardio che avevano ricevuto un'infusione di glucosio ed insulina per 24h, seguita da iniezioni sottocutanee di insulina 4 volte al giorno per 3 mesi, rispetto ai pazienti con terapia standard ⁶.

Lo studio DIGAMI 2 conferma che qualunque forma di trattamento si scelga durante la fase acuta e post-acuta della sindrome coronarica, migliore è lo stato del controllo metabolico migliore è la prognosi ⁷. Inoltre, la prognosi dell'infarto miocardico acuto, ma anche della forma cronica di cardiopatia ischemica, è peggiore nei diabetici rispetto ai non diabetici ¹. Per ogni fattore di rischio noto per la malattia cardiovascolare il tasso di mortalità nei pazienti diabetici è aumentato di molte volte rispetto ai soggetti non diabetici ⁸.

I pazienti che sono contemporaneamente affetti da DM e CAD sono a maggior rischio di mortalità rispetto a chi è affetto da una sola tra le due ^{2,9-11}. Alcuni lavori recenti hanno comunque evidenziato che il DM è spesso non diagnosticato e, conseguentemente non trattato, in soggetti con coronaropatia (studio GAMI). Il risultato fondamentale dello studio GAMI, cioè la mancata diagnosi di disturbi del metabolismo glucidico che spesso si verifica nei soggetti con pregresso infarto del miocardio, suggerisce chiaramente quanto sia importante un adeguato controllo glicometabolico nel contribuire alla sopravvivenza dopo un evento coronarico acuto ^{7,12,13}. I risultati di suddetto studio sono stati successivamente confermati e rafforzati da un recente lavoro Europeo che ha evidenziato come la condizione di alterato metabolismo del glucosio (IGM) sia comune a diverse tipologie di macroangiopatia aterosclerotica, e in particolare non solo in soggetti con sindrome coronarica acuta ma anche in coloro che sono affetti da una forma cronica di malattia ischemica cardiaca. Infatti l'IGM colpisce almeno il 60% dei soggetti con malattia cardiovascolare, se si considerano insieme i dati riguardanti pazienti con coronaropatia, cerebropatia vascolare, scompenso cardiaco, arteriopatia periferica, dislipidemia e insufficienza renale cronica. ¹⁴

Dato che sia il DM manifesto che la ridotta tolleranza glucidica vengono ormai riconosciuti come fattori di rischio indipendenti di

mortalità cardiovascolare ^{10,11}, l'identificazione di un disturbo del metabolismo glucidico in soggetti con coronaropatia potrebbe condurre alla identificazione di strategie preventive o approcci terapeutici specifici sia in condizioni di acuzie sia in condizioni di malattia cronica.

Pertanto la mancata diagnosi del diabete è certamente un punto cruciale nella caratterizzazione dei soggetti coronaropatici, e come tale è indispensabile verificarne la presenza in tutti i pazienti con malattia coronarica nota e senza storia di diabete.

In questo studio dimostriamo come una condizione di mancata diagnosi di IGM si associa a malattia coronarica severa, valutata attraverso il numero di vasi coronarici affetti da ateromasia stenosante. Inoltre, il campione di popolazione è stato fenotipizzato allo scopo di identificare i disturbi più precoci alla base dello sviluppo di questa forma precoce di DM nella nostra particolare popolazione; nonostante questi soggetti siano caratterizzati sia da una marcata insulino-resistenza sia da una ridotta insulino-secrezione, l'alterata insulino-sensibilità appare costituire il problema metabolico preponderante.

Inoltre abbiamo osservato che i pazienti affetti da IGM sono caratterizzati da un incremento dei livelli di TNF-alfa e da ipoadiponectinemia. Ciononostante, solo i bassi livelli circolanti di adiponectina, e in particolar modo i bassi livelli circolanti della isoforma ad alto peso molecolare dell'Adiponectina, si sono rilevati un predittore significativo dello status di IGM. Quindi, abbiamo interpretato la condizione caratterizzata da bassi livelli di adiponectina/alti livelli di TNF-alfa come un marker di disfunzione del tessuto adiposo. Per cui, partendo da questa ipotesi, in un sottogruppo di pazienti in cui era stata diagnosticata l'alterata tolleranza al glucosio, caratterizzata principalmente da insulino resistenza ma non influenzata da glucotossicità, abbiamo ipotizzato

che la modulazione della funzione del tessuto adiposo attraverso l'attivazione del recettore PPARgamma potesse migliorare sia l'insulino resistenza che la funzione endoteliale.

2. METODI

2.1 Soggetti

Sono stati studiati 601 pazienti con precedente diagnosi di infarto miocardico acuto. Dal nostro studio stati esclusi 370 pazienti che presentavano uno o più dei seguenti criteri di esclusione: diabete, infarto miocardico acuto negli ultimi tre mesi, scompenso cardiaco o frazione d'eiezione ventricolare inferiore al 40% e altre patologie croniche. I rimanenti 231 soggetti, di età media compresa tra i 42 e i 78 anni, sono stati inclusi nello studio e ciascun partecipante ha dato il proprio consenso informato. Lo studio è stato approvato dalla commissione etica locale e le ricerche sono state eseguite in accordo con i principi di Dichiarazione di Helsinki, come revisionato nel 2000.

Tutti i soggetti soddisfacevano i seguenti criteri di inclusione: storia di IMA nei 7 anni precedenti e mancanza di diagnosi di DM.

La diagnosi di infarto miocardico è stata definita in accordo con la Società di Cardiologia e con le linee guida dell'American Heart Association. Tutti i partecipanti erano sottoposti alla terapia medica cardiologica tipica del post-infarto composta da: aspirina, ace-inibitori o antagonisti recettoriali dell'angiotensina II, statine, beta-bloccanti e omega-3. Inoltre i pazienti sono stati sottoposti ad angiografia e/o TC coronarica.

I disturbi del metabolismo glucidico sono stati definiti secondo gli attuali criteri diagnostici dell'OMS.

2.2 Metodi di laboratorio

Durante il primo di giorno di ricovero in regime di Day Hospital sono stati raccolti i seguenti dati di ogni paziente: peso, altezza e circonferenza della vita. L'Indice di Massa Corporea (BMI) è stato calcolato con la formula: $\text{peso (Kg)}/\text{altezza}^2 \text{ (m}^2\text{)}$. La misurazione della pressione arteriosa è stata ottenuta con il paziente in posizione

seduta, dopo circa 5 minuti di riposo, con sfigmomanometro a mercurio, utilizzando la media di 3 misurazioni. Inoltre sono stati eseguiti prelievi ematici per il dosaggio di: emoglobina glicosilata, profilo lipidico, peptide C e IGF-1.

Molteplici aliquote di siero sono state conservate a -80 °C. I campioni sono stati congelati e scongelati una volta sola ed è stato eseguito il dosaggio dei seguenti markers infiammatori: proteina C reattiva (PCR) ad alta sensibilità, TNF-alfa e adiponectina.

Ciascun paziente è stato sottoposto al test da carico orale (75g) di glucosio (OGTT) ed in rapporto alla glicemia post-prandiale i soggetti sono stati distinti in tre gruppi: normale tolleranza al glucosio (NGT) per un valore di glicemia inferiore a 140 mg/dl; alterata tolleranza al glucosio (IGT) per glicemia compresa tra 140 e 199 mg/dl e diabete (DM) con glicemia superiore a 199 mg/dl.

