



## Acidi grassi poliinsaturi (PUFA n-3)

### Polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs)

L. DEI CAS, S. NODARI, A. MANERBA

Cattedra di Cardiologia, Università di Brescia

Nowadays, several observational and experimental studies, especially clinical randomized trials, have been proved polyunsaturated fatty acids n-3 (n-3 PUFAs) beneficial effects. The ipolipidic effect was the first detected, so at first these drugs had been used for the treatment of dislipidemic disorders, while the anti-inflammatory, antithrombotic, antiatherosclerotic and antiarrhythmogenic effects have been found later. GISSI-Prevenzione trial was the first which demonstrated the efficacy and tolerability of n-3 PUFAs in post-myocardial infarction patients. According to the evidence in literature, today n-3 PUFAs are indicated for the primary and secondary prevention of ischaemic cardiopathy and sudden cardiac death (SCD). Besides, as recently demonstrated, n-3 PUFAs could be indicated not only in patients affected by heart failure or with implantable cardioverter defibrillators, but also in patients at high risk for SCD and for the prevention of Atrial Fibrillation after coronary artery bypass surgery.

The latest studies underline the important role of n-3 PUFAs on the normal brain development, therefore n-3 PUFAs could be used both in the prevention and in the treatment of mental and cognitive diseases. As a matter of fact, n-3 PUFAs beneficial effects on the vascular system can be extended also to cerebral system, where the defects of microcirculation are associated with decreased cognitive capacity and the progression of dementia, often present in the elderly patients. Lower n-3 PUFAs concentration in eritrocytes have been observed in patients affected by depression and the concentration have also been correlated with the severity of this psychiatric disease.

In conclusion, increased intake of n-3 PUFAs, both with a diet and a pharmacological therapy, could be indicated not only in the prevention and treatment of cardiovascular diseases but also in neurological and psychiatric diseases, especially in the elderly patients who usually present more comorbidities.

**Key words:** Polyunsaturated fatty acids n-3 (n3-PUFAs) • Arrhythmias • Ischemic disease • Sudden cardiac death • Primary and secondary prevention

L'interesse nei confronti degli acidi grassi poliinsaturi PUFA (*Polynsaturated Fatty Acid*) è riconducibile agli anni '70 ed agli studi epidemiologici condotti da Bang e Dyenbergh<sup>1</sup>. In particolare, essi osservarono che gli eschimesi Inuit, residenti nel luogo d'origine, mostravano un'incidenza minore di eventi cardiovascolari e di cardiopatia ischemica rispetto alla controparte residente in Danimarca od emigrata nei Paesi industrializzati. Tale osservazione poteva essere unicamente correlata a differenti abitudini alimentari e, in particolare, alla maggiore assunzione di pesce negli Inuit residenti in Groenlandia.



## Definizione ed aspetti biochimici

Gli acidi grassi presenti in natura si distinguono, in base all'assenza o alla presenza di doppi legami, in saturi e insaturi, rispettivamente. Gli acidi grassi insaturi, a loro volta, si differenziano in monoinsaturi o in poliinsaturi in relazione al numero di doppi legami presenti nella loro molecola <sup>2</sup>.

L'aumento del numero di doppi legami, ovvero il passaggio da acidi grassi saturi a molecole progressivamente più "insature", costituisce un elemento strutturale di primaria importanza funzionale: la presenza in serie di doppi legami conferisce alla catena carboniosa il progressivo incremento dei punti di torsione, proprio in corrispondenza del doppio legame. A livello tridimensionale ciò comporta la crescente tendenza degli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) ad assumere una conformazione meno rigida che, sul piano morfo-funzionale, corrisponde ad una crescente fluidità delle membrane entro cui i PUFA sono incorporati.

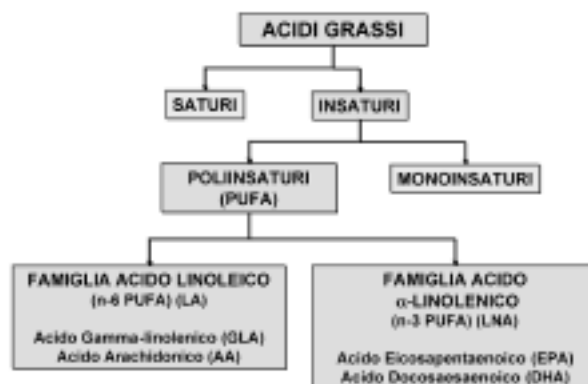
I principali PUFA n-3, contenuti pressoché esclusivamente nel pesce, sono l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) e docosaesaenoico (DHA, C22:6 n-3), l'ultimo dei quali maggiormente rappresentato nel corpo umano. I principali PUFA n-6, contenuti principalmente negli oli vegetali e nella carne, sono rappresentati dall'acido  $\gamma$ -linolenico (GLA, C18:3 n-6) e dall'acido arachidonico (AA, C20:4 n-6).

La conversione dell'acido linoleico in  $\alpha$ -linolenico avviene solamente nei cloroplasti delle foglie, delle alghe e del fitoplancton, mentre negli animali e nell'uomo le due vie metaboliche, pur comprendendo fondamentalmente gli stessi enzimi senza una particolare specificità di substrato, sono distinte e non intercambiabili.

I principali PUFA n-3 sono rappresentati dall'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) e docosaesaenoico (DHA, C22:6 n-3), contenuti pressoché esclusivamente nel pesce. I principali PUFA n-6 sono rappresentati dall'acido  $\gamma$ -linolenico (GLA, C18:3 n-6) e dall'acido arachidonico (AA, C20:4 n-6).

Entrambe le serie di PUFA n-6 e n-3 vengono incorporate nelle membrane biologiche, sotto forma di componenti di fosfolipidi e glicolipidi. A tale livello competono per lo stesso sistema enzimatico, in quanto il loro metabolismo è completamente separato e non è possibile una loro interconversione. Le vie metaboliche della serie linoleica e  $\alpha$ -linolenica utilizzano, infatti, gli stessi enzimi per le reazioni di allungamento e desaturazione che dall'acido linoleico e  $\alpha$ -linolenico conducono, rispettivamente, alla formazione di acido arachidonico (PU-

**Fig. 1.** Classificazione degli acidi grassi (Dei Cas, Nodari. *Excerpta Medica 2003, mod.*).



FA n-6) e di acido eicosapentaenoico (PUFA n-3). L'EPA può ulteriormente essere allungato e desaturato ad acido docosaesaenoico (DHA), che nel corpo umano è il PUFA n-3 più rappresentato; quest'ultimo costituisce una riserva di EPA e può quindi esercitare i suoi effetti cellulari sia direttamente sia indirettamente tramite riconversione in EPA (Fig. 1).

## Effetti biologici

Negli ultimi anni sono stati condotti vari studi sia sperimentali su modelli animali sia clinici, che hanno dimostrato i numerosi effetti favorevoli dei PUFA n-3. Il primo effetto biologico individuato è stato quello ipotrigliceridemizzante, per cui tali farmaci sono stati inizialmente utilizzati per il trattamento delle dislipidemie. Successivamente sono stati evidenziati gli effetti antiaggregante, antiaterotrombotico e, di recente, quello antiaritmogeno.

