



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA

TESI DI DOTTORATO IN FISIOPATOLOGIA MEDICA E FARMACOLOGIA
(Presidente Chia.mo Prof. M. del Tacca)

INSULINO-RESISTENZA E DISFUNZIONE VASCOLARE

Dottoranda

Dott.ssa Romana Femia

Tutor

Chia.mo Prof. Ele Ferrannini

INDICE

. RIASSUNTO	pag. 3
. INTRODUZIONE	pag. 5
. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 8
. PAZIENTI E METODI	pag. 9
. ANALISI STATISTICA-RISULTATI	pag. 16
. DISCUSSIONE	pag. 20
. BIBLIOGRAFIA	pag. 28

RIASSUNTO

L'insulino-resistenza e le alterazioni metaboliche ed emodinamiche ad essa associate sono indiscusse caratteristiche del diabete tipo 2 (DM2) e delle sue complicanze macrovascolari. Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che il diabete conferisce un aumentato rischio di coronaropatia e mortalità cardiovascolare.

Nell'ambito delle complicanze microvascolari del DM2 già 20 anni fa il *Framingham Heart and Eye Study* dimostrava che la retinopatia diabetica era la manifestazione di processi microangiopatici e la spia di una disfunzione microvascolare multiorgano. Il dilemma di come l'insulino-resistenza si correli al tipo di danno cardiovascolare è più che attuale. Assumendo che l'insulino-resistenza si associa all'iperglicemia, alla dislipidemia e all'ipertensione arteriosa, non sorprende che essa possa avere un ruolo sicuramente importante nello sviluppo e nella progressione del danno microcircolatorio, ma il legame causale è lungi dall'esser chiarito.

Scopo dello studio è stato quello di valutare le correlazioni esistenti nel DM2 fra insulino-resistenza e disfunzione micro- e macrocircolatoria, e di valutare le correlazioni fra i fattori di rischio cardiovascolare classici e non e la retinopatia.

Per tale motivo sono stati studiati 28 pazienti con DM2, di cui 14 pazienti con retinopatia diabetica (9M/5F, con età 63 ± 4 anni) e 14 pazienti non affetti da tale complicanza (9M/5F, con età 60 ± 8 anni), ben appaiati per indice di massa corporea (BMI). Dei 14 pazienti con retinopatia diabetica 9 presentavano retinopatia proliferativa/laser trattata e 5 presentavano retinopatia "background".

I **metodi** utilizzati per lo studio di tutti i pazienti sono stati: clamp euglicemico iperinsulinemico, per la valutazione della sensibilità insulinica, fluorangiografia retinica, per la valutazione del microcircolo retinico, iontoforesi laser Doppler, per la

valutazione del microcircolo cutaneo, ecocardiografia bidimensionale-CD, eco-CD dei vasi cerebro-afferenti, valutazione di alcuni parametri di rigidità arteriosa, come indicativi della funzionalità macrovascolare.

I **risultati** ottenuti hanno rilevato che i retinopatici mostrano una più bassa sensibilità all'insulina rispetto ai diabetici non affetti da tale complicanza.

Non ci sono sostanziali differenze nei valori di insulinemia a digiuno e nel profilo lipidico, fuorché un più basso valore di colesterolo HDL. I diabetici retinopatici inoltre presentano più elevati livelli glicemia a digiuno, di emoglobina glicata e maggior durata di malattia. I diabetici affetti da retinopatia presentano inoltre valori più alti di alcuni indici infiammatori, quali il fibrinogeno, la velocità di eritrosedimentazione (VES), il numero dei globuli bianchi, e un più basso valore di albumina sierica.

Il nostro studio ha dimostrato che il grado di retinopatia è indipendente dall'età, dal sesso e dal BMI mentre è significativamente associato al fibrinogeno, alla VES, alla durata della malattia diabetica, al colesterolo HDL, all'insulino-resistenza. L'insulino-resistenza si correla invece al colesterolo HDL, alla circonferenza addominale, alla glicemia a digiuno e alla presenza di retinopatia. La presenza di retinopatia è associata a precoce disfunzione diastolica e ad alterazioni del microcircolo cutaneo.

In **conclusione**, insulino-resistenza e retinopatia sembrano essere entrambe parte integrante di una malattia diabetica in cattivo controllo glicemico; è sì presente insulino-resistenza nei retinopatici, ma maggiore enfasi viene data alla possibilità che tale aspetto faccia parte di una fenomenologia più complessa, comprendente diverse alterazioni che concertano insieme a produrre un più avverso fenotipo cardiovascolare nel soggetto diabetico.

INTRODUZIONE

Si stima che il diabete sia responsabile del 5.2% di tutte le morti [1]. L'insulino-resistenza e le alterazioni metaboliche ed emodinamiche ad essa associate sono indiscusse caratteristiche del diabete tipo 2 (DM2) e delle sue complicanze macrovascolari [2-4]. Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che il diabete conferisce un aumentato rischio di coronaropatia e mortalità cardiovascolare [5-6]. Nell'ambito delle complicanze microvascolari del DM2 già 20 anni fa il *Framingham Heart and Eye Study* dimostrava che la retinopatia diabetica [7] era la manifestazione di processi microangiopatici e la spia di una disfunzione microvascolare multiorgano [8]. Recentemente, grazie all'utilizzo di metodiche standardizzate ed automatiche per la valutazione accurata delle lesioni retiniche, diversi studi hanno quantificato le associazioni fra retinopatia diabetica e un più ampio spettro di complicanze vascolari. Classicamente la retinopatia diabetica viene distinta in una forma "non-proliferativa" e in una "proliferativa" o laser-trattata; entrambe sono state correlate con eventi cardiovascolari maggiori, come l'ictus, la cardiopatia ischemica, la nefropatia [9], così come con misure subcliniche di malattia cardiovascolare, cioè presenza di calcificazioni coronariche e "remodeling" cardiaco [10-11]. La sola presenza di retinopatia in soggetti diabetici è associata ad un incrementato rischio di mortalità [**tabella 1**]; questa associazione è più forte in pazienti con DM2 rispetto a pazienti con diabete tipo 1, verosimilmente a causa dell'età più avanzata e della più alta prevalenza di fattori di rischio cardiovascolare in pazienti con DM2 [**tabella 2**].