L'IGF-1 plasmatica è stata determinata tramite IRMA (Immunotech, Marseille, France). I livelli sierici della PCR ad alta sensibilità sono stati ottenuti utilizzando la nefelometria (Dade-Behring, Liederbach, Germany). IL TNF-alfa sierico è stato valutato tramite ELISA (Bender MedSystem and Pierce Endogen), la stessa tecnica è stata utilizzata per il dosaggio dell'adiponectina sierica totale e le sue forme multimeriche (High Molecular Weight -HMW-, Mid-Molecular Weight -MMW-, e Low Molecular Weight -LMW-) (ALPCO Diagnostics).

La glicemia plasmatica è stata rilevata con test enzimatico in vitro (Roche, automated chemistry clinical analyzer) e l'insulina sierica attraverso elettrochemiluminescenza (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La sensibilità insulinica è stata stimata utilizzando il modello Omeostasi di insulino-resistenza (HOMA IR) $((\text{insulinemia a digiuno } \mu\text{U/ml} \times \text{glicemia a digiuno mmol/l})/22.5)$ e Quicki $(1/\text{LOG}_{10} \text{ insulinemia a digiuno } \mu\text{U/ml} + \text{LOG}_{10} \text{ glicemia a digiuno mg/dl})$ ¹⁵ e l'indice di Matsuda $(10000/\sqrt{\text{glicemia} \times \text{insulinemia} \times \text{media glicemie durante OGTT} \times \text{media insulinemie}})$

durante OGTT))¹⁶. Il tasso di secrezione insulinica è stato valutato tramite l'indice insulinogenico (IGI) ($\Delta I30/\Delta G30$)¹⁷

2.3 Angiografia ed MSTC coronarica

L'angiografia coronarica convenzionale è stata eseguita con Philips Integris 5000 equipment (Medical Philips System) e l'analisi coronarica quantitativa attraverso programma MPS, che utilizza la punta di catetere per la calibrazione.

L'MSCT è stata eseguita con scanner generale elettrico LightSpeed¹⁸. Dapprima veniva acquisita una scansione del torace senza contrasto in proiezione antero-posteriore. Successivamente i dati volume erano acquisiti con tecnica spirale con acquisizioni simultanee di 16 slices parallele con collimazione 16 x 0.625 mm. Dopo la somministrazione del mezzo di contrasto (Lopamiro 370) (145mL, 4 mL/s) in singola iniezione, veniva iniziata la scansione TC. L'elettrocardiogramma è stato eseguito e registrato in tutti i pazienti.

2.4 Modulazione della disfunzione del tessuto adiposo.

Tredici pazienti, provenienti dal gruppo di soggetti in cui era stata posta diagnosi di IGT, con età <65, sono stati arruolati ed invitati ad assumere Pioglitazone (30 mg/dì) per dodici settimane. Prima e dopo il trattamento con Pioglitazone tutti in tutti i soggetti è stata studiata la funzione endoteliale (giorno 1) e l'insulina sensibilità (giorno 2). Il primo giorno la dilatazione endotelio-dipendente e - indipendente è stata misurata mediante lo studio ecografico dell'arteria brachiale seguendo le comuni linee-guida internazionali così come precedentemente pubblicate¹⁹ e descritto nella sezione 2.6. Il secondo giorno è stata studiata la sensibilità insulinica mediante la tecnica del Clamp euglicemico iperinsulinemico, come precedentemente effettuato²⁰ e descritto nella sezione 2.5.

2.5 Valutazione metabolismo glucidico

Durante il primo giorno, dopo 12 ore di digiuno, è stata effettuata una curva da carico orale con 75gr di glucosio, e sono stati prelevati campioni ematici ai tempi 0, 30, 60, 90 e 120 minuti.

Il secondo giorno, dopo 12 ore di digiuno notturno, è stato effettuato il Clamp Euglicemico Iperinsulinemico. L'insulina (Humulin R – Eli-Lilly & Co. Indianapolis) è stata somministrata per via endovenosa ad una velocità tale da raggiungere nei primi 10 minuti una concentrazione plasmatica pari a circa 0,08 mU/ml; per la restante durata dello studio la velocità di infusione dell'insulina è stata mantenuta a 40 mU/m²*min. La glicemia per le 2 ore dello studio viene mantenuta a 90 mg/dl circa mediante l'infusione di soluzione glucosata al 20% a velocità che viene variata in base ai livelli di glicemia misurata ogni 5 minuti (il coefficiente di variazione medio della glicemia durante il test è stato sempre < del 4%). Il glucose disposal durante il clamp è stato calcolato come la quantità di glucosio infusa per kg di peso corporeo per minuto durante la seconda ora del test.

2.6 Valutazione della funzione endoteliale

La funzione di vasodilatazione endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente è stata valutata come segue. I soggetti sdraiati in posizione supina vengono lasciati a riposo per circa 10 minuti. L'arteria brachiale sinistra viene visualizzata dai 2 ai 15 cm dalla fossa antecubitale mediante ultrasuoni B-Mode ad alta risoluzione (ecografo ATL HDI 3000) con una sonda lineare da 7,5 MHz. Dopo aver ottenuto un'immagine iniziale e una valutazione del flusso, si applica un manicotto gonfiabile nella parte alta del braccio, che viene portato ad una pressione interna che supera di 50 mmHg la pressione sistolica del soggetto: tale pressione viene mantenuta per 5 minuti. Il flusso sanguigno viene misurato nei 15 secondi successivi al rilascio del manicotto e il diametro dell'arteria tra i 60 e i 90

secondi successivi alla deflazione del manicotto. La dilatazione endotelio-dipendente (Flow-mediated dilation: FMD) è calcolata come l'aumento del diametro post-stimolo rispetto al diametro basale (in percentuale). Dopo 15 minuti di riposo, sono state prese nuove immagini basali per il diametro dell'arteria e nuove misure del flusso ed è stata somministrata Nitroglicerina 0,4 mg sublinguale per valutare la risposta vasodilatatoria endotelio-indipendente. Il flusso sanguigno e le immagini sono state prese dopo 5 minuti dalla somministrazione della Nitroglicerina. La vasodilatazione endotelio-indipendente è stata calcolata come l'aumento del diametro post-stimolo rispetto al diametro basale (in percentuale). Il diametro dell'arteria è stato calcolato fra l'interfaccia anteriore e posteriore fra lume ed endotelio, all'inizio dell'onda R dell'ECG.

2.7 Analisi statistiche

Le variabili quantitative sono espresse come media $\pm$ SD. Le variabili categoriche sono presentate come N. (%). Le variabili quantitative senza una distribuzione normale sono trasformate in logaritmo e la normalità della distribuzione è stata valutata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov seguita dalla correzione di Lilliefors. Le differenze fra i tre gruppi di pazienti NGT, IGT, T2DM sono confrontate attraverso l'ANOVA a una via.

I modelli lineari generalizzati sono usati per correggere le differenze delle variabili per età, sesso e circonferenza vita.

I coefficienti di correlazione sono usati per calcolare le associazioni tra le variabili.

E' stata effettuata un'analisi di regressione lineare per identificare i predittori significativi e indipendenti dei disturbi del metabolismo del glucosio (2 h dopo il carico di glucosio).