### EFFETTO ANTITROMBOTICO ED EMOREOLOGICO

Dopo appropriata stimolazione, i PUFA vengono liberati dalle membrane cellulari e, ad opera degli enzimi cicloossigenasi e lipoossigenasi, danno origine a metaboliti attivi, detti eicosanoidi (prostaglandine, trombossani, leucotrieni e altri composti biologicamente attivi). Dall'acido arachidonico derivano il trombossano della serie A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), i leucotrieni della serie 4 (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, ecc.) e le prostaglandine della serie 2 (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, ecc.) formati rispettivamente nelle piastrine, leucociti e cellule endoteliali, mentre l'EPA viene metabolizzato, nelle stesse sedi, a trombossano A<sub>3</sub> (TXA<sub>3</sub>), leucotrieni della serie 5 (LTB<sub>5</sub>, LTC<sub>5</sub>, ecc.) e prostaglandine della serie 3 (PGI<sub>3</sub>, PGD<sub>3</sub>, ecc.). Mentre gli effetti

vasodilatanti e antiaggreganti delle prostaglandine della serie 2 e 3 sono considerati equivalenti, il TXA<sub>2</sub> e i leucotrieni della serie 4, derivati dall'acido arachidonico, hanno rispettivamente un effetto proaggregante/vasocostrittore e proinfiammatorio complessivamente superiori agli analoghi eicosanoidi derivati dall'EPA<sup>3</sup>.

La maggiore assunzione con la dieta di PUFA n-3 determina uno *shift* nella sintesi di eicosanoidi per sostituzione a livello delle membrane cellulari dell'acido arachidonico con EPA, come substrato dello stesso sistema enzimatico. Questo potrebbe in parte spiegare gli effetti biologici favorevoli dei PUFA n-3 rispetto ai PUFA n-6, anche se probabilmente altri meccanismi sono operanti nel determinare un benefico effetto antitrombotico dei PUFA n-3, quali<sup>4</sup>:

1. potenziamento della fibrinolisi e riduzione del fibrinogeno;
2. riduzione dell'attività della lipoproteina (a), potente fattore protrombotico oltre che proaterogeno.

I meccanismi appena elencati (Tab. I) rendono ragione dei positivi effetti svolti dagli acidi grassi poliinsaturi n-3 sull'aggregazione piastrinica, con relativo allungamento del tempo di sanguinamento. È stato inoltre dimostrato che una maggiore incorporazione dei PUFA n-3 nella membrana cellulare dei globuli rossi è in grado di incrementarne la fluidità e quindi la deformabilità meccanica ed osmotica, favorendone la circolazione a livello del microcircolo.

#### EFFETTI SULL'ASSETTO LIPIDICO

Gli effetti degli acidi grassi PUFA n-3 a carico dei trigliceridi sono stati quelli maggiormente studiati: si attesta una riduzione media della trigliceridemia attorno al 30% e l'effetto ipotrigliceridemizzante sembra essere dose-dipendente<sup>5,6</sup>. Il meccanismo alla base sembra essere una diminuita sintesi epati-

ca di acidi grassi, trigliceridi, VLDL, oltre che un aumentato catabolismo delle VLDL in LDL, dal momento che le VLDL ricche in omega-3 sarebbero più suscettibili all'azione delle lipoproteinlipasi. Di recente è stata anche ipotizzata un'azione su recettori nucleari PPARs (*Perioxosome Proliferator Activated Receptors*)<sup>7</sup>.

Molto discussi sono invece gli effetti dei PUFA n-3 sugli altri lipidi. Essi incrementano modestamente i livelli di HDL, grazie alla riduzione degli acidi grassi liberi nel plasma, che causerebbe un ridotto trasferimento, mediato dalla *Cholesterol Ester Transfer Protein*, degli esteri di colesterolo dalle HDL alle LDL e VLDL<sup>8</sup>.

Molto meno certo è l'effetto degli acidi grassi omega-3 sulle concentrazioni plasmatiche delle LDL: è stato descritto un modesto aumento di tale frazione lipoproteica da ascrivere ad una maggiore dimensione delle singole particelle, piuttosto che ad un loro incremento numerico<sup>9</sup>. Questo è pertanto un effetto antiaterogeno dei PUFA n-3 tenendo conto che solo le LDL piccole e dense sono associate a un maggior rischio aterogeno.

In ultimo, alcuni recenti studi hanno evidenziato che i PUFA n-3 riducono la lipemia post-prandiale, fattore che sembra avere un ruolo indipendente nello sviluppo dell'aterosclerosi: tale effetto sembra essere correlato a una maggiore attività della lipoproteinlipasi sulle lipoproteine, sui chilomicroni e forse anche sulle VLDL<sup>10,11</sup>.

#### EFFETTI SUL METABOLISMO GLUCIDICO

Tenendo conto del ruolo centrale dell'insulinoreistenza nello sviluppo del diabete, alcuni studi hanno voluto verificare se i PUFA n-3 potessero influenzare l'azione dell'insulina a livello dei corrispondenti recettori. Nel ratto è stato evidenziato che un'aumentata concentrazione di omega-3 migliora la fluidità di membrana e quindi l'interazione tra l'insulina e il suo recettore<sup>12</sup>.

**Tab. I.** Effetti anti-trombotici dei PUFA n-3.

Riduzione di fattori protrombotici	Aumento dei fattori antitrombotici
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trombossano A<sub>2</sub></li> <li>• Numero di piastrine</li> <li>• Adesione piastrinica</li> <li>• Aggregazione piastrinica</li> <li>• Fibrinogeno</li> <li>• Fattore di adesione piastrinica</li> <li>• Fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF)</li> <li>• Lipoproteina (a)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostaciline I<sub>3</sub></li> <li>• Fattore di rilasciamento endotelio-derivato (EDRF o NO)</li> <li>• Fibrinolisi</li> <li>• Tempo di emorragia</li> </ul>

Tutto questo non è stato dimostrato ancora nell'uomo, in cui invece in letteratura sono riportati dati discordanti, anche se dalle ultime metanalisi sembrerebbe che la somministrazione di PUFA n-3 fino a 3 g/die è sicura ed ha effetto neutro sia sull'emoglobina glicata sia sulla glicemia a digiuno.

#### EFFETTI SULLA PRESSIONE ARTERIOSA E SUL TONO VASCOLARE

Gli acidi grassi omega-3 riducono la pressione arteriosa sia in soggetti sani, sia in pazienti affetti da ipertensione arteriosa <sup>13</sup> attraverso diversi meccanismi:

- soppressione di prostanoidi ad azione vasocostrittrice;
- incrementata produzione e rilascio di nitrossido;
- riduzione della concentrazione plasmatica di noradrenalina;
- regolazione dell'accumulo di calcio nella cellula;
- aumentata fluidità delle membrane plasmatiche.

#### EFFETTI ANTIINFIAMMATORI

Come già detto in precedenza, dagli acidi grassi omega-3 derivano i leucotrieni della serie 5, che rispetto a quelli della serie 4 (derivati dall'acido arachidonico), sono dotati di un'azione vasocostrittrice e pro-infiammatoria molto più modesta, circa dieci volte inferiore. Ciò può comportare importanti ricadute sia sull'aterosclerosi sia su altre patologie infiammatorie (artrite reumatoide, morbo di Crohn, psoriasi, dermatite atopica) <sup>14-17</sup>.

Il ruolo svolto dall'infiammazione nella genesi della placca aterosclerotica e nelle condizioni di instabilità e rottura della stessa è ormai universalmente accettato <sup>18</sup>. È quindi verosimile che gli acidi grassi omega-3, mediante l'attenuazione dei processi infiammatori, possano svolgere un ruolo centrale nella prevenzione sia del processo aterosclerotico, sia degli eventi acuti connessi alla rottura della placca.

#### EFFETTI ANTIATEROTROMBOTICI

Diversi studi hanno ampiamente dimostrato come la disfunzione endoteliale <sup>19</sup>, indotta da diversi fattori quali tossine, *shear stress*, fumo di sigaretta, dislipidemia, sia l'evento iniziale nello sviluppo dell'aterosclerosi: l'endotelio diventa "pro-adesivo", inducendo un'aumentata adesività dei monociti circolanti, che successivamente infiltrano l'intima della parete arteriosa. A questo livello formano la stria lipidica, primo evento morfologicamente rilevabile nell'aterosclerosi, richiamando LDL

ossidate dai radicali liberi rilasciati dall'endotelio stesso o dai macrofagi <sup>18</sup>.

