



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO di RICERCA in
"FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE"
XX CICLO**

Tesi di Dottorato

**RUOLO DEI PUFA N-3 NELLA
REGOLAZIONE DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE
IN PARENTI DI PRIMO GRADO DI
PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE MELLITO TIPO 2**

Dottoranda
Dr. Angelica Galli

Coordinatore
Prof. Renato Lauro

Tutor
Prof. Davide Lauro

Anno Accademico 2006-07

Indice

INTRODUZIONE

- 1. DISFUNZIONE ENDOTELIALE pag 2
- 2. PUFA N-3 pag 8

SEZIONE SPERIMENTALE

- 1. OBIETTIVI DELLO STUDIO pag 12
- 2. MATERIALI E METODI
 - 2.1 Disegno dello studio pag 14
 - 2.2 Popolazione dello studio pag 15
 - 2.3 Valutazione della funzione endoteliale pag 16
 - 2.4 Valutazione clinica e metabolica pag 18
 - 2.5 Determinazioni analitiche pag 19
 - 2.6 Analisi statistiche pag 19
- 3. RISULTATI pag 21

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI pag 28

BIBLIOGRAFIA pag 35

INTRODUZIONE

Il Diabete Mellito (DM) è una malattia di grande rilievo sociale con un notevole impatto sulla salute pubblica per l'entità della diffusione, i costi e la gravità delle complicanze. Mostra una chiara tendenza, in tutti i paesi industrializzati, ad un aumento sia dell'incidenza che della prevalenza, stimata, a livello mondiale e per la popolazione adulta (20-79 anni), intorno al 5.9%, pari a 246 milioni di malati che dovrebbero aumentare a 370 milioni entro il 2025 [1]. In Italia si registra la presenza di 2 milioni e 643 mila persone colpite da DM, con una prevalenza del 4.5%, secondo i dati riportati nell'annuario statistico ISTAT 2006. La forma più comune è il Tipo 2 (DMT2) che rappresenta il 92.2% del totale.

Nel DMT2 l'ereditarietà è complessa e multifattoriale. Studi condotti negli anni '80 hanno evidenziato che esiste una predisposizione genetica allo sviluppo della malattia: la concordanza della malattia nei gemelli monozigoti è del 90% circa [2] ed i bambini con un genitore affetto da DMT2 hanno un rischio di sviluppare la malattia nel corso della vita pari al 40% [3]. Circa il 55% dei pazienti affetti riferisce un'anamnesi familiare positiva per diabete e si assiste ad una diminuzione della frequenza della malattia in popolazioni con pregressa alta prevalenza in seguito alla mescolanza genetica, come negli indiani Pima.

L'evidenza che la familiarità è un forte fattore di rischio per lo sviluppo del DMT2 ha indotto a cercare di individuare nei parenti di primo grado dei pazienti diabetici alterazioni fenotipiche iniziali e di spiegarne il contributo relativo nella patogenesi della malattia.

La positività alla familiarità per diabete è stata associata con un aumento dei fattori di rischio cardiovascolari, quali incremento del grasso viscerale, dei livelli plasmatici di insulina, trigliceridi e colesterolo totale, e dell'insulino-resistenza, elevata pressione arteriosa sistolica e ridotti livelli di colesterolo HDL

[4,5]. Inoltre, questi soggetti, rispetto a controlli sani, sono ad alto rischio di sviluppare aterosclerosi perché mostrano una riduzione della dilatazione endotelio-dipendente [6,7] ed un aumento dello spessore mio-intimale carotideo, espressione di uno stato di attivazione vascolare [8,9].

1. Disfunzione endoteliale

Fino a pochi anni fa l'endotelio era considerato una semplice barriera cellulare tra il sangue circolante e la parete vascolare e si riteneva che esplicasse funzioni di trasporto, metaboliche e coagulative. Oggi sappiamo invece che l'endotelio svolge un ruolo di primaria importanza non solo nella modulazione del tono vascolare ma, più in generale, di tutti i processi che intervengono nella patogenesi della trombosi e dell'aterosclerosi [10,11].

La disfunzione endoteliale è considerata uno dei principali meccanismi patogenetici nello sviluppo e nella progressione delle manifestazioni cliniche della malattia vascolare aterosclerotica, che precede ogni evidenza morfologica di danno [12-14]. Rappresenta infatti, una condizione caratterizzata da cellule endoteliali anatomicamente integre, ma la cui attivazione, invece di determinare esclusivamente produzione di ossido nitrico (NO), attiva nello stesso tempo quella di stress ossidativo che accelera l'eliminazione dello NO stesso.

Il termine "disfunzione endoteliale" fu coniato nel 1980 in seguito alla scoperta di Furchgott e Zawadzki che, in segmenti di aorta di coniglio, la presenza dell'endotelio era indispensabile perchè l'acetilcolina inducesse rilasciamento [15]; fu postulata, quindi, la produzione di una sostanza responsabile della vasodilatazione endotelio-dipendente, che venne definita fattore di rilasciamento endotelio-derivato (EDRF, Endothelium Derived Relaxing Factor) e in seguito identificata come NO [16].

Numerosi sono gli studi che dimostrano una disfunzione endoteliale nei pazienti con DMT2 [17]. La risposta vasodilatatoria dell'arteria brachiale è alterata dopo stimolo con donatori, sia endogeni sia esogeni, di NO. Il difetto può essere la conseguenza di una ridotta attività di eNOS (Ossido Nitrico Sintetasi endoteliale) e/o biodisponibilità di NO o di una minore risposta delle cellule muscolari vascolari lisce al gas vasoattivo.

Persone obese, senza diabete, presentano alterazioni della funzione endoteliale [18,19], quali una riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente, un incremento dei livelli circolanti di molecole di adesione leucocitaria, e della sintesi e dell'espressione del PAI-1. Gli obesi hanno una ridotta tolleranza ai carboidrati spesso associata alle altre componenti della sindrome metabolica; tuttavia, cambiamenti nella funzione delle cellule endoteliali possono essere osservati anche nelle fasi precoci dell'insulino-resistenza, prima che si manifestino alterazioni della tolleranza glucidica.

La dilatazione endoteliale è alterata nei familiari di primo grado di pazienti con DMT2 [6]. In questi soggetti, in apparente buona salute, è stata identificata la presenza di una comune e precoce disfunzione endoteliale attraverso la valutazione della reattività vasale a livello dell'arteria brachiale e del microcircolo cutaneo mediante la misurazione dei livelli plasmatici di vari markers biochimici di attivazione endoteliale e di infiammazione [20-22]. In aggiunta, negli stessi soggetti, se paragonati a individui della stessa età ma senza storia familiare di diabete, è stata riscontrata una ridotta distensibilità aortica e un aumentato spessore mio-intimale dell'arteria carotide comune [7,9,23,24]. L'aumento dello spessore mio-intimale, marker precoce di aterosclerosi, è l'espressione di uno stato di attivazione vascolare caratterizzato dalla produzione, da parte delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce, di fattori chemiotattici, quali il Monocyte Chemoattractan Protein-1 (MCP-1), in grado di richiamare e facilitare l'ingresso di cellule infiammatorie nella parete arteriosa [25,26] (figura 1).

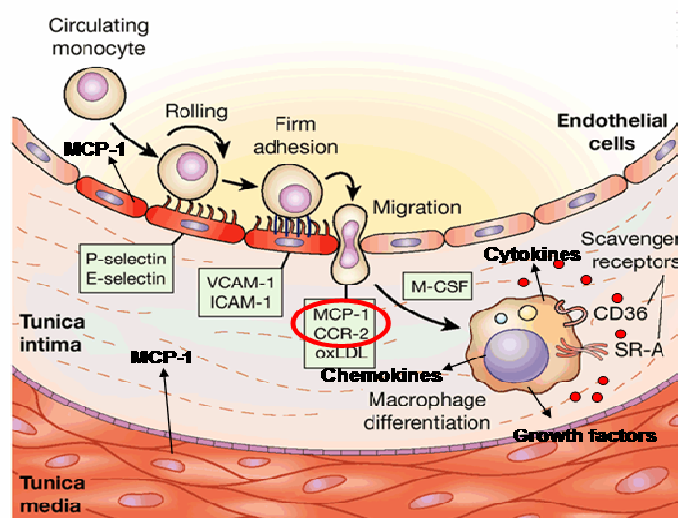


Figura 1 . Stato di attivazione vascolare

L'evidenza di un elevato rischio di malattia cardiovascolare non solo in pazienti con DM noto, ma anche in soggetti predisposti alla malattia [27], induce a considerare la possibilità di un terreno comune (genetico e/o metabolico e/o bio-umorale) in grado di condizionare la comparsa di entrambe le patologie, aterosclerosi e diabete, determinandone la forte associazione epidemiologica [28]. Infatti, sebbene nei soggetti diabetici l'iperglicemia fornisca il contributo maggiore nella determinazione del danno vascolare, è ormai accertato che molti altri fattori come l'insulino-resistenza, l'incremento della pressione arteriosa, la dislipidemia e l'infiammazione, prendono parte ad aggravare tale processo. Queste anomalie metaboliche, inoltre, possono essere presenti molti anni prima dello sviluppo dell'iperglicemia franca e possono precocemente ed indipendentemente aumentare il rischio di un accelerato processo aterosclerotico [29-31].

L'insulino-resistenza, indicata come possibile fattore comune sotteso sia al DMT2 che ai processi aterosclerotici, al di là degli effetti sullo stato di infiammazione cronica, di per sé gioca un ruolo primario nello sviluppo del danno

endoteliale [32-34] L'azione dell'insulina è importante nel mantenimento dell'omeostasi vascolare [35,36]. Esiste, infatti, una correlazione diretta tra risposta vasomotoria NO-dipendente e sensibilità insulinica. A livello della cellula endoteliale l'attivazione della via di trasmissione del segnale insulinico (IRS/PI3-K/Akt) comporta la trascrizione di eNOS, l'enzima responsabile della sintesi di ossido nitrico. Cellule endoteliali geneticamente insulino-resistenti mostrano un'alterata capacità di up-regolare l'espressione, la sintesi e l'attività di eNOS in risposta all'insulina [37] con diminuzione delle azioni "positive" dell'ormone sulla parete del vaso. Inoltre, in presenza di alterazioni nella trasmissione del segnale insulinico lungo la via PI-3-Kinasi dipendente, l'iperinsulinemia compensatoria, che frequentemente si osserva in caso di insulino-resistenza, determina un eccesso di attivazione della via mitogena MAP-Kinasi dipendente con conseguente esaltazione degli stimoli pro-aterogeni dell'insulina [38] (figura 2), come è stato descritto nei topi Zucker, un noto modello animale di insulino-resistenza [39].

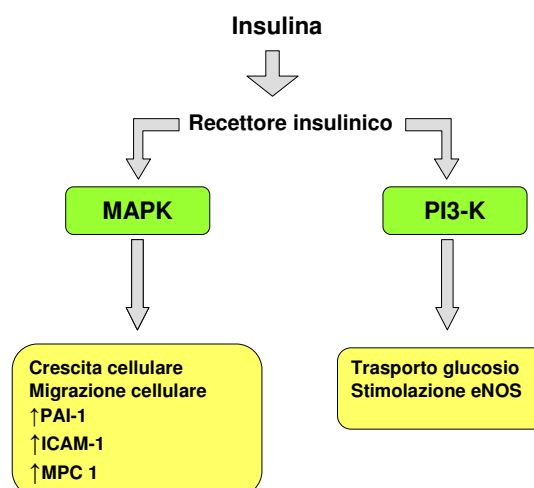


Figura 2. Azioni dell'insulina sul metabolismo cellulare e sulla funzione endoteliale

E' stato dimostrato inoltre che, così come l'insulino-resistenza contribuisce alla disfunzione endoteliale, difetti della vasodilatazione NO-mediata possono contribuire alla riduzione della sensibilità all'insulina, e quindi alla patogenesi della stessa malattia diabetica. Infatti, l'infusione di NG-monometil-L-arginina, un inibitore della NO-sintetasi, non solo riduce la vasodilatazione, ma altera anche la captazione muscolare insulino-mediata di glucosio [40].

È nota la stretta relazione esistente fra stato infiammatorio, aterosclerosi ed azione insulinica. L'infiammazione è probabilmente un determinante fondamentale della disfunzione endoteliale. Numerosi studi suggeriscono infatti che la somministrazione di TNF- α *in vivo* deprime la vasodilatazione endotelio-dipendente [41] e riduce l'emivita dell'mRNA che codifica per la eNOS in cellule endoteliali in coltura [42]. Il TNF- α , inoltre, modula l'espressione di un'ampia gamma di molecole di adesione (come VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, selectina E e selectina P) e chemochine (IL-8 e MCP-1) da parte delle cellule endoteliali [43,44] coinvolte nei meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi. Tuttavia, l'infiammazione oltre ad avere un ruolo ampiamente dimostrato nella patogenesi dell'aterosclerosi [45], potrebbe essere coinvolta anche nello sviluppo sia dell'insulino-resistenza, che del DMT2 [31,46]. Il ruolo dell'infiammazione nell'induzione dell'insulino-resistenza è probabilmente legato alla protezione del sistema nervoso centrale e alla redistribuzione dei substrati energetici in condizioni di stress. Questo concetto si accoppia all'idea che nel passato sarebbe stata favorita la selezione di un corredo genomico che oggi predispone all'insulino-resistenza (teoria del Thrifty Genotype) e allo sviluppo di malattie infiammatorie croniche [47].

E' stato dimostrato che il TNF- α stimola una serie di proteine ad attività chinasi (IKK) coinvolte nel controllo dell'attivazione del fattore di trascrizione NF-kappa-B, molecola effettrice terminale degli stimoli infiammatori che regola l'espressione di citochine e chemochine. IKK fosforila I κ B che, in condizioni basali, lega e trattiene a livello citoplasmatico NF-kappa-B, e ne induce la sua degradazione con conseguente traslocazione di NF-kappa-B nel nucleo dove

svolge la sua azione di fattore di trascrizione pro-infiammatorio. IKK, inoltre, è in grado di attivare un'anomala fosforilazione in serina dell'Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) che inibisce la tirosinchinasi del recettore insulinico e quindi rappresenta il mediatore degli effetti di inibizione del "signaling" dell'insulina del TNF- α [48]. Il contributo di questa citochina pro-infiammatoria nello sviluppo dell'insulino-resistenza sarebbe riconducibile a un'interferenza diretta nella cascata di trasmissione del segnale insulinico. In aggiunta, la relazione tra stato infiammatorio e DMT2 è sottolineata dall'evidenza che fibrinogeno, PCR e IL-6, markers sensibili dell'infiammazione subclinica presente in corso di insulino-resistenza, possono predire la manifestazione di DMT2 e di alterazioni del metabolismo del glucosio [49-51]. Queste osservazioni hanno fatto ipotizzare che l'alterazione della immunità naturale, espressa dallo stato flogistico cronico, rappresenti la causa iniziale dell'insulino-resistenza (figura 3) [52].

L'infiammazione cronica può essere l'elemento comune alla patogenesi di diabete ed aterosclerosi, ed è logico supporre che il principale meccanismo sotteso ai processi aterosclerotici sia l'induzione della disfunzione endoteliale.

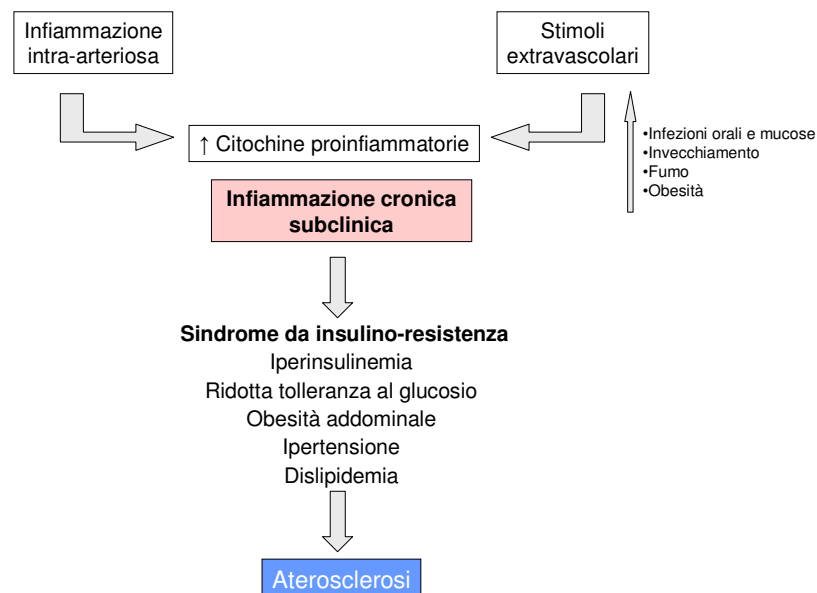


Figura 3. Fattori alla base dell'infiammazione cronica e dello sviluppo dell'aterosclerosi

2. PUFA n-3

L'interesse destato dagli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) della serie omega 3 (o n-3) risale ad alcune osservazioni riportate, circa 30 anni fa, negli studi epidemiologici pionieristici di *Dyerberg* e *Bang* effettuati sugli Inuit, popolazione eschimese della Groenlandia. Da questi studi emergeva chiaramente una bassa incidenza di eventi coronarici negli eschimesi tipicamente esposti a una dieta ricca di pesce grasso dei mari freddi e, per conseguenza, di PUFA n-3, in particolare l'acido decosaesanoico (DHA) e l'acido ecosapentanoico (EPA) [53].

Alle prime osservazioni epidemiologiche seguirono numerosi altri studi che confermarono l'emergere di una correlazione inversa significativa tra consumo di pesce o integrazione della dieta con acidi grassi n-3 e mortalità e morbilità per eventi cardiovascolari. Questo profilo di effetti protettivi è stato confermato in due studi osservazionali su larga scala, il *Nurses' Health Study* e il *Physicians' Health Study*. Nel *Nurses' Health Study*, condotto su oltre 100.000 infermiere seguite per alcune decenni, è stato rilevato un rischio coronario sensibilmente più basso tra le donne che hanno dichiarato consumi elevati di pesce, rispetto a quelle che hanno denunciato consumi inferiori. In particolare, una dieta a base di almeno 2 porzioni di pesce la settimana è risultata associata a una riduzione del 30% circa di incorrere in un evento coronario, rispetto a un regime alimentare che prevede un consumo di pesce meno frequente (< 1 volta al mese) [54]. Nel *Physicians' Health Study*, che ha valutato circa 40.000 medici di sesso maschile di età compresa tra 40 e 75 anni, il consumo di pesce è apparso associato a una significativa riduzione (-40%) del rischio di incorrere in ictus di natura ischemica. Nello stesso studio, i soggetti con più elevate concentrazioni ematiche di omega-3 sono risultati maggiormente protetti dal rischio di morte improvvisa rispetto a quelli con più basse concentrazioni plasmatiche [55].

Un ruolo protettivo del pesce grasso nella prevenzione secondaria della coronaropatia è stato osservato anche nello studio *DART (Diet And Reinfarction*

Trial); i risultati di questo trial hanno mostrato una riduzione del 29%, nel corso di due anni, della mortalità complessiva in 2000 maschi con infarto miocardio recente, randomizzati a consumare 2-3 pasti di pesce grasso per settimana rispetto ad una dieta standard di controllo [56].

In ambito di prevenzione secondaria, tra gli studi di intervento che hanno documentato i benefici degli acidi grassi poliinsaturi il famoso trial clinico *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardio (GISSI)-Prevenzione* ha dimostrato che la terapia cronica (per 3,5 anni) con 1 g/die di PUFA n-3 migliora significativamente la prognosi in pazienti con infarto miocardio recente (≤ 3 mesi) con riduzione della mortalità totale del 21% e di quella cardiovascolare del 30% e della morte improvvisa del 44% (beneficio compatibile soprattutto con l'effetto antiaritmico dei PUFA n-3) [57]. In questi studi le curve di sopravvivenza iniziano a divergere già entro pochi mesi dall'inizio dell'intervento (di tipo alimentare nello studio DART, farmacologico nel GISSI Prevenzione) raggiungendo la significatività statistica entro i primi 4 mesi sia per ciò che riguarda la mortalità totale che la morte improvvisa. Questo sembra testimoniare un effetto diretto e non mediato da variazioni metaboliche, che richiedono tempi più lunghi, della somministrazione degli acidi grassi.

L'utilità clinica degli acidi grassi poliinsaturi n-3 nella prevenzione cardiovascolare si basa sulle diverse azioni biologiche, in gran parte riconducibili all'interferenza con il sistema degli eicosanoidi, che, anche in maniera sinergica, esplicano a livello dei parametri coinvolti nella patogenesi e nell'evoluzione della malattia aterosclerotica. Essi sono in grado di ridurre la sintesi di citochine proinfiammatorie che intervengono nel processo della placca aterosclerotica instabile, hanno capacità antiaggregante, agiscono su diversi fattori di proliferazione cellulare e modulano l'espressione di molecole di adesione da parte della parete arteriosa (VCAM-1, ESelectina, ICAM-1). Gli acidi grassi omega-3 hanno inoltre proprietà ipotrigliceridemizzante che si esplicano, invece, attraverso l'inibizione della produzione epatica di lipoproteine ricche di trigliceridi (VLDL). I PUFA n-3 riducono la generazione dell'anione superossido e aumentano

conseguentemente la produzione di NO nell'endotelio. Diversi studi hanno dimostrato che il trattamento a lungo termine con l'acido eicosapentaenoico (EPA) aumenta sia la risposta della vasodilatazione endotelio-dipendente NO-mediata che quella non NO-mediata in pazienti con cardiopatia ischemica [58]. In aggiunta, è stato osservato che l'acido docosaesaenoico (DHA) sopprime l'influsso di Ca^{2+} recettore-mediato attraverso i canali voltaggio-dipendenti delle cellule muscolari lisce producendo, così, il rilasciamento della muscolatura liscia vasale. Questo potrebbe anche spiegare la possibile azione antiipertensiva di EPA e DHA dal momento che sia l'NO che il Ca^{2+} hanno un ruolo importante nella patogenesi dell'ipertensione essenziale. Tuttavia, sulla base delle indicazioni cliniche ed epidemiologiche a favore di un effetto cardiaco più diretto dei PUFA n-3, sono stati eseguiti un gran numero di studi sperimentali nell'animale, nell'uomo e in vitro, i quali nell'insieme supportano un ruolo per i PUFA n-3 anche nell'aritmogenesi, dovuto all'effetto protettivo sull'instabilità elettrica dei cardiomiociti che si esplicherebbe con un'azione degli omega 3 sui canali ionici calcio e sodio delle membrane cellulari [59].

È noto che gli acidi grassi poliinsaturi della serie n-3 sono in grado di modificare diversi fattori di rischio cardiovascolare; tuttavia non è chiaro se la protezione cardiovascolare è direttamente correlata solo alle proprietà antiaterogeniche o è anche associata al miglioramento di particolari condizioni cliniche ad elevato rischio, come il diabete. I pazienti con diabete mellito, infatti, presentano condizioni metaboliche dirette in senso pro-aterosclerotico ed una maggiore incidenza di vasculopatia coronaria e carotidea [60,61]. Inizialmente è stato messo in discussione il ruolo benefico dei PUFA n-3 in questo gruppo di pazienti per i risultati contrastanti di studi clinici sui valori di glicemia [62,63], sull'emoglobina glicosilata e sul colesterolo-LDL [64,65], ma un'attenta revisione critica della letteratura ha evidenziato che i dosaggi impiegati erano sensibilmente maggiori (10-16 g/die) rispetto a quelli successivamente ritenuti sufficienti nel diabetico (≤ 3 g/die). In particolare sono state condotte due metanalisi di studi metabolici che hanno definitivamente chiarito l'influenza esercitata dalla

somministrazione controllata di PUFA n-3 nei pazienti diabetici; i risultati ottenuti hanno dimostrato una variazione statisticamente non significativa della glicemia a digiuno e dell'emoglobina glicata dopo supplementazione con olio di pesce [66,67] e una riduzione della ipertrigliceridemia diabetica [68]; effetti addizionali includono anche il miglioramento della disfunzione endoteliale, marker precoce di aterosclerosi [69]. Sono stati allestiti numerosi studi clinici con PUFA n-3 in soggetti sovrappeso, in pazienti con sindrome metabolica e in diabetici; i risultati di questi studi indicano che la somministrazione di PUFA n-3 alla dose di 2-4 g/die è in grado di migliorare la dilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale sia nei soggetti sani sia nei pazienti diabetici [70-72].

SEZIONE SPERIMENTALE

1. Obiettivi dello studio

Il presente lavoro è stato intrapreso al fine di verificare se la somministrazione di PUFA n-3 fosse in grado di modificare la funzione endoteliale in soggetti ad elevato rischio di sviluppare aterosclerosi precocemente rispetto al resto della popolazione.

A tale scopo sono stati reclutati soggetti aventi un parente di primo grado affetto da DMT2, peraltro giovani, normotesi, in assenza di patologie infiammatorie e cardiovascolari, che rappresentano un ottimo modello di studio dei rapporti esistenti tra insulino-resistenza, infiammazione ed aterosclerosi.

In accordo con tali premesse, sono presenti in letteratura alcuni lavori che dimostrano come la popolazione a rischio di DMT2, quali i parenti di primo grado dei pazienti diabetici, presenta disfunzione endoteliale anche a fronte di una condizione di normale tolleranza glucidica. Numerose evidenze suggeriscono che sia l'iperinsulinemia relativa che l'insulino-resistenza caratterizzano questa popolazione e che esiste una correlazione diretta fra queste alterazioni metaboliche e la disfunzione endoteliale. Tuttavia, non vi sono ancora conclusioni certe e definitive se lo stato infiammatorio cronico subclinico e/o le caratteristiche identificative della sindrome metabolica (obesità centrale, dislipidemia, insulino-resistenza) possano contribuire alle menzionate precoci anomalie vascolari.

I PUFA n-3 possiedono riconosciuti effetti ipo-trigliceridemizzanti ma si sono dimostrati anche efficaci nel migliorare lo stato pro-ossidativo ed infiammatorio [73] di soggetti affetti da patologie cardiovascolari e metaboliche e nel ridurre gli eventi responsabili del deterioramento della reattività dell'endotelio vascolare e quindi dell'insorgenza dell'aterosclerosi [74,75].

Il nostro fine è quello di studiare la possibile azione benefica dell'assunzione di PUFA-n3 (2g/die per 90 giorni) sulla funzione endoteliale valutando l'effetto sia sul profilo metabolico che sui livelli di alcuni markers di perturbazione endoteliale.

2. Materiali e Metodi

2.1 Disegno dello studio

Abbiamo condotto uno studio clinico monocentrico, prospettico, randomizzato, controllato con placebo in doppio cieco, a gruppi paralleli, atto a valutare gli effetti dell'assunzione quotidiana di 2g di PUFA n-3 vs placebo, in parenti di primo grado di pazienti affetti da DMT2.

Lo studio è stato diviso in due fasi:

- fase di reclutamento
- fase di trattamento.

Durante la fase di reclutamento, i soggetti, ricevute opportune informazioni relative ai propositi del protocollo di studio, hanno firmato il consenso informato. I partecipanti sono stati quindi sottoposti a visita di screening (V1). La V1 ha previsto le seguenti procedure: verifica dei criteri di inclusione/esclusione; valutazione clinica con raccolta dei dati anamnestici (particolare attenzione è stata posta alla rilevazione di concomitanti patologie infiammatorie acute e/o croniche) ed obiettivi (esame fisico con misurazione dei parametri antropometrici e della pressione arteriosa); prelievo di campioni di sangue per la misurazione dei lipidi e dei principali markers biochimici, e per il dosaggio di citochine infiammatorie; curva da carico orale di glucosio (OGTT); studio della funzione endoteliale.

I soggetti considerati eleggibili, le cui condizioni abbiano soddisfatto i criteri richiesti dallo studio e che non abbiano presentato controindicazioni per i supplementi dietetici (per esempio allergia nota ai PUFA n-3) sono entrati nella fase di trattamento ed allocati, per randomizzazione attraverso un software dedicato, ad uno dei due bracci: PUFA n-3 o placebo. I soggetti sono stati istruiti ad assumere 1 capsula due volte al giorno in corrispondenza dei pasti principali. Ogni capsula di gelatina poteva contenere 1g di PUFA n-3 [$\geq 85\%$ di acido

eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) sotto forma di esteri etilici, in un rapporto medio EPA/DHA pari a 0.9-1.5:1] o 1g di olio di oliva raffinato (placebo). Il trattamento è stato somministrato dagli sperimentatori.

A 60 giorni dall'inizio del protocollo i soggetti sono stati rivalutati (V2) ed è stata verificata l'eventuale comparsa di criteri di ritiro.

A V3, di fine trattamento (giorno 90), sono stati rivalutati tutti i parametri considerati al baseline (specificamente i parametri metabolici, infiammatori e della funzione endoteliale), verificati eventuali eventi avversi (in particolare l'insorgenza di malattie infiammatorie) e misurata la compliance al trattamento ricostituendo le scorte dei farmaci.

Prima di cominciare lo studio è stata ottenuta l'approvazione del Comitato Etico del Policlinico Universitario di Roma "Tor Vergata".

2.2 Popolazione dello studio

Lo studio clinico è stato condotto presso il Centro per l'Aterosclerosi del Policlinico Universitario "Tor Vergata" di Roma, dove sono stati reclutati 120 soggetti apparentemente sani con un genitore affetto da DMT2. Di questi 70 (30 donne, 40 uomini; età media: 30.5 ± 5.2 DS) hanno completato lo studio, 45 non soddisfacevano tutti i criteri di inclusione del protocollo per cui sono stati esclusi, 5, dopo la randomizzazione, sono usciti prematuramente dallo studio per scarsa aderenza alle procedure. Tra i partecipanti, nessuno ha assunto farmaci diversi dalla molecola in esame, inclusi pillola estro-progestinica, aspirina e supplementi vitaminici, durante il periodo di osservazione e nei tre mesi precedenti. Le donne sono state sottoposte alle procedure del protocollo nella prima settimana del ciclo mestruale.

I criteri di esclusione allo studio sono stati:

- età inferiore a 18 e superiore a 40 anni

- storia o evidenza di ipertensione arteriosa (definita per livelli di pressione sistolica > 140 mmHg o di diastolica > 90 mmHg, per almeno tre volte in tre giorni diversi)
- diabete mellito tipo 1
- diabete mellito tipo 2 diagnosticato secondo i criteri ADA [76]
- patologie cardiovascolari, vasculopatie periferiche, coagulopatie ed ogni altra condizione predisponente a vasculite o fenomeno di Raynaud
- patologie infiammatorie acute e/o croniche.

2.3 Valutazione della funzione endoteliale

La funzione di vasodilatazione, endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente, valutata due volte in ogni soggetto, a inizio e fine trattamento, è stata esaminata mediante la tecnica del *Brachial Artery Reactivity Test (BART)* (figura 1) [77].

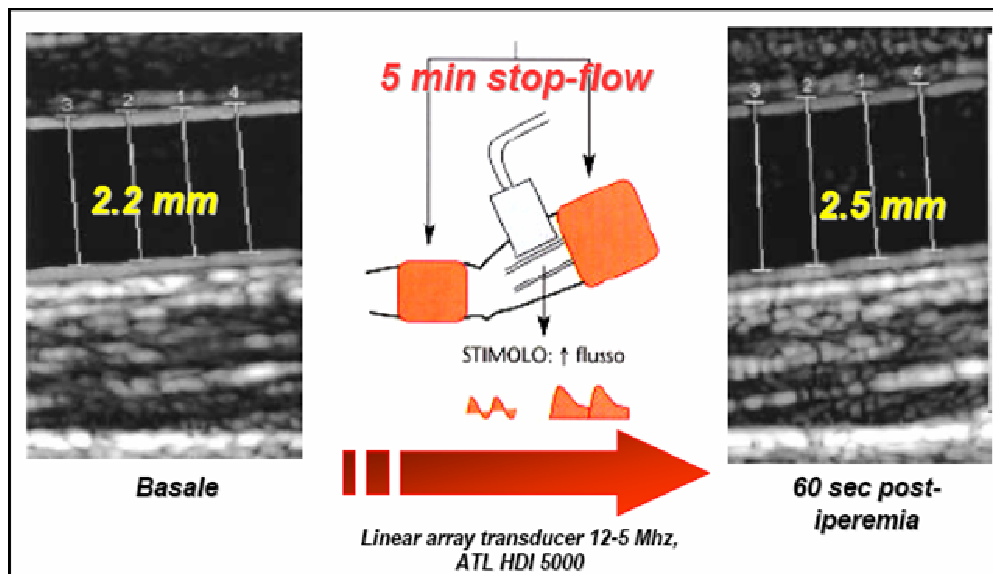


Figura 1 Studio della funzione endoteliale nell'arteria omerale

Al fine di minimizzare gli effetti di fattori che potessero influenzare la reattività vascolare (temperatura ambientale, assunzione di cibo, fumo di sigaretta, ecc.), il test è stato eseguito al mattino, in un ambiente silenzioso a temperatura controllata (22°C circa). Ai partecipanti è stato chiesto di essere a digiuno da 12 ore e di astenersi dall'assunzione di bevande alcoliche e/o contenenti caffeina e dal fumo di sigaretta nelle 24 ore precedenti l'esame. I soggetti, sdraiati in posizione supina su un lettino, sono stati lasciati a riposo per 10 minuti. L'arteria brachiale sinistra è stata visualizzata dai 2 fino ai 15 cm prossimalmente alla fossa antero-cubitale mediante ultrasuoni B-Mode ad alta risoluzione (ecografo ATL HDI 3000, Philips Medical System, Best, Netherlands) con una sonda lineare 7,5 MHz. Dopo aver misurato il calibro arterioso ed il flusso basale, è stato posizionato un manicotto a pressione sulla porzione più alta del braccio e gonfiato fino a 200-250 mmHg. Al rilascio del manicotto, dopo 5 minuti di ischemia dell'avambraccio, sono stati misurati il flusso sanguigno (a 15-20 secondi) e il calibro dell'arteria (a 60-90 secondi). L'aumento di calibro del vaso indotto dall'aumento del flusso arterioso e quindi dall'aumento di *shear stress* dopo ischemia del segmento distale dell'avambraccio misura la "flow-mediated dilatation" (FMD), che rappresenta la risposta endotelio-dipendente. Dopo 15 minuti di riposo, sono state acquisite nuove immagini e misurato con il doppler il flusso arterioso (diametro e flusso basali); quindi sono stati somministrati 0.4 mg di nitroglicerina (NTG) spray per via sublinguale al fine di valutare la vasodilatazione endotelio-indipendente cioè la risposta intrinseca della muscolatura liscia vascolare e quindi escludere un'alterata risposta contrattile delle cellule muscolari lisce della parete arteriosa del vaso in esame. L'entità della dilatazione NGT-mediata (NMD) è stata calcolata, dopo circa 3-4 minuti dalla somministrazione del farmaco, come incremento percentuale del diametro arterioso dopo stimolo rispetto al basale. In entrambi i casi, FMD e NMD, il calibro dell'arteria è stato misurato nella cosiddetta "m" line (interfaccia tra media e avventizia), alla fine della diastole, in corrispondenza dell'onda R dell'ECG. La durata totale del test è stata di circa 60 minuti.

Tutte le immagini registrate sono state analizzate e validate da un operatore ad hoc in condizioni di cecità, sia rispetto alla sequenza (prima o dopo stimolo) sia rispetto al trattamento assegnato al soggetto.

2.4 Valutazione clinica e metabolica

A ciascun visita dello studio, i soggetti sono stati sottoposti a valutazione clinica; effettuato un accurato esame fisico con misurazione dei parametri antropometrici (peso corporeo, altezza, BMI e circonferenza vita) e dei segni vitali (pressione arteriosa e frequenza cardiaca). La misurazione dei livelli di pressione arteriosa è stata effettuata al braccio sinistro del paziente disteso supino, dopo 5 minuti di riposo, con sfigmomanometro a mercurio. I valori sono stati calcolati come media delle ultime 2 di 3 misurazioni ottenute a 3 minuti di distanza fra loro.

All'inizio e alla fine del trattamento sono stati valutati alcuni parametri metabolici (colesterolo totale, LDL-colesterolo, HDL-colesterolo, trigliceridi) ed è stato calcolato il grado di insulino-resistenza tramite l'indice statico HOMA IR (Homeostasis Model Assesment), modello matematico che mette in relazione glicemia ed insulinemia basali secondo la formula proposta da *Matthews* e coll. [78]. Durante la fase di reclutamento, tutti i partecipanti hanno effettuato un OGTT che si basa sull'assunzione, dopo 12 ore di digiuno notturno, di 75 gr di glucosio per os seguita dalla raccolta di campioni di sangue ogni trenta minuti per due ore per la determinazione di glicemia ed insulinemia plasmatici. Attraverso tale procedura è stato possibile escludere la presenza di diabete mellito tipo 2 ed individuare alterazioni del metabolismo glucidico (in accordo con i criteri diagnostici stabiliti dall'American Diabetes Association), così da dividere la nostra popolazione di studio in due gruppi: normotolleranti (NGT) ed individui con alterata tolleranza ai carboidrati (IGT).

2.5 Determinazioni analitiche

A tempo 0 (V1) e dopo 90 giorni (V2) di trattamento, tutti i soggetti, a digiuno da 12 ore, sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue per la valutazione di parametri bio-chimici. Inoltre, sono stati ottenuti campioni ematici da cui sono state ricavate multiple aliquote di siero che sono state conservate ad una temperatura di -80°C in attesa di essere analizzate; dalle aliquote, opportunamente scongelate, sono stati dosati alcuni marcatori sierici di infiammazione (hsPCR, TNF α , Adiponectina, CD40L).

I livelli di hsPCR (proteina C reattiva ad alta sensibilità) sono stati misurati utilizzando un saggio nefelometrico (Dade-Behring, Liederbach, Germany); i valori di TNF α e CD40L sono stati valutati col metodo ELISA utilizzando kit disponibili in commercio (Bender MedSystem); l'Adiponectina è stata dosata col metodo ELISA utilizzando kit ad alta sensibilità (Alpco Diagnostics, USA).

2.6 Analisi statistica

Le variabili quantitative sono espresse come media e deviazione standard, le variabili qualitative come rapporto o percentuale. I parametri quantitativi dei soggetti dei quattro gruppi (NGT/placebo, NGT/omega-3, IGT/placebo, IGT/omega-3) sono stati confrontati attraverso l'ANOVA univariata, corretti per sesso, età e BMI mediante l'analisi della covarianza. Le differenze tra le variabili qualitative invece, sono state valutate attraverso il test χ^2 .

Il test t-student per dati appaiati è stato applicato per confrontare le variabili quantitative al baseline e al termine del periodo di trattamento. I coefficienti di correlazione sono stati utilizzati per descrivere le relazioni bivariate tra i cambiamenti delle variabili durante il trattamento. Abbiamo utilizzato due differenti modelli di analisi di regressione con metodica forward: nel primo abbiamo usato il cambiamento della FMD come variabile dipendente ed età,

Sesso, modificazione dell'adiponectina, del TNF α , del BMI e dei trigliceridi come variabili indipendenti; nel secondo modello abbiamo aggiunto lo stato NGT/IGT tra le variabili di predizione.

Abbiamo considerato significativo il valore di probabilità inferiore a 0.05. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il programma SPSS, versione software 14.0 per Windows.

3. Risultati

Le caratteristiche demografiche e cliniche e i livelli di biomarkers basali della popolazione studiata, composta da 70 soggetti con familiarità per DMT2, sono riassunti nella tabella 1.

La popolazione è composta da 30 donne e 40 uomini.

L'OGTT, effettuata in tutti i partecipanti alla visita di screening, ha permesso di suddividere la popolazione di studio in due gruppi: 53 soggetti NGT (f/m: 25/28), aventi cioè glicemia due ore dopo carico inferiore a 7.8 mmol/L, e 17 soggetti IGT (f/m: 5/12), con glicemia a due ore fra 7.8 mmol/L e 11.1 mmol/L. I due gruppi (NGT/IGT) sono stati assegnati per randomizzazione al trattamento, PUFA n-3 o placebo, così da ottenere quattro bracci: NGT-PUFA n-3 (n=26, f/m: 12/14), IGT-PUFA n-3 (n=10, f/m: 3/7), NGT-placebo (n=27, f/m: 13/14), IGT-placebo (n=7, f/m: 2/5).

I soggetti IGT di entrambi i gruppi, IGT-PUFA n-3 e IGT-placebo, come atteso, hanno un'età maggiore e presentano un livello significativamente più alto di BMI, trigliceridi ed insulinemia a digiuno; inoltre, in questi soggetti è stata rilevata una maggiore insulino-resistenza (valutata tramite HOMA IR) rispetto ai partecipanti NGT, appartenenti sia al braccio PUFA n-3 che al braccio placebo. Peraltro, tutti i soggetti IGT mostrano livelli lievemente più alti di glicemia a digiuno, LDL-colesterolo, colesterolo totale, hsPCR e TNF α , e concentrazioni minori di IGF-1 ed adiponectina, parametri tuttavia non statisticamente significativi. Al contrario, nessuna differenza evidente è emersa fra i quattro gruppi in termini di pressione arteriosa, HDL colesterolo, e livelli di C-peptide plasmatici. Confrontati con i partecipanti IGT, i soggetti NGT (NGT-PUFA n-3 ed NGT placebo) mostrano una FMD significativamente più alta.

L'osservazione della popolazione di studio al baseline ha consentito, dunque, di rilevare nei partecipanti allo studio IGT i principali tratti della sindrome metabolica accompagnati da un'alterata funzione endoteliale.

Dei 55 individui arruolati, 50 hanno completato lo studio e la conta delle capsule alla fine del protocollo ha dimostrato un'eccellente compliance al trattamento (93.7%).

Tabella 1. Caratteristiche basali dei soggetti randomizzati

	<i>PUFA n-3 NGT (N=26)</i>	<i>PUFA n-3 IGT (N=10)</i>	<i>Placebo NGT (N=27)</i>	<i>Placebo IGT (N=7)</i>	P
Età (anni)	28.6±6.8	36.2±4.3	29.0±5.9	34.1±6.3	<0.05
Sesso (f/m)	12/14	3/7	13/14	2/5	n.s.
BMI (kg/m ²)	24.5±5.8	29.4±5.1	24.5±4.1	29.1±5.8	<0.05
PAS (mmHg)	116.7±9.5	116.1±13.6	116.2±17.6	117.4±11.3	n.s.
PAD (mmHg)	72.2±8.1	81.1±6.0	76.2±11.7	80.9±12.6	n.s.
Colesterolo tot (mg/dl)	182.3±28.3	213.8±30.9	189.1±26.4	205.3±33.2	n.s.
HDL colesterolo (mg/dl)	60.9±15.7	55.3±21.9	50.2±19.2	57.6±18.2	n.s.
LDL colesterolo (mg/dl)	113.5±35.0	144.7±30.1	119.7±34.7	124.6±31.1	n.s.
Trigliceridi (mg/dl)	69.7±27.9	119.8±48.9	78.6±56.3	121.4±34.5	<0.05
Glicemia a digiuno (mg/dl)	89.4±7.5	95.0±12.4	72.0±10.8	91.4±11.4	n.s.
Insulinemia a digiuno (mU/ml)	8.7±7.5	16.0±7.1	9.6±4.6	15.3±6.5	<0.05
HOMA IR	1.9±1.0	3.6±1.7	1.7±1.1	3.2±1.5	<0.05
IGF-1 (ng/ml)	281.9±98.5	202.9±51.4	335.4±94.5	256.3±67.5	n.s.
C-peptide (ng/ml)	1.5±0.6	1.7±0.6	2.0±0.6	1.9±0.7	n.s.
TNF-α (pg/ml)	6.9±2.6	7.5±2.5	6.0±5.1	7.1±4.9	n.s.
Adiponectina (μg/ml)	10.5±5.8	4.9±2.7	13.7±9.1	6.4±4.3	n.s.
hs-PCR (mg/L)	1.9±2.3	2.6±2.8	1.4±1.9	2.3±2.8	n.s.
FMD (%)	10.2±5.7	7.3±5.8	11.1±5.8	7.2±5.9	<0.05

A 12 settimane dall'inizio del trattamento è stato effettuato un controllo delle variabili cliniche e metaboliche al fine di valutare la validità dell'intervento terapeutico rispetto all'obiettivo principale, rappresentato dal miglioramento della funzione endoteliale, e alle variazioni del pattern di citochine circolanti (TNF- α e adiponectina).

Al termine del protocollo sono state rilevate solo piccole modificazioni dei livelli dei parametri d'interesse nei partecipanti appartenenti al gruppo placebo, sia NGT che IGT (dati non mostrati).

Al contrario, tutti i soggetti che hanno assunto PUFA n-3 durante lo studio hanno mostrato alcune significative differenze dopo il trattamento rispetto alle misurazioni basali. La tabella 2 (a,b) riassume il profilo completo degli effetti dei PUFA n-3 nei 36 soggetti, NGT ed IGT, dopo le dodici settimane di protocollo.

I dati documentano nel gruppo di individui studiati una riduzione statisticamente significativa dei trigliceridi (116.85 ± 72.63 vs 86.23 ± 43.55 , $p < 0.01$) e dei livelli di TNF- α (8.94 ± 2.32 vs 6.78 ± 2.73 , $p < 0.01$). Inoltre, la valutazione della concentrazione plasmatica di adiponectina, citochina potenzialmente coinvolta nei meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi, ha mostrato valori significativamente aumentati rispetto ai dosaggi pre-trattamento (7757.69 ± 4516.38 vs 9464.62 ± 5053.82 , $p < 0.01$). È stato osservato un netto miglioramento della FMD nei soggetti dopo la somministrazione di PUFA n-3 (9.07 ± 5.81 vs 11.41 ± 4.18 , $p < 0.01$) (Figura 2). Viceversa, non si è avuta una modificazione rilevante della pressione arteriosa, sia sistolica che diastolica, né dell'assetto lipidico, fatta eccezione per una tendenza all'aumento del colesterolo HDL, tuttavia non significativa. Anche i livelli plasmatici della glicemia, dell'insulinemia e del C-peptide a digiuno non hanno subito variazioni marcate.

La misurazione dell'HOMA IR non ha evidenziato diminuzione dei valori di tale parametro dopo l'intervento terapeutico, né nei soggetti NGT né nei soggetti IGT. Sono stati valutati i principali indici di flogosi ed emocoagulativi marcatori di stato infiammatorio cronico (VES, hsPCR, fibrinogeno); dai risultati ottenuti non è emersa alcuna significatività statistica.

Tabella 2a. Profilo complessivo di efficacia del trattamento con PUFA n-3

N= 36 soggetti	Baseline	12 weeks	p
PAS (mmHg)	114.23±14.47	113.27±11.22	0.77
PAD (mmHg)	75.18±8.54	74.81±8.42	0.85
Glicemia a digiuno (mg/dl)	89.91±10.80	90.92±9.50	0.33
Insulinemia a digiuno (mU/ml)	10.40±6.21	11.38±6.31	0.18
HOMA IR	2.33±1.48	2.60±1.53	0.16
C-peptide (ng/ml)	1.55±0.58	1.57±0.56	0.90
IGF-1 (ng/ml)	266.44±95.27	254.08±95.54	0.41
Colesterolo totale (mg/dl)	184.92±40.68	192.15±39.28	0.10
HDL colesterolo (mg/dl)	57.73±14.55	60.23±18.24	0.20
LDL colesterolo (mg/dl)	120.65±39.15	123.46±0.49	0.41
Trigliceridi (mg/dl)	116.85±72.63	86.23±43.55	<0.01

Gli effetti del trattamento sono stati esaminati utilizzando un t-test per dati appaiati e presentati come media±DS

Tabella 2b. Efficacia dei PUFA n-3 sui parametri infiammatori ed endoteliali

N= 36 soggetti	Baseline	12 weeks	p
VES (mm/h)	12.42±6.54	13.93±6.21	0.25
hsPCR (mg/l)	1.97±0.46	2.16±0.49	0.64
Fibrinogeno (mg/dl)	293.05±67.97	307.35±58.91	0.22
CD40L (ng/ml)	8.25±1.16	8.07±1.66	0.93
TNFα (pg/ml)	8.94±2.32	6.78±2.73	<0.01
Adiponectina (ng/ml)	7757.69±4516.38	9464.62±5053.82	<0.01
FMD (%)	9.07±5.81	11.41±4.18	<0.01

Gli effetti del trattamento sono stati esaminati utilizzando un t-test per dati appaiati e presentati come media±DS

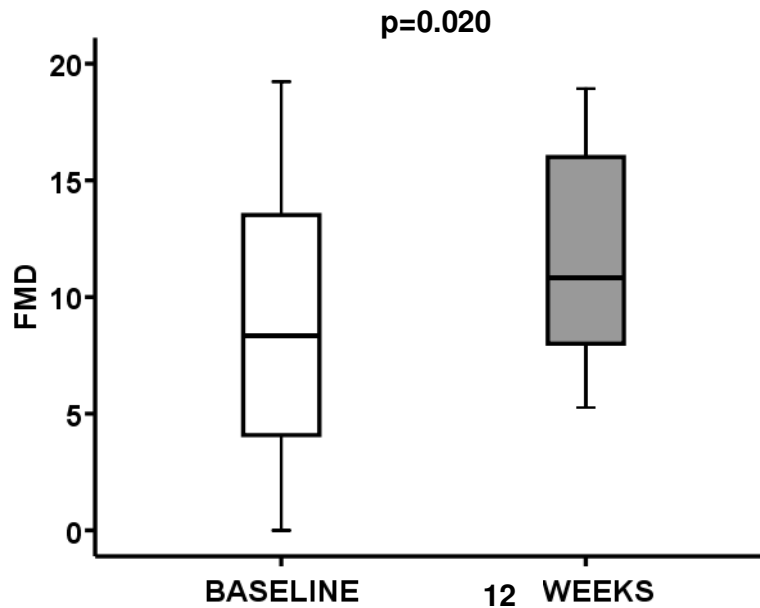


Figura 2. Incremento della FMD dopo 12 settimane di trattamento con PUFA-n 3

E' stata inoltre valutata la possibile correlazione tra la variazione media (Δ) dei parametri di interesse (trigliceridi, $\text{TNF}\alpha$, adiponectina) e la variazione media della funzione endoteliale (Δ FMD) associate all'assunzione di PUFA n-3.

Queste correlazioni sono state aggiustate per età, sesso e BMI. In tutti i soggetti trattati per 12 settimane con PUFA n-3, NGT e IGT, l'aumento della FMD era associato ad una riduzione dei livelli di trigliceridi ($r = -0.45$, $p = 0.02$) e di $\text{TNF}\alpha$ ($r = -0.55$, $p = 0.003$). Non abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa fra Δ FMD e l'aumento dell'adiponectina ($r = 0.323$, $p = 0.107$) (Figura 3).

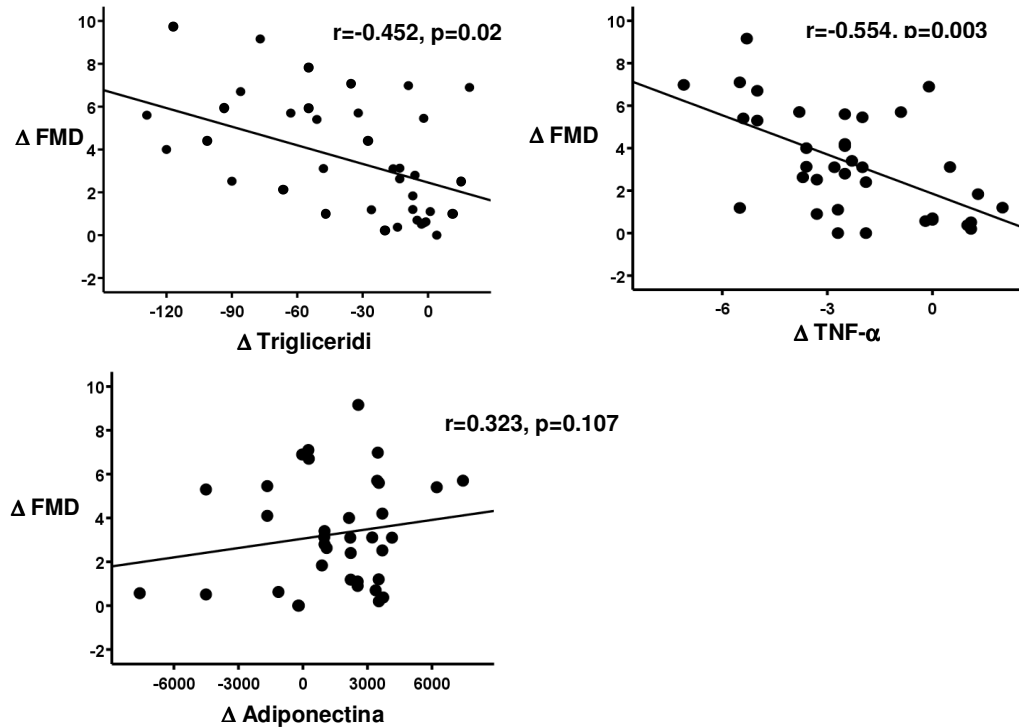


Figura 3. Correlazione fra Δ FMD e Δ Trigliceridi, fra Δ FMD e Δ TNF- α , fra Δ FMD e Δ adiponectina nei soggetti in trattamento con PUFA n-3

Nel tentativo di identificare quale cambiamento delle variabili valutate, associato all'assunzione dei PUFA n-3, fosse in grado di predire il miglioramento della funzione endoteliale in tutti i soggetti, NGT e IGT, è stata utilizzata un'analisi di regressione multipla con metodica forward. Abbiamo utilizzato Δ BMI, Δ trigliceridi, Δ TNF α , Δ adiponectina, età e sesso come variabili indipendenti, e Δ FMD come variabile dipendente.

Il modello era altamente significativo ($F=10.65$, $d.f.=4.75$, $p=0.03$) e spiegava circa 34% del miglioramento della FMD (R^2 corretto =0.341). Il cambiamento dei livelli di TNF- α dopo la somministrazione di PUFA n-3 per 90 giorni emergeva come unico predittore indipendente (Tabella 3a). Infine, abbiamo ripetuto l'analisi aggiungendo lo stato NGT/IGT al modello ma i risultati sono rimasti sostanzialmente immutati (Tabella 3b).

Tabella 3. Predittori del cambiamento della FMD nei soggetti in trattamento con PUFA n-3

a

	<i>Coefficiente β</i>	P
Δ adiponectina	0.055	0.785
Δ trigliceridi	-0.154	0.481
Δ BMI	-0.049	0.806
ΔTNF α	-0.485	0.025
Sesso	0.049	0.815
Età	-0.217	0.355

b

	<i>Coefficiente β</i>	p
Δ adiponectina	0.113	0.564
Δ trigliceridi	-0.100	0.634
ΔBMI	0.127	0.557
ΔTNF α	-0.531	0.013
Sesso	0.280	0.221
Età	-0.225	0.388
Stato NGT/IGT	0.391	0.102

DISCUSSIONE

I parenti di primo grado dei pazienti affetti da DMT2 rappresentano un ottimo modello di studio dei rapporti esistenti fra insulino-resistenza, infiammazione ed aterosclerosi. Essi hanno un aumentato rischio di sviluppare DM, come già precedentemente descritto, ed aterosclerosi, poiché mostrano una diminuzione della dilatazione endotelio-dipendente [6] e un aumentato spessore mio-intimale [9].

Nel presente studio clinico abbiamo dimostrato che la somministrazione orale di PUFA n-3, per 90 giorni alla dose di 2 gr/die, in soggetti apparentemente sani ma con familiarità per DMT2, migliora la disfunzione endoteliale e questo si associa ad una significativa riduzione dello stato di lieve infiammazione cronica, in particolare dei livelli di TNF- α .

Sottoposti ad OGTT, circa il 37% dei figli dei soggetti diabetici in studio è risultato affetto da una ridotta tolleranza al glucosio (IGT). Come atteso, questi individui erano più anziani, avevano un BMI più elevato e livelli di trigliceridi e di insulino-resistenza maggiori rispetto al resto della popolazione dello studio, dimostratisi normotolleranti ai carboidrati. (NGT) In ultima analisi, dunque, i soggetti IGT presentavano talune caratteristiche della Sindrome Metabolica. Questi dati sono peraltro in linea con i risultati di numerosi studi presenti in letteratura, condotti sullo stesso tipo di popolazione. I figli di soggetti diabetici infatti, anche se relativamente giovani e apparentemente sani, presentano, con elevata frequenza, caratteristiche antropometriche, metaboliche ed infiammatorie che ne aumentano considerevolmente il rischio di sviluppare DM e malattie cardiovascolari. In accordo con queste evidenze, i soggetti dello studio, risultati affetti da IGT dopo il carico di glucosio, presentavano inoltre una peggiore funzione endoteliale ed un lieve incremento dei parametri infiammatori rispetto ai soggetti normoglicemici.

Alla luce di queste caratteristiche, abbiamo diviso la popolazione dello studio in due gruppi: il primo, formato da ventisei soggetti NGT e dieci IGT, ha assunto 2 g al giorno di acidi grassi poliinsaturi della serie n-3, il secondo, composto da ventisette NGT e sette IGT, è stato randomizzato ad assumere placebo, entrambi per un periodo di 12 settimane.

Al termine del trattamento il gruppo di soggetti che ha assunto placebo non ha evidenziato alcuna modificazione significativa, in nessuna delle variabili studiate, rispetto al baseline.

La valutazione del braccio di studio trattato con PUFA n-3, sia che i soggetti fossero normoglicemici sia che fossero risultati affetti da ridotta tolleranza al glucosio, non ha mostrato alcun sostanziale cambiamento dei livelli di glicemia ed insulinemia a digiuno, di emoglobina glicosilata, nè dell'insulino-resistenza, misurata attraverso l'indice statico dell'HOMA IR. Inoltre, non è stata rilevata alcuna variazione nei livelli di secrezione insulinica, valutata attraverso la determinazione della concentrazione plasmatica a digiuno del peptide-C. Tali risultati sono in linea con quanto riportato in precedenti trials clinici che vedono coinvolti soggetti diabetici e non [79-81].

Nei nostri due gruppi di individui, PUFA n-3/NGT e PUFA n-3/IGT, non si è verificato alcun cambiamento nei livelli di pressione arteriosa, sia sistolica che diastolica. Questo dato è in controtendenza con quanto riportato nello studio di *Yosefy e coll.* Dove è descritta una significativa riduzione dei livelli pressori sisto-diastolici in soggetti diabetici e obesi, trattati per tredici giorni con dosi elevate di PUFA n-3 [82]. Tuttavia i soggetti del nostro protocollo sono più giovani rispetto alla popolazione di *Yosefy*, non presentano diabete ed ipertensione, e sono solamente in leggero sovrappeso; tra l'altro la dose di PUFA n-3 da noi impiegata è inferiore, anche se somministrata per un periodo più lungo.

Per quanto riguarda l'assetto lipidico il trattamento con PUFA n-3 è apparso associato a una riduzione marcata dei livelli di trigliceridi. Questo dato, piuttosto atteso, è in linea con precedenti e numerosi studi clinici [83-85]. In tal senso, una recente meta-analisi ha rivalutato i risultati di 23 trials, in cui erano

coinvolti più di mille soggetti diabetici, confermando l'utilità e l'efficacia dei PUFA n-3 nel migliorare la dislipidemia tipicamente associata al diabete [86]. Non abbiamo osservato invece, alcun cambiamento nei livelli di colesterolo totale ed LDL-colesterolo, laddove c'è stato un lieve incremento, sebbene non significativo, dei livelli di HDL-colesterolo.

Per quanto concerne i markers di coagulazione (fibrinogeno, CD-40L), non si è verificata alcuna significativa variazione, rispetto ai valori basali, al termine del trattamento.

Alcuni tra gli indici di infiammazione cronica analizzati hanno mostrato viceversa, interessanti cambiamenti. Mentre VES e PCR ad alta sensibilità sono rimasti sostanzialmente immutati, abbiamo osservato una notevole riduzione dei livelli di TNF- α e un incremento sostanziale dei livelli di adiponectina totale. Questo non è un dato completamente nuovo; studi, sia su modelli cellulari che su modelli animali, confermano la potenzialità dei PUFA n-3 nel ridurre lo stato di infiammazione cronica. Tuttavia, pochi trials hanno prodotto risultati convincenti, sufficienti a confermare tale effetto in vivo [87], peraltro caratterizzati da un setting di studio sostanzialmente differente rispetto al nostro [88,89]. Infatti, nella maggior parte dei casi, i protocolli hanno coinvolto soggetti affetti da malattie infiammatorie croniche, come l'artrite reumatoide, la psoriasi, l'asma, il morbo di Chron, o da DM franco, condizioni che si associano a livelli marcatamente più elevati di citochine infiammatorie rispetto alla condizione di familiarità per DM.

La terapia in vivo anti-TNF- α si è dimostrata clinicamente utile; anzi, studi recenti hanno enfatizzato l'effetto positivo che gli anticorpi bloccanti il TNF- α determinano nel migliorare la funzione endoteliale in soggetti affetti da artrite reumatoide [90]. Tale effetto tuttavia sembra essere transitorio, essendo tali patologie caratterizzate da elevati e persistenti livelli di infiammazione cronica, come precedentemente detto. Inoltre la medesima terapia somministrata a pazienti cardiopatici con elevati livelli di TNF- α circolanti non ha garantito gli stessi risultati [91].

E' noto che l'integrazione dietetica di PUFA n-3 determina una riduzione dell'aggregazione piastrinica e un incremento della produzione endoteliale di ossido nitrico attraverso un cambiamento qualitativo della concentrazione di prostanoidei sulle membrane cellulari. Questi meccanismi, o la ridotta espressione di citochine, fattori tissutali e fattori di crescita verosimilmente giocano un ruolo di primaria importanza nella risposta vasoattiva indotta dai PUFA n-3, anche nei giovani parenti di primo grado di pazienti diabetici.

Il dato centrale del nostro lavoro rimane tuttavia il miglioramento della funzione endoteliale valutata attraverso il BART. I parenti di primo grado di pazienti diabetici, anche se ancora giovani, quando confrontati con soggetti di pari età ma senza familiarità per diabete, presentano delle anomalie precoci, sia metaboliche che in termini di infiammazione cronica sub-clinica. Tale situazione, come descritto ormai ampiamente in letteratura, è accompagnata da una disfunzione endoteliale, condizione precoce che viene normalmente interpretata come predisponente lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi e delle sue complicanze. Inoltre, un report molto recente del *Framingham Offspring Study* [92] ha identificato nella disfunzione endoteliale di per sè un importante fattore predisponente allo sviluppo del DM, indipendentemente da altri fattori come l'insulino-resistenza, l'obesità e l'infiammazione.

Abbiamo osservato che la somministrazione di PUFA n-3 conduce a una significativa modulazione dei markers di infiammazione con un importante riduzione dei livelli di TNF- α e un sostanziale aumento dei valori di adiponectina. Applicando ai risultati dello studio relativi all'intero gruppo in trattamento con PUFA n-3 una regressione lineare multivariata è emerso che la riduzione dei livelli di TNF- α è il predittore significativo ed indipendente associato al miglioramento della funzione endoteliale, mentre la riduzione di trigliceridi e l'aumento dell'adiponectina, una volta inseriti nel modello statistico, non sono apparsi associati significativamente all'incremento dell'FMD (Tabella 3,a). Le correlazioni descritte sono state corrette per età e sesso dei partecipanti.

Nel tentativo di capire se l'insulino-resistenza, e nel nostro caso la ridotta tolleranza al glucosio, potesse avere una qualche forma di influenza sui risultati dello studio, abbiamo inserito nel modello statistico la condizione di NGT/IGT tra le variabili indipendenti; tuttavia, questo approccio non ha prodotto significativi cambiamenti (Tabella 3b). In particolare, una ridotta tolleranza al glucosio non si associa ad un diverso miglioramento della funzione endoteliale, quando si è sottoposti ad una terapia PUFA n-3.

Diversi trials clinici hanno dimostrato che un precoce intervento farmacologico, quale la somministrazione di antiossidanti o agenti antidiabetici, permette di ridurre l'insulino-resistenza o di modulare lo stato infiammatorio in parenti di primo grado di pazienti affetti da diabete mellito tipo 2 [93-97]. Al contrario, solo pochi studi hanno provato l'effetto di trattamenti terapeutici sul deterioramento della reattività dell'endotelio vascolare di tale popolazione di individui [98]. Il nostro lavoro ha descritto un legame tra riduzione dell'infiammazione e miglioramento della funzione endoteliale in soggetti sani ma fortemente predisposti a complicanze cardiovascolari trattati con PUFA n-3.

CONCLUSIONI

Sebbene in letteratura siano presenti dati che indichino il ruolo primario dell'insulino-resistenza nello sviluppo del danno endoteliale, e sia stata dimostrata l'associazione fra l'insulino-resistenza e l'aumento dello spessore mio-intimale carotideo, definito "indice subclinico di aterosclerosi precoce" [99], nel nostro studio il miglioramento della funzione endoteliale, valutata mediante FMD, non si è accompagnato a una modificazione significativa dell'HOMA IR, sia nei soggetti NGT che nei soggetti IGT.

È stato invece dimostrato che la somministrazione di olio di pesce in soggetti normoglicemici e con ridotta tolleranza ai carboidrati, parenti di primo grado di pazienti affetti da DMT2, è associata ad un miglioramento della funzione endoteliale attraverso la diminuzione del TNF- α , a ribadire la relazione nota fra lo stato infiammatorio cronico sub-clinico e le alterazioni vascolari.

E' oggi fortemente suggerita la necessità di precoci modificazioni dello stile di vita di soggetti predisposti a complicanze cardiovascolari [100,101]; noi riteniamo che questo studio offra interessanti e stimolanti informazioni per la caratterizzazione di strategie di intervento in grado di ritardare l'inizio o rallentare la progressione di complicanze vascolari associate alla condizione di familiarità per DMT2. Inoltre, la comprensione del ruolo relativo dell'infiammazione subclinica nel determinismo della disfunzione endoteliale apre la strada a trattamenti terapeutici innovativi e/o a nuove applicazioni dei trattamenti attualmente disponibili. In particolare, in questo studio è stato dimostrato che la somministrazione di acidi grassi poliinsaturi n-3, sotto forma di integratori alimentari, si associa ad un miglioramento della funzione endoteliale attraverso la diminuzione del TNF- α in soggetti con precoci anomalie vascolari, predisposti al DMT2 e all' aterosclerosi.

Tali risultati ribadiscono l'importanza di modificare lo stile di vita, in particolare di agire su fattori nutrizionali di "protezione"; infatti, sulla base delle

evidenze emerse , si conferma con forza la necessità di incrementare nella dieta l'apporto di acidi grassi n-3, derivati o da fonte alimentare o da supplementi nutrizionali.

Tuttavia, per quanto suggestivi, questi risultati non possono essere considerati conclusivi; infatti, il nostro lavoro presenta alcune importanti limitazioni. La prima consiste nella ridotta numerosità del campione; la seconda è nel periodo di trattamento dello studio, che può essere, a ragione, considerato relativamente breve. Solamente studi di più ampio respiro permetteranno di verificare il reale impatto di questo approccio terapeutico in una tale popolazione di soggetti, apparentemente sani, ma ad alto rischio cardiovascolare.

-
- [1] **Winer and Sowers.** *Epidemiology of Diabete.* J Clin Pharmacol 2004; 44: 397-405
- [2] **Barnett et al.** *Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs.* Diabetologia 1981; 20: 87-93.
- [3] **Koberling et al.** *Empirical risk figures for first degree relatives of non-insulin dependent diabetics.* In "Genetics of diabetes mellitus" London: Academic Press, 1982: 201-209.
- [4] **Haffner SM et al.** *Increased insulin concentration in nondiabetic offsprings of diabetic patients.* NEJM 1998; 319: 1297-1301
- [5] **Sarlund et al.** *Early abnormalities in coronary heart disease risk factors in relatives of subjects with NIDDM.* Arterioscler Thromb 1992; 12: 657-663
- [6] **Balletshofer MD, Ritting K, Enderle MD et al.** *Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance.* Circulation 2000; 101: 1780-1784
- [7] **Iellamo F, Tesauro M, Rizza S, Aquilani S, Cardillo C, Iantorno M, Turriziani M, Lauro R.** *Concomitant impairment in endothelial function and neural cardiovascular regulation in offsprings of type 2 diabetic subjects.* Hypertension Sep 2006; 48 (3): 418-423 Epub 2006 Jul 24
- [8] **Howard et al.** *Insulin sensitivity and atherosclerosis.* Circulation 1996; 93: 1809-1817
- [9] **Pannacciulli N, De Pergola G, Ciccone M, Rizzon P, Giorgino F, Giorgino R.** *Effect of the family history of type 2 diabetes on the intima-media thickness of the common carotid artery in normal weight, overweight and obese glucose-tolerant young adults.* Diabetes Care 2003; 26: 1230-34
- [10] **Luscher TF, Vanhoutte PM.** *The endothelium: modulator of cardiovascular function.* Boca Raton: CRC Press 1990
- [11] **Ross R.** *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature 1993; 362: 801-809
- [12] **De Caterina R.** *Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease.* Curr Op Lipidol 2000; 11: 9-23

-
- [13] **Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM.** *Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the “vulnerable” patient.* *Circulation* 2004; 110: 1926-1932
- [14] **Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM.** *Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the cardiovascular health study.* *Circulation* 2007; 115: 2390-2397
- [15] **Furchgott RF, Zawadzki JV.** *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* *Nature* 1980; 288: 373-376
- [16] **Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, et al.** *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical.* *Circ Res* 1987; 61: 866-879
- [17] **Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, et al.** *Impaired nitric oxide-mediated vasodilatation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.* *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 567-574
- [18] **Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, et al.** *Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C.* *Diabetes* 2001; 50: 159-165
- [19] **Steiberg HO, Chaker H, Leaming R, et al.** *Obesity/insul resistance is associated with endothelial dysfunction: implication for the syndrome of insulin resistance.* *J Clin Invest* 1996; 97: 2601-2610
- [20] **Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park J, King GL, Lo Gerfo FW, Horton ES, Veves A.** *Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes.* *Diabetes* 1999; 48:1856-1862
- [21] **Goldfine AB, Beckman JA, Betensky RA, Devlin H, Hurley S, Varo N, Schonbeck U, Patti ME, Creager Ma.** *Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function.* *J Am Coll Cardiol* Jun 2006; 47(12): 2456-2461
- [22] **Gurlek A, Bayraktar M, Kirazli S.** *Increased plasminogen activator-1 in offspring of type 2 diabetic patients.* *Diabetes Care* 2000; 23: 88-92

-
- [23] **Tesauro M, Rizza S, Iantorno M, Campia U, Cardillo C, Lauro D, Leo R, Turriziani M, Cocciolillo GC, Fusco A, Panza JA, Scuteri A, Federici M, Lauro R, Quon MJ.** *Vascular, metabolic, and inflammatory abnormalities in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus.* *Metabolism* Mar 2007; 56(3): 413-419
- [24] **Hopkins KD, Lehamann ED, Jones RL, Turay RC, Gosling RG.** *A Family history of NIDDM is associated with decreased aortic distensibility in normal healthy young adult subjects.* *Diabetes Care* 1996; 19: 501-503
- [25] **Yla-Herttuala et al.** *Expression of MCP-1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.* *PNAS* 1991; 88: 5252-5256
- [26] **Rollins BJ.** *Chemokines.* *Blood* 1997; 90: 909-928
- [27] **Hu FB, Stampfer MJ, Haffner SM, Solomon CG, Willet WC, Manson JE.** *Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes.* *Diabetes Care* Jul 2002; 25(7):1129-34
- [28] **Stern MP.** *Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis.* *Diabetes* Apr 1995; 44(4): 369-374
- [29] **Ginsberg HN.** *Insulin resistance and cardiovascular disease.* *J Clin Invest* Aug 2000; 106(4): 453-458
- [30] **Taegtmeyer H.** *Insulin resistance and atherosclerosis. Common roots for two common disease?* *Circulation* May 1996; 93(10): 1777-1779
- [31] **Fernandez-Real J M, Ricart W.** *Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome.* *Endocr Rev* Jun 2003; 24(3): 278-301
- [32] **Stout RW.** *Insulin and atheroma. 20-yr perspective.* *Diabetes Care* Jun 1990; 13(6): 631-654
- [33] **Arcaro G, Zamboni M, Rossi L, Turcato E, Covi G, Armellini E, Bosello O, Lechi A.** *Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity.* *Int J Obes Relat Metab Disord* Sep 1999; 23(9): 936-942
- [34] **Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Cloro C, Candigliota M, Scozzafava A, Mongiardo a, Mastroberto P, Chello M, Mattioli PL.** *Effects of atorvastatin and vitamin C on endothelial function of hypercholesterolemic patients.* *Atherosclerosis* Oct 2000; 152(2): 511-518

- [35] **Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M.** *Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1.* J Clin Invest Apr 1998; 101(8): 1784-1788
- [36] **Montagnani M, Quon MJ.** *Insulin action in vascular endothelium: potential mechanisms linking insulin resistance with hypertension.* Diabetes Obes metab Oct 2000; 2(5): 285-292
- [37] **Federici M, Pandolfi A, de Filippis EA, Pellegrini G, Menghini R, Lauro D, Cardellini M, Romano M, Sesti G, Lauro R, Consoli A.** *G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of endothelial nitric oxide synthase in cultured human endothelial cells.* Circulation Jan 2004; 109 (3): 399-405
- [38] **Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B.** *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells.* J Biol Chem Jan 2002; 277(3): 1794-1799
- [39] **Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL.** *Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats.* J Clin Invest 1999; 104: 447-457
- [40] **Baron AD, Steiberg HO, Chaker H, et al.** *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans.* J Clin Invest 1995; 96: 786-792
- [41] **Wang P, Ba ZF, Chaudry IH.** *Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation.* Am J Physiol Jun 1994; 266(6 Pt 2): H2535-2541
- [42] **Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Lee ME.** *Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life.* Circ Res Jul 1993; 73(1): 205-209
- [43] **Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D.** *Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo.* Cell Adhes Commun 1994; 2: 7-14
- [44] **Neumann B, Machleidt T, Lifka A, Pfeffer K, Vestweber D, Mak TW, Holzmann B, Kronke M.** *Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in*

- TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration.* J Immunol 1996; 156: 1587-1593
- [45] **Libby P.** *Inflammation in atherosclerosis.* Nature Dec 2002; 420(6917): 868-874
- [46] **Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A.** *Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes.* Trends Immunol Jan 2004; 25(1): 4-7
- [47] **Diamond.** *The double puzzle of diabetes.* Nature 2003; 423: 599-602
- [48] **Birbaum MJ.** *Turning down insulin signalling.* J Clin Invest Sep 2001; 108(85): 655-659
- [49] **Pradhan AD, Masson JE, Rifai N, et al.** *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.* JAMA 2001; 286: 327-334
- [50] **Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, et al.** *The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study.* Diabetes 2001; 50: 2384-2389
- [51] **Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM.** *Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes mellitus: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS).* Diabetes 2002; 51: 1131-1137
- [52] **Pickup JC, Crook MA.** *Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?* Diabetologia 1998; 41: 1241-1248
- [53] **Bang HO, Dyerberg J, Hjoorne N.** *The composition of food consumed by Greenland Eskimos.* Acta Med Scand 1976; 200: 69-73
- [54] **Hu FB, Bronner L, Willet WC, et al.** *Fish and omega-3 fatty acids intake and risk of coronary heart disease in women.* JAMA 2002; 287: 1815-21
- [55] **Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, et al.** *Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death.* JAMA 1998; 279: 23-28
- [56] **Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al.** *Effects of changes in fat, fish, and fiber intakes on death and myocardial reinfarction: Diet and Reinfarction Trial (DART).* Lancet 1989; 2: 757-761

-
- [57] **GISSI Prevenzione Investigators.** *n-3 PUFA and Vitamin E in 11,324 post-MI patients: Results of the GISSIPrevenzione trial.* Lancet 1999; 354: 447-455
- [58] **Tagawa H, Shimokawa H, Tagawa T, et al.** *Long-term treatment with eicosapentaenoic acid augments both nitric oxide-mediated and non-nitric oxide-mediated endothelium-dependent forearm vasodilatation in patients with coronary artery disease.* J Cardiovasc Pharmacol 1999; 33: 633-640
- [59] **Kang JX, Leaf A.** *Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids.Recent studies.* Circulation 1996; 94: 1774-1780
- [60] **Wilson PW.** *Diabetes mellitus and coronary heart disease.* Endocrinol Metab Clin North Am 2001; 30: 857-881
- [61] **Bonora E, Kiechl S, Oberhollenzer F, et al.** *Impaired glucose tolerance, Type II diabetes mellitus and carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck Study.* Diabetologia 2000; 43: 156-164
- [62] **Glauber H, Wallece P, Griver K, et al.** *Adverse metabolic effect of omega-3 fatty acid in non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Ann Intern Med 1988; 108: 663-668
- [63] **Borkman M, Chisholm DJ, Furler SM, et al.** *Effect of fish oil supplementation on glucose and lipid metabolism in NIDDM.* Diabetes 1989; 38: 1412-1426
- [64] **Schectman G, Kaul S, Kissebah AH.** *Effect of fish oil concentrate on lipoprotein composition in NIDDM.* Diabetes 1988; 37: 1567-1573
- [65] **Stacpoole PW, Alig J, Ammon L, et al.** *Dose-response effects of dietary fish oil on carbohydrate and lipid metabolism in hypertriglyceridemia (Abstract).* Diabetes 1988; 37 (Suppl 1): 12A
- [66] **Friedberg CE, Janssen MJ, Heine RJ, et al.** *Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis.* Diabetes Care 1998; 21: 494-500
- [67] **Montori VM, Farmer A, Wollan PC, et al.** *Fish oil supplementation in type 2 diabetes: a quantitative systematic review.* Diabetes Care 2000; 23: 1407-1415
- [68] **Connor WE.** *Diabetes, fish oil, and vascular disease.* Ann Intern Med 1995; 123: 950-962

-
- [69] **Brown A, Hu FB.** *Dietary modulation of endothelial function.* Am J Clin Nutr 2001; 73: 673-686
- [70] **Mc Veigh GE, Brennan GM, Cohn JN, et al.** *Fish oil improves arterial compliance in non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Arterioscler Thromb 1994 ; 14 : 1425-1429
- [71] **Mc Veigh GE, Brennan GM, Johnston GD, et al.** Andrews JW, Hayes JR : *Dietary fish oil augments nitric oxide production or release in patients with type23 (non-insulin dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia 1993; 36: 33-38
- [72] **Mori TA, Watts FG, Burke V, et al.** *Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of forearm microcirculation in hyperlipidaemic overweight men.* Circulation 2000; 102:1264-1269
- [73] **Basu A, Devaraj S, Jialal I.** *Dietary factors that promote or retard inflammation.* Arterioscler Thromb vasc Biol 2006; 26: 995-1001
- [74] **Rallidis LD, Paschos G, Liakos GK, Velssaridou AH, Anastasiadis G, Zampelas A.** *Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients.* Atherosclerosis 2003; 167: 237-242
- [75] **Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones JHC, lewis MJ.** *Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia.* JACC 2000; 35 (2): 265-270
- [76] **Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus.* Diabetes Care 2003; 26 (suppl 1): S5-S20
- [77] **Corretti MC, Todd J, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer DS, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield JE, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R.** *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilatation of the brachial artery.* J Am Coll Cardiol 2002; 39: 257-265
- [78] **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.** *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-*

cell function from a fasting plasma glucose and insulin concentrations in men. Diabetologia 1985; 28: 412-419

- [79] **Westerveld HT, de Graaf JC, van Breugel HH, Akkerman JW, Sixma JJ, Erkelens DW, Banga JD.** *Effects of low-dose EPA-E on glycemic control, lipid profile, lipoprotein(a), platelet aggregation, viscosity, and platelet and vessels wall interaction in NIDDM.* Diabetes care 1993; 16: 683-688
- [80] **Axelrod L, Camuso J, Williams E, Kleinman K, Briones E, Schoenfeld D.** *Effects of a small quantity of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in NIDDM. A randomized, prospective, double-blind, controlled study.* Diabetes Care 1994; 17:37-44
- [81] **Luo J, Rizkalla SW, Vidal H, Oppert JM, Colas C, Boussairi A, Guerre-Millo M, Chapuis AS, Chevalier A, Durand G, Slama G.** *Moderate intake of n-3 fatty acids for 2 months has no detrimental effect on glucose metabolism and could ameliorate the lipid profile in type 2 diabetic men. Results of a controlled study.* Diabetes Care 1998; 21: 717-724
- [82] **Yosefy C, Viskoper JR, Laszt A, Priluk R, Guita E, Varon D, Illan Z, Berry EM, Savion N, Adan Y, Lugassy G, Schneider R, Raz A.** *The effect of fish oil on hypertension, plasma lipids and hemostasis in hypertensive, obese, dyslipidemic patients with and without diabetes mellitus.* Prostaglandins leukot Essent Fatty Acids 1999; 61: 83-87
- [83] **Harris WS.** *N-3 fatty acids and human lipoprotein metabolism: an update.* Lipids 1999; 34: S257-S258
- [84] **Prichard BNC, Smith CCT, Ling KLE, Betteridge DJ.** *Fish oils and cardiovascular disease.* BMJ 1995; 310: 819-820
- [85] **Harris WS, Bulchandani D.** *Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides?* Curr Opin Lipidol 2006, 17: 387-39
- [86] **Hartweg J, Farmer AJ, Perera R, Holman RR, Neil HA.** *Meta-analysis of the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on lipoproteins and other emerging lipid cardiovascular risk markers in patients with type 2 diabetes.* Diabetologia 2007; 50(8): 1593-1602. Epub 2007 may 31
- [87] **Simopoulos AP.** *Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune disease.* J Am Coll Nutr 2002; 21(6): 495-505

-
- [88] **Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ.** *The effect on human tumor necrosis factor- α and interleukin 1b production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil.* Am J Clin Nutr 1996; 63: 116-122
- [89] **Trebble T, Arden NK, Stroud MA, Wootton SA, Burdge GC, Miles EA, Ballinger AB, Thompson RL, Calder PC.** *Inhibition of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation.* Br J Nutr 2003; 90: 405-412
- [90] **Bilsborough W, keen H, Taylor A, O'driscoll GJ, Arnolda L, Green DJ.** *Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy over conventional therapy improves endothelial function in adults with rheumatoid arthritis.* Rheumatol Int 2006; 26(12): 1125-1131. Epub 2006 Jun 24
- [91] **Anker SD, Coats AJS.** *How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH.* I J of Cardiology 2002; 86: 123-130
- [92] **Meigs JB, O'donnell CJ, Tofler GH, Benjamin EJ, Fox CS, Lipinska I, Nathan DM, Sullivan LM, D'Agostino RB, Wilson PW.** *Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study.* Diabetes 2006; 55(2): 530-537
- [93] **Stakos DA, Schuster DP, Sparks EA, Wooley CF, Osei K, Boudoulas H.** *Long-term cardiovascular effects of insulin sensitizer troglitazone on non-diabetic individuals with insulin resistance: double blind, prospective randomized study.* J Cardiol Apr 2003; 41(4): 183-190
- [94] **Overkamp D, Volk A, Maerker E, Heide PE, Walh HG, Rett K, Haring HU.** *Acute effect of glimepiride on insulin-stimulated glucose metabolism in glucose-tolerant insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care Nov 2002; 25(11): 2065-2073
- [95] **Osei K, Gaillard T, Kaplow J, Bullock M, Schuster D.** *Effects of rosiglitazone on plasma adiponectin, insulin sensitivity and insulin secretion in high-risk African Americans with impaired glucose tolerance test and type 2 diabetes.* Metabolism Dec 2004; 53(12): 1552-1557
- [96] **Levin K, Hother-Nielsen O, Henriksen JE, Beck-Nielsen H.** *Effects of troglitazone in young first-degree relatives of patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care Jan 2004; 27(1): 148-154

- [97] **McSorley PT, Bell PM, Young IS, Atkinson AB, Sheridan B, Fee JP, McCance DR.** *Endothelial function, insulin action and cardiovascular risk factors in young healthy adult offspring of parents with type 2 diabetes: effect of vitamin E in a randomized double-blind, controlled clinical trial.* Diabet Med Jun 2005; 22(6): 703-710
- [98] **De Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, Laflor C, Sicuro F, Wiernsperger N, Bottino D, Bouskela E.** *Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetes patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance.* Diabetes Care May 2006; 29(5): 1083-1089
- [99] **Cardellini et al.** *Carotid artery intima media thickness is associated with insulin mediated glucose-disposal in nondiabetic normotensive offsprings of type 2 diabetic patients.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2006; Sep epub ahead of print.
- [100] **Lawlor DA, Davey Smith G, Ebrahim S.** *Life course influences on insulin resistance: findings from the British Women's Heart and Healty Study.* Diabets Care Jan 2003; 26(1): 97-103
- [101] **Ostergard T, Nyholm B, Hansen TK, Rasmussen LM, Ingerslev J, Sorensen KE, Botker HE, Saltin B, Schmitz O.** *Endothelial function and biochemical vascular markers in first-degree relatives of type 2 diabetic patients: the effect of exercise training.* Metabolism Nov 2006; 55(11): 1508-1515