Le variabili considerate come possibili predittori hanno incluso: età, sesso, circonferenza vita, glicemia a digiuno, Quicki, HbA1c, trigliceridi, TNF-alfa e adiponectina totale e le sue forme

multimeriche. Un test per la linearità (Spearman' Rho) è stato utilizzato per valutare la correlazione tra i disturbi del metabolismo glucidico e la severità della coronaroptia stenosante. Nel gruppo di trattamento con il Pioglitazone le analisi per dati appaiati sono state effettuate attraverso il test non parametrico di Wilcoxon. Le differenze fra le percentuali di variabili categoriche sono state valutate con il χ^2 test. L'analisi statistica è stata effettuata mediante SPSS versione 14.0

3. RISULTATI

3.1 Analisi del metabolismo glucidico e dello stato infiammatorio dei pazienti coronaropatici con pregresso IMA e senza disturbi metabolici conosciuti.

L'età media dei soggetti era 65.49±9.21 anni. Le caratteristiche antropometriche, pressorie, l'assetto biochimico e infiammatorio della popolazione dello studio sono descritti nella Tabella 1.

Tabella 1.Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione dello studio. I valori sono espressi come medie ± DS

	NGT	IGT	DM		
Pazienti	100	85	46		
	Media±DS;(CI 95%)			P	P*
Età (aa)	60.4±9.7; (58.3-62.5)	63.3±8.7; (61.3-65.3)	64.7±8.4; (61.9-67.5)	.028	NA
Sesso (m/f)	75/15	63/13	33/6	.972	NA
Circonf vita (cm)	97.3±10.3; (95.2-99.5)	101.9±9.8; (99.6-104.2)	102.1±9.9; (99.0-105.3)	.005	NA
BMI	26.9±3.6; (26.2-27.7)	28.7±4.2; (27.8-29.7)	28.4±4.1; (27.1-29.7)	.009	NP
PA sist (mmHg)	127.9±19.3; (123.8-132.1)	132.2±20.7; (127.4-137.2)	134.2±22.5; (126.7-141.7)	.219	.245
PA diast (mmHg)	77.5±10.1; (75.3-79.7)	79.2±12.1; (76.4-82.1)	80±10.9; (76.4-83.7)	.427	.402
Creatinina (mg/dl)	1.0±0.2; (0.9-1.0)	2.4±1.6; (0.3-3.0)	1.1±0.2; (1.0-1.2)	.410	.440
Azotemia (mg/dl)	41.4±11.3; (39.0-43.8)	42.7±12.9; (39.6-45.7)	42.4±9.6; (39.2-45.5)	.256	.774
Uricemia (mg/dl)	5.8±1.4; (5.5-6.1)	6.3±1.3; (6.0-6.6)	6.8±1.4; (6.4-7.3)	.000	.001
Coolest tot (mg/dl)	175.7±40.1; (167.1-184.4)	180.6±43.3; (170.4-190.8)	182.8±43.5; (168.5-197.1)	.463	.630
HDL colest (mg/dl)	50.8±12.5; (48.1-53.4)	48.3±13.8; (45.0-51.5)	50.0±17.7; (44.2-55.9)	.540	.718
LDL colest (mg/dl)	113.3±36.4; (105.5-121.1)	117.7±37.6; (108.9-126.6)	118.6±36.7; (106.9-130.3)	.665	.874
Trigliceridi (mg/dl)	122.4±56.9; (110.2-134.6)	156.8±76.5; (138.8-174.7)	165.9±73.3; (141.9-190.0)	.001	.000
Glicemia (mg/dl)	93.9±10.2; (91.8-96.1)	101.8±10.6; (99.4-104.3)	114.5±11.1; (111.2-121.7)	.000	.000
Insulin (µU/ml)	11.6±7.1; (10.1-13.1)	14.5±9.3; (12.3-16.6)	16.5±9.4; (13.4-19.5)	.006	.006
HOMA IR	2.7±1.7; (2.3-3.0)	3.7±2.5; (3.1-4.3)	5.0±3.2; (4.0-6.0)	.000	.000
QUICKI	0.34±0.3; (0.33-0.34)	0.32±0.3; (0.32-0.33)	0.31±0.2; (0.30-0.32)	.000	.000
Matsuda	81.6±51.4;	54.1±29.9	41.8±21.7;	.000	.000

Formattato

Formattato

	(77.4-84.7)	(52.8-55.9)	(38,5-44.9)		
HbA1c (%)	5.4±0.3; (5.3-5.4)	5.5±0.3; (5.5-5.6)	6.0±0.6; (5.9-6.2)	.000	.000
IGF-1 (ng/ml)	202.3±65.6; (187.6-217.0)	188.8±80.6; (168.2-207.8)	160.2±75.7; (135.0-185.5)	.017	.228
IGI (pmol/mmol)	19.1±11.9 (16.7-21.6)	15.9±11.7 (13.0-18.8)	8.6±5.3 (7.0-10.2)	.000	.000
Adiponect tot (µg/ml)	7.3±5.7; (5.6-8.9)	4.4±4.1; (3.1-5.6)	4.6±6.0; (1.9-7.4)	.011	.010
High Adiponect (µg/ml)	2.8±2.1 (2.3-3.4)	1.7±1.2 (1.4-2.1)	1.8±1.9 (1.0-2.6)	.000	.000
Low Adiponect (µg/ml)	1.6±1.3 (1.2-1.9)	1.5±1.3 (1.2-1.9)	2.1±2.1 (1.2-3.1)	.222	.711
TNF-alfa (ng/ml)	2.7±3.5; (2.0-3.4)	5.3±4.7; (4.3-6.4)	5.6±4.8; (4.0-7.2)	.000	.000
HsPCR (mg/L)	3.4±2.0; (2.5-4.4)	3.9±4.9; (2.8-5.1)	2.5±2.0; (1.8-3.1)	.253	.092

NGT: Normo-tolleranti; IGT: alterata tolleranza glucidica; DM: diabete mellito.
Hs PCR: proteina C reattiva ad alta sensibilità; IGF-1: insulin-like growth factor-1; HbA1c: emoglobina glicosilata HOMA IR: homeostasis model assessment of insulin resistance. IGI: Indice insulinogenico.

p: differenze tra i gruppi all'analisi univariata

p*: valori aggiustati per età, sesso e circonferenza vita.

NA: non applicabile; NP: non eseguiti.

Dopo l'esecuzione della curva da carico orale di glucosio (OGTT), i soggetti sono stati divisi in tre gruppi: NGT (42.9%), IGT (36.8%) e DM (20.3%). In questa popolazione che è la più ampia finora descritta come selezionata in un unico centro, la prevalenza dei disturbi metabolici è sovrapponibile a quanto osservata sia nello studio GAMI sia nello studio EuroHeart Survey on Diabetes promosso dalla Società Europea di Cardiologia (Figura 1). Curiosamente, se la frequenza di DM viene valutata attraverso la sola glicemia a digiuno, il DM viene diagnosticato solo nel 5.8% dei soggetti, mentre l'alterata glicemia a digiuno (IFG) nel 20.9%. Tra i quarantatre soggetti classificati come IFG, dopo l'OGTT 4 soggetti vengono diagnosticati come NGT, 15 come IGT e 24 come affetti da DM.