Diversi sono i fattori che mediano l'interazione endotelio-leucociti, quali le chemochine (N-formil peptidi, componenti del complemento, leucotrieni B<sub>4</sub>, PAF), le selectine, proteine di adesione (ICAM1, ICAM2, ICAM3, VCAM-1) che riconoscono come ligandi, alcune integrine espresse sulla membrana leucocitaria. Nell'evoluzione da stria lipidica a placca aterosclerotica sono a loro volta implicate numerose citochine, che causano l'infiltrazione di leucociti, cellule muscolari lisce e fibroblasti e promuovono l'adesione piastrinica.

Le placche instabili sono quelle particolarmente ricche in lipidi e rivestite da un sottile cappuccio fibroso, che sono a rischio di fissurazione. Esse rappresentano l'ultimo stadio evolutivo dell'ateroma che porta all'angina instabile, all'infarto e a tutte le complicanze correlate ad esso, prima fra tutte l'insorgenza di aritmie fatali <sup>20</sup> (Fig. 2).

I PUFA n-3 si inseriscono positivamente all'interno dei meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi grazie ai loro effetti ipolipemizzanti, antitrombotici, emoreologici e sull'attivazione endoteliale

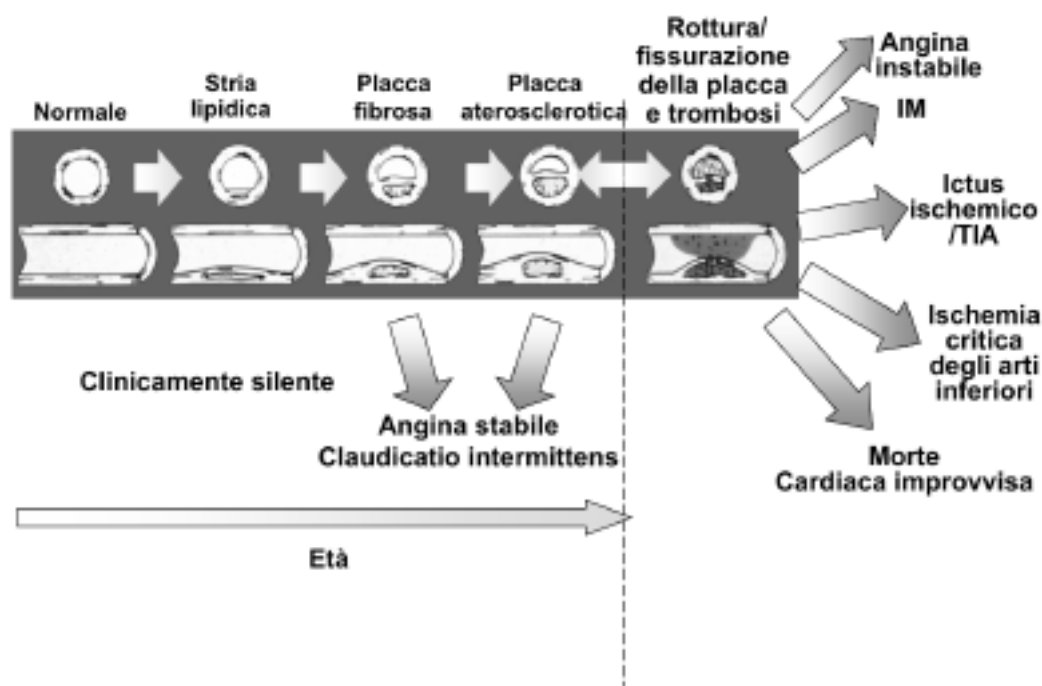
Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti dei PUFA n-3 sull'attivazione endoteliale come ad esempio una ridotta produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL6, TNF  $\alpha$ ) <sup>21</sup>, di proteina ed mRNA del PDGF- $\alpha$  e - $\beta$  <sup>22-23</sup> (potente piogeno e chemochina per le cellule muscolari lisce), nonché una ridotta espressione di fattore tissutale dei monociti <sup>24</sup> e di molecole endoteliali di adesione <sup>25</sup>, ed un aumentato rilascio di nitrossido da parte dell'endotelio.

Esperimenti in vitro condotti su colture di cellule endoteliali, hanno dimostrato che l'aggiunta di DHA alcune ore o giorni prima della stimolazione con citochine (IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-4 ed LPS), inibisce significativamente l'attivazione endoteliale nelle sue diverse fasi, tra cui l'espressione di molecole di adesione, quali VCAM-1, E-selectina e, in misura minore, ICAM-1 <sup>26</sup>.

Questo effetto è correlato all'incorporazione dei PUFA n-3 nelle membrane cellulari, mentre è inversamente proporzionale al contenuto di PUFA n-6. Il DHA si concentra maggiormente nel *pool* di fosfatidil-etanolamina, che è notoriamente più rappresentato nella parte interna della membrana plasmatica e pertanto in una posizione strategica per alterare vie di trasduzione intracellulare.

Infine i PUFA n-3 inibiscono il fattore di trascrizione nucleare NF-kB che controlla l'espressione coordinata di diverse molecole di adesione e chemotattiche, specifiche per i leucociti <sup>27</sup>.

**Fig. 2.** Progressione dell'aterosclerosi ed eventi ischemici (Libby, *Circulation* 2001;104:365-72, mod.).



Un recente trial randomizzato<sup>28</sup> ha dimostrato il ruolo degli acidi grassi poliinsaturati n-3 sulla stabilità della placca. In questo studio sono stati arruolati 188 pazienti con aterosclerosi carotidea condizionante una stenosi critica, in attesa di intervento di tromboendarteriectomia; tali pazienti sono stati randomizzati ad assumere placebo, olio di pesce (PUFA n-3) e olio di semi (PUFA n-6). I pazienti che avevano ricevuto PUFA n-3 presentavano a livello della placca aterosclerotica un'elevata concentrazione di EPA e DHA, una riduzione dell'infiltrazione di monociti e macrofagi, un cappuccio fibroso più spesso sia rispetto ai controlli, sia rispetto ai pazienti trattati con PUFA n-6 (Tab. II). Tutti questi fattori contribuiscono sicuramente alla stabilità della placca e potrebbero giustificare quindi la riduzione di eventi cardiovascolari fatali e non fatali osservata negli studi clinici di prevenzione primaria e secondaria con PUFA n-3.

#### EFFETTI ANTIARITMOGENI

Gli acidi grassi poliinsaturati n-3, nati come farmaci da utilizzare nel controllo delle dislipidemie, hanno imprevedibilmente dimostrato un'efficacia antiaritmica, rappresentando una nuova opzione farmacologica nel trattamento delle aritmie ventricolari, e quindi della Morte Cardiaca Improvvisa

(MCI), nei pazienti affetti da cardiopatia post-infartuale. È noto come la MCI rappresenti un'evenienza frequente, potendo esordire come prima manifestazione dell'ischemia acuta nel 25% dei casi o come complicanza tardiva dell'infarto o della cardiopatia ischemica nel 75% dei casi.

I meccanismi ipotizzati nell'indurre una maggiore stabilità elettrica di membrana da parte dei PUFA n-3 sarebbero molteplici. La produzione di eicosanoidi meno dannosi (TXA<sub>3</sub> e LTB<sub>3</sub>) determina una minore risposta vasocostrittrice e infiammatoria tessutale e quindi, una riduzione dell'*infarct size* e una minore produzione di radicali superossido, favorendo l'instabilità elettrica delle aree perinfartuali. I PUFA n-3 sono in grado di modulare la bilancia simpatico-vagale a favore di quest'ultimo, quando vi sia un'iperattività simpatica<sup>29</sup>. Infatti, studi condotti mediante l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV), utilizzata come *end-point* surrogato di eventi aritmici e di MCI, hanno documentato come la somministrazione di PUFA n-3 determini un aumento della variabilità R-R sia in pazienti ad elevato rischio aritmico (pazienti infartuati con disfunzione ventricolare sinistra, pazienti con insufficienza renale cronica in dialisi, pazienti diabetici)<sup>30 31</sup>, sia in soggetti sani, e come questo sia correlato con le concentrazioni di EPA e DHA

**Tab. II.** Risultati del trattamento PUFA n-6 e PUFA n-3 verso controllo sulla placca aterosclerotica a livello carotideo (Thies et al., *Lancet* 2003:361-477, mod.).