I dati esistenti in letteratura sull'associazione fra insulino-resistenza, valutata con clamp euglicemico iperinsulinemico, metodo gold standard per la stima della sensibilità all'insulina, e retinopatia diabetica, valutata con fluorangiografia, come espressione di

danno microvascolare, sono pochi e contrastanti [tabella 3]. Inesistenti i lavori che valutano contemporaneamente all'insulino-resistenza sia la componente microcircolatoria (mediante la fluorangiografia retinica e la iontoforesi laser Doppler) che macrovascolare (attraverso lo studio del cuore e dei grossi vasi).

Il dilemma di come l'insulino-resistenza si correli al tipo di danno cardiovascolare è più che attuale. Assumendo che l'insulino-resistenza si associa all'iperglicemia, alla dislipidemia e all'ipertensione arteriosa, non sorprende che essa abbia un ruolo sicuramente importante nello sviluppo e nella progressione del danno microcircolatorio, ma il legame causale è lungi dall'esser chiarito. Diversi studi indicano che nel soggetto normale l'insulina ha effetto anti-aterogeno ed anti-lipolitico, riducendo gli acidi grassi liberi circolanti, prevenendo il danno ossidativo di quest'ultimi sull'endotelio [12-13], attraverso la produzione di ossido nitrico [14]. Il *Diabetes Control and Complications Trial* (DCTT) [15] e l'*U.K. Prospective Diabetes Study* (UKPDS) [16] hanno dimostrato che l'iperglicemia è l'evento fondamentale nella genesi del danno microvascolare, sebbene questo processo venga modificato sia da determinanti genetici della suscettibilità individuale sia da fattori indipendenti acceleranti, come l'ipertensione e la dislipidemia. L'UKPDS ha dimostrato che esiste un aumento di circa 10 volte del rischio quando l'emoglobina glicata (HbA_{1c}) aumenta dal 5.5 al 9.5%. Di contro, all'interno dello stesso range di HbA_{1c}, il rischio macrovascolare aumenta solo di circa due volte [16]. I meccanismi alla base degli effetti dannosi dell'iperglicemia sul microcircolo sono così schematizzabili: aumento del flusso intracellulare di glucosio attraverso la via dei polioli [17]; produzione intracellulare di precursori AGE (glucose-derived advanced glycation endproducts), che avrebbero ruolo fondamentale nella genesi del danno retinico [18]; alterazione dei meccanismi di trasduzione post-recettoriale endoteliale legati all'attivazione del calcio e all'attivazione della protein-

chinasi C [19]; aumento dell'attività della via dell'esosamina, con blocco della trascrizione nucleica di alcuni fattori di crescita [20]. Tutti questi meccanismi confluiscono in una disfunzione mitocondriale, con sovrapproduzione dei radicali liberi dell'ossigeno e alterazione del DNA nucleico con compromissione dei meccanismi di riparazione [20].

Se l'iperglicemia non appare direttamente correlabile al danno macrovascolare, si conosce invece bene la relazione esistente fra questo e insulino-resistenza [2]. Al fine di separare il rischio dovuto alla presenza di danno macrovascolare associato all'insulino-resistenza dall'aumentato rischio dovuto all'iperglicemia, il *San Antonio Heart Study* ha preso in considerazione soggetti di sesso maschile senza diabete o con ridotta tolleranza al glucosio [21]. La presenza di insulino-resistenza, indipendentemente da altri fattori di rischio noti, aumentava il rischio cardiovascolare del 25%. Specificamente, una larga parte del rischio cardiovascolare dovuto all'insulino-resistenza riflette una sua conseguenza e cioè l'aumento del flusso acidi grassi liberi (FFA) dagli adipociti nelle cellule endoteliali arteriose. L'aumentata ossidazione degli FFA causa la sovrapproduzione di radicali liberi dell'ossigeno che attivano le stesse vie responsabili del danno tissutale secondario alla sola iperglicemia. Pertanto la disfunzione micro- e macrocircolatoria si embricano e amplificano. Questione aperta rimane: come mai le complicanze micro- e macrocircolatorie si combinano in modo differente in pazienti con DM2, presentandosi come singole o multiple complicanze.

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio è stato:

- Valutare le correlazioni esistenti nel DM2 fra insulino-resistenza e disfunzione micro- e macrocircolatoria, espressa la prima essenzialmente dalla presenza di retinopatia e di alterazioni della microcircolazione cutanea, la seconda dalla presenza di alterazioni di parametri funzionali del cuore e dei grossi vasi .
- Valutare le correlazioni fra i fattori di rischio cardiovascolare – classici e non – e retinopatia.

PAZIENTI E METODI

Sono stati studiati pazienti con DM2, di cui 14 pazienti con retinopatia diabetica (9M/5F, con età 63 ± 4 anni) e 14 pazienti non affetti da tale complicanza (9M/5F, con età 60 ± 8 anni), ben appaiati per indice di massa corporea (BMI). Dei 14 pazienti con retinopatia diabetica 9 presentavano retinopatia proliferativa/laser trattata e 5 presentavano retinopatia “background”. L’intero gruppo è stato selezionato come indenne da malattia renale, con valori di creatinina minori a 1,2 mg/l, al fine di poter meglio valutare la sola retinopatia come manifestazione clinica maggiore di disfunzione microcircolatoria. Altro criterio di esclusione è stata la presenza di malattia cardiovascolare nota (coronaropatia, aterosclerosi carotidea, ecc.)

I dati relativi ad ogni paziente comprendono *informazioni demografiche* (età, peso, altezza, grado di scolarità); *informazioni sulla presenza di fattori di rischio cardiovascolare e metabolico* (anamnesi familiare positiva per cardiopatia ischemica, diabete mellito, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, ecc.), *informazioni su eventuali malattie pregresse e/o esami strumentali eseguiti*. La storia familiare di cardiopatia ischemica (FIHD), ipertensione arteriosa, diabete mellito (FHMD) sono espresse come presenti se almeno un parente di 1° grado ne risulta affetto. I fumatori sono stati suddivisi in due gruppi: non fumatori e fumatori correnti.