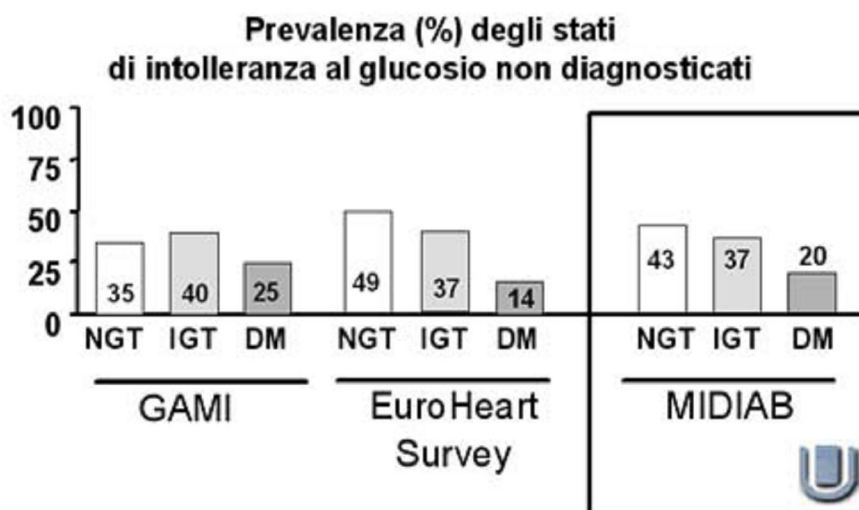


Figura 1 Prevalenza del diabete non diagnosticato nello studio MIDIAB in confronto allo studio GAMI e allo studio EuroHeart Survey on Diabetes.

Come mostra la Tabella 1, tra i tre gruppi emergono alcune differenze (ANOVA a 1 via). I soggetti diabetici sono lievemente più anziani. Non ci sono differenze per quanto concerne il trattamento terapeutico tra i 3 gruppi (dati non mostrati). La circonferenza della vita e il BMI sono lievemente più alti nei diabetici; inoltre, i diabetici mostrano più elevati livelli di trigliceridi, di glicemia a digiuno, di insulinemia a digiuno e di livelli di IGF-1 ($p < 0.05$ per tutti). Il Quicki e il valore dell'emoglobina glicosilata sono marcatamente più elevati nei soggetti diabetici ($p < 0.01$ per entrambe). Invece i diabetici mostrano un valore di IGI significativamente più basso ($p < 0.01$).

Tra le citochine infiammatorie dosate (PCR ad alta sensibilità, TNF-alfa e Adiponectina) in questa popolazione, solo il TNF-alfa e l'Adiponectina raggiungono una differenza statisticamente

significativa ad un'analisi univariata ($p < 0.01$ e $p < 0.05$). Tra le isoforme multimeriche dell'Adiponectina la HMW (ma non la LMW) mostra una differenza statisticamente significativa tra i 3 gruppi in esame ($p < 0.01$).

Dopo avere aggiustato per età, sesso e circonferenza della vita (Tabella 1), solamente la glicemia a digiuno, l'insulinemia a digiuno, i trigliceridi e l'emoglobina glicosilata si sono riconfermate più alte nei soggetti con neo-diagnosi di DM ($p < 0.01$). Interessante il fatto che il TNF-alfa si è confermato significativamente più elevato sia nei soggetti affetti da DM che in quelli affetti da IGT ($p < 0.01$), mentre l'Adiponectina tot e la HMW rimangono significativamente più basse sia nei diabetici che negli IGT ($p < 0.01$ per entrambe). Inoltre, sia i diabetici che gli IGT sono più insulino-resistenti in accordo con diversi indici utilizzati (HOMA IR e Quicki), mentre solo i diabetici mostrano una modesta riduzione di insulino-secrezione valutata mediante IGI (Tabella 1).

Abbiamo inoltre osservato che il valore della glicemia a 2 ore dal carico orale di glucosio (2hG) correla positivamente con l'età della popolazione ($r = 0.197$, $p < 0.05$), con la circonferenza della vita ($r = 0.197$, $p < 0.05$), con la glicemia a digiuno ($r = 0.579$, $p < 0.01$), con l'insulinemia a digiuno ($r = 0.243$, $p < 0.01$), con l'emoglobina glicosilata ($r = 0.545$, $p < 0.001$), con i trigliceridi ($r = 0.224$, $p < 0.01$) e inversamente con il Quicki ($r = -0.378$, $p < 0.01$) (Figura 2 e dati non mostrati);

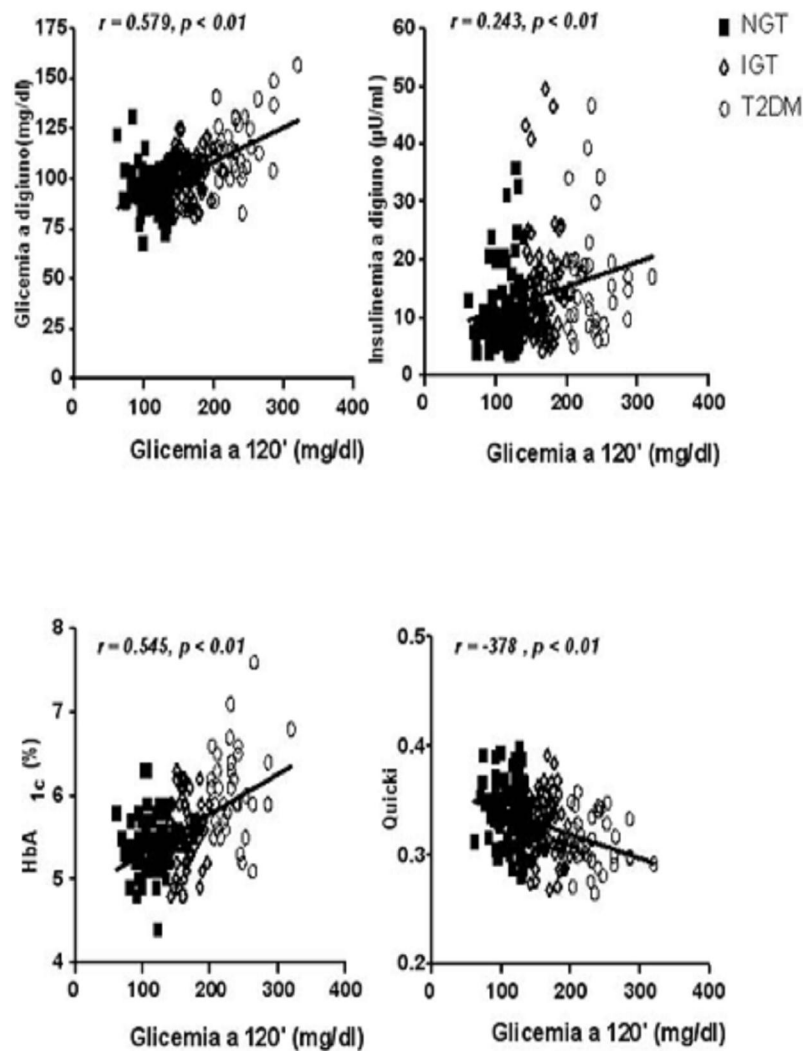


Figura 2: Correlazione della 2hG con glicemia a digiuno, con Insulinemia a digiuno, con HbA1c e con Quicki

Successivamente la 2hG è stata correlata con i parametri infiammatori le cui medie sono risultate significativamente diverse all'analisi univariata. I dati mostrano che la 2hG correla positivamente con il TNF- α ($r = 0.257, p < 0.01$) e inversamente

con l'Adiponectina totale ($r = -0.203$, $p < 0.05$) (Fig. 3). Inoltre, mentre la HMW adiponectina correla inversamente con la 2hG ($r = -0.224$, $p < 0.01$) la LMW mostra una correlazione positiva ($r = 0.277$, $p < 0.01$) (figura non mostrata).