	Sunflower Oil vs. Control oil (95% CI)		Difference between fish oil and control oil (95% CI)		Differente between fish oil and sunflower oil (95% CI)	
AHA Classification						
Type III (%)	0		0		0	
Type III (%)	1,02	ns	1,19	p = 0,0408	1,16	p = 0,0472
Type III (%)	1,06	ns	0,52	p = 0,0273	0,49	p = 0,0251
Type III (%)	0,84	ns	1,54	ns	1,82	ns
Modified AHA Classification						
Pathological intimal thickening (%)	1,06	ns	1,09	ns	1,04	ns
Fibrous cap atheroma (%)	0,96	ns	1,17	ns	1,22	ns
Thin fibrous cap atheroma (%)	1,3	ns	0,68	p = 0,0437	0,52	p = 0,0298
Erosion (%)	...	...	...	...	1,04	ns
Plaque ropture (%)	1,58	ns	1,09	ns	0,68	ns
Calcified nodule and fibrocalcific plaque (%)	0,18	ns	0,55	ns	3,12	ns

nelle membrane cellulari. L'aumento del contenuto di PUFA n-3 nelle membrane piastriniche è correlato ad un aumento della variabilità della frequenza cardiaca, espressa come SDNN (*Standard Deviation of Normal to Normal intervals*)<sup>32-34</sup>. Infine, i PUFA n-3 modulano la conduttanza dei canali ionici di membrana, attraverso la modificazione dello stato fisico e, quindi, delle caratteristiche di fluidità del doppio strato lipidico. I PUFA n-3 agiscono a livello dei canali del Na<sup>++</sup><sup>35</sup> determinando uno spostamento della soglia per l'apertura dei canali verso un valore di potenziale più positivo, in modo tale che solo una stimolazione maggiore del 40-50% possa indurre il potenziale d'azione. A livello dei canali del Ca<sup>++</sup><sup>36</sup>, i PUFA n-3 determinerebbero un'inibizione delle correnti voltaggio-dipendenti di tipo L, riducendo la concentrazione citosolica di tale ione, che è aritmogena quando eccessiva (ischemia, scompenso, intossicazione digitale)<sup>37</sup> e, soprattutto, diminuendo le fluttuazioni della concentrazione di Ca<sup>++</sup> citosolico prima della contrazione, responsabili della comparsa di post-potenziali. Un meccanismo più recentemente ipotizzato circa l'effetto modulante esercitato dai PUFA n-3 a livello dei canali ionici, sarebbe rappresentato da un'alterazione della tensione che i fo-

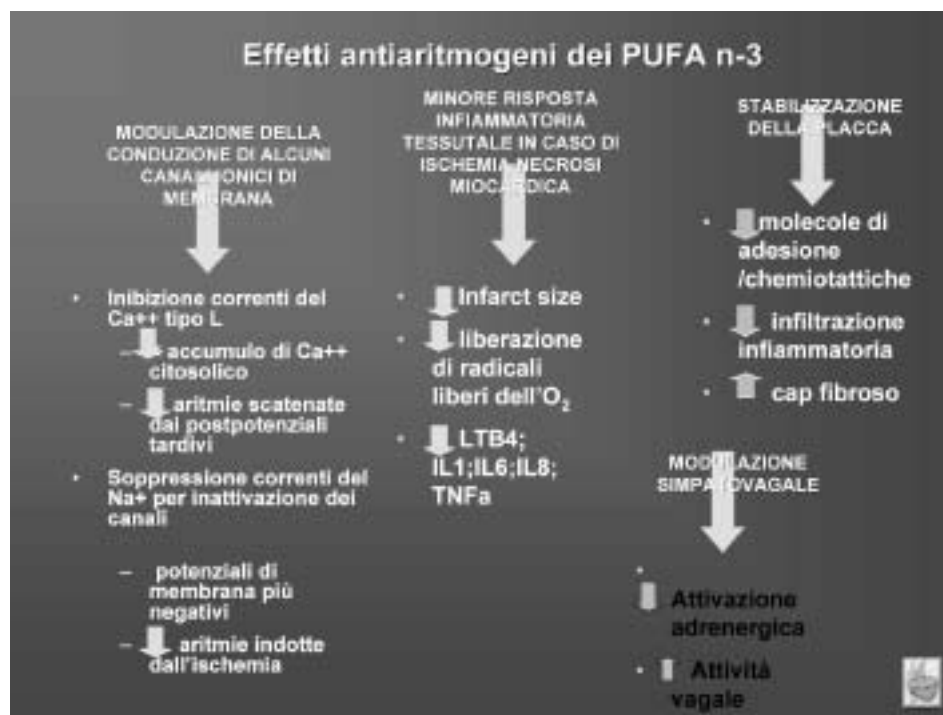
sfolipidi di membrana esercitano sul canale stesso, con conseguente cambiamento conformazionale e alterazione della conduttanza ionica<sup>38</sup>.

Questi effetti sui canali ionici di membrana sono stati testati in una serie di lavori sperimentali condotti prevalentemente su miociti isolati trattati con sostanze aritmogene (ad esempio livelli tossici di calcio o ouabaina)<sup>39</sup>. Analogamente, studi condotti in vivo su animali da esperimento (cani con pregresso infarto esteso anteriore, indotto dalla legatura dell'interventricolare anteriore) hanno evidenziato un effetto protettivo dei PUFA n-3 verso le aritmie ventricolari fatali indotte dall'ischemia<sup>40-41</sup>. Nella Figura 3 sono schematizzati gli effetti antiaritmogeni dei PUFA n-3.

## I PUFA n-3 e le Dislipidemie

Sono ormai numerosi i trial basati sulla dieta mediterranea che hanno dimostrato gli effetti benefici dell'assunzione di pesce sull'assetto lipidico e sul rischio cardiovascolare. In particolare, è stato dimostrato che per ottenere una riduzione della trigliceridemia di almeno il 30% è necessario assumere dai 120 ai 320 grammi al giorno di pe-

**Fig. 3.** Schema riassuntivo degli effetti antiaritmogeni dei PUFA n-3 (Dei Cas, Nodari. *Excerpta Medica* 2003, mod.).



sce. Per questo motivo le preparazioni presenti in commercio, che contengono una quantità titolata di PUFA n-3, consentono l'assunzione terapeutica di 3 ai 4 grammi/die, dose ritenuta efficace per una riduzione adeguata della trigliceridemia.

Studi condotti in pazienti portatori di differenti fenotipi di ipertrigliceridemia mostrano come i PUFA n-3 abbiano un effetto ipolipemizzante, riducendo i livelli plasmatici di trigliceridi, VLDL, chilomicroni, *remnants*.

In una review degli studi condotti sull'uomo<sup>42</sup> è stato osservato che una dose media di circa 4 g/die riduce di circa il 20-25% i livelli di trigliceridi e che esiste una stretta relazione dose-risposta.

Attualmente, l'uso dei PUFA n-3 è indicato nel trattamento delle forme severe di ipertrigliceridemia<sup>43</sup> e nelle forme di dislipidemia mista in associazione alle statine<sup>44</sup>. Un'altra indicazione al loro impiego è la dislipidemia secondaria ad insufficienza renale cronica sia in trattamento conservativo sia dialitico: infatti, in questi pazienti, l'impiego di altri ipolipemizzanti è limitato dalla presenza di un'alterata funzione renale, mentre i PUFA n-3, efficaci sull'assetto lipidico, non presentano effetti collaterali<sup>45</sup>.

## I PUFA n-3 e la Morte Improvvisa

### STUDI EPIDEMIOLOGICI E DI PREVENZIONE PRIMARIA

I dati degli studi osservazionali condotti su popolazioni con elevato consumo di pesce grasso (come gli esquimesi, i pescatori delle coste giapponesi, ecc.) hanno messo in evidenza una riduzione della mortalità cardiovascolare e degli eventi ischemici non fatali legati all'elevata introduzione dietetica di PUFA n-3<sup>46-48</sup>.

I risultati dell'*US Physicians' Health Study*<sup>49</sup> hanno dimostrato come, in soggetti liberi da patologia cardiovascolare, l'assunzione di pesce almeno una volta alla settimana era associata ad una riduzione del 52% del rischio di morte improvvisa e del 30% di mortalità totale, mentre nessuna variazione significativa era stata osservata per l'IMA non fatale o per la morte non improvvisa. Una recentissima analisi nell'ambito dello stesso studio ha confermato il ruolo fondamentale che i PUFA n-3 rivestono nella prevenzione anche primaria della MCI<sup>50</sup>: medici americani, apparentemente sani al momento dell'arruolamento, sono stati sottoposti a prelievo ematico per un'eventuale determinazione delle concentrazioni degli acidi grassi e seguiti con un follow-up di 17 anni. In questo lasso di

tempo 94 soggetti sono deceduti per morte improvvisa e l'analisi del contenuto lipidico delle membrane cellulari in questi soggetti, confrontata con quella di un gruppo di controllo con caratteristiche basali sovrapponibili, ha dimostrato come solo le concentrazioni plasmatiche di PUFA n-3 a lunga catena erano significativamente inferiori nel gruppo deceduto per MCI. Nessuna differenza, statisticamente significativa, è stata infatti osservata fra i due gruppi per quanto riguarda le concentrazioni di acidi grassi saturi, monoinsaturi, poliinsaturi n-6 e n-3 a corta catena (acido  $\alpha$  linolenico). Sempre nello stesso studio, l'analisi multivariata ha confermato l'importanza prognostica della carenza di acidi grassi poliinsaturi n-3 nello sviluppo di MCI: gli Autori, avendo suddiviso in quartili di rischio i soggetti in studio in base alle concentrazioni plasmatiche di acidi grassi PUFA n-3 a lunga catena, hanno evidenziato come i soggetti con livelli più elevati di PUFA n-3 appartenenti all'ultimo quartile, presentassero un rischio inferiore dell'81% rispetto ai soggetti collocati nel quartile a concentrazione minore.

Il *Nurses health study* <sup>51</sup> ha confermato gli effetti positivi del consumo elevato di pesce e PUFA n-3 nelle donne. In questo studio sono state arruolate 84.688 donne, di età compresa tra i 34 e 59 anni, con anamnesi negativa per eventi cardiovascolari o tumori. Dopo un follow-up di 16 anni si è osservato come il consumo di pesce e acidi grassi poliinsaturi n-3 sia inversamente correlato con l'incidenza di eventi coronarici acuti.

#### STUDI DI PREVENZIONE SECONDARIA

Lo studio DART (*The Diet And Reinfarction Trial*) <sup>52</sup> è stato il primo trial clinico randomizzato che ha evidenziato, su oltre 2.000 pazienti colpiti da IMA, un effetto favorevole dei PUFA n-3 sulla sopravvivenza, con una riduzione significativa a 2

anni della mortalità totale e degli eventi ischemici fatali. Pur non essendo stata valutata la morte improvvisa, la precocità della riduzione della morte coronarica, già significativa dopo circa 3 mesi di trattamento, considerando che il numero di eventi ischemici non fatali non veniva modificato significativamente, confermerebbe l'ipotesi di un effetto protettivo dei PUFA n-3 sulle morti aritmiche (Fig. 4).

Il *Lyon Diet Heart* <sup>53</sup> è uno studio di prevenzione secondaria, precocemente interrotto, dopo un follow-up di 27 mesi, che ha evidenziato l'effetto benefico della dieta di tipo mediterraneo rispetto a quella di tipo "americano", con una significativa riduzione di tutti gli *endpoint* considerati (morte cardiaca e infarto miocardico non fatale, morte cardiaca e infarto miocardico fatale più angina instabile, ictus, scompenso cardiaco, embolia polmonare e periferica, tutti gli eventi precedenti più un ricovero ospedaliero).

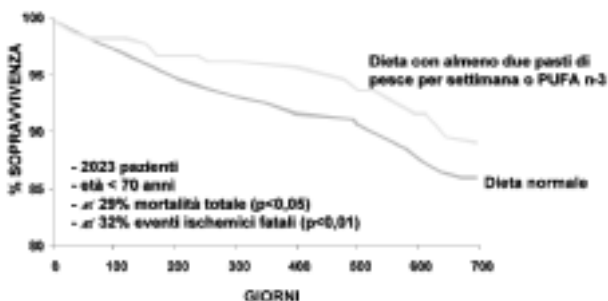
Lo studio *Indian* <sup>54</sup> è un trial clinico randomizzato, controllato con placebo, nel quale sono stati confrontati gli effetti sulla mortalità per cause cardiache e sull'incidenza degli eventi cardiaci dell'olio di pesce (EPA 1,08 g/die) e dell'olio di mostarda (acido alfa-linolenico 2,9 g/die) in pazienti ricoverati per infarto miocardico acuto. Dopo 1 anno di follow-up, nei due gruppi in trattamento con PUFA n-3 rispetto ai controlli, si è avuta una riduzione significativa degli eventi cardiaci (24,5% e 28,0% vs. 34,7%;  $p < 0,01$ ) e degli infarti miocardici non fatali (13,0% e 15,0% vs. 24,5%;  $p < 0,05$ ). Fra gli eventi cardiaci considerati nello studio erano compresi le aritmie, gli episodi di angina e lo sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra. Infine, si è osservata una riduzione significativa nel numero di morti cardiache improvvise nel gruppo trattato con olio di pesce rispetto al gruppo placebo (11,4% vs. 22,0%;  $p < 0,05$ ).

Questo studio ha quindi dimostrato che la somministrazione precoce di PUFA n-3 (entro 18 ore dal ricovero), attraverso olio di pesce o di mostarda, ha un effetto protettivo nei pazienti con infarto miocardico acuto.

La riprova dell'azione antiaritmogena di tali sostanze ci è stata fornita dallo studio GISSI-Prevenzione <sup>55 56</sup> dove sono stati arruolati 11.324 pazienti reduci da un recente IMA, randomizzati in 4 gruppi a ricevere in aggiunta alla terapia tradizionale: 1 g/die di PUFA n-3 (EPA + DHA 850 mg); 300 mg/die di vitamina E; entrambi i trattamenti; nessun trattamento in esame.

L'analisi fattoriale a quattro vie ha evidenziato una riduzione significativa degli *endpoint* primari

**Fig. 4.** Studio DART (*Burt et al., Lancet 1998;2:757-61, mod.*).



(mortalità totale + IMA non fatale + ictus non fatale; mortalità cardiovascolare + IMA non fatale + ictus non fatale) solo nel gruppo trattato con PUFA n-3 e, seppure in minore misura, nel gruppo sottoposto a trattamento combinato. Nessuna variazione significativa è stata osservata nel gruppo trattato con vitamina E. In particolare, è stata rilevata nel gruppo PUFA n-3, trattato con bassi dosaggi di farmaco, una riduzione significativa della mortalità totale (20%), della mortalità cardiovascolare (30%) e della morte improvvisa (45%) (Fig. 5), sottolineando in accordo con i precedenti studi, un effetto protettivo diretto dei PUFA n-3 sul miocardio, anche indipendentemente dagli effetti antiaterogeno e antitrombotico. La precocità della comparsa di tali risultati, espressa dalla divergenza delle curve di sopravvivenza a soli 4 mesi di trattamento, conferma, infatti, che i risultati osservati sulla riduzione della mortalità, ed in particolare della MCI, non siano imputabili agli effetti antiaterogeno ed antitrombotico dei PUFA n-3, ma soprattutto a un effetto antiaritmogeno.

Una metanalisi dei trial di prevenzione secondaria condotti con PUFA n-3 <sup>57</sup>, per un totale di circa 15.700 pazienti, evidenzia come i risultati siano concordi nel confermare gli effetti favorevoli del trattamento con PUFA n-3 sugli eventi ischemici,

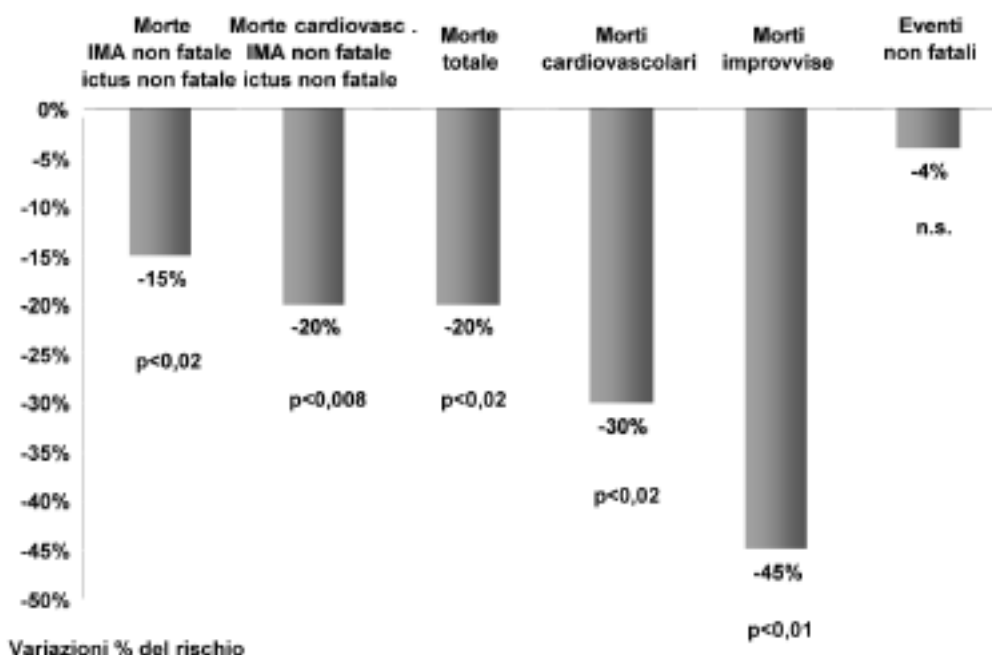
fatali e non, sulla mortalità totale e sulla morte improvvisa. Analizzando il beneficio ottenuto in termini di vite salvate, su 1.000 pazienti trattati all'anno, in confronto con altri trattamenti raccomandati, come le statine, appare evidente l'efficacia del trattamento con PUFA n-3 nella prevenzione secondaria della cardiopatia ischemica: 5,7 su 1.000 pazienti all'anno con PUFA n-3 vs. 5,2 su 1.000 pazienti all'anno con le statine; in tal senso, fra i farmaci cardiovascolari è da sottolineare come solo i  $\beta$ -bloccanti nello scompenso cardiaco si siano dimostrati superiori ai PUFA n-3 ed alle statine, relativamente al numero di soggetti da trattare all'anno per salvare una vita.

#### INDICAZIONI CLINICHE ALL'IMPIEGO DEI PUFA N-3

A conferma del crescente interesse scientifico e terapeutico attorno ai PUFA n-3, le Linee Guida Dietetiche dell'AHA <sup>58</sup> includono fra le raccomandazioni per la prevenzione secondaria del post-IMA, l'assunzione di 1 grammo/die di PUFA n-3, estendendo l'indicazione all'assunzione di PUFA n-3, in forma alimentare o di estratto purificato farmacologico, anche a soggetti senza documentata coronaropatia (Tab. III).

Ed ancora, il trattamento con PUFA n-3 è incluso tra le raccomandazioni per la prevenzione prima-

**Fig. 5.** Effetti sulla sopravvivenza indotti dal trattamento con PUFA n-3 in pazienti infartuati. GISSI-Prevenzione (Marchioli et al., *Circulation* 2002;105:1897-903, mod.).



ria della Morte Cardiaca Improvvisa nel post-IMA nel report della Task force della Società Europea di Cardiologia sulla Morte Cardiaca Improvvisa <sup>59</sup>, e le attuali Linee Guida della Società Cardiologica Europea raccomandano l'assunzione di PUFA n-3 nella prevenzione secondaria del post-infarto (Tab. IV) <sup>60</sup>.

Se per aumentare l'assunzione di PUFA n-3 è, in generale, preferibile un approccio dietetico, tuttavia, specie per i pazienti con malattia coronarica, è praticamente impossibile raggiungere con la sola dieta la dose raccomandata di 1 grammo al giorno; lo stesso dicasi per i pazienti con ipertrigliceridemia in cui sono consigliate dosi ancora più elevate (da 2 a 4 grammi). In tal caso è consigliata l'assunzione di PUFA n-3 in forma di supplemento farmacologico ad alta concentrazione di EPA e DHA.

L'impiego di questi preparati presenta alcuni vantaggi, tra cui la certezza del dosaggio somministrato e la maggiore comodità posologica della cura, che riducono la variabilità dell'apporto alimentare di PUFA n-3 e favoriscono la compliance dei pazienti. Infatti il contenuto di PUFA n-3 nel pesce varia in rapporto al tipo di pesce (grasso *vs.* magro), ma anche a variabili ambientali (pesce di allevamento o di mare, tipo di cottura ...).

## I PUFA n-3 e il Sistema Nervoso

Il cervello umano ha un elevato contenuto in acidi grassi, di cui circa il 35% è costituito da acidi grassi poliinsaturi, fondamentali per il suo normale sviluppo e il mantenimento delle sue funzioni.

**Tab. III.** Raccomandazioni dell'AHA per l'assunzione di PUFA n-3 in termini di prevenzione primaria e secondaria (*Kris-Etherton et al., Circulation 2002;106:2747-57, mod.*).

Popolazione	Raccomandazioni
Pazienti senza documentata CHD	Assumere pesce grasso almeno due volte alla settimana. Includere olii e cibi ricchi di acido $\alpha$ -linolenico (olio di lino e soia, semi di lino e noci)
Pazienti con documentata CHD	Consumare ~ 1 g di EPA + DHA al giorno, preferibilmente proveniente da pesce grasso. Eventuale assunzione di supplementi di EPA + DHA in base a consiglio medico
Pazienti che necessitano di ridurre i livelli di trigliceridemia	Due a quattro grammi di EPA + DHA al giorno, assunti in capsule, sotto controllo medico

**Tab. IV.** Linee Guida della Società Europea di Cardiologia nella Prevenzione Secondaria del post infarto (*Van de Werf. Eur Heart J 2003;24:28-66, mod.*).

Raccomandazioni	Classe I	Ila	Ilb	III	Livelli di evidenza
Smettere di fumare	X				C
Ottimale controllo glicemico nei diabetici	X				B
Controllo dei valori pressori negli ipertesi	X				C
Dieta mediterranea	X				B
Supplemento con 1 g PUFA n-3	X				B
Beta bloccanti in tutti i pz. senza controindicazioni	X				A
Aspirina 75-10 mg/day, se non tollerata					A
clopidogrel anticoagulanti			X		C
ACE-inibitori	X				B
Statine se colesterolo totale > 190 mg/dL o colesterolo LDL > 115 mg/dL	X				A
Fibrati se colesterolo HDL < 45 mg/dL e trigliceridi > 200 mg/dL		X			A
Calcio-antagonisti se esistono controindicazioni all'uso di Beta-bloccanti e non c'è insufficienza cardiaca			X		B
Nitarti in assenza di angina				X	A

Insieme all'acido arachidonico, l'acido docosaesae-noico è uno dei principali costituenti delle membrane cellulari dei neuroni: in particolare la loro concentrazione risulta essere elevata a livello sinaptico, dove intervengono nella trasduzione del segnale, attraverso l'attivazione della fosfolipasi A2 e di diversi neurotrasmettitori<sup>61-65</sup>.

È stato inoltre dimostrato che l'acido docosaesae-noico è fondamentale per lo sviluppo delle funzioni cognitive: studi condotti su animali hanno dimostrato che la maggiore assunzione di PUFA n-3 è associata a una maggiore capacità di apprendimento e di memoria rispetto al gruppo di controllo. In modelli transgenici di ratto, che assumevano con la dieta PUFA n-3, è stata dimostrata una maggiore densità sinaptica e una riduzione della concentrazione di beta-amiloide, suggerendo un possibile ruolo di

queste sostanze nella prevenzione della malattia di Alzheimer e di altri disturbi cognitivi<sup>66,67</sup>.

Infine, bisogna ricordare come le attività benefiche degli omega 3 sul sistema vascolare si debbano estendere anche a livello cerebrale, dove i disturbi del microcircolo si associano a ridotte capacità cognitive ed al progredire della demenza<sup>68</sup>.

A conferma dell'importante ruolo svolto dai PUFA n-3 nelle normali funzioni cerebrali vi è inoltre l'evidenza che soggetti affetti da depressione hanno un minor contenuto di PUFA n-3 nelle membrane plasmatiche degli eritrociti<sup>69,70</sup> e vi è una correlazione diretta con la severità della malattia. Quindi un aumentato apporto dietetico di PUFA n-3 potrebbe essere benefico non solo per le malattie cardiovascolari ma anche per le malattie neurologiche e mentali.

Sono ormai numerosi gli studi osservazionali e sperimentali, ma soprattutto i trial clinici, che hanno evidenziato gli effetti benefici degli acidi grassi poliinsaturi  $\Omega$  3 (PUFA n-3). Il primo effetto biologico individuato è stato quello ipotrigliceridemizzante, per cui tali farmaci sono stati indicati dapprima nel trattamento delle dislipidemie mentre successivamente sono stati evidenziati gli effetti antinfiammatorio, antiaggregante, antiaterotrombotico ed antiaritmogenico. Lo studio GISSI-Prevenzione è stato il primo studio che ha dimostrato l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità dei PUFA n-3 nel post-infarto. Sulla base delle evidenze attualmente disponibili, i PUFA n-3, trovano indicazione nella prevenzione non solo secondaria, ma anche primaria della cardiopatia ischemica e della morte cardiaca improvvisa. Altri dati recentemente pubblicati circa la prevenzione dell'insorgenza della fibrillazione atriale dopo intervento cardiocirurgico o dopo CVE, nonché la riduzione di eventi aritmici ventricolari minacciosi in pazienti ad elevato rischio di MCI, come i pazienti affetti da insufficienza cardiaca o portatori di ICD, fanno presupporre un ampliamento delle indicazioni all'uso di PUFA n-3 in tali patologie.

Più recenti sono le acquisizioni circa il ruolo fon-

damentale svolto dai PUFA n-3 per il normale sviluppo delle funzioni cerebrali. Per tale motivo si è ipotizzato un loro possibile impiego nella prevenzione e nel trattamento dei disturbi cognitivi e mentali. Infatti, le azioni benefiche degli omega 3 sul sistema vascolare si debbono estendere anche a livello cerebrale, dove i disturbi del microcircolo si associano a ridotta capacità cognitiva ed al progredire della demenza, aspetti frequentemente presenti nel paziente anziano. È stato osservato come soggetti affetti da depressione presentino un minor contenuto di PUFA n-3 nelle membrane plasmatiche degli eritrociti e come vi sia una correlazione diretta con la severità della malattia.

Pertanto, un aumentato apporto dietetico o farmacologico di PUFA n-3, specie nel paziente anziano che, come è noto, presenta spesso più comorbilità, potrebbe essere indicato per la prevenzione e il trattamento non solo di malattie cardiovascolari ma anche di malattie neurologiche e mentali.

**Parole chiave:** Acidi grassi poliinsaturi omega 3 (PUFA n-3) • Aritmie • Cardiopatia ischemica • Morte cardiaca improvvisa • Prevenzione primaria e secondaria

## BIBLIOGRAFIA

- Bang HO, Dybenberg J, Hjoorne N. *The composition of food consumed by Greenland Eskimos*. Acta Med Scand 1976;200:69-73.
- Dei Cas L, Nodari S. *Ruolo degli acidi grassi poliinsaturi PUFA n-3 nella prevenzione della morte improvvisa*. *Experientia Medica* 2003.
- Lee TH, Sethi T, Crea AE, Peters W, Arm JP, Horton CE, et al. *Characterization of leukotriene B3: comparison of its biological activities with leukotriene B4 and leukotriene B5 in complement receptor enhancement, lysozyme release and chemotaxis of human neutrophils*. Clin Sci 1988;74:467-75.
- Haglund O, Metha JL, Saldeen T. *Effect of fish oil on some parameters of fibrinolysis and lipoprotein a in healthy subjects*. Am J Cardiol 1994;74:189-92.
- Weber P, Raederstorff D. *Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC polyunsaturated fatty acids - a review*. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2000;10:28-37.
- Mori TA, Beilin LJ. *Long-chain omega-3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction*. Curr Opin Lipidol 2001;12:11-7.

- 7 Poli A. *Acidi grassi omega-3 e prevenzione cardiovascolare*. Trends Med 2002;2:129-36.
- 8 Rustan AC, Nenaseter MS, Drevon CA. *Omega-3 and omega-6 fatty acids in the insulin resistance syndrome*. Ann NY Acad Sci 1997;827:310-26.
- 9 Suzukawa M, Abbey M, Howe PR, Nestel PJ. *Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidability, and uptake by macrophages*. J Lipid Res 1995;36:473-84.
- 10 Roche HM, Gibney MJ. *Effect of fish oil fatty acids on fasting and post-prandial triacylglycerol metabolism*. Am J Clin Nutr 2000;71(Suppl 1):232S-37S.
- 11 Nordoy A, Bonna KH, Sandset PM, Hansen JB, Nilsen H. *Effect of omega-3 fatty acids and simvastatin on hemostatic risk factors and post-prandial hyperlipidemia in patients with combined hyperlipidemia*. Arterioscler Thromb Vas Biol 2000;20:259-65.
- 12 Montori VM, Farmer A, Wollan PC, Dinneen SF. *Fish oil supplementation in type 2 diabetes: a quantitative systematic review*. Diabetes Care 2000;23:1407-15.
- 13 Bonna KH, Bjerve KS, Straume B, Gram IT, Thelle D. *Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension: a population based intervention trial from the Tromso Study*. N Engl J Med 1990;322:795-801.
- 14 James MJ, Cleland LG. *Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis*. Semin Arthritis Rheum 1997;27:85-97.
- 15 Belluzzi A, Boschi S, Brignola C, Munarini A, Cariani G, Miglio F. *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease*. Am J Clin Nutr 2000;71(Suppl 1):339S-42S.
- 16 Majser P, Grimm H, Grimminger F. *N-3 fatty acids in psoriasis*. Br J Nutr 2002;87(Suppl 1):S77-82.
- 17 Soyland E, Funk J, Rajka G, Sandberg M, Thune P, Rustad L, et al. *Dietary supplementation with very long chain n-3 fatty acids in patients with atopic dermatitis. A double blind, multicentre study*. Br J Dermatol 1994;130:757-64.
- 18 Ross R. *Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature 1993;362:801-9.
- 19 De Caterina R. *Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease*. Curr Op Lipidol 2000;11:9-23.
- 20 Falk E, Shah PK, Fuster V. *Coronary plaque disruption*. Circulation 1995;92:657-71.
- 21 Endres S, Ghorbani R, Kelley VE. *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells*. N Eng J Med 1989;320:265-71.
- 22 Fox PL, Di Corleto PE. *Fish oil inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein*. Science 1988;241:453-6.
- 23 Jendraschak E, Kaminski WE, Hessel F, Kiefl R, von Schacky C. *Dietary omega3 fatty acids lower levels of platelet - derived growth factor mRNA in human mononuclear cells*. Blood 1993;81:1871-9.
- 24 Hansen JB, Olsen JO, Wilsgard L, Osterud B. *Effects of dietary supplementation with cod liver oil on monocyte thromboplastin synthesis, coagulation and fibrinolysis*. J Intern Med Suppl 1989;225:133-9.
- 25 Shimokawa H, Vanhoutte PM. *Dietary omega-3 fatty acids and endothelium dependent relaxation in porcine coronary artery*. Am J Physiol 1989;256:H968-73.
- 26 De Caterina R, Cybulsky MA, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P. *Omega-3 fatty acids and endothelial leukocyte adhesion molecules*. Prostagl Leukotr Ess Fatty Acids 1995;52:191-5.
- 27 Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-KB and cytokine inducible enhancers*. FASEB J 1995;9:899-909.
- 28 Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. *Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial*. Lancet 2003;361:477-85.
- 29 Barron HV, Viskin S. *Autonomic markers and prediction of cardiac death after myocardial infarction*. Lancet 1998;351:461-2.
- 30 AA.VV. *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology*. Circulation 1996;93:1043-65.
- 31 La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. *Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators*. Lancet 1998;351:478-84.
- 32 Christensen JH, Skou HA, Madsen T, Torring I, Schmidt EB. *Heart rate variability and n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with diabetes mellitus*. J Intern Med 2001;249:545-52.
- 33 Christensen JH, Dyerberg J, Schmidt EB. *n-3 fatty acids and the risk of sudden cardiac death assessed by 24-hour heart rate variability*. Lipids 1999;34(Suppl):S197.
- 34 Christensen JH, Skou HA, Fog L, Hansen V, Vesterlund T, Dyerberg J, et al. *Marine n-3 fatty acids, wine intake, and heart rate variability in patients referred for coronary angiography*. Circulation 2001;103:651-7.
- 35 Bendahhou S, Cummins TR, Agnew WS. *Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids*. Am J Physiol 1997;272:C592-600.
- 36 Pepe S, Bogdanov K, Hallaq H, Spurgeon H, Leaf A, Lakatta E. *Omega 3 polyunsaturated fatty acid modulates dihydropyridine effects on L-type Ca<sup>++</sup> channels, cytosolic Ca<sup>++</sup>, and contraction in adult rat cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:8832-6.
- 37 Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. *Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. Circulation 1992;85:1046-55.
- 38 Leaf A, Xiao YF, Kang JX. *Interactions of n-3 fatty acids with ion channels in excitable tissues*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002;67:113-20.
- 39 Kang JX, Leaf A. *Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids. Recent studies*. Circulation 1996;94:1774-80.
- 40 Billman GE, Hallaci H, Leaf A. *Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by omega 3 fatty acids*. Proc Nat Acad Sci USA 1994;91:4427-30.

- <sup>41</sup> Billman GE, Kang JX, Leaf A. *Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs*. *Circulation* 1999;99:2452-7.
- <sup>42</sup> Harris WS. *N-3 fatty acids and serum lipoproteins; human studies*. *Am J Clin Nutr* 1997;65(5 Suppl):S1645-54.
- <sup>43</sup> Saynor R, Gillot T. *Changes in blood lipids and fibrinogen with a note on safety in a long term study on the effects of n-3 fatty acids in subjects receiving fish oil supplements and followed for seven years*. *Lipids* 1992;27:533-8.
- <sup>44</sup> Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
- <sup>45</sup> Ando M, Sanaka T, Nihei H. *Eicosapentaenoic acid reduces plasma levels of remnant lipoproteins and prevents in vivo peroxidation in dialysis patients*. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2177-84.
- <sup>46</sup> Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C. *The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease*. *N Engl J Med* 1985;312:1205-9.
- <sup>47</sup> Daviglius ML, Stamier J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, et al. *Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction*. *N Engl J Med* 1997;336:1046-53.
- <sup>48</sup> Dolecek TA, Granditis G. *Dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)*. *World Rev Nutr Diet* 1991;66:205-16.
- <sup>49</sup> Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, et al. *Fish consumption and risk of sudden cardiac death*. *JAMA* 1998;279:23-8.
- <sup>50</sup> Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC, et al. *Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death*. *N Engl J Med* 2002;346:1113-8.
- <sup>51</sup> Hu FB, Cho E, Rexrode KM, Albert CM, Manson JE. *Fish and omega 3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women*. *JAMA* 2002;287:1815-21.
- <sup>52</sup> Burt ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, et al. *Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)*. *Lancet* 1989;2:757-61.
- <sup>53</sup> de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mammelle N. *Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study*. *Circulation* 1999;79:779-85.
- <sup>54</sup> Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M. *Randomized, double-blind, placebo controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival*. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11:485-91.
- <sup>55</sup> Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, et al.; GISSI-Prevenzione Investigators. *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI-Prevenzione)*. *Circulation* 2002;105:1897-903.
- <sup>56</sup> Marchioli R, Schweiger C, Tavazzi L, Valagussa F. *Efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: results of GISSI Prevenzione trial*. *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico*. *Lipids* 2001;36(Suppl):S119-26.
- <sup>57</sup> Bucher HC, Hengstler P, Sdiindler C, Meier G. *N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Am J Med* 2002;112:298-308.
- <sup>58</sup> Penny M, Kris-Etherton PM, Harris WS, Lawrence J. *Appel for Nutrition Committee. Fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. *Circulation* 2002;106:2747-57.
- <sup>59</sup> Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, et al. *Task force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology*. *Europace* 2002;4:3-18.
- <sup>60</sup> Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KAA, et al. *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology*. *Eur Heart J* 2003;24:28-66.
- <sup>61</sup> Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. *The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina*. *Progr Lipid Res* 2001;40:1-94.
- <sup>62</sup> Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. *Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions*. *J Neurosci Res* 1999;56:565-70.
- <sup>63</sup> Jones C, Arai T, Rapoport S. *Evidence for the involvement of docosahexaenoic acid in cholinergic stimulated signal transduction at the synapse*. *Neurochem Res* 1997;22:663-70.
- <sup>64</sup> Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. *Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. Symposium on PUFA in Maternal and Child Health, Kansas City, Missouri, USA, 10-13 September 2000*. *Lipids* 2001;36:945-59.
- <sup>65</sup> Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y, et al. *Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats*. *J Neurochem* 2002;81:1084-91.
- <sup>66</sup> Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubuda O, et al. *Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model*. *Neuron* 2004;43:633-45.
- <sup>67</sup> Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Peres K, Dartigues JF, Renaud S. *Fish, meat, and risk of dementia: cohort study*. *BMJ* 2002;325:932-3.
- <sup>68</sup> Terano T, Fujishiro S, Ban T, Yamamoto K, Tanaka T, Noguchi Y, et al. *Docosahexaenoic acid supplementation improves the moderately severe dementia from thrombotic cerebrovascular diseases*. *Lipids* 1994;34(Suppl):S345-6.
- <sup>69</sup> Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D. *Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients*. *J Biol Psychiatr* 1998;43:315-19.
- <sup>70</sup> Peet M, Edwards RW. *Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients*. *J Affect Disord* 1998;48:149-55.