A tutti i pazienti sono stati eseguiti i seguenti esami ematochimici: glicemia, profilo lipidico (colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi), acido urico, azotemia, creatininemia, transaminasi (GOT, GPT), VES, fibrinogeno, proteina C-

reattiva, omocisteina, ematocrito e numero di globuli bianchi e piastrine, microalbuminuria.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a clamp euglicemico iperinsulinemico, per la valutazione della sensibilità insulinica, a fluorangiografia retinica, per la valutazione del microcircolo retinico, a iontoforesi laser Doppler, per la valutazione del microcircolo cutaneo, ad ecocardiografia bidimensionale-CD, ad eco-CD dei vasi cerebro-afferenti, a valutazione di alcuni parametri di rigidità arteriosa, come indicativi della funzionalità macrovascolare.

METODI

Clamp euglicemico iperinsulinemico

Rappresenta il metodo di riferimento per quantificare l'insulino-sensibilità [22-23]. Durante clamp euglicemico iperinsulinemico in soggetti normotolleranti al glucosio l'insulina stimola l'uptake di glucosio di tre o quattro volte e una larga porzione (50-60%) dell'utilizzazione di glucosio è rappresentata dall'uptake di glucosio e dal deposito di glicogeno nel muscolo scheletrico. Usando tale definizione si può affermare che l'insulino-resistenza è presente approssimativamente in almeno il 25% [23] della popolazione sana normopeso e interessa almeno il 50% dei soggetti diabetici non obesi [24].

La metodica prevede l'inserimento di due cateteri venosi, uno in una vena del braccio per la somministrazione di insulina e glucosio, l'altro, in direzione antidromica al polso, per i prelievi seriati del glucosio. La somministrazione esogena di insulina viene eseguita a dosi pari a $40 \text{ mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ al fine di produrre una insulinemia

plasmatica superiore di 60-100 $\mu\text{U/ml}$ rispetto all'insulinemia basale. I pazienti diabetici presentano glicemie a digiuno differenti e successivamente all'infusione di insulina presentano tempi variabili di discesa della glicemia. Quando quest'ultima raggiunge valori di circa 5.0 mmol/L (tempo 0 di euglicemia) essa viene "clampata" attraverso la somministrazione esogena variabile di glucosio per un tempo pari a 150 minuti. Ad una fase di incremento iniziale segue una fase di "steady state" (generalmente nell'intervallo di tempo compreso fra gli 80 e i 150 minuti), in cui la quantità infusa di glucosio esogeno eguaglia l'ammontare di glucosio necessario ai tessuti. Tale metodo permette una quantizzazione dell'insulino-sensibilità complessiva e permette inoltre di valutare diversi effetti isolati dell'insulina senza l'influenza contemporanea delle fluttuazioni glicemiche. Generalmente il calcolo finale della sensibilità viene eseguito sui valori degli ultimi 30 minuti dello studio ed espresso per kg di massa magra del soggetto, valutata con tecnica impedenziometrica, ed è basato sul computo totale di glucosio infuso maggiorato del glucosio endogeno, misurato attraverso l'uso di glucosio marcato con deuterio. I traccianti del glucosio presentano un metabolismo sovrapponibile a quello del glucosio [25].

Fluorangiografia retinica

In tutti i pazienti è stata eseguita una angiografia con fluoresceina. L'angiografia con la fluoresceina è esame diagnostico che usa delle speciali macchine fotografiche per evidenziare i vasi sanguigni che nutrono la retina, definendone le caratteristiche morfologiche e di decorso [26]. Nello sviluppo delle lesioni della retinopatia diabetica i principali processi fisiopatologici sono a carico del microcircolo retinico con primitiva sofferenza ischemica e secondaria risposta abnorme per sopperire al ridotto apporto di

ossigeno e nutrienti. La fluorangiografia è esame principe [27] nel definire gli stadi fisiopatologici della retinopatia diabetica, schematizzabili come segue: perdita della funzionalità dei periciti dei capillari; sfiancamento della parete dei capillari con formazione di microaneurismi; rottura della barriera emato-retinica, con aumento della permeabilità vascolare dei capillari retinici; edema maculare; obliterazione di capillari e di arteriole della retina; proliferazione di neovasi retino-vitreali e di tessuto fibroso. L'edema maculare è in genere manifestazione di passaggio dalla retinopatia "background" alla retinopatia proliferativa.

Ecocardiografia-2D-CD

Lo studio ecografico è stato eseguito con apparecchio Aloka Prosound SSD-5500 implementato con una sonda cardiaca settoriale (PA52101) e comprendeva: visualizzazione apicale a 2 e 4 camere del ventricolo sinistro; interrogazione Doppler dei profili di flusso transmitralico, aortico e ventricolare sinistro; velocità tissutali miocardiche ottenute tramite tissue Doppler imaging (TDI). Dalle acquisizioni M-mode sono state ottenute: massa ventricolare sinistra indicizzata (LVMI); ispessimento della parete posteriore durante la sistole; accorciamento frazionale endomiocardico e stress sistolico parietale, calcolati usando le formule standard [28]; MWS è l'accorciamento circonferenziale medio-parietale; LVDD e LVDs sono i diametri tele-sistolici e tele-diastolici; Pwd e IVSd sono gli spessori della parete posteriore e del setto interventricolare in telediastole; lo stress parietale ESS è stato calcolato con le formule standard e il valore di MWS in base al livello osservato di ESS è stato calcolato. L'ipertrofia ventricolare sinistra (LVH) definita come rapporto tra la massa ventricolare sinistra e l'altezza^{2.7} $> 47 \text{ g m}^{-2.7}$ nelle donne e $> 50 \text{ g m}^{-2.7}$ negli uomini. La frazione di eiezione è stata calcolata secondo la formula di Simpson. Dal profilo di flusso

transmitralico sono state ottenute la velocità di flusso proto- e telesistolico (E ed A rispettivamente) e il loro rapporto calcolato. La gittata sistolica e l'indice cardiaco sono stati calcolati dagli integrali velocità-tempo al livello dell'aorta e dell'apertura aortica. Applicando il principio Doppler al tessuto miocardico sono state visualizzate attraverso l'analisi spettrale, la velocità di movimento (in cm/sec) sistolico (Svel), protodiastolico (Evel) e telediastolico (Avel) e i loro integrali tempo-velocità (VTI in cm), sono state ottenute al livello dell'annulus della valvola mitrale e delle regioni basale e media del setto interventricolare [29]. Per tutte le misurazioni è stata calcolata la media di tre battiti.