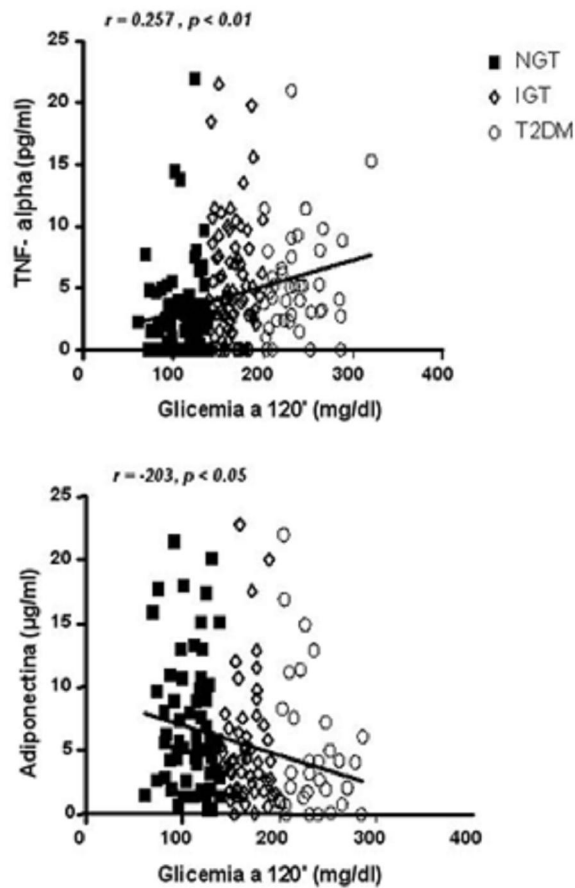


Figura 3: Correlazione della 2hG con TNF- α e Adiponectina

A questo punto, nel tentativo di identificare quale possa essere il predittore indipendente più significativo della 2hG, abbiamo usato tre modelli di analisi di regressione con metodica stepwise. Abbiamo utilizzato sempre come variabile dipendente la 2hG e

come variabili esplicative l'età, il sesso, la circonferenza della vita, i trigliceridi, l'insulinemia a digiuno, il Quicki, il TNF-alfa. Abbiamo invece inserito vicendevolmente nei modelli o l'adiponectina totale o la HMW o la LMW, al fine di verificare quale forma multimerica circolante potesse mostrare il migliore potere predittivo sulla variabile dipendente. Abbiamo escluso dal modello la glicemia a digiuno e l'emoglobina glicosilata, perché, pur essendo significativamente correlate alla 2hG, costituiscono un probabile bias statistico per due motivi: sono fisiologicamente legate in maniera marcata alla 2hG e presentano una colinearità con l'indice statico utilizzato per l'insulino-resistenza (Quicki). Fra tutte le variabili esplicative abbiamo identificato l'età, il Quicki e l'adiponectinemia come i predittori indipendenti e significativi dei livelli più elevati di 2hG ($p < 0.01$ per tutte). Tuttavia, tra i tre modelli costruiti, il più significativo è risultato quello in cui tra le variabili esplicative avevamo inserito la HMW adiponectina ($F=22.13$, d.f.=4, $p < 0.0001$), che spiegava il 33% (R^2 aggiustato) della varianza della 2hG (Tabella 2).

Tabella 2 Tre modelli di analisi di regressione con metodica automatica stepwise con glicemia a 2 ore come variabile dipendente. Variabili escluse: Insulina a digiuno, sesso, TNF-alfa, circonferenza vita, trigliceridi. Il modello 3 mostra l'R² più alto che spiega il 33% della variabilità della 2hG

Model		95,0% CI for β coefficient					
	Variabile dipendente	Variabili indipendenti	coefficiente β	p	Lower	Upper	R ² del modello (adj)
1	2h post load glucose	Age	.91	.033	.07	1.75	.22
		Quicki	-588.6	.000	-877.1	-300.1	
		Total Adiponectin	-19.2	.003	-32.4	-6.1	
2	2h post load glucose	Age	1.06	.011	.25	1.87	.26
		Quicki	-797.8	.000	-1078.5	-517.1	
		LMW Adiponectin	-0.58	.528	-41.1	16.2	
3	2h post load glucose	Age	1.63	.000	.85	2.40	.33
		Quicki	-586.2	.000	-868.7	-303.7	
		HMW Adiponectin	-40.74	.002	-66.5	-14.9	

Curiosamente le stesse conclusioni sono state osservate in un modello che includeva il BMI in sostituzione della circonferenza della vita (dati non mostrati).

A questo punto abbiamo valutato quale potesse essere il disturbo metabolico prevalente nella popolazione dello studio, l'insulino resistenza o l'insulino secrezione. Abbiamo effettuato una regressione lineare multivariata utilizzando come variabile dipendente l'area sotto la curva glicemica (AUCg), surrogato di iperglicemia durante l'OGTT, e come variabili esplicative l'IGI, stimatore della secrezione insulinica, e l'indice di Matsuda, stimatore di insulino resistenza. Il modello utilizzato è stato corretto per età, sesso e circonferenza vita. I risultati del test hanno

evidenziato che sia l'insulina secrezione che l'insulina resistenza contribuiscono significativamente al grado di escursione glicemica, tenendo conto delle differenze di età, sesso e obesità centrale dei soggetti. Ciononostante, tra i due parametri statisticamente significativi, l'indice di Matsuda appare come il più potente predittore di iperglicemia (β standardizzato -0.770, $p < 0.01$, CI - 0.304:-0,249) (Tabella 3.).

Tabella 3 *Regressione lineare multivariate con AUC glicemica come variabile dipendente e IGI, età, sesso, vita e Indice di Matsuda come variabili esplicative.*

Intervallo di confidenza (CI) per β al 95.0% CI					
	p	β standardizzato	β coeff	Lower	Upper
Matsuda Index	.000	-.770	-.276	-.304	-.249
IGI	.000	-.687	-.214	-,236	-,193
Età (anni)	.033	.075	.001	.000	.0001
Sesso (m/f)	.209	-.044	-.010	-.026	.006
Vita (cm)	.587	-.020	.000	-,001	.000

Infine, allo scopo di verificare il legame tra il dismetabolismo glucidico e la severità della CAD, i soggetti sono stati classificati in due distinti gruppi sulla base alla severità della coronaropatia (mono-vasale e multi-vasale) (Figura 4). La Figura 4 mostra la correlazione tra il numero di vasi affetti (uno o più di uno) e la 2hG ($Rho=0.30$, $p < 0.01$).

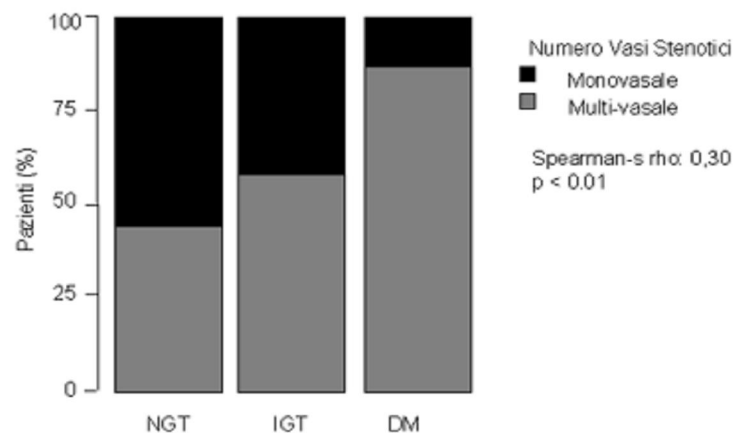


Figura 4 *Correlazione tra severità dell'aterosclerosi coronarica e disturbi del metabolismo glucidico*

3.2 Effetti dell'attivazione del recettore PPAR-gamma sull'insulino resistenza e suulla funzione endoteliale nei soggetti affetti da IGT.

