

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI MILANO BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato in Ipertensione e Prevenzione del Rischio Cardiovascolare



**POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE E RIGIDITÀ VASCOLARE:  
VALUTAZIONE IN UNA POPOLAZIONE DI SOGGETTI AFFETTI DA  
IPERTENSIONE ARTERIOSA ESSENZIALE**

Coordinatore: Prof. **G. Mancia**

Relatore: Prof. Ssa **C. Giannattasio**

Tesi di

Dott.ssa Alessandra Salvioni

Matr. 716514

Anno Accademico 2009-2010

## INDICE

Introduzione	4
Rischio e danno cardiovascolare	6
Differenti algoritmi di rischio	8
Il danno d'organo subclinico	16
Aterosclerosi	18
Fattori implicati nell'aterogenesi	18
Fattori di rischio non modificabili	25
Fattori di rischio modificabili	28
Rigidità vascolare	
Meccanismi fisiopatologici	
Alterazioni strutturali e cellulari	34
Fattori meccanici ed alterazioni vascolari	36
Arterial Stiffness, ipertensione arteriosa e diabete mellito	48
Arterial Stiffness e disfunzione endoteliale	40
Arterial Stiffness e PCR	41
Arterial Stiffness e sistema nervoso simpatico	42
Arterial Stiffness, onda di riflessione e rischio cardiovascolare	43
Rigidità aortica: predittore indipendente di eventi cardiovascolari	44
Prospettive: la riduzione dell'arterial stiffness e del rischio cardiovascolare	46
Metodiche di misurazione	
Pulse Pressure	48
Velocità da	
ll'onda sfigmica :Pulse wave velocity	49
Danno preclinico e Pulse wave velocity	51
Valutazione endoteliale	56
Metodi e strumenti per determinare l'arterial stiffness	59
Geni e genoma	69
Variabilità genetica: mutazioni e polimorfismi	73
Polimorfismi a singolo nucleotide, linkage disequilibrium ed aplotipi	76
Genetica di popolazioni e legge di Hardy-Weinberg	78
Genetica delle patologie cardiovascolari	80
Malattie a trasmissione mendeliana	80
Studi di associazione: polimorfismi	81
Geni candidati nell'ipertensione arteriosa .	86
Ruolo della regione 9p21	87
Influenze genetiche sull'arterial stiffness	91
Malattie Monogeniche	93
Studi di famiglia e di ereditabilità	94

Studi su geni candidati	96
Polimorfismi genetici in geni candidati associati all'arterial stiffness	96
Studi genome wide	101
Valutazione del profilo di espressione genica	105
Potenziali terapeutici	105
Scopo dello studio	107
Materiali e metodi	108
Analisi statistica	117
Risultati	118
Discussione	135
Bibliografia	142

## INTRODUZIONE

Ogni anno in Italia muoiono circa 243 mila persone per malattie cardiovascolari. I decessi per infarto miocardico sono 37 mila l'anno.

L'ipertensione arteriosa è, almeno in Europa, il principale fattore di rischio cardiovascolare (1-6.)

Le patologie cardiovascolari rappresentano la prima causa di mortalità e morbidità nei paesi industrializzati. L'OMS ha stimato che il 30% dei 58 milioni di decessi avvenuti nel 2005 sia ascrivibile a cause cardiovascolari. Questa percentuale è equivalente alla somma di patologie infettive, deficit nutrizionali e patologie perinatali.

Il 46% dei decessi per patologie cardiovascolari colpisce persone di età inferiore a 70 anni, nella fase più produttiva della vita. Si stima che entro il 2015 le morti per patologie non trasmissibili (metà della quali, dovute a patologie cardiovascolari) aumenteranno del 17%, mentre le morti dovute a patologie infettive e deficit nutrizionali diminuiranno del 3%.

Oggi è possibile identificare i pazienti che hanno maggiore possibilità di essere colpiti da una patologia cardiovascolare in base a vari fattori clinici e ambientali tramite una stratificazione del rischio cardiovascolare, come riportato nelle Linee, guida ESH/ESC 2007/2009 (1,2).

Tra le principali cause e/o fattori di rischio un ruolo di primaria importanza lo giocano l'età, il sesso maschile, la familiarità per cardiopatia ischemica, il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia, il fumo e lo stress. Tali fattori di rischio, tuttavia, non sono sufficienti a spiegare tutti i casi d'infarto che si manifestano in individui non a rischio: per questo motivo la ricerca e gli studi clinici si sono indirizzati verso l'individuazione di nuovi marcatori, sia legati ai vari cicli metabolici (tra cui i processi emocoagulativi e infiammatori) che a livello genico, al fine di individuare la **predisposizione genetica** allo sviluppo di una determinata patologia cardiovascolare.

Il progetto genoma umano ha consegnato alla comunità scientifica internazionale una sequenza genetica di tre miliardi di paia di basi condivisa al 99,9% da tutti gli individui.

Le differenze fra individui sono costituite per la maggior parte da polimorfismi nucleotidici, in altre parole cambiamenti di una singola base nel DNA.

In campo medico, le nuove conoscenze sul Genoma Umano hanno permesso il consolidarsi di una nuova dimensione molecolare della medicina, in particolare di un settore definito come "Medicina Predittiva", ovvero una medicina, che basandosi sulle

informazioni ricavabili dalla costituzione genetica di un individuo, possa anticipare una stima del rischio di quest'ultimo di sviluppare una determinata patologia durante il corso della vita. L'ipertensione arteriosa essenziale è un fenotipo complesso causato dall'interazione di molteplici geni cui si associano diversi fattori ambientali. Molte componenti umorali, nervose, emodinamiche, renali regolano la pressione arteriosa. Sulla base di queste considerazioni, l'attenzione dei ricercatori inizialmente si è concentrata sulla determinazione di polimorfismi di geni (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) che codificano per proteine ed enzimi coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa e nella patogenesi del danno d'organo cardiovascolare e dell'arteriosclerosi. La speranza è che l'identificazione dei determinanti genetici di malattia possa consentire, da un lato un intervento precoce nei soggetti a rischio elevato, dall'altro una riduzione del numero dei soggetti inutilmente in terapia farmacologica perché a basso rischio di complicanze.

L'interesse per la componente genetica della suscettibilità a malattie complesse sta assumendo sempre più importanza nella medicina moderna, in quanto si sta mettendo in evidenza il ruolo di alcuni polimorfismi genetici relativamente comuni, ma che se associati tra loro e combinati con specifiche componenti ambientali, possono elevare notevolmente il rischio di sviluppare patologie diffuse nella società industriale, quali le malattie cardiovascolari.

## **RISCHIO E DANNO CARDIOVASCOLARE**

L'ipertensione arteriosa è, almeno in Europa, il principale fattore di rischio cardiovascolare (1-6). Poiché l'ipertensione arteriosa nella maggior parte dei casi si associa ad altre condizioni metaboliche di aumentato rischio cardiovascolare, nelle linee guida ESH/ESC del 2007 e 2009 (1,2) è stata enfatizzata l'importanza di stratificare il profilo globale di rischio cardiovascolare a scopo prognostico e terapeutico. Infatti, i singoli fattori di rischio si potenziano, quando contemporaneamente presenti, con un impatto di tipo esponenziale sul rischio cardiovascolare globale. I pazienti che presentano più fattori di rischio cardiovascolari giovano di più di una terapia multipla e che tenga in considerazione il rischio globale. Questo concetto è stato ben definito e ampliato nelle linee guida ESH/ESC 2007 e riconfermato nelle più recenti linee guida del 2009. (Vedi figura 1).

***Il rischio cardiovascolare globale*** è elevato nei pazienti con malattia cardiovascolare, diabete mellito e marcata alterazione di ogni singolo fattore di rischio cardiovascolare (2,7-9). In tutti gli altri individui può essere calcolato in base a complessi sistemi computerizzati che calcolano la probabilità di incorrere in eventi cardiovascolari nell'arco dei 10 anni successivi che tengono in considerazione i fattori di rischio maggiori.

La mortalità e morbosità per cardiopatia ischemica è doppia o tripla in USA e nei paesi del Nord Europa e dell'Est Europeo (7,9), e i fattori di rischio (FR) coronarici sono (soprattutto le variabili lipidiche) più elevati che nel Sud Europa e nei Paesi dell'area mediterranea (8).

Pertanto in Italia per la valutazione del rischio coronario debbono essere usate carte o algoritmi informatici costruiti su popolazioni o coorti arruolate negli studi epidemiologici condotti in modo prospettico nel nostro Paese. In Italia fortunatamente sono portati avanti da oltre un trentennio sia al nord sia al sud del Paese numerosi studi longitudinali ed epidemiologici; pertanto abbiamo a disposizione un'enorme messe di dati sulla prevalenza dei FR cardiovascolari e sulle loro modificazioni nel tempo. Tuttavia i dati debbono essere valutati con competenza da esperti del problema con documentata capacità in questo campo specifico, così da avere alla fine una stima corretta del rischio cardiovascolare facilmente applicabile a qualsiasi segmento della popolazione italiana distinta per sesso ed età.

**Figura 1.** Stratificazione del rischio cardiovascolare in quattro categorie.

<b>Pressione arteriosa (mmHg)</b>					
<b>Altri Fattori di rischio, danno d'organo o presenza di patologia concomitante</b>	Normale PAS 120-129 o PAD 80-84	Normale alta PAS 130-139 o PAD 85-89	Grado 1 PAS 140-159 o PAD 90-99	Grado 2 PAS 160-179 o PAD 100-109	Grado 3 PAS = 180 o PAD = 110
<b>Nessun fattore di rischio aggiunto</b>	Rischio nella media	Rischio nella media	Rischio aggiunto basso	Rischio aggiunto moderato	Rischio aggiunto elevato
<b>1-2 fattori di rischio</b>	Rischio aggiunto basso	Rischio aggiunto basso	Rischio aggiunto moderato	Rischio aggiunto moderato	Rischio aggiunto molto elevato
<b>3 o più fattori di rischio, SM, Danno d'organo o Diabete</b>	Rischio aggiunto moderato	Rischio aggiunto elevato	Rischio aggiunto elevato	Rischio aggiunto elevato	Rischio aggiunto molto elevato
<b>Malattia CV o renale</b>	Rischio aggiunto molto elevato	Rischio aggiunto molto elevato	Rischio aggiunto molto elevato	Rischio aggiunto molto elevato	Rischio aggiunto molto elevato

PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; CV: cardiovascolare; Basso, moderato, elevato, molto elevato si riferisce al rischio di eventi CV fatali e non fatali a 10 anni. Il termine "aggiunto" indica che nelle diverse categorie il rischio è superiore alla media; SM: sindrome metabolica. La linea tratteggiata indica che la definizione di ipertensione può essere flessibile, poiché dipende dal livello di rischio CV globale.

## **DIFFERENTI ALGORITMI DI RISCHIO**

È importante sottolineare che i differenti algoritmi attualmente disponibili nella letteratura scientifica, sviluppati in differenti popolazioni, utilizzano differenti parametri per la stima del rischio coronarico o cardiovascolare. Ciò significa che, nelle differenti popolazioni considerate, sono apparentemente diversi gli elementi che contribuiscono in modo significativo alla predizione della probabilità di malattia. A titolo di esempio si può ricordare che nell'algoritmo di Framingham (7), che permette di stimare la probabilità dei soli eventi coronarici, e su cui si basano le carte del rischio proposte nel documento delle Società Europee di Cardiologia, dell'Ipertensione e dell'Aterosclerosi, nonché il più recente documento statunitense elaborato e diffuso dal National Cholesterol Education Program (il cosiddetto ATP-III)(8), i parametri di interesse sono il sesso, l'età, il valore del colesterolo totale, del colesterolo HDL, la pressione sistolica (in una variante anche la diastolica), la presenza o meno di diabete e dell'abitudine al fumo di sigaretta. Nell'algoritmo di PROCAM (10), basato sul follow-up dei soggetti di sesso maschile e di età intermedia di una coorte di lavoratori arruolata nella città tedesca di Münster, e che pure permette per ora la sola stima del rischio coronarico, entra anche la familiarità per malattia coronarica; per quanto concerne il profilo lipidico il modello PROCAM utilizza il valore del colesterolo LDL al posto di quello della colesterolemia totale, e considera anche il valore della trigliceridemia. Nell'algoritmo RISCOR(11), sviluppato a partire da alcune coorti italiane arruolate e seguite a partire dagli anni '60-'70, e che permettendo anche la stima del rischio di eventi cerebrovascolari va considerato un esempio di strumento per il calcolo del Rischio Cardiovascolare Globale, entrano il peso e l'altezza. Nell'algoritmo di Rischio pubblicate in varie versioni dall'Istituto Superiore di Sanità a partire dall'inizio del 2005, i parametri di stima sono, come nella funzione di Framingham, la colesterolemia totale ed HDL, la pressione arteriosa sistolica, la presenza o l'assenza di fumo o malattia diabetica (oltre, naturalmente, al sesso ed all'età). I motivi di queste differenze non sono facilmente comprensibili. È possibile, sul piano teorico, che in differenti popolazioni (con assetto genico almeno in parte diverso) i vari parametri possano possedere un ruolo o un peso diversi, per esempio perché interagiscono con l'assetto genico stesso, o con stili di vita, condizioni ambientali, climatiche, socioeconomiche differenti. È peraltro anche possibile che la "preferenza" del modello verso alcuni parametri (a scapito di altri) possa dipendere da fattori almeno in parte casuali. Quando i valori di alcuni parametri sono correlati tra loro

(si pensi ad esempio alla glicemia, alla trigliceridemia, al peso corporeo), l'analisi statistica tende a trattarne uno solo, escludendo gli altri. L'informazione contenuta in uno di tali valori, infatti, comprende in parte più o meno ampia anche quella contenuta negli altri parametri, se questi ultimi tendono a muoversi in modo correlato al primo. La scelta effettuata dal programma statistico, in questo caso, può essere influenzata anche da fattori contingenti (per esempio la dispersione del dato o l'errore intrinseco associato alla sua determinazione), ed essere quindi variabile. L'adozione dell'uno o dell'altro degli algoritmi disponibili, pertanto, influenza in modo significativo la predizione degli eventi che ne deriva. È per esempio noto che, applicato a popolazioni italiane, l'algoritmo di Framingham sovrastima la probabilità di malattia. La nostra popolazione, per motivi solo in parte noti, tende ad incorrere, a parità di livello dei principali fattori di rischio, in eventi coronarici con una frequenza più bassa rispetto a soggetti anglosassoni o scandinavi. Nel 2003 le società Europee di Cardiologia, dell'Aterosclerosi e dell'Ipertensione hanno redatto un documento di Linee Guida(1,12), che aggiorna e sostituisce quello a suo tempo pubblicato nel 1998, basato su una nuova Carta del Rischio, che presenta graficamente i dati ottenuti nel progetto epidemiologico internazionale denominato Score (13).

La Società Europea di Cardiologia e la Second Joint Task Force (14) stimolano la nascita del progetto SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation) proposto proposto come una Azione Europea Concertata e finanziato nell'ambito del programma BIOMED dell'Unione Europea. Lo scopo, concettualmente condivisibile, del progetto era inizialmente quello di costruire un'unica carta che funzionasse per qualsiasi paese Europeo. Nel corso dei lavori purtroppo i Ricercatori si resero conto che ciò era semplicemente utopico e quindi ripiegarono sulla produzione di due carte: una per i paesi Europei cosiddetti a "basso rischio" (basata sul sottogruppo costituito da Belgio, Italia e Spagna, considerati appunto paesi a basso rischio), un'altra per quelli cosiddetti ad "alto rischio" (basata su Danimarca, Finlandia e Norvegia). L'end-point "obbligato" fu la mortalità cardiovascolare, e non l'incidenza cumulativa di eventi fatali e non fatali, come nella totalità delle carte fino ad allora prodotte; il tempo considerato per la predizione, 10 anni. Il progetto SCORE ha messo insieme coorti provenienti da 12 paesi Europei, per un totale di 205.178 soggetti (43% e 57% rispettivamente donne e uomini) che hanno prodotto, in un follow-up medio di 8 anni, 7934 decessi cardiovascolari. Per la produzione delle funzioni di rischio è stato impiegato il modello di Weibull. In pratica, le carte del progetto SCORE consentono di stimare le probabilità di un Europeo, esente da una pregressa malattia cardiovascolare,

uomo o donna, di età compresa fra 40 e 65 anni, appartenente a un paese a basso o ad alto rischio, di andare incontro a un decesso per malattia cardiovascolare in 10 anni in funzione dell'età, della pressione arteriosa sistolica, della presenza o assenza di abitudine al fumo e di due diverse espressioni della colesterolemia (o il colesterolo totale tout court, o, per tenere in conto anche il contributo il colesterolo HDL, il rapporto colesterolo totale/colesterolo HDL). Peraltro, viene chiaramente dichiarato dagli Autori che fra queste due diverse modalità non esistono differenze statisticamente significative, essendo il coefficiente di concordanza fra le due stime pari a 0.99, sia per le aree a basso sia per quelle ad alto rischio. Quindi, la libertà di scegliere il colesterolo totale o il suo rapporto con il colesterolo HDL, viene garantita e lasciata alla disponibilità per l'utilizzatore della misurazione del colesterolo HDL stesso. Una prospettiva dei risultati del progetto SCORE è la calibrazione delle carte del rischio in funzione delle mortalità nazionali, per poter ottenere delle carte specifiche per ogni paese.

Score è un progetto internazionale, che ha esaminato complessivamente circa 200 mila soggetti, per un follow-up medio di 2,7 milioni di anni/uomo, caratterizzato essenzialmente dal fatto che le coorti sono tutte europee (dalla Russia ad Est alla Spagna ad Ovest e dalla Scandinavia all'Italia da Nord a Sud). Esso si basa quindi su progetti osservazionali condotti sia in paesi nord-europei che mediterranei (questi ultimi in larga parte italiani). Per poter utilizzare dati raccolti in Paesi nei quali la raccolta ed il monitoraggio degli eventi non fatali era insufficiente o incompleto, si è presa la decisione di basare il progetto Score solo sugli eventi fatali; anche gli eventi di tipo cerebrovascolare (ictus) fatali sono stati inclusi. L'algoritmo dal progetto Score, quindi, permette di stimare la probabilità di un soggetto, in base ad un'aggregazione di fattori di rischio, di incorrere, nei dieci anni successivi, in un evento cardiovascolare fatale. Per ovviare alla differenza di incidenza di questi eventi nelle aree settentrionali e meridionali del continente europeo, gli autori di Score hanno elaborato due differenti algoritmi, uno adatto alle popolazioni ad alto rischio ed uno adatto alle popolazioni a basso rischio, come la nostra. In entrambi i casi, il livello dell'alto rischio, oltre il quale attivare specifici interventi di natura preventiva, è stato collocato al 5% (contro il precedente 20% degli eventi coronarici fatali e non fatali).

In tempi più recenti, la situazione degli algoritmi (e delle Carte del Rischio che da essi derivano) nel nostro Paese si è ulteriormente modificata. All'inizio del 2004 sono state presentate alla comunità scientifica, e pubblicate sul sito dell'Istituto Superiore di Sanità le

carte del rischio cardio-Cerebrovascolare sviluppate dall'Istituto stesso, basandosi su una serie di 17 studi di Coorte condotti nel nostro Paese a partire dalla metà degli anni '80. Questi studi, che hanno esaminato un numero molto ampio di soggetti di ambo i sessi (circa 40.000, con una leggera prevalenza di donne, per un numero totale di circa 300.000 anni-uomo, hanno permesso di strutturare carte del rischio specifiche per soggetti di sesso maschile e femminile, fumatori e non fumatori, diabetici e non diabetici. Le carte sono per ora limitate al range di età compreso tra 40 e 69 anni.

Il modello SCORE è stato utilizzato anche nell'ambito del progetto HeartScore dell'ESC finalizzato alla prevenzione delle malattie cardiovascolari nella pratica clinica. Ne è disponibile una versione online all'indirizzo web: [www.escardio.org](http://www.escardio.org).

Nella Tabella 1 sono riportati le principali variabili prese in esame nella stratificazione del rischio. Esse includono, come già descritto nelle Linee Guida (2), i fattori di rischio tradizionali (demografici, antropometrici, familiarità per malattie cardiovascolari in giovane età, livelli di pressione arteriosa, abitudine al fumo, profilo lipidico e glucidico), la presenza di danno d'organo, di diabete e di altre patologie. Alcune aspetti innovativi delle Linee Guida meritano di essere ricordati:

- Viene menzionata la sindrome metabolica perché tale patologia, più che un'entità autonoma, è una condizione clinica caratterizzata dalla presenza di più fattori di rischio oltre allo stato ipertensivo, elemento quest'ultimo che si riflette negativamente sul profilo di rischio cardiovascolare globale (15)
- In queste Linee Guida è stata data particolare importanza alla valutazione del danno d'organo, la cui presenza anche a livello subclinico incrementa notevolmente il rischio. Una Sezione particolare delle Linee Guida è stata dedicata all'identificazione del danno d'organo subclinico e sono stati proposti valori soglia di riferimento per ciascuna variabile in esame.
- È stato ampliato l'elenco dei marcatori di danno d'organo renale, che include il calcolo della creatina clearance mediante la formula di Cockcroft-Gault (16) o la stima del tasso di filtrazione glomerulare mediante la formula MDRD (17). L'inclusione di queste variabili nel suddetto elenco dipende dal fatto che esse sono dei marker affidabili del rischio cardiovascolare che si associa all'insufficienza renale.

- La microalbuminuria è stata considerata come un parametro essenziale per la valutazione del danno d'organo perché la sua determinazione è facile e relativamente poco costosa.
- L'ipertrofia ventricolare sinistra di tipo concentrico rappresenta l'alterazione strutturale cardiaca che incrementa in modo cospicuo il rischio cardiovascolare.
- Viene raccomandato di effettuare valutazioni del danno d'organo in diversi distretti (cuore, vasi, rene e cervello), in quanto la presenza di un danno multi-organo si associa ad una prognosi peggiore rispetto alla condizione caratterizzata da un danno di un singolo organo (18).
- Nella lista dei fattori che influenzano la prognosi è stata aggiunta una variabile, e cioè l'incremento della velocità dell'onda di polso come indice precoce di alterata distensibilità delle grandi arterie (19,20), pur riconoscendone l'ancora limitato impiego in clinica.
- Un ridotto valore del rapporto tra valori pressori agli arti superiori e inferiori, inferiore a 0.9, è stato proposto come indice di aterosclerosi. Tale parametro è di relativamente facile valutazione in clinica e si associa ad un incremento del rischio cardiovascolare globale (21).
- Viene raccomandata la valutazione del danno d'organo non solo prima di impostare la terapia (per la stratificazione del rischio) ma anche durante il trattamento, in quanto la regressione dell'ipertrofia ventricolare sinistra e della proteinuria rappresentano degli indici attendibili degli effetti di protezione cardiovascolare indotti dalla terapia (22-26).
- Valori di frequenza cardiaca elevati sono stati inclusi tra i fattori di rischio poiché numerosi studi hanno dimostrato che un incremento della frequenza cardiaca si associa a un rischio più elevato di morbilità e mortalità cardiovascolare e globale. E' stato anche evidenziato il valore prognostico di una elevata frequenza cardiaca nei confronti del rischio di sviluppo di uno stato ipertensivo (27,28) e la elevata frequenza d'associazione tra tachicardia a riposo ed alterazioni metaboliche e sindrome metabolica (29,30). Tuttavia, a causa dell'ampio range di normalità dei valori di frequenza cardiaca a riposo (60-90 battiti/min), non esiste ad oggi un valore soglia in grado di identificare in modo accurato l'aumento del rischio cardiovascolare.
- Nelle più recenti linee guida del 2009 viene enfatizzata la PWV che assume notevole importanza per la valutazione della rigidità vascolare come predittore di rischio di

danno preclinico, soprattutto nei pazienti giudicati a rischio intermedio/basso dalle comuni scale di valutazione.

**Tabella 1.** Fattori che influenzano la prognosi.

Fattori di rischio	Danno d'organo subclinico
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pressione sistolica e diastolica</li> <li>• Pressione pulsatoria (anziani)</li> <li>• Età (M &gt; 55anni; F &gt; 65 anni)</li> <li>• Abitudine al fumo</li> <li>• Dislipidemia               <ul style="list-style-type: none"> <li>- CT &gt; 5.0 mmol/l (190 mg/dl)</li> <li>o:</li> <li>- C-LDL &gt; 3.0 mmol/l (115 mg/dl)</li> <li>o:</li> <li>- C-HDL: M &lt; 1.0 mmol/l (40 mg/dl), F &lt; 1.2 mmol/l (46 mg/dl)</li> <li>o:</li> <li>- TG &gt; 1.7 mmol/l (150 mg/dl)</li> </ul> </li> <li>• Glicemia a digiuno: 5.6-6.9 mmol/L (102-125 mg/dl)</li> <li>• Glicemia da carico alterata</li> <li>• Obesità addominale [circonferenza addominale &gt; 102 cm (M), &gt; 88 cm (F)]</li> <li>• Familiarità per malattie cardiovascolari precoci (M età &lt; 55 anni; F età &lt; 65 anni)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evidenza elettrocardiografica di IVS (Sokolow-Lyon &gt; 38 mm; Cornell &gt; 2440 mm*ms)</li> <li>o:</li> <li>• Evidenza ecocardiografica di IVS° (IMVS M = 125 g/m<sup>2</sup>, F = 110 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>• Ispessimento della parete carotidea (IMI &gt; 0.9 mm) o placche ateromasiche</li> <li>• Velocità dell'onda di polso carotidea - femorale &gt;12 m/sec</li> <li>• Indice pressorio arti inferiori / arti superiori &lt; 0.9</li> <li>• Lieve incremento della creatinina plasmatica: M: 115-133 µmol/l (1.3-1.5 mg/dl); F: 107-124 µmol/l (1.2-1.4 mg/dl)</li> <li>• Riduzione del filtrato glomerulare + (&lt; 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) o della creatinina-clearance? (&lt; 60 ml/min)</li> <li>• Microalbuminuria 30-300 mg/24h o rapporto albumina-creatinina: = 22 (M) o = 31 (F) mg/g di creatinina</li> </ul>
Diabete mellito	Malattie CV o renali conclamate
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicemia a digiuno = 7.0 mmol/l (126 mg/dl) (ripetute valutazioni)</li> <li>o:</li> <li>• Glicemia postprandiale &gt; 11.0 mmol/l (198 mg/dl)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Malattie cerebrovascolari: ictus ischemico; emorragia cerebrale; attacco ischemico transitorio (TIA)</li> <li>• Malattie cardiache: infarto del miocardico; angina; rivascolarizzazione coronarica; scompenso cardiaco</li> <li>• Malattie renali: nefropatia diabetica; insufficienza renale (creatininemia M &gt; 133, F &gt; 124 mmol/l); proteinuria (&gt; 300 mg/24h)</li> <li>• Vasculopatia periferica</li> <li>• Retinopatia avanzata: emorragie o essudati, papilledema</li> </ul>
<p><b>Nota:</b> La presenza di almeno 3 di questi 5 fattori di rischio: obesità addominale, alterata glicemia a digiuno, PA ? 130/85 mmHg, basso colesterolo-HDL, elevati TG (come già descritto) fa porre diagnosi di sindrome metabolica</p>	

**Legenda**

M: maschio; F: femmina; CV: malattia cardiovascolare; IVS: ipertrofia ventricolare sinistra; PA: pressione arteriosa; TG: trigliceridi; CT: colesterolemia totale; IMI:ispessimento medio-intimale; ? formula di Cockcroft Gault; † formula MDRD; °rischio massimale di IVS concentrica: incremento dell'IMVS (indice di massa ventricolare sinistra) con un rapporto spessore parietale / raggio ? 0.42

Nella Tabella 2 sono riportati i principali elementi diagnostici per la stratificazione dei soggetti nelle categorie di rischio “elevato” e “molto elevato”. E’ importante notare che la presenza di più fattori di rischio, di diabete o di danno d’organo fanno sì che il soggetto con ipertensione rientri, anche quando i valori di pressione arteriosa risultano normali-alti, nella categoria a rischio elevato

**Tabella 2.** Soggetti a rischio cardiovascolare elevato o molto elevato

- PA sistolica  $\geq 180$  mmHg e/o diastolica  $\geq 110$  mmHg
- PA sistolica  $> 160$  mmHg con valori diastolici bassi ( $< 70$  mmHg)
- Diabete mellito
- Sindrome metabolica
- 3 o più fattori di rischio cardiovascolare
- Uno o più markers di danno d’organo subclinico:
  - Evidenza elettrocardiografica (in particolare sovraccarico ventricolare) o ecocardiografica di ipertrofia ventricolare sinistra (di tipo concentrico)
  - Evidenza ultrasografica di ispessimento della parete arteriosa carotidea o di placche ateromasiche
  - Ridotta distensibilità arteriosa
  - Moderato incremento della creatinina serica
  - Riduzione del filtrato glomerulare stimato o della creatinina clearance
  - Microalbuminuria o proteinuria
- Malattie cardiovascolari o renali conclamate

## **IL DANNO D'ORGANO SUBCLINICO**

I vari tipi di danno subclinico come definito secondo le linee guida ESH/ESC 2007 sono schematizzati nella tabella 1.

In particolare l'ipertrofia ventricolare sinistra (31-33) e l'ispessimento miointimale carotideo (34,35) hanno valore prognostico sfavorevole e possono essere reversibili in caso di terapia ben condotta (35-40). Analogamente concerne la microalbuminuria e la presenza di proteinuria. L'ecocardiogramma è indicato nei soggetti in cui l'ecg non ha evidenziato l'ipertrofia ventricolare sinistra secondo i criteri definiti (37). Deve comprendere la misurazione del setto, della parete posteriore e il calcolo della massa ventricolare sinistra. La presenza di ipertrofia concentrica è la condizione che più correla con un rischio aumentato. Seppure il rischio aumenta in modo continuo è stato considerato patologico un valore di massa  $>125$  nell'uomo e  $>110$  nella donna (41-45). Inoltre l'ecocardiogramma permette la stima della distensibilità diastolica del ventricolo sinistro e può essere valutata mediante la tecnica doppler rapportando l'onda E e A del flusso transmitralico o mediante la misurazione del tempo di rilasciamento diastolico precoce, valutando il pattern di efflusso delle vene polmonari, o grazie alla flussimetria doppler a livello della mitrale. La disfunzione diastolica può predire il rischio di scompenso cardiaco con normale funzione sistolica e di mortalità. La terapia antiipertensiva può far regredire l'ipertrofia ventricolare sinistra con una certa superiorità di ace-inibitori, sartanici e calcio-antagonisti sui beta-bloccanti. La regressione dell'IVS si associa ad una riduzione del rischio di morbilità e mortalità. Meno è noto circa la possibilità di regressione della disfunzione diastolica.

L'ecocolordoppler dei tronchi sovra aortici è indicata soprattutto in coloro che hanno un'età più avanzata (46,47). La valutazione dello spessore del complesso intima-media a livello delle carotidi comuni e la valutazione delle eventuali placche ateromasiche generalmente alla biforcazione o a livello delle carotidi interne predice l'incidenza di eventi cerebrovascolari e coronarici (48,49). Il rischio aumenta progressivamente ma è stato definito un valore soglia di ispessimento  $\geq 0.9$  mm oltre il quale l'ispessimento è considerato patologico. La placca si definisce per ispessimenti  $>1.5$  mm o focale di 0.5 mm. La diagnosi del danno renale legato ad uno stato ipertensivo si basa sul riscontro di elevati livelli di creatinina sierica, di una riduzione della clearance della creatinina o di un'elevata escrezione urinaria di albumina (50). La classificazione dell'insufficienza renale si fonda sul

calcolo del tasso di filtrazione glomerulare mediante la formula abbreviata MDRD che tiene conto dell'età, del sesso e dei livelli di creatinina sierica(17). La presenza di insufficienza renale allo stadio 3 è stata definita come quella condizione caratterizzata da valori di filtrato glomerulare  $<60$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, mentre gli stadi 4 e 5 sono definiti da valori inferiori rispettivamente a 30 e 15 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Un'altra stima dei valori della creatinina clearance si basa sulla formula di Cockcroft-Gault che tiene conto dell'età, del sesso, del peso corporeo e dei livelli di creatinina sierica. Questa formula è valida per valori  $>60$  ml/min, ma sovrastima i valori di creatinina clearance in presenza di una malattia renale in fase avanzata (stadi 3-5)(16). Entrambe le formule permettono di diagnosticare un'insufficienza renale di grado lieve, caratterizzata da livelli di creatinina sierica ancora nella norma (51). La microalbuminuria predice gli eventi cardiovascolari sia nei diabetici che negli ipertesi. Anche la riduzione del filtrato glomerulare predice la morbilità e la mortalità cardiovascolare.

Nei pazienti con storia di pregresso ictus cerebrale le tecniche di immagine disponibili permettono di perfezionare l'approccio diagnostico, consentendo di precisare la natura e la sede del processo(52,53). Infine, poiché i disturbi cognitivi dell'anziano sono, almeno in parte, correlati all'ipertensione (54-59), il ricorso a test di valutazione cognitiva dovrebbe avvenire più spesso nella valutazione clinica del paziente iperteso anziano. Le alterazioni retiniche di grado 1 e 2 non sono specifiche della patologia ipertensiva, anche se un loro riscontro nei pazienti più giovani richiede l'esecuzione di ulteriori approfondimenti diagnostici. Al contrario le alterazioni retiniche di grado 3 e 4 si associano ad un aumento del rischio di eventi cardiovascolari (60,61). Sono attualmente in corso di elaborazione metodiche che consentono una valutazione più precisa del danno oculare nell'ipertensione (62).

## ATEROSCLEROSI

Il maggior determinante dell'incidenza delle patologie cardiovascolari è costituito dall'aterosclerosi. Numerosi fattori sono implicati nella genesi di questa alterazione vascolare ed è stata dimostrata e documentata la molteplicità e gravità delle conseguenze che questa malattia dei vasi ha su tutto l'organismo. L'aterosclerosi è una patologia lentamente progressiva che interessa le arterie, caratterizzata da placche fibrolipidiche intimali rilevate, costituite da depositi di lipidi, proliferazione di cellule muscolari lisce e sintesi di matrice extracellulare. Sono interessate prevalentemente le arterie elastiche (aorta, carotide ed arterie iliache) e le arterie muscolari di grande e medio calibro (arterie coronarie e poplitea). Le lesioni tendono inizialmente ad essere focali, e coinvolgono solo parzialmente l'intera circonferenza del vaso. Accrescendosi, le placche aterosclerotiche invadono progressivamente il lume dell'arteria e si estendono alla tonaca media sottostante. A livello delle piccole arterie gli ateromi hanno un effetto occlusivo e compromettono il flusso ematico negli organi distali causando lesioni ischemiche; nelle arterie di grandi dimensioni, invece, distruggono le pareti, indebolendole, provocando la formazione di aneurismi e favorendo la formazione di trombi. Inoltre gli ateromi più estesi sono costituiti da materiale friabile, da cui si possono staccare emboli che entrano in circolo. Le arterie maggiormente e più precocemente interessate dalla malattia sono l'aorta, le coronarie ed i vasi cerebrali (63).

### ***Fattori implicati nell'aterogenesi***

Per spiegare lo sviluppo dell'aterosclerosi (64) sono stati analizzati diversi meccanismi che consistono in:

- lesione endoteliale
- proliferazione e modulazione fenotipica delle cellule muscolari lisce vascolari (CMLV), e loro migrazione dalla tonaca media alla tonaca intima
- alterato metabolismo lipidico, con infiltrazione ed accumulo di colesterolo nella parete arteriosa, e formazione di cellule schiumose (foam cells).

Da circa 20 anni si sono documentate numerose evidenze sperimentali e cliniche sul ruolo dell'endotelio nell'innescare del processo aterogenetico (65,66). La cellula endoteliale è localizzata a livello dell'interfaccia tra il torrente circolatorio e la parete vascolare. In questo modo essa può integrare stimoli di natura fisica e biochimica generando, in risposta ad essi, mediatori capaci di influire sulle cellule muscolari lisce adiacenti attraverso un efficace meccanismo paracrino.

Questi mediatori in base alla loro funzione vengono divisi in: EDRF (endothelium-derived relaxing factors) ed in EDCF (endothelium-derived constricting factors).

Gli EDRFs comprendono: l'ossido nitrico (NO), le prostaciline (PGI<sub>2</sub>), l'adrenomidullina (ADM), il peptide natriuretico atriale ed EDHF, non ancora ben identificato. Gli EDCFs invece comprendono: l'endotelina-1 (ET-1) ed il trombossano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>). Poiché gli EDRF hanno effetto natriuretico ed antiproliferativo, si ritiene che svolgano un ruolo antipertensivo ed antiaterogeno. Al contrario gli EDCFs, inducendo vasocostrizione e promuovendo l'adesione dei monociti e la crescita cellulare, si ritiene che svolgano un ruolo aterogeno. Nella genesi dell'aterosclerosi si verifica uno squilibrio tra fattori anti-aterogeni e fattori pro-aterogeni. La disfunzione endoteliale, intesa come sbilanciamento tra aumentata produzione di EDCFs e ridotta produzione o biodisponibilità di EDRFs, è stata associata alla maggior parte dei fattori di rischio cardiovascolare, tra cui naturalmente l'ipertensione arteriosa. La maggior parte degli studi svolti ha preso in considerazione gli effetti di NO e di ET-1. Per quanto riguarda l'NO sono stati condotti studi in vivo che hanno dimostrato come questo mediatore endoteliale svolga un ruolo fondamentale sia nel mantenimento di normali valori pressori che nel rimodellamento vascolare, esercitando un effetto antiproliferativo. Inoltre l'NO interagisce con l'ET-1 nel controllo dell'angiogenesi. L'ET-1 ha effetti opposti; questa molecola, infatti, è un potente vasocostrittore e di conseguenza causa rialzi pressori (64). L'ET-1 è inoltre in grado di promuovere la sintesi del DNA e la mitogenesi. Aumenta anche la secrezione di aldosterone che è implicato nella patogenesi della fibrosi extracellulare e della deposizione di collagene nell'apparato cardiovascolare. Nei pazienti con aterosclerosi i livelli di ET-1 sono aumentati e correlati con il numero di siti interessati dal processo aterosclerotico.

Al danno endoteliale contribuiscono anche le modificazioni indotte dallo stress parietale (shear stress) e l'instaurarsi di condizioni di flusso turbolento, tipiche dell'ipertensione. Lo shear stress indica quel tipo di sollecitazione che il vaso subisce in senso longitudinale (la parola inglese "*shear*" in questo caso significa che i diversi strati della parete arteriosa sono spostati longitudinalmente l'uno sull'altro). Studi in vitro hanno dimostrato che incrementi anche modici dello shear stress e della turbolenza del flusso ematico inducono un aumentato turnover delle cellule endoteliali con conseguente aumento dell'espressione di molecole di adesione, fattori di crescita e citochine. Lo shear stress svolge un ruolo ambivalente sulla sintesi dell'ET-1. Alti valori di shear stress (>5 dynes/cm<sup>2</sup>) inibiscono l'espressione di ET-1, aumentando la sintesi di NO (stimolando quella di cGMP e

riducendo la concentrazione di calcio intracellulare). Bassi livelli di shear stress ( $<2$  dynes/cm<sup>2</sup>) aumentano l'espressione di ET-1, svolgendo un ruolo opposto. La presenza di un flusso turbolento costituisce uno dei principali fattori responsabili di danno endoteliale. Una condizione di flusso turbolento si può verificare anche per una diminuita distensibilità dei vasi, come nell'ipertensione o nell'anziano, oppure quando un'arteria origina da un'altra con un angolo di biforcazione elevato, come nel caso delle arterie iliache. In quest'ultimo caso la turbolenza può insorgere anche ad una minore velocità dell'onda sfigmica ed è incrementata dalla pulsatilità del flusso. In presenza di ipertensione arteriosa con elevate resistenze periferiche l'onda riflessa amplifica ulteriormente lo stress radiale e longitudinale della parete arteriosa, innescando dei fenomeni di turbolenza che rappresentano il fattore emodinamico probabilmente più rilevante per l'aterosclerosi.