Eco-CD dei vasi cerebro-afferenti e Pulse Wave Velocity

Lo studio Eco-CD dei vasi carotidei è stato eseguito al livello della carotide comune mediante Prosound SSD-5500 con una sonda lineare ad alta frequenza (LN5545), Aloka, Tokio, Japan) implementato con un sistema di monitoraggio dei diametri arteriosi ad elevata risoluzione (echo-tracking) interfacciato con un personal computer. Il sistema echo-tracking permette di misurare le variazioni dei diametri arteriosi con un'accuratezza pari ad un sedicesimo della lunghezza d'onda del fascio ultrasonoro stesso (0,013 mm) orientato perpendicolarmente rispetto alle pareti vasali. La velocità del flusso ematico viene registrata simultaneamente mediando valori derivati dal color Doppler con un secondo fascio ultrasonoro orientato secondo la direzione del flusso. Infine una curva di pressione in funzione del tempo viene ottenuta calibrando la curva di diametro per la pressione arteriosa omerale, mediante sfigmomanometro automatico [30]. Tutte le acquisizioni sono sincronizzate con il segnale elettrocardiografico (ECG). I soggetti sono stati studiati nella posizione supina dopo 10 minuti di riposo. Il sito vascolare scelto era la carotide comune a 2 cm dalla biforcazione carotidea. I seguenti

indici di rigidità arteriosa locale e di distensibilità sono automaticamente ottenuti dal sistema delle curve arteriose e dalla pressione arteriosa: indice di rigidità pressione-indipendente (stiffness-index) (B); modulo elastico di Peterson (pressure-strain) (Ep); compliance arteriosa (AC); augmentation index (AIx) [31]; velocità dell'onda sfigmica (PWV), un indice della rigidità arteriosa sistemica. Le metodiche convenzionali per la misurazione on-line della velocità dell'onda sfigmica sono basate sulla metodica cosiddetta "a due punti", vale a dire la misurazione della velocità dell'onda stessa attraverso una direzione prefissata, utilizzando due trasduttori cutanei di pressione, applicati contemporaneamente in corrispondenza del punto di repere di due arterie (nel nostro studio carotide e femorale) e un programma informatico di registrazione ed analisi che consente il calcolo automatico ed istantaneo della velocità di propagazione dell'onda di polso durante dieci sistole consecutive, corrispondenti ad un ciclo respiratorio. I segnali ottenuti dai due trasduttori di pressione vengono processati da un algoritmo computerizzato sulla base del principio che le differenze tra due onde vengono ridotte al minimo una volta sovrapposte. I dati ottenuti consentono di calcolare la PWV relativa a diversi distretti.

Iontoforesi laser Doppler

È metodo tradizionalmente utilizzato per la valutazione del flusso microcircolatorio periferico. Quest'ultimo (conventional perfusion units, P.U.), viene misurato al livello della superficie volare di entrambe le braccia attraverso un flussometro laser Doppler (Periflux PF 4001, standard probes PF408; Perimed, Jarfallan, Sweden). Lo strumento elabora misure semiautomatiche (media \pm SD, area sotto la curva) del flusso microcircolatorio cutaneo in selezionati intervalli di tempo [32]. La risposta vasodilatatoria viene misurata in risposta alla iontoforesi di soluzioni contenenti: 1% di

acetilcolina diluita in soluzione salina (che stimola sia una risposta neurovascolare sia una vasodilatazione endotelio-dipendente); 1% di sodio nitroprussiato diluito in soluzione salina (che stimola solo la vasodilatazione endotelio-dipendente) [33]. Il dispositivo contiene due alloggiamenti che accolgono due singoli elettrodi, l'uno viene imbevuto con la sostanza usata, alla quale viene applicata la polarità corrispondente, l'altro viene applicato a circa 10-15 cm di distanza. La iontoforesi segue all'applicazione di un flusso di corrente ($200 \mu\text{A} \times 5 \text{minuti}$). La risposta vasoattiva viene rilevata in tempo reale dal laser Doppler. Le misure vengono ottenute 5 minuti prima, durante la iontoforesi e 5 minuti dopo. Lo studio viene eseguito ad una temperatura ambiente di circa 22°C , con il paziente in posizione supina da almeno 15 minuti.

ANALISI STATISTICA

Le variabili in considerazione sono state espresse come medie \pm SD. I trigliceridi, l'insulinemia, la glicemia e il tasso d'escrezione urinaria dell'albumina sono stati espressi come mediane e [range interquartile]. La significatività statistica è stata testata con il t test (o ANOVA) per variabili continue, il χ^2 test per variabili nominali e il test di Mann Whitney per variabili non parametriche. Le analisi di regressione semplice e multipla sono state condotte attraverso metodi standard con StatView, ver.5.0, software (SAS, Cary, NC, USA). La significatività statistica è assunta con valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

La **tabella 4** mostra le caratteristiche cliniche dei soggetti in esame stratificati in base alla presenza (ret +) o assenza di retinopatia (none). I due gruppi sono sovrapponibili per età, sesso e BMI. I valori di pressione arteriosa e i parametri ad essa correlati (pressione differenziale e pressione media) sono paragonabili nei due gruppi. Non ci sono differenze nel profilo lipidico eccetto il valore del colesterolo HDL, che è significativamente più basso nel gruppo di retinopatici ($p=0,02$). Non ci sono sostanziali differenze nei valori di insulinemia a digiuno, l'emoglobina glicata tende ad essere più elevata nei retinopatici ($p=0,06$), mentre statisticamente significativi risultano la durata della malattia diabetica ($p=0,02$) e la glicemia a digiuno ($p=0,004$). I retinopatici sono anche più ipoalbuminemici rispetto al gruppo di confronto ($p=0,06$). Infine, malgrado si osservi una certa differenza nei valori di escrezione urinaria di albumina nelle 24 ore, con valori più alti nei retinopatici (36% vs 7%), la differenza non è statisticamente significativa. I diabetici affetti da retinopatia presentano inoltre valori più alti di alcuni indici infiammatori, quali il fibrinogeno (266 ± 49 vs 322 ± 62 mg/L, $p=0,02$), la VES (14 ± 15 vs 27 ± 17 mm/hr, $p=0,04$), il numero dei globuli bianchi (5683 ± 1456 vs 6926 ± 632 , $p=0,04$) (**Figura 1**).

I retinopatici mostrano una più bassa sensibilità all'insulina ($23,9\pm 9,2$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}_{\text{FFM}}^{-1}$) rispetto ai diabetici non affetti da tale complicanza ($34,1\pm 15,3$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}_{\text{FFM}}^{-1}$) (**Figura 2**). La curva insulinica e la curva della velocità di infusione di glucosio durante clamp euglicemico iperinsulinemico mostrano significative differenze (**Figura 3**). In entrambi i gruppi si osserva il decremento atteso, sotto l'effetto dell'insulina, nei valori di acidi grassi non esterificati (FFA), mentre valori lievemente

più elevati si osservano, sia basalmente che durante clamp euglicemico iperinsulinemico, nei retinopatici ($p=n.s.$). Infine, i due gruppi non presentano differenze significative nei valori di omocisteina.

Effettuando l'analisi di regressione semplice, la retinopatia è indipendente dall'età, dal sesso e dal BMI mentre è significativamente associata al fibrinogeno ($r=0,52$, $p=0,005$), alla VES ($r=0,46$, $p=0,01$), alla durata della malattia diabetica ($r=0,43$, $p=0,02$), al colesterolo HDL ($r=0,40$, $p=0,03$), all'insulino-resistenza ($r=0,38$, $p=0,04$). Viceversa, considerando la sensibilità all'insulina come variabile dipendente, parametri correlati sono il colesterolo HDL ($r=0,50$, $p=0,006$), la circonferenza addominale ($r=0,55$, $p=0,03$), la glicemia a digiuno ($r=0,41$, $p=0,03$) e la presenza di retinopatia ($r=0,38$, $p=0,04$).

Nella **tabella 5** sono riportati gli indici di funzionalità cardiaca. La significatività statistica è presente solo per alcuni indici di precoce disfunzione diastolica, rappresentati dall'aumento della velocità del flusso telediastolico (A'mitral velocity) ($p=0,02$), dall'aumento del rapporto E/E' ($p=0,04$) e da una riduzione del rapporto E'/A' ($p=0,05$).

Nella **tabella 6** sono riportati parametri di meccanica arteriosa, riguardanti il macro- e il microcircolo. In particolare, non ci sono significative differenze nello spessore medio-intimale carotideo e in altri indici di rigidità arteriosa. Statisticamente significativa è solo la differenza del valore del diametro carotideo in diastole, che viene considerato precocissimo segno di rimodellamento arterioso.

Per ciò che riguarda la valutazione del microcircolo cutaneo, significative differenze sono presenti basalmente e nella risposta all'acetilcolina, con valori più bassi nel gruppo dei retinopatici; nessuna differenza è riscontrabile basalmente e dopo stimolo con sodio-nitroprussiato (SNP). I valori basali diversi tra il test all'acetilcolina e quello

al nitroprussiato sono solo legati al cambiamento della sede cutanea di iontoforesi e ad una variabilità insita nel metodo.

Infine, nella *tabella 7* sono indicate le percentuali dei pazienti sottoposti a diversa terapia antidiabetica, antiipertensiva ed antiaggregante ($p=0,005$).

DISCUSSIONE

Il risultato principale del nostro studio è l'aver individuato nella presenza di retinopatia diabetica la somma di diverse alterazioni ovvero un quadro di infiammazione subclinica, alterazioni metaboliche, compromissione della funzione diastolica del VS, iniziali alterazioni a carico dei grossi vasi e del microcircolo cutaneo e una maggiore insulino-resistenza.

Nei pazienti retinopatici è presente un quadro di infiammazione subclinica rappresentato dall'incremento dei valori di fibrinogenemia, VES, leucocitosi relativa e ipoalbuminemia. È già noto che il quadro di infiammazione subclinica è correlato alla malattia diabetica e allo stato di insulino-resistenza [34], mentre l'ipoalbuminemia è sostanzialmente un dato nuovo, oggetto di discussione in un recente lavoro, che per la prima volta ha dimostrato che l'ipoalbuminemia può essere considerata marker di severità della retinopatia in diabetici di tipo 2 [35]. In precedenza era stato riportato che l'ipoalbuminemia era verosimilmente dovuta alla nefropatia diabetica [36]. I nostri pazienti, tuttavia, non presentano segni di compromissione renale né vi sono differenze significative per quanto riguarda i valori di microalbuminuria. Quindi l'ipoalbuminemia, in accordo con Iwasaki et al., potrebbe essere un marker dell'infiammazione cronica subclinica presente nei retinopatici, essendo l'albumina una proteina di fase acuta [37]. In questa chiave l'ipoalbuminemia potrebbe essere segno ancora più precoce della microalbuminuria e, per converso, la retinopatia rappresentare quadro di disfunzione microvascolare più precoce della nefropatia.

I retinopatici presentano inoltre un profilo metabolico più compromesso rispetto ai non retinopatici esibendo più bassi valori di colesterolo HDL, valori più elevati della

glicemia a digiuno, una più lunga durata di malattia e valori più elevati di emoglobina glicata.

Klein et al. hanno dimostrato che i diabetici retinopatici rispetto ai pazienti non affetti da tale complicanza hanno maggiore prevalenza di fattori di rischio cardiovascolare [38], come ipertensione e dislipidemia, che tuttavia non spiegano la quantità delle associazioni osservate fra retinopatia e danno d'organo [39-41]. A tal proposito, consideriamo che nel nostro studio, pur essendo piccolo il numero dei casi osservati, i valori di pressione arteriosa e il profilo lipidico sono molto simili nei due gruppi e anche la terapia antiipertensiva e antidiabetica non sono così diverse da giustificare le associazioni trovate con i parametri di disfunzione macrovascolare. A tal proposito, in una recente review [42] sono stati presi in considerazione i dati di circa 70.000 pazienti diabetici dimostrando che il classico "Framingham risk score" [43] sottostima ampiamente il rischio cardiovascolare nella popolazione diabetica. Sembra dunque opportuno identificare predittori addizionali di malattia cardiovascolare e la retinopatia potrebbe essere tra questi.