Dati su modelli animali suggeriscono che l'alterazione contemporanea dei livelli di Adiponectina e di TNF-alfa può essere ragionevolmente considerato un marker di disfunzione del tessuto adiposo ²¹⁻²³. I pazienti del nostro campione affetti contemporaneamente da CAD e IGT sono insulino resistenti e mostrano nello stesso tempo un incremento dei markers infiammatori (tabella 1) se confrontati con i soggetti normotolleranti. Pertanto, in un sottogruppo di 13 soggetti CAD/IGT abbiamo provato a testare l'effetto dell'attivazione del recettore PPAR-gamma attraverso il Pioglitazone (PPAR-gamma agonista) per un breve periodo (12 settimane). Prima e dopo il periodo di trattamento, abbiamo valutato la funzione endoteliale (FMD) attraverso lo studio ecografico dell'arteria brachiale e l'insulino sensibilità mediante il Clamp euglicemico iperinsulinemico. Abbiamo evidenziato, in maniera interessante,

che l'attivazione PPAR-gamma per un periodo di 12 settimane ha determinato un incremento dei livelli di adiponectina e contemporaneamente una riduzione significativa dei livelli di TNF-alfa e dei trigliceridi ($p < 0.05$ sia per il TNF-alfa che per l'Adiponectina e $p < 0.01$ per i trigliceridi, Figura 4). Infine sia l'FMD che l'insulino sensibilità hanno mostrato un significativo miglioramento dopo il trattamento con il Pioglitazone ($p < 0.05$ per entrambe, Fig. 5).

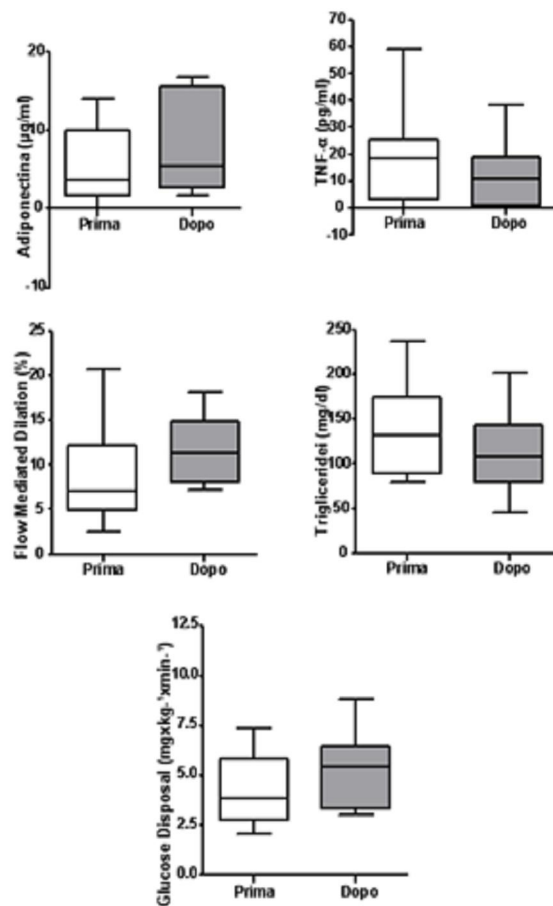


Figura 5 *Effetto del trattamento con un farmaco rimodellatore del tessuto adiposo, il Pioglitazone sulla sensibilità insulinica, la funzione*

endoteliale e i parametri biochimici in un gruppo di soggetti CAD con IGT non diagnosticata

Allo scopo di verificare se il Pioglitazone è in grado di indurre attraverso il rimodellamento del tessuto adiposo una variazione della distribuzione delle isoforme della Adiponectina, queste sono state dosate prima e dopo il trattamento. I risultati dimostrano che il Pioglitazone aumenta significativamente ($p < 0.01$ basal vs 12 weeks) la isoforma HMW ma non la MMW e LMW (figura 6).

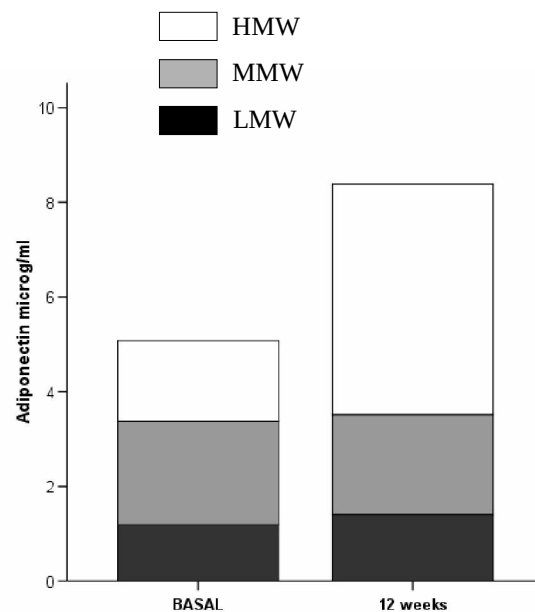


Figura 6 *Effetto del trattamento con un farmaco rimodellatore del tessuto adiposo, il Pioglitazone, sulle tre isoforme di adiponectina (HMW, MMW e LMW).*

4. DISCUSSIONE

La mancata diagnosi di DM in pazienti affetti da coronaropatia può peggiorare la sopravvivenza durante l'ospedalizzazione e incrementare la ricorrenza del numero di eventi coronarici. E' quindi di fondamentale importanza non sottostimare la presenza di disturbi del metabolismo glucidico, ancorchè precoci, in soggetti coronaropatici. Per tale motivo in questo studio abbiamo voluto studiare il fenotipo dei pazienti affetti da CAD e da disturbi del metabolismo glucidico non diagnosticati, allo scopo di identificare dei markers che possano facilitare la diagnosi.

I nostri risultati dimostrano che fra i pazienti affetti da coronaropatia e con pregresso IMA il 57% ha disturbi del metabolismo glucidico non diagnosticati. In particolare circa il 20% dei soggetti è affetto da DM e tali pazienti costituiscono la categoria a maggior rischio di mortalità^{2,3}.

L'esecuzione dell'OGTT si dimostra essere un utile strumento per individuare i pazienti affetti da IGT e quindi predisposti al DM. Lo dimostra il fatto che nella nostra popolazione i soggetti con glicemia a digiuno inferiore a 110 mg/dl sono l'81.6% e quelli con glicemia a digiuno inferiore a 100 mg/dl sono il 38.1% (dati non mostrati). Pertanto l'uso della sola glicemia a digiuno potrebbe sottostimare l'individuazione della categoria IGT.

Il campione di pazienti del nostro studio è il più numeroso studiato in un singolo centro europeo e i nostri dati sono in linea con precedenti studi sui pazienti affetti sia da forme acute che croniche di cardiopatia ischemica⁹.

Il DM è caratterizzato da una ridotta insulina secrezione, a causa di una progressiva insufficienza β cellulare, e da un incremento dell'insulina resistenza. L'importanza relativa e l'inter-relazione causale tra questi due disturbi metabolici sono ancora largamente dibattute. Sia l'insulina secrezione che l'insulina resistenza sono

determinate geneticamente, ma influenzabili anche dallo stile di vita, e l'insufficienza di una o di entrambe si associa ad un aumentato rischio di sviluppare DM. E' stato descritto che nelle fasi iniziali di DM la riduzione di insulino-secrezione ed un peggioramento di insulino-resistenza sono predittori indipendenti di scarso controllo glicemico ²⁴. Ma quale dei due aspetti sia il determinante più precoce non è ancora chiaro. Nel nostro studio abbiamo stimato l'insulino secrezione attraverso l'indice insulinogenico (IGI), che rispetto ad altri indici studia meglio la fase iniziale di insulino-secrezione ²⁵⁻²⁸ e l'insulino resistenza attraverso l'indice di Matsuda, entrambi calcolati attraverso l'OGTT. L'analisi di regressione multivariata effettuata ha mostrato una forte correlazione indipendente tra l'escursione glicemica da un lato e la disfunzione secretoria e l'aumentata insulino resistenza dall'altro, ma l'indice di Matsuda, surrogato di insulino resistenza, emerge chiaramente come il principale e più potente predittore di iperglicemia in soggetti con pregresso infarto e forme precoci di dismetabolismo glucidico.

Un terzo risultato del nostro studio è l'identificazione di predittori della tolleranza glucidica in pazienti con anamnesi positiva per CAD, ma non per DM. Abbiamo osservato che l'età e il Quicki sono predittori indipendenti dei valori dell'OGTT. Tuttavia, poiché abbiamo individuato diversi markers infiammatori significativamente differenti nei pazienti diabetici ed in quelli IGT confrontati agli NGT, ci saremmo aspettati di trovare che uno o più di questi markers potessero predire i risultati dell'OGTT.

Ma, mentre sia il TNF-alfa che l'Adiponectina correlavano con 2hG, solo l'Adiponectina è risultata un predittore indipendente di alterato metabolismo glucidico in pazienti affetti da CAD. In particolar modo nel nostro campione bassi livelli di Adiponectina totale appaiono in grado di predire alti livelli glicemici dopo l'assunzione orale di glucosio (OGTT). I dati sono stati

successivamente rivalutati dopo il dosaggio delle forme ad alto, medio e basso peso molecolare dell'Adiponectina. I dati suggeriscono che tra le forme sia quella ad alto peso molecolare ad essere ridotta nei soggetti CAD-IGT e CAD-DM, e dunque a definire la predittività per diabete non diagnosticato nei pazienti CAD.

I nostri risultati possono far luce sul ruolo dell'Adiponectina nelle malattie cardiovascolari. Una recente metanalisi suggerisce che l'Adiponectina non è un fattore di rischio primario per malattie cardiovascolari nonostante evidenze precedenti la descrivessero come possibile predittore di cardiopatia²⁹. Un altro recentissimo studio longitudinale sottolinea il ruolo ancora poco chiaro dell'adiponectina nei confronti della malattia coronarica, ponendo il dubbio che l'adiponectina non sia un fattore di rischio indipendente di coronaropatia, come precedentemente suggerito, ma solamente un marker di rischio⁴⁰. Il suo ruolo rimane quindi dibattuto.

In questo studio abbiamo trovato che i livelli di Adiponectina sono ridotti in pazienti affetti da CAD e DM o IGT misconosciuto. Pertanto è possibile che i risultati discordanti sul ruolo dell'Adiponectina come marker indipendente di malattia cardiovascolare possano dipendere da un numero elevato di pazienti inclusi nei precedenti studi come non diabetici e in realtà già affetti da tale malattia; ciò a nostro avviso potrebbe essere imputato all'utilizzo di test imprecisi per la diagnosi di malattia diabetica, come la sola anamnesi o al massimo la glicemia a digiuno; pertanto, la curva da carico orale di glucosio dovrebbe essere il test di eccellenza da utilizzare nella diagnosi di diabete in questa categoria di pazienti⁷⁻⁹.

Nei modelli sperimentali l'Adiponectina si è dimostrata ridurre l'aterosclerosi attraverso l'inibizione del NFκB e l'inibizione dell'espressione del TNF-alfa³⁰⁻³². Sebbene i nostri risultati possono suggerire che l'ipoadiponectinemia è un marker di alterazione del

metabolismo glucidico latente in pazienti coronaropatici, non è possibile da questo studio escludere che i bassi livelli di Adiponectina possano avere un effetto sfavorevole anche sulla funzione cardiovascolare, contribuendo alla progressione della malattia. Una risposta diretta a tale quesito potrebbe essere l'uso di Adiponectina in vivo, ma l'ormone non è ancora disponibile per studi in soggetti umani ed è quindi difficile testare direttamente il suo ruolo sul controllo del metabolismo glucidico in tali pazienti. Comunque è stato dimostrato in modelli sperimentali animali su diabete e obesità che l'ipoadiponectinemia e gli elevati livelli di TNF-alfa sono il risultato di disfunzione degli adipociti, le sole cellule conosciute in grado di sintetizzare e secernere l'ormone³³.

L'inter-relazione tra Adiponectina e TNF-alfa potrebbe essere clinicamente rilevante perché i pazienti affetti da CAD con elevati livelli di TNF-alfa hanno una maggiore frequenza di recidive cardiache e il TNF-alfa ha un impatto negativo sulla funzione cardiovascolare dopo IMA³⁴⁻³⁶. Ma poiché l'inibizione diretta dei TNF-alfa attraverso agenti farmacologici capaci di bloccarne l'azione, come l'infliximab o l'etanercept, si sono rilevati inefficaci nel migliorare la funzione cardiaca³⁷, sembrerebbe ragionevole pensare di utilizzare un approccio alternativo, finalizzato all'incremento dei livelli circolanti di Adiponectina. Tuttavia l'Adiponectina non è disponibile in formulazione farmacologica da somministrare per via enterale o parenterale, quindi l'incremento dei suoi livelli è possibile solamente agendo sul tessuto adiposo; infatti la modulazione del tessuto adiposo attraverso l'attivazione del recettore PPAR-gamma è in grado di incrementare i livelli di espressione di adiponectina.

Partendo da questo assunto, abbiamo verificato le capacità del Pioglitazone, un farmaco somministrato per via orale nel trattamento del DM e appartenente alla famiglia dei Glitazoni, di incrementare i livelli di Adiponectina in un sottogruppo di pazienti

affetti da CAD e ridotta tolleranza al glucosio. I risultati sono stati rimarchevoli; il Pioglitazone si è mostrato in grado di aumentare i livelli circolanti di Adiponectina totale e in particolar modo la HMW e tale effetto si accompagna ad un miglioramento significativo sia dell'insulino resistenza che della funzione endoteliale. Alcuni studi precedenti hanno suggerito che sia in volontari sani che in soggetti diabetici i glitazoni possono migliorare lo stato infiammatorio, la funzione endoteliale e l'insulino sensibilità, valutata attraverso indici statici di insulino resistenza^{38,39}. In questo studio noi dimostriamo per la prima volta che in pazienti CAD/IGT, in cui l'insulino sensibilità viene valutata attraverso il Clamp euglicemico iperinsulinemico che costituisce la tecnica migliore per lo studio dell'insulino sensibilità, l'attivazione PPRA-gamma determina un incremento della isoforma ad alto peso molecolare di Adiponectina, una riduzione del TNF-alfa, associati ad incremento di insulino sensibilità e un miglioramento di funzione endoteliale, in assenza di incremento di peso o di altri conosciuti rari effetti collaterali.

In conclusione il nostro studio suggerisce che:

- 1) il numero dei soggetti coronaropatici con disturbi del metabolismo glucidico non diagnosticati è elevato.
- 2) Nella nostra popolazione la severità della coronaropatia si associa a peggiore tolleranza glucidica.
- 3) Inoltre, in questi soggetti appare evidente che l'insulino resistenza riveste un ruolo significativamente importante e probabilmente particolarmente precoce nel contribuire alla progressione verso il DM.

4) Infine l'ipoadiponectinemia in pazienti con pregresso IMA è associata a disturbi non conosciuti del metabolismo glucidico e il trattamento farmacologico per un breve periodo con un farmaco modulatore del tessuto adiposo aumenta il livello di adiponectina circolante mentre appare in grado di migliorare la sensibilità insulinica, la funzione endoteliale e l'assetto lipidico in soggetti coronaropatici e fortemente predisposti al DM.

Poichè l'Adiponectina è una proteina la cui concentrazione sierica è piuttosto elevata e che presenta una regolazione strutturale non ancora definita ma resa complessa dalla presenza delle varie isoforme, un suo uso clinico diretto potrebbe non essere attuabile. Tuttavia i nostri dati dimostrano che un'azione specifica sulla sua espressione potrebbe incrementarne le attività biologiche protettive sulla funzione cardiovascolare e sulla regolazione metabolica.

5.BIBLIOGRAFIA

1. Haffner SM, Lehto s, Ronnema t et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in non diabetic subject with and without prior myocardial infarction. *N.Engl J Med* 1998; 339: 229-34.
2. Tucker KL, Buranapin S. Nutrition and aging in developing countries. *J Nutr.* 2001;131(9): 2417S-23S.
3. Balkau B, Shipley M, Jarrett RJ, Pyorala K, Pyorala M, Forhan A, Eschwege E. High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged non-diabetic men: 20-year follow-up in the Whitehall Study, the Paris Prospective Study, and the Helsinki Policemen Study. *Diabetes Care.* 1998;21:360-373.
4. Alderman EL, Corley SD, Fisher LD, et al. Five-year angiographic follow up of factors associated with progression of coronary artery disease in the Coronary Artery Surgery Study (CASS). CASS Participating Investigators and Staff. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1141-54.
5. Silva JA, Ramee SR, White CJ, et al. Primary stenting in acute myocardial infarction: influence on diabetes mellitus in angiographic results and clinical outcome. *Am Heart J* 1999; 138 (Part I): 446-55.
6. Malmberg K, Ryden L, Efendic S, et al. Randomized trial of insulin-glucose infusion followed by subcutaneous insulin treatment in diabetic patients with acute myocardial infarction (DIGAMI study): effects on mortality at 1 year. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 57-65.
7. Bartnik M, Malmberg K, Norhammar A, Tenerz A, Ohrvik J, Ryden L. Newly detected abnormal glucose tolerance: an important predictor of long-term outcome after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2004;25:1990-1997.
8. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16: 434-44.

- 9.** Lee CD, Folsom AR, Pankow JS, Brancati FL; Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Cardiovascular events in diabetic and nondiabetic adults with or without history of myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:855-860.
- 10.** The DECODE study group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet*. 1999;354:617-621
- 11.** Saydah SH, Loria CM, Eberhardt M, Brancati FL. Subclinical states of glucose intolerance and risk of death in the US. *Diabetes Care*. 2001;24:447-453
- 12.** Norhammar A, Tenerz A, Nilsson G, Hamsten A, Efendic S, Ryden L, Malmberg K. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. *Lancet*. 2002;359:2140-2144.
- 13.** Norhammar A, Malmberg K, Diderholm E, Lagerqvist B, Lindahl B, Ryden L, Wallentin L. Diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:585-591.
- 14.** Bartnik M, Ryden L, Ferrari R, Malmberg K, Pyorala K, Simoons M, Standl E, Soler-Soler J, Ohrvik J; Euro Heart Survey Investigators. The prevalence of abnormal glucose regulation in patients with coronary artery disease across Europe. The Euro Heart Survey on diabetes and the heart. *Eur Heart J*. 2004;25:1880-1890.
- 15.** Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2402.
- 16.** Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999;22:1462-1470
- 17.** Wallander M, Bartnik M, Efendic S, Hamsten A, Malmberg K, Ohrvik J, Ryden L, Silveira A, Norhammar A. Beta cell dysfunction in patients with acute

myocardial infarction but without previously known type 2 diabetes: a report from the GAMI study. *Diabetologia*. 2005;48:2229-2235.

18. Martuscelli E, Romagnoli A, D'Eliseo A, Tomassini M, Razzini C, Sperandio M, Simonetti G, Romeo F, Mehta JL. Evaluation of venous and arterial conduit patency by 16-slice spiral computed tomography. *Circulation*. 2004;110:3234-3238.

19. Iellamo F, Tesouro M, Rizza S, Aquilani S, Cardillo C, Iantorno M, Turriziani M, Lauro R. Concomitant impairment in endothelial function and neural cardiovascular regulation in offspring of type 2 diabetic subjects. *Hypertension*. 2006;48:418-23

20. Marini MA, Frontoni S, Mineo D, Bracaglia D, Cardellini M, De Nicolais P, Baroni A, D'Alfonso R, Perna M, Lauro D, Federici M, Gambardella S, Lauro R, Sesti G. The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an atherogenic profile in offspring of type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3368-71.

21. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002;106:2767-70.

22. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8:731-7.

23. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000;102:1296-301.

24. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose

tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care*. 2001; 24:89-94.

25. Pimenta WP, Rudge MVC, Aragon FF, Padovani CR Pancreatic beta-cell defects in women at risk of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2004; 63: 87-92.

26. Haffner SM, Miettinen H, Gaskill SP, Stern MP. Decreased insulin secretion and increased insulin resistance are independently related to the 7-year risk of NIDDM in Mexican-Americans. *Diabetes*. 1995; 44: 1386-1391.

27. Viberti G, Kahn SE, Greene DA, et al. A Diabetes outcome progression trial (ADOPT). *Diabetes Care*. 2002; 25: 1737-1743.

28. Tripathy D, Carlsson AL, Lehto M, Isomaa B, Tuomi T, Groop L. Insuline secretion and insulin sensitivity in diabetic subgroups: studies in the prediabetic and diabetic state. *Diabetologia*. 2000; 43: 1476-1483.

29. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM, Danesh J, Whincup PH. Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation*. 2006;114:623-9.

30. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002;106:2767-70.

31. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8:731-7.

32. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000;102:1296-301.

- 33.** Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96:939-49.
- 34.** Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101:2149-2153.
- 35.** Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, Liu PP. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2004;110:3221-8.
- 36.** Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation.* 1999;99:1492-8.
- 37.** Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L, Krum H, Liu P, Nieminen M, Tavazzi L, van Veldhuisen DJ, Waldenstrom A, Warren M, Westheim A, Zannad F, Fleming T. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation.* 2004;109:1594-1602.
- 38.** Marx N, Imhof A, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, Maerz W, Hombach V, Koenig W. Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation.* 2003 ;107:1954-1957.
- 39.** Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC. The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1757-1763.
- 40.** Laughlin GA, Barret-Connor E, May S, Langenberg C. Association of Adiponectin with Coronary Heart Disease and Mortality. The Rancho Bernardo Study. *Am J Epidemiol.* 2006;163:1-11.