



Università  
degli Studi di Palermo

**AZIENDA UNIVERSITARIA POLICLINICO  
DIPARTIMENTO BIOMEDICO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA  
(Di.Bi.M.I.S.)  
Dottorato di Ricerca in “Genetica e fisiopatologia del danno cardiovascolare  
nelle malattie endocrino-metaboliche” XXII Ciclo  
Direttore: Prof. G. Licata**

# **Fattori emergenti di rischio cardiovascolare: ruolo dell’infiammazione e del’insulino-resistenza**

**MARIANNA BONO**

**ANNO ACCADEMICO 2009-2010**

# Fattori emergenti di rischio cardiovascolare: ruolo dell'infiammazione e del'insulino-resistenza

**12 APRILE 2011**

**SALA DEI BARONI-PALAZZO STERI**

**TUTOR: Prof.ssa T. Di Chiara**

<b><i>CAPITOLI</i></b>		<b><i>Pagina</i></b>
<b>Capitolo 1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
<b>Capitolo 2</b>	<b>Infiemmazione</b>	<b>10</b>
	• <b>Fisiopatologia dell'infiammazione</b>	<b>11</b>
	• <b>Citochine infiammatorie</b>	<b>13</b>
	• <b>Meccanismi biologici dell'infiammazione</b>	<b>19</b>
<b>Capitolo 3</b>	<b>Insulino-resistenza</b>	<b>23</b>
<b>Capitolo 4</b>	<b>Contributo clinico</b>	<b>28</b>
<b>Capitolo 5</b>	<b>Discussione</b>	<b>34</b>
<b>Capitolo 6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>43</b>
<b>Capitolo 7</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>46</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

# **FATTORI EMERGENTI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE: RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE E DELL'INSULINO-RESISTENZA**

## **INTRODUZIONE:**

Le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di morte nei paesi più sviluppati, ma la loro incidenza va notevolmente aumentando, in considerazione di una globalizzazione sempre più rapida, anche nei paesi in via di sviluppo. Ciò sembra essere dovuto all'incremento della disponibilità di cibo e delle abitudini voluttuarie, alla riduzione dello svolgimento di una sana attività fisica, con conseguente incremento ponderale progressivo tanto da far definire il problema legato all'incremento di peso su scala mondiale come "Globesity". Lo studio di tutti i fattori determinanti una maggiore incidenza di malattie cardiovascolari su scala mondiale ha dato inizio, sin dagli anni 50', alla necessità di una definizione che ben racchiudesse tutti questi elementi, denominando quella che oggi viene definita come Sindrome Metabolica. Questa sindrome è stata largamente dibattuta negli ultimi decenni poiché già nel 1998 l'OMS stabilì che l'Insulino Resistenza rappresenta un elemento determinante della Sindrome Metabolica, ma successivamente si comprese che identificare l'Insulino-Resistenza è sicuramente difficile, soprattutto effettuare la sua diagnosi nella pratica clinica quotidiana, in quanto l'esame gold standard per la sua diagnosi è il "Clamp euglicemico iperinsulinemico". Nel 2001 il National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel III (ATP III) stabilì che non era necessaria la presenza di un criterio dominante per definire la sindrome, ma la associazione di almeno tre criteri tra quelli elencati sotto. Nel 2005 l'IDF (International Diabetes Federation) stabilì che criterio fondamentale per formulare la diagnosi di Sindrome Metabolica era la misurazione della circonferenza vita, strettamente correlata alla presenza di obesità addominale (e

quindi all'insulino-resistenza), alla quale poi si associavano due criteri minori. In questo modo si rendeva molto più semplice identificare i soggetti con Sindrome Metabolica nella pratica clinica quotidiana, senza dover ricorrere a tests di difficile esecuzione ed interpretazione quale il "Clamp euglicemico iperinsulinemico". Uno degli indici più utilizzati è L'HOMA-IR, che fornisce una stima del' IR tramite una formula matematica che utilizza la concentrazione di glucosio e di insulina a digiuno.

#### Confronto della diagnosi di Sindrome Metabolica tra ATP III e IDF

	<b>Criteri ATP III</b>	<b>Criteri IDF</b>
	<i>Presenza di almeno 3 fattori</i>	
Circonferenza Addome	>102 cm. Uomo  > 88 cm. Donna	<b>&gt; 94 cm. Uomo</b>  <b>&gt; 80 cm Donna</b>  <b>Presenza di almeno 2 fattori</b>
Pressione Arteriosa	≥130/85 mmHg	<b>≥130/85 mmHg</b>
Trigliceridi	≥ 150 mg/dL	<b>≥150 mg/dL</b>
Colesterolo HDL	< 40 mg/dL uomo  < 50 mg/dL donna	<b>&lt; 40 mg/dL uomo</b>  <b>&lt; 50 mg/dL donna</b>
Glicemia a digiuno	≥110 mg/dL	<b>100 mg/dL</b>

La Sindrome Metabolica quindi è caratterizzata da un insieme di alterazioni emodinamiche e metaboliche, strettamente correlate tra loro, che condizionano la comparsa e la progressione del danno d'organo nella sua molteplicità di espressione. L'eterogeneità di presentazione dei pazienti con tale Sindrome, la possibile modificazione temporale dei quadri clinici (correlati a fenomeni parafisiologici quali invecchiamento e menopausa), ne rendono ancora a tutt'oggi difficile una definizione univoca. Mentre secondo la classificazione del NCEP ATP III l'Insulino-resistenza potrebbe rappresentare l'elemento

unificante di tutte le alterazioni che caratterizzano la Sindrome Metabolica, per l'IDF, l'elemento fondamentale per l'insorgenza della Sindrome Metabolica è l'insulino-resistenza, identificata come adiposità addominale. La presenza di una adiposità viscerale spiccata nei soggetti insulino-resistenti si accompagna ad una serie di alterazioni metaboliche, diabetogene, aterogene, protrombotiche e proinfiammatorie, tipiche della Sindrome Metabolica. In condizioni normali il tessuto adiposo sotto l'azione insulinica immagazzina trigliceridi che vengono utilizzati nel digiuno tramite lipolisi. In condizioni di obesità viscerale ed insulino-resistenza, si ha una lipolisi accelerata con aumento di acidi grassi liberi (FFA). Il tessuto adiposo inoltre ha assunto vera e propria dignità di organo con funzioni immuno-metaboliche-endocrine. Il tessuto adiposo viscerale è in grado di produrre adipochine quali: *Leptina* (implicata nella segnalazione all'ipotalamo della sensazione di sazietà, per scongiurare l'incremento volumetrico degli epatociti); *TNF-alfa* (prodotto dagli adipociti in condizioni di Insulino-resistenza e di ipertrofia della cellula adiposa, agisce alterando l'espressione del gene di IRS-1, citochina post-recettoriale responsabile della trasmissione del segnale insulinico); *Interleuchina-6* (determina la sensazione di stanchezza, iperprodotta negli stati di Insulino-resistenza); *Adiponectina* (ha azione insulino-sensibilizzante e riduce l'espressione di TNF-alfa ed IL-6). Queste adipochine potrebbero avere un ruolo fondamentale nella patogenesi dell' Insulino-resistenza (1). Il tessuto adiposo inoltre è un potente attivatore della Proteina Chinasi C che aumenta l'espressione di IKK $\alpha$  ed IKK $\beta$ , modulatori dell'attivazione del fattore nucleare  $\kappa\beta$  (NFK $\beta$ ) ed aumenta l'espressione di numerosi markers e mediatori di flogosi che possono causare Insulino-resistenza. Gli altri componenti della Sindrome Metabolica, quali l'ipertensione, Dislipidemia, Fumo di sigaretta, Obesità rappresentano sicuramente i fattori di rischio tradizionali per l'insorgenza delle malattie cardiovascolari, ma negli ultimi anni, con il progressivo aumento dell' incidenza del Diabete Mellito nella popolazione mondiale, si è osservato che in realtà il Diabete stesso rappresenta forse il più importante fattore di

rischio per le malattie cardiovascolari. Infatti studi epidemiologici di grandi dimensioni hanno dimostrato che il rischio di arteriopatia coronarica è aumentato da 2 a 6 volte rispetto ai soggetti non diabetici (2). Questo aumento del rischio cardiovascolare associato al Diabete può essere solo in parte spiegato dagli effetti negativi del Diabete di tipo 2 sui fattori di rischio “classici” quali ipertensione e dislipidemia, ma una parte sostanziale dell’ aumentato rischio è attribuibile agli effetti direttamente svolti dall’iperinsulinemia, dall’insulino-resistenza e dall’attivazione di uno stato di flogosi cronica strettamente correlato all’insulino-resistenza. In realtà i principali fattori di rischio per le malattie cardiovascolari dei pazienti diabetici sono simili a quelli dei pazienti non diabetici: Colesterolo HDL più basso, elevato rapporto colesterolo tot/HDL, ipertrigliceridemia, ipertensione arteriosa. Oltre ai fattori di rischio dimostrati quali dislipidemia ed ipertensione, il Diabete si associa ad un certo numero di nuovi fattori di rischio legati in larga misura all’insulino-resistenza ed alla flogosi cronica, che svolgono un ruolo chiave nello sviluppo della Sindrome coronarica acuta e nell’Infarto del Miocardio.

Essi includono:

- ❖ **Dislipidemia**, caratterizzata da elevate concentrazioni di LDL dense di piccole dimensioni, di VLDL ricche di trigliceridi e da ridotti livelli di HDL;
- ❖ **Disfunzione endoteliale**, caratterizzata da aumentata espressione dell’inibitore dell’attivatore del plasminogeno PAI-1 e delle molecole di adesione cellulare e da ridotta attività vasomotoria correlata alla minore disponibilità di OSSIDO NITRICO (NO);
- ❖ **Stress ossidativo** che si traduce in un aumento delle concentrazioni di markers quali LDL ed F2-isoprastani ossidati;
- ❖ **Inflammatione cronica**, associata ad aumentata espressione di markers quali Fibrinogeno e Proteina C Reattiva;

- ❖ **Anomalie della coagulazione e della Fibrinolisi** che risultano nella eccessiva produzione di fibrinogeno ed espressione di PAI-1 ed attivatore del Plasminogeno di tipo tissutale (t-PA);
  
- ❖ **Glicazione delle proteine** con formazione di prodotti di Glicazione avanzata (AGE) nelle LDL e nel collagene sub-intimale con una serie di effetti pro-aterogeni.

Nonostante la maggiore incidenza di Malattie Cardiovascolari, la maggiore gravità delle manifestazioni cliniche e la minore risposta alle strategie di rivascolarizzazione nei pazienti diabetici rispetto ai non diabetici, diversi studi interventistici di ampie dimensioni hanno dimostrato che i pazienti diabetici traggono maggiore beneficio dalla modificazione dei fattori di rischio rispetto ai pazienti non affetti da diabete (3)

## **Capitolo 2**

### **Infiammazione**

## **L'INFIAMMAZIONE:**

L'infiammazione può essere definita come la risposta normale del tessuto ad un insulto o ad una infezione. Essa è considerata una risposta protettiva nella quale l'obiettivo finale è allontanare la causa scatenante e riportare il tessuto alla struttura originaria. La risposta infiammatoria è comunque strettamente connessa con i processi riparativi. Senza questo meccanismo di difesa i tessuti non verrebbero riparati per cui gli agenti flogistici e/o i meccanismi di danno cellulare non verrebbero rimossi ed allontanati. L'evento critico nell'inizio del processo flogistico è il riconoscimento e la distruzione dell'agente infettivo o delle cellule danneggiate da parte dei fagociti. Questo fenomeno è condiviso da tutte le specie del regno animale. Nei vertebrati, il trauma fisico e/o l'infezione da parte di microrganismi, induce segnali di allarme che provocano un aumento della viscosità del sangue contenuto nei vasi vicino la sede di flogosi o danno ed accumulo dei leucociti nel sito di flogosi. Questo comporterà l'insorgenza dei quattro ben noti segni della flogosi, quali arrossamento e gonfiore con calore e dolore (definiti anticamente *rubor et tumor cum calor et dolor*). In parallelo questo processo locale stimola una reazione definita risposta di fase acuta, che si manifesta con il rapido cambiamento delle proteine di fase acuta (5). Così in risposta ad un danno tissutale determinato da un trauma o da un'infezione la risposta infiammatoria risulta costituita da una complessa rete di interazioni molecolari e cellulari che agiscono in maniera tale da ripristinare l'omeostasi cellulare e la riparazione dei tessuti. La risposta dell'organismo è composta sia di eventi locali, che di eventi sistemici mediati dalle citochine. Se il danno non viene completamente riparato l'infiammazione diviene un processo cronico che danneggia i tessuti circostanti. Infatti durante una flogosi cronica

le risposte immuni per riparare il danno tissutale procedono simultaneamente. Il danno collaterale causato da questo tipo di infiammazione di solito si accumula lentamente a volte asintomaticamente per diversi anni, generando poi un danno tissutale severo (6). Un esempio di segnale sistemico di flogosi è rappresentato dall' IL-1 che stimola i centri nervosi ipotalamici ed attiva l'asse ipotalamo-ipofisi-surreni che rappresenta la risposta allo stress ed il sistema nervoso simpatico (7). Ciò induce un cambio nel profilo dei neurotrasmettitori e dei neuropeptidi aumentando le proteine intracellulari dello stress. Nei vertebrati l'infiammazione è mediata dai leucociti polimorfonucleati e dai monociti/macrofagi sostenuti dalle cellule tissutali locali e che può coinvolgere i linfociti. Il corso dell'infezione è di solito accompagnato da un set di cambiamenti comportamentali riferiti alla malattia che includono febbre, debolezza, difficoltà di concentrazione, inappetenza e mancata voglia di bere, perdita di interesse per l'ambiente circostante. A livello molecolare questi effetti sono dovuti a citochine proinfiammatorie quali: IL-1, IL-6, e TNFalfa. I geni coinvolti nel processo infiammatorio sono numerosi, così come le variazioni genomiche di molti di questi geni. Molti geni coinvolti nella cascata infiammatoria sono importanti candidati che influenzano la risposta allo stimolo. Il ruolo di un background genetico individuale e la predisposizione all'estensione di una risposta infiammatoria è determinato dalla variabilità dei geni codificanti per i mediatori endogeni che costituiscono le vie di conduzione della flogosi. La risposta primaria dell'infiammazione è mediata dal recettore di riconoscimento dell'agente patogeno detto TLR (Toll-like receptor), dalle citochine proinfiammatorie quali il TNF-alfa, IL-1, IL-6, dalla citochina antinfiammatoria quale l'IL-10, il TGF-beta, gli eicosanoidi e le metalloproteinasi. Le risposte pro- ed antinfiammatorie contribuiscono all'outcome dei pazienti con infiammazione sistemica. Comunque i mediatori della flogosi sono candidati a determinare il background genetico umano che è responsabile delle differenze interindividuali nelle risposte infiammatorie al danno. La

capacità geneticamente determinata della produzione dei mediatori e del rilascio potrebbe contribuire ad un ampio range di manifestazioni cliniche di una malattia infiammatoria. La comprensione della determinazione genetica del processo infiammatorio include la possibilità di sviluppare e nuovi approcci terapeutici al processo infiammatorio correlato alla malattia. La valutazione di possibili marcatori genetici per la stratificazione del rischio dei pazienti con infiammazione sia cronica che sistemica e persone con elevato rischio di sviluppare un processo infiammatorio ha stimolato a migliorare i livello di studi di epidemiologia genetica. Le varianti dei geni infiammatori possono sostanzialmente contribuire agli studi di predisposizione genetica dell'infiammazione (8).

## **Molecole infiammatorie**

### **Interleuchina 1 (IL-1)**

L'interleuchina 1 è il prototipo delle citochine infiammatorie ed è il primo mediatore delle risposte infiammatorie sistemiche quali ipofagia, sonno ad onde lente, disturbi del comportamento e cambiamenti di tipo neuroendocrino. Il cluster dei geni della IL-1 contiene tre geni per IL-1alfa, IL-1 beta e l'antagonista del recettore dell' IL-1. L'IL1 promuove l'interazione tra le cellule endoteliali ed i leucociti circolanti, induce l'attivazione e la proliferazione dei monociti-macrofagi e stimola la mitogenesi delle cellule muscolari lisce e la sintesi dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (I-PAI1). Per questo motivo si pensa che svolga un ruolo chiave nell'aterogenesi e nella trombosi (9). L'antagonista per il recettore dell' IL1 si lega ai recettori dell'IL1 senza indurre risposta cellulare, antagonizzando competitivamente gli effetti infiammatori di IL1alfa e beta. I livelli dell'antagonista per il recettore dell' IL1 sono regolati da

meccanismi di equilibrio tra varie molecole (stimolatorie ed inibitorie). Una disregolazione del bilancio tra IL-1 ed il suo antagonista è uno dei fattori che influenza il decorso, la suscettibilità e la severità di molte malattie (10). Questo antagonista per il recettore dell' IL1 ha attratto su di se l'attenzione degli studiosi poiché i suoi livelli sono elevati in patologie che hanno aspetti diversi quali: sepsi, cancro, m. metaboliche ed autoimmuni. Mentre nella popolazione sana il rapporto tra IL1 e Il-1ra è circa 1 e mostra minime variazioni, l'aumento dell' IL-1ra circolante corrisponde ad un bilanciamento dei livelli di IL1 che sono aumentati per un processo distruttivo e può rappresentare un meccanismo di prevenzione ad una prolungata risposta infiammatoria. IL1ra è stato anche considerato come una proteina di fase acuta poiché la sua espressione è regolata dalle citochine pro infiammatorie degli epatociti (11).

### **Interleuchina-6**

E' una citochina pleiotropica, capace di regolare la proliferazione, la differenziazione e l'attività di una varietà di tipi cellulari e gioca un ruolo più importante nel rimodellamento osseo, nell'omeostasi neuroendocrina, nell'emopoiesi e nella regolazione del sistema immune. Ha un ruolo molto importante nella risposta di fase acuta e nel bilanciamento tra meccanismi pro- ed antinfiammatori. Stimola l'attivazione endoteliale, la proliferazione delle cellule muscolari lisce ed il reclutamento dei leucociti. L'IL-6 è coinvolta nell'alterato metabolismo lipidico e nella produzione dei trigliceridi, rappresentando un grosso fattore di rischio per le malattie cardiovascolari. Il-6 riduce l'attività della lipoproteina lipasi ed i livelli monomerici di questa nel plasma, mentre aumenta la captazione lipidica dei macrofagi. I macrofagi attivati esprimono IL-6 suggerendo un ruolo importante di questa citochina nella progressione del processo aterosclerotico. Durante il danno vascolare le cellule muscolari lisce sono esposte alle

piastrine ed ai loro prodotti e la produzione di citochine dalle cellule muscolari lisce probabilmente contribuisce al danno vascolare. Inoltre l'IL-6 circolante stimola l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene la cui attivazione è associata con obesità centrale, ipertensione ed insulino-resistenza. Per questi motivi è stato proposto un ruolo per la IL-6 nella patogenesi delle malattie cardiovascolari attraverso una combinazione di meccanismi autocrini, paracrini ed endocrini (12). Come già detto nell'introduzione i markers infiammatori sono associati allo sviluppo di malattie coronarie, alla severità della malattia ed al manifestarsi di eventi cardiovascolari (13). Biasucci et al. suggeriscono che gli elevati livelli di IL-6 sono predittivi dei futuri eventi cardiovascolari ed indicano una prognosi infausta negli eventi coronarici acuti (14).

### **Interleuchina-10**

Citochina con attività antiinfiammatoria e stimola i linfociti B. E' prodotta dalle cellule T attivate dai linfociti B, dai monociti-macrofagi e cellule dendritiche. La principale funzione di IL-10 sembra essere limitare e completare il segnale infiammatorio. Molte linee di evidenza indicano un coinvolgimento di IL-10 nello sviluppo di aterosclerosi. Infatti l'IL-10 può limitare la progressione dell' aterosclerosi come visto in esperimenti e possiede molti effetti antiaterogeni includenti l'inibizione dell'adesione dei monociti LDL attivati all'endotelio e la down regulation della sintesi di fibrinogeno. E' rintracciabile nelle placche aterosclerotiche umane ed è stato considerato giocare un ruolo chiave nella progressione dell'aterosclerosi coronarica. I livelli sierici di IL-10 possono essere importanti nella valutazione prognostica dei pazienti con sindrome coronarica acuta (15).

## **Tumor Necrosis Factor**

Il cluster dei geni del TNF codifica per 3 proteine infiammatorie TNFalfa, TNFbeta e linfotossina-beta. Molti polimorfismi sono documentati nel cluster dei geni del TNF. I maggiori effetti sull'apparato cardiovascolare includono l'aumentata espressione di molecole di adesione e proteine HLA, il rilascio di citochine endoteliali ed ossido nitrico, l'aumentata permeabilità vascolare, la riduzione dell'attività della lipoproteina lipasi, l'aumentata sintesi di acidi grassi epatici coinvolti nella genesi dell'obesità e dell'insulino-resistenza ed effetti pro trombotici (attraverso l'aumentata espressione di Inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 e fattore di von Willebrand ed attraverso la soppressione della proteina C ad azione anticoagulante (16).

## **TGF-beta**

E' espresso da diversi tipi cellulari: piastrine, cellule endoteliali, emopoietiche cellule del tessuto connettivo. Le sue maggiori azioni sono la immunosoppressione, la riduzione della flogosi, la regolazione della proliferazione cellulare, la migrazione cellulare, la differenziazione cellulare, la produzione della matrice extracellulare quale il collagene. Vari studi suggeriscono una relazione inversa tra TGF-beta e malattie cardiovascolari, mentre altri suggeriscono un ruolo nella re-stenosi vascolare (16). E' stato suggerito che il TGF-beta può interferire con lo sviluppo di aterosclerosi, principalmente attraverso l'azione sulla funzione endoteliale. TGF-beta modula

l'espressione endoteliale di molte molecole coinvolte nell'adesione cellulare o nella regolazione del tono vasomotorio e nella proliferazione cellulare. TGF-beta preserva anche la funzione endoteliale e protegge contro il danno da ri-perfusione in molte situazioni da ri-perfusione dopo ischemia. Un altro legame tra TGF-beta e malattie cardiovascolari è dato dall'interazione con il sistema fibrinolitico (17).

### **Interferone-gamma**

Regolatore chiave dello sviluppo e funzione del sistema immune, gioca un ruolo chiave nella difesa dai patogeni intracellulari (18). Vi sono evidenze che polimorfismi di IFN-  $\gamma$  possono essere coinvolti nella suscettibilità alle infezioni esterne. Gioca anche un ruolo aterosclerosi. Recenti scoperte supportano l'ipotesi che un componente cruciale dell'aterosclerosi è rappresentato dalla risposta immune cellulo-mediata, che è inappropriata in termini di tempo d'insorgenza, intensità ed obiettivi. D'altra parte l'evidenza più diretta sul ruolo cruciale delle cellule T, dell'IFN-  $\gamma$  e delle molecole guidate dall' IFN-  $\gamma$  nell'aterosclerosi è dimostrato da esperimenti su topi con deficit combinato di Apolipoproteina E (apoE) e del recettore per IFN-  $\gamma$  , nei quali lo sviluppo di ateromi è significativamente ridotto rispetto a topi con deficit esclusivo di Apo E.

### **Metalloproteasi**

Sono enzimi proteolitici che degradano la matrice intracellulare, consentendo il rimaneggiamento del tessuto connettivo durante i normali processi biologici. Il rimodellamento vascolare è solitamente riconosciuto come un elemento determinante per le più importanti patologie vascolari comprese l'aterosclerosi e la restenosi ed è ormai universalmente accettato che la deregolazione del sistema delle Metalloproteasi gioca un ruolo cardine nel rimodellamento vascolare e nell'aterosclerosi.(19), studiando le varianti genetiche delle Metalloproteasi, associate

con maggiore longevità, si riesce meglio a valutare il rapporto causale nel processo aterosclerotico.

### **Ciclossigenasi, Lipossigenasi**

Le Ciclossigenasi (COX-1, COX-2) sono enzimi chiave nella conversione dell'acido arachidonico ai precursori di mediatori lipidici attivi, eicosanoidi, che includono prostaglandine, trombossani e prostaciline. La Ciclossigenasi gioca un ruolo chiave nei processi fisiopatologici delle malattie infiammatorie. L'enzima indotto dalla COX-2 si trova espresso nel sistema nervoso centrale, in particolare nei neuroni ippocampali e piramidali, nei leucociti circolanti, nelle cellule vascolari ed infiammatorie. Comunque nell'encefalo dei pazienti affetti da M. di Alzheimer la sua espressione si correla con la densità delle placche amiloidi e delle neurofibrille. In due differenti studi la mutazione -765GC nella regione promoter del gene per la COX-2, comporta una significativa riduzione dell'attività di promoter ed è dimostrato essere associato con il rischio ridotto di infarto del miocardio e stroke, come nella M. di Alzheimer (20). Gli Eicosanoidi, i leucotrieni generati dall'a. arachidonico attraverso l'azione della 5-lipossigenasi negli ultimi 20 aa. Sono stati riconosciuti come responsabili di una varietà di disordini infiammatori. I recettori accoppiati alle proteine G mediano gli effetti dei leucotrieni in differenti tipi cellulari. Studi recenti hanno dimostrato che i polimorfismi della Lipossigenasi coinvolti nella ridotta espressione della 5-Lipossigenasi sono meno rappresentati nei pazienti con M di Alzheimer ed in pazienti affetti da una forma più severa di aterosclerosi (21).

## **Meccanismi biologici dell'infiammazione**

L'infiammazione è un processo reattivo verso agenti patogeni di qualsiasi natura attraverso cui l'organismo si difende, innescando i processi del sistema immunitario (5). L'ultimo obiettivo del processo infiammatorio è di liberare l'organismo da ogni entità che generi danno cellulare (ad esempio i microorganismi, le tossine, ecc.) o dagli effetti del danno stesso (ad esempio le cellule morte ed i tessuti necrotici). L'infiammazione distrugge, diluisce o contiene l'agente nocivo ed allo stesso tempo innesca una serie di eventi che riparano e ricostituiscono il tessuto danneggiato. Una funzione critica dell'infiammazione è il reclutamento, nel sito danneggiato, delle cellule del sistema immunitario, i leucociti. Questo fenomeno, chiamato chemiotassi, si verifica tramite l'incremento locale del flusso ematico e attraverso mutamenti strutturali dei microvasi. I leucociti ingeriscono gli agenti tossici, uccidono i microorganismi, degradano il tessuto necrotico e gli antigeni estranei. Liberando enzimi, mediatori chimici e radicali dell'ossigeno o dell'azoto, i leucociti sostengono l'infiammazione ed oltre a ricoprire un ruolo effettore protettivo possono, in alcuni casi, indurre danni nei tessuti circostanti. Infatti, nel caso in cui, a causa di un alterato meccanismo regolatorio, lo stato infiammatorio si prolunghi, l'infiammazione può diventare nociva e risultare implicata nella patogenesi di numerose malattie. Più in dettaglio, l'infiammazione può essere definita di tipo acuto o cronico. L'infiammazione acuta rappresenta la risposta immediata ad un agente dannoso, è di durata relativamente breve (va da minuti ad alcuni giorni) ed è principalmente caratterizzata dalla formazione dell'edema e dalla migrazione dei leucociti, in prevalenza granulociti neutrofili. L'infiammazione cronica, che è generalmente il risultato di stimoli persistenti, è di durata più lunga ed è

caratterizzata, dal punto di vista istologico, dalla presenza di altri tipi di cellule leucocitarie (linfociti e macrofagi), dalla proliferazione dei vasi sanguigni e dalla fibrosi o dalla necrosi del tessuto. In alcuni casi l'infiammazione cronica può essere preceduta da una fase iniziale di infiammazione acuta, altre volte inizia in maniera asintomatica e con un'intensità ridotta. L'infiammazione cronica può verificarsi in seguito ad infezioni persistenti dovute a microorganismi che riescono a sfuggire al controllo del sistema immune, come ad esempio il *Mycobacterium tuberculosis* (agente eziologico della tubercolosi) o il *Treponema pallidum* (che causa la sifilide); in seguito all'esposizione prolungata ad agenti potenzialmente tossici di origine esogena o endogena, oppure a causa di fenomeni di autoimmunità. Le cellule coinvolte nell'infiammazione cronica vengono reclutate nel sito dell'infiammazione, si attivano e rilasciano innumerevoli fattori solubili che mediano il danno e la fibrosi del tessuto. Tali molecole svolgono un ruolo chiave nell'inizio e nell'esecuzione della risposta infiammatoria e tra le loro funzioni principali vi è l'induzione della dilatazione dei vasi, la chemiotassi, l'adesione e l'attivazione dei leucociti, la tossicità diretta nei confronti del microorganismo invasore, la proliferazione dei fibroblasti, la deposizione del collagene e l'angiogenesi (6). Di grande rilevanza fra questi mediatori sono le citochine, molecole di natura proteica, che agiscono anche a bassissime concentrazioni, interagendo mediante legami ad alta affinità con recettori specifici espressi sulle cellule bersaglio. Le citochine mediano la comunicazione intercellulare intervenendo nell'indirizzo, nella regolazione e nella terminazione dei processi infiammatori. Esse costituiscono una trama complessa di relazioni e, dalla loro reciproca regolazione, dipende l'esito finale dei processi biologici che vengono regolati. Un aspetto importante è legato alle quantità di mediatori solubili che vengono prodotti in risposta ad uno stimolo. Ad esempio, il rilascio extracellulare di bassi livelli di una citochina proinfiammatoria, può aumentare l'espressione di altre citochine e delle molecole di adesione per i leucociti, tutti fattori che amplificano la

cascata infiammatoria; al contrario, livelli elevati di essa, possono danneggiare cellule o tessuti. Per finire, poiché le citochine rappresentano degli strumenti estremamente efficaci nelle risposte immunitarie, che possono rivelarsi anche armi pericolose, esiste in natura un complesso sistema atto a regolarne finemente l'attività. Le citochine ad esempio, possono essere prodotte in una forma immatura che viene attivata tramite il taglio operato da specifici enzimi rilasciati solo in determinate condizioni; possono esistere dei recettori solubili, oppure delle proteine dalla funzione analoga, che legandosi alla citochina bersaglio, ne neutralizzano l'azione impedendo che si leghi ai recettori di membrana; inoltre possono esistere delle molecole con la funzione di antagonisti recettoriali che, legandosi al recettore specifico, impediscono il legame della citochina e l'innescare degli eventi biologici che essa influenza. Queste e molte altre forme di controllo dell'attività di una citochina rappresentano un sistema di sicurezza attraverso il quale l'organismo si tutela dalla possibile azione nociva di queste molecole. Oltre al ruolo chiave delle citochine nella cronicizzazione, ma anche nella limitazione del processo infiammatorio, non possiamo tralasciare il ruolo chiave svolto dall'endotelio. Quello che fino ad alcuni anni fa veniva ritenuto esclusivamente il rivestimento interno del vaso, ha mostrato di svolgere funzioni di organo autocrino, paracrino ed endocrino che, mediante la produzione di sostanze vasoattive svolge una funzione chiave nella modulazione del tono e della struttura vascolare, così come nella regolazione della bilancia emocoagulativa. Fisiologicamente l'endotelio svolge un'attività antitrombotica (mediante inibizione dell'adesione e dell'aggregazione piastrinica), un'attività antiproliferativa (mediante inibizione della migrazione e della proliferazione delle cellule muscolari lisce) ed un'attività antinfiammatoria (inibisce l'adesione dei monociti e l'espressione di molecole di adesione intercellulari) (22). In considerazione di questi molteplici ruoli svolti dall'endotelio, è comprensibile quantificare come enorme il danno dovuto ad alterazioni a carico di quest'ultimo. Nel

corso degli studi in merito alla disfunzione endoteliale come primum movens del processo aterosclerotico un ruolo chiave è esercitato anche dall'insulino-resistenza. In condizioni normali l'Insulina esercita un'azione vasodilatante a carico di tutto l'albero vascolare ed è in grado di stimolare la produzione di ossido nitrico. La flogosi cronica, l'insulino-resistenza e la disfunzione endoteliale sembrano essere legate dall'ipotesi della "mild vascular inflammation", sostenuta dall'attivazione del sistema Renina-Angiotensina che induce disfunzione endoteliale che, a sua volta, promuove lo stato di Insulino-resistenza e la progressione verso l'iperglicemia manifesta. In altri termini, si attivano meccanismi riverberanti ed automantenentisi, che, se non prontamente riconosciuti ed interrotti, promuovono il danno d'organo e la progressione verso gli eventi clinici.

## **Capitolo 3**

### **Insulino-resistenza**

## **INSULINO-RESISTENZA**

Il mantenimento della tolleranza al glucosio è una funzione di enorme importanza per l'organismo e la condizione di euglicemia viene garantita dall'equilibrio tra la quota che giunge al sangue dopo essere stata assorbita dal tratto gastrointestinale o dal fegato/rene e la clearance del glucosio a carico del muscolo, del circolo splacnico e del tessuto adiposo (23). Il glucosio per consentirne la clearance deve essere trasportato attraverso la membrana plasmatica mediante trasportatori per il glucosio che si trovano costituzionalmente sulla membrana plasmatica (GLUT1) o vi traslocano in rapporto a diversi stimoli (GLUT4), tra i quali il più studiato è sicuramente l'insulina. Quando questa aumenta la sua concentrazione ematica si determina la traslocazione dei GLUT4 sulla membrana, l'aumento del flusso di glucosio verso il muscolo ed il tessuto adiposo e, contemporaneamente, la ridotta produzione ed il rilascio epatico di glucosio dal fegato (23). L'insorgenza del Diabete Mellito in un numero sempre più grande di popolazione mondiale, ha spinto gli studiosi ad approfondire la ricerca sulle cause molecolari che ne sono all'origine. Quando l'insulina si lega al proprio recettore si attiva la chinasi della subunità  $\beta$  del recettore e si determina la fosforilazione di diversi substrati endogeni del recettore (IRS) su residui specifici di tirosina responsabili a loro volta dell'innesco di diverse cascate di segnali più a valle.

L'attuale definizione di DM tipo 2 riguarda una sindrome in cui l'iperglicemia è dovuta ad un deficit beta-cellulare quasi sempre associato ad insulino-resistenza.

L'insulino-resistenza è una condizione in cui l'insulina esercita un effetto biologico inferiore a quello atteso. Può riguardare un singolo organo o coinvolgere contemporaneamente più organi e tessuti. Più comunemente l'insulino-resistenza si riferisce ad una condizione di ridotto effetto biologico dell'insulina nel regolare il metabolismo glucidico dell'organismo in toto. Visto che quindi nell'insulino-resistenza

l'effetto biologico è inferiore a quello atteso, bisogna identificare la sede del difetto dell'azione ormonale. L'insulina per esercitare il proprio effetto agisce legandosi al suo recettore a livello di vari tessuti. Il legame dell'insulina al suo recettore comporta l'attivazione del recettore ed una serie di meccanismi che hanno il compito di propagare il segnale. Il recettore per insulina è costituito da due subunità di tipo alfa (che sono esterne alla membrana cellulare) e due subunità di tipo beta (in parte esterne alla membrana, ma per la maggior parte aggettanti nel citoplasma), tenute insieme da ponti disolfuro. L'insulina si lega alla subunità alfa, determinando con questo legame una modifica conformazionale del recettore, che stimola una attività tirosino-chinasica intrinseca alla subunità beta che si autofosforila. Questo processo a sua volta determina la fosforilazione di varie proteine di cui la prima e più importante è il primo substrato del recettore insulinico (Insulin Receptor Substrate-1, IRS-1). Questo substrato viene considerato una sorta di proteina di ancoraggio alla quale si agganciano, per poi venire fosforilate, numerose altre proteine di cui la più studiata è la fosfatidilinositolo-3-chinasi. Il segnale poi continua ad amplificarsi propagandosi attraverso una cascata di fosforilazioni e defosforilazioni di altre proteine fino ad arrivare agli effetti biologici dell'insulina sul metabolismo e sulla crescita cellulare. Da cosa viene determinata l'insulino-resistenza? Sostanzialmente da fattori genetici (alterazioni a vari livelli dei geni implicati nei meccanismi suddetti), fattori acquisiti (comportamenti errati o alterazioni ambientali) o, più comunemente da entrambi.

#### **Cause di Insulino-resistenza:**

- Anomalie di secrezione da parte della beta-cellula (es. insulina anomala per mutazioni a livello genico);
- Antagonisti dell'azione insulinica: 1) Immunologici (Ab anti-insulina, antirecettore insulinico)

2) Ormonali (cortisolo, GH, Glucagone, Catecol.

O.tiroidei)

3) Metabolici (iperglicemia, ipernefemia)

- Recettoriali (del recettore insulinico) o post-recettoriali (IRS-1)
- Acquisiti (obesità, distribuzione centrale del grasso, fumo).

L'insulina svolge un ruolo molto importante a carico di diversi organi e tessuti: sul **fegato** svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi glicemica. La captazione epatica del glucosio è indipendente dall'insulina in quanto è mediata dai GLUT-2 e dipende dai livelli glicemici, non da quelli insulinemici. L'azione fondamentale dell'insulina si svolge all'interno dell'epatocita, in quanto questa stimola sia gli enzimi glicolitici che glicogenosintetici favorendo la utilizzazione del glucosio; inibisce a sua volta la neoglucogenesi e la glicogenolisi. Inibisce particolarmente la glicogeno-fosforilasi (enzima regolatore della glicogenolisi) e la fosfoenolpiruvatocarbossichinasi (enzima regolatore della neoglucogenesi). Nella condizione di insulino-resistenza la capacità dell'insulina di inibire la produzione epatica di glucosio è fortemente ridotta per cui una maggiore quantità di glucosio viene liberata dal fegato sia in condizioni di digiuno che nel periodo post-prandiale.

Sul **Muscolo** L'insulina favorisce l'ingresso del glucosio attraverso i trasportatori del glucosio GLUT-4. Nel miocita il glucosio viene fosforilato ad opera di una esochinasi muscolo-specifica per essere avviato alla glicogenosintesi ed alla glicolisi. In presenza di insulino-resistenza la capacità di captazione del glucosio si riduce del 30-50% probabilmente per un'alterata funzione dei GLUT-4.

Nel **Tessuto Adiposo** l'insulina regola l'immagazzinamento dei lipidi favorendo la sintesi di trigliceridi dagli acidi grassi. In condizioni di insulino-resistenza i trigliceridi immagazzinati vanno incontro ad idrolisi liberando in circolo glicerolo ed acidi grassi non esterificati che andranno in circolo in maggiori quantità causando una riduzione competitiva della captazione muscolare del glucosio (ciclo di Randle), nonché un

aumento della neoglucogenesi epatica per maggiore disponibilità di substrato.

Quando a questi meccanismi suddetti si aggiunge anche il deficit di azione della beta-cellula, compare il Diabete Mellito.

---

## **RESISTENZA INSULINICA**

**↑ CITOCHINE CHEMOCHINE PRO-INFLAMMATORIE**

**NF- IL6- PCR -TNF-ALFA**

**DISFUNZIONE ENDOTELIALE**

**SINDROME METABOLICA**

**↑ TG, ↓ HDL, ↑ PAO, ↑ MCV**

**IGT IFG**

**DIABETE MELLITO (2)**

**ATEROSCLEROSI AUMENTATA**

**INSTABILITA' DI PLACCA, TROMBOSI**

---

## **Capitolo 4**

### **Contributo clinico**

## **CONTRIBUTO CLINICO**

Lo scopo dello studio clinico è stato quello di analizzare i meccanismi che determinano la trasformazione di un processo utile ed indispensabile alla sopravvivenza quale l'infiammazione in un processo cronico, inavvertito e latente ed illustrare come questo può determinare l'insorgenza di patologie di grande rilevanza clinica, quali quelle a carico dell'apparato cardiovascolare. Infatti il termine "Inflammaging" è stato coniato per spiegare i meccanismi che sottendono i cambiamenti della risposta infiammatoria, verosimilmente anche correlati all'età (23). Analizzeremo inoltre il fenomeno dell'Insulino-Resistenza largamente studiato e dibattuto negli ultimi decenni come concausa, insieme all'infiammazione, di tutte quelle modificazioni a carico della parete vascolare che portano allo sviluppo della placca ed all'insorgenza di tutte le manifestazioni cliniche a carico dell'apparato cardiovascolare.

## **RAZIONALE DELLO STUDIO**

La sindrome metabolica è frequentemente accompagnata da uno stato proinfiammatorio, caratterizzato da aumenti dei livelli di proteina C-reattiva.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo dello studio è stato quello di individuare in una coorte di pazienti che presentavano un quadro di Sindrome metabolica, la concentrazione di un importante marcatore di flogosi quale la Proteina C reattiva, prima e dopo adeguata terapia farmacologica o modifica dello stile di vita.

Di tali pazienti sono stati valutati i dati antropometrici, lo stato nutrizionale, l'assetto lipidico e la concentrazione della Proteina C Reattiva.

### Criteri di eleggibilità e di esclusione dei pazienti

Sono stati considerati eleggibili i pazienti che corrispondevano ai seguenti requisiti:

- Presenza di Sindrome metabolica secondo i criteri suggeriti dall'IDF;
- Status clinico: I pazienti non dovevano presentare patologie acute tali da inficiare le concentrazioni degli indici di flogosi

## MATERIALI E METODI

### ➤ STUDIO CLINICO

I pazienti sono stati sottoposti a visita medica con particolare valutazione del peso, dell'Indice di Massa corporea, della circonferenza addominale, della Pressione arteriosa e dell'assetto lipidico in accordo con i criteri suggeriti dalle società scientifiche per l'obesità e l'ipertensione.

### ➤ STUDIO ENDOCRINO-METABOLICO

Sui 200 pazienti sono stati eseguiti i seguenti dosaggi ematici:

- assetto lipidico con determinazione del colesterolo totale, HDL e trigliceridi.
- assetto nutrizionale con determinazione delle proteine totali, albumina, ferritina, emoglobina ed ematocrito.
- funzionalità epatica e renale con determinazione di azotemia, creatininemia, transaminasi.
- Indici di flogosi quali PCR.

Il prelievo ematico è stato effettuato al mattino, dopo il digiuno della notte.  
Nessuna restrizione dietetica è stata prescritta nei giorni precedenti l'esame.

## ➤ ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software "r" versione 2.6.1.

Per le rappresentazioni grafiche è stato utilizzato il foglio di calcolo Excel in ambiente Microsoft Windows XP.

Delle variabili qualitative in esame sono state calcolate: la media con il relativo scarto quadratico medio e talora la mediana qualora l'elevato range di distribuzione dei valori lo rendeva necessario.

Il confronto tra le medie è stato effettuato attraverso il test t di Student per dati non appaiati. Le correlazioni tra le variabili qualitative sono state calcolate attraverso il coefficiente di Pearson e analizzate attraverso il metodo della regressione lineare.

La significatività del coefficiente di correlazione è stata calcolata utilizzando la distribuzione di Student (distribuzione normale corretta per piccola numerosità di campione).

Il livello di significatività considerato accettabile sia per il confronto tra le medie che per il coefficiente di correlazione è stato fissato al 95 %, indicato con  $p < 0,05$ .

## DISEGNO DELLO STUDIO

Il numero di pazienti seguiti è stato di 280 circa.

Si è proceduto ad escludere i pazienti che non rispondevano ai criteri di eleggibilità e quindi i pazienti con un grave stato catabolico e i pazienti con patologie acute.

Ai pazienti arruolati è stato chiesto ed ottenuto il consenso informato all'esecuzione dello studio. Di questi 280 pazienti 200 hanno presentato tutti i criteri di eleggibilità.

Dei 200 pazienti arruolati nello studio dunque, 70 sono i soggetti di sesso maschile e 130 i soggetti di sesso femminile. L'età media è risultata essere di 54 anni ( mediana 52 anni) . Per gli uomini l'età media  $55 \pm 6$  DS, per le donne  $53 \pm 10$  DS.

La valutazione del BMI ha evidenziato un valore medio di  $28,5 \pm 3$  Kg/m<sup>2</sup> . I maschi presentano un BMI di  $29 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup> ; le femmine  $27 \pm 3$  Kg/m<sup>2</sup> . La pressione arteriosa sistolica media è stata  $138 \pm 5$  mmHg, la diastolica media è stata  $88 \pm 6$  mmHg.

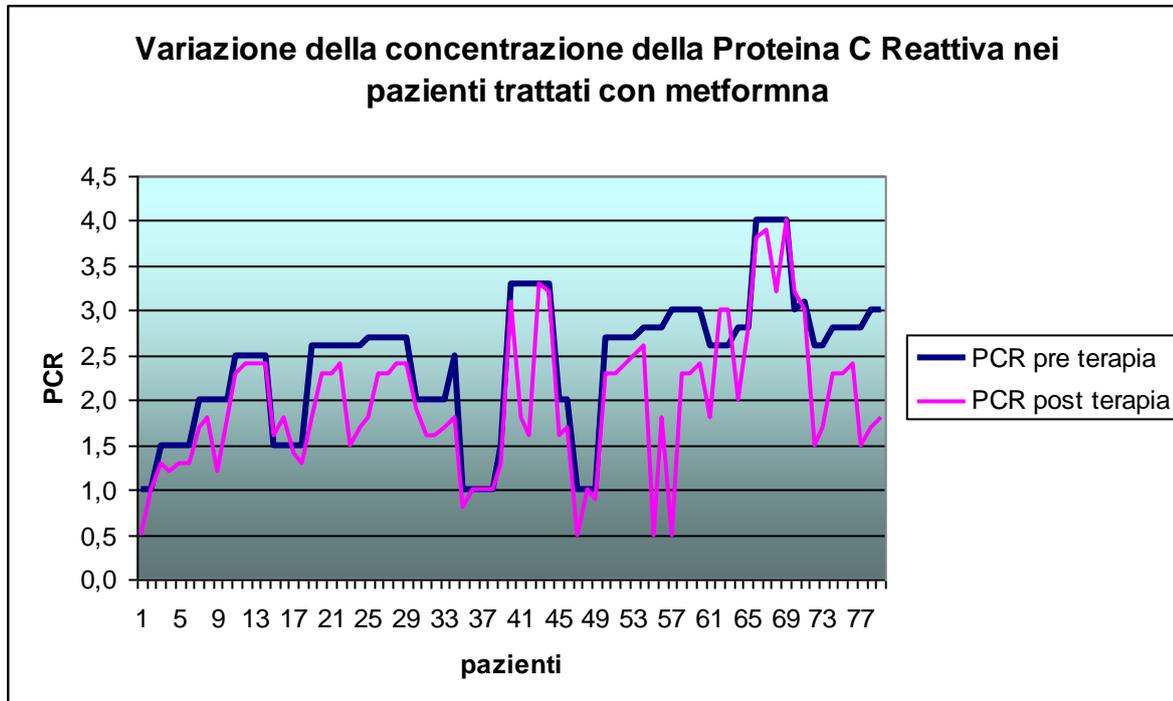
I pazienti sono stati distribuiti in due gruppi: ad un primo gruppo costituito da 120 pazienti è stato fortemente consigliato di modificare le abitudini e lo stile di vita, con diete personalizzate, terapia comportamentale, con riduzione dell'apporto di grassi e inizio di un'attività fisica costante. Al secondo gruppo, costituito da 80 pazienti, oltre alla modificazione dello stile di vita, è stato invece prescritto un trattamento farmacologico con metformina . La distribuzione dei pazienti nei due gruppi è stata effettuata in modo casuale.

I pazienti sono stati sottoposti ad un follow-up medio di  $24 \pm 6$  mesi.

I pazienti appartenenti al secondo gruppo hanno ricevuto 1000 mg di metformina due volte al giorno.

**RISULTATI:** Prima del trattamento, non vi erano differenze significative tra il gruppo di pazienti trattati con metformina e il gruppo di controllo in termini di dati antropometrici e di parametri metabolici e degli indici di flogosi. Dopo il trattamento con la metformina, abbiamo osservato oltre ad una significativa riduzione dell'indice di massa corporea (da  $28,5$  a  $26,7$  kg/m<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ), dell'insulinemia a digiuno (da  $19,2$  a  $11,1$  microU / ml,  $p < 0.001$ ), della glicemia a digiuno e dell' HOMA-IR da  $4,95$  a  $2,6$  ( $p < 0,001$ ), anche una significativa riduzione dei valori di Proteina C reattiva (media:  $2,4$  md/dl prima del trattamento,  $2$  mg/dl dopo il trattamento con metformina;  $p < 0,005$ ). I pazienti senza trattamento con metformina hanno presentato una lieve riduzione della concentrazione

della Proteina C reattiva ( 2, 45 mg/dl prima del trattamento, 2,38 mg/dl dopo il trattamento) che non ha raggiunto comunque la significatività statistica.



Inoltre, il confronto delle variazioni degli indici di sensibilità all'insulina tra i trattati con metformina e gruppi di controllo, ha evidenziato nel gruppo di pazienti trattati con metformina un significativo miglioramento del controllo metabolico. Il trattamento con metformina è stato ben tollerato dalla maggioranza dei pazienti: transitori disturbi addominali o diarrea si è verificato nel 12 % dei partecipanti trattati; non ci sono stati episodi di vomito o acidosi lattica.

## **Capitolo 5**

### **Discussione**

## DISCUSSIONE

Il diabete è la prima causa di cecità nell'adulto, la prima di insufficienza renale, ma soprattutto gli studi sempre più approfonditi in tal senso rendono noto che la maggior parte dei pazienti diabetici muore per problemi cardiovascolari (24). La malattia cardiovascolare rappresenta quindi la prima causa di morte nella popolazione diabetica (80% delle cause di mortalità di questi pazienti). Circa il 75% delle ospedalizzazioni dei pazienti diabetici è determinato da patologie connesse all'aterosclerosi, ed il 50% dei pazienti presenta alla diagnosi una patologia cardiovascolare preesistente (25). Il National Cholesterol Education Program di recente ha pertanto suggerito di considerare il Diabete Mellito come un equivalente di un fattore di rischio cardiovascolare (26). I soggetti affetti da Diabete Mellito presentano infatti un rischio di mortalità simile a quello degli individui con pregressa storia di Infarto Miocardico (27). Non solo il Diabete si associa con maggior frequenza ad eventi cardiovascolari, ma questi sono caratterizzati da maggiore morbilità e mortalità, rispetto al soggetto non diabetico. E' stato pertanto suggerito che il paziente diabetico sia un candidato alla prevenzione secondaria, questo perché nel paziente diabetico l'aterosclerosi sembra più accelerata, più estesa e più severa (28). Gli studi a tal proposito hanno riscontrato una debole associazione tra iperglicemia e malattia cardiovascolare, probabilmente perché i fattori di rischio cardiovascolari sono presenti già durante la fase di prediabete. Numerosi studi si sono occupati di misurare realmente questa correlazione ed è stato ipotizzato che diabete e malattie cardiovascolari condividono una comune iniziale predisposizione (la teoria della genesi comune) da alcuni individuata nella condizione di insulino-resistenza. I fattori di rischio cardiovascolari non sono sufficienti a rendere conto dell'elevata frequenza di

aterosclerosi del diabete mellito. Nello studio di Natali et al sesso, età, presenza di diabete, livelli di colesterolo, familiarità per malattia cardiovascolare, fumo di sigaretta e scolarità erano tutti fattori indipendentemente associati alla coronaropatia angiograficamente documentata, ma rendevano conto solo del 23% della varianza dell'aterosclerosi, suggerendo che altri fattori devono incidere nel rischio cardiovascolare complessivo del paziente diabetico (29). Inoltre, dall'analisi dei dati dello studio *Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)* si evidenzia come il rischio cardiovascolare di paziente diabetico sembra essere indipendente dalla concomitanza di altri fattori quali: obesità, ipertensione, dislipidemia (30). Anche in assenza dei classici fattori di rischio infatti, la mortalità cardiovascolare del paziente diabetico è circa 4 volte più alta rispetto a quella del paziente non diabetico. Questo dato viene ancora più rafforzato dallo studio STENO-2 (31), nel quale l'intervento terapeutico intensivo mirato al controllo dell'Emoglobina Glicata (HbA1c), della pressione arteriosa e della dislipidemia, pur riducendo gli eventi cardiovascolari del 20% rispetto alla terapia convenzionale, si associava al rischio di eventi acuti del 24%, sicuramente più alto di quello dei pazienti non diabetici. Quindi il rischio cardiovascolare del paziente diabetico non può essere ricondotto in toto alla presenza di fattori di rischio tradizionalmente noti (Ipertensione, Dislipidemia, Fumo di sigarette, Obesità), ma l'individuazione dei fattori di rischio *non tradizionali* potrebbe essere importante per la gestione della malattia aterosclerotica nel paziente diabetico. L'infiltrazione lipidica, e la ritenzione nello strato intimale delle arterie, l'attivazione cellulare nella parete arteriosa la disfunzione endoteliale, lo stress ossidativo, l'infiammazione sistemica e locale, la risposta immunologica, le anomalie emocoagulative e la fibrinolisi sono tutti importanti fattori che contribuiscono allo sviluppo dell'aterosclerosi (32). Un ruolo chiave nella genesi delle malattie cardiovascolari viene inoltre riconosciuto all'Insulino-resistenza che tutt'ora rappresenta un fattore di rischio indipendente sia nella popolazione generale che in quella diabetica

(33). Nel Diabete insulino-resistenza, iperinsulinemia, iperglicemia, dislipidemia concorrono ad indurre uno stato infiammatorio. Dai dati presenti in letteratura emerge chiaramente che l'Insulino-resistenza, l'iperglicemia post-prandiale, l'iperomocisteinemia sembrano agire sulla funzione endoteliale, quindi sull'inizio del processo aterosclerotico ed, attraverso l'aumento delle LDL ossidate e dei markers della flogosi potrebbero condizionare non solo la formazione, ma anche la rottura della placca. Sulla base di queste costatazioni è importante valutare il ruolo aterogeno dei singoli fattori di rischio nelle varie fasi della malattia diabetica. Consideriamo il ruolo aterogeno dell'insulino-resistenza nella fase pre-diabetica. Recenti osservazioni hanno messo in evidenza come il tessuto adiposo, durante l'iperalimentazione è in uno stato di continuo stress metabolico, caratterizzato da un aumento dello stress ossidativo a livello del reticolo endoplasmatico. Ciò determinerà un'attivazione della risposta infiammatoria responsabile di un accumulo di macrofagi. In questa fase gli adipociti sottoposti ad uno stress metabolico-ossidativo rilevante, rilasciano citochine che amplificano lo stato infiammatorio e causano uno stato di insulino-resistenza localizzato nel tessuto adiposo; si crea quindi un segnale paracrino che amplifica lo stato infiammatorio ed altera l'interazione insulina-recettore. Successivamente, mediante un segnale di tipo endocrino le citochine pro infiammatorie raggiungono il tessuto epatico, muscolare e cardiaco creando insulino-resistenza anche in questi organi (34) L'insulino-resistenza potrebbe pertanto essere il primo fattore legato al diabete che condiziona l'insorgenza del processo aterosclerotico. Uno dei principali effetti dell'insulino-resistenza sul processo aterosclerotico sembra essere legato all'alterazione del segnale insulina-recettore che sarebbe in grado di alterare la vasodilatazione endotelio-dipendente. La ridotta interazione insulina-recettore si associa ad una down regulation del path-way PI-3 chinasi (PI-3K) che in condizioni normali attraverso l'attivazione della ossido nitrico (NO)-sintetasi endoteliale aumenta la produzione di NO, non solo

attraverso la down regulation del path-way PI-3 chinasi (PI-3K) a livello vasale, ma anche attraverso la up-regulation relativa pro-aterogena della miogen-activated protein kinase (MAPK), che determina ridotta produzione di NO, aumento dell'apoptosi, migrazione delle cellule muscolari lisce e dell'espressione CD36 nei macrofagi. Ne consegue che l'insulino-resistenza sarebbe in grado di iniziare direttamente il processo aterosclerotico attraverso la disfunzione endoteliale (35) e di influenzare indirettamente la progressione del processo aterosclerotico condizionando la presenza dei fattori di rischio non-tradizionali. Sappiamo infatti che l'insulino-resistenza è legata ad un aumento delle LDL ossidate, le quali entrano più facilmente al di sotto dell'endotelio, nei macrofagi, nei quali determinano la produzione di metallo proteinasi e di citochine pro infiammatorie (36) Nello studio Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) condotto in pazienti non diabetici, quindi in una fase di pre-diabete con insulino-resistenza, è stato evidenziato che l'insulino-resistenza si associava ad elevati livelli di Proteina C Reattiva (PCR) e di fibrinogeno e ad elevati livelli di inibitore del plasminogeno. Quindi le interazioni tra insulino-resistenza e processo aterosclerotico sono molteplici, sia tramite un'azione diretta sull'endotelio, sia tramite l'interazione con altri fattori di rischio determinando la progressione e la rottura della placca aterosclerotica. Il Fibrinogeno e la Proteina C Reattiva rappresentano un marker sensibile di questa condizione. Il Fibrinogeno, attraverso i suoi effetti sulla viscosità plasmatica, sull'aggregabilità piastrinica e sulla deposizione di fibrina, non è solo un componente chiave della formazione del coagulo, ma può giocare un ruolo causale nel processo aterosclerotico (37). Dati preliminari suggeriscono infatti che il Fibrinogeno possa essere considerato come un fattore di rischio indipendente per le complicanze vascolari nel paziente con Diabete di tipo 2 (38) In questi pazienti, analogamente al PAI-1, i livelli di fibrinogeno sono spesso aumentati (39) Ciò comunque non deve sorprendere poiché numerosi determinanti dei livelli plasmatici di fibrinogeno sono i

costituenti della S. Metabolica tanto da far considerare l'iperfibrinogenemia come un componente della S. Metabolica (40). Anche la proteina C reattiva (PCR), uno dei marcatori bioumorali dell'infiammazione gode di particolare popolarità grazie alla notevole quantità di dati che hanno messo in evidenza la sua capacità di predire eventi coronarici (41) La PCR è sintetizzata nel fegato ed è un indicatore sensibile e stabile di infiammazione subclinica (42). I livelli di PCR sono correlati al BMI, ai livelli ematici dei lipidi ed alla glicemia. Infatti gli studi epidemiologici che hanno valutato quali variabili o condizioni cliniche fossero associate a elevati livelli plasmatici di PCR, hanno riportato obesità, ipertensione arteriosa, ipertrigliceridemia, basso HDL ed iperinsulinemia, cioè tutti gli elementi della S. Metabolica. E' stato inoltre dimostrato che esiste una relazione lineare tra numero di elementi coinvolti nella S. Metabolica e livelli di PCR . Nello studio IRAS precedentemente menzionato, PCR, conta dei globuli bianchi e fibrinogenemia sono risultati direttamente correlabili ai livelli di pressione arteriosa, trigliceridi, colesterolo HDL ed aumentati livelli di insulina, mentre inversa era la correlazione con il grado di sensibilità insulinica(43).. I livelli di PCR non solo correlano con la sindrome metabolica, ma ne aggravano il rischio cardiovascolare. In individui con Sindrome Metabolica l'incidenza di eventi cardiovascolari varia da 3,4 a 5,9 /1000 persone-anno in rapporto a valori basali di PCR inferiori o superiori il limite di 3,0 mg/L. La stretta e spesso inestricabile relazione tra azione insulinica e stato infiammatoria è. messa in evidenza dal fatto che fibrinogeno, PCR ed IL-6 possono predire lo sviluppo di DM tipo 2 (44). Le analisi multivariate individuano nell'obesità e nella distribuzione centrale del grasso corporeo le correlate più forti soprattutto nel sesso femminile dove si osserva in maniera statisticamente più significativa la associazione tra PCR e gli altri indici di insulino resistenza. Sembra quindi che tra la condizione di flogosi sub-clinica e quella di insulino-resistenza ci sia uno stretto legame che solo in parte è mediato dall'eccesso di peso corporeo o dalla sua distribuzione centrale e riconosce piuttosto un legame con il

compenso metabolico. Quanto ciò detto dimostra come la interrelazione tra flogosi ed insulino-resistenza sia così stretta da avere dato vita ad una serie di studi che si antepongono nel dimostrare se sia l'insulino-resistenza a determinare l'attivazione di una flogosi cronica, oppure che sia la flogosi a condizionare l'insulino-resistenza infatti si è ipotizzato che l'alterazione dell'immunità naturale espressa dallo stato flogistico cronico, rappresenti proprio la causa iniziale dell'insulino-resistenza (45). Comunque, indipendentemente dalla causa, ogni processo infiammatorio è in grado di indurre acutamente uno stato di insulino-resistenza attraverso l'increzione di catecolamine e cortisolo (ormoni controregolatori), sia tramite la produzione di citochine (TNF $\alpha$ ). L'ipotesi che la PCR predice lo sviluppo di diabete e s. metabolica, suffraga certamente questa possibilità. Si osserva però una maggiore correlazione nei soggetti di sesso femminile, dove il valore di PCR ha un potere predittivo reale. D'altro canto lo sviluppo di insulino-resistenza determinato da iperalimentazione stimola una reazione flogistica locale a sua volta capace di attivare citochine in grado di amplificare lo stress infiammatorio. Si è dimostrato che l'insulina ha una potente attività antinfiammatoria, infatti in studi in vivo ed in vitro (gruppo di Buffalo) l'insulina induce una potente inibizione del fattore intranucleare Nf $\kappa$ B, il quale regola l'espressione di molti geni coinvolti nella risposta infiammatoria (citochine, molecole di adesione, chemochine quali la MCP-1 proteina responsabile del reclutamento in loco dei monociti) che sono abitualmente iperespressi nelle lesioni aterosclerotiche. La delezione eterozigote del gene IKK $\beta$ <sup>+/-</sup> in modelli animali di insulino-resistenza comporta il miglioramento della sensibilità insulinica. Insulino-resistenza ed aterosclerosi presentano meccanismi fisiopatologici simili, legati soprattutto all'azione delle due citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-6. Una predisposizione genetica capace di incrementare la trascrizione di queste citochine potrebbe favorire lo sviluppo simultaneo di alterazioni del metabolismo ed aterosclerosi. D'altra parte, un'induzione dell'azione insulinica sui principali tessuti

insulino-sensibili (tessuto adiposo, muscolo e fegato) può peggiorare uno stato infiammatorio cronico di basso grado. Indipendentemente dai fattori scatenanti e dagli eventi iniziali, sembra che la relazione tra i due fattori sia bidirezionale, ossia, qualunque processo associato all'infiammazione cronica sembra in grado di causare una riduzione della secrezione insulinica, mentre l'insulino-resistenza può peggiorare l'infiammazione instaurando un circolo vizioso. E' stato quindi ipotizzato che l'iperinsulinemia post-prandiale compensi l'effetto proinfiammatorio e pro-ossidante dovuto alla comparsa nel plasma dei nutrienti. Qualora il carico dei nutrienti sia eccessivo (obesità), qualitativamente povero (fast food) o la secrezione insulinica sia inadeguata, si verificherebbe uno sbilanciamento a favore degli effetti tossici con uno stato di infiammazione cronica che determina insulino-resistenza ed aterosclerosi. Questa ipotesi molto suggestiva trova però ancora necessità di conferme e pone dubbi legati anche alla variabilità degli stimoli ed alla diversità dei tessuti. Numerosi studi sui farmaci che riducono l'insulino-resistenza, anche con meccanismi diversi hanno dimostrato che è più quest'ultima a determinare l'aumento della PCR, piuttosto che l'iperinsulinismo. La coesistenza di insulino-resistenza e citochine pro-infiammatorie nello sviluppo di aterosclerosi sarebbe da ascrivere ad un meccanismo di selezione positiva per il genere umano, in quanto l'insulina resistenza potrebbe essersi determinata, secondo la teoria del "thrifty gene" (gene del risparmio) come meccanismo che avrebbe consentito una maggiore sopravvivenza nei periodi di carestia, d'altra parte la vivace risposta infiammatoria avrebbe selezionato gli individui particolarmente reattivi contro le infezioni batteriche, che per migliaia di anni hanno rappresentato la maggiore minaccia alla salute dell'uomo. In una fase successiva con l'evoluzione verso la malattia diabetica si passa dall'insulino-resistenza al progressivo deterioramento del compenso glicemico che si manifesta inizialmente con aumento della glicemia nella fase post-prandiale ancora prima della manifestazione franca dello

stato diabetico. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che il controllo glicemico post-prandiale è un importante fattore predittivo di morbilità e mortalità cardiovascolare (46). Lo studio DECODE ha dimostrato infatti che l'iperglicemia post-prandiale si associa ad un elevato rischio per malattie cardiovascolari, in relazione ad una serie di alterazioni a livello dell'endotelio indotte da un'aumentata produzione di radicali liberi che sarebbe in grado di provocare vasocostrizione, infiammazione e trombosi, configurando quella che viene denominata patologia endoteliale, per la quale si intende una serie di alterazioni inizialmente funzionali che portano poi ad un danno organico irreversibile. La disfunzione endoteliale iniziale è caratterizzata da una ridotta disponibilità di Ossido Nitrico (NO), con conseguente stimolo endoteliale alla produzione di citochine pro infiammatorie, molecole di adesione e PCR. Le alterazioni funzionali dell'endotelio divengono quindi irreversibili, provocate in gran parte dal processo flogistico. L'iperglicemia inoltre sbilanciando il rapporto tra NO ed Anione Superossido a favore di quest'ultimo, aggrava la disfunzione endoteliale. Nella fase di Diabete conclamato, in cui si ha la maggiore incidenza di eventi cardiovascolari il ruolo centrale è svolto dall'infiammazione. Tra i vari markers infiammatori che sembrano essere più strettamente legati al processo aterosclerotico, sicuramente la PCR riveste un ruolo importante non soltanto nella fase di formazione della placca, ma soprattutto nella fase di rottura di questa (47) Livelli di PCR maggiori di 3 mg/l si associano ad un aumento significativo degli eventi cardiovascolari (48) La PCR oltre ad essere marker di infiammazione, stimola a sua volta le citochine pro-infiammatorie determinando inoltre aumento delle molecole di adesione.

## **Capitolo 6**

### **Conclusioni**

## CONCLUSIONI

Molteplici sono i meccanismi che stanno alla base delle complicanze aterosclerotiche, ma negli ultimi anni si è andato delineando un concetto almeno parzialmente unificante: l'insulino-resistenza. Molti infatti di questi meccanismi possono essere accelerati o esaltati dalla presenza di una ridotta sensibilità insulinica. Il difetto d'azione dell'insulina sembra agire come fattore indipendente di rischio cardiovascolare. L'insulino-resistenza condiziona l'aggregazione di più fattori di rischio configurando quella che oggi conosciamo come sindrome metabolica, poiché agisce sui livelli pressori, sui lipidi plasmatici (con una azione anche a livello delle caratteristiche chimico-fisiche), sull'equilibrio pro- ed antitrombotico ed alla fine sul metabolismo glicidico (con la conseguente iperglicemia e diabete). L'insulino-resistenza, insieme all'iperinsulinemia e successivamente anche all'iperglicemia, esercitano azione diretta su quello che costituisce il core dello sviluppo del processo aterosclerotico: l' endotelio. Sull'endotelio l'insulino-resistenza determina un limitato rilascio di NO, l'aumento delle metallo proteinasi e delle molecole di adesione. Inoltre l'insulino-resistenza favorisce lo stato infiammatorio, la differenziazione dei monociti a macrofagi e la migrazione delle cellule muscolari lisce. Ciò comporterà un processo aterosclerotico accelerato, una placca più instabile con conseguente facilità alla rottura ed al processo trombotico. La partecipazione di tutti questi fattori di rischio deve quindi spingere ad un trattamento preventivo multifattoriale, cioè che agisca su tutti i componenti (modificazione dello stile di vita, controllo della glicemia, della pressione arteriosa, dei lipidi plasmatici), ma soprattutto sull'insulino-resistenza. Negli studi più importanti (UKPDS, DPP.....) si è dimostrato che l'intervento mirato al miglioramento della sensibilità insulinica è in grado

di ridurre notevolmente l'incidenza di infarto del miocardio ed ictus. Il miglioramento della sensibilità insulinica ha poi avuto delle ripercussioni positive sui fattori della coagulazione/fibrinolisi, sulle dimensioni delle LDL e sui markers di infiammazione. Lo studio sempre più intenso ed approfondito sui markers non tradizionali di malattia cardiovascolare, potrà sicuramente essere di supporto nella prevenzione e nell'attuazione di nuove strategie terapeutiche volte a ridurre l'impatto della malattia cardiovascolare in generale e soprattutto nella popolazione diabetica.

## Capitolo 7

### Bibliografia

## Bibliografia:

1. Licata G, Argano C, Di Chiara T, Parrinello G, Scaglione R. Obesity: a main factor of metabolic syndrome? *Panminerva Medica* 2006; 48 (2): 77-85
2. Stamler J, Vaccaro O, Neaton J et al: Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16: 434-444;
3. Pyorala K, Pedersen TR. et al Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 1997; 20: 614-20;
4. Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):370-1.
5. Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 349,60-72 (2003).
6. Stein M, Miller AH. Stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and immune function. *Adv Exp Med Biol*. 1993;335:1-5.
7. Imahara SD, O'Keefe GE. Genetic determinants of the inflammatory response. *Curr Opin Crit Care* 10,318-324 (2004).
8. Andreotti F, Porto I, Crea F, Maseri A. Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart* 2002; 87: 107-12.
9. W.P. Arend, The balance between IL-1 and IL-1ra in disease, *Cytokine Growth Factor Rev*. 13 (2002), pp. 323–340.
10. C. Gabay, M.F. Smith, D. Eidlen and W.P. Arend, Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein, *J. Clin. Invest*. 99 (1997), pp. 2930–2940.
11. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101: 1767-72.
12. Mori T, Sasaki J, Kawaguchi H et al. Serum glycoproteins and severity of coronary atherosclerosis. *Am.Heart J*. 1995; 129: 234-8.
13. Biasucci LM, Liuzzo G, Buffon A, Maseri A. The variable role of inflammation in acute coronary syndromes and in restenosis. *Semin.Interv.Cardiol*. 1999; 4: 105-10.
14. Lio D, Candore G, Crivello A et al. Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic

background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J.Med.Genet.* 2004; 41:790-4.

15. Andreotti F, Porto I, Crea F, Maseri A. Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart* 2002; 87: 107-12.
16. Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N.Engl.J.Med.* 2000; 342: 1350-8.
17. Novelli F, and Casanova JL. The role of IL-12, IL-23 and IFN-gamma in immunity to viruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Oct;15(5):367-77.
18. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–62.
19. Hoozemans JJ, O'Banion MK. The role of COX-1 and COX-2 in Alzheimer's disease pathology and the therapeutic potentials of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4,307-315. (2005).
20. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 350,29-37 (2004).
21. Vane JR, Angaar EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl J Med* 1990; 323:27-36 Luscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of cardiovascular function. CRC Press Boca Roton FL 1990.
22. Kahn CR. Insulin action, diabetogenesis, and cause of type 2 diabetes. *Diabetes* 43: 1066-1084, 1994.
23. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:208–218.
24. Grundy SM, Benjamin IJ et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 100: 1134-1146, 1999.
25. Bertoni AG, Krop GS, Anderson GF, Brancati FL. Diabetes-related morbidity and mortality in a National samples of U.S. elders. *Diabetes Care* 25: 471-475, 2002.
26. National Cholesterol Education Program. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in Adults. (adult treatment panel III) *JAMA* 285: 2486-2497, 2001

27. Lotufo PA, Gaziano JM, Chae CU, et al. Diabetes and all-cause and coronary heart disease mortality among US male physicians. *Arch. Intern Med* 22: 242-247, 2001
28. Ledru F, Ducimetiere P, Battaglia S, et al. New diagnostic criteria for diabetes and coronary artery disease: insights from an angiographic study. *J Am Coll Cardiol* 37: 1543-1550, 2001
29. Natali A, Vichi S, Landi P et al. Coronary atherosclerosis in type 2 diabetes: angiographic findings and clinical outcome. *Diabetologia* 43: 632-641, 2000).
30. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12 year cardiovascular mortality for men screened in the MRFIT trial. *Diabetes Care* 16:434-44, 1993
31. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 348: 383-393, 2003,
32. Fonseca V, Desouza C, Asnani S, Jialal I. Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocr Rev* 25: 153-75, 2004.
33. Bonora E et al The Metabolic Syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes complications study. *Diabet Med* 21: 52-58, 2004.
34. De Luca C, Olefsky JM. Stressed about obesity and insulin resistance. *Nat Med* 12:41-42, 2006.
35. Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin Resistance and atherosclerosis. *End Rev* 27: 242-259, 2006.
36. Scaglione R, Di Chiara T, Cariello G, Licata G. Visceral obesity and metabolic syndrome: two faces of the same medal? *Journal of Internal and Emergency medicine* 2010; 5 (2) 111-119
37. Smith EB, Thompson WD. Fibrin as a factor in atherogenesis. *Thromb Res* 73: 1-19, 1994.
38. Ganda O, Arkin C. Hyperfibrinogenemia a major determinant of vascular complication in diabetes. In: *Fibrinogen, a new cardiovascular risk factor*. Ernst E (editor). Oxford: Blackwell; 1992
39. Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Thrombogenic and fibrinolytic factors and cardiovascular risk in non insulin dependent diabetes mellitus. *Ann. Med* 28:371-380, 1996.
40. Imperatore G, Riccardi G, Iovine C, et al. Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes Care* 21:649-654, 1998.

41. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy American women. *Circulation* 107: 391-397, 2003.
42. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342: 836-843, 2000.
43. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G et al. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102: 42-47, 2000).
44. Prodam AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, Interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286: 327-334, 2001
45. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41: 1241-1248, 1998.
46. The DECODE Study group on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group. *Lancet* 354: 617-623, 1999.
47. (Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictor of peripheral arterial disease. *JAMA* 285: 2481-2485, 2001).
48. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Letho S, Ronnema T. High-sensitivity C-Reactive protein and coronary heart disease mortality in patients with type 2 diabetes: a 7 year follow-up study. *Diabetes Care* 29: 329-333, 2006.