Per quanto riguarda la compromissione cardiaca, al TDI i retinopatici presentano alterazioni di disfunzione diastolica, con aumento della velocità del flusso telediastolico (picco A'), riduzione del rapporto E'/A' ed aumento del rapporto E/E', indicativo di un aumento delle pressioni di riempimento del ventricolo sinistro. Il vantaggio di tale metodica è di essere relativamente indipendente dal pre-carico, pertanto il suo impiego non sottostima la disfunzione diastolica del ventricolo sinistro come fanno invece i più comuni indici ecocardiografici (E/A ratio) determinati con il Doppler del flusso transmitralico [44]. Sebbene pochi altri lavori, anche se in maniera contrastante, [45-46] indichino la presenza di disfunzione diastolica nel soggetto diabetico, il nostro studio è il primo a fornire tali evidenze in diabetici affetti da retinopatia. La causa della

disfunzione diastolica nei pazienti con DM2 non è chiara; essa sembrerebbe indipendente dal cattivo controllo della malattia [47], mentre sarebbe associata alla bassa capacità aerobica [48], all'obesità [49] e/o all'ipertensione arteriosa [50], cioè a situazioni di comorbidità del DM2. Cambiamenti strutturali del miocardio in pazienti con DM2 sarebbero responsabili del decremento della compliance ventricolare. Tali cambiamenti sarebbero legati ad un processo di fibrosi interstiziale, forse innescata dall'accumulo locale di prodotti infiammatori [51] e pertanto in parte legata a caratteristiche proprie e maggiormente espresse della malattia, indipendente dalla presenza di ipertensione arteriosa o coronaropatia.

Per quanto riguarda i parametri di meccanica arteriosa, sebbene iniziali alterazioni nei valori di rigidità arteriosa e nelle caratteristiche morfo-strutturali carotidee siano riscontrabili nei retinopatici, tuttavia le differenze tra i due gruppi non raggiungono la significatività statistica.

La presenza di una ridotta risposta alla vasodilatazione indotta dalla iontoforesi con acetilcolina nei pazienti con retinopatia evidenzia la presenza di disfunzione microcircolatoria cutanea e sottende ad una disfunzione endoteliale, in cui confluiscono la larga parte dei processi di infiammazione e danno ossidativo indotto dall'iperglicemia [12-14, 52-53].

Infine, nel nostro studio i diabetici con retinopatia presentano maggiore insulino-resistenza rispetto ai pazienti non affetti da tale complicanza. Sono veramente pochi i lavori che hanno studiato questa relazione (fig.3). Maneschi F. et al. [54] trovano un'associazione positiva in relazione con un cattivo controllo metabolico e una maggior durata di malattia, mentre Parvanova et al. [55] dimostrano che solo pazienti affetti dalla forma più grave di retinopatia, cioè quella proliferativa/laser trattata, rispetto a diabetici non retinopatici, sono più insulino-resistenti, con più alti livelli di colesterolo

LDL ed albuminurici. Secondo questi autori, i pazienti affetti da retinopatia meno grave o “background” hanno invece uno stato di insulino-resistenza non diverso dai diabetici non retinopatici. Infine gli autori concludono enfatizzando il ruolo causale e precedente dello stato di insulino-resistenza sul quadro di retinopatia proliferativa/laser-trattata.

Nel nostro studio, la retinopatia è più specificamente correlata con i parametri infiammatori, un basso valore di colesterolo HDL, durata di malattia, mentre l’insulino-resistenza si associa ad un basso colesterolo HDL, alla circonferenza addominale, alla glicemia a digiuno. Quindi insulino-resistenza e retinopatia sembrano essere entrambe parte integrante di una malattia diabetica in cattivo controllo glicemico. Inoltre, è solo la retinopatia, ma non l’insulino-resistenza, a risultare predittore indipendente di precoce danno miocardico. Tuttavia, non è possibile stabilire, né da questo studio né da quelli precedentemente citati, un rapporto di causa ed effetto fra l’insulino-resistenza e la complicanza retinopatica.

In conclusione, sommando insieme tutti i risultati del nostro studio, che sono stati trattati non in ordine d’importanza, ma solo per logica consequenziale, si comprova la presenza di insulino-resistenza nei soggetti con retinopatia, ma maggiore enfasi viene data alla possibilità che tale aspetto faccia parte di una fenomenologia più complessa, comprendente diverse alterazioni che concertano insieme a produrre un più avverso fenotipo cardiovascolare nel soggetto diabetico (**Figura 4**) (“vascular resilience of diabetic subjects”) [56].

Table 4. Clinical characteristics of study subjects stratified by absence (none) or presence (ret +) of retinopathy

	None	Ret +	p-value
Male/Female (n)	9/5	9/5	n.s.
Age (years)	60 ± 8	63 ± 4	n.s.
BMI (kg·m⁻²)	30.9 ± 4.9	31.7 ± 4.2	n.s.
Waist circumference (cm)	107 ± 10	112 ± 11	n.s.
FIHD y/n (%)	52/43	48/57	n.s.
FHDM y/n (%)	21/43	79/57	n.s.
Smoking (n\ex\c; in %)	21/57/21	50/36/14	n.s.
Systolic BP (mmHg)	134 ± 18	143 ± 20	n.s.
Diastolic BP (mmHg)	79 ± 10	78 ± 15	n.s.
Total cholesterol (mmol/L)	4.93 ± 0.70	4.88 ± 1.11	n.s.
HDL cholesterol (mmol/L)	1.25 ± 0.28	1.01 ± 0.28	0.03
FFA (mmol/L)	0.59 ± 0.26	0.66 ± 0.28	n.s.
Triglycerides (mmol/L)	1.95 [1.81]	1.48 [0.94]	n.s.
Diabetes duration (months)	96 ± 75	171 ± 88	0.03
Fasting Glucose (mmol/L)	7.80 [1.90]	10.10 [1.60]	0.01
HbA_{1c} (%)	7.6 ± 2.0	8.6 ± 1.6	0.06
Fasting Insulin (pmol/L)	75 [93]	92 [84]	n.s.
Serum Albumin (g/L)	4.58 ± 0.3	4.36 ± 0.3	0.06
Serum creatinine (mg/dl)	1.02 ± 0.12	1.16 ± 0.25	n.s.
Albumin Excretion Rate (mg/L)	5 [12]	5 [87]	n.s.
Homocysteine (μmol/L)	14.6 ± 11.1	13.0 ± 4.1	n.s.

Table 5. Echocardiographic and tissue Doppler imaging parameters.

	None	Ret +	<i>p</i> value
LVEDD (mm)	50.5 ± 5.2	53.9 ± 2.9	n.s.
LVESD (mm)	33.5 ± 5.0	33.3 ± 6.7	n.s.
PWD (mm)	8.9 ± 0.5	9.2 ± 0.9	n.s.
IVSd (mm)	9.3 ± 1.0	9.5 ± 1.7	n.s.
LVMi (g.m^{2.7})	56.8 ± 13.3	53.2 ± 8.3	n.s.
LVEF (%)	64	59	n.s.
MWS (mm)	19.8 ± 2.3	18.8 ± 3.5	n.s.
E (cm/sec)	63.2 ± 11.9	69.0 ± 19.6	n.s.
A (cm/sec)	71.3 ± 10.9	84.5 ± 24	n.s.
E/A	0.86 ± 0.1	0.80 ± 0.3	n.s.
Mitral E' velocity (cm/sec)	10.1 ± 3.6	10.1 ± 3.4	n.s.
Mitral A' velocity (cm/sec)	7.0 ± 0.8	8.8 ± 2.1	0.02
E'/A'	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.05
E/E'	7.0 ± 2.0	8.7 ± 2.1	0.04
Cardiac index (ml·min⁻¹·m²)	3521 ± 645	3227 ± 815	n.s.

Table 7. Macrovascular parameters (ultrasonography) and microvascular parameters (laser Doppler velocimetry)

	None	Ret +	p-value
IMT (mm)	0.92 ± 0.2	1.04 ± 0.3	n.s.
Diastolic Diameter (mm)	8.4 ± 0.9	9.4 ± 0.8	0.04
Systolic Diameter (mm)	8.1 ± 0.9	8.9 ± 0.9	0.08
Stiffness Index (B) (mmHg)	12.5 ± 3.9	11.5 ± 3.6	n.s.
Pressure Strain (Ep)(mmHg)	184 ± 78	160 ± 56	n.s.
Artery Compliance (AC) (mm)	6.7 ± 3.2	8.7 ± 2.3	n.s.
Augmentation Index	14 ± 7	12 ± 9	n.s.
Pulse Wave Velocity C-R	11.2 ± 1.5	11.0 ± 1.4	n.s.
Pulse Wave Velocity C-F	11.5 ± 3.0	13.0 ± 2.0	n.s.
Pulse Wave Velocity (m/sec)	8 ± 2	7 ± 1	n.s.

	None	Ret +	p-value
Basal ACH (PU)	8.08 ± 4.0	5.42 ± 1.7	0.05
Max ACH	55.8 ± 22.5	36.9 ± 25.8	0.07
Basal SNP	5.3 ± 1.9	4.9 ± 2.6	n.s.
Max SNP	32.6 ± 14.8	28.2 ± 23.2	n.s.

Table 8. Percentage of patients on pharmacological treatment.

	None	Ret +
Biguanides	93/7	86/14
SU/Glinides/Glitazones	29/71	29/ 71
Insulin	21/79	50/50
Statins	21/79	43/57
ACE/ARB	36/64	57/43
β-blockers	14/86	14/86
Diuretics	21/79	43/57
Calcium antagonists	21/79	7/93
Aspirin*	14/86	64/36

BIBLIOGRAFIA

1. Roglic G, Unwin N, Bennet PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 2005;28:2130-2135.
2. De Fronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance a multifaced syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991;14:173-194.
3. Haffner SM, D'Agostino Jr R, Mykkanen L, Tracy R, Howard B, Rewers M, Selby J, Savane PJ, Saad MF. Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 1999;22:562-568.
4. Kuusisto J, Lempiainen P, Mykkanen L, Laakso M. Insulin resistance syndrome predicts coronary artery disease events in elderly type 2 diabetic men. *Diabetes Care* 2001;24:1629-1633.
5. Fox CS, Sullivan L, D'Agostino RB, Wilson PW. The significant effect of diabetes duration on coronary heart disease mortality: the Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2004;27:704-708.
6. Vaccaro O, Eberly LE, Neaton JD, Yang L, Riccardi G, Stamler J. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Impact of diabetes and previous myocardial infarction on long-term survival: 25-year mortality follow-up of primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arch Intern Med*. 2004;164:1438-1443.
7. Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA*. 2007;298; 902-916.
8. Hiller R, Sperduto RD, Podgor MJ, Ferris FL, Wilson PW. Diabetic retinopathy and cardiovascular disease in type II diabetics. The Framingham Heart Study and the Framingham Eye Study. *Am. J. Epidemiol*. 1988;128:402-409.
9. Wong TY, Klein R, Klein BE, Tielsch JM, Hubbard L, Nieto FJ. Retinal microvascular abnormalities and their relationship with hypertension, cardiovascular disease, and mortality. *Surv. Ophthalmol*. 2001;46:59-80.
10. Cheung N, Bluemke DA, Klein R, Sharrett AR, Islam FM, Cotch MF, Klein BE, Criqui MH, Wong TY. Retinal arteriolar narrowing and left ventricular

- remodeling: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;50:48-55.
11. Wong TY, Cheung N, Islam AFM, Klein R, Criqui MH, Cotch MF, Carr JJ, Klein BE, Sharrett AR. Relation of retinopathy to coronary artery calcification: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol.* 2008;167:51-58.
 12. Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Hardin D. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* 1993;21:129-135.
 13. Steinberg HO, Baron AD. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 2002;45:623-634.
 14. Groop PH, Forsblom C, Thomas MC. Mechanisms of disease: pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2005;1:100-110.
 15. Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Rutledge BN. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial-revisited. *Diabetes* 2008;57:995-1001. Epub 2008 Jan 25.
 16. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet.*1998;352:837-853.
 17. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contributions of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:233-236.
 18. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:11555-11558.
 19. Bishara NB, Dunlop ME, Murphy TV, Darby IA, Sharmini Rajanayagam MA, Hill MA. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca²⁺ signaling in endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2002; 193:80-92.
 20. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:12222-12226.

21. Hanley AJ, Williams K, Stern MP, Haffner SM. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 2000;25:1177-1184.
22. De Fronzo RA, Tobin J, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:214-223.
23. Ferrannini E. How to measure insulin sensitivity. *Journal of Hypertension* 1998;16:895-906.
24. Harano Y, Ogaku S, Kosugi K, Yasuda H, Nakano T, Kobayashi M, Hidaka H, Izumi K, Kashivagi A, Shigeta Y. Clinical significance of altered insulin sensitivity in diabetes mellitus assessed by glucose, insulin and somatostatin infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:982-987.
25. Basu R, Di Camillo B, Toffolo G, Basu A, Shah P, Vella A, Rizza R, Cobelli C. Use of a novel triple-tracer approach to assess postprandial glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284:55-69.
26. Clermont AC, Bursell SE. Retinal blood flow in diabetes. *Microcirculation*. 2007;14:49-61. Review.
27. Agardh E, Cavallin-Sjoberg U. Peripheral retinal evaluation comparing fundus photographs with fluorescein angiograms in patients with diabetes mellitus. *Retina* 1998;18:420-423.
28. Henry WL, De Maria A, Gramiak R. Report of the American Society of Echocardiography Committee on nomenclature and standards in two-dimensional echocardiography. *Circulation* 1980;62:212-217.
29. Dalsgaard M, Snyder EM, Kjaergaard J, Johnson BD, Hassager C, Oh JK. Isovolumic acceleration measured by tissue Doppler echocardiography is preload independent in healthy subjects. *Echocardiography* 2007;24:572-579.
30. De Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC, Kastelein JP. Measurement of Arterial Wall Thickness as a Surrogate Marker for Atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:33-38.
31. Nakae I, Matsuo S, Matsumoto T, Mitsunami K, Horie M. Augmentation Index and Pulse Wave Velocity as Indicators of Cardiovascular Stiffness. *Angiology* 2008 Apr 2; [Epub ahead of print]
32. Hamdy O, Abou-Elenin K, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Contribution of nerve-axon reflex-related vasodilation to the total skin vasodilation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care*. 2001;24:344-349.

33. Veves A, Akbari CA, Primavera J, Donaghue VM, Zacharoulis D, Chrzan JS, De Girolami U, Lo Gerfo FW, Freeman R. Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes* 1998;47:457-463.
34. Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000;102:42-47.
35. Iwasaki T, Togashi Y, Terauchi Y. Significant association of serum albumin with severity of retinopathy and neuropathy, in addition to that of nephropathy, in Japanese type 2 diabetic patients. *Endocrin J* 2008 Epub ahead in print.
36. Folsom AR, Ma J, Eckfeldt JH, Nieto FJ, Metcalf PA, Barnes RW. Low serum albumin: association with diabetes mellitus and other cardiovascular risk factors but not with prevalent cardiovascular disease or carotid intima-media thickness. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Ann Epidemiol* 1995;5:186-191.
37. Moshage HJ, Janssen JA, Franssen JH, Hafkenscheid JC, Yap SH. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *J Clin Invest* 1987;79:1635-1641.
38. Klein R, Sharret AR, Klein BE, Moss SE, Folsom AR, Wong TY, Brancati FL, Hubbard LD, Couper D, Group A. The association of atherosclerosis vascular risk factors, and retinopathy in adults with diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology* 2002;109:1225-1234.
39. Cheung N, Rogers S, Couper DJ, Klein R, Sharret AR, Wong TY. Is diabetic retinopathy an independent risk factor for ischemic stroke? *Stroke* 2007;38:398-401.
40. Cheung N, Wang JJ, Klein R, Couper DJ, Sharret AR, Wong TY. Diabetic retinopathy and the risk of coronary heart disease. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care* 2007;30:1742-1746.
41. Juutilainen A, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Retinopathy predicts cardiovascular mortality in type 2 diabetic men and women. *Diabetes Care* 2007;30:292-299.
42. Brindle P, Bswich A, Fahey T, Ebrahim S. Accuracy and impact of risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Heart* 2006;92:1752-1759.

43. Kirk JK, Bertoni AG, Case D, Bell RA, Goff DC Jr, Narayan KM. Predicted risk of coronary heart disease among persons with type 2 diabetes. *Coron Artery Dis.* 2007;18:595-560.
44. Poirier P, Garneau C, Bogaty P. Impact of left ventricular diastolic dysfunction on maximal treadmill performance in normotensive subjects with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2000;85:473-477.
45. Andersen NH, Poulsen SH, Eiskjer P, Poulsen PL, Mogensen CE. Decreased left ventricular contraction in normotensive and nonalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus: a Doppler tissue tracking and strain rate echocardiography study. *Clin Sci* 2003;66:59-66.
46. Baldi JC, Aoina JL, Whalley GA, Carrik-Ranson G, Walsh HA, O'Shaughnessy H, Bagg W, Doughty RN. The effect of type 2 diabetes on diastolic function. *Med Sci Sports Exerc.* 2006;38:1384-1388.
47. Astorri E, Fiorina P, Gavaruzzi A, Astorri A, Mognati G. Left ventricular function in insulin-dependent and non insulin-dependent diabetic patients: radionuclide assessment. *Cardiology* 1997;88:152-155.
48. Vanoverschelde JJ, Essamri R, Vanbutsele R. Contribution of left ventricular diastolic function to exercise capacity in normal subjects. *J Am Coll Cardiol* 1993;74:2225-2233.
49. Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano N, Byrne E, Beller T, Marwick H. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation* 2004;110:3081-3087.
50. Fang ZY, Shull-Meade R, Downey M, Prins J, Marwick TH. Determinants of subclinical diabetic heart disease. *Diabetologia* 2005;48:394:402.
51. Norton GR, Candy G, Woodiwiss AJ. Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozocin-induced diabetes mellitus in rats. *Circulation* 1996;93:1905-1912.
52. Natali A, Baldi S, Vittone F, Muscelli E, Casolaro A, Morgantini C, Palombo C, Ferrannini E. Effects of glucose tolerance on the changes provoked by glucose ingestion in microvascular function. *Diabetologia.* 2008 Mar 29; Epub ahead of print.

53. Barzilaym JI, Freedland ES. Inflammation and its relationship to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and endothelial dysfunction. *Metab Syndr Relat Disord*. 2003;1:55-67.
54. Maneschi F, Mashiter K, Koehner EM. Insulin-resistance and insulin deficiency in diabetic retinopathy of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1983;32:82-87.
55. Parvanova A, Iliev I, Filipponi M, Dimitrov BD, Vedovato M, Tiengo A, Trevisan R, Remuzzi G, Ruggenti P. Insulin resistance and proliferative retinopathy: a cross sectional, case control study in 115 patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4271-4376.
56. Jurgensen JS. The values of risk scores. *Heart* 2006;92:1713-1714.
57. Suzuki M, Kanazawa A, Shiba M, Kojima H, Harano Y. Insulin resistance in diabetic microangiopathies. *J Diabetes Complications* 2000;14:40-45