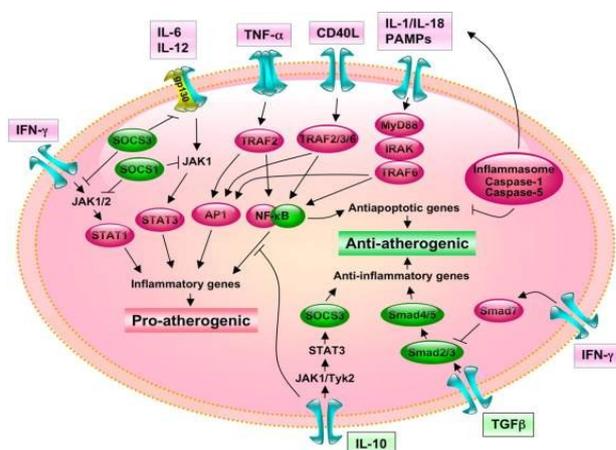
Un altro aspetto d'importanza fondamentale nell'aterogenesi è costituito dalle modificazioni fenotipiche che interessano le cellule muscolari lisce (CMLV) della tonaca media vasale in risposta a stimoli derivati sia dagli altri elementi cellulari della parete arteriosa (cellule endoteliali, linfociti T, piastrine e macrofagi), sia da alcune sostanze presenti nel torrente circolatorio (angiotensina, lipoproteine). È stato dimostrato che i miociti vanno incontro ad un processo di de-differenziazione, passando dal fenotipo differenziato adulto (che esprime la miosina muscolare liscia) a quello indifferenziato fetale (che esprime sia la miosina muscolare liscia che le isoforme A e B della miosina non muscolare). A questo processo di de-differenziazione si accompagna un'aumentata capacità delle CMLV immature di proliferare e migrare nell'intima. I meccanismi responsabili della replicazione delle CMLV e dei loro cambiamenti fenotipici non sono pienamente compresi, anche se sono state formulate diverse ipotesi:

- L'ipotesi della modulazione fenotipica prevede che in seguito ad uno stimolo esogeno (stress meccanico, fattori di crescita, citochine) il fenotipo "quiescente" contrattile della parete aortica muti le sue proprietà proliferative e strutturali acquistando le caratteristiche di un fenotipo "sintetico", che può attivamente replicarsi e metabolizzare le lipoproteine. L'ipotesi della persistenza nelle arterie dell'adulto di cellule immature di tipo "staminale", derivanti da un unico precursore indifferenziato prevede che in seguito ad uno stimolo esterno queste "CMLV staminali" siano attivate: proliferino e gradualmente si differenzino verso il fenotipo maturo di tipo "contrattile", a bassa capacità metabolica e replicativa. Tuttavia la presenza di cellule di tipo staminale nella parete dei vasi non è mai stata dimostrata in modo definitivo. Quindi nella parete arteriosa esistono specifiche

popolazioni di CMLV di tipo immaturo, che svolgono un ruolo fondamentale sia nella progressione delle lesioni aterosclerotiche che nella genesi della vasculopatia ipertensiva. Negli ipertesi i livelli di LDL ossidate sono correlati con l'entità dell'ispessimento intimale carotideo e femorale. Inoltre le LDL ossidate sono ritenute responsabili dell'attivazione di un fattore di trascrizione specifico (NFκB), che regola a sua volta l'espressione genica di molecole implicate nei fenomeni di adesione leucocitaria (VCAM), di rimodellamento della matrice extra-cellulare (metalloproteinasi), di chemiotassi dei granulociti e dei monociti (IL-8, monocyte chemoattractant protein), di sintesi di sostanze vasodilatatrici ed ossidanti (TNF alfa, fattore tissutale). È stato evidenziato che alcuni fattori di rischio aterogeno, quali lo stress della parete vascolare (shear stress) legato all'ipertensione, i prodotti della glicazione osservati nel diabete e gli idroperossidi lipidici che si formano in condizioni di ipercolesterolemia, sono in grado di stimolare le cellule endoteliali a produrre radicali dell'ossigeno altamente reattivi che favoriscono a livello subendoteliale l'ossidazione delle LDL(67). A loro volta sia le LDL ossidate che i monociti ed i macrofagi penetrati nello spazio subendoteliale costituiscono un ulteriore stimolo all'adesione monocitaria sulla superficie dell'endotelio.

Attualmente si ritiene che il processo aterogeno inizi a livello dell'endotelio(68). Un posto di rilievo fra i meccanismi dell'aterogenesi è stato attribuito anche all'infiammazione ed all'infezione.

I potenziali agenti patogeni la cui presenza sarebbe responsabile dell'aumento degli indici di flogosi, come la PCR, sarebbero la Chlamydia Pneumoniae, l'Helicobacter Piloni, il Citomegalovirus ed altri. I lipopolisaccaridi, le proteine termolabili e le citochine, come l'IL-1 e l'IL-6, sarebbero i mediatori della risposta infiammatoria con richiamo di cellule flogistiche e rapida progressione delle lesioni. Vedi Figura 2.



**Figura2.** Citochine e vie di regolazione nell'aterosclerosi.

*Physiol. Rev.* 86: 515-581,2006

## ***Patogenesi***

La patogenesi della malattia aterosclerotica si articola in diverse fasi. La prima alterazione è costituita dalla cosiddetta “stria lipidica” dovuta all’accumulo di lipoproteine nella tonaca intima delle arterie; le lipoproteine trasportano colesterolo e trigliceridi in associazione con proteine e fosfolipidi che rendono i lipidi solubili nel sangue. Queste possono accumularsi nella tonaca intima delle arterie, soprattutto quando la loro concentrazione aumenta nel sangue, tramite alterazioni della permeabilità della parete vasale e fissurazioni della tonaca intima. Nello spazio extracellulare tali lipoproteine, in particolare quelle legate ai proteoglicani, andrebbero incontro a modificazioni fondamentali nello sviluppo dell’ateroma: l’ossidazione e la glicazione non enzimatica.

L’ossidazione delle lipoproteine si verifica in quanto queste molecole sono sequestrate a livello dello spazio extracellulare dell’intima; non sono, perciò, più protette dagli agenti antiossidanti circolanti a livello plasmatico e quindi risultano più soggette agli insulti ossidativi; l’ossidazione può riguardare sia le porzioni proteiche che quelle lipidiche della molecola.

La glicazione non enzimatica è un meccanismo che si verifica in soggetti diabetici con valori persistentemente elevati di glicemia ed è stato dimostrato che questo tipo di modificazione strutturale delle apolipoproteine può alterare la funzionalità di questi componenti e indurre un’accelerazione dello sviluppo del processo aterosclerotico.

Il secondo passaggio della formazione della stria lipidica è rappresentato dal reclutamento dei leucociti. Normalmente le cellule endoteliali integre impediscono l’adesione dei leucociti. I fattori di rischio cardiovascolare agiscono determinando un danno endoteliale che si traduce in un aumento dell’espressione di molecole di adesione che permettono l’attacco dei leucociti sulla parete vasale.

Le molecole di adesione più coinvolte nel processo sono le ICAM-1, le VCAM-1 e la P-selectina (69,70), la cui espressione può essere stimolata da alcuni costituenti delle LDL ossidate. Dopo aver aderito alla superficie delle cellule endoteliali dell’arteria interagendo con recettori come le VCAM-1, i monociti e i linfociti T attraversano lo strato endoteliale e si insediano nella tonaca intima; la chemiotassi è stimolata dalle LDL ossidate e da un gradiente chemiotattico di citochine e interleuchine. Dopo aver raggiunto la tonaca intima i monociti si differenziano in macrofagi e successivamente si trasformano in cellule schiumose ricche di lipidi, fagocitando le lipoproteine ossidate. Nello stesso tempo i macrofagi producono citochine e fattori di crescita che amplificano il processo

infiammatorio; il mediatore fondamentale della trasformazione e della proliferazione dei macrofagi è M-CSF. I mediatori chiave nello sviluppo della stria lipidica, lesione iniziale dell'aterosclerosi, risultano quindi essere VCAM-1, MCP-1 e M-CSF (Figura2).

Studi recenti hanno dimostrato che la stria lipidica si inizia a formare durante l'età giovanile, anche se le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi e le sue complicanze si verificano durante l'età adulta-anziana. Non tutte le strie lipidiche progrediscono ad ateroma. Mentre l'accumulo di macrofagi infarciti di lipidi è l'elemento caratteristico della stria lipidica, l'accumulo di tessuto fibrotico contraddistingue la lesione aterosclerotica più avanzata. Le cellule muscolari lisce costituiscono la maggior parte della lesione aterosclerotica complessa, andando a sostituire parte delle cellule schiumose derivanti dai macrofagi. Nella fase di progressione dell'aterosclerosi l'infiammazione ha un ruolo molto importante: diverse sono le molecole infiammatorie coinvolte nello stimolare la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla media all'intima, la loro proliferazione e la loro trasformazione in cellule schiumose. Nelle strie lipidiche avanzate si possono evidenziare rotture microscopiche dell'endotelio su cui si possono formare microtrombi ricchi di piastrine. Le piastrine attivate rilasciano numerosi fattori che possono promuovere la risposta fibrotica. Man mano che la lesione avanza si sviluppano in abbondanza plessi di microvasi in connessione con i vasa vasorum dell'arteria: questo può contribuire alle complicanze della lesione. I vasi di questo circolo forniscono un'ampia superficie per il passaggio dei leucociti e possono fungere da porta attraverso cui i globuli bianchi entrano ed escono dall'ateroma avanzato; da questi microvasi possono anche originare le emorragie all'interno delle placche e il sanguinamento provoca trombosi in situ e attivazione della protrombina in trombina. L'emorragia all'interno della placca stimola la proliferazione delle cellule muscolari lisce accelerando l'evoluzione e l'ingrandimento dell'ateroma.

Nelle placche aterosclerotiche avanzate si riscontra anche frequentemente un accumulo di calcio; le proteine specializzate nel legare il calcio solitamente presenti nel tessuto osseo si ritrovano anche nell'ateroma. Durante l'espansione della lesione intimale alcune cellule muoiono, verosimilmente per apoptosi. La morte dei fagociti mononucleati porta alla formazione di un nucleo necrotico (core) ricco di lipidi all'interno della lesione, aspetto caratteristico di placche più complesse. La lamina fibromuscolare, costituita dalla matrice extracellulare sintetizzata dalle cellule muscolari lisce nella tonaca intima, riveste il core ricco di lipidi e di macrofagi. In questo modo si è formata la placca aterosclerotica. Le placche aterosclerotiche sono quindi costituite da tre componenti principali:

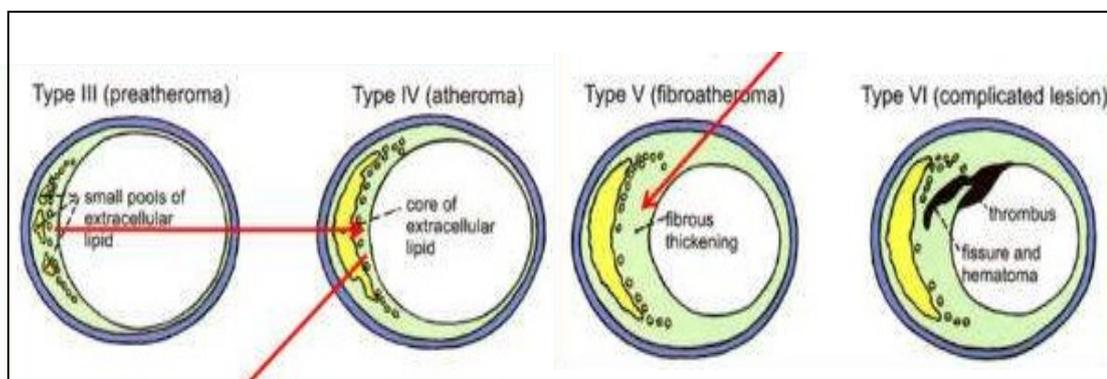
- 1) cellulare: cellule muscolari lisce, macrofagi e altri leucociti,
- 2) tessuto connettivo della matrice extracellulare: formato da collagene, fibre elastiche e proteoglicani,
- 3) depositi lipidici intra ed extracellulari.

In particolare il cappuccio fibroso di una placca è formato da cellule muscolari lisce, da scarsi leucociti e da tessuto connettivo relativamente denso; l'area cellulata situata sotto e a fianco del cappuccio fibroso (la cosiddetta spalla) è costituita da macrofagi, cellule muscolari lisce e linfociti T; nel nucleo necrotico più profondo si reperta una massa disorganizzata di materiale lipidico, costituita da colesterolo, detriti cellulari, cellule schiumose, fibrina e trombi in vario stadio di organizzazione (64).

Le lesioni aterosclerotiche, secondo l'American Heart Association (72), possono essere classificate dal punto di vista istologico in sei gruppi:

- tipo I: lesione iniziale con isolati macrofagi schiumosi;
- tipo II: stria lipidica caratterizzata da accumulo di lipidi soprattutto intracellulari;
- tipo III: lesione intermedia simile al tipo II ma con presenza di lipidi extracellulari;
- tipo IV: ateroma caratterizzato da una lesione di tipo II con un nucleo di lipidi extracellulari;
- tipo V: fibroateroma con nucleo di lipidi e strato fibrotico o vari nuclei e strati fibrosi, o più calcifici o più fibrosi;
- tipo VI: lesione complicata con danni di superficie, ematomi-emorragie, trombi.

I tipi I e II si ritrovano anche in soggetti nella prima e nella seconda decade di vita, i tipi III e IV compaiono a partire dalla terza decade e i tipi V e VI sono presenti solo dopo la quarta decade. La malattia aterosclerotica rappresenta quindi un processo che si sviluppa lentamente nel corso degli anni.



**Figura 3.** American Heart Association classification.

## ***FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE***

### ***Fattori di rischio non modificabili***

- ***Età***

In anni recenti è divenuto evidente come l'aterosclerosi non rappresenti una malattia paradigmatica dell'età avanzata, in quanto essa esordisce precocemente nel corso della vita, presumibilmente già durante l'infanzia. In due studi autoptici, il PDAY study (72) e il Bogalusa Heart Study (73), condotti su soggetti tra i 2 e i 39 anni, è stata dimostrata un'alta incidenza di lesioni aterosclerotiche già in giovane età ed è stata dimostrata la loro correlazione con la presenza di fattori di rischio cardiovascolare per la malattia aterosclerotica. Sia le strie lipidiche che le placche erano molto più frequenti nelle coronarie di soggetti con numerosi fattori di rischio quali ipertensione, dislipidemia, diabete mellito, obesità e fumo di sigaretta. Sicuramente le complicanze cliniche dell'aterosclerosi sono più frequenti in soggetti di età adulta-anziana, essendo l'incidenza delle patologie cardiovascolari direttamente correlata con l'età. In particolare, se si considera l'incidenza di ictus, si nota che questa raddoppia ogni 10 anni a partire dall'età di 55 anni. Diverse ipotesi sono state proposte per spiegare tale relazione. In primo luogo l'invecchiamento è "sinonimo di malattia"; sebbene molte persone raggiungano un'età avanzata senza evidenza clinica di alterazioni cardiovascolari; l'invecchiamento comporta infatti inevitabilmente l'esposizione per un tempo prolungato all'azione lesiva dei fattori di rischio e quindi a un'aumentata probabilità di sviluppo delle complicanze cardiovascolari. Una teoria più recente è quella secondo la quale la struttura e la funzione del sistema cardiovascolare si modificano nel tempo a causa di un processo di invecchiamento in grado di alterare il substrato sul quale vanno ad agire i fattori di rischio. Le reali interazioni tra questi fenomeni sono probabilmente molto complesse e coinvolgono, oltre all'invecchiamento e a molteplici fattori di rischio, anche tratti genetici non ancora ben individuati. Nei soggetti anziani le arterie sono allungate e tortuose e caratterizzate da un aumento del diametro e da un ispessimento della parete che coinvolge soprattutto l'intima e la media.

Numerose sostanze coinvolte nei processi infiammatori e aterosclerotici come molecole di adesione, metalloproteasi della matrice, TGF beta e altre citochine pro infiammatorie, sono aumentate nell'intima delle arterie di soggetti anziani dando così inizio alla catena degli eventi che porta allo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche.

## ▪ *Sesso*

E' nota la diversa distribuzione delle complicanze cardiovascolari, come la cardiopatia ischemica e l'ictus, tra il sesso maschile e il sesso femminile (1,2). Per quanto riguarda l'ictus, l'infarto cerebrale e l'emorragia intraparenchimale sono più frequenti nel sesso maschile, mentre l'emorragia subaracnoidea è più frequente nel sesso femminile. Anche se l'incidenza di ictus ischemico è maggiore nel sesso maschile, poiché tuttavia la sopravvivenza è maggiore nelle donne, la mortalità per anno per eventi cerebrovascolari è superiore nel sesso femminile (74). La cardiopatia ischemica è un "killer" con uguale potenzialità negli uomini e nelle donne per l'intera durata della vita. La percentuale globale di decessi per coronaropatia è lievemente più elevata nelle donne che negli uomini e questo potrebbe essere attribuito ancora una volta alla maggiore longevità del sesso femminile. Al contrario un minore tasso di mortalità per eventi cardiovascolari si osserva tra le donne giovani in premenopausa. Già nello studio Framingham (8) si era infatti reso evidente che l'aumento delle patologie cardiovascolari con l'aumentare dell'età si verificava con lo stesso andamento negli uomini e nelle donne con un ritardo però di circa 10 anni per il sesso femminile. Il ritardo nell'esordio della CVD nelle donne è attribuito all'esposizione nel periodo precedente la menopausa all'azione protettiva degli estrogeni ovarici endogeni. Gli estrogeni esercitano un'azione protettiva sulla parete arteriosa riducendo la penetrazione e il deposito delle LDL nella parete vasale e determinando una minore risposta infiammatoria attraverso un diminuito rilascio di citochine e una ridotta produzione di molecole proinfiammatorie nell'endotelio, nella tonaca intima e media della parete arteriosa. Alcuni di questi effetti possono essere correlati all'azione antiossidante degli estrogeni: un effetto non recettore mediato che si ritiene inibisca l'aterogenesi. Inoltre l'azione degli estrogeni può essere mediata dagli effetti per via genomica o non genomica sui recettori degli estrogeni stessi, sui macrofagi e sulle cellule endoteliali. Un effetto immediato degli estrogeni, tramite l'interazione con i recettori, è quello di aumentare l'attività della NO sintetasi endoteliale, cioè la produzione di ossido nitrico e la vasodilatazione; inoltre gli estrogeni si associano a una minore concentrazione di endotelina e questo amplifica il loro effetto vasodilatante (75).

Tuttavia è stato dimostrato che nelle aree di aterosclerosi i recettori degli estrogeni sono diminuiti o assenti e tale elemento può spiegare il riscontro in recenti studi clinici della mancanza di un beneficio vascolare da parte del trattamento ormonale sostitutivo in menopausa. Oltre agli effetti diretti sulla parete vasale, gli estrogeni hanno un effetto

indiretto protettivo tramite la regolazione del metabolismo glucidico e lipidico. Questo effetto viene meno con la riduzione dei livelli di estrogeni circolanti in post menopausa e questo si associa a un incremento dei casi di sindrome metabolica nel sesso femminile in menopausa e a un conseguente aumento del rischio cardiovascolare (72).

- ***Familiarità***

La familiarità è oggi riconosciuta come uno dei fattori di rischio più importanti per sindromi coronariche acute e per ictus. Sono stati evidenziati alcuni polimorfismi, che sembrano mediare una maggiore predisposizione allo sviluppo di patologie cardiovascolari. Tra questi, i più rilevanti sono quelli del sistema renina-angiotensina che riguardano i geni dell'angiotensinogeno, dell'ACE (enzima convertitore dell'angiotensina) e del recettore dell'angiotensina II. E' stato attribuito un ruolo al polimorfismo inserzione/delezione (I/D) dell'ACE come fattore di rischio per l'ictus, essendo stata riscontrata un'associazione significativa del genotipo DD con l'ictus. Meno certo è invece il legame tra genotipo DD e cardiopatia ischemica. La predisposizione alla formazione della placca sembra anche dipendere dall'intervento di mutazioni dei geni che regolano i processi di emostasi, tra cui, per esempio, il fibrinogeno, il fattore V di Leiden, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno PAI-I, il polimorfismo P1A della glicoproteina IIb-IIIa, il polimorfismo del gene della protrombina ed altri ancora(76-84). Non va inoltre dimenticato che lo sviluppo di lesioni vascolari è fortemente influenzato da alterazioni del metabolismo lipidico di cui sono note le basi genetiche e molecolari

### **Fattori di rischio modificabili**

#### **▪ *Ipertensione arteriosa***

L'ipertensione arteriosa rappresenta uno dei più importanti fattori di rischio cardiovascolare (1,2) ed è coinvolta nel determinare l'insorgenza e la progressione delle lesioni aterosclerotiche. Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'ipertensione è un fattore che contribuisce in modo rilevante a tutte le maggiori patologie cardiovascolari, come cardiopatia ischemica, ictus, arteriopatia periferica, scompenso cardiaco e nefropatia ipertensiva, determinando un rischio risultante di patologie cardiovascolari di 2-3 volte maggiore rispetto a una popolazione di normotesi (84-87). Attualmente si sa che, partendo da un valore di pressione sistolica di 115 mmHg, il rischio cardiovascolare aumenta in modo continuo e lineare e raddoppia per ogni incremento di 20 mmHg(85). Questo implica che, anche all'interno dell'area di normalità della pressione, il rischio cardiovascolare aumenta con l'aumentare della pressione e questa relazione è correlata alla presenza di altri grandi fattori di rischio e di segni di danno d'organo(86); infatti l'ipertensione arteriosa di solito si associa con altri fattori di rischio modificabili ed è isolata solo in meno del 20% dei casi. Fattori di rischio aggiuntivi e segni di danno d'organo che frequentemente accompagnano l'ipertensione includono: l'intolleranza glucidica, l'obesità, la dislipidemia, l'ipertrofia ventricolare sinistra, la microalbuminuria e l'ispessimento miointimale carotideo. Di conseguenza, la scelta in merito alla terapia del paziente iperteso non dovrebbe basarsi unicamente sui valori pressori, ma anche sulla correzione dei fattori di rischio associati od eventuali danni d'organo già sviluppati. Da questo si può dedurre l'importanza di eseguire, tra gli esami di routine nella gestione di un paziente iperteso, l'ecocardiogramma per la diagnosi di ipertrofia ventricolare sinistra e l'ecocolordoppler dei tronchi sovraaortici per evidenziare ispessimenti miointimali e placche aterosclerotiche(87). E' stato dimostrato che la registrazione dei valori pressori nelle 24 ore si correla maggiormente con il danno d'organo subclinico rispetto a registrazioni isolate e casuali della pressione e in particolare si è visto che la variabilità pressoria elevata si associa fortemente allo sviluppo di danno d'organo nei soggetti ipertesi (67,88). Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare in che modo l'ipertensione agisca nella genesi e nella progressione del processo aterosclerotico:

1) alterazioni della funzione endoteliale con aumento dell'espressione delle molecole di adesione leucocitaria e incremento della produzione di citochine proinfiammatorie e di radicali liberi;

- 2) aumento della cellularità nell'ateroma con maggior numero di linfociti, macrofagi, cellule muscolari lisce
- 3) ipertrofia della media per aumento della sintesi del collagene.

#### ▪ ***Ipercolesterolemia***

La prima ipotesi di relazione tra colesterolo e aterosclerosi è nata quando si è scoperto che il colesterolo è uno dei principali componenti delle placche aterosclerotiche. L'associazione tra aumento della colesterolemia e aterosclerosi è stata osservata per la prima volta negli anni trenta. I grandi studi epidemiologici successivi, come il Seven Country Study(89) e lo studio Framingham (8), hanno confermato la stretta relazione tra colesterolemia e malattia coronarica. Nello studio Framingham si è visto che ogni incremento dell'1% del colesterolo totale plasmatico si associava ad un'umentata incidenza di CHD del 2-3%; nel Seven Country Study un incremento del colesterolo totale di 20 mg/dl corrispondeva a un aumento del rischio di mortalità cardiovascolare del 12%.

Nel Multiple Risk Factor Intervention Trial (90) 356.000 uomini senza storia di infarto miocardico sono stati valutati e seguiti per 6 anni in relazione alla comparsa di una coronaropatia. Si è osservato che l'associazione tra i livelli di colesterolo e la successiva malattia coronarica era continua, progressiva e significativa. Lo studio PROCAM (10) ha dimostrato una relazione lineare tra l'incidenza di eventi coronarici e i terzili di colesterolo LDL. Il Lipid Research Clinics Prevalence Study (91) ha mostrato, con un follow up durato 10 anni, che la colesterolemia basale si associava fortemente alla morte per malattia coronarica indipendentemente dalla presenza di malattia all'inizio dello studio. Nel Bogalusa Heart Study (73) le strie lipidiche aortiche nei giovani erano fortemente associate alla colesterolemia. Questi e molti altri studi epidemiologici hanno contribuito a formare la base della cosiddetta "ipotesi del colesterolo" secondo la quale la relazione tra colesterolemia e l'aterosclerosi è causale e la riduzione dei livelli di colesterolo riduce la frequenza di malattia aterosclerotica. La distinzione del colesterolo sierico in colesterolo contenuto in lipoproteine specifiche ad alta e bassa densità, note rispettivamente come HDL e LDL, è stata uno dei principali progressi a livello clinico. Si è osservato, infatti, che il rischio di malattia coronarica è strettamente correlato ai livelli di colesterolo LDL, mentre è inversamente correlato con i livelli di HDL, come si è dimostrato per la prima volta negli anni Cinquanta e riproposto negli anni Settanta. La fondatezza dell'ipotesi del colesterolo trova indiretta conferma dalla dimostrazione che la riduzione della colesterolemia migliora

le lesioni aterosclerotiche e riduce l'incidenza di nuovi eventi cardiovascolari(68), sia in prevenzione primaria che in prevenzione secondaria.

#### ▪ *Ipertriglicidemia*

Il ruolo dei trigliceridi nella malattia aterosclerotica rimane ancora non ben definito. I trigliceridi tendono a variare in modo inversamente proporzionale ai livelli di HDL, perciò la dimostrazione di un effetto inequivocabile sugli eventi cardiovascolari e sulla mortalità indipendente dai livelli di HDL è molto difficile.

Inoltre i livelli dei trigliceridi nel sangue dipendono esclusivamente dalla dieta e, dato che i prelievi vengono effettuati a digiuno, il reale valore della trigliceridemia e il suo ruolo nella progressione dell'aterosclerosi potrebbero risultare sottostimati. Tuttavia nello studio PROCAM è stata dimostrata un'associazione significativa tra livelli sierici di trigliceridi e incidenza di eventi coronarici maggiori; Hokanson e Austin (92) hanno quantificato l'associazione tra trigliceridi e malattie cardiovascolari nella popolazione generale e hanno determinato che questa relazione è indipendente dai livelli di HDL. Una metaanalisi di 17 studi prospettici ha dimostrato che l'ipertriglicidemia è un fattore di rischio indipendente per patologie cardiovascolari. Le linee guida ATP III (8) non includono il livello di trigliceridi come fattore di rischio indipendente, definiscono tuttavia il livello soglia al di sotto del quale andrebbe mantenuta la trigliceridemia (< di 150 mg/dl). L'atteggiamento attuale è quindi quello di includere il dosaggio della trigliceridemia nella valutazione del rischio cardiovascolare.

#### ▪ *Diabete mellito*

Il diabete mellito è uno dei principali fattori di rischio di mortalità e di morbilità cardiovascolare. Questa patologia aumenta il rischio di malattia coronarica, cerebrovascolare e di arteriopatia periferica. L'effetto del diabete sull'aterosclerosi è così pronunciato che il beneficio legato al sesso femminile è annullato nelle donne diabetiche per le quali si stima una percentuale di eventi cardiovascolari simili a quella degli uomini con diabete. Il diabete si associa a un rischio di sviluppo di malattia coronarica 2-4 volte maggiore; inoltre i pazienti diabetici con angina instabile hanno maggiori probabilità di sviluppare un infarto del miocardio e coloro che hanno avuto un infarto del miocardio presentano un rischio di morte maggiore rispetto ai pazienti non diabetici. Allo stesso modo il diabete aumenta il rischio di ictus e la mortalità ictus correlata, raddoppia la frequenza di recidiva di ictus e triplica la frequenza di demenza ictus correlata (93).

Il diabete aumenta inoltre di 2-4 volte l'incidenza e la severità dell'ischemia arteriosa periferica. L'importanza del diabete mellito nella definizione del rischio cardiovascolare è suggerita dalle ultime linee guida ESH/ESC 2007 sull'ipertensione arteriosa in cui l'associazione del solo diabete a ipertensione di grado lieve è sufficiente perché il rischio di sviluppare accidenti cerebro e cardiovascolari a 10 anni sia definito elevato. La stretta associazione tra diabete e rischio di accidenti cerebro e cardiovascolari trova la sua spiegazione nell'accelerata aterosclerosi che caratterizza la malattia diabetica. Il diabete, infatti, è in grado di determinare anomalie nella funzione delle cellule endoteliali, delle cellule muscolari lisce e delle piastrine. In condizioni normali le cellule endoteliali producono sostanze essenziali per il mantenimento dell'omeostasi vascolare, in grado di assicurare un adeguato flusso ematico e di prevenire la trombosi e l'adesione leucocitaria (94). Tra queste molecole un ruolo fondamentale è svolto dall'ossido nitrico. L'iperglicemia induce una serie di eventi cellulari che portano alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno, come l'anione superossido (95). Questi inattivano l'ossido nitrico formando perossinitrito che ossida un cofattore della NO sintetasi, disaccoppiando l'enzima e facendo sì che venga incrementata la produzione di anione superossido a discapito della sintesi di NO (66).

I livelli circolanti di acidi grassi liberi sono elevati nel diabete a causa della loro eccessiva liberazione dal tessuto adiposo e della loro diminuita captazione dal muscolo scheletrico. Gli acidi grassi liberi causano disfunzione endoteliale, aumentando la produzione di radicali liberi dell'ossigeno e aumentando la dislipidemia. Il profilo lipidico caratteristico dei soggetti diabetici consiste infatti in livelli elevati di trigliceridi, bassi di HDL e normali di LDL poichè il fegato risponde a un eccesso di acidi grassi liberi aumentando la produzione di VLDL e la sintesi dei trigliceridi. L'ipertrigliceridemia, che si osserva frequentemente in soggetti diabetici, determina una diminuzione delle HDL promuovendo il trasporto del colesterolo dalle HDL alle VLDL; inoltre aumenta il numero di LDL piccole e dense, appartenenti alla sottoclasse aterogena, anche se i livelli totali di LDL, in soggetti diabetici ben controllati, risultano quasi normali. Le LDL di questo tipo sono maggiormente suscettibili a modificazioni ossidative, inclini a indurre disfunzioni endoteliali e a penetrare nella parete arteriosa. Nei soggetti non diabetici l'insulina stimola l'attività della NO sintetasi aumentando, quindi, la produzione endoteliale di NO e la vasodilatazione. Nei soggetti con diabete mellito tipo 2 si osserva invece un'insulino-resistenza con conseguente riduzione della vasodilatazione endoteliale dipendente dalla sintesi di NO. L'impatto del

diabete sulla funzionalità vascolare non è limitato all'endotelio, ma coinvolge anche le cellule muscolari lisce. I sistemi coagulativo e fibrinolitico rivestono particolare importanza nell'aterosclerosi, in quanto sono alla base della trombosi successive alla rottura della placca. Nei soggetti diabetici si osserva un aumento dell'aggregabilità piastrinica che sembra determinata, sia dall'aumentata sintesi di radicali liberi, sia dall'alterata omeostasi del calcio a livello piastrinico che potrebbe essere legata all'iperglicemia (96). Il diabete provoca, inoltre, una tendenza all'ipercoagulabilità agendo sui fattori della coagulazione e riduce la fibrinolisi endogena aumentando, tramite l'iperinsulinemia e l'insulina resistenza, l'attività dell'inibitore del plasminogeno tissutale. Tutto questo sembra essere importante per determinare la trombosi conseguente alla rottura della placca.

#### ▪ *Tabagismo*

Il tabagismo è considerato un classico fattore di rischio cardiovascolare a cui è stata riconosciuta una partecipazione attiva alla genesi e alla progressione della patologia aterosclerotica. E' stata stimata una prevalenza del 17-30% del fumo di sigaretta nei decessi da malattia cardiovascolare e la riprova di un suo coinvolgimento nel rischio cardiovascolare deriva dall'evidenza che dopo un anno dalla sospensione del fumo il rischio di CVD si riduce del 50% e si avvicina a quello di una persona non fumatrice, dopo 3-4 anni dalla sospensione. Il fumo contribuisce all'aumento del rischio di eventi cardiovascolari attraverso diversi meccanismi tra cui l'azione proaterogena che facilita la produzione di trombi coronarici, l'induzione di spasmo delle coronarie, l'azione proaritmica e la riduzione della capacità del sangue di trasportare ossigeno. Un'analisi dello studio Framingham, della durata di 30 anni, ha dimostrato che il rischio relativo di malattia cardiovascolare era almeno 3 volte maggiore nei maschi fumatori rispetto ai non fumatori (96). Demsey, Moore et al. (97) hanno dimostrato che il numero di sigarette fumate si associa a un'accelerazione dello sviluppo dell'aterosclerosi carotidea, indipendentemente dall'età, dalla storia di diabete e di ipertensione. Il fumo di sigaretta da solo favorisce l'ispessimento della parete carotidea e tale effetto sembra essere correlato con il numero di sigarette fumate.

E' però evidente che, sebbene i fattori di rischio abbiano un ruolo fondamentale e dimostrato nel promuovere l'aterosclerosi e nell'accelerarne il processo, essi non bastano a spiegare il manifestarsi di morbilità e mortalità da eventi cardiovascolari né l'aggregarsi di

varie condizioni patologiche negativamente sinergiche sul sistema cardiovascolare, nello stesso individuo. Infine la letteratura degli ultimi dieci anni ha proposto con sempre maggior intensità il ruolo delle alterazioni della funzione vascolare nel predire da un lato e nell'accelerare dall'altro la progressione dell'aterosclerosi e degli eventi morbosi cardiovascolari, suggerendo che una sua alterazione possa essere considerata come segno di iniziale malattia di parete (98).

Ciò rende ragione del grande interesse nel comprendere i meccanismi e le funzioni delle grandi arterie nel distribuire e condurre il sangue in periferia (99) (e dell'affinamento di metodiche atte a misurare tali capacità) (100-102).

## **RIGIDITA' VASCOLARE**

### **Meccanismi fisiopatologici**

#### ***Alterazioni strutturali e cellulari***

Fisiologicamente, la stiffness delle grandi arterie dipende da tre fattori principali: gli elementi strutturali all'interno della parete arteriosa, come collagene ed elastina, tono della muscolatura liscia vascolare e componenti cellulari.

La rigidità vascolare si sviluppa a partire da complesse interazioni tra cambiamenti stabili e dinamici, coinvolgendo elementi strutturali e cellulari della parete vasale (103). La stiffness non è uniformemente distribuita nell'albero vascolare, ma è piuttosto più spesso concentrata nei vasi di conduttanza centrali, risparmiando le arteriole più periferiche (104).

L'aorta è l'arteria elastica di conduttanza principale dell'organismo umano. Il suo diametro è di circa 35mm all'arco, per diventare mediamente di 15-20mm a livello addominale. La sua parete è costituita da fibre elastiche e fibre muscolari: le prime sono maggiormente concentrate nel tratto toracico, le seconde a livello addominale. Le componenti strutturali, quali endotelio, muscolo liscio e connettivo, sono disposte in tonache concentriche: intima, media e avventizia.

Come in tutte le arterie elastiche, l'intima consiste di un singolo strato di cellule endoteliali rivolte verso il lume del vaso; tra l'intima e la media si frappone la lamina elastica interna, composta da un foglietto fenestrato di fibre elastiche, con interposte cellule muscolari lisce e vari componenti della matrice connettivale extracellulare. La matrice extracellulare della parete arteriosa è formata da collagene, elastina, glicoproteine e proteoglicani; le prime due, che conferiscono integrità e elasticità strutturale alla matrice, sono regolate da metalloproteinasi, endopeptidasi zinco-dipendenti che, in condizioni di alterato equilibrio, attraverso proprietà collagenolitiche ed elastinolitiche, le alterano, creando un collagene meno efficace e molecole di elastina frammentate e poco resistenti.

La media rappresenta la base principale delle proprietà meccaniche di tutte le arterie elastiche periferiche. E' composta da un certo numero di strati di lamelle elastiche. La zona interlamellare consiste di cellule muscolari lisce e connettivo, formato principalmente da mucopolisaccaridi. Le cellule muscolari lisce rappresentano una popolazione alquanto eterogenea, includendo fenotipi contrattili, proliferativi, sintetici o apoptotici. La quantità relativa di ciascun fenotipo dipende dall'età, dalla localizzazione nell'albero vascolare e dalle condizioni patologiche eventualmente presenti, come appunto potrebbe essere un lieve stato infiammatorio cronico.

Il terzo livello è costituito dall'avventizia, abbondante soprattutto nelle arterie più centrali, e consiste principalmente di collagene e fibroblasti. La quantità di collagene viene determinata nelle fasi precoci dello sviluppo. Esso ha un turnover molto lento, ma è soggetto a modificazioni chimiche, come la rottura di legami crociati o la glicazione che esercitano un'influenza profonda sulle proprietà meccaniche di queste arterie.

Le componenti strutturali della parete vascolare sono il determinante principale della compliance arteriosa, costituite da collagene ed elastina. Il contenuto relativo di queste molecole è normalmente reso stabile da un lento, ma dinamico processo di produzione e degradazione che, se viene alterato, porta all'irrigidimento vascolare. La perdita di questo equilibrio, che conduce all'iperproduzione di collagene anomalo e a diminuite quantità di elastina, è influenzato da forze emodinamiche, come la pressione endoluminale, ma anche da fattori "estrinseci", come ormoni, natriemia, glicemia e stimoli infiammatori.

L'elastina è una proteina con un'emivita misurabile in decenni; la rottura delle sue fibre porta all'irrigidimento e alla dilatazione dell'aorta con l'invecchiamento, proprio perché la sua funzione principale è quella di sopportare e attenuare gli stress e gli stiramenti dei vasi elastici centrali.

L'intima dei vasi rigidi si presenta istologicamente costituita da cellule endoteliali disposte in modo disordinato, eccesso di collagene, molecole di elastina interrotte, infiltrati di cellule muscolari lisce, macrofagi e cellule mononucleate, metalloproteinasi della matrice, TGFβ, molecole di adesione intracellulare e citochine.

Per quanto riguarda le componenti cellulari l'arterial stiffness viene determinata non solo da alterazioni strutturali, ma anche dai segnali delle cellule endoteliali e dal tono delle cellule muscolari lisce, influenzate dall'attività del sistema nervoso autonomo, ormoni, sostanze vasoattive prodotte localmente e farmaci.

Lo stress di parete e sostanze, come l'angiotensina II, endoteline, plasmina, trombina, radicali liberi, rappresentano uno stimolo lesivo, al quale l'endotelio risponde liberando citochine, diminuendo l'NO, stimolando l'ipertrofia e il tono delle cellule muscolari lisce e i processi di fibrosi. Le cellule vascolari, infatti, così come i macrofagi e polimorfonucleati, producono collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13) ed elastasi (MMP-7 e serino-proteasi)(105-109) che vanno ad alterare il pattern connettivale e a rimodellare le componenti della matrice, aumentando la quota di condroitin solfato, eparan solfato, proteoglicani e fibronectina.

### ***Fattori meccanici ed alterazioni vascolari***

Il rimodellamento vascolare indotto da fattori meccanici è un punto fondamentale per la crescita e l'adattamento dei vasi. Ci sono importanti evidenze che l'ipertensione sia associata con l'incremento della rigidità arteriosa(104), soprattutto a causa dell'ipertrofia delle cellule muscolari lisce, accompagnata dal poliploidismo, dall'iperplasia e dai cambiamenti proporzionali nella matrice contrattile e proteica, nell'alterazione della funzione arteriosa.

Una caratteristica chiave delle arterie ipertensive è l'incremento della stiffness vascolare, che determina un aumento della Pulse Wave Velocity, che è un predittore indipendente del rischio cardiovascolare (104,105). L'accumulo di collagene contribuisce probabilmente a questo fenotipo, come l'incremento di collagene di tipo I, III e IV che è stato quantificato nei pazienti ipertesi<sup>49</sup> così come nei modelli animali con ipertensione (106). Si è poi trovato che la sintesi di collagene è correlata con l'ipertrofia vascolare e con il carico pressorio nei soggetti ipertesi. Tuttavia in uomini giovani con lieve o moderata ipertensione, l'incremento della deposizione del collagene è associata a una riduzione dell'arterial stiffness.

Questo si pensava riflettesse un reclutamento di fibre collagene pressione dipendente o cambiamenti nella matrice extracellulare di ancoraggio come progressione dell'ipertensione. Ma è stato dimostrato che un'elevata pressione intraluminare induce la produzione di metallo proteinasi (MMP-9) nell'arteria carotide contribuendo all'aumento della distensibilità arteriosa, come punto di ancoraggio per gli enzimi che degradano la matrice nei primi stadi del rimodellamento vascolare ipertensivo(107). In un altro studio MMP-2, MMP-9, inibitori tissutali delle metallo-proteinasi (TIMP-2) e l'attività dell'elastasi sierica sono stati misurati in pazienti con ipertensione sistolica isolata. Il livello delle MMP-9 è correlato con la PWV aortica e brachiale e anche nei soggetti sani l'attività dell'elastasi sierica e delle MMP-9 sono correlate indipendentemente con la PWV(108). L'attivazione delle MMP e la maggiore distensibilità potrebbe essere caratterizzata da un rimodellamento precoce dell'ipertensione, consentendo ai vasi di espandersi per impostare una nuova pressione. La concomitante sintesi di proteine della matrice extracellulare potrebbe contribuire a un più tardivo irrigidimento della parete vascolare. NF-KB regola e aumenta la trascrizione di numerose MMPs che comprendono MMP-1, MMP-2, MMP-9(108). Dall'altra parte, la proliferazione delle cellule del muscolo liscio richiede ERK1/2 (109). È interessante notare come nell'ipertensione le pareti vascolari si rimodellano per adattarsi ad

un ambiente con un elevato stress di parete. Le cellule muscolari lisce sono sottoposte a ipertrofia/ipertrofia e alla sintesi di matrice proteica extracellulare per incrementare lo spessore di parete e per normalizzare lo stress. NF-KB e le MAP Kinasi giocano probabilmente un ruolo centrale in questo processo.

I vasi arteriosi hanno meccanismi di regolazione autocrina e paracrina che consentono una reazione immediata a modificazioni emodinamiche, come le forze tangenziali meccaniche (che aumentano con la pressione) o lo shear stress (che si incrementa con la gittata sistolica). Il tono vascolare è modificato quasi immediatamente per compensare i cambiamenti dell'ambiente e in molti casi questa efficienza ripristina le forze meccaniche a un normale livello.

Eccezionalmente la variazione del tono vasomotore non è sufficiente a compensare i nuovi vincoli meccanici e il fenotipo delle cellule vascolari si altera, causando modificazioni locali del trofismo. Nel lungo periodo questi cambiamenti adattativi tendono a far ritornare le forze meccaniche ai loro fisiologici valori. Il rimodellamento vascolare è osservato in diverse situazioni dove la pressione locale e il flusso sono modificati, come nell'ipertensione arteriosa, aterosclerosi, fistole arterovenose, stenosi e aneurismi.

Molti recettori presenti sulle superficie delle cellule endoteliali e sulle cellule muscolari lisce consentono ai vasi di individuare lievi cambiamenti nel loro ambiente(109,110). Da questo punto di vista diverse cascate di attivazione di segnali intracellulari possono essere iniziate secondo la natura del meccanismo di stimolo. All'interno delle cellule vascolari le proteine del citoscheletro trasmettono e modulano la tensione tra i siti di adesione focale, le integrine e la matrice extracellulare. Oltre alle modificazioni strutturali indotte dalle forze meccaniche si assiste al cambiamento della composizione ionica delle cellule mediante i canali ionici, stimolati da vari recettori di membrana che inducono la risposta del complesso biochimico. Molti pathways intracellulari, come la cascata delle MAP-kinasi e NF-KB, sono attivati dal flusso da cui ha inizio la via della fosforilazione, dell'attivazione dei fattori di trascrizione e dell'espressione genica.

### ***Arterial Stiffness, ipertensione arteriosa e diabete mellito***

Anche se l'incidenza dell'ipertensione colpisce circa il 90% delle persone di età superiore ai 70 anni, l'eziologia dell'ipertensione resta sfuggente per la stragrande maggioranza dei casi. Le complicanze dell'ipertensione protratta sono ben note e si riferiscono ad un'arteriopatia con manifestazioni cliniche al cuore, all'encefalo e ai reni. Tuttavia, il paradigma dell'elevata pressione del sangue con conseguente vasculopatia continua ad essere oggetto di discussione (105). Sembra che non solo l'ipertensione esiti in un'alterata struttura e funzione vascolare, ma anche le modifiche nell'integrità struttura vascolare precedano e possano essere causa dello sviluppo di un'elevata pressione arteriosa, con conseguente ipertensione che conduce poi ad eventi clinici. È stato dimostrato che le alterazioni della struttura e della funzione cardiovascolare precedono il ritrovamento di un'elevata pressione arteriosa incluso il verificarsi dell'ipertrofia ventricolare sinistra in bambini e giovani adulti parenti di ipertesi (anche se non si può escludere il ruolo della pressione arteriosa come causa del rimodellamento cardiovascolare negli studi in cui le misurazioni della pressione sono state effettuate solo a riposo o in modo occasionale)(45,47), dell'alterato rilasciamento diastolico in individui normotesi predisposti per l'ipertensione, della disfunzione endoteliale come precursore del riscontro di ipertensione, e dell'incremento dell'arterial stiffness in soggetti normotesi predisposti a sviluppare ipertensione(110,111). Recentemente è stato riportato che in soggetti preipertensione, lo spessore miointimale è incrementato nell'arteria carotide comune, se comparato con soggetti che rimangono normotesi(46).

Nell'Atherosclerosis Risk in Communities analysis l'incidenza dell'ipertensione è stata prevista quando i soggetti si trovavano nel quartile più elevato dell'arterial stiffness. In questo studio 6992 soggetti (uomini e donne di età dai 45 ai 64 anni), che erano normotesi all'inizio e hanno eseguito un Doppler carotideo per valutare l'elasticità arteriosa, sono stati poi rivalutati a distanza di 3 anni per verificare lo sviluppo di ipertensione (definita come PA>160/95mmHg o che necessita di terapia farmacologica). Per ogni decremento di 1 SD nell'elasticità si assisteva a un incremento del 15% di sviluppo di ipertensione. Nell'analisi del Minnesota Children's Blood Pressure Study sono stati seguiti bambini normotesi di età scolare tra i 10 e i 14 anni, dal '77 al '78, e un campione è stato selezionato per valutare l'incidenza dell'ipertensione(113). Dei 1207 studenti seguiti, a 179 è stata misurata la distensibilità arteriosa tramite una tecnica non invasiva. La pressione arteriosa sistolica era inversamente correlata alla compliance delle grandi arterie prima e dopo l'aggiustamento per i fattori di rischio cardiovascolari (sesso, peso, altezza, insulino-resistenza,

iperlipidemia).

Questi reperti non possono essere attribuiti solo all'effetto di stretching dovuto all'aumentata pressione arteriosa, ma devono essere valutate anche come modificazioni adattative strutturali e funzionali intrinseche della parete, in risposta al cronico aumento della pressione o a lesioni primariamente a carico del vaso.

Sono stati effettuati studi su giovani pazienti con ipertensione borderline, valutando la *pulse wave velocity* (PWV) carotido-femorale e carotido-radiale. I risultati hanno mostrato un aumento della velocità di polso nei pazienti con ipertensione borderline rispetto ai controlli sani e significative correlazioni con la pressione arteriosa media. Questi dati suggeriscono che l'aumento della PWV presente nell'ipertensione borderline non sia dovuto solo all'elevazione della pressione arteriosa, ma rispecchi un danno già presente nelle pareti arteriose. Utilizzando una varietà di tecniche, si è dimostrato che le alterazioni vascolari della struttura e della funzione vascolare spesso accadono anche nel diabete mellito. McVeigh et al hanno dimostrato che la compliance vascolare è significativamente ridotta nei soggetti diabetici, indipendentemente dalla presenza o assenza di complicanze fisiche della malattia. Tuttavia, come è vero per l'ipertensione, anche per i soggetti diabetici è stato pensato che la modificazione vascolare fosse il risultato dell'aterosclerosi associata. Oxlund et al hanno dimostrato che le alterazioni della compliance arteriosa non sono correlate con il grado di aterosclerosi e che i soggetti diabetici sviluppano alterazioni nel tessuto connettivo arterioso indipendentemente dalla presenza di aterosclerosi. In un'altra analisi, Atherosclerosis Risk in Communities analysis(113), l'associazione della rigidità arteriosa con l'insulina resistenza è stata valutata in 4701 soggetti che erano prediabetici. I loro risultati erano compatibili con la visione che lo stato prediabetico è associato con l'incremento dell'arterial stiffness e che la stiffness non era correlata con lo spessore della parete del vaso. Giannattasio et al (111) hanno studiato 54 soggetti normoglicemici, normotesi, figli sani di 2 genitori con diabete mellito di tipo 2 e 55 soggetti di età e sesso corrispondenti, come controllo sano. Essi hanno scoperto che la pressione del sangue, il livello di glucosio nel sangue, l'emoglobina glicata e la sensibilità all'insulina erano normali e simili nei soggetti figli dei diabetici e nei controlli sani. Tuttavia, nei soggetti con genitori diabetici, la rigidità arteriosa era aumentata. Essi hanno correttamente notato che le alterazioni nello spessore della parete delle grandi arterie e la riduzione della distensibilità arteriosa non sono conseguenze tardive dello stato diabetico, ma che tuttavia non ci sono sufficienti dati sulla rigidità arteriosa nei soggetti normoglicemici predisposti per il diabete. I soggetti con una

predisposizione per il diabete hanno mostrato una rigidità arteriosa anche in assenza di alterazioni pressorie. Questo suggerisce che nel diabete le alterazioni delle proprietà meccaniche delle arterie rappresentano un fenomeno precoce che accade in assenza di alterazioni metaboliche o pressorie.

### ***Arterial stiffness e disfunzione endoteliale***

Sia la funzione endoteliale che la stiffness arteriosa sono considerate misure surrogate del rischio cardiovascolare e della morbilità futura. Diversi fattori (68,69,112) conosciuti compromettono la funzione vasomotoria endoteliale e sono anche associati all'incremento dell'arterial stiffness. Uno studio di Sharon et al (114) mostra che la funzione vasomotoria endotelio decresce nei soggetti con ipertensione sistolica isolata, confrontati con controlli normotesi, e che la aortic PWV è associata in modo indipendente con la funzione endoteliale.

Si è confermato che l'ipertensione sistolica isolata è associata a maggiore rigidità aortica indipendentemente dai valori pressori medi e che l'età è, di per sé, associata con il decremento della funzione endoteliale e l'incremento dell'arterial stiffness, anche in individui sani, normotesi.

La Pulse Pressure dipende da tre fattori principali: l'entità del volume, l'elasticità delle grandi arterie e la riflessione dell'onda. Quindi, la pulse pressure è spesso considerata un "surrogato" della misurazione della rigidità arteriosa. La risposta all'iperemia reattiva nell'arteria brachiale è significativamente ridotta nei soggetti con ipertensione sistolica isolata rispetto ai controlli sani, normotesi, anziani. Ciò suggerisce che l'ipertensione sistolica isolata è associata a disfunzioni vasomotorie endoteliali. Gruppi precedenti hanno segnalato sia normali (115) che anormali funzioni endoteliali in soggetti più giovani con ipertensione. La differenza nella funzione endoteliale non è stata spiegata dalla variazione del picco di flusso o dal diametro dell'arteria brachiale.

Interessante è la risposta reattiva all'iperemia che è stata da una parte, inferiore nel controllo dei soggetti anziani rispetto ai più giovani controlli sani, confermando una precedente osservazione di un calo della funzione endoteliale correlato all'età (116), e suggerisce dall'altra che l'ipertensione sistolica isolata potrebbe rappresentare un'esagerazione dell'usuale processo dovuto all'invecchiamento.

Si è inoltre riscontrata una significativa correlazione inversa tra la funzione endoteliale e l'aortic PWV, che rimaneva significativa anche dopo la correzione per i potenziali fattori

confondenti, tra cui età e pressione arteriosa media. La funzione endoteliale è stata anche inversamente correlata sia con la pulse pressure brachiale che aortica. La rigidità del condotto vascolare è in parte regolata dal tono del muscolo liscio che è sotto l'influenza di numerosi mediatori locali, incluso l'NO e l'endotelina-1. È stato inoltre notato che la disfunzione endoteliale e la ridotta biodisponibilità di NO possono contribuire ad un incremento della rigidità arteriosa e a potenziare lo sviluppo dell'ipertensione sistolica isolata.

### ***Arterial stiffness e PCR***

L'infiammazione subclinica, rispecchiata nella pratica clinica da valori di PCR sierici, sta alla base dei processi aterogenetici, di rimodellamento strutturale della matrice della parete vasale e di alterazioni endoteliali e bioumorali che costituiscono il meccanismo alla base dell'incremento della rigidità vascolare.

Così come per l'ipertensione, la PCR può avere una relazione sia di causa che di effetto nei confronti della stiffness (117).

La PCR, marker affidabile di stati infiammatori subclinici, rispecchia un'alterazione delle proprietà dell'endotelio e del letto arterioso, contribuendo all'irrigidimento vascolare anche attraverso un ruolo promotore nel processo aterogeno. Considerando pazienti con arteriti, vasculiti, artriti reumatoidi, in cui è ben noto lo stato flogistico cronico a cui sono sottoposti, alcuni studi rilevano un'aumentata PWV rispetto ai controlli sani (118).

Cambiamenti nella fisiologia arteriosa dovuti, per esempio, ad uno stato ipertensivo, il quale può determinare, secondo la legge di Laplace, un aumento della tensione e dello stress di parete, possono essere alla base di quella disfunzione endoteliale (119) che si manifesta incrementando l'espressione di fattori di adesione, chemochine, citochine, metalloproteinasi e, quindi, del marker PCR. La PCR e la stiffness sono intimamente correlate ed è difficile stabilire chi detenga il ruolo promotore dell'intero processo. Probabilmente, a legare tutti i fattori trattati precedentemente con l'incremento della stiffness sta proprio la PCR, sia in qualità di "marker" di flogosi cronica, sia come "marker" della disfunzione endoteliale alla base dell'irrigidimento vascolare e dell'ipertensione.

Ci sono condizioni comuni che, indipendentemente, contribuiscono all'incremento di entrambe, come l'obesità, il fumo, la sedentarietà, l'insulinoresistenza, l'ipercolesterolemia, e i farmaci che, come le statine, diminuiscono sia il grado di infiammazione che di PWV. In ogni caso si può affermare che la PCR costituisce un marker di rigidità arteriosa e un suo

utilizzo nella pratica clinica in aggiunta alla PWV rappresenta un valido determinante nella stratificazione del rischio CV e nel monitoraggio terapeutico.

### ***Arterial stiffness e sistema nervoso simpatico***

Diversi studi hanno mostrato che un aumento puntuale dell'attività del sistema nervoso simpatico è accompagnato da un'immediata riduzione della distensibilità arteriosa. Nel lavoro proposto da Giannattasio e Mancina (120), si è visto che l'infusione di fenilefrina nell'arteria brachiale è associata ad un'immediata riduzione della distensibilità dell'arteria radiale, valutata dal cambiamento del diametro del vaso, battito dopo battito (tramite il dispositivo Echotracking). Boutouyrie et al (121) e Perret et al (122) hanno descritto con una tecnica simile una marcata riduzione della distensibilità arteriosa in risposta al "cold pressure test", manovra conosciuta per incrementare in modo diffuso l'attività simpatica per via riflessa e tramite meccanismi centrali. Si è poi ulteriormente notata (123) una riduzione della distensibilità arteriosa nella radiale e nella carotide che avviene durante il fumo di sigaretta, situazione che è accompagnata dall'aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca, provocata dall'effetto stimolatore del sistema simpatico della nicotina e di altri componenti del fumo; ed è dimostrata la sua abolizione, se vi è il bloccaggio dei recettori  $\alpha$  e  $\beta$ . Non ci sono poi dubbi sul fatto che la stimolazione simpatica incrementi la rigidità arteriosa. L'effetto è ben definito nelle arterie di tipo muscolare come l'arteria radiale, ma sono implicate anche le arterie elastiche (come potrebbe essere possibile per tutto l'albero arterioso). L'incremento dell'attività del simpatico potrebbe ridurre la distensibilità arteriosa attraverso diversi meccanismi. Quando l'attività simpatica è accompagnata da un incremento della pressione arteriosa, la distensibilità dovrebbe essere ridotta a causa del conseguente aumento del diametro vascolare che stira gli elementi meno distendibili della parete vasale (come il collagene). In secondo luogo la distensibilità potrebbe essere ridotta anche per l'incremento istantaneo della frequenza cardiaca, supponendo che questo incremento sia associato all'irrigidimento delle grandi e medie arterie elastiche che avviene sia nei modelli animali che nell'uomo. Inoltre, altri meccanismi dovrebbero essere coinvolti, poiché il simpatico riduce la distensibilità arteriosa anche in assenza dell'incremento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca. Possiamo speculare che questi meccanismi consistono in una modificazione cronica della struttura della parete arteriosa, che favoriscono la distensibilità dei suoi componenti e l'incremento della rigidità, come mostrato in studi su animali, comparando la parete dell'arteria carotide

innervata o denervata. Altri meccanismi dovrebbero consistere nella contrazione della muscolatura liscia vascolare influenzata dal sistema simpatico, dato che il modulo elastico della contrazione dei muscoli tissutali è maggiore del loro rilassamento. L'importanza potenziale di questi fattori è esemplificata dalla marcata riduzione della distensibilità carotidea e femorale che si verifica nel ratto, quando la frequenza cardiaca aumenta dopo la simpatectomia.

Tutto ciò implica che le malattie caratterizzate dall'incremento dell'attività del simpatico, dovrebbero portare a una riduzione della distensibilità arteriosa.

L'invecchiamento, per esempio, è accompagnato da un progressivo incremento sia dell'attività del simpatico che da una progressiva riduzione della distensibilità arteriosa.

Nell'ipertensione e negli individui anziani la distensibilità arteriosa è ridotta, mentre l'attività simpatica si ritrova aumentata. La distensibilità arteriosa e l'attività simpatica sono rispettivamente ridotte e aumentate nell'insufficienza renale e nel diabete (124,125). Infine una diffusa riduzione della distensibilità arteriosa si verifica nello scompenso cardiaco nel quale l'attività simpatica è molto aumentata e il grado di cambiamento ha un preciso indice prognostico. L'attività simpatica può essere misurata direttamente tramite una tecnica microneurografica. Inoltre, interventi terapeutici che indirettamente o direttamente riducono l'attività del simpatico sono accompagnati da un aumento della distensibilità arteriosa (125).

### ***Arterial Stiffness, onda di riflessione e rischio cardiovascolare***

La distensibilità arteriosa e la riflessione d'onda sono stati largamente utilizzati negli studi osservazionali al fine di analizzare i determinanti delle modificazioni emodinamiche presenti in molteplici situazioni cliniche e per capire la patogenesi delle loro complicanze cardiovascolari. Per contro, le anomalie genetiche e molecolari riscontrate nelle malattie dei vasi hanno permesso di studiare da un nuovo punto di vista la stiffness arteriosa. Nel complesso, questi approcci hanno fatto emergere nuove ipotesi a riguardo della farmacologia e dei mezzi terapeutici atti a prevenire complicanze cardiovascolari. Una delle maggiori ragioni per valutare la distensibilità e la riflessione d'onda in modo routinario nella pratica clinica giunge dalle recenti dimostrazioni riguardanti la distensibilità arteriosa: essa ha un valore predittivo indipendente per gli eventi cardiovascolari.

### ***Rigidità aortica: predittore indipendente di eventi cardiovascolari***

Studi longitudinali epidemiologici hanno dimostrato un valore predittivo indipendente della stiffness arteriosa, della Pulse Pressure carotidea e dell'augmentation index per gli eventi CV(1). La maggior parte delle evidenze sono state date per la stiffness aortica misurata attraverso la PWV carotidofemorale: più di 10.000 soggetti sono stati inclusi in 11 studi (126). Negli ultimi anni, la stiffness aortica ha mostrato un valore predittivo indipendente per tutte le cause di mortalità e la mortalità cardiovascolare, eventi coronarici fatali e non, e stroke mortali in pazienti con ipertensione arteriosa non complicata, diabete di tipo II e alterazioni renali complicate (127-130).

Anche se la stiffness carotidea è predittiva di eventi cardiovascolari in un piccolo numero di pazienti con malattia renale agli ultimi stadi o con trapianto renale, essa non ha un valore predittivo indipendente in un numero maggiore di pazienti con alterazioni arteriose manifeste. Questo potrebbe essere spiegato da influenze metodologiche. Proprio nello studio SMART, la stiffness carotidea non è appropriatamente determinata, perché i calcoli includono la Pulse Pressure brachiale invece della Pulse Pressure centrale. Un'altra spiegazione, anche se non così esclusiva, potrebbe essere che la regione degli arti inferiori e superiori per la loro particolare fisiopatologia non riflettano il danno aortico, cerebrale e coronarico. In verità la PWV misurata al di fuori della traccia aortica, al di sopra (PWV brachiale) o al di sotto (PWV femoro-poplitea), è incapace di predire l'outcome nei pazienti con malattia renale in fase terminale (ESRD). Tuttavia la PWV femoro-poplitea e la stiffness carotidea forniscono simili informazioni sull'impatto dell'età sulla stiffness delle grandi arterie in soggetti normali; questo non è il caso degli ipertesi o dei diabetici. In questi casi l'aorta si irrigidisce molto di più che l'arteria carotide con l'età e altri fattori di rischio CV. Inoltre, la stiffness aortica e la stiffness carotidea non possono essere usate come un indicatori predittivi intercambiabili nei pazienti ad alto rischio.

L'Augmentation index (AIx) e la Pulse Pressure, misurati direttamente tramite un tonometro, hanno dimostrato di essere predittori indipendenti di tutte le cause di mortalità nei pazienti con malattia renale negli stadi finali. Questo è stato esteso a pazienti ipertesi dello studio CAFE' (131) e ai pazienti sottoposti a intervento coronarico percutaneo (132), nei quali la Pulse Pressure centrale e l'augmentation index, stimata tramite un tonometro, sono predittivi di eventi CV. Tuttavia, i dati concernenti i valori predittivi di entrambi questi parametri nella popolazione generale sono piuttosto scarsi. Nelle donne ipertese anziane i dati raccolti nello studio ANBP2 non mostrano benefici prognostici nell'uso di un

tonometro per la carotide (Augmentation index o compliance arteriosa) come prognosi oltre al bracciale sfigmomanometrico per la pressione arteriosa. Tuttavia, il metodo di questo studio è stato messo in discussione; la mancanza del valore predittivo positivo dovrebbe essere spiegato dalla mancanza dell'amplificazione della Pulse Pressure. Il valore predittivo positivo della Pulse Pressure e dell'augmentation index dovrebbe piuttosto riguardare i soggetti più giovani. A conferma di ciò, nello studio Anglo-Cardiff (133) si mostra come in individui sani, normotesi, i cambiamenti correlati all'età per AIx e la PWV aortica non sono lineari, con un maggior incremento dell'AIx negli individui giovani, mentre i cambiamenti della PWV sono molto accentuati negli individui più anziani. Questi dati suggeriscono che l'AIx potrebbe essere un marker molto sensibile della stiffness arteriosa e del rischio negli individui più giovani, ma la PWV aortica è verosimilmente una migliore misura in individui più anziani. Nello studio condotto da Tine Willum Hansen et al (134) è stato studiato il valore prognostico della Pulse Wave Velocity Aortica al di là dei classici fattori di rischio. È stata presa in considerazione una popolazione di 1678 danesi, è stata utilizzata una regressione Cox per investigare il valore prognostico della AoPWV, della Pulse Pressure ambulatoriale e quella nelle 24 ore (MAP) e aggiustati rispetto alla pressione arteriosa media e ad altre covariabili. Il follow up è durato 9,4 anni e dopo aver modificato i dati per età, sesso, BMI, fumo e alcool, l'AoPWV ha aumentato il suo valore prognostico, mentre la Pulse Pressure ambulatoriale e quella nelle 24 ore hanno perso il loro valore predittivo, eccetto per la Pulse Pressure ambulatoriale che è in relazione con la coronaropatia. Per ogni incremento di 1-SD dell'AoPWV il rischio di eventi CV aumenta dal 16% al 20%. L'AoPWV è in grado di predire tutti gli eventi cardiovascolari dopo la standardizzazione della frequenza cardiaca a 60 battiti per minuto, dopo l'aggiustamento della pressione arteriosa media e del colesterolo totale e della glicemia basale. Cheol Choi et al (135) hanno pubblicato un lavoro sul ruolo predittivo dell'aortic stiffness, in particolare andando a valutare l'associazione tra AoPWV, misurata tramite un metodo diretto intrarterioso e futuri eventi CV, in pazienti con dolore toracico. Arterial stiffness (AoPWV), misurata tramite un metodo invasivo, è un fattore di rischio indipendente per nuovi eventi cardiovascolari e per coronaropatia in pazienti con dolore toracico. Sarebbe possibile misurare l'aortic stiffness in pazienti con dolore toracico così da poter identificare pazienti ad alto rischio di eventi CV che dovrebbero beneficiare di un trattamento più aggressivo.

La distensibilità ha un valore predittivo migliore rispetto ad ogni singolo fattore di rischio

cardiovascolare “classico”. La distensibilità aortica è un fattore predittivo per eventi cardiovascolari nei pazienti con ESRD e dopo trapianto renale, mentre non ha valore predittivo indipendente nei pazienti con arteropatia manifesta (136). Le lesioni dell’albero vascolare dell’arto superiore ed inferiore, in virtù della particolare patofisiologia propria di questi territori (137), possono non riflettere lo stato del danno aortico, cerebrale e coronarico; infatti le arterie di tipo centrale subiscono modificazioni delle componenti elastiche maggiori rispetto a quelle dei distretti periferici, inoltre le arterie centrali risentono molto di più delle variazioni pressorie rispetto alle arterie periferiche. L’augmentation index carotideo e la pressione di polso sono stati dimostrati essere un fattore di rischio attendibile di mortalità nell’ESRD (138), mentre non sono apparsi così attendibili nel paziente con basso rischio o nella popolazione generale.

***Prospettive: la riduzione dell’arterial stiffness e la riduzione del rischio cardiovascolare***

Quello che risulta interessante è poter determinare se la riduzione della PWV o dell’onda di riflessione è associata ad una concomitante riduzione degli eventi cardiovascolari, indipendentemente dalla normalizzazione dei fattori di rischio.

Questo dovrebbe avvenire probabilmente perché il decremento dell’arterial stiffness riflette la reale riduzione del danno della parete arteriosa, mentre la riduzione della pressione arteriosa, della glicemia, della lipemia no. Infatti la pressione arteriosa e i lipidi plasmatici possono normalizzarsi in poche settimane tramite una terapia adeguata, portando ad una consistente riduzione del rischio cardiovascolare, ma senza alcun miglioramento delle lesioni aterosclerotiche e dell’arterial stiffness, che dovrebbero richiedere una più durevole correzione delle anomalie biochimiche. Ci si aspetta una dissociazione temporale tra il miglioramento dei fattori di rischio cardiovascolari e l’ancora elevata rigidità arteriosa. Una diretta risposta alla questione del valore predittivo dell’attenuazione dell’arterial stiffness per la riduzione del rischio cardiovascolare è stata data nei pazienti con ESRD (139), ma non in altre popolazioni di pazienti, particolarmente in quelli con un rischio un po’ inferiore, ma comunque elevato, per esempio con ipertensione, dislipidemia o diabete. Allo stesso modo rimane ancora da dimostrare se la riduzione della Pulse Pressure centrale è associata a una concomitante riduzione degli eventi cardiovascolari, indipendentemente dalla normalizzazione dei classici fattori di rischio. Dato che l’incremento dell’arterial stiffness e della Pulse Pressure centrale provoca danno d’organo (giudicato attraverso

l'ipertrofia ventricolare sinistra, la microalbuminuria, la filtrazione glomerulare renale e l'ispessimento dell'intima-media della carotide) e dato che il danno d'organo è considerato un end point intermedio per gli eventi cardiovascolari, è quasi logico considerare che una più importante riduzione dell'arterial stiffness e della pulse pressure porti ad una più elevata riduzione degli eventi cardiovascolari.

## **METODICHE DI MISURAZIONE**

### ***Pulse Pressure***

La misurazione della pulse pressure è la più semplice misura surrogata della rigidità arteriosa. La pulse pressure è calcolata sottraendo la pressione diastolica da quella sistolica. Essa è determinata dalla portata cardiaca e dalla rigidità arteriosa (140). Questo semplice parametro, che indica il grado di deterioramento della funzione di ammortizzatore delle grandi arterie, è stato dimostrato in diversi studi avere valore predittivo per eventi cardiovascolari. La pulse pressure risulta avere un valore predittivo per le malattie cardiovascolari nella popolazione generale, in individui sani, nei pazienti ipertesi non trattati, nei pazienti ipertesi trattati e in quelli con diabete mellito di tipo 2. In pazienti con diabete mellito di tipo I, l'età è significativamente associata alla pulse pressure, soprattutto in pazienti con albuminuria o con retinopatia. L'elevata pulse pressure può anche prevedere l'insufficienza cardiaca congestizia in individui sani anziani (141,142). Secondo alcuni autori, la pulse pressure è molto più significativa, se misurata centralmente, e questo è stato dimostrato correlarsi più fortemente alla funzione endoteliale che alla pulse pressure misurata a livello dell'arteria brachiale. Poiché nel condotto arterioso non vi è una lineare relazione tra pressione-volume, la pulse pressure è direttamente correlata alla pressione arteriosa media. Abbassando quindi la pressione arteriosa si riduce la pulse pressure senza necessariamente esercitare un effetto diretto sulla parete arteriosa. Detto questo, un indice più raffinato che coinvolge la pulse pressure è il rapporto tra SV/PP (stroke volume/pulse pressure). Questo indice dovrebbe dimostrare che l'utilità della pulse pressure dipende dalla sua capacità di fornire una stima del rapporto pressione-volume, mentre l'incremento di volume durante la sistole è determinato dallo stroke volume e dalla sistole. Il rapporto SV/PP è stato dimostrato essere un predittore di eventi cardiovascolari nella popolazione generale e in pazienti ipertesi. La PP si può ottenere attraverso metodiche ultrasonografiche Doppler (143) o con l'utilizzo di tonometri ad appianazione(144), dove la piccola pressione esercitata dal tonometro va ad equilibrarsi con la pressione all'interno del vaso.

### ***Velocità dell'onda sfigmica (Pulse Wave Velocità – PWV)***

La velocità dell'onda sfigmica, specialmente dell'aorta, è risultata essere un importante fattore predittivo di eventi cardiovascolari, così come sottolineato nelle Linee Guida ESH/ESC 2007e 2009 (1,2), anche se metodica disponibile attualmente solo in centri specializzati.

La PWV si misura in metri al secondo e rappresenta la velocità con cui l'impulso generato dalla meccanica cardiaca si propaga all'interno dell'albero arterioso. Valori normali di questo parametro sono intorno ai 9 m/s, valore che aumenta con l'aumento della stiffness.

L'onda di polso nasce dalla sovrapposizione di due componenti: l'onda incidente che viaggia dal cuore alla periferia, dipende dalla gittata sistolica e dalla rigidità della parete arteriosa e l'onda riflessa che dalla periferia si porta alla sede di riflessione dell'onda al cuore, a sua volta influenzata dalla rigidità del vaso. Nei giovani, essendo le arterie più distendibili, l'onda si propaga lentamente e l'onda riflessa si osserva solo in diastole. Negli anziani (142), a causa della minore elasticità arteriosa, l'onda di polso viaggia più velocemente e l'onda riflessa si sovrappone precocemente all'onda di propagazione determinando un aumento della pressione sistolica (103,104). Tali alterazioni fisiologiche della morfologia dell'onda di polso con l'età sono attribuibili all'irrigidimento delle arterie e all'aumento della PWV che condiziona un precoce ritorno dell'onda riflessa dalla periferia (101). Va inoltre tenuto presente che la riflessione dell'onda è influenzata anche dalla stessa architettura dell'albero arterioso verificandosi in corrispondenza dei punti di biforcazione delle arterie di conduzione come pure a livello delle piccole arterie muscolari (145). Un'onda pressoria che si propaga verso la periferia incrociando numerose ramificazioni andrà incontro pertanto al fenomeno dell'amplificazione con la conseguente risultante che l'onda pressoria avrà un'ampiezza maggiore nelle arterie periferiche che in quelle centrali. (126).

L'aorta è la sede di maggior interesse per la misurazione della rigidità arteriosa in quanto è a tale livello che avviene la principale modulazione delle oscillazioni pressorie e dove la PWV ha dimostrato un valore prognostico di rischio cardiovascolare. E' stata infatti riscontrata l'esistenza di una correlazione inversa tra la rigidità dell'aorta, espressa come PWV, e la presenza di fattori di rischio cardiovascolari

La PWV è considerata il gold standard tra gli indici di stiffness(1,126), in quanto mantiene il suo valore predittivo e prognostico anche dove altri indici di stiffness si rivelano inaffidabili. In numerose patologie sono stati rilevati valori di PWV variati, in particolare:

- . **nell'ipertensione** conclamata e borderline la PWV aumenta in modo costante, anche negli stadi precoci. Come precedentemente descritto, queste alterazioni sono da imputare in parte all'effetto di stretching che la pressione aumentata genera sulle pareti del vaso ed in parte a modificazioni reattive o primarie della struttura stessa della parete vascolare.

- . nel **diabete mellito tipo 1 e tipo 2** la variazione di PWV è diversa, valgono infatti le considerazioni fatte nella discussione della variazione degli indici di stiffness. Nel diabete di tipo 1 abbiamo, come già ricordato, l'aumento della PWV fin dai primi stadi della malattia, nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 la PWV si modifica e varia in relazione alla durata della malattia ed ai livelli di insulina circolante.

- . nelle dislipiemie si è notato un netto aumento della PWV nei pazienti con ipercolesterolemia familiare; significative alterazioni dei valori sono presenti anche nei soggetti con dislipidemia di grado lieve e moderato.

- . nell'**aterosclerosi** la PWV è correlata in maniera diretta all'estensione della malattia aterosclerotica

- . nella **coronaropatia** è stato dimostrato un aumento della PWV. L'entità dell'incremento della velocità è proporzionale al numero di vasi colpiti da malattia.

- . nella **patologia cerebrovascolare** sia su base aterosclerotica che ipertensiva: anche se sono stati effettuati pochi studi a riguardo pare evidente che nei pazienti con infarto cerebrale la stiffness aortica sia aumentata; rimane da valutare l'influenza della paralisi della muscolatura vasale nelle sedi colpite da plegia.

- . **nell'insufficienza renale cronica**, nell'end stage renal disease (ESRD)(146) e nei pazienti in dialisi, la PWV aumenta in maniera indipendente dall'età, genere e pressione arteriosa. I distretti maggiormente colpiti sono quello aortico e dell'arto inferiore. L'incremento di PWV è fattore prognostico indipendente per la mortalità cardiovascolare e globale nei pazienti con nefropatia.

La PWV è inoltre modificata nei pazienti affetti da aritmia cardiaca (fibrillazione atriale), da aneurismi aortici, nei soggetti fumatori, nei distiroidismi, nell'ipotensione posturale e nell'ipermocisteinemia

Vi sono differenti metodi per misurare la PWV. L'onda sfigmica è misurata in una arteria prossimale, come la carotide comune, e contemporaneamente in una distale, come la radiale o la femorale. La posizione superficiale di queste arterie rende possibile la valutazione dell'onda in maniera non invasiva e, se valutata la PWV carotido-femorale, si valuta la progressione d'onda attraverso l'aorta, sito particolarmente pronò allo sviluppo di aterosclerosi. Il tempo di ritardo tra l'arrivo di una convenuta parte dell'onda, ad esempio il piede, oppure attraverso una registrazione ECG-gated ai due siti di misurazione permette la valutazione della PWV. La distanza misurata è una stima della reale lunghezza del letto arterioso esplorato, infatti l'aorta addominale tende a divenire tortuosa con l'invecchiamento (142), generando una potenziale sottostima del PWV.

### ***Danno preclinico e PWV***

La distensibilità arteriosa e la riflessione d'onda sono stati largamente utilizzati negli studi osservazionali al fine di analizzare i determinanti delle modificazioni emodinamiche presenti in diverse situazioni cliniche e per capire la patogenesi delle loro complicanze cardiovascolari (147). Per contro, le anomalie genetiche e molecolari riscontrate nelle malattie dei vasi hanno permesso di studiare da un nuovo punto di vista la stiffness arteriosa (127-129,148). Nel complesso questi approcci hanno fatto emergere nuove ipotesi a riguardo della farmacologia e dei mezzi terapeutici atti a prevenire complicanze cardiovascolari (149).

Una delle maggiori ragioni per valutare la distensibilità e la riflessione d'onda in modo routinario nella pratica clinica giunge dalle recenti dimostrazioni riguardanti la distensibilità arteriosa: essa ha un valore predittivo indipendente per gli eventi cardiovascolari.

La pulse wave velocity (PWV) carotido-femorale ha come già ricordato, un valore predittivo indipendente per la mortalità di origine cardiovascolare, per eventi coronarici fatali e non fatali, strokes fatali in pazienti con ipertensione essenziale non complicata diabete mellito di tipo 2, nell'end stage renal disease, negli anziani e nella popolazione generale. Ora la distensibilità arteriosa è accettata come un end-point intermedio per gli eventi cardiovascolari.

La distensibilità ha un valore predittivo migliore rispetto ad ogni singolo fattore di rischio cardiovascolare "classico". Una ragione può essere che la distensibilità integra i danni dei fattori di rischio cardiovascolari sulla parete arteriosa in un lungo periodo di tempo, mentre la pressione arteriosa, la glicemia ed i lipidi possono fluttuare ed i loro valori, registrati al

momento della valutazione del rischio, possono non riflettere i veri valori che hanno danneggiato le pareti arteriose.

La distensibilità aortica è un fattore predittivo per eventi cardiovascolari nei pazienti con ESRD (146) e dopo trapianto renale, mentre non ha valore predittivo indipendente nei pazienti con arteriopatia manifesta. Le lesioni dell'albero vascolare dell'arto superiore ed inferiore, in virtù della particolare patofisiologia propria di questi territori, possono non riflettere lo stato del danno aortico, cerebrale e coronarico; infatti le arterie di tipo centrale subiscono modificazioni delle componenti elastiche maggiori rispetto a quelle dei distretti periferici, inoltre le arterie centrali risentono molto di più delle variazioni pressorie rispetto alle arterie periferiche.

L'augmentation index carotideo e la pressione di polso sono stati dimostrati essere un fattore di rischio attendibile di mortalità nell'ESRD, mentre non sono così attendibili nel paziente con basso rischio o nella popolazione generale.

Gli stress pulsatili generati dalla meccanica cardiaca a cui sono sottoposte le arterie di conduttanza danno luogo con il passare del tempo ad una frammentazione degli elementi elastici propri della parete vasale provocando una dilatazione ed un irrigidimento della parete stessa; secondo la legge di Laplace la dilatazione aggrava ulteriormente l'effetto dello stress pulsatile anche se la pressione permane imm modificata, generando una ipertrofia delle cellule muscolari, un incremento delle fibre collagene ed un ulteriore irrigidimento. Vengono così a ridursi le proprietà elastiche delle grandi arterie che dipendono dal rapporto tra elastina e collagene, dal tono e dalla ipertrofia della tonaca muscolare, dalla funzione autocrina e paracrina dell'endotelio.

La rigidità arteriosa o *stiffness* può essere quindi considerata come un fattore potenziale di inizio e progressione dell'aterosclerosi così come dell'ipertensione; inoltre essa è associata ad altri fattori di rischio cardiovascolari, quali quelli precedentemente ricordati. Pertanto l'incrementata rigidità arteriosa potrebbe servire da "marker precoce" per scoprire le lesioni aterosclerotiche iniziali e / o le modificazioni strutturali arteriose provocate dai vari fattori di rischio. Determinare la rigidità arteriosa e quindi la distensibilità equivale a stimare la capacità delle arterie di espandersi e di contrarsi in relazione alle varie fasi del ciclo cardiaco, convertendo il flusso sanguigno intermittente in un flusso più stabile, ovvero la capacità di aumentare il loro diametro dalla sistole alla diastole.

Un'arteria più rigida possiede una ridotta facoltà di ammortizzare il flusso di sangue emesso ad ogni sistole dal cuore dilatandosi ed il risultato sono valori più alti di pressione sistolica e più bassi di diastolica.

Da diversi studi è emerso che la modificazione della rigidità arteriosa può precedere il danno d'organo conclamato (1).

Sono state valutate le modificazioni della rigidità arteriosa in malati ipertesi, diabetici, dislipidemici, vasculopatici, cardiopatici e cerebrovasculopatici, in malati con insufficienza renale: in tutte queste condizioni può essere stimato un danno preclinico.

- *Ipertensione*

È ormai noto che nei soggetti con ipertensione franca, anche negli stadi precoci di malattia, si repertano delle modificazioni arteriose. Queste anomalie non possono essere attribuite solo all'effetto di stretching dovuto all'aumentata pressione arteriosa, ma devono essere valutate anche come modificazioni adattative strutturali e funzionali intrinseche della parete in risposta al cronico aumento della pressione o lesioni primariamente a carico del vaso.

Sono stati effettuati studi su giovani pazienti con ipertensione borderline, valutando la *pulse wave velocity* (PWV) carotido-femorale e carotido-radiale. I risultati hanno mostrato un aumento della velocità di polso nei pazienti con ipertensione borderline rispetto ai controlli sani e significative correlazioni con la pressione arteriosa media. Questi dati suggeriscono che l'aumento della PWV presente nell'ipertensione borderline non sia dovuto solo all'elevazione della pressione arteriosa, ma rispecchia un danno già presente nelle pareti arteriose. Soma ha descritto l'incremento dei valori pressori nell'ipertensione da camice bianco come l'associazione dell'aumento delle resistenze vascolari periferiche con una ridotta compliance arteriosa.

- *Diabete mellito*

È noto, in virtù dei numerosi studi effettuati, che gli indici di rigidità arteriosa nel diabete di tipo 1 siano aumentati. Grazie allo studio sistematico di numerosi soggetti con diabete mellito di tipo 1 è stato possibile osservare la presenza di alterazioni della meccanica arteriosa già prima dello svilupparsi del danno d'organo. Le lesioni aterosclerotiche tipiche di questa malattia si sviluppano verosimilmente in

seguito alle alterazioni delle proprietà funzionali vasali, a loro volta generate dallo squilibrio metabolico.

È stato inoltre osservato che i soggetti sani ma con entrambi i genitori diabetici (quindi con un'alta probabilità di sviluppare diabete) mostrano un irrigidimento arterioso quando ancora il glucosio plasmatico è nell'intervallo di normalità. Questo ci suggerisce che il danno vascolare si sviluppa precocemente nel corso della cascata degli eventi che portano all'alterazione metabolica tipica del diabete(111).

Non sono così chiare, invece, le relazioni che intercorrono tra irrigidimento arterioso e diabete mellito di tipo 2; infatti pare esserci una diversità nel comportamento dell'albero vascolare in relazione alla durata della malattia ed ai livelli di insulina circolante.

Nel diabete di tipo 2 è stata valutata la distensibilità arteriosa a livello degli arti inferiori e dell'aorta ed è stato notato che la modificazione degli indici di stiffness precede lo svilupparsi della malattia aterosclerotica e della neuropatia diabetica.

- *Dislipidemia*

L'interesse riguardo la distensibilità arteriosa deriva dalle osservazioni su modelli animali nei quali si osservava una inaspettata modificazione della distensibilità e della compliance arteriosa già da uno stadio precoce di aterosclerosi sperimentale indotta dalla dieta.

Numerosi studi hanno dimostrato che nell'uomo c'è una lieve modificazione della distensibilità aortica all'aumentare delle dosi di colesterolo HDL, mentre non sono emerse correlazioni significative con la colesterolemia totale. Questo può significare che l'ipercolesterolemia rappresenta un fattore negativo per la funzione meccanica arteriosa in quanto gli indici di stiffness si modificano nell'ipercolesterolemia anche lieve, soprattutto se associata all'ipertensione.

- *Aterosclerosi*

Considerando le complesse relazioni che l'aterosclerosi instaura con la pressione arteriosa, l'invecchiamento e gli altri fattori di rischio che interferiscono con la stiffness arteriosa, è realmente complesso lo studio delle alterazioni degli indici di rigidità in relazione alla sola malattia aterosclerotica.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'arterial stiffness e la PWV sono correlate ai fattori di rischio dell'aterosclerosi, alle lesioni aterosclerotiche e delle complicanze.

Un recente studio di Jadhav et al (2005) ha proposto di utilizzare due stime, la distensibilità arteriosa e lo studio della funzione endoteliale nella pratica clinica per valutare il danno preclinico nell'aterosclerosi in soggetti ad alto rischio di sviluppare la malattia.

Resta da capire e dimostrare se una riduzione della PWV possa predire o meno una riduzione del rischio cardiovascolare, indipendentemente dalla normalizzazione dei consueti fattori di rischio cardiovascolare. Infatti una attenuazione della distensibilità può riflettere una reale riduzione del danno vascolare, mentre la pressione, la glicemia ed i lipidi plasmatici possono essere normalizzati in poche settimane con le adeguate terapie farmacologiche, portando una forte riduzione del rischio calcolato, ma senza ancora alcuna modificazione delle lesioni aterosclerotiche e sull'arterial stiffness, che invece necessitano di un periodo molto lungo per correggere le anomalie biochimiche. È quindi presente una discrepanza tra il miglioramento dei fattori di rischio cardiovascolari ed una rigidità arteriosa ancora alta.

Una risposta diretta alla questione del valore prognostico della stiffness aortica come endpoint *surrogato* per gli eventi cardiovascolari non è stata ancora data per quanto riguarda la popolazione generale.

### ***Valutazione della funzione endoteliale***

Lo studio della funzione endoteliale è stato condotto negli anni con metodiche sempre più raffinate. Tramite l'infusione di sostanze che stimolano la reattività vascolare si attivano cellule endoteliali di particolari distretti con agonisti specifici (acetilcolina, metacolina, bradichinina, serotonina, sostanza P) oppure si blocca la produzione di NO con antagonisti dell'enzima NO sintetasi, non potendo utilizzare direttamente NO in vivo, data la sua elevata instabilità. In genere si utilizzano i distretti del circolo coronarico o dell'avambraccio in quanto permettono di infondere le sostanze a dosi che non producono modificazioni dell'emodinamica sistemica. In queste condizioni qualsiasi variazione di flusso è indice di variazione delle resistenze vascolari locali, così un aumento di flusso indica vasodilatazione e viceversa.

L'entità della vasodilatazione viene valutata con varie metodiche tra cui la pletismografia e l'ultrasonografia Doppler. L'endotelio è di estrema importanza per il mantenimento del tono vascolare, infatti partecipa alla regolazione del flusso sanguigno in risposta alle diverse richieste di ossigeno e nutrienti dei tessuti. Quando il flusso sanguigno aumenta all'interno di un vaso, il vaso si dilata. Questo fenomeno è stato definito *flow-mediated dilatation* (FMD) e viene utilizzato per studiare la funzione dell'endotelio stesso. Per avere una buona *flow-mediated dilatation* è necessario tuttavia un endotelio intatto. Nel circolo sanguigno dell'avambraccio la risposta endoteliale al flusso sanguigno dipende dalle caratteristiche dello stimolo di flusso. Dopo brevi episodi di iperemia la FMD è dovuta quasi esclusivamente all'NO, mentre durante un'iperemia sostenuta essa non risente dell'inibizione della sintesi di NO.

La FMD non solo dipende dalla formazione di NO, ma anche dall'inattivazione di NO e dalla sensibilità della sottostante muscolatura liscia all'NO. Un esercizio regolare induce simultaneamente una *up-regulation* della NOS endoteliale e dell'espressione della superossido dismutasi. Questo meccanismo può prevenire l'inattivazione dell'NO dovuto alla superossido dismutasi e così aumenta la FMD causata dallo shear stress. Un'alterata FMD riflette la presenza di disfunzione endoteliale.

Celermajer et al introdussero una tecnica innovativa per studiare la FMD in modo non invasivo e riproducibile a livello del circolo dell'avambraccio.

Notarono infatti che, in seguito ad uno stimolo ischemico indotto, nel letto vascolare a valle si verifica una FMD nel segmento considerato. L'ischemia viene indotta attraverso l'utilizzo di un manicotto posto a valle e gonfiato ad una pressione sovrastolica.

Rilasciando il manicotto si nota un incremento improvviso del flusso sanguigno e una dilatazione nel segmento vascolare considerato. L'incremento dello shear stress indotto dall'ischemia causa una dilatazione nell'arteria brachiale, dilatazione che può essere visualizzata con una sonda ultrasonografica.

La misurazione della FMD permette così di conoscere lo stato di funzionalità dell'endotelio vasale. La FMD risulta essere quindi un metodo di valutazione della disfunzione endoteliale in presenza dei maggiori fattori di rischio. Inoltre la sua misurazione è sensibile e riproducibile e ne permette l'utilizzazione nella routine clinica e negli studi di follow up terapeutico.

Negli adulti, la disfunzione endoteliale è considerata evento chiave nella patogenesi dell'aterosclerosi. Giovani adulti sani con una storia familiare di patologia aterosclerotica a livello coronarico manifestano un'alterazione prematura della FMD, anche in assenza di altri fattori di rischio. Essa infatti ci permette di identificare precocemente i pazienti a rischio di aterosclerosi e di poterne fare uno screening.

### ***Ambulatory Arterial Stiffness Index***

Uno dei limiti all'applicazione delle nuove tecniche di misurazione delle proprietà funzionali delle grandi arterie è costituito dal fatto che è necessaria la disponibilità di strumentazioni dedicate, spesso costose e di non larga diffusione, e di operatori opportunamente addestrati, con relative implicazioni in termini di costi e di riproducibilità. Questo ha stimolato diversi ricercatori a ottenere stime della rigidità arteriosa basate su altri parametri, derivati ad esempio dai valori pressori o dall'ecocardiografia. Li et al (150) hanno proposto un indice derivato dal monitoraggio automatico della pressione arteriosa nelle 24 ore, che consentirebbe di ottenere un stima della stiffness arteriosa senza ricorrere a misurazioni specifiche. Tale indice, definito Ambulatory Arterial Stiffness Index (AASI), è basato sul principio teorico che, in un determinato vaso, all'aumentare delle pressione di riempimento i valori di pressione sistolica e diastolica tenderanno ad aumentare consensualmente, se il vaso ha una buona distensibilità. Al contrario, in un vaso rigido, all'aumentare della pressione sistolica corrisponderà un aumento modesto o addirittura una diminuzione della diastolica. Per questo si è proposto che la pendenza della retta di regressione (coefficiente di regressione) dei valori di pressione diastolica sulla sistolica sia un indice di distensibilità ed il suo complemento (AASI) un indice di rigidità. È una misura semplice di rigidità arteriosa, ma si tratta pur sempre di un surrogato di misure più dirette di

rigidità (151). In particolare nel Dublin Outcome Study elevati valori di AASI predicevano un'elevata mortalità cardiovascolare, anche dopo correzione per i principali fattori di rischio cardiovascolari (152). Questa misurazione ha, però, dei limiti, in quanto è stato dimostrato come AASI dipenda in maniera determinante dalla caduta della pressione arteriosa notturna, un fattore che non era stato considerato in nessuno dei precedenti studi. Una riduzione o l'assenza della caduta della pressione diastolica notturna, che è la variabile dipendente nel modello di regressione su cui si basa il valore di AASI, tende ad attenuare inevitabilmente il valore del coefficiente di regressione e, quindi, ad aumentare artificialmente il valore di AASI. Infatti, una volta tenuto conto della riduzione pressoria notturna, l'AASI perde ogni relazione sia con gli indicatori di danno d'organo, quali la massa ventricolare sinistra, sia con una misura diretta di rigidità aortica, quale la velocità dell'onda sfigmica carotideo-femorale. Sono necessari, perciò, numerosi altri studi per chiarire sia il significato fisiologico dell'AASI che il reale impatto clinico e prognostico indipendente di questo nuovo parametro.

## **METODI E STRUMENTI PER DETERMINARE L'ARTERIAL STIFFNESS**

In contrasto con la rigidità arteriosa sistemica che può essere stimata solo con modelli della circolazione, la rigidità locale può essere stimata direttamente e in modo non invasivo in diversi punti lungo l'albero arterioso. Il vantaggio della valutazione locale della rigidità arteriosa sta nella misurazione diretta di parametri che sono fortemente collegati alla rigidità della parete arteriosa (vedi Tabella 4).

	Device	Methods	Measurement site	Reference
<b>Regional Stiffness</b>				
	Complior <sup>®</sup>	Mechanotransducer	Aortic PWV <sup>a</sup>	44
	Sphygmocor <sup>®</sup>	Tonometer	Aortic PWV <sup>a</sup>	82
	WallTrack <sup>®</sup>	Echotracking	Aortic PWV <sup>a</sup>	45
	Artlab <sup>®</sup>	Echotracking	Aortic PWV <sup>a</sup>	5
	Ultrasound systems	Doppler probes	Aortic PWV <sup>a</sup>	164
<b>Local stiffness</b>				
	WallTrack <sup>®</sup>	Echotracking	CCA <sup>b</sup> , CFA, BA	57
	NIUS <sup>®</sup>	Echotracking	RA	58
	Artlab <sup>®</sup>	Echotracking	CCA <sup>b</sup> , CFA, BA	5
	Various vascular ultrasound syst.	Echotracking	CCA <sup>b</sup> , CFA, BA	5
	MRI device	Cine-MRI	Ao	5
<b>Systemic stiffness (waveform shape analysis)</b>				
	Area method	Diastolic decay		72
	HDI PW CR-2000 <sup>®</sup>	Modif. Windkessel		68
	SV/PP	Stroke volume and pulse pressure		73
<b>Wave reflections</b>				
	Sphygmocor <sup>®</sup>	Alx	All superficial art.	79
	Pulse Trace <sup>®</sup>	Finger photoplethysmography		50

Ao., aorta; CCA, common carotid artery; CFA, common femoral artery; BA, brachial artery; RA, radial artery; SV/PP, stroke volume/pulse pressure.  
<sup>a</sup>Aorta, carotid-femoral, also carotid-radial and femoro-tibial PWV.  
<sup>b</sup>All superficial arteries, including particularly those mentioned.

**Tabella 4.** Strumenti utilizzati per la determinazione dell'arterial stiffness regionale, locale, sistemica e dell'onda di riflessione

L'aorta è un grande vaso di interesse per la determinazione dell'arterial stiffness regionale per almeno due motivi: l'aorta toracica e addominale danno il più grande contributo per la funzione di immagazzinamento dello stroke volume, e l'aortic PWV è un predittore indipendente per gli outcome di una popolazione.

Ciononostante, tutti i siti hanno un interesse potenziale. Proprio a livello della circolazione brachiale, dove la PA è misurata comunemente e a livello delle arterie degli arti inferiori, vi sono significative alterazioni per aterosclerosi.

Misurazioni della rigidità arteriosa carotidea possono fornire importanti informazioni prognostiche, dal momento che l'arteria carotide è un'importante e frequente sede di formazione dell'ateroma. Ci sono raccomandazioni che è necessario seguire per

standardizzare le condizioni delle misurazioni. In primo luogo la temperatura dell'ambiente deve essere di circa 22C°, il paziente deve rimanere per almeno 10 minuti in posizione supina e le misurazioni dovrebbero essere effettuate tutte allo stesso orario. I pazienti devono essere a digiuno da bevande che contengono caffeina da almeno 3 ore, o dal fumo di sigaretta, o digiuno da 10 ore, per quanto riguarda gli alcolici. I pazienti non dovrebbero né parlare né assopirsi durante la misurazione.

### ***Misurazione regionale della arterial stiffness***

#### ***Misurazione della PWV***

La misurazione della PWV è generalmente accettata come il metodo più semplice non invasivo, solido e riproducibile per determinare l'arterial stiffness.

La PWV carotido-femorale è una misura diretta e corrisponde al modello propagativo del sistema arterioso, misurato lungo la via aortico-iliaca ed è il più rilevante, dal momento che l'aorta e la sua prima diramazione sono ciò che il ventricolo sinistro 'vede' e sono in tal modo responsabili della maggior parte degli effetti fisiopatologici della rigidità arteriosa. La PWV carotido femorale è stata utilizzata negli studi epidemiologici per predire il rischio CV. In contrasto le misure di PWV fuori dalla traccia aortica, al di sopra (PWV brachiale) o al di sotto (PWV femoro-tibiale) che non hanno alcun valore predittivo in pazienti con ESRD(146). La PWV è solitamente misurata usando il metodo della velocità battito dopo battito, che è ottenuto in modo transcutaneo nella carotide comune e nell'arteria femorale destra, e il tempo di ritardo è misurato tra i due piedi delle due forme d'onda.

La distanza (D) coperta dalle onde di solito può essere assimilata alla distanza superficiale tra i due siti di registrazione. La PWV è calcolata come  $PWV = D \text{ (metri)} / \Delta t \text{ (secondi)}$ . Tuttavia, la distanza deve essere misurata precisamente proprio perché piccole imprecisioni possono influenzare il valore assoluto della PWV (152-154). Alcuni investigatori raccomandano di usare la distanza totale tra la carotide e il sito di registrazione della femorale o sottrarre la distanza tra la carotide e lo sterno dalla distanza totale oppure sottrarre la distanza tra la carotide e lo sterno dalla distanza tra lo sterno e la femorale. Queste tre procedure sono approssimazioni. Tuttavia, quando si comparano due popolazioni o un pool di dati per metanalisi, le differenze usate nei metodi possono risultare importanti. La forma d'onda della pressione a livello femorale è difficile da rilevare accuratamente nei pazienti obesi, con sindrome metabolica, con diabete e alterazione delle arterie periferiche. In presenza di stenosi aortiche, iliache o femorali l'onda pressoria può

essere attenuata e ritardata. Negli uomini con obesità addominale o in donne con misure “large” la misurazione della distanza può risultare inaccurata. Il piede dell’onda è definito alla fine della diastole, quando incomincia il forte incremento del fronte d’onda.

Il tempo di transito è il tempo del piede dell’onda su una distanza nota. Gli errori che si possono introdurre nella determinazione della PWV sono di due livelli (155): la valutazione della distanza tra i due polsi e il tempo impiegato per l’onda di polso a viaggiare tra i due siti. Per misurare la distanza tra i due siti arteriosi come ad esempio la carotide e l’arteria femorale, nessuna differenza viene fatta per le diversità nella forma del corpo tra i soggetti. Questa distanza sarà ovviamente maggiore in un soggetto con obesità centrale piuttosto che in un soggetto magro con la stessa altezza. La misura della distanza può anche essere inesatta, dal momento che è un postulato che l’aorta sia dritta. Il software fornito con alcuni sistemi richiede la distanza tra i sensori in centimetri, mentre altri dispositivi richiedono precisione millimetrica. Quando si misura il tempo necessario per l’onda di polso per viaggiare tra i due punti di interesse, un settore controverso riguarda l’individuazione dell’inizio del ciclo nella registrazione della forma d’onda. Simili punti tra le forme d’onda devono essere identificati per consentire la sincronizzazione della velocità dell’onda viaggiante. Tuttavia, la determinazione del fronte d’onda è difficile a causa dei cambiamenti nel contorno della Pulse Pressure che si manifestano appena l’onda si propaga, a causa delle proprietà visco-elastiche del percorso e della riflessione dell’onda. Tipicamente, quattro diversi punti possono essere scelti per segnare l’inizio della Pulse Pressure. Questi sono: (i) quando l’altezza del polso è a una determinata percentuale del limite massimo degli impulsi di altezza (e.g. 10%), (ii) quando la prima derivata della forma d’onda di pressione è massima; (iii) quando la seconda derivata della forma d’onda di pressione è massima, e (iv) quando il punto formato dall’intersezione di una linea tangente al punto iniziale dell’eiezione sistolica della forma d’onda pressoria è una linea orizzontale attraverso il punto minimo. Chiu et al (154) hanno studiato gli effetti dell’utilizzo di questi quattro metodi simili di identificazione di un fronte d’onda per il calcolo della PWV. La PWV ottenuta utilizzando la seconda derivata e il metodo della tangente sono stati ben correlati, con un coefficiente di correlazione di 0,90. Tuttavia, quando è stato utilizzato il punto di minimo della pressione diastolica correlato con la prima derivata, la concordanza è stata debole a 0,09. In un soggetto, la PWV è stata calcolata come 14,11m/sec usando il metodo precedente e 7,00 m/sec usando questi ultimi: con una differenza di oltre il 50%. Sarebbe utile pertanto stabilire un metodo per identificare l’inizio di un fronte d’onda, e più

cautela dovrebbe essere applicata quando vi è il confronto tra i risultati di più studi in cui sono state utilizzate tecniche diverse.

### ***Metodo basato su sensori pressori***

La forma dell'onda di pressione può essere registrata simultaneamente per fornire misurazioni automatiche della PWV, usando diversi congegni. Il Complior System® (Colson, Les Lilas, Francia) impiega meccanotransduttori dedicati, che si applicano direttamente sulla cute (156). Il tempo di transito è determinato per mezzo di un algoritmo di correlazione di traduzione simultanea tra ogni onda registrata. L'operatore è in grado di visualizzare la forma dell'onda arteriosa registrata per convalidarla. Tre principali siti arteriosi possono essere valutati, soprattutto il tronco aortico (carotide-femorale) e a livello superiore (carotide-brachiale) e inferiore (femorale-dorsale del piede). Il sistema è stato usato in diversi studi epidemiologici dimostrando il valore predittivo della PWV per gli eventi CV.

L'onda pressoria può essere registrata sequenzialmente da diversi siti e il tempo di transito può essere calcolato usando anche una registrazione elettrocardiografica. Nel sistema SphygmoCor® (ArtCor, Sydney, Australia) viene utilizzato un unico tonometro di appianazione ad alta fedeltà (Millar®) per ottenere a livello prossimale (della carotide) e a livello distale (radiale o femorale) una registrazione in sequenza di un breve periodo di tempo e si calcola la PWV dal tempo di transito tra i due siti arteriosi, determinata in relazione alle onde R-R dell'ECG. Per ottenere il tempo di transito si sottrae il tempo tra l'ECG e la pulsazione prossimale dal tempo tra l'ECG e la pulsazione distale. La parte iniziale della forma dell'onda pressoria è usata come punto di riferimento. E' anche possibile verificare la variabilità della misura su una gamma di impulsi, secondo ogni algoritmo. Dal momento che le misurazioni sono fatte su un breve periodo di tempo, il cambiamento nel periodo isovolumetrico del ventricolo sinistro o della variabilità della frequenza ha poco o nessun effetto sulla misurazione del tempo di transito dell'onda.

### ***Metodi basati sul Doppler ed altri metodi***

L'onda di distensione ottenuta dall'Ecotracking può essere usata per calcolare la PWV. Come descritto prima per lo SphygmoCor, la PWV è calcolata da onde successive ottenute in un breve intervallo di tempo tra due punti arteriosi (carotide e femorale), usando l'onda R dell'ECG per calcolare il ritardo di tempo. Il tempo di transito richiesto per la

determinazione della PWV può essere misurato tra due pulsazioni registrate simultaneamente dal Doppler continuo (157) o con l'ECG. Le misure sono solitamente fatte all'origine dell'arteria sottoclaveare (come la sovra sternale) e vicino alla biforcazione dell'aorta addominale (a livello ombelicale). Il tempo di transito è automaticamente calcolato seguendo il riconoscimento del piede della pulsazione. Questo metodo è stato usato per mostrare il valore predittivo della PWV aortica per eventi CV in pazienti diabetici e fornisce una valutazione più accurata per la valutazione dell'aortic PWV, quando si confronta con la carotide femorale, anche se un vantaggio specifico deve essere ancora visto.

### ***Determinazione locale dell'arterial stiffness***

La rigidità arteriosa locale delle arterie superficiali può essere determinata utilizzando dispositivi ad ultrasuoni. La rigidità carotidea può essere di particolare interesse, poiché in questa arteria l'arteriosclerosi è frequente. Tutti i tipi di sistemi a ultrasuoni possono essere utilizzati per determinare il diametro in diastole e cambiamenti di diametro durante la sistole, definiti come la differenza tra il diametro sistolico e diastolico in mm, ma la maggior parte di queste però sono limitatamente precise nelle misurazioni perché in generale si usano immagini di analisi-video. Al momento, alcuni ricercatori hanno misurato la rigidità arteriosa locale di arterie profonde come l'aorta, tramite la RMN.

Tuttavia, la maggior parte degli studi di fisiopatologia e di farmacologia hanno usato tecniche di echotracking (155,156). Uno dei principali vantaggi è che la rigidità arteriosa locale è direttamente determinata dal cambiamento della pressione rispetto al cambiamento in termini di volume, vale a dire senza utilizzare alcun modello di circolazione. Tuttavia, poiché richiede un elevato grado di competenza tecnica e richiede più tempo della misurazione della PWV, la misurazione locale della rigidità arteriosa è indicata solo per analisi meccanicistiche di fisiopatologia e di farmacologia piuttosto che per studi epidemiologici. Tuttavia, l'ecografia è attualmente l'unico mezzo per determinare, in modo non invasivo, le proprietà elastiche della parete arteriosa (modulo elastico di Young) (157), il rapporto tra lo spessore intima-media (IMT) e le proprietà elastiche (158), o il rimodellamento ventricolare per la distensibilità arteriosa(159). I dispositivi di Echotracking sono stati sviluppati per misurare il diametro in fine diastole e i rapidi cambiamenti del diametro con un sistema ad alta precisione. I primi due dispositivi sono stati il Wall Track System e il NIUS-02 (160,161). Questi apparecchi utilizzano un segnale a radiofrequenza

per ottenere una precisione 6-10 volte superiore a quella con l'immagine dei sistemi video, che sono limitati dalla risoluzione spaziale dell'analisi pixel. Infatti, la precisione nel determinare il cambiamento istantaneo del diametro è più basso di  $1\mu\text{m}$  (162) per il sistema Echotracking, e di  $150\mu\text{m}$  (vale a dire la dimensione dei pixel) con gli analizzatori dell'immagine video. Per la misurazione di distanze assolute, la deviazione standard si estende da 9 a  $25\mu\text{m}$  per il sistema Echotracking e da 54 a  $60\mu\text{m}$  con gli analizzatori dell'immagine video(163).

I sistemi Echotracking hanno altri importanti vantaggi rispetto ai sistemi video di immagine: dagli stessi dati degli ultrasuoni l'IMT può essere estratto, e consente di determinare il modulo di Young; è possibile determinare la curva pressione-diametro dell'arteria così da determinare la stiffness arteriosa per ogni pressione arteriosa (163); dal periodo di tempo tra due forme d'onda adiacenti è possibile calcolare la PWV locale e i cambiamenti patofisiologici e terapeutici possono essere relazionati ai cambiamenti nella geometria (area del lume e IMT). La maggior parte di questi parametri richiedono la misurazione della pressione arteriosa. Questa dovrebbe essere la pressione locale, che è di solito ottenuta da tonometri di appianazione del vaso in questione (164), mentre la calibrazione della forma d'onda per la pressione brachiale media è ottenuta mediante l'integrazione della forma d'onda brachiale o radiale o da un calcolo automatico con funzione di trasferimento (SphygmoCor, AtCor, Sydney Australia).

L'Echotracking messo a punto da Aloka nel 2003, è stato migliorato tecnologicamente così da poter sviluppare nuove metodologie per poter studiare la funzionalità arteriosa attraverso indici sempre più eloquenti. Questa tecnica usa la frequenza di risonanza eco dei vasi sanguigni e registra automaticamente i loro movimenti, misurando la distensione arteriosa in modo continuo con margini di errore prossimi a 0,01 mm.

L'Echotracking, come strumento di misurazione delle variazioni nel diametro delle arterie, può quindi essere applicato al rilevamento della FMD e della compliance arteriosa mediante una serie di misurazioni della profondità di una determinata interfaccia tissutale ecogenica, che deriva dagli echi ottenuti da pulsazioni periodiche e ricevuti da una data direzione (165), cioè da un unico senso.

Questa metodica, di norma utilizzata nello studio dell'arteria carotide o della radiale, è in grado di rilevare cambiamenti di diametro anche di pochi micrometri, "tracciando" la distanza tra due strutture "ecogene" (cioè tra i due muri della parete arteriosa).

Attraverso l'echo-tracking è possibile calcolare diversi indici: la stiffness arteriosa, la

compliance, la PWV derivata dalla stiffness e l'augmentation index.

È, inoltre, possibile valutare la funzione endoteliale in virtù del livello di vasodilatazione causato da una ischemia indotta. Una disfunzione endoteliale è considerata il primo step nello sviluppo dell'aterosclerosi e, quindi, il miglioramento dell'echo-tracking ha permesso di rivelare la malattia aterosclerotica fin dai suoi prodromi, grazie alla misurazione degli indici di stiffness vascolare. Le rilevazioni permettono di individuare in questo modo le alterazioni ancora in stadio subclinico, ovvero prima che la malattia si manifesti con ispessimento miointimale o con la formazione di placche.

Tutte le arterie superficiali sono adatte per le indagini, in particolare la carotide comune, la femorale comune e l'arteria brachiale. Si può concludere che per l'arterial stiffness locale:

1. il sistema di Echotracking prevede una condizione ottima per la determinazione della rigidità arteriosa locale, che è determinata direttamente e non richiede assunzione dei modelli della circolazione;
2. la rigidità locale dovrebbe essere determinata da misurazioni del cambiamento del diametro e della pressione locale di polso, preferenzialmente in modo simultaneo;
3. i sistemi di echotracking prevedono misure aggiuntive dell'IMT, che consentono il calcolo del modulo elastico di Young's;
4. la determinazione, sia della rigidità carotidea che dello spessore, è ottimale;
5. le misure locali della rigidità sono indicate nelle indagini meccanicistiche in patofisiologia, farmacologia e terapia, più che per studi epidemiologici;

### ***Determinazione non invasiva delle onde di riflessione***

#### ***Analisi dell'onda di polso centrale***

La pressione centrale è importante per diversi motivi (166). Innanzitutto perché è la pressione sanguigna vista dal ventricolo sinistro, dai reni e dal cervello. In tale misura, questo è il solo valore di pressione arteriosa che dovrebbe essere considerato per il danno d'organo. In secondo luogo, i modelli di riflessione influenzano direttamente il lavoro del ventricolo sinistro e la sua perfusione. Da ultimo, quando si studia la rigidità arteriosa locale, è obbligatorio definire la pressione arteriosa locale al fine di ottenere la corretta rigidità e deve essere misurata a livello locale per le arterie centrali di grandi dimensioni come l'aorta e la carotide comune. La forma dell'onda pressoria è composta dalla pressione anterograda, dovuta alla contrazione ventricolare, e dall'onda di riflessione. Le onde sono riflesse dalla periferia, principalmente nei punti di diramazione o nei siti di impedenza. Nei

vasi elastici, poiché la PWV è bassa, le onde riflesse tendono a tornare indietro nella radice aortica durante la diastole, nelle arterie resistenti la PWV cresce e le onde tendono a tornare in tempi minori nell'arterie centrali, aggiungendosi all'onda in avanti e aumentando la pressione sistolica. Questo fenomeno può essere quantificato tramite un Augmentation Index:

$$AIx = (P2-P1) / \text{Pulse Pressure}$$

definito come la differenza tra il secondo e il primo picco sistolico, espresso come la percentuale della pressione pulsatoria.

Oltre che per un aumento della PWV, anche il cambiamento dei siti di riflessione possono influenzare l'Augmentation Index. Nelle ricerche cliniche, non solo la pressione diastolica e l'altezza, che sono relazionate ai siti di riflessione, ma anche l'età e la PWV aortica sono i maggiori determinanti dell'AIx (167). La forma dell'onda pressoria dovrebbe essere analizzata a livello centrale, nell'aorta ascendente, dato che rappresenta il vero carico imposto al ventricolo sinistro e alle pareti delle grandi arterie elastiche. La forma d'onda della pressione aortica può essere stimata sia dalla forma d'onda dell'arteria radiale, usando una funzione di trasferimento (168), o dalla forma d'onda della carotide comune. In tutte le arterie la forma d'onda della pressione può essere misurata in modo non invasivo tramite una penna, che contiene un trasduttore Millar ad alta definizione (SPT-301, Millar Instruments). Il più grande approccio è quello di eseguire una tonometria radiale e poi applicare una funzione di trasferimento (SphygmoCor, AtCor, Sydney Australia) per calcolare la pressione aortica dalla forma d'onda della radiale (169). L'arteria radiale è ben supportata da tessuto osseo e ciò permette un'ottima appianazione. Le funzioni di trasferimento inverse vengono utilizzate per ricostruire la forma d'onda aortica dalla tonometria radiale, la stima della pressione aortica centrale è accertata come più accurata rispetto alla stima dell'AIx (170); inoltre la pressione nell'arteria brachiale è usata come surrogato della pressione dell'arteria radiale per calibrare la pressione centrale e questo può introdurre alcuni errori.

Nonostante queste limitazioni, la tonometria radiale è popolare ed è semplice da applicare. La tonometria carotidea richiede un alto grado di esperienza tecnica, ma non richiede una funzione di trasferimento, perché i siti arteriosi sono vicini e le forme d'onda sono simili (171). L'AIx centrale e la pressione pulsatoria centrale hanno mostrato un indipendente

valore predittivo per tutte le cause di mortalità nei pazienti con ESRD, e per eventi cardiovascolari in pazienti sottoposti a intervento percutaneo coronarico (172) e nei pazienti ipertesi dello studio CAFE’.

In conclusione, come mostrato nella tabella 4e 5, vari parametri arteriosi possono essere calcolati per valutare in modo non invasivo la rigidità arteriosa e l’onda di riflessione; alcuni sono suggeriti per la pratica clinica, altri per la ricerca.

Parameter	Main features and definition	Limitations	Predictive value	Degree of for CV events technical expertise
Carotid-femoral PWV	Gold standard for arterial stiffness Speed of travel of the pulse along an arterial segment ( $L/\Delta t$ in m/s)	Pressure-dependent No data on arterial geometry	+++	+
Central pulse-wave analysis (carotid and aortic pressure waves)	Central pulse pressure (PP) Central SBP Central augmentation pressure (AP) Central AIX with AIX = AP/PP	Inaccuracy of distance measurement Indirect information on arterial stiffness	++	+
Local arterial stiffness	Carotid distensibility Carotid compliance Carotid Young's modulus Takes into account BP level	Requires echotracking systems Requires local PP	+	+++

Tabella 5. Metodi di misurazione dell'arterial stiffness nella pratica clinica

## GENI E GENOMA

Il gene è l'unità ereditaria fondamentale degli organismi viventi, corrisponde ad una sequenza di acidi nucleici in cui si individuano regioni trascritte e regioni regolatorie. I geni dirigono lo sviluppo fisico e comportamentale di un essere vivente.

Il fenotipo di un organismo può dunque essere considerato come il prodotto complesso dell'interazione tra il genotipo e l'ambiente che determina l'espressione fenotipica stessa a diversi gradi, anche la non espressione.

La maggior parte dei geni codifica per proteine, che sono le macromolecole maggiormente coinvolte nei processi biochimici e metabolici della cellula. Molti geni non codificano per proteine, ma producono RNA non codificante, che può in ogni caso giocare un ruolo fondamentale nella biosintesi delle proteine e nell'espressione genica.

La maggior parte del contenuto dei geni, perlomeno negli eucarioti, non viene in ogni caso tradotto ma può coordinare la stessa espressione genica. Tra queste regioni figurano i promotori, i terminatori e gli introni, sequenze non tradotte che spaziano gli esoni, poi eliminate attraverso la maturazione del trascritto primario (splicing).

Una definizione più concisa di gene, che tenga conto delle varie sfaccettature citate fino ad ora, è stata proposta da Gerstein (173): un gene è l'unione di sequenze genomiche che codificano per un set coerente di prodotti funzionali potenzialmente sovrapponibili.

Nella cellula eucariote, un gene consiste di una sequenza di DNA caratterizzata dalla presenza di:

- un promotore: ha funzione di controllo sull'espressione genica;
- regioni codificanti: definite esoni;
- sequenze non codificanti: definite introni, che possono avere funzione regolatoria.

Sia gli esoni che gli introni sono copiati durante la trascrizione a produrre un filamento di pre-mRNA. Successivamente viene processato per diventare un RNA messaggero (o mRNA), in grado di dirigere la sintesi delle proteine:

- mediante lo **splicing** vengono sottratti gli introni. Esiste inoltre in fenomeno dello splicing alternativo che permette alla cellula di sintetizzare più proteine a partire da un unico gene;
- mediante il **capping** viene aggiunto un cappuccio guanosinico, che ne impedisce la degradazione;

- mediante la **poliadenilazione** è aggiunta una coda poliadenilica che ha scopi protettivi per il trascritto.

La sintesi proteica è possibile grazie all'esistenza del codice genetico che mette in corrispondenza i codoni (tripleste di acidi nucleici sull'RNA) e gli amminoacidi.

Per **genoma umano**, intendiamo l'insieme delle informazioni genetiche presenti all'interno di ogni cellula umana. All'interno del genoma umano si distinguono un genoma nucleare, di dimensioni maggiori, ed un genoma mitocondriale, di dimensioni minori.

Il genoma mitocondriale contiene circa 17.000 basi ed è circolare; questa caratteristica, tipica degli organismi procarioti, ha fatto nascere la teoria endosimbiotica secondo la quale i mitocondri sono cellule procarioti ancestrali che sono entrate in simbiosi con la cellula eucariota. Il genoma mitocondriale contiene in totale 37 geni, costituendo quindi un'elevata densità genica (1/0.45 Kb), la percentuale di DNA codificante è pari al 93%. Di questi 37 geni, 13 codificano per proteine coinvolte nella catena respiratoria e 24 per RNA non codificanti.

Il genoma nucleare contiene circa  $3 \cdot 10^9$  coppie di basi (ci si riferisce al genoma aploide) suddivise in 23 molecole lineari che sono i cromosomi. Il numero di geni è stimato attorno a 25000, inizialmente si pensava fossero molti più, successivamente si è osservato che il numero di geni è simile a quello dei altri mammiferi. Il DNA nucleare presenta una bassa densità genica: infatti si trova un gene ogni 100 Kb, inoltre sono presenti ampie frazioni di DNA ripetitivo e sono presenti numerosi introni per ogni gene. Come mostrato nella figura 4, si ritiene che il 30% del DNA nucleare sia all'interno di sequenze geniche e gene correlate, ma solo il 3% sia codificante; il restante 27% è costituito da introni, pseudogeni e frammenti genici.

Il restante 70% è costituito da sequenze di DNA non codificante che possono essere:

- singole: sequenze diverse che fanno da "spaziatore" tra un gene e l'altro e che non sono ripetute nel genoma
- mediamente ripetute
- altamente ripetute

Le sequenze non codificanti mediamente o altamente ripetute possono essere organizzate in clusters (raggruppamenti di sequenze ripetute) o intersperse nel genoma

Le sequenze moderatamente ripetute in tandem costituiscono il DNA *microsatellite e minisatellite*, le sequenze altamente ripetute in tandem costituiscono il DNA satellite. Le sequenze moderatamente ripetute intersperse sono i trasposoni e retrotrasposoni, le sequenze altamente ripetute intersperse costituiscono *LINE e SINE*.

#### **DNA altamente ripetuto in tandem:**

È costituito da sequenze semplici, la cui lunghezza varia, a seconda della famiglia considerata, tra le 2 e le 200 coppie di basi. Ciascuna sequenza è altamente ripetuta nel genoma per migliaia, centinaia di migliaia, a volte anche milioni di volte. È rappresentato dal DNA satellite che presenta cluster di dimensioni importanti dell'ordine di Mb. Si distinguono:

- **DNA  $\alpha$  satellite:** è presente a livello della cromatina centromerica di tutti i cromosomi, ha la funzione di organizzare il centromero e far sì che questo possa interagire con le proteine centromeriche le quali a loro volta possono interagire con le proteine del fuso mitotico e quindi permettere la corretta segregazione dei cromosomi in mitosi.
- **DNA  $\beta$  satellite:** è presente a livello dell'eterocromatina centromerica dei cromosomi acrocentrici (13,14,15,21 e 22). Si ritiene che queste sequenze siano poste in corrispondenza di blocchi eterocromatici di grandi dimensioni e di geni che devono essere espressi.

#### **DNA moderatamente ripetuto in tandem:**

- **DNA minisatellite:** le sequenze ripetute sono costituite da 6 fino a 64 coppie di basi ripetute fino a determinare blocchi di 20.000 paia di basi. Un esempio è il DNA telomerico: una sequenza di 6 basi (TTAGGG) ripetuta a formare i telomeri dei cromosomi.
- **DNA microsatellite:** le sequenze ripetute sono composte da 1, 2, 3 o massimo 4 nucleotidi componendo blocchi di massimo 150-200 nucleotidi. Non hanno una localizzazione preferenziale, sono presenti sia nell'eucromatina che nell'eterocromatina.

#### **DNA altamente ripetuto intersperso:**

Viene classificato sulla base della lunghezza della sequenza monomero, si distinguono infatti:

- **SINE:** short interspersed nucleotide elements la cui sequenza è breve. La famiglia più nota è Alu, che presenta una sequenza lunga circa 300 paia di basi ed è ripetuta nel genoma circa un milione di volte rappresentandone il 7% circa. Queste copie sono disposte nelle regioni geniche introniche, tra un gene e l'altro, nelle regioni eucromatiche ed eterocromatiche.
- **LINE:** long interspersed nucleotide elements la cui sequenza è di maggiori dimensioni. La famiglia più nota è LINE-1, che presenta una sequenza lunga 6.100 coppie di basi ed è dispersa nel genoma tra le 200.000 e 500.000 volte, rappresentandone fra il 5 e il 12%.

#### DNA moderatamente ripetuto intersperso:

Sono rappresentate da trasposoni e retrotrasposoni, cioè sequenze che hanno capacità di trasporre nel genoma, sia tramite un intermedio a DNA che a RNA.

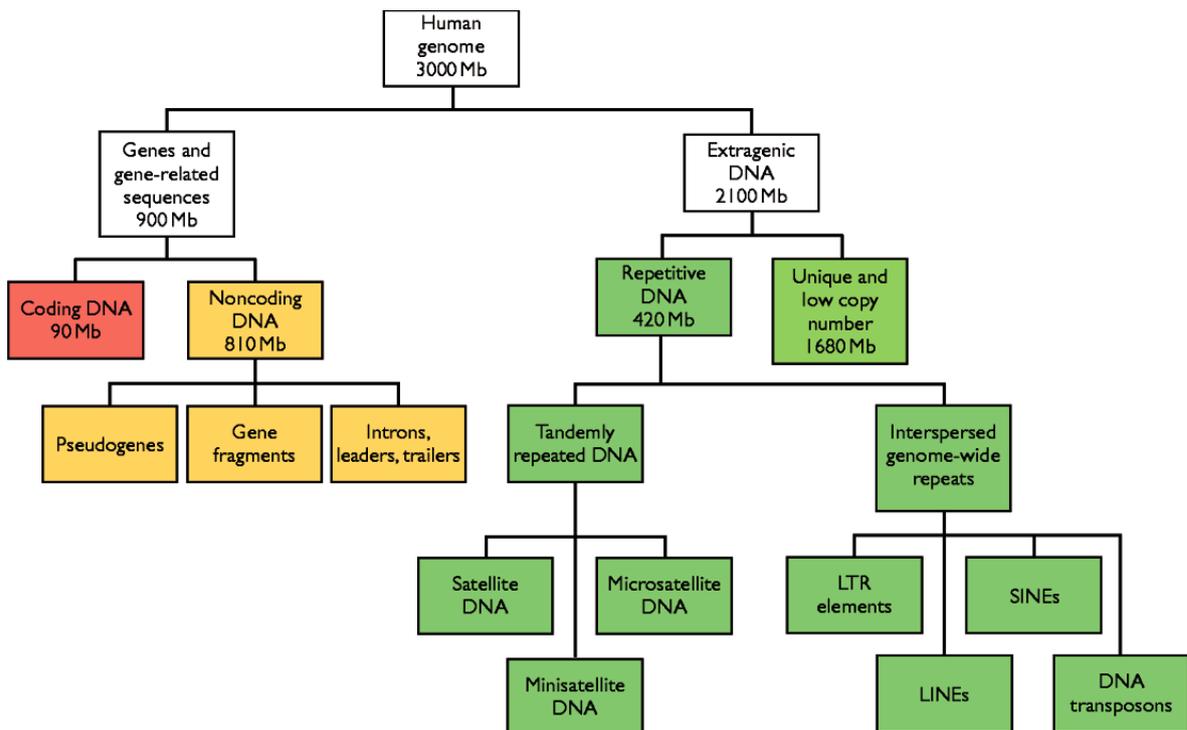


Figura 4: Composizione del genoma umano.

### ***Variabilità genetica: mutazioni e polimorfismi***

Il DNA non rappresenta un'entità statica: infatti i processi che fisiologicamente lo caratterizzano, come ad esempio la replicazione, sono responsabili del fenomeno della variabilità genetica. Ad esempio la DNA polimerasi, l'enzima deputato alla trascrizione del DNA, può far sì che una sequenza ordinaria venga trascritta in una variante lievemente diversa.

La variabilità è alla base del processo evolutivo perché permette di introdurre un elemento di diversità, prima genotipico, poi fenotipico, che viene selezionato dall'ambiente in cui l'organismo vive.

In questo modo s'introduce il concetto di polimorfismo, cioè la presenza di più alleli per un locus genico che codificano per lo stesso prodotto ma lievemente diverso. Se invece uno degli alleli crea un vantaggio selettivo, allora tenderà a prevalere ritornando ad una situazione di monomorfismo.

Quando si parla di malattie complesse, da un punto di vista genetico si passa dal concetto di mutazione a quello di polimorfismo genico.

La mutazione è un evento raro che causa la malattia anche se con possibili variazioni nell'espressione del fenotipo, con frequenze nelle popolazioni inferiori allo 0,05%.

Si definisce polimorfismo genico, invece, una variazione genetica con una frequenza superiore all'1% nella popolazione. I polimorfismi genetici possono essere presenti all'interno di regioni codificanti (esoni) o non codificanti (introni) e possono essere determinati da sostituzioni, delezioni o inserzioni di singole basi o di sequenze di DNA. Viene stimato che ogni 300 nucleotidi si manifesti un polimorfismo, il più comune dei quali è associato alla mutazione di un singolo nucleotide (SNP) e circa l'1% di questi non sia silente, ma si traduca in variazioni fenotipiche.

In particolare, gli SNPs possono essere responsabili di una modificazione (qualitativa o quantitativa) di proteine con una funzione nota che, se alterata, può spiegare la suscettibilità individuale verso lo sviluppo di una data patologia.

Nel corso degli ultimi anni, la conoscenza del genoma umano ha ampliato enormemente le informazioni sul corredo genetico individuale.

Si è appreso come ogni persona dimostri il 99,9% di identità genetica rispetto ad una qualsiasi altra. Il restante 0,1% del nostro DNA rappresenta la variabilità individuale, che è sostanzialmente dovuta alla presenza dei polimorfismi genetici.

Ad oggi, sono stati identificati circa 3 milioni di SNPs, ma si calcola che ve ne siano almeno 10 milioni. E' ormai riconosciuto che gruppi di queste piccole variazioni conferiscono una predisposizione o suscettibilità allo sviluppo della patologia, che, soprattutto, può manifestarsi in età precoce quando profili genetici a rischio "elevato" interagiscono con fattori ambientali o stili di vita considerati ad alto rischio.

Il DNA rappresenta un'entità dinamica e le variazioni del DNA sono quindi insite nella sua struttura e nei polimorfismi di un singolo nucleotide, spesso chiamati SNPs (si pronuncia "snips"), sono il tipo più comune di variazioni genetiche tra le persone. Ogni SNP rappresenta una differenza in un blocco unico edificio DNA, chiamato un nucleotide. Ad esempio un SNP può essere determinato dalla sostituzione del nucleotide citosina (C) con il nucleotide timina (T) in un certo tratto di DNA.

Quando si verificano SNPs all'interno di un gene o in una regione di regolamentazione nei pressi di un gene, possono svolgere un ruolo più diretto nella malattia colpendo la funzione del gene.

I ricercatori hanno evidenziato negli ultimi anni come gli SNPs possono essere utilizzati per predire la risposta di una persona di alcuni farmaci, la suscettibilità a fattori ambientali come le tossine, e il rischio di sviluppare malattie particolari. SNPs possono essere utilizzati anche per monitorare l'eredità di geni malattia all'interno delle famiglie. Studi futuri lavori per identificare SNPs associati a malattie complesse come le malattie cardiache, il diabete e il cancro.

Per **polimorfismo** intendiamo quindi variazioni del DNA neutre dal punto di vista selettivo, che possono determinare differenze fenotipiche, senza che queste però risultino vantaggiose o svantaggiose. Nella specie umana ciascun individuo presenta differenze nella sequenza genetica ogni 500-1000 paia di basi ed in totale ci sono  $6 \times 10^6$  paia di basi diverse tra gli individui della specie umana.

Per **mutazione**, invece, intendiamo una variazione della sequenza di DNA che causa un malfunzionamento dell'allele, diventando quindi svantaggiosa.

Polimorfismi e mutazioni presentano differenze anche dal punto di vista epidemiologico, infatti i primi si presentano nella popolazione con una frequenza maggiore dell'1%, le seconde con una frequenza inferiore all'1%.

Le mutazioni possono essere suddivise in mutazioni spontanee ed indotte.

Le mutazioni spontanee possono avvenire nella fase di duplicazione del DNA (m. geniche), nella fase di crossing over (m. cromosomiche) e nella fase di segregazione (m. genomiche).

Le mutazioni indotte sono causate da fattori esogeni come radiazioni ultra violette, calore e mutageni chimici.

Le mutazioni più comuni sono le mutazioni puntiformi che hanno come meccanismo molecolare la sostituzione di basi, che consiste nella sostituzione di una base con un'altra durante la replicazione. I sistemi di riparazione riconoscono l'errore, poiché esso genera una distorsione della normale struttura della doppia elica, e possono correggere la mutazione o fissarla. Le cause della sostituzione devono essere indagate negli errori della DNA polimerasi, nella tautomeria delle basi e nei fenomeni di deaminazione e depurinazione. Le mutazioni puntiformi che cadono nelle regioni esoniche potranno avere diverse conseguenze:

- Mutazioni silenti: sono le più frequenti, non modificano la sequenza del prodotto genico. Questo può accadere grazie alla ridondanza del codice genetico, fenotipicamente non si avranno alterazioni e sarà possibile visualizzare la mutazione solo sequenziando il DNA.
- Mutazioni missense: la mutazione del nucleotide muta il senso del codone per cui verrà mutato l'amminoacido. Vengono definite conservative se il nuovo amminoacido ha caratteristiche simili al precedente, non conservative se il nuovo amminoacido ha caratteristiche diverse.
- Mutazione nonsense: sono le mutazioni meno frequenti, trasformano la tripletta che codificava per un amminoacido in una tripletta di stop, provocando il blocco della sintesi proteica.

### ***Polimorfismi a singolo nucleotide, linkage disequilibrium ed aplotipi***

Un polimorfismo a singolo nucleotide è una variazione della sequenza di DNA che si definisce nel momento in cui un singolo nucleotide differisce fra due membri della stessa specie oppure fra due cromosomi omologhi nello stesso individuo.

Se, per esempio, due frammenti di DNA sequenziato da due individui differiscono per un singolo nucleotide (AAGCCTA e AAGCTTA), si parlerà di polimorfismo di singolo nucleotide e C e T saranno i due alleli.

Ad uno SNP può essere assegnata una **minor allele frequency (MAF)** che corrisponde alla frequenza allelica minore che è osservata in quel locus in una particolare popolazione, o più semplicemente la frequenza allelica minore tra i due alleli dello SNP.

Gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche umane. SNPs con minor frequenza allelica pari o maggiore all'1% sono presenti ogni circa 100-300 paia di basi lungo l'intero genoma. In media, due SNPs su tre corrispondono ad una variazione tra citosina e timina.

I polimorfismi di singolo nucleotide presentano una forte connotazione geografica, infatti, esistono variazioni tra popolazioni umane, cosicché un allele frequente in un gruppo etnico o geografico può essere raro in un altro.

Gli SNPs possono cadere in sequenze geniche codificanti, in sequenze geniche non codificanti o in regioni intergeniche.

Come precedentemente illustrato, questo potrebbe non determinare conseguenze sul prodotto proteico, alterarlo in misura lieve o in misura importante. Gli SNPs che cadono in regioni non codificanti potrebbero alterare il processo di splicing o il legame dei fattori di trascrizione.

Lo studio degli SNPs è utile poiché queste variazioni genetiche possono influenzare lo sviluppo di patologie complesse e la risposta ai patogeni, agli agenti chimici e ai farmaci. Per tale motivo gli SNPs hanno assunto un ruolo di prim'ordine nella farmacogenomica, hanno, infatti, grande importanza nello sviluppo di nuovi farmaci e nella diagnostica, in quanto consentono di conoscere l'effetto che avrà il farmaco sull'individuo ancor prima della somministrazione, attraverso lo screening degli SNPs presenti nel gene responsabile della metabolizzazione del farmaco stesso.

L'uso degli SNPs può essere utile per comparare regioni del genoma fra coorti di soggetti (es caso-controllo) poiché la presenza di solo due possibili varianti alleliche li rende facilmente valutabili ed inoltre tendono a conservarsi lungo le generazioni.

Un concetto che si deve accostare agli SNPs è quello di **linkage disequilibrium**.

Nelle popolazioni genetiche, per linkage disequilibrium intendiamo l'associazione non casuale di alleli fra due o più loci, non necessariamente sullo stesso cromosoma.

Questo concetto differisce dal concetto di linkage che descrive l'associazione fra due o più loci sullo stesso cromosoma con un tasso di ricombinazione limitato.

Il linkage disequilibrium descrive una situazione in cui alcune combinazioni di alleli o markers genetici ricorrono in modo più o meno frequente in una popolazione rispetto a quello che ci si aspetterebbe da una formazione casuale di aplotipi di alleli basati sulla loro frequenza. Le associazioni non casuali tra polimorfismi presenti in diversi loci sono misurate dal grado di linkage disequilibrium, numericamente rappresentato dalla differenza fra le frequenze alleliche osservate ed attese (assumendo una distribuzione casuale).

Parametri utilizzati nella valutazione del linkage disequilibrium sono **r<sup>2</sup>** e **LOD score** (log<sub>10</sub> degli odds).

r<sup>2</sup> può assumere valori da 0 ad 1, ove 0 indica l'assenza di LD e 1 indica LD perfetto.

LOD può assumere valori negativi e positivi, ove un valore negativo indica una scarsa probabilità di linkage e un valore positivo indica una probabilità crescente di linkage.

Grazie a questo fenomeno si delineano gli aplotipi che sono combinazioni di varianti alleliche lungo un cromosoma o segmento cromosomico contenente loci in linkage disequilibrium.

Aplotipi differenti sono generati da un aplotipo ancestrale per effetto della mutazione ai singoli loci. I prodotti di questo meccanismo evolutivo possono essere correlati attraverso la filogenesi fino a desumere la forma ancestrale dell'aplotipo. Spesso, quando la risoluzione molecolare di un aplotipo è molto elevata, può essere utile raggruppare filogeneticamente aplotipi diversi sulla base di un comune progenitore definendo così un aplogruppo.

L'analisi del linkage disequilibrium e degli aplotipi costituisce uno strumento importante per la mappatura genetica ad alta risoluzione.

Nonostante un aplotipo contenga numerosi SNPs, può essere individuato mediante l'identificazione di un numero esiguo di SNPs che fungono da tag per l'intero blocco aplotipico.

## ***Genetica di popolazioni e legge di Hardy-Weinberg***

La genetica di popolazioni è una branca della genetica che analizza la costituzione genetica delle popolazioni mendeliane in termini qualitativi (varianti alleliche presenti all'interno di una popolazione) e quantitativi (frequenze alleliche e genotipiche).

La genetica di popolazioni valuta le modalità con le quali le caratteristiche genetiche sono tramesse alla progenie (evoluzione temporale) ed il variare delle stesse in relazione al territorio (distribuzione spaziale). La genetica di popolazioni è rappresentata da una componente teorica che si avvale di metodi matematici, afferenti alla teoria delle probabilità e alla statistica, ed una maggiormente empirica che rileva e quantifica la diversità genetica con scopi conoscitivi della storia naturale delle popolazioni, o del grado di biodiversità per scopi di conservazione.

Basilare è il concetto di **frequenza**, che è il rapporto tra il numero di elementi di un insieme con una data proprietà e il numero totale di elementi dell'insieme, il suo valore è ovviamente compreso tra **0 e 1**.

Ognuno degli alleli presenti per un certo locus avrà una data frequenza allelica e ogni genotipo una data frequenza genotipica.

L'insieme dei geni di una popolazione costituisce il suo pool genico.

Considerando un locus in cui sono presenti due alleli: **A** e **a** siano  $f(AA)$ ,  $f(Aa)$  e  $f(aa)$  le tre frequenze genotipiche, la cui somma vale 1.

Le frequenze alleliche saranno allora  $f(A) = f(AA) + (1/2) f(Aa)$  e  $f(a) = f(aa) + (1/2) f(Aa)$ . Spesso le due frequenze alleliche si indicano con  $p$  e  $q$ .

La legge di Hardy-Weinberg, espressa dalla formula matematica  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , stabilisce che le frequenze alleliche non variano col tempo e che le frequenze genotipiche si stabiliranno sulle proporzioni  $p^2$  (frequenza degli AA),  $2pq$  (frequenza degli Aa) e  $q^2$  (frequenza degli aa).

Affinchè queste legge sia valida devono essere verificate le seguenti condizioni:

- HW1 Popolazione infinitamente grande: affinché le frequenze siano praticamente coincidenti con le probabilità.
- HW2 Assenza di immigrazione ed emigrazione: in questo modo il pool genico è influenzato solo dalle sue dinamiche interne.
- HW3 Panmissia (incrocio casuale): la probabilità che due individui si incrocino

non deve essere influenzata dal fenotipo del carattere in questione. La panmissia manca, ad esempio, nel caso di forti preferenze matrimoniali all'interno di caste chiuse, specie se con diversa origine etnica.

- HW4 Non selezione: il successo riproduttivo medio degli individui (detto anche fitness) non deve essere influenzato dal genotipo per il carattere in questione. I due alleli devono quindi avere la stessa probabilità di essere trasmessi alle successive generazioni.
- HW5 Non mutazione: le mutazioni alterano la composizione del pool genetico delle nuove generazioni.

## GENETICA DELLE PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI

Lo spettro di varianti genetiche che predispongono alle patologie cardiovascolari si estende da rare e deleterie mutazioni responsabili di patologie di tipo mendeliano a comuni polimorfismi con effetto debole che, da soli o in combinazione, modulano il rischio di patologie comuni e complesse. Per patologie complesse intendiamo patologie il cui pattern di aggregazione familiare differisce da quello delle patologie mendeliane da singolo difetto genetico.

Comunque, ancora oggi non sono completamente conosciuti i geni che determinano un aumentato rischio di malattia cardiaca ed è ancora indispensabile acquisire ulteriori informazioni prima di ottenere strumenti utilizzabili nella prassi clinica. Tuttavia, alcuni test genetici di rischio cardiovascolare sono già disponibili in molti laboratori di analisi. In questo campo, di particolare interesse sono le recenti conoscenze acquisite relative alle mutazioni pro trombotiche del Fattore V, del fattore II della coagulazione o protrombina, del gene della metilene-tetraidrofolato-reduttasi (MTHFR), ACE, PAI I, APO E, APO B, fattore XIII, HPA 1 e Beta Fibrinogeno (vedi Tabella) (77-84, 174).

Da una prospettiva epidemiologica, le rare mutazioni che determinano un aumento significativo del rischio di patologie cardiovascolari sono rilevanti nei portatori della mutazione, ma il loro impatto sulla popolazione generale è minimo.

Diversamente, i polimorfismi, che sono, per definizione, relativamente comuni nella popolazione, possono avere un effetto minimo sul singolo ma avere grande importanza nella popolazione.

### ***Malattie a trasmissione mendeliana***

Le mutazioni responsabili di patologie mendeliane in ambito cardiovascolare sono rare, si stima meno dell'1%. Queste mutazioni sono individuate grazie ad **analisi di linkage** condotti all'interno di famiglie con numerosi membri affetti dalla patologia. Le regioni che potrebbero contenere i geni responsabili per la patologia sono identificate testando la co-segregazione della patologia con marcatori genetici che "taggano" specifiche regioni del genoma. Questa strategia usufruisce di marcatori genetici (come pannelli di DNA microsatellite oppure grandi gruppi di SNPs che spaziano lungo tutto il genoma) per verificare se particolari alleli sono co-trasmessi con la patologia ad una frequenza maggiore

rispetto a quella che si osserverebbe per caso. Il successo di questo approccio dipende dalla disponibilità di famiglie ben caratterizzate che includono un numero sufficiente di soggetti affetti. Una volta mappata una regione che risulta correlata con la patologia, individuare quale gene è coinvolto non è semplice, infatti la regione potrebbe comprendere decine o centinaia di geni.(175-181).

### ***Studi di associazione: polimorfismi***

In contrapposizione alle mutazioni responsabili di patologie mendeliane, **i polimorfismi**, specialmente quelli di singolo nucleotide, sono alla base della maggior parte dei recenti studi genetici per la valutazione delle patologie complesse. Si ritiene che, nel genoma umano, siano presenti più di 10 milioni di SNPs(179). Alcuni di questi presentano alleli in grado di aumentare la suscettibilità per determinate patologie complesse. Si ritiene che una combinazione di alleli di suscettibilità, situati in diversi loci nello stesso individuo, possa influenzare il rischio cardiovascolare in modo diverso da quello che si possa analizzare per le singole varianti.

Per questo motivo nello studio delle patologie complesse appare più utile lo studio di sistemi di geni piuttosto che lo studio di un singolo gene (180,181).

Le patologie complesse non seguono un'ereditarietà di tipo mendeliano, per cui l'approccio a queste patologie non prevede studi su famiglie di affetti, ma studi di associazione genetica.

Questo approccio si basa sull'esistenza del **linkage disequilibrium** tra i siti polimorfici del genoma che si trovano in prossimità gli uni agli altri. Il che significa che, anche se il polimorfismo causalmente coinvolto nella genesi della patologia non viene direttamente osservato, potrebbe però essere evidenziato dall'osservazione di un polimorfismo in linkage disequilibrium con esso.

Questa è la base degli studi di associazione genetica che valutano l'associazione statistica fra una patologia nella popolazione e marcatori genetici diffusi nel genoma, senza che questi abbiano un ruolo causale definito a priori.

Oggigiorno si sono sviluppati numerosi progetti, tra cui **HapMap (176)** (Haplotype Map Project), che permettono di avere pannelli di SNPs che fungono da markers per studi di associazione.

Lo scopo principale dell'HapMap project è quello di creare una banca dati di SNPs in modo da racchiudere la variabilità della sequenza genomica umana e analizzare il LD fra gli

SNPs noti. Alla luce del forte LD dimostrato dalla maggior parte delle regioni del genoma, le combinazioni di SNPs, chiamate aplotipi, generano minor diversità rispetto a quella che ci si aspetterebbe.

HapMap descrive aplotipi, compresa la loro posizione nel genoma e di come essi sono comuni in diverse popolazioni di tutto il mondo. L'International HapMap Project è uno sforzo internazionale scientifico per identificare comuni varianti genetiche tra le persone. Questo progetto rappresenta una collaborazione di scienziati provenienti da organizzazioni pubbliche e private in sei paesi. I dati del progetto è liberamente a disposizione dei ricercatori di tutto il mondo. I ricercatori possono utilizzare i dati per saperne di più sul rapporto tra differenze genetiche e di malattie umane.

Recenti studi hanno dimostrato che il genoma umano è organizzato in una successione di distinti blocchi aplotipici che sono ancestralmente conservati (79-83,182).

Inoltre sequenziando il genoma di individui di origine Africana, Asiatica ed Europea sono stati identificati set di SNPs che fungono da tag per la maggior parte degli aplotipi del genoma umano: in questo modo vengono prodotti arrays con tag SNPs che comprendono l'intero genoma oppure specifiche regione di interesse.

Gli approcci alle patologie complesse possono essere distinti in studi su geni candidati e studi genome-wide.

Nel primo tipo di studio si analizzano varianti genetiche presenti all'interno di geni che sono fisiopatologicamente correlati con la patologia in studio.

Un esempio è lo studio delle displipidemie ed in particolare la regolazione dei livelli plasmatici di LDL. Si ritiene che i livelli plasmatici di LDL siano strettamente correlati con il rischio cardiovascolare.

Per questo motivo polimorfismi comuni che influenzano i livelli di LDL possono aumentare il rischio cardiovascolare.

Numerosi geni sono risultati coinvolti nella regolazione dei livelli plasmatici di LDL, tra questi il più importante si è rivelato essere APOE (76), che codifica per una proteina che ha ruolo importante nel trasporto dei lipidi ai tessuti e alla cellule. APOE è presente in numerose lipoproteine e lega con alta affinità il recettore per le LDL.

Il gene di APOE presenta 2 polimorfismi non sinonimi, che generano 3 aplotipi:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ . Questi 3 aplotipi hanno diversa frequenza nella popolazione:  $\epsilon 3$  è il più comune ed  $\epsilon 2$  il

meno comune. Le tre proteine codificate hanno proprietà funzionali diverse: E2 è associato con livelli più bassi di LDL ed E4 con livelli più alti rispetto ad E3.

In una recente meta-analisi i portatori di E4 (che rappresentano il 20% della popolazione) sono caratterizzati dall'aver rischio cardiovascolare più elevato del 40% rispetto agli omozigoti E3-E3 (81).

Con la recente disponibilità di microarrays ad alta densità contenenti pannelli di tag SNPs per l'intero genoma è possibile condurre studi genome wide, per investigare la componente genetica di patologie complesse senza fare riferimento ad alcuna ipotesi fisiopatologica. Il razionale di questo approccio risiede nell'individuare, tramite il linkage disequilibrium con i tag SNPs valutati, varianti genetiche, prima sconosciute che predispongono allo sviluppo della patologia in osservazione.

Questi tipi di studi hanno permesso di scoprire sequenze genetiche che, inaspettatamente, sono implicate nello sviluppo delle patologie cardiovascolari e di migliorarne la comprensione delle cause e della patofisiologia, tracciando nuovi percorsi di prevenzione e terapia.

Gli studi genome wide si rivelano essere molto potenti nell'esplorare aspetti genetici di fattori di rischio misurati negli studi epidemiologici.

Di contro, però, sono studi molto costosi che necessitano di campioni di grandi dimensioni.

Appare però fondamentale ricordare che l'espressione fenotipica di un genotipo dipende da molti fattori che includono il background genetico, lo stato dello sviluppo dell'organismo, l'età, il genere, le condizioni fisiologiche e patologiche, l'introito di cibo e farmaci (82,83). L'importanza di queste interazioni mitiga il concetto di determinismo genetico e mette in luce il ruolo di fattori modificabili che vanno ad interferire con il rischio di base geneticamente determinato.

A maggior ragione, nella valutazione delle patologie cardiovascolari, non possiamo prescindere dall'eziologia multifattoriale, ove numerosi fattori, genetici e non, interagiscono gli uni con gli altri.

Marcatori fenotipici come LDL, glicemia, pressione arteriosa, BNP, PCR devono essere considerati nell'allestimento degli studi di associazione genetica; risulta importante correggere i dati per quei fattori non genetici che possono influenzare i risultati.

Il singolo polimorfismo è in grado di contribuire solo per un lieve aumento del rischio, appare pertanto di maggiore utilità clinica la valutazione della presenza di più polimorfismi che, insieme, vanno a determinare un aumento del rischio significativo sulla popolazione. Concludendo, l'obiettivo della genetica umana è quello di individuare nuovi meccanismi fisiopatologici e, da questo punto di vista, la genetica sta cambiando l'approccio alle patologie cardiovascolari.

Nella tabella 6 è riportato l'elenco dei geni investigati e delle varianti genetiche studiate in ambito cardiovascolare.

Gene analizzato	Varianti genetiche studiate	Ruolo del gene nell'insorgenza delle patologie cardiovascolari	
APOA1	-75 G>A	ARTERIOSCLEROSI E METABOLISMO DEI LIPIDI	
Apo B	R3500Q		
APOC3	T3175G T3206G		
APO E	Cys112Arg Arg158Cys		
CETP	G279A G1533A		
GJA4 (CX37)	Pro319Ser		
HMGCR	-911 C-A		
LPL	C1595G		
MMP3	-1171 5A>6°		
NOS3	-786 T>C Glu298Asp		
PON1	VNTR introne 4 Gln192Arg		
SREBF2	Gly595Ala		
FATTORE II	3'UTR G20210A		OMEOSTASI – TROMBOSI
FATTORE V	G1691A (Leiden) Y1702C His1299Arg, V34L		
FATTORE XIII			
FGB	-455G-A		
HPA	Leu33Pro		
PAI-1	1 bp Del/Ins 4G/5G	IPERTENSIONE	
ACE	I/D introne 16		
AGT	M235T		
ADRA2B	Ins>Del Codon 299	METABOLISMO E OBESITA'	
ADRB1	Gly389Arg		
ADRB2	Gly16Arg Gln27Glu	METABOLISMO DELL'OMOCISTEINA	
ADRB3	Trp64Arg		
NPY	Leu7Pro		
CBS	C699T T1080C	RISPOSTA INFIAMMATORIA	
MTHFR	C677T A1298C		
MTR	A2756G		
MTRR	A66G		
ACT	-51 G-T	ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE	
IL-1B	-511 C-T		
IL-6	G-634C G-174C		
IL-10	-1082 G-A		
IFN-γ	+874 T-A		
TNFα	-308 G-A		
VEGF	-2578 C-A		
MnSOD	C(-28)T T175C		
SOD3	C760G		

**Tabella 6.** Elenco dei geni investigati e delle varianti genetiche studiate in ambito cardiovascolare.

### ***Geni candidati nell'ipertensione arteriosa***

Gli studi su geni candidati, come prima ricordato, si basano sulla valutazione di polimorfismi presenti all'interno di geni, che sono fisiopatologicamente correlati con il fenotipo in osservazione.

Iwai et Al (78) hanno studiato, in una popolazione Giapponese di soggetti ipertesi, 10 geni candidati, a vario titolo correlati con l'insorgenza di ipertensione:

- *SCNN1B*, *KCNJ1*, *CLCNKB* e *SLC12A3* (implicati in patologie tubulari renali che conducono a squilibri elettrolitici e ad alterazioni dell'omeostasi pressoria),
- *UMOD* (responsabile di una nefropatia iperuricemica giovanile caratterizzata da ipertensione, iperuricemia ed insufficienza renale),
- *SCL9A3*, *SCL9A2*, *ELN*, *PTEN* e *GPX3*.

Una preliminare genotipizzazione su una parte del gruppo di pazienti (in totale 3654 soggetti ipertesi) ha permesso di identificare 161 SNPs all'interno dei 10 geni, che sono stati successivamente genotipizzati in tutto il campione.

L'associazione fra i genotipi è stata valutata con l'ipertensione e con fenotipi intermedi, fra cui PWV.

Dall'analisi 5 polimorfismi sono risultati significativamente associati all'ipertensione arteriosa: il polimorfismo numero 4 del gene *SCL9A2*, il polimorfismo 107 del gene *UMOD*, i polimorfismi 145, 158 e 160 del gene *ELN*.

Inoltre è stata valutata l'associazione fra i polimorfismi del gene *ELN* e PWV correggendo per età, pressione arteriosa sistolica, frequenza cardiaca, tolleranza glucidica, consumo di etanolo e trigliceridi.

Il polimorfismo 160 del gene *ELN* è risultato essere il maggiormente associato con i valori pressori e con PWV.

E' stato pertanto impostato uno studio replica per il polimorfismo 160 in una popolazione di circa 300 soggetti che ha confermato l'associazione con l'ipertensione arteriosa, i valori pressori e la PWV. Il rischio relativo per l'ipertensione arteriosa dei soggetti che presentano il genotipo omozigote ed eterozigote (A/A+e +/-A) è risultato 1.28 rispetto al genotipo wild type.

Nonostante questi risultati non passino la correzione di Bonferroni per test multipli, appare evidente che un approccio a partenza dai geni candidati possa produrre risultati che sono rafforzati dalla basi fisiopatologiche considerate.

Appare quindi evidente che il polimorfismo 160 del gene ELN è coinvolto nel determinare i valori pressori. Inoltre l'elastina è un costituente fondamentale della parete vasale, quindi alterazioni di questa proteina possono influenzare la rigidità aortica. La conferma di quest'ipotesi ci viene dal fatto che il polimorfismo 160 del gene ELN risulta essere associato anche con PWV, misura della rigidità aortica.

### ***Ruolo della regione 9p21***

Mediante approccio genome wide è stata identificata una regione del cromosoma 9p21 associata allo sviluppo di coronaropatia, infarto miocardico, aneurismi dell'aorta addominale ed intracranici.

Inizialmente McPherson et al (148) hanno identificato una regione di 58 Kb sul cromosoma 9p21 associata all'aumento del rischio di coronaropatia nella popolazione caucasica.

Lo studio ha previsto 3 step: nel primo, mediante analisi GWA sono stati valutati 100.000 SNPs su un numero ristretto di pazienti selezionati tra i partecipanti all'Ottawa Heart Study (322 pazienti con coronaropatia insorta in età <60 anni e 312 controlli).

Dopo l'analisi genetica, è stato eseguito un controllo di qualità che prevedeva criteri come il rispetto dell'equilibrio di Hardy Weimberg e  $MAF > 1\%$ ; in questo modo soltanto 72864 SNPs furono ammessi all'analisi.

Dall'analisi 2582 SNPs sono risultati significativi ( $p < 0.025$ ), questi, nel secondo step, furono rivalutati su un campione caso-controllo indipendente (311 casi, 326 controlli). Da questa analisi furono identificati 50 SNPs che furono valutati, nel terzo step, in uno studio prospettico su un grande campione di 1347 casi e 9054 controlli.

Infine di questi 50, sono risultati associati significativamente con l'incidenza di coronaropatia 2 SNPs: ***rs10757274 e rs2383206***, siti nella regione 9p21 ad una distanza di 20kb l'uno dall'altro e in forte LD.

Questi due SNPs sono stati replicati e successivamente validati in 3 studi indipendenti prospettici su ampi gruppi di popolazione per un totale di 2297 casi e 10362 controlli, che hanno confermato l'associazione.

Così facendo, progressivamente vengono filtrate quelle associazioni che sono probabilmente spurie o deboli, restringendo il campo degli SNPs a quelli maggiormente significativi.

I due polimorfismi, essendo in forte LD, definiscono un allele fortemente associato con il rischio di coronaropatia, infatti, nel 50% dei soggetti che presentano eterozigosi il rischio di coronaropatia aumenta del 15-20%, nel 25% dei soggetti omozigoti il rischio aumenta del 30-40% .

Il meccanismo mediante il quale questi polimorfismi determinano un aumento del rischio non è chiaro, è però evidente che l'effetto di questo allele non è mediato da nessuno dei fattori di rischio cardiovascolare, dal momento che le correzioni per età, sesso, lipidi plasmatici, pressione arteriosa, diabete mellito e PCR non hanno inficiato l'associazione.

Per un mappaggio più preciso è stata condotta un'ulteriore analisi su 500 casi e 500 controlli con markers più ravvicinati che marcassero la zona contigua ai due SNPs significativi. In questo modo sono stati evidenziati 8 SNPs in forte LD con i precedenti 2. Viene così definito un aptotipo, che comprende una regione di 58 kb, fortemente associato a coronaropatia. Le successive indagini hanno dimostrato che nessun gene è presente nella regione di 58 kb, ma piuttosto è presente un RNA antisense non codificante nel locus INK4 (ANRIL) la cui funzione è ignota, ma che è altamente espresso nella placenta e nei linfociti trasformati. Interrogandosi sull'ipotesi fisiopatologica si è pensato che variazioni nell'espressione o funzione di questo trascritto possano essere associate con il rischio di coronaropatia. Alternativamente l'allele che conferisce rischio potrebbe influenzare l'espressione di geni collocati fuori dalla regione di 58 kb. I geni più prossimi sono rappresentati da inibitori delle chinasi ciclina dipendenti (CDKN2A e CDKN2B), dalla metil-tioadenosina fosforilasi (MTAP) e ARF.

Da allora, numerosi studi si sono focalizzati sulla regione 9p21.

Helgadóttir et al(183) hanno valutato, con approccio genome wide, l'incidenza di infarto miocardico sulla popolazione islandese (1607 casi, 6728 controlli). Tre SNPs sono risultati significativi: rs1333040, rs2383207 e rs 10116277, localizzati all'interno di un blocco di linkage disequilibrium di 190 kb nella regione 9p21. Successivamente questi 3 SNPs sono stati replicati su 4 popolazioni e, in tutte, la correlazione è stata confermata: il più significativo è risultato rs2383207.

Dopo aver valutato gli SNPs in linkage disequilibrium con rs2383207, 8 di questi sono stati scelti per essere genotipizzati nel campione: il più significativo è risultato rs10757278.

Anche in questo caso, le varianti genetiche si trovano sul cromosoma 9p21 in un blocco di LD che comprende il geni CDKN2A e CDKN2B. Il rischio di infarto miocardico e di

infarto miocardico precoce è aumentato da queste varianti del 21% e del 31% rispettivamente.

Una successiva replica e metanalisi(184) ha valutato il polimorfismo rs1333049 che si trova in LD sia con polimorfismi individuati da McPherson (rs10757274 e rs2383206) che da Helgadottir (rs1333040, rs2383207, rs 10116277 rs10757278).

In LD moderato con questo blocco, esiste un altro blocco confinante che contiene SNPs, associati a coronaropatia, che generano 5 aplotipi principali. Tre SNPs sono sufficienti a caratterizzare gli aplotipi: rs7044859, rs1292136 e rs7865618.

Questi 3 SNPs (rs7044859, rs1292136 e rs7865618) in associazione con il polimorfismo rs1333049 costituiscono l'aplotipo ACAC.

È stata condotta un'analisi di associazione fra i 4 SNPs e le coronaropatie. Dall'analisi è emerso che il polimorfismo rs1333049 è significativamente associato con coronaropatie, inoltre si è evidenziato come uno dei 5 aplotipi sia più frequente nei casi rispetto ai controlli.

La metanalisi condotta su 7 studi caso controllo ha confermato che il locus sul cromosoma 9p21 (9p21.3 e 9p21.2) è associato con le coronaropatie e con l'infarto miocardico, in modo indipendente dai fattori di rischio cardiovascolare. L'associazione è più forte per l'aplotipo ACAC e il polimorfismo rs1333049 sembra avere maggior effetto quando ha come background aplotipico ACA-. Queste evidenze si fondano su studi nella popolazione caucasica e non possono essere automaticamente applicate alle altre etnie in considerazione della forte componente geografica sopra ricordata.

Ulteriori evidenze hanno successivamente correlato il locus 9p21 con placche carotidee (Leipzig Heart study), aneurismi dell'aorta addominale ed intracranici.

Parallelamente diversi studi hanno indagato le possibili implicazioni fisiopatologiche della regione 9p21.

Lesca et al (185) hanno valutato l'espressione di ANRIL quantificando i suoi tre trascritti noti (NR\_003529, DQ485454 e EU741058) nei PBMC e nel sangue dei pazienti appartenenti al Leipzig Heart study (1134 pazienti con vario grado di coronaropatia angiograficamente dimostrato), dimostrando che l'aplotipo presente in 9p21 influenza l'espressione di NR\_003529 ed EU741058. L'aplotipo GGGG è, infatti, correlato con un aumento del 23% di EU741058 e del 12% di NR\_003529. Al contrario l'espressione di DQ485454 non ne viene influenzata. Si è inoltre evidenziato che i livelli di NR\_003529 in

modo maggiore, ma anche di EU741058 sono significativamente aumentati nei soggetti con elevato carico di placche carotidee.

Si è dunque dimostrato che un'elevata espressione di ANRIL, i cui trascritti NR\_003529 ed EU741058 sono influenzati dall'aplotipo presente in 9p21, è correlata con la suscettibilità all'aterosclerosi. Si è inoltre dimostrato che l'espressione dei geni limitrofi (MTAP, CDKN2A, CDKN2B) non è associata con la severità dell'aterosclerosi e non è influenzata dall'aplotipo del locus.

## **INFLUENZE GENETICHE SULL'ARTERIAL STIFFNESS**

Come precedentemente illustrato, molti fattori di rischio cardiovascolare sono noti, però l'esposizione ad essi non permette di spiegare completamente l'incidenza di eventi cardiovascolari (186-189).

Pertanto si è pensato che fattori genetici possano influenzare l'incidenza di patologie cardiovascolari e, più in particolare, influenzare l'arterial stiffness. Un'evidenza che corrobora quest'idea è che la relazione tra rigidità arteriosa e mortalità cardiovascolare o globale rimane significativa anche dopo aggiustamento per i classici fattori di rischio. Inoltre il valore predittivo della rigidità arteriosa è tanto più alto nei pazienti considerati a basso rischio per evento cardiovascolare sulla base delle comuni scale di rischio.

Già Boutouyrie et Al dimostrarono in uno studio longitudinale su un gruppo di 1045 pazienti ipertesi che un incremento di 3,5 m/s nel valore di PWV si accompagnava ad un rischio relativo di 1.42 e di 1.41 di eventi coronarici o di eventi cardiovascolari rispettivamente, applicando una correzione per i fattori di rischio classici, il rischio relativo non veniva sostanzialmente modificato.

Laurent et Al (189), allo stesso modo, dimostrarono, su un gruppo di 1715 ipertesi essenziali, che un aumento della PWV di 4 m/s si associava ad un rischio relativo di stroke di 1.72, dopo correzione per i fattori di rischio cardiovascolari il RR risultava 1.39.

Dunque è stato dimostrato che l'arterial stiffness subisce un'importante influenza genetica che risulta indipendente dall'esposizione a fattori come pressione arteriosa, età, frequenza cardiaca e fattori di rischio cardiovascolare come diabete mellito, fumo, obesità e dislipidemia (189).

Normalmente con l'invecchiamento si assiste ad una degenerazione delle fibre elastiche nella parete arteriosa e al parallelo aumento delle fibre collagene e della sostanza fondamentale, spesso accompagnante da calcificazioni.

Modelli animali hanno permesso di evidenziare i meccanismi cellulari e molecolari determinanti l'arterial stiffness. Nel ratto iperteso si è notato che, come previsto, la risposta al maggior carico pressorio si estrinseca nello sviluppo di un'ipertrofia di parete, sorprendentemente però, l'ipertrofia è accompagnata da una riduzione della rigidità di parete. Questo ha permesso di capire che l'ispessimento di parete, indotto dall'ipertensione, non è associato ad un incremento dell'arterial stiffness nel ratto iperteso, diversamente da quanto accade nei pazienti ipertesi.

Ulteriori indagini hanno dimostrato che il cambiamento strutturale nel ratto iperteso consiste in un aumento delle connessioni fra elastina e cellule muscolari lisce e una riduzione delle dimensioni delle fenestrature della lamina elastica interna, permettendo in questo modo di redistribuire il carico, senza determinare un aumento dell'arterial stiffness.

### ***Malattie monogeniche***

Lo studio delle patologie monogeniche che presentano manifestazioni a carico del tessuto connettivo appare utile nel determinare l'influenza delle componenti anomale sulla rigidità arteriosa.

La sindrome di Marfan è una patologia del connettivo autosomica dominante caratterizzata da anomalie scheletriche, oculari e cardiovascolari. La base fisiopatologica è una mutazione nel gene che codifica per la fibrillina 1, determinando anomalie nell'assemblamento delle fibre elastiche (190). In questi pazienti si registra un incremento dell'arterial stiffness limitato all'aorta, senza cambiamenti nella rigidità a livello carotideo, femorale e radiale(191).

Una manifestazione tipica di questa sindrome, che costituisce la principale morbilità di questi pazienti, è la dilatazione della radice aortica con associata insufficienza valvolare aortica, dissecazione e rottura aortica. Per sviluppare queste alterazione si ritiene importante il ruolo dello stress pulsatile, infatti la pulse pressure, influenzata dalla rigidità aortica risulta il maggior determinante del diametro della radice aortica di questi pazienti, mentre la pressione arteriosa media è ininfluenza. Si ritiene quindi che la dilatazione dell'aorta dipenda dall'incapacità delle fibre elastiche anormali di sostenere il fisiologico stress pulsatile. Le alterazioni della fibrillina 1 esitano in una lamina elastica più liscia e priva di adesione cellulare. La fibrillina 1 appare fondamentale nel mantenere una corretta organizzazione spaziale di parete assicurando un apporto fisiologico di elementi elastici.

La sindrome di Williams è una patologia su base genetica caratterizzata da deficit di statura, anomalie cardiovascolari come stenosi arteriose periferiche ed ipertensione arteriosa. Queste caratteristiche sembrano dovute alle delezione di un allele del gene dell'elastina(192). Nel modello murino, l'assenza di elastina determina la proliferazione delle cellule muscolari lisce e contribuisce alla genesi di patologie arteriose su base ostruttiva. Appare dunque un ruolo dell'elastina non solo nella struttura ma anche nella regolazione della proliferazione delle cellule muscolari lisce e nello stabilizzare la struttura arteriosa.

Aggoun et al (193) hanno dimostrato che lo spessore miointimale carotideo e la distensibilità carotidea sono significativamente aumentate nei bambini affetti da S. di Williams rispetto ai controlli.

Tali considerazioni hanno sollecitato l'evolversi di studi volti a valutare l'influenza genetica sull'arterial stiffness, partendo da studi di famiglia ed ereditabilità, studi su geni candidati fino a studi genome wide e a valutazioni del profilo di espressione genetica.

### ***Studi di famiglia ed ereditabilità***

Il Bogalusa Heart Study (194) è stato il primo studio a dimostrare un ruolo familiare nella rigidità arteriosa: ha, infatti, dimostrato che l'arterial stiffness è maggiore negli adolescenti con storia familiare di infarto miocardico e diabete rispetto agli adolescenti con genitori sani. Yasmin et Al (195) hanno evidenziato che l'augmentation index è significativamente più alto nei discendenti di famiglie di soggetti ipertesi rispetto ai controlli. Anche dopo correzione per i principali fattori di rischio cardiovascolare l'evidenza è conservata, anche se la PWV non ha dimostrato differenza significativa nei due gruppi, suggerendo un ruolo maggiore di una riduzione funzionale o strutturale del calibro delle arteriole.

Gaeta et Al (196) hanno dimostrato un aumento dell'IMT, misura surrogata della struttura della parete arteriosa e della funzione endoteliale, nella prole di pazienti con prematura coronaropatia rispetto ai soggetti normotesi. Si stima che l'IMT possa avere una componente di ereditabilità pari al 21-59% a seconda dei diversi studi.

Inoltre lo studio Strong Heart ha dimostrato che le alterazioni strutturali e funzionali dell'arteria carotide rappresentano una misura fenotipica di una patologia vascolare che contiene informazioni che vanno oltre quelle derivabili dall'analisi convenzionale del rischio cardiovascolare. Nello studio viene evidenziato come nella rigidità carotidea si possa indentificare un contributo pari al 51% dei comuni fattori come età sesso, diabete, ma che il 23% sia imputabile ad effetti genetici e di ereditabilità. Nello stesso studio si è evidenziato che la percentuale di ereditabilità dell'AIx è pari al 18%.

Studi sull'augmentation index fra gemelli monoziogoti ed eterozigoti hanno dimostrato che il 37% della variabilità dell'AIx risulta determinato da fattori genetici e, di questo 37% 44, solo una piccola parte è imputabile a geni che influenzano altezza, frequenza cardiaca e pressione arteriosa media.

Nonostante l'importanza della PWV, soltanto 2 studi ne hanno valutato l'ereditabilità, nell'Eramsums Rucphen Study (197), l'ereditabilità corretta per età e sesso, fu stimata in 36%, nel Framminggam Offspring Study (198) fu stimata in 40%, senza correzioni.

Riassumendo, appare evidente da questi studi che esiste un'ereditabilità tra il 13% e 54% nel fenotipo rigidità arteriosa.

## Studi su geni candidati

Come illustra la tabella 6, molti studi su varianti genetiche, che sono coinvolte fisiopatologicamente nel processo di stiffening, sono stati pubblicati.

Gene (chromosome location)	Population	Sample size (age)	Polymorphism	Phenotype	Association (+/-)
<b>Non-matrix gene</b>					
<i>AGT</i> (1q41-q45)	Untreated HT	<i>n</i> = 441 (18–74 years)	M235T and T174M	Aortic PWV	–
	Untreated HT	<i>n</i> = 98 (24–80 years)	M235T	IMT	+
	Untreated HT	<i>n</i> = 98 (24–80 years)	M235T	Distensibility	+
<i>ACE</i> (17q23)	Untreated HT	<i>n</i> = 441 (18–74 years)	I/D	Aortic PWV	–
	HT and NT	<i>n</i> = 311 (49 years) and <i>n</i> = 128 (44 years)	I/D	Aortic PWV	+
	Type II diabetics and NT	<i>n</i> = 137 (53 years) and <i>n</i> = 260 (53 years)	I/D	Aortic PWV	+
	Untreated HT	<i>n</i> = 469 (19–85 years)	I/D	Aortic PWV	+
	Untreated HT	<i>n</i> = 469 (19–85 years)	I/D	PP	+
	Healthy men and women	<i>n</i> = 3001 (72 years)	I/D	Distensibility	+
	Men and women	<i>n</i> = 756 (45 years)	I/D	Distensibility	+
	Healthy adults and offspring	<i>n</i> = 622 (< 40 years) and <i>n</i> = 328 (30 years)	I/D	Alx	–
	FLEMINGHO study	<i>n</i> = 380 (12–16 years)	I/D	IMT	+
<i>AGTR1</i> (3q21-q25)	Untreated HT	<i>n</i> = 134 (21–72 years)	A1166C	Aortic PWV	+
	HT and NT	<i>n</i> = 311 (49 years) and <i>n</i> = 128 (44 years)	A1166C	Aortic PWV	+
	HT	<i>n</i> = 185 (53 years)		Aortic PWV	+
	Untreated HT	<i>n</i> = 429 (18–74 years)	A1166C and A153G	Aortic PWV	+
<i>CYP11B2</i> (8q21-q22)	Untreated HT	<i>n</i> = 171 (47 years)	A1166C	Aortic PWV	+
	Essential HT	<i>n</i> = 216 (40 years)	C – 344T	Aortic PWV	+
	Untreated HT	<i>n</i> = 425 (19–85 years)		Aortic PWV	+
	Untreated HT	<i>n</i> = 441 (18–74 years)		Aortic PWV	–
	Healthy adults and offspring	<i>n</i> = 622 (< 40 years) and <i>n</i> = 328 (30 years)		Alx	+
<i>EDNI</i> (6p24)	Men and women	<i>n</i> = 756 (45 years)		Distensibility	–
	Untreated HT	<i>n</i> = 528 (19–79 years)	– 138I/D	Aortic PWV	+
<i>EDNRA</i> (4q31)	Untreated HT	<i>n</i> = 528 (19–79 years)	A – 231G and C1363T	Aortic PWV	+
	Untreated HT	<i>n</i> = 528 (19–79 years)			
<i>EDNRB</i> (13q22)	Untreated HT	<i>n</i> = 528 (19–79 years)	G30A	Aortic PWV	+
<i>GNB3</i> (12p13)	Healthy subjects	<i>n</i> = 99 (27 years)	C825T	Aortic PWV and Alx	+
	Healthy subjects	<i>n</i> = 99 (27 years)			
<i>NOS3</i> (7q35-q36)	Young adults	<i>n</i> = 118 and 285 (25–37 years)	G894T (E298D)	Petersen's and Young's elastic modulus	+
	Men and women	<i>n</i> = 553 and 604 (62 years)		PP, aortic PWV, and reflected and forward wave amplitudes	+
	HT and NTs	<i>n</i> = 311 (18–74 years) and <i>n</i> = 128 (19–72 years)		Aortic PWV	–
	Untreated HT	<i>n</i> = 171 (47 years)		Aortic PWV	+
<i>ADRB2</i> (5q31-q32)	Treated HT	<i>n</i> = 331 (62 years)	Q27E	Aortic PWV	+
	Twin study	<i>n</i> = 395 European-American and 275 African-American twins (14.6 years)	R16G and Q27E	PP	+
<b>Matrix gene</b>					
<i>ELN</i> (7q11.2)	Healthy adults	<i>n</i> = 320 (49 years)	S422G (A > G)	Distensibility	+
	Healthy adults	<i>n</i> = 320 (49 years)			
<i>COL1A1</i> (17q21.33)	Young healthy adults	<i>n</i> = 489 (22.6 years)	G2064T	Arterial compliance	+
	Healthy men	<i>n</i> = 245 (50–61 years)		PP and aortic stiffness ( $\beta$ )	+
<i>FBN1</i> (15q21.1)	Healthy male first-degree relatives with aortic aneurysm	<i>n</i> = 79 (28–81 years)	VNTR2,3 and 4	Distensibility	+
	Patients with CAD	<i>n</i> = 145 (62 years)		Carotid PP and impedance	+
	Healthy individuals	<i>n</i> = 742 (16–83 years)		Aortic PWV, Alx and PP	–
<i>MMP3</i> (11q23.3)	Untreated subjects in two groups	<i>n</i> = 320 (> 60 years and 30–60 years)	5A/6A (– 1612del/ins)	Aortic impedance	+
	Untreated subjects in two groups	<i>n</i> = 320 (> 60 years and 30–60 years)			
<i>MMP9</i> (20q11.2-q13.1)	Patients with CAD	<i>n</i> = 84 (61 years)	C – 1562T and R279Q	Aortic and characteristic impedance	+
	Healthy individuals	<i>n</i> = 865 (16–81 years)	C – 1562T and R279Q	Aortic PWV and Alx	+
	HT	<i>n</i> = 215 (46 years)	C – 1562T	Aortic PWV	+

### ***Polimorfismi genetici in geni candidati associati all'arterial stiffness.***

Gli studi hanno valutato principalmente due gruppi di geni candidati. Il primo gruppo è costituito da geni che non appartengono alla matrice connettivale, ma che sono coinvolti nella proliferazione cellulare ed ipertrofia vascolare, oppure geni che modificano le proprietà funzionali influenzando il controllo pressorio, come il sistema renina angiotensina aldosterone, l'NO sintetasi, l'endotelina e recettori dell'endotelina e le G protein.

Il secondo gruppo è costituito da geni che sono coinvolti nella struttura di parete o che modulano cambiamenti nelle proteine come elastina, collagene e fibrillina.

#### **▪ *Geni non appartenenti alla matrice***

Il sistema renina angiotensina aldosterone è coinvolto nel controllo della pressione arteriosa, nella produzione della matrice e nell'ipertrofia vascolare; per questo è ritenuto importante nel processo di irrigidimento arterioso. Molti studi hanno valutato l'associazione fra PWV e geni coinvolti in questo sistema come AGT (angiotensinogeno), ACE (enzima che converte l'angiotensina) AGTR1 (recettori di tipo 1 per l'angiotensina II), CYP11B2 (aldosterone sintetasi).

Evidenze che polimorfismi del gene ACE potrebbero essere implicati nel processo di irrigidimento arterioso derivano da associazioni positive in soggetti ipertesi(199) e diabetici(200). Nello studio Rotterdam(201) l'allele D del gene ACE è apparso inversamente associato alla distensibilità carotidea in soggetti adulti sani. Nello studio FLEMENGHO(202) sono stati studiati più polimorfismi del gene ACE: il polimorfismo I/D appare associato con la rigidità carotidea, mentre gli omozigoti DD presentano un aumento della PWV

Per quanto riguarda il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II, alcuni studi hanno valutato l'associazione del polimorfismo A1166C sulla PWV in soggetti ipertesi non trattati (202-207). Benetos et Al(205) hanno mostrato che, dopo aggiustamento per età, pressione arteriosa e BMI, un incremento dose dipendente nella PWV è osservato negli individui che presentavano l'allele C. In soggetti ipertesi non trattati i polimorfismi A1166CC e A153G influenzano l'aumento della rigidità aortica con l'età.

Lo studio dell'aldosterone sintetasi (CYP11B2) ha mostrato, in alcuni studi, un'associazione tra il polimorfismo T344C e un incremento di PWV (207-209). Pojoga et Al hanno dimostrato che la condizione di omozigote CC presenta elevati livelli di aldosterone

plasmatici rispetto agli omozigoti TT, in aggiunta i soggetti che presentano almeno un allele C presentano un più elevato grado di rigidità arteriosa.

Appare quindi forte l'ipotesi che varianti genetiche del sistema renina angiotensina aldosterone possano influenzare il processo di irrigidimento vascolare.

Le endoteline sono un gruppo di peptidi con potente effetto vasocostrittore che sono coinvolte nel rimodellamento vascolare (210). È stata evidenziata un'associazione fra il gene dell'endotelina1 (EDN1), il recettore per l'endotelina di tipo A (EDNRA) e di tipo b (EDNRB) e l'ipertensione (211,212) nonostante il ruolo dell'endotelina nell'ipertensione non sia completamente noto. Un'associazione positiva è riportata fra polimorfismi di EDNRA (A-231G e C1363T), EDNRB (G30A) ed EDN1 (-138I/D) e la PWV aortica (213).

Iemitsu et Al (214) hanno dimostrato che l'effetto dell'attività fisica sulla rigidità aortica è influenzata da alcuni polimorfismi presenti all'interno di EDNRA e EDNRB, infatti, nei soggetti che presentano il genotipo AA del il polimorfismo 958A/G di EDNRA e il genotipo AG e GG del polimorfismo 831A/G di EDNRB, l'attività fisica ha condotto ad una riduzione dell'arterial stiffness. Nei genotipi AG/GG e AA rispettivamente l'attività fisica non ha influenzato la rigidità arteriosa.

Le G protein sono una componente chiave di una pletora di cascate di signaling intracellulare, trasmettendo segnali da più di 1000 recettori a una grande varietà di molecole effettrici, come enzimi e canali ionici (215). È dimostrata un'associazione fra l'allele 825T del gene GNB3 (gene della subunità b3 delle Gprotein) e l'ipertensione (216-218). Nurnberger et Al (219) hanno esaminato le influenze di questo polimorfismo sull'arterial stiffness e sulle onde di riflessione. Gli individui che presentano l'allele T (TT e CT) presentano una PWV significativamente più alta rispetto agli omozigoti CC, indipendentemente dagli altri fattori. Il meccanismo che sottintende a questa associazione risulta poco chiaro, ma è stato suggerito che potrebbe essere correlato al rimodellamento vascolare dovuto all'aberrante proliferazione delle cellule muscolari lisce in risposta all'aumentata attività di NHE (scambiatore Na/H).

Appare evidente che anche il rilascio di fattori vasoattivi all'interno della parete arteriosa possa influenzare l'arterial stiffness, fra questi si pensa che un ruolo possa essere rivestito dalla NO sintetasi endoteliale. È stato, infatti, dimostrato che l'inibizione di tale enzima ha effetti sia sul tono vascolare che sulla pressione arteriosa(220-221). Il polimorfismo G894T del gene NOS3, che codifica per la NO sintetasi endoteliale, presenta un effetto

indipendente sull'arteria stiffness in giovani adulti di origine afro-americana(167). All'interno della coorte dello studio l'allele T si associa in modo significativo con una pressione arteriosa sistolica più bassa e con un più basso grado di rigidità carotidea, quest'associazione non è dimostrata nei soggetti di origine europea, nei quali l'allele T non è associato con la PWV aortica (222). Quest'osservazione rafforza l'idea che il gene NOS3 possa essere uno dei fattori responsabili delle differenze etniche osservate per l'ipertensione e l'arterial stiffness.

Un aspetto importante appare quello dell'infiammazione, molti studi infatti hanno mostrato un'associazione fra la proteina C reattiva, interleuchina 6, tumor necrosis factor  $\alpha$  e la PWV e l'elasticità arteriosa. Nei pazienti con storia di malattia di Kawasaki, è stato evidenziato un effetto sinergico fra i polimorfismi 1444 C/T del gene della PCR e -308A/G del gene TNF sulla rigidità carotidea.

Uno studio di Schumacher et Al ha mostrato una correlazione fra i polimorfismi rs1130864, rs1800947, rs1205 del gene PCR e i livelli plasmatici di PCR, non ha però dimostrato una correlazione con PWV. Questo suggerisce che nonostante PCR sia associata con PWV, non ha un ruolo causale nel determinare l'irrigidimento arterioso.

Nei giovani adulti sani è stato riportato un contributo genetico nel processo di irrigidimento arterioso da parte di molecole di adesione coinvolte nei processi infiammatori quali P selectine, ICAM1, VCAM1.

Nel Bogalusa Heart Study è stata inoltre riportata un'influenza sulla rigidità arteriosa negli adulti di razza bianca e nei giovani di razza nera da parte di polimorfismi dei recettori  $\beta$  adrenergici come  $\beta$ 1-AR Arg389Gly,  $\beta$ 2-AR Arg16Gly e  $\beta$ 3-AR Trp64Arg.

Valutando alcuni polimorfismi appartenenti ai geni del fibrinogeno alfa (FGA) e gamma (FGG), Sie et Al hanno dimostrato un'associazione fra l'aplotipo 3 del gene FGA, l'aplotipo 2 del gene FGG e l'aortic stiffness nella porzione femminile del campione di 3891 soggetti.

Recentemente è stata posta l'attenzione sul ruolo dei recettori per gli advanced glycation endproducts (RAGE) nello sviluppo di patologia vascolare. Engele et Al hanno studiato 9 tag SNPs che coprono le principali variazioni genetiche di RAGE in 1291 soggetti, comprendendo soggetti euglicemici, soggetti con iperglicemia a digiuno/ridotta tolleranza glucidica e soggetti affetti da diabete mellito tipo 2. Si è dimostrato che il genotipo AA per il polimorfismo rs1800624 è costantemente associato con livelli più bassi di pressione arteriosa sistolica e diastolica, pulse pressure ed arterial stiffness nei soggetti euglicemici; lo

stesso polimorfismo nei soggetti con alterato metabolismo glucidico e diabete mellito tipo 2 con pressione arteriosa sistolica e diastolica, pulse pressure e arterial stiffness maggiori. Questo polimorfismo appare avere un effetto protettivo da un lato e sfavorevole dall'altro.

▪ ***Geni appartenenti alla matrice***

Il processo di irrigidimento arterioso include alterazioni strutturali a carico di elementi quali elastina e collagene, che sono le proteine principali della matrice extracellulare. La struttura di queste proteine non è fissa dal momento che possono essere sintetizzate, possono essere degradate da enzimi quali le elastasi e le metalloproteinasi di matrice (MMPs) e possono essere modificate dalla glicosilazione.

Numerosi studi hanno indagato le variazioni genetiche delle proteine della matrice extracellulare, per l'evidenza della loro funzione di modulazione del rimodellamento arterioso.

L'elastina è la principale proteina che conferisce elasticità alle grandi arterie. Molte evidenze suggeriscono che la rottura delle fibre elastiche arteriose e la proliferazione dell'intima nelle grandi arterie comporta una modificazione quantitativa e qualitativa dell'elastina durante lo sviluppo vascolare (221-225). Studi molecolari genetici su topi knock out, su patologie genetiche umane, come la sopra citata Sindrome di Williams, e su adulti normotesi hanno identificato delezioni, mutazioni e numerosi polimorfismi del gene dell'elastina (ELN) che, rompendo le fibre elastiche, determinano un lume vasale ridotto, alterando le proprietà biomeccaniche della parete arteriosa (226,227).

Uno studio (228), ha valutato l'associazione tra il polimorfismo S422G o A>G del gene ELN e la distensibilità carotidea: il genotipo AA e AG si associano ad una riduzione della distensibilità confrontato al genotipo GG. Nessuna associazione è risultata evidente fra il polimorfismo e l'arteria radiale. Questo sottolinea la differente istologia delle due arterie: la carotide presenta un'importante componente elastica e pertanto influenzata dai polimorfismi di ELN, diversamente dalla radiale che è principalmente muscolare. Come precedentemente evidenziato, i polimorfismi 145, 158 (rs3757587) e 160 (rs34208922) risultano associati, nella popolazione giapponese con ipertensione arteriosa e PWV.

Brull et Al (229) hanno valutato l'impatto del polimorfismo G2064T del gene COL1a, che codifica per il collagene di tipo 1a, sulla compliance arteriosa evidenziando che il genotipo GG si caratterizzava per arterie più complianti rispetto al genotipo TT, in modo indipendente dalla pressione arteriosa e dalla storia familiare di ipertensione.

La fibrillina 1 è la proteina, che se mutata, causa la S. di Marfan. All'interno del gene che la codifica è stato evidenziato un VNTR (variable nucleotide tandem repeat), un polimorfismo che si caratterizza per la ripetizione di nucleotidi in tandem all'interno dell'introne 28. Alcuni alleli presenti in questo polimorfismo sono associati con la sclerosi sistemica e con PP nei soggetti sani. Medley et Al (230) hanno dimostrato che i pazienti con genotipo 2-3 della sequenza TAAAA presentano arterie più rigide, maggiore PP e coronaropatie più gravi dei pazienti con gli altri genotipi (2-2 e 2-4).

Powel et Al (231) hanno confermato questa osservazione riportando che pazienti con genotipo 2-3 presentavano PP maggiori rispetto a 2-2 e 2-4.

Non è pienamente chiaro il meccanismo per cui un polimorfismo sito a livello intronico possa influenzare la rigidità della grandi arterie, potrebbe però dipendere da un'alterazione dell'espressione genica o da un'alterazione dello splicing dal momento che il polimorfismo è localizzato in prossimità di un sito di splicing dell'esone 28 del gene FBN1.

Uno studio sulla popolazione giapponese ha evidenziato un'associazione fra il polimorfismo -1030C/T nella regione promotrice del gene della laminina e PWV, i soggetti con genotipo CC presentavano valori significativamente maggiori rispetto ai soggetti CT e TT, anche dopo correzione per età, pressione arteriosa sistolica e BMI.

L'omeostasi della matrice extracellulare è un determinante critico delle proprietà dei vasi sanguigni e i meccanismi implicati nella deposizione e nel turnover delle proteine strutturali giocano un ruolo importante nel processo di irrigidimento vascolare. Sono emerse particolari evidenze dell'importanza delle metalloproteinasi di matrice che ne regolano l'omeostasi. Tra queste la MMP3 e MMP9 rivestono un ruolo molto importante nell'aumentare la suscettibilità alle coronaropatie, aneurismi dell'aorta e rigidità vascolare.

La MMP3 è coinvolta in numerose condizioni cardiovascolari ed è critica nella regolazione della rigidità arteriosa. Il polimorfismo più studiato è il -1612 5A/6A che si trova nella regione promotrice del gene, infatti legandosi ai fattori di trascrizione regola l'espressione genica. Entrambi gli alleli sono associati con eventi coronarici e aneurismi aortici (232,233). L'allele 6A è associato con l'aumento dell'IMT carotideo e con le proprietà elastiche dei grossi vasi (234,235), gli omozigoti per l'allele 6A presentano una maggiore progressione di patologie dimostrate angiograficamente rispetto ai soggetti 5A/5° (236). Medley et Al (237) hanno dimostrato che il genotipo eterozigote 5A/6A è associato con la rigidità delle arterie di grosso calibro negli anziani, ma non nei giovani a basso rischio cardiovascolare.

La MMP9 è particolarmente importante nel rimodellamento della parete arteriosa, dal momento che degrada l'elastina e altre proteine della membrana basale. È grandemente espressa nelle placche aterosclerotiche ed è associata a numerose condizioni cardiovascolari (238,239). Nonostante l'espressione genica della MMP9 sia strettamente controllata a livello della trascrizione, numerosi fattori come markers infiammatori e varianti genetiche ne influenzano la produzione.

Due polimorfismi appaiono rilevanti: C-1562T (rs3918242) nella regione promotrice e R279Q (rs17576) nella regione codificante. Medley et Al (240) hanno dimostrato l'associazione fra C-1562T e l'irrigidimento vascolare nei soggetti con coronaropatia, la presenza dell'allele T determina la presenza di arterie significativamente più rigide e pressione arteriosa sistolica più alta rispetto agli omozigoti CC, su campioni biotipici di aorta si è evidenziata una maggior livello di MMP9 nei portatori dell'allele T. Yasmin et Al analizzando i due polimorfismi sopra citati hanno evidenziato che i soggetti che presentano l'allele T e Q presentano PWV aortica e AIx maggiori rispetto ai soggetti che presentano CC e RR rispettivamente. È stato confermato che la presenza degli alleli T e Q si accompagna a livelli più elevati di MMP9. Queste osservazioni suggeriscono che la rigidità delle grosse arterie possa essere attribuita, nei soggetti che portano gli alleli sfavorevoli, all'aumentata degradazione della matrice di parete.

### Studi genome wide

Molti studi sono stati compiuti, come mostra la tabella 7, valutando PP e numerose regioni cromosomiche sono state identificate come significative e suggestive di linkage (LOD fra 2.70 e 5.07), però pochi studi replica sono stati eseguiti.

Source	Population	Number of genotyped individuals	Age (years)	Parameter measured	Heritability	Location with evidence of linkage (chromosome, cM)	Type of evidence
Atwood <i>et al.</i> <sup>5</sup>	Mexican Americans	441 (10 families)	40-60	PP	0.21	4-114, 8-154, 18-116, 21-46	Suggestive
Camp <i>et al.</i> <sup>6</sup>	Utahns	1454 (26 pedigrees)	27.8 ± 18.2	PP	0.25	8-54, 12-109	Suggestive
DeStefano <i>et al.</i> <sup>7</sup>	Framingham Heart Study	1584 (345 pedigrees)	47.5 ± 8.8	PP	0.51	15-122, 5-53, 7-71, 7-152, 8-140, 10-81, 22-36	Suggestive
Bielinski <i>et al.</i> <sup>8</sup>	Family blood pressure program (FBPP)	10 798 (3320 families)	13 to 93 mean = 52	PP	0.29	18-75, 1-200, 21-25	Suggestive
Mitchell <i>et al.</i> <sup>12</sup>	Framingham Offspring Study	1480 (heritability) 590 (linkage) (204 families)	60 ± 10 58 ± 10	CFPWV Central PP FWA RWA RWTT MAP PP	0.40 0.35 0.21 0.28 0.48 0.33	2-94, 7-29, 13-108, 15-108 7-172, 9-160, 15-122 7-174 4-181 8-33, 1-27, 9-22, 9-164 1-192 7-79, 11-17	Suggestive Suggestive Significant Significant Suggestive Suggestive Significant
Turner <i>et al.</i> <sup>10</sup>	Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) of the FBPP	488 (223 families)	64.7 ± 7.5	PP	0.294	3-6, 7-85, 11-15	Significant
Turner <i>et al.</i> <sup>9</sup>	GENOA of the FBPP	948 (393 families)	59.6 ± 9.9	PP	0.26	7-37	Significant
Franceschini <i>et al.</i> <sup>13</sup>	Strong Heart Family Study	1892 (14 pedigrees)	14-93	PP	0.25	19-92	Suggestive
Levy <i>et al.</i> <sup>50</sup>	Framingham Offspring Study	644	28-62	CFPWV FW RW	0.43 0.22 0.66	2-74, 18-40, 15-100, 4-12 3-60 8-19, 9-10, 4-169, 15-100, 1-12	Suggestive

PP, pulse pressure; CFPWV, carotid-femoral pulse wave velocity; FWA, forward wave amplitude; RWA, reflected wave amplitude; RWTT, reflected wave transit time; MAP, mean arterial pressure.

**Tabella7.** Studi genome wide sull'arterial stiffness.

Un fattore che ha causato risultati inconsistenti e a volte contrastanti è probabilmente l'eterogeneità del campione, differenze dal disegno dello studio e nella raccolta dati, diverse condizioni di rischio cardiovascolare al momento del reclutamento. In alcuni studi è stato commesso l'errore di reclutare soggetti relativamente giovani, in cui valutare la PP, infatti, come mostra Franklin (241), la PP cresce decisamente dopo i 50 anni di età, inoltre nei giovani la PP è determinata prevalentemente dalla funzione eiettiva del ventricolo sinistro.

Nel 2001 Atwood et Al (242) hanno scoperto per la prima volta 4 regioni cromosomiche che mostravano linkage suggestivo ( $LOD > 1.9$ ) per PP. La concordanza fra i loci suggestivi per PP e per pressione arteriosa, così come la presenza nella stessa regione di geni candidati, come l'aldosterone sintetasi, hanno fatto inizialmente pensare che la PP e la pressione arteriosa sistolica condividano la medesima base genetica. Questi risultati sono stati successivamente confermati da Camp (243), che ha evidenziato la medesima regione nel cromosoma 8, inoltre la regione sul cromosoma 8 e una sul cromosoma 12 risultano in maggior linkage per PP rispetto a pressione arteriosa sistolica, in questo modo si è iniziato a pensare che i geni coinvolti nella determinazione della PP potessero essere differenti da quelli coinvolti nella determinazione della pressione arteriosa sistolica.

Successivamente l'analisi di DeStefano et Al (244) nel Frammingham Heart Study ha supportato quest'idea dimostrando che soltanto uno delle 3 regioni cromosomiche con  $LOD > 2$  per PP si sovrapponeva al picco di linkage per la pressione arteriosa sistolica.

Usando un'analisi multivariata di linkage, Turner et Al (245) hanno identificato loci genetici più statisticamente significativi per PP associata a calcificazioni coronariche (cromosoma 1 e 11), atrofia cerebrale (cromosoma 11 e 16) o creatinina sierica (cromosoma 5) rispetto a ciascun tratto da solo, questo potrebbe riflettere l'effetto pleiotropico di un singolo gene o di geni contigui.

Franceschini et Al (246) hanno condotto un'analisi genome wide sulla pulse pressure in 1892 indiani americani partecipanti al Strong Heart Family Study. La pulse pressure, derivata dalla media di due misurazioni pressorie, è stata corretta per età e sesso. È stato individuato un quantitative trait locus che influenza PP sul cromosoma 7 a 37 cM ( $LOD = 3.3$ ) e un'evidenza suggestiva di linkage sul cromosoma 19 a 92 cM ( $LOD = 1.8$ ).

Alla luce delle limitazioni del parametro PP evidenziate in precedenza, è apparso quindi più opportuno studiare PWV.

Nel Framingham Heart Study, Mitchell et al (247) hanno dimostrato 4 regioni suggestive per linkage con PWV: sul cromosoma 2 a 94 cM (LOD=2.46), sul cromosoma 7 a 29 cM (LOD=2.50), sul cromosoma 13 a 108 cM (LOD=2.10) e sul cromosoma 15 a 108 cM (LOD 2.50). In queste regioni sono presenti potenziali geni candidati come il recettore per l'insulin growth factor-1 (IGF1R), myocyte specific enhancer factor 2a (MEF2A), condroitin sintetasi (CHSY1), convertasi di proproteine (PACE4 e FURIN),  $\beta$  adducina (ADD2), recettore per la neurochinina 1 (TACR1), recettori  $\beta$  adrenergici (ADRA2B) e interleuchina 6 (IL6). Alcuni di questi geni, quali IGF1R, MEF2A, CHSY1 e PACE4, erano già stati indicati come geni candidati da De Stefano.

Partendo dal presupposto che numerosi studi genome wide hanno evidenziato un'associazione fra la regione 9p21.3 e diverse patologie cardiovascolari come coronaropatie, aneurismi aortici ed intracranici, ma nessuna associazione con fenotipi intermedi è stata ancora descritta, Bjorck et al (248) hanno valutato una possibile influenza di questa regione cromosomica sul grado di rigidità dell'aorta in soggetti anziani. Su un campione di 400 soggetti, di età compresa fra 70-88 anni, è stata valutata l'associazione fra rs10757274, rs 2891168 (polimorfismi presenti nella regione e associati a coronaropatia), rs10811661 (polimorfismo associato con diabete mellito tipo 2) e la rigidità arteriosa misurata a metà fra arterie renali e biforcazione aortica. La compliance aortica e i coefficienti di distensibilità sono risultati più alti nei soggetti che presentavano l'allele rs10757274G e rs2891168G riflettendo una riduzione della rigidità aortica; la correzione per età e pressione arteriosa media non ha inficiato l'associazione. I due polimorfismi non hanno mostrato associazione con spessore miointimale e diametro dell'aorta. Il polimorfismo rs10811661 non ha mostrato associazione con nessuna misura della rigidità aortica. Si ritiene che l'associazione fra questi due polimorfismi e la patologia vascolare possa essere dovuta a deterioramento delle proprietà meccaniche della parete arteriosa.

Tarasov et al (249) hanno condotto uno studio di associazione genome wide su una coorte di 4221 soggetti provenienti dalla valle di Lanusei in Sardegna usando un chip che ha permesso di analizzare 362000 SNPs e correlarli con PWV. Dopo la prima analisi, corretta per età e sesso, 85 SNPs sono risultati significativi. Di questi 85, 43 non sono risultati in LD e sono stati inclusi in un chip personalizzato. È stata quindi condotta una nuova analisi su 1828 soggetti della coorte precedente. Di questi 43 SNPs 2 sono risultati significativi: rs3742207 appartenente al gene COL4A1 (cr 13) e rs1495448 appartenente al gene MAGI1 (cr 3). Successive correzioni e metanalisi sul campione hanno rafforzato l'associazione di

rs3742207 e indebolito quella di rs1495448. Questi due loci furono successivamente valutati in una popolazione di Amish, popolazione geneticamente distante da quella Europea, dall'analisi il polimorfismo rs3742207 è risultato associato con PWV, mentre il polimorfismo rs1495448 non lo è risultato.

Lo SNP rs3742207 è situato all'interno dell'esone 45 gene del collagene di tipo 4 (principale componente della membrana basale) e media una sostituzione aminoacidica (Istidina in luogo di Glicina) in posizione 1334, localizzata nella regione centrale della proteina caratterizzata per domini ripetuti di triple eliche.

Questo studio suggerisce che le interazioni fra le cellule e la matrice potrebbero avere un ruolo importante nel regolare la rigidità arteriosa.

In conclusione gli studi genome-wide per l'arterial stiffness sono relativamente recenti, specialmente quelli correlati con PWV. Appare importante rilevare se queste associazioni genetiche siano correlate a specifici determinanti molecolari dell'arterial stiffness o alle patologie che poi determinano il procedimento di irrigidimento vascolare.

Risulta di difficile comprensione la ragione per cui nessuno dei geni candidati, i cui polimorfismi sono risultati associati all'arterial stiffness, sia emerso dall'analisi genome wide. Quest'osservazione insieme alla mancanza di coerenza nei loci identificati fra i diversi studi è la cifra della complessità della regolazione genetica dell'arterial stiffness nella popolazione generale.

Ci sono molte ragioni per l'apparente mancanza di concordanza fra gli studi di linkage genome wide e gli studi di associazione su geni candidati. Molti degli studi genome wide sono stati condotti su popolazioni selezionate, la limitazione di questi studi risiede principalmente nell'esistenza di associazioni multiple e deboli, dovute a piccoli effetti fenotipici degli alleli individuali, complesse interazioni epistatiche, mancanza di potenza statistica ed incompleta copertura del genoma con i markers.

Dall'altro lato gli studi di associazione su geni candidati potrebbero soffrire di potenza statistica dal momento che sono basati su singola ipotesi e su campioni più ridotti.

Per motivi metodologici gli studi su geni candidati sono iniziati molti anni prima rispetto a quelli genome wide, oggi giorno però gli studi si stanno spostando verso un approccio genome wide, mediante l'uso pannelli di tag SNPs che coprono tutto il genoma.

### ***Valutazione del profilo di espressione genica***

Solo pochi studi hanno analizzato il profilo di espressione genica usando microarray per la valutazione dell'RNA. Confrontando campioni di aorta patologica e normale, Durier et Al (250) hanno identificato 151 trascritti espressi in maniera significativamente diversa fra aorte sane e rigide, di questi, 32 trascritti sono significativamente associati, in modo positivo o negativo con PWV. Questi trascritti appartengono a geni codificanti per proteine strutturali, elementi del citoscheletro e molecole di signaling cellulare. Cambiamenti nel profilo delle molecole di signaling potrebbero essere coinvolti nella regolazione dell'organizzazione del citoscheletro, nelle interazioni cellule-matrice o nello stato contrattile delle cellule.

Nei soggetti con insufficienza renale cronica, che notoriamente è una condizione che anticipa l'irrigidimento vascolare, è stata mostrata un'aumentata espressione di trascritti di geni coinvolti nella regolazione della polimerizzazione dei filamenti di actina e nella migrazione e organizzazione delle cellule muscolari lisce dei vasi.

Questo suggerisce che, non solo cambiamenti nelle proteine di struttura della matrice extracellulare, ma anche nell'espressione di molecole di signaling giocano un ruolo importante nel processo di irrigidimento vascolare.

### ***Potenziali terapeutici***

L'arterial stiffness è principalmente influenzata da 3 fattori: pressione arteriosa media, tono delle cellule muscolari lisce e proteine strutturali.

La maggior parte delle medicine prescritte dai medici funziona tra il 30 e il 50% dei casi per il modo in cui i geni del paziente interferiscono con la cura. La ricerca farmacologica oggi si concentra su farmaci mirati ad un numero limitato di pazienti con dei geni specifici

Molti studi hanno usato farmaci antiipertensivi tradizionali, come diuretici tiazidici, ACE inibitori e calcio antagonisti, per ridurre l'arterial stiffness attraverso la riduzione della pressione arteriosa, conducendo però a risultati contrastanti. Ciò potrebbe essere dovuto all'uso di molecole farmacologiche diverse, diverso effetto su arterie muscolari ed elastiche, non omogenea inclusione.

In altri studi farmaci vasoattivi come i nitroderivati sono stati impiegati per ridurre il tono vascolare. Queste terapie puntano ad una riduzione indiretta della rigidità arteriosa, agendo sui suoi determinanti.

Nuovi spunti per ridurre direttamente l'arterial stiffness sono derivati dall'impiego di farmaci anti aldosteronici e statine. Lo Spironolattone si è dimostrato efficace nel ridurre la PWV brachiale e i livelli di PIIINP (peptide N terminale del procollagene) nei soggetti diabetici ipertesi.

Le statine hanno mostrato effetti ancillari come il miglioramento della funzione endoteliale, aumento della biodisponibilità di NO, effetti antiossidanti ed antiinfiammatori e di modulazione delle proprietà di parete arteriosa.

Inoltre l'identificazione di geni differentemente espressi nel tessuto aortico normale e patologico potrebbe facilitare l'identificazione di potenziali target farmacologici per ridurre la rigidità arteriosa.

## SCOPO DELLO STUDIO

Alla luce dell'inconfutabile rilevanza epidemiologica delle patologie cardiovascolari, molti sforzi sono stati compiuti per ricercare da un lato, fattori di rischio coinvolti nella loro genesi, dall'altro marcatori precoci in grado predirne lo sviluppo.

Tra questi, un ruolo importante ha assunto la PWV, indice affidabile di arterial stiffness e predittore indipendente di eventi cardiovascolari, che presenta maggior valore predittivo nei pazienti considerati a basso rischio sulla base delle comuni scale di valutazione come sottolineato nelle ultime linee guida.

Per quanto si siano identificati fattori di rischio modificabili e non modificabili, non siamo ancora in grado di spiegare completamente l'incidenza delle patologie cardiovascolari.

La letteratura si è concentrata negli ultimi anni sui polimorfismi a singolo nucleotide, che rappresentano mutazioni relativamente diffuse nella popolazione e che nella maggior parte dei casi non sono responsabili di un fenotipo evidente ma attraverso una complessa interazione multifattoriale possono influenzare lo sviluppo di una malattia cardiovascolare.

Numerosi studi infatti hanno valutato l'influenza genetica su patologie cardiovascolari quali coronaropatie, infarto miocardico, aneurismi dell'aorta addominale ed intracranici. Non molti però, hanno valutato end point intermedi come PWV.

Partendo da queste considerazioni abbiamo progettato uno studio per valutare l'associazione fra la PWV carotido-femorale e 384 SNPs in un gruppo di pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale.

La scelta dei polimorfismi è caduta su alcuni SNPs presenti in geni candidati fisiopatologicamente correlati con la patologia vascolare:

- *rs3918242 e rs17576* all'interno del gene della metallo proteinasi 9 (MMP9),
- *rs34208922 ed rs3757587* all'interno del gene codificante per l'elastina (ELN),
- *rs5334 e rs1801708* all'interno del gene del recettore di tipo A per le endoteline (EDNRA)
- SNPs mappanti il braccio corto del cromosoma 9 e, in particolare, la regione 9p21 (fra cui *rs10757274, rs2383206* e SNPs presenti nei geni *CDKN2A, CDKN2B, MTAP*).

## **MATERIALI E METODI**

### ***Popolazione***

Sono stati valutati 821 soggetti afferenti al Day Service del Centro Ipertensione dell'Ospedale San Gerardo di Monza, giunti in seguito al primo riscontro di ipertensione arteriosa o per una valutazione del danno d'organo in pazienti ipertesi già noti.

### **Criteri di inclusione:**

- uomini o donne di età compresa tra i 18 e gli 80 anni,
- ipertensione arteriosa essenziale ( $PAS \geq 140$  mmHg e/o  $PAD \geq 90$  mmHg, pazienti già in trattamento farmacologico ipotensivo e/o pazienti nei quali si sono riscontrati valori pressori oltre i limiti di norma al Monitoraggio Pressorio delle 24h)
- pazienti che hanno accettato di sottoscrivere un consenso informato per l'esecuzione dello studio ed all'uso dei dati personali e di analisi molecolare.

### **Criteri di esclusione:**

- ipertensione arteriosa di natura secondaria
- pazienti un cui consanguineo sia già stato reclutato nel medesimo studio
- aritmia cardiaca
- donne in stato di gravidanza
- pazienti colpiti da eventi acuti cerebrovascolari nel mese precedente lo studio
- pazienti affetti da sindromi genetiche note
- pazienti affetti da condizioni mediche tali da interferire con la corretta esecuzione dello studio

Prima del reclutamento allo studio è stato ottenuto un consenso informato da ciascun soggetto in accordo con le raccomandazioni della *Dichiarazione di Helsinki* (251) e preventivamente approvato dal comitato etico del San Gerardo di Monza.

### ***Visita medica***

Durante la visita medica si sono ottenute le seguenti informazioni:

- valutazione dei criteri di inclusione/esclusione.
- luogo e data di nascita (particolarmente le origini geografiche)

- peso corporeo, altezza, BMI (Kg/m<sup>2</sup>), misurazione circonferenza vita e fianchi.
- familiarità per malattie cardiovascolari, ictus o diabete mellito.
- abitudine al fumo di sigaretta, distinguendo i soggetti in non fumatori, fumatori ed ex fumatori; nel caso in cui il paziente riferisse di essere fumatore attivo, è stata anche indagata la quantità di sigarette fumate ogni giorno.
- abitudine al consumo di alcol; nel caso il paziente riferisse di consumare alcol, è stata anche indagata la quantità assunta/die.
- abitudine al consumo di caffè.
- epoca di diagnosi di ipertensione arteriosa.
- storia di TIA o ictus, cardiopatia ischemica, diabete mellito.
- terapia medica in atto.
- esame obiettivo.
- pressione arteriosa ottenuta con metodica sfigmomanometrica e con metodica semiautomatica.

### ***Alterazioni metaboliche***

La presenza di alterazioni metaboliche è stata definita nel modo seguente:

- il sovrappeso e l'obesità, attraverso il calcolo del BMI (rispettivamente  $\geq 25 \text{Kg/m}^2$  e  $\geq 30 \text{Kg/m}^2$ ) (8)
- l'ipertensione arteriosa, attraverso quanto riportato nelle linee guida del ESH/ESC 2007 (1,2) e dall'US Adult Treatment Panel III of National Cholesterol Education Program ( $\text{PA} \geq 130/85 \text{mmHg}$  o utilizzo di farmaci anti-ipertensivi) (8);
- il diabete mellito, in base alle linee guida americane 1997, come anche l'intolleranza glucidica (glicemia a 2 ore dall'OGTT  $\geq 140 \text{mg/dl}$ ) e l'alterata glicemia a digiuno (se tra 110 e 126mg/dl);
- l'ipercolesterolemia totale e l'ipertrigliceridemia in base alle linee guida dell' US National Cholesterol Education Program (colesterolo  $\geq 200 \text{mg/dl}$  e trigliceridi  $\geq 150 \text{mg/dl}$ ) (8);

### ***Danno cardiovascolare***

Per valutare il danno d'organo cardiovascolare nei soggetti sono stati considerati:

- le alterazioni della geometria ventricolare sinistra: in base al dato ecocardiografico di massa ventricolare (patologico  $>116\text{g}/\text{m}^2$ ) e H/R (patologico  $>0.42$ ) (98-102);
- l'alterato rilasciamento ventricolare in base al dato ecocardiografico di E/A+deceleration time;
- la malattia aterosclerotica carotidea definita in quattro gradi in base al dato ecocolordoppler dei tronchi sovra-aortici: ispessimento miointimale (IMT $>0.9$ ), placca (IMT $>1.5$ ), stenosi non emodinamicamente significativa, emodinamicamente significativa (accelerazione di flusso)(103-106);
- il danno renale in base al valore di filtrato glomerulare calcolato mediante formula MDRD, microalbuminuria (spot), clearance creatinina calcolata secondo formule crok (82).

### ***Rischio relativo.***

I fattori considerati per valutare il rischio rispetto alla popolazione generale di pari età sono quelli definiti nelle linee guida dell'ipertensione arteriosa 2007 (1,2)(**tabella**).

### ***Misurazione della pressione arteriosa.***

La pressione arteriosa è stata misurata mediante metodica oscillometrica semi automatica (apparecchio Dinamap): la misurazione è stata eseguita al braccio, a paziente in posizione supina, ripetendo la manovra a intervalli di due minuti. Dopo aver gonfiato il manicotto si esercitava una deflazione dello stesso, consentendo la rilevazione della PA sistolica, diastolica e media, nonché della frequenza cardiaca. Ciò è reso possibile da un trasduttore meccanico altamente sensibile posizionato all'interno del manicotto che registra non solo la pressione nel manicotto, ma anche le minime oscillazioni che originano dalla dislocazione della parete arteriosa conseguente alla differenza tra la pressione del manicotto e quella del vaso. Tale approccio cerca di minimizzare l'eventuale incremento pressorio da "effetto camice bianco".

## *Danno d'organo*

### *Doppler TSA*

L'indagine ultrasonografica a livello carotideo è stata condotta con un apparecchio PHILIPS 5500 dotato di sonda lineare di 7.5 MHz.

Il paziente è stato fatto sdraiare supino su un lettino con l'operatore alle sue spalle. A paziente fermo, con il collo leggermente esteso e ruotato verso il lato opposto a quello che si intende esaminare, si è proceduto ponendo la sonda tra la tiroide e il muscolo sternocleidomastoideo (approccio anteriore) o posteriormente allo sternocleidomastoideo (approccio posterolaterale), senza esercitare compressioni eccessive.

L'esame standard del distretto carotideo con una sonda ad alta frequenza consiste nell'utilizzo di tre modalità: l'analisi in B-mode con scala di grigi (B-mode gray scale imaging), il color-Doppler sia sulle sezioni longitudinali che su quelle assiali e il doppler pulsato per l'analisi delle velocità di flusso in sezioni longitudinali.

Il primo step è stato quello di visualizzare la carotide comune, la biforcazione, la carotide interna per il tratto più lungo possibile e la carotide esterna.

Sono state raccolte prima di tutto scansioni longitudinali della carotide comune, visualizzata come una formazione nastriforme anecogena.

Una volta identificata la carotide comune, sulla parete posteriore, 3 cm al di sotto della biforcazione, si è proceduto alla misurazione dello spessore miointimale (IMT).

Le misurazioni sono state ricavate visualizzando l'arteria in B-mode, congelandola e andando a misurare la distanza tra la linea iperecogena più interna corrispondente all'interfaccia lume-intima e la linea iperecogena più esterna corrispondente all'interfaccia media-avventizia. Infine, sebbene la relazione tra IMT e eventi cardiovascolari sia continua, convenzionalmente le linee guida definiscono come ispessimento miointimale un  $IMT > 0.9\text{mm}$  mentre la placca aterosclerotica viene definita come un ispessimento focale maggiore di 1.3 - 1.5 mm.

### ***Ecocardiocolordoppler***

È stato possibile eseguire una valutazione ecocardiografica mediante l'utilizzo di un ecografo SONOS 5500 (Philips) e una sonda piezoelettrica di 2.5 o 3.5 MHz. Sono state usate la proiezione parasternale sinistra (M-MODE) e la proiezione apicale 4 camere (B-MODE), secondo le linee-guida della Società Americana di Ecocardiografia (36).

Le variabili ecocardiografiche che sono state considerate sulla media di 3 cicli cardiaci sono le seguenti:

- lo spessore del setto interventricolare e della parete posteriore del ventricolo sinistro
- la frazione d'eiezione del ventricolo sinistro (LVEF o FE), indice di funzione sistolica globale, è stata ottenuta per tutti i pazienti utilizzando il metodo dei dischi di Simpson in proiezione apicale quattro camere. Il valore risultante è stato espresso come percentuale del rapporto indicizzato tra volume telediastolico del ventricolo sinistro e volume telediastolico secondo la formula  $(VTDVS - VTSVS) / VTDVS(\%)$ .
- il picco precoce (E) e tardivo (A) della velocità di flusso transmitralico e l'E/A ratio (riempimento ventricolare precoce/tardivo), indice di distensibilità del ventricolo sinistro e quindi della funzione diastolica del ventricolo sinistro
- il tempo di accorciamento del ventricolo sinistro (deceleration time), dal picco E sino all'onda di base, indice della funzione diastolica del ventricolo sinistro
- la massa del ventricolo sinistro, calcolata in base al diametro e allo spessore di parete secondo la convenzione di Penn (107) ed espressa come indice di massa del ventricolo sinistro (LVMI).

## ***PWV***

La PWV viene calcolata dal rapporto tra la distanza tra i due punti di rilevazione (in metri) e la misura del tempo di transito dell'onda sfigmica (in secondi), ottenendo la velocità (in metri/secondo) con cui l'onda di polso progredisce all'interno di un'arteria elastica, come l'Aorta. Abbiamo scelto la PWV carotido-femorale per valutare la distensibilità aortica per diverse ragioni: prima di tutto perché l'onda di polso può essere facilmente registrata prendendo come riferimento questi due siti; secondo, perché la distanza tra questi due siti è sufficientemente ampia per permettere un calcolo maggiormente accurato dell'intervallo temporale tra le due onde; terzo, perché la PWV carotido-femorale riflette in modo migliore il livello di elasticità aortica, in virtù della buona correlazione tra le due, dimostrata mediante tecniche invasive.

Si è valutata dunque, attraverso una misurazione superficiale, la distanza tra polso carotideo e femorale, siti su cui sono stati applicati i tonometri; nel software poi queste misurazioni sono state integrate con altezza, peso, circonferenza vita e fianchi del soggetto, per una migliore stima della distanza percorsa dall'onda sfigmica.

La PWV è stata misurata usando la tecnica della tonometria ad appianazione (sistema Complior 2 ); dopo aver ricercato palpatariamente il sito ove meglio si apprezza la pulsatilità dell'onda, manualmente venivano posizionati e mantenuti in sede i tonometri, in corrispondenza dell'arteria carotide destra e femorale destra, subito sotto la plica inguinale. Nel frattempo, veniva chiesto al paziente sottoposto all'esame di non deglutire e di non muoversi per circa 10 secondi.

Sul monitor si visualizzavano contemporaneamente i profili dell'onda sfigmica delle due sedi esaminate, in alto l'onda di polso carotideo, più in basso quella del polso femorale; i dati venivano acquisiti allorché gli operatori, aggiustando la posizione dei sensori e la pressione sullo strumento, ritenevano che la forma dell'onda fosse di qualità adeguata.

La suddetta manovra veniva ripetuta per due volte per ciascun paziente, ottenendo un numero variabile (12-15) di onde sfigmiche per sessione.

Lo strumento misurava poi il delta di Tempo intercorrente tra i due piedi dell'onda, identificabili dall'inizio degli "upstrokes" delle onde rilevate e, dividendo automaticamente la distanza tra i due siti (come precedentemente impostata) per tale valore, forniva la PWV carotido-femorale.

La pulse wave velocity (PWV) si misura in metri al secondo e rappresenta la velocità con cui l'impulso generato dalla meccanica cardiaca si propaga all'interno dell'albero arterioso. Valori normali di questo parametro sono intorno ai 9 m/s, ed aumentano all'aumentare della stiffness.

L'onda sfigmica è misurata in una arteria prossimale, come la carotide comune, e contemporaneamente in una distale, come la radiale o la femorale. La posizione superficiale di queste arterie rende possibile la valutazione dell'onda in maniera non invasiva e, nel caso della PWV carotido-femorale, si valuta la progressione d'onda attraverso l'aorta, sito particolarmente pronò allo sviluppo di aterosclerosi. Il tempo di ritardo tra l'arrivo di una convenuta parte dell'onda, ad esempio il piede, oppure attraverso una registrazione ECG-gated ai due siti di misurazione permette la valutazione della PWV. La distanza misurata è una stima della reale lunghezza del letto arterioso esplorato, infatti l'aorta addominale tende a divenire tortuosa con l'invecchiamento (154), generando una potenziale sottostima del PWV.

### ***Stoccaggio DNA***

Da ogni provetta per emocromo contenente l'anticoagulante EDTA sono state prelevate 2 aliquote di sangue da 300  $\mu$ l. Entrambe sono state stoccate in freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Si è proceduto all'estrazione del DNA genomico da 300  $\mu$ l di sangue secondo il protocollo della ditta produttrice del kit Wizard genomic DNA® (Promega) e risospeso il pellet in 70  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O.

Il DNA ottenuto è stato sottoposto a reazione di PCR utilizzando primers specifici per le regioni in cui si ricercano i polimorfismi scelti.

### ***Analisi genetica***

La selezione degli SNPs è avvenuta in base a MAF > 0.05, SNP score > 1, designability rank > 1, no failure code, validation class 3, validation bine goldengate validated. È stato eseguito minisequencing preliminare per i primi sei SNPs che ha confermato che le frequenze alleliche nel campione sono in linea con quelle osservate nella popolazione caucasica.

Ogni analisi genetica ha previsto una Polymerase Chain Reaction (PCR) preliminare. Le condizioni di PCR sono le seguenti: 5  $\mu$ l di 5X PCR Buffer (Promega), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M di ciascun dNTP, 1 U di GoTaq (Promega) e 15 pmol di ciascun primer, in un volume finale di 25  $\mu$ l. Il protocollo di amplificazione consiste in 2 min. a  $95^{\circ}\text{C}$  di pre-denaturazione e attivazione della Taq Polimerasi, seguito da 30 cicli di 1 min. a  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 min. a  $65^{\circ}\text{C}$ , 1 min. a  $72^{\circ}\text{C}$ , e una estensione finale di 5 min. a  $72^{\circ}\text{C}$ . Un controllo negativo per ogni reazione di PCR effettuata è sempre inserito. I prodotti di PCR così ottenuti vengono verificati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 1.5%.

I primi 100 campioni sono stati genotipizzati tramite tecnologia SNaPshot. I prodotti di PCR precedentemente preparati sono stati purificati mediante la reazione enzimatica EXO/SAP per rimuovere i componenti chimici della precedente reazione di PCR, e quindi sottoposti ad analisi di mutazione mediante l'impiego della metodica del minisequencing, utilizzando il Kit SNaPshot ddNTP Primer Extension (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). I prodotti della reazione di minisequencing sono stati successivamente analizzati mediante corsa elettroforetica capillare in sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). La tecnica del Minisequencing consiste in una reazione di sequenza mediante la chimica dei dideoossi-Terminatori (ddTerminators) i quali, mancando del gruppo idrossile al carbonio 3', non possono formare il legame

fosfodiesterico 3'→5' con un altro deossinucleotidtrifosfato (dNTP). Dopo l'annealing del primer nel template, durante la fase di extension avviene l'incorporazione di un singolo dideoossinucleotidtrifosfato (ddNTP) marcato con un colorante fluorescente, che è complementare alla base sede della mutazione da ricercare. Poiché il primer è disegnato in maniera tale da appaiarsi al DNA stampo immediatamente a monte del sito di mutazione, e poiché la *SNaPshot ready Reaction Mix* non contiene dNTP, l'incorporazione del ddNTP marcato avviene solamente a livello del sito di mutazione, con conseguente blocco della reazione di sequenza. Questo processo viene ripetuto in cicli successivi di estensione e terminazione, producendo così i frammenti marcati che verranno evidenziati ed analizzati dopo la corsa elettroforetica.

Per l'analisi genetica si è utilizzata la piattaforma *Illumina BeadExpress reader* (Illumina Inc., San Diego, CA), un sistema high-throughput a scansione laser dual-color che consente di analizzare un'ampia varietà di saggi in multiplex sviluppati utilizzando la tecnologia digitale VeraCode™. Tale tecnologia si basa sull'utilizzo di microbeads, cioè cilindri di vetro ognuno dei quali è associato ad un codice a barre olografico che identifica lo SNP da screenare. Quando eccitato dal laser, ogni microbead emette un segnale fluorescente che discrimina l'allele specifico per lo SNP, permettendo così di analizzare fino a 384 biomarkers contemporaneamente per soggetto.

## ANALISI STATISTICA

E' stata calcolata la media $\pm$ deviazione standard delle variabili fenotipiche per l'intero campione e per il gruppo di soggetti di sesso maschile e femminile.

È stato effettuato un confronto mediante test T di Student a due code fra le medie delle misurazione nei gruppi di soggetti di sesso maschile e femminile, adottando come significatività statistica P-value di 0.05.

Sui dati genetici è stato eseguito un controllo di qualità: rispetto delle frequenze alleliche nella popolazione CEUS, MAF (Minor Allele Frequency) 0.01, HWE (Hardy Weinberg equilibrium P-value) 0.0005, mind (Maximum per-person missing) 0.1, geno (Maximum per-SNP missing) 0.1.

I dati PWV sono stati normalizzati secondo funzione logaritmica. Per ogni polimorfismo si è scelto di eseguire un test allelico poichè dotato di maggior conservatività.

È stata impostata una regressione lineare multivariata secondo età, sesso, BMI e pressione arteriosa sistolica per valutare l'associazione fra gli SNPs analizzati e il fenotipo PWV. Le significatività ottenute sono state corrette per test multipli adottando un false discovery rate di 0.3.

A titolo esplicativo sono state rappresentate le frequenze genotipiche e alleliche per gli SNPs significativi all'analisi statistica, valutando le medie $\pm$ deviazioni standard per PWV nei diversi gruppi. Il confronto è stato eseguito con il test trend lineare.

Successivamente è stato indagato il linkage disequilibrium per i polimorfismi significativi valutando LOD score e  $r^2$ .

## RISULTATI

Sono stati studiati 821 soggetti ipertesi di cui 464 uomini e 357 donne, tra questi, 654 (79.7%) erano in terapia con farmaci anti ipertensivi: 374 (45.5%) fra gli uomini e 280 (34.1%) fra le donne.

L'età media del campione è  $53.9 \pm 13.7$  (media $\pm$ SD) anni, degli uomini  $53 \pm 13$  anni, delle donne  $55 \pm 14$  anni.

Nella **Tabella 1** sono riportati le principali variabili cliniche e bioumorali.

<b>Variable</b>	<b>TUTTI</b>	<b>MASCHI</b>	<b>FEMMINE</b>	<b>P</b>
Età (aa)	$53.9 \pm 13.7$	$52 \pm 13.5$	$55.1 \pm 13$	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$26.8 \pm 4.2$	$27.4 \pm 3.6$	$25.9 \pm 4.7$	<0.0001
SBP( mmHg)	$142.4 \pm 18.3$	$142.9 \pm 18$	$141.7 \pm 18.7$	0.3450
DBP( mmHg)	$86.8 \pm 10.5$	$87.6 \pm 10.7$	$85.6 \pm 10.3$	0.0077
WBC(103/mL)	$6.5 \pm 2.64$	$6.7 \pm 3.2$	$6.2 \pm 1.8$	0.0087
Hb( g/dL)	$13.9 \pm 1.3$	$14.5 \pm 1.1$	$13. \pm 1.1$	<0.0001
Creatinina (mg/dL)	$0.9 \pm 0.2$	$1 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.2$	<0.0001
PCR (mg/dL)	$2.8 \pm 4.5$	$2.5 \pm 3.9$	$3.3 \pm 5.2$	0.0760
Microalbuminuria (mg/L)	$26 \pm 104.7$	$32.7 \pm 123$	$17.3 \pm 74.1$	0.0945
Colesterolo(mg/dL)	$197. \pm 35.2$	$192.4 \pm 33.8$	$202 \pm 36$	<0.0001
HDL( mg/dL)	$53.5 \pm 13.6$	$49 \pm 11.6$	$59.3 \pm 13.9$	<0.0001
LDL (mg/dL)	$118.7 \pm 31.9$	$117.2 \pm 31.5$	$120.7 \pm 32.3$	0.1521
Trigliceridi(mg/dL)	$121.7 \pm 78$	$129.5 \pm 81.7$	$111.4 \pm 71.5$	0.0015
Glicemia(mg/dL)	$90 \pm 23.2$	$92.7 \pm 26$	$86.5 \pm 18.6$	0.0004

**Legenda.** BMI=body mass index, SBP=pressione arteriosa sistolica, DBP=pressione arteriosa diastolica

Nella **Tabella 2** sono riportati i valori medi (+SD) delle variabile utilizzate come markers di danno d'organo.

<b>Variable</b>	<b>Tutti</b>	<b>Maschi</b>	<b>Femmine</b>	<b>P</b>
PWV(m/sec)	10.8±2.7	11.1±2.8	10.4±2.5	0.0003
FC (bpm)	66.4±10.7	65.3±10.9	67.9±10.3	0.0006
IMTdx( mm)	0.6±0.2	0.7±0.2	0.6±0.2	0.1528
IMTsx(mm)	0.7±0.2	0.7±0.2	0.7±0.2	0.0382
LVMI( g/m2)	111.5±32.7	119.9±32.2	100.6±30	<0.0001
Setto (cm)	1.±0.2	1.1±0.2	1±0.2	<0.0001
PPOST( cm)	1±0.2	1±0.2	0.9±0.2	<0.0001
E/A	1±0.3	1±0.3	1.1±0.3	0.5446
DECTIME(msec)	210.9±46.8	212±46.4	208±47.3	0.1520
FE( %)	63.2±4.2	63±4.3	63.4±4	0.1307
Cockroft Gault	91.7 ±29.4	na	na	na
MDRD	91.44 ± 25.9	na	na	na

**Legenda** PWV=pulse wave velocity, IMT=Intima-media thickness, LVMI=left ventricular mass index, DECTIME=deceleration time, FE=ejection fraction.

Gli indici di funzionalità renale hanno permesso di stimare la clearance della creatinina a  $91.7 \pm 29.4$  ml/min (secondo la formula di Cockroft – Gault) ed il GFR a  $91.4 \pm 25,9$  ml/min (secondo la MDRD).

Per quanto concerne l'indagine ecocardiografica, sono stati riscontrati un LVMI medio di  $111.5 \pm 32.7$  g/mq, uno spessore di setto e parete posteriore rispettivamente di  $1 \pm 0,2$  e di  $0,96 \pm 0,17$  cm, un rapporto E/A di  $1. \pm 0.33$ , un deceleration time di  $210.24 \pm 36.4$  ed una FE di  $63.2 \pm 4.2$

L'IMT carotideo medio, invece, è risultato essere di  $0,66 \pm 0,23$  mm.

La misurazione della PWV ha evidenziato un valore medio di  $10.8 \pm 2.7$  m/sec, significativamente diverso (P value 0.0003) fra uomini e donne.

## ***Danno Cardiovascolare***

**Tabella 3.** Frequenza delle alterazioni nefro-cardio-vascolari in 501 pazienti.

---

---

<b>malattia carotidea</b>	
ispessimento media-intima (IMI)	50 (10%)
--malattia ats	105 (31%)
<b>danno cardiaco</b>	
ipertrofia ventricolare sx	241(48%)
<b>danno renale</b>	
--Microalbuminuria	73 (14.5%)
--MDRD	26(5.3%)
--GRGL	68 (13.5%)

---

**Legenda.** Dati espressi come numero (percentuale).

Il 9 % (73/821) dei pazienti hanno valori di microalbuminuria compatibili con danno renale.

Il 7.7% dei soggetti (63/821) sono affetti da diabete mellito, 39 uomini e 24 donne (p:ns).

Il 17.3 % dei soggetti (141/821) erano fumatori attivi, 85 soggetti fra gli uomini e 56 fra le donne (p=ns).

L'Ipertrofia Ventricolare Sinistra era presente in 241 soggetti (48% della popolazione). La frequenza di un ridotto filtrato Glomerulare e' stata del 5.3%, di una ridotta clearance della Creatinina del 13.5% e di un aumentato spessore miointimale del 10%.

E' stata inoltre riscontrata una significativa correlazione ( $p < 0.01$ ) delle diverse misure di danno d'organo tra di loro ( $R = 0.15 - 0.36$ ).

Tuttavia la sola correlazione tra CrCl e LVMI si è mantenuta anche all'analisi multivariata considerando tutti i fattori di rischio misurati ( $r = 0.18, p < 0.01$ ).

### ***Rischio relativo***

In accordo alle linee guida ESH/ESC è stato valutato il rischio cardiovascolare relativo, come illustrato nella tabella 4.

**Tabella 4.** Rischio cardiovascolare relativo calcolato nei pazienti al momento dell'arruolamento. I dati sono espressi come numero (percentuale).

---

---

#### **rischio CV relativo**

nella media	13 %
aggiunto basso	45 %
aggiunto moderato	34 %
aggiunto alto	<b>6%</b>
aggiunto molto alto	<b>2%</b>

---

---

**Legenda.** Rischio relativo CV: in base alle linee guida ESC/ESH 2007.

Il rischio cardiovascolare relativo calcolato in base ai parametri dei pazienti è risultato nella media della popolazione sana nel 13% dei soggetti.

Correla come atteso con l'età, il BMI , IMT, LVM, PWV e DRDR, il grado di malattia carotidea ( $r=0.49$ ,  $p=0.0007$ ),

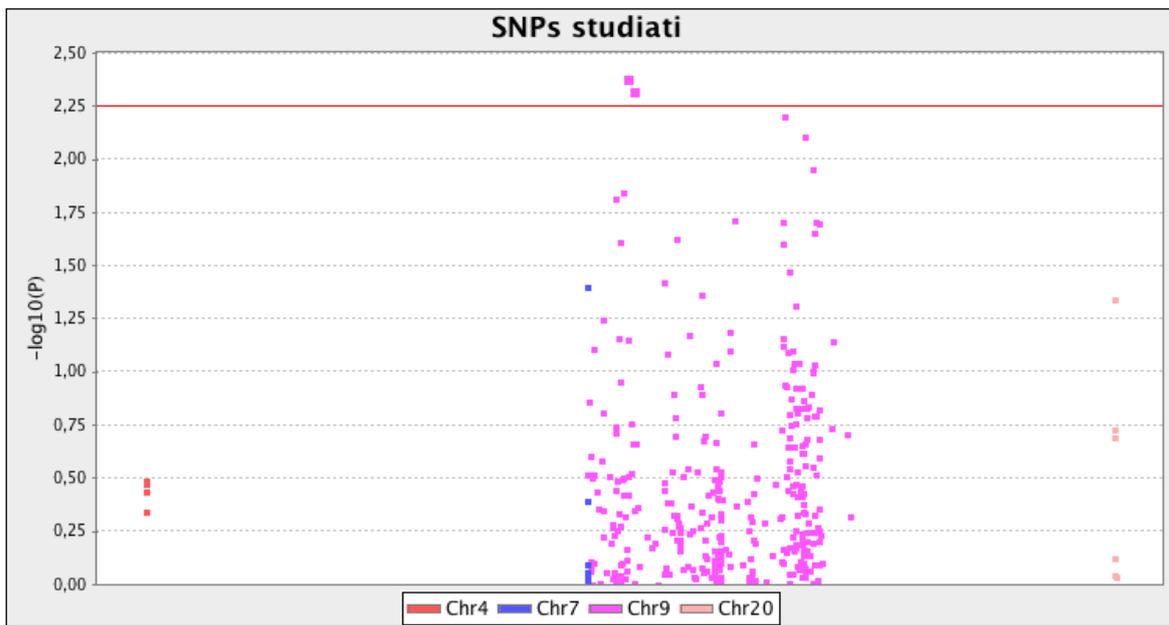
## POLIMORFISMI

Dall'analisi statistica dei polimorfismi analizzati, 2 sono risultati significativamente associati a PWV, come si può notare dal Manhattan Plot in Figura 1, con un false discovery rate di 0,3: **rs300622 e rs2381640** entrambi siti sul braccio corto del cromosoma 9.

**Figura 1** Manhattan Plot per i polimorfismi analizzati nello studio.

Sull'asse delle ordinate si trova la significatività espressa come  $-\log_{10}(P)$ .

I due polimorfismi **rs300622 e rs2381640** superano la soglia di significatività.

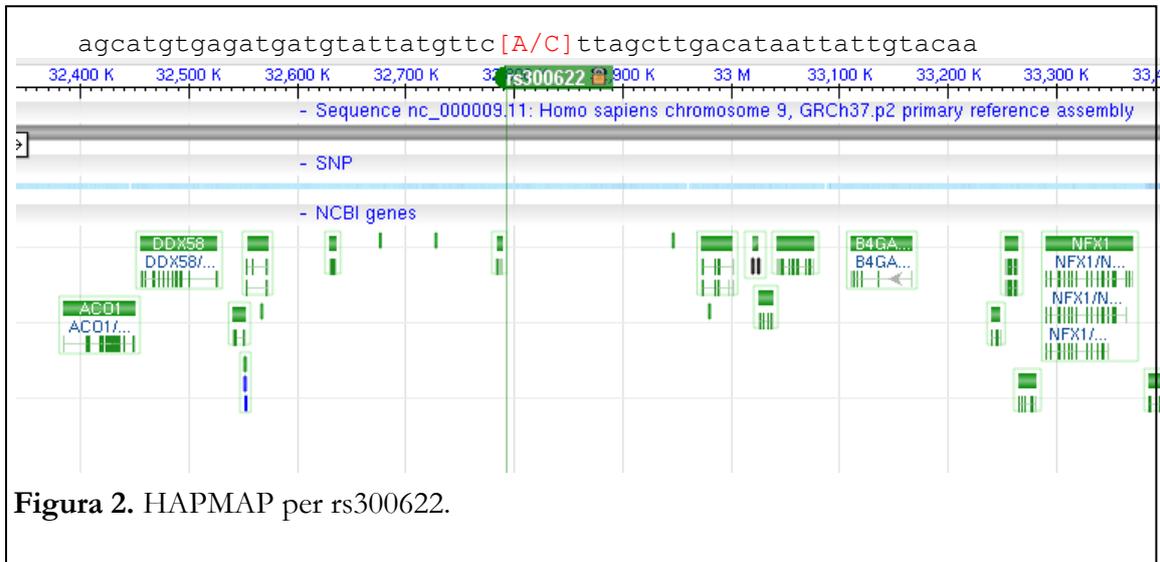


COVARIATE	GENE	SNP	BP	A1	NMISS	BETA	STAT	P	Q
età, sesso, bmi, pas	LOC392285	<b>rs2381640</b>	7550779	T	797	-0.0130	-2.968	3.09E-03	0.6159
età, sesso, bmi, pas	LOC401498	<b>rs300622<sup>o</sup></b>	32783466	C	801	0.0173	2.89	3.95E-03	0.6159
età, sesso, bmi, pas	DMRT2	rs9140	1047318	A	801	0.0081	2.072	3.86E-02	1
età, sesso, bmi, pas	FREM1	rs10810293	14932035	C	799	-0.0132	-2.42	1.58E-02	1

<sup>o</sup>Associato anche a imtdx con pvalue=0.02

## Rs300622

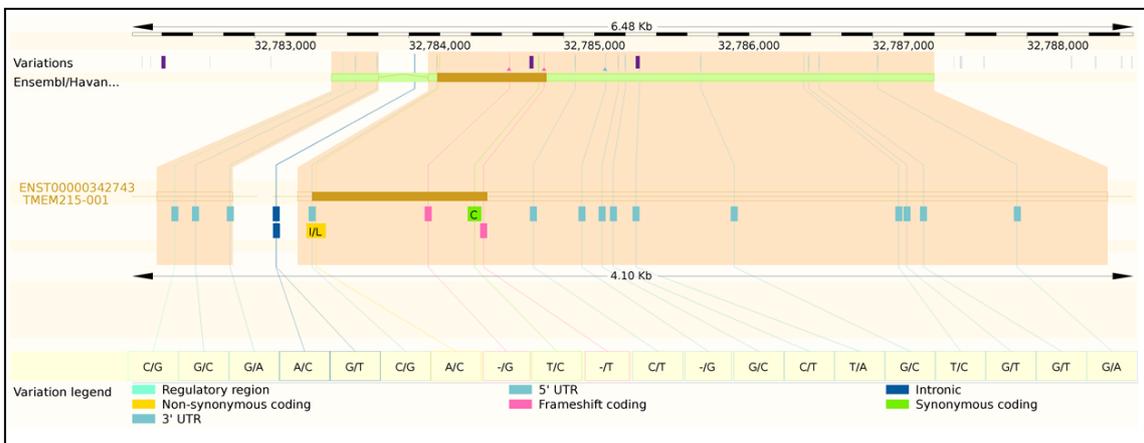
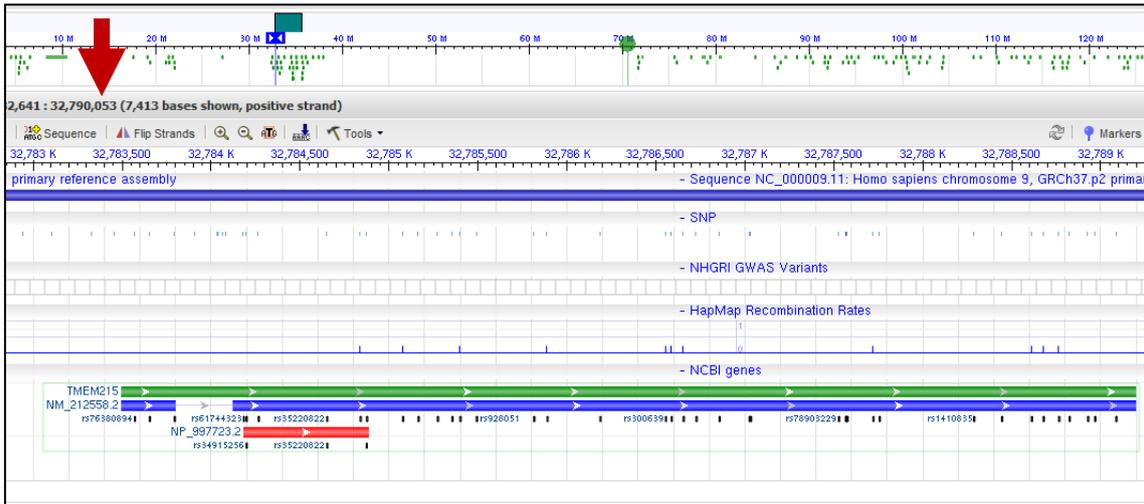
NT\_008413.18:g.32783466C>A



**Figura 2.** HAPMAP per rs300622.

Il polimorfismo rs300622 si trova all'interno di LOC401498 ed è localizzato nella regione 9p21.1, come rappresentato in figura2 e 2a, in una sequenza non codificante .

In questo LOC è presente la sequenza del gene TMEM215 che codifica per una proteina transmembrana con funzione non ancora identificata.



**Figure 2a** Da: [ALFRED: The Allele Frequency Database](#), Hapmap project, NCBI database of single nucleotide polymorphisms NCBI Genedatabase

Kenneth K. Kidd et al. "Data unpublished".

## **Rs2381640**

NT\_008413.18:g.7550779C>T

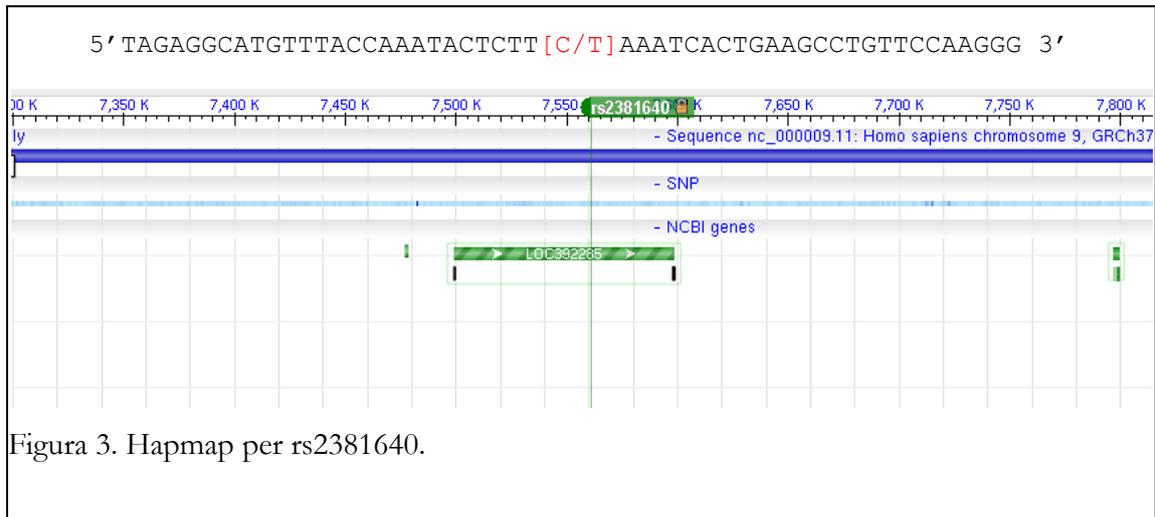


Figura 3. Hapmap per rs2381640.

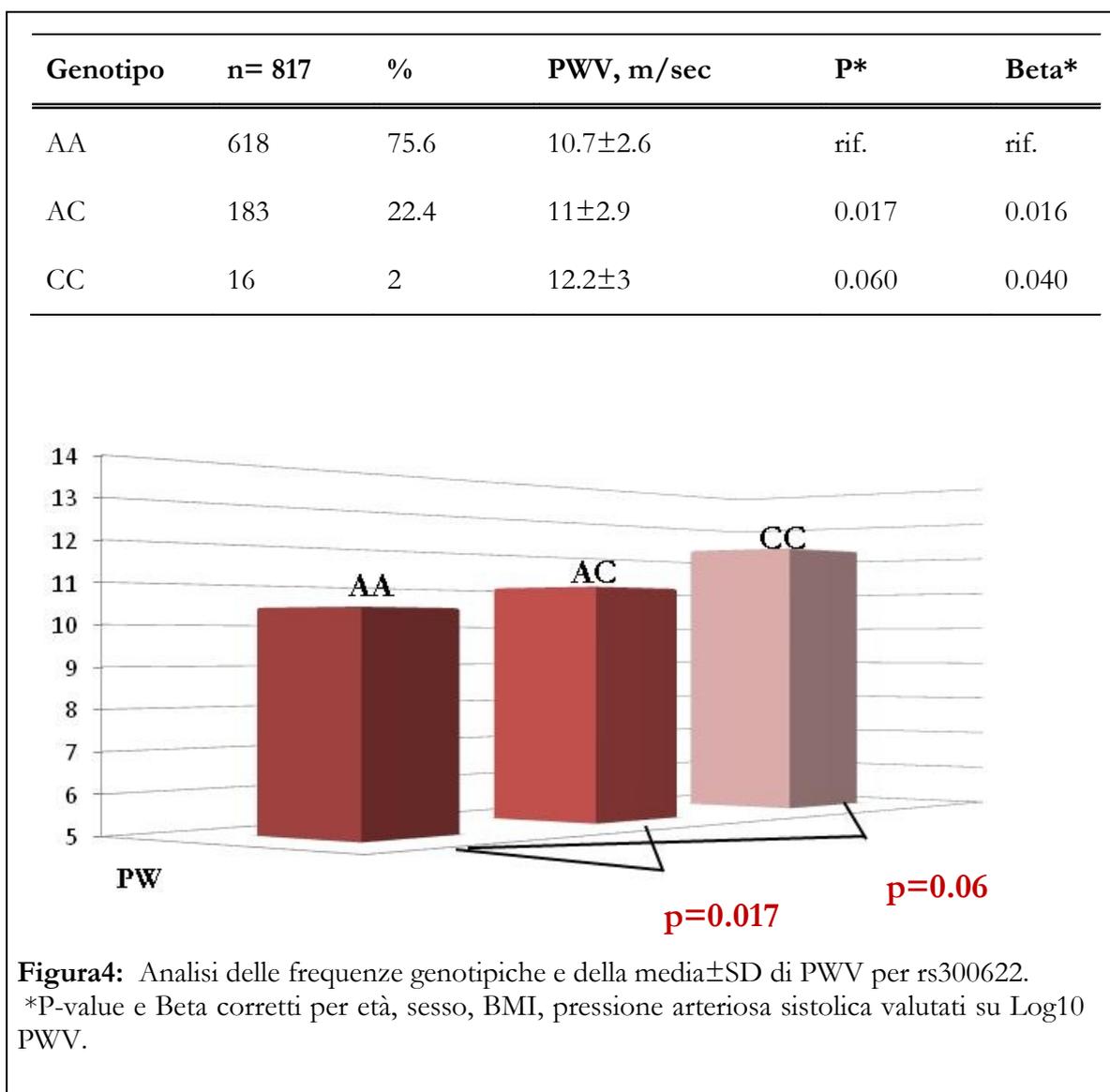
Il polimorfismo rs2381640 si trova all'interno di LOC392285 ed è localizzato nella regione 9p24.1, in una regione intronica, come illustrato in Figura 3.

In questo LOC, sullo strand + del DNA, è presente la sequenza di uno pseudogene che codifica per una proteina con sequenza aminoacidica simile alla proteina TRIM5, che ha funzione strutturale. È inoltre presente, sullo strand – del DNA, la sequenza di uno pseudogene che codifica per una proteina ribosomiale RPL4P5.

### ***Frequenze genotipiche ed alleliche***

Sono state calcolate le frequenze genotipiche ed alleliche dei polimorfismi significativi, come illustrato nelle figure qui di seguito. Come precedentemente illustrato le frequenze sono state confrontate con i valori di PWV, oggetto del nostro studio.

La Figura 4 illustra le frequenze genotipiche per **RS300622**.



Il 75.6% del campione presenta genotipo AA, il 22.4% AC ed il 2% CC.

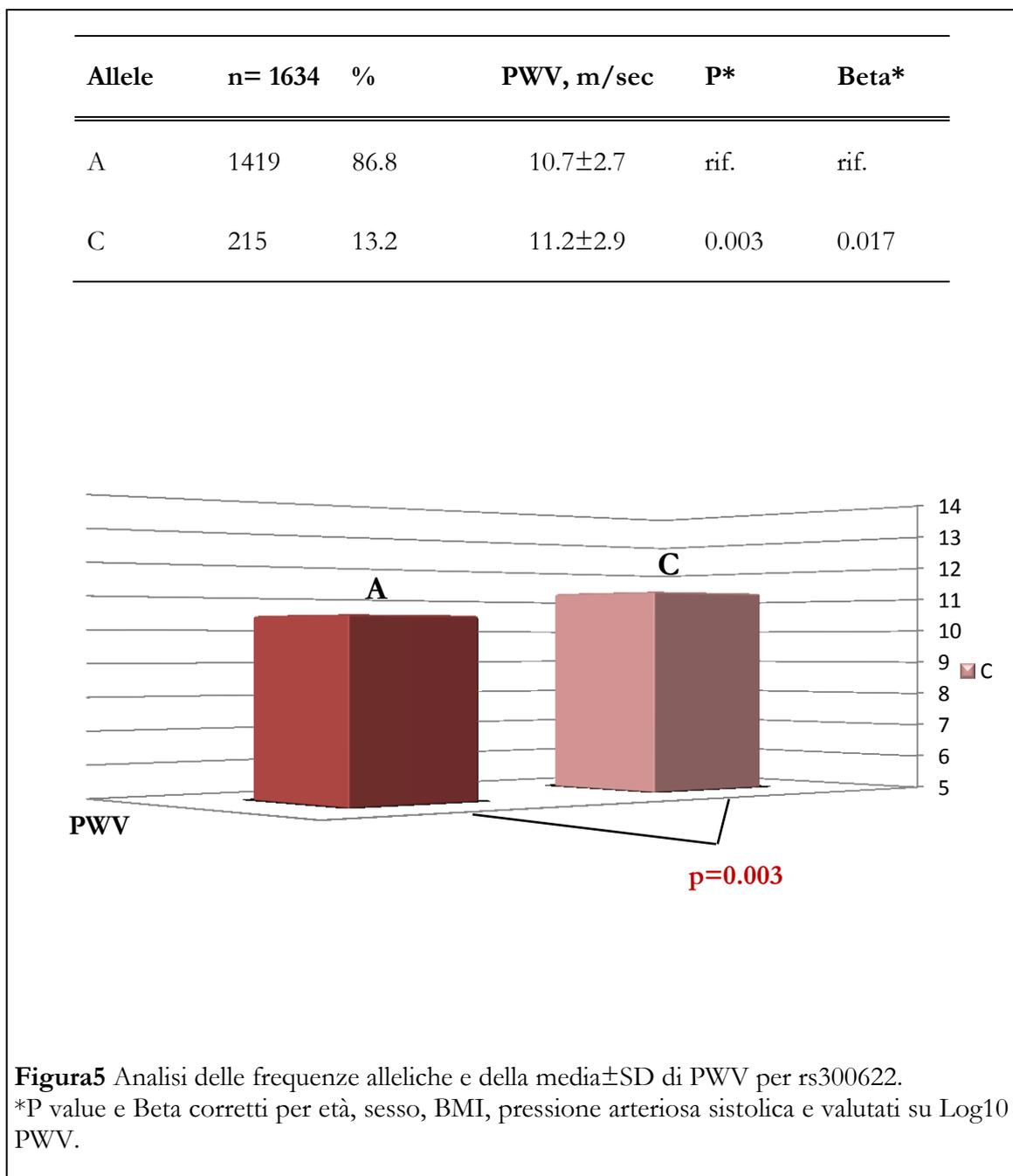
L'eterozigosi attesa nelle uniche due popolazioni europee con origini italiane (n52 e n78) riportate in Hapmap ed in Alfred project risulta essere 18% ( 0.25): il confronto tra l'eterozigosi risulta essere altamente significativo ( $p<0.0001$ ).

I valori medi per PWV sono risultati  $10.7 \pm 2.67$  m/sec per il genotipo AA, per il genotipo AC  $11.005 \pm 2.92$  m/sec (P-value 0.017 e beta 0.016 corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV), per il genotipo CC  $12.246 \pm 2.99$  m/sec (P-value 0.060 e beta 0.040 corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV).

Una quota minoritaria del campione (2%) appare non protetta dal punto di vista genetico: infatti la presenza del genotipo CC si associa a valori di PWV significativamente più elevati. Al contrario la maggioranza del campione (75.6%), che presenta genotipo AA, appare protetta presentando valori di PWV nella norma. La presenza dell'allele C si associa in modo dose dipendente all'incremento di PWV.

***Risulta evidente che la presenza dell'allele C in singola e doppia copia determina un aumento lineare della PWV, rispettivamente, di 0,039 m/sec e 0,097 m/sec ( $p < 0.001$  per trend lineare).***

La Figura 5 illustra le frequenze alleliche per *RS300622*.

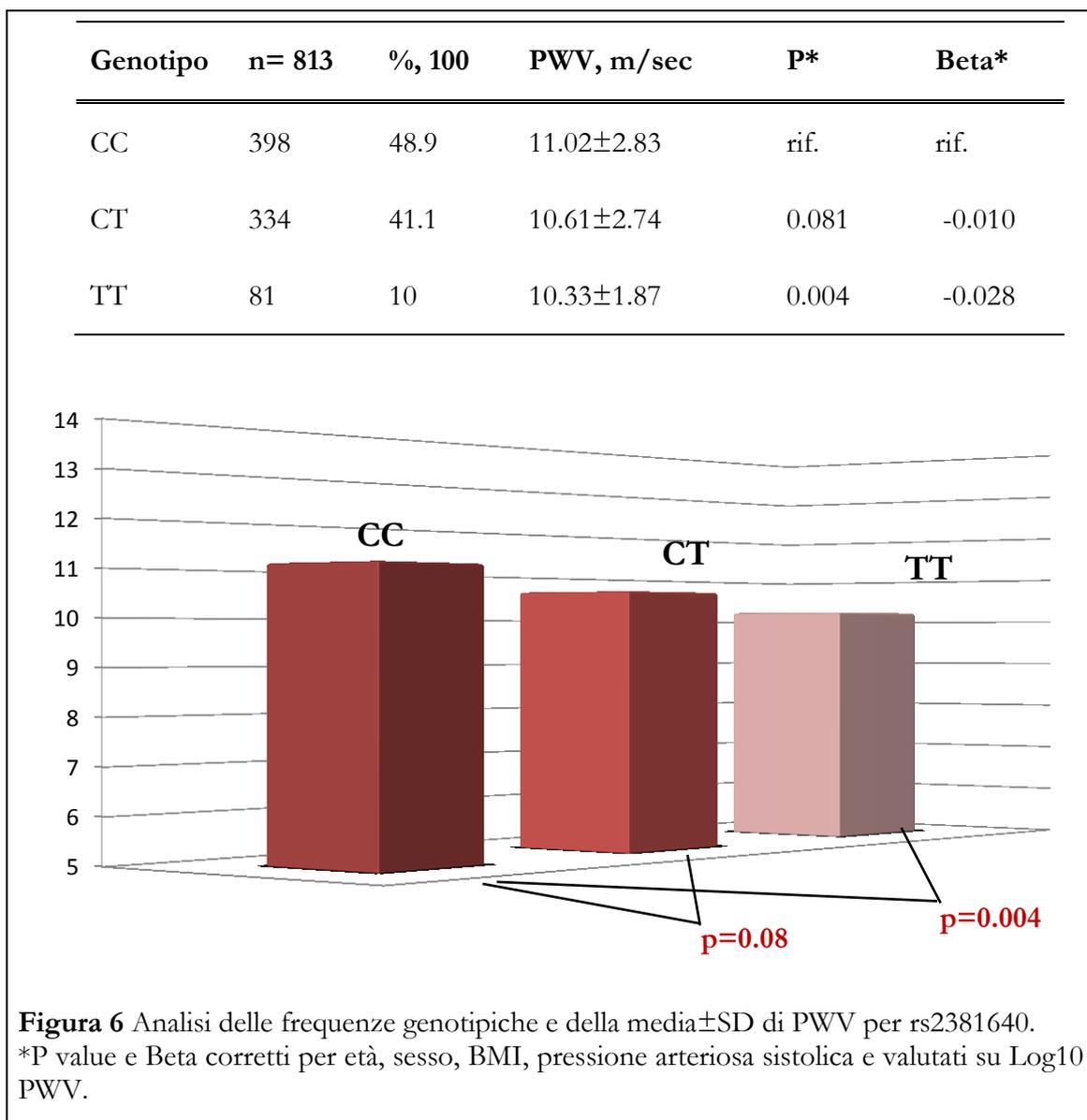


L'86.84% del campione presenta allele A e il 13.16% l'allele C.

La media per PWV è risultata 10.717±2.68 m/sec per l'allele A, 11.190±2.95 m/sec per l'allele C (P-value 0.003 e beta 0.017 corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV).

*Anche analizzando i dati da un punto di vista allelico, risulta evidente che la presenza dell'allele C determina un aumento della PWV di 0,041 m/sec (OR=0.3).*

Nella figura 6 sono riportate le frequenze genotipiche per **rs2381640**



**Figura 6** Analisi delle frequenze genotipiche e della media±SD di PWV per rs2381640.  
\*P value e Beta corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV.

Il 48.9% del campione presenta genotipo CC, il 41.1% CT e il 10% TT.

In letteratura non è riportata una frequenza attesa per l'eterozigosi attesa per questo polimorfismo in Alfred ma in hapman in tre popolazioni europee con origini italiane la frequenza genotipica per l'eterozigosi attesa è del 49%: il confronto tra le frequenze risulta altamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

I valori medi per PWV sono risultati  $11.025 \pm 2.83$  m/sec per il genotipo CC, per il genotipo CT  $10.614 \pm 2.74$  m/sec (P-value 0.081 e beta -0.010 corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV), per il genotipo TT  $10.332 \pm 1.87$

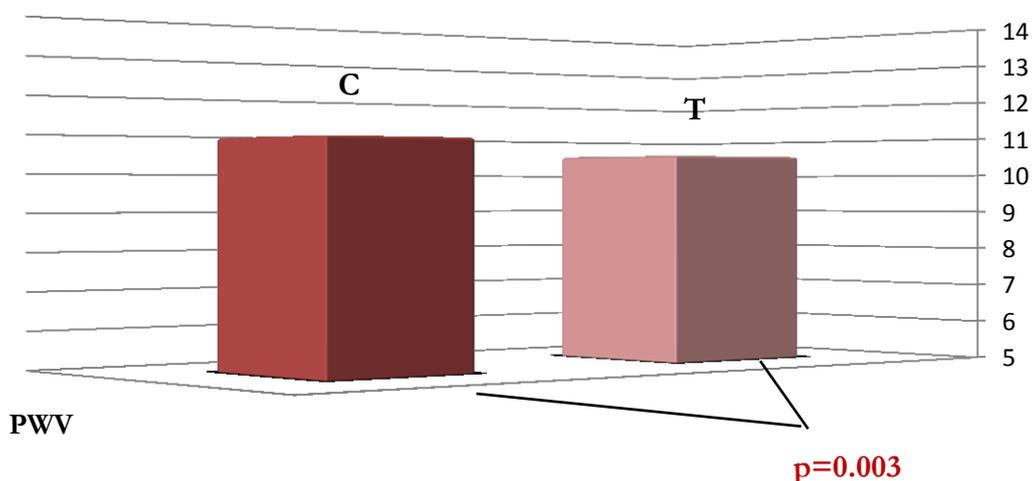
m/sec (P-value 0.004 e beta -0.028 corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV).

Per il polimorfismo rs2381640 la maggioranza del campione (48.9%) appare geneticamente non protetta, infatti, la presenza del genotipo CC si associa a valori di PWV significativamente più elevati. Al contrario la minoranza del campione (10%), che presenta genotipo TT, risulta protetta presentando valori di PWV nella norma. La presenza dell'allele C si associa in modo dose dipendente all'incremento di PWV.

***Risulta evidente che la presenza dell'allele T in singola e doppia copia determina una riduzione lineare della PWV, rispettivamente, di 0,024 m/sec e 0,064 m/sec (  $p < 0.001$  per trend lineare).***

Nella figura 7 sono riportate le frequenze alleliche per rs2381640.

Allele	N, 1626	%, 100	PWV, m/sec	P*	Beta*
C	1130	69.5	10.9±2.81	rif.	rif.
T	496	30.5	10.5±2.49	0.003	-0.013



**Figura 7** Analisi delle frequenze alleliche e della media±SD di PWV per rs2381640. \*P value e Beta corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV.

Il 69.5% del campione presenta l'allele C e il 30.5% presenta l'allele T. La media per PWV è risultata  $10.904 \pm 2.81$  m/sec per l'allele C,  $10.522 \pm 2.49$  m/sec per l'allele T (P-value 0.003 e beta -0.013 corretti per età, sesso, BMI, pressione arteriosa sistolica e valutati su Log10 PWV).

*Anche analizzando i dati da un punto di vista allelico, risulta evidente che la presenza dell'allele T determina una riduzione della PWV di 0,030 m/sec (OR:0.4).*

*Per ultimo si è andato a valutare il linkage disequilibrium per i due SNPs risultati significativi.*

Come mostrato nella figura 8, rs300622 è risultato in LD con rs603150, rs167279, rs300628, rs2889283, rs2439760, rs2478564, rs10971140, rs10971141, rs10971142, rs12378748, rs595799, rs12380431, rs1581862, rs2584110, rs1579750, rs1579751, rs2584111, rs6476380 e rs6476381.

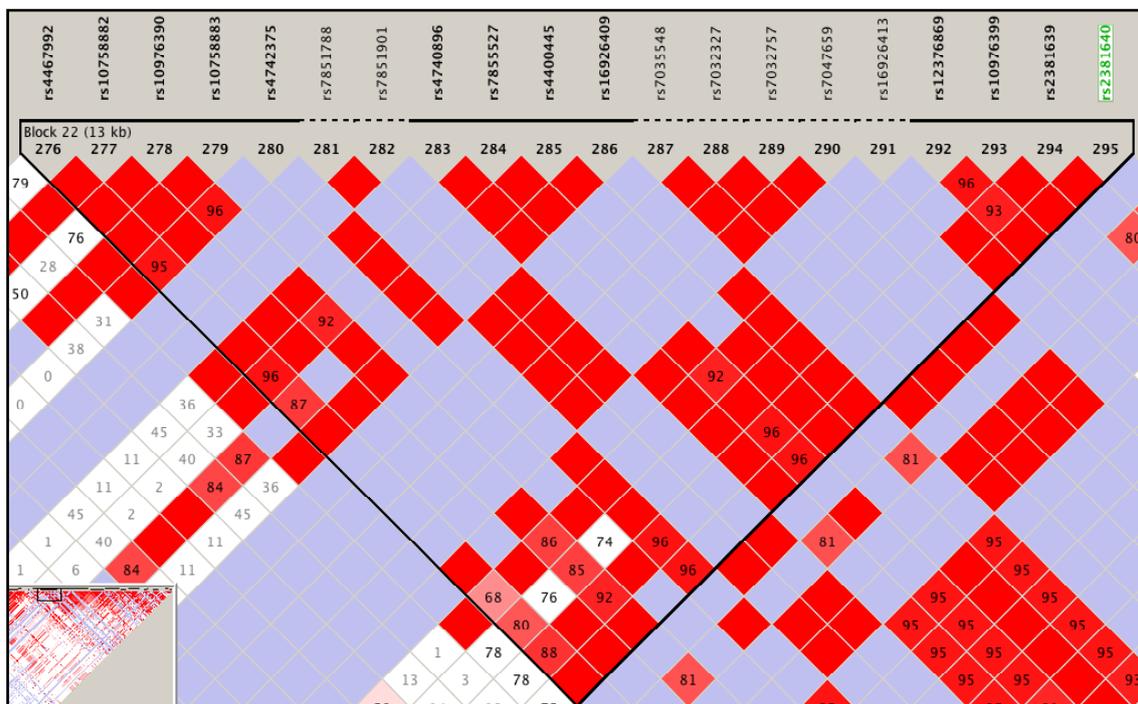
Si definisce in questo modo un blocco di linkage disequilibrium di 16 Kb, che presenta, nella popolazione europea, 5 aplotipi principali, di cui il più frequente risulta ACTTAACCTTGAGAGAAGA.



**Figura 8** Linkage disequilibrium di rs300622. Il blocco di LD misura 16Kb.

Come mostrato nella figura 9, rs2381640 è risultato in LD con rs2381639, rs10976399, rs12376869, rs16926413, rs16926409, rs4400445, rs7855527, rs4740896, rs4742375, rs10976390, rs10758882 e rs4467992.

Si definisce in questo modo un blocco di linkage disequilibrium di 13 Kb, che presenta, nella popolazione europea, 7 aplotipi principali, di cui il più frequente risulta CTCAGCACGCTTC.



**Figura 9.** Linkage disequilibrium di rs2381640. Il blocco di LD misura 13Kb.

## **DISCUSSIONE**

Il presente studio ha la peculiarità di analizzare un campione di soggetti omogeneo e ben selezionato.

I criteri applicati nella selezione del campione (in accordo alle Linee Guida(1,2)) limitano le possibili interferenze dei fattori acquisiti confondenti l'espressione fenotipica:

Sono stati esclusi soggetti con sospetta ipertensione di origine secondaria, soggetti un cui consanguineo era già stato reclutato nello studio, soggetti colpiti da eventi acuti cerebrovascolari nel mese precedente lo studio e soggetti affetti da condizioni mediche tali da interferire con la corretta valutazione fenotipico dello studio.

Questo costituisce senza dubbio un punto a favore per la correttezza della valutazione genetica; molto spesso, infatti, gli studi genetici, anche se dotati di grande numerosità, mancano di una corretta selezione fenotipica che può influenzare i risultati.

In particolare si sottolinea la distribuzione omogenea del campione dal punto di vista geografico.

I valori medi di ipertensione arteriosa sistolica e diastolica evidenziano un campione di soggetti ipertesi in buon controllo farmacologico secondo le linee guida della European Society of Hypertension, così come la valutazione del rischio cardiovascolare e del danno d'organo subclinico.

L'esecuzione di esami strumentali quali l'elettrocardiogramma, l'ecocardiogramma, l'ecocolordoppler dei tronchi sovra aortici e la determinazione della PWV ha permesso una puntuale valutazione del danno d'organo. La popolazione nell'insieme ha valori medi per spessore miointimale carotideo, massa ventricolare sinistra, pulse wave velocity ed indici di funzione diastolica negativi per danno d'organo. Le valutazioni clinico diagnostiche sono state eseguite sempre dai medesimi operatori, esperti della materia, per ridurre la variabilità.

Quest'approccio rappresenta l'optimum nella valutazione del paziente iperteso, oggi, infatti, assume primaria importanza la valutazione del danno d'organo e la conseguente stratificazione del rischio cardiovascolare. Ciò permette di avere indicazioni prognostiche, ma soprattutto indicazioni terapeutiche; seconda della classe di rischio del paziente saranno diversi i target terapeutici e l'approccio farmacologico.

Nelle più recenti linee guida della European Society of Hypertension(2) ha assunto notevole importanza la valutazione della rigidità vascolare, soprattutto nei pazienti giudicati a rischio intermedio/basso dalle comuni scale di valutazione. Il motivo dell'importanza della rigidità vascolare è facilmente intuibile, dal momento che rappresenta un indice di significato più fedele ed affidabile della reale patologia vascolare rispetto alle valutazioni della pressione arteriosa o del profilo lipidico che fotografano un momento e che, in molte situazioni, possono essere effimere, come nei casi di ipertensione arteriosa mascherata ed ipertensione arteriosa da camice bianco.

Tra le metodiche di valutazione della rigidità vascolare, la pulse wave velocity carotido-femorale è la misura più affidabile. Nel presente studio molta attenzione è stata posta nella misurazione della PWV carotido-femorale, adottando un basso livello di tolleranza e ottenendo la media di due misurazioni.

In definitiva il presente campione appare ottimale per l'esecuzione di studi genetici e dispone di dati di sostanza.

L'approccio genetico appare innovativo: possiede da un lato caratteristiche che lo riconducono all'approccio sui geni candidati, dall'altro all'approccio genome wide.

Sono stati valutati infatti sia SNPs presenti in geni candidati come la metallo proteinasi 9, l'elastina, il recettore di tipo A per l'endotelina, sia SNPs che mappano il braccio corto del cromosoma 9 in assenza di un'ipotesi fisiopatologica determinata a priori ma in base alle osservazioni riportate in letteratura dell'associazione della regione 9p21(183-185) con coronaropatia, infarto miocardico, aneurismi dell'aorta addominale ed intracranici: solo pochi dei lavori disponibili di fatto valutava come end point intermedio la PWV().

Anche nell'analisi genetica e statistica il presente studio dispone di criteri molto rigidi. Sono stati ammessi all'analisi di associazione solo gli SNPs che hanno superato il controllo di qualità. Il test di associazione è stato condotto con modalità allelica, che consente di avere maggior conservatività e non assume alcun modello ereditario. L'analisi di associazione è stata corretta per quei fattori che possono influenzare la rigidità vascolare, come pressione arteriosa sistolica, BMI, sesso ed età. La significatività è stata corretta per test multipli, rendendo quindi lo studio ancor più conservativo. In questo modo è stata ridotta l'interferenza dei fattori non genetici e non sono considerate come attendibili le associazioni deboli dal punto di vista statistico, a prescindere dall'aspetto fisiopatologico.

I risultati confermano un'importante componente genetica alla base della rigidità arteriosa: due polimorfismi a singolo nucleotide risultano significativamente associati alla PWV.

Più precisamente risulta che per il polimorfismo rs300622 una quota minoritaria del campione (2%) appare non protetta dal punto di vista genetico: infatti, la presenza del genotipo CC si associa a valori di PWV significativamente più elevati. Al contrario la maggioranza del campione (75.6%), che presenta genotipo AA, appare protetta presentando valori di PWV nella norma. La presenza dell'allele C si associa in modo dose dipendente all'incremento di PWV.

Per il polimorfismo rs2381640 la maggioranza del campione (48.9%) appare geneticamente non protetta, infatti, la presenza del genotipo CC si associa a valori di PWV significativamente più elevati. Al contrario la minoranza del campione (10%), che presenta genotipo TT, risulta protetta presentando valori di PWV nella norma. La presenza dell'allele C si associa in modo dose dipendente all'incremento di PWV.

Come sottolineato da Cambien(251), è importante valutare l'effetto di tutti i polimorfismi, associati al fenotipo in osservazione, nel singolo individuo; soltanto in questo modo si potrà comprendere la reale influenza genetica.

Gli SNPs significativi descrivono due blocchi di linkage disequilibrium, rispettivamente, di 16 Kb nella regione 9p21 per rs300622 e 13 kb nella regione 9p24.1 per rs2381640.

La localizzazione di questi blocchi ci conferma la rilevanza del braccio corto del cromosoma 9 in ambito cardiovascolare ed è importante sottolineare che solo pochi studi prima d'ora hanno riportato un'associazione fra la regione 9p21 e PWV (248).

Il significato fisiopatologico di questi risultati, come spesso accade nell'approccio genome wide, non è d'immediata comprensione.

Il polimorfismo rs2381640 si trova in un LOC dove sono presenti 2 pseudogeni, un analogo di una proteina strutturale e un analogo di una proteina ribosomiale. Gli pseudogeni sono considerati geni ancestrali che hanno perso la loro capacità funzionale, negli ultimi anni però è stato dimostrato che alcuni pseudogeni possono svolgere un'attività regolatoria dell'espressione di geni omologhi.

Il polimorfismo rs300622 si trova in un LOC dove è presente un gene per una proteina transmembrana la cui funzione non appare ancora identificata. Questo potrebbe andare nella stessa direzione di recenti lavori, come quello di Tarasov (249), che pongono

l'attenzione sul ruolo dell'interazione fra cellula e matrice nel processo d'irrigidimento vascolare.

Da sottolineare comunque l'associazione della PWV con la regione 9p21 dove come già ricordato **Helgadottir, (183)** ha dimostrato l'associazione di una variante genetica localizzata sul cromosoma 9p21 con l'infarto del miocardio, mentre **Gschwendtner(252)**, la sua associazione tra tale regione (SNP rs1537378-C) e l'ictus aterosclerotico. Inoltre, è stato dimostrato che varianti genetiche (rs2383207-G e rs10757278-G) localizzate sul cromosoma 9p21 sono associate con l'ictus in maniera indipendente dagli eventi coronarici, almeno in soggetti con ipertensione arteriosa (253). Si può ipotizzare che tale regione cromosomica contenga varianti a carico di geni la cui funzione contribuisce in maniera significativa allo sviluppo delle malattie cardiovascolari. È importante identificare quali geni in questa regione siano responsabili dell'aumentato rischio cardiovascolare. Tra questi suscitano interesse CDKN2A, CDKN2B e ANRIL perché codificano molecole espresse a livello dei tessuti cardiovascolari e regolano la proliferazione, la senescenza e l'apoptosi cellulare.

È evidente che nuove indagini saranno necessarie per la definizione del significato fisiopatologico delle associazioni dimostrate dal presente studio.

I due blocchi di linkage di fatto definiscono un buon numero di tag SNPs che permetteranno di identificare i due polimorfismi significativi in studi futuri.

Un punto aperto rimane la non significatività dei polimorfismi presenti all'interno dei geni candidati. Per il gene dell'elastina, una ragione potrebbe derivare dal fatto che l'associazione è stata descritta in una popolazione giapponese (76) e pertanto profondamente diversa dal punto di vista dalla variabilità genetica ed in particolare degli SNPs, che sono caratterizzati da una forte connotazione geografica. Nella popolazione europea, finora è stata dimostrata l'associazione dei polimorfismi del gene dell'elastina soltanto con la rigidità locale carotidea(228).

Il presente studio assume quindi la valenza di uno studio pilota in un campo ad oggi poco esplorato, non prefigura ancora un'ipotesi, ma pone le basi per ulteriori studi e valutazioni.

Risulta infatti interessante valutare l'influenza genetica sugli altri marcatori di danno d'organo. Le analisi parallelamente condotte mostrano una correlazione fra IMTdx e rs300622: evidenza che costituisce un punto di forza nei confronti dei risultati ottenuti nel presente studio, ponendo l'accento su un possibile ruolo nell'interazione cellula-matrice nel processo di irrigidimento vascolare e nel processo di regolazione della proliferazione cellulare.

Inoltre appare importante l'allestimento di un gruppo di controllo composto di pazienti normotesi scelti nella stessa area geografica, così come di uno studio replica in una popolazione ipertesa geograficamente diversa che valuti l'associazione fra PWV e i polimorfismi a singolo nucleotide analizzati nel presente studio o ereditati in linkage disequilibrium con essi.

Il presente studio conferma l'importanza dell'assetto genetico nel determinare, insieme all'esposizione ai tradizionali fattori di rischio, lo sviluppo di patologie cardiovascolari. Poiché gli studi di associazione genome-wide esaminano SNPs in tutto il genoma, essi rappresentano un modo promettente per lo studio complesso, le malattie comuni in cui molte variazioni genetiche contribuiscono al rischio di una persona. In questo modo si potrebbe trovare una spiegazione alla diversa incidenza di eventi cardiovascolari in soggetti nei quali l'esposizione ai fattori di rischio appare identica e, ancor di più, in soggetti nei quali l'intervento terapeutico, volto alla correzione dei fattori di rischio modificabili, appare efficace, ma non protettivo nei confronti dello sviluppo della patologia. Solo nel 10-15% degli ipertesi è possibile identificare una causa dell'ipertensione arteriosa, mentre nella maggiore parte dei casi non si conosce il meccanismo fisiopatologico che causa l'aumento pressorio. In questi pazienti, l'aumento della pressione arteriosa origina da una interazione di fattori genetici e fattori ambientali attraverso meccanismi molecolari non ancora identificati.

Alla luce del progressivo invecchiamento della popolazione, è prevedibile che nei prossimi anni un significativo aumento delle malattie cardiovascolari richiederà una terapia e una gestione del paziente sempre più accurata, ma con costi umani e sociali elevati. Pertanto, una migliore conoscenza e comprensione dei determinanti di questi eventi potrebbe consentire sia una migliore stratificazione prognostica dei pazienti sia l'attuazione di misure

farmacologiche più razionali e mirate, e quindi più efficaci, traducendosi in una riduzione di costi (254,255).

La speranza è che con test genetici si riesca ad individuare quei pazienti che beneficerebbero di un determinato farmaco e questo dovrebbe consentire di risparmiare molti soldi al sistema pubblico ed ai pazienti stessi. Invece di curare i pazienti provando farmaci diversi, i medici potrebbero essere in grado di prescrivere dati farmaci soltanto a quelle persone che ne trarrebbero dei benefici. Si programmano quindi studi prospettici, longitudinali per definire quale polimorfismo genico risponde meglio alla terapia anti-ipertensiva.

Si delinea una nuova prospettiva nella quale risulta evidente un rischio cardiovascolare, che può essere definito, basale, determinato dall'assetto genetico del paziente, sul quale i fattori di rischio modificabili esercitano la propria influenza.

Sono necessari inoltre ulteriori studi, sia retrospettivi che prospettici, dotati di potere statistico adeguato, che esplorino i nuovi scenari suggeriti dai dati di letteratura alla ricerca di metodologie statistiche e bioinformatiche in grado di valutare la complessità di interazioni tra fattori genetici e ambientali che contribuiscono a determinare tali tratti clinici multifattoriali.

Alcuni possibili obiettivi di queste ricerche devono essere quindi:

- a. attribuzione dei valori/livelli di vari enzimi e peptidi con funzioni diverse ai diversi genotipi;
- b. stima del rischio relativo/genotipo;
- c. ottenere la mappa del rischio genetico derivante dalla caratterizzazione di più genotipi o di interi sistemi.

Identificato il rischio, sarà parallelamente necessario mettere a punto tecniche rapide di *screening* molecolari periferizzabili. Un particolare campo di sviluppo sarà quello della

valutazione delle interazioni fra *marker* di rischio genetico per malattia vascolare e fattori ambientali.

In ultimo, ma forse più rilevante, emerge il problema della formazione del personale sanitario alla gestione nella pratica medica dei risultati genetici ottenuti onde evitare inutili allarmismi od eccessi terapeutici per il paziente (254-257).

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Mancia, G; Laurent, S, Agabiti-Rosei et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European J Hypertens 2009; 27: 2121-2158-: sup3
- 2) Society of Hypertension Task Force documentESH/ESC Hypertension Practice Guidelines Committee. Practice guidelines for primary care physicians: 2007 ESH/ESC hypertension guidelines. J Hypertens settembre 2007; 14: sup3.
- 3) Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. National Heart, Lung, Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension 2003; 42: 1206-52.
- 4) Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, et al. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: the Framingham Heart Study. JAMA 2002; 287: 1003-10.
- 5) Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Kannel WB, Levy D. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. Lancet 2001; 358: 1682-6.
- 6) Wood D, De Backer G, Faergeman O, et al. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Summary of recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. J Hypertens 1998; 16: 1407-14.
- 7) 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.
- 8) D'Agostino RBS, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. JAMA 2001; 286: 180-7. Thomas F, Rudnichi A, Bacri AM, et al . Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors. Hypertension 2001; 37: 1256-61.
- 9) Wei M, Mitchell BD, Haffner SM, Stern MP. Effects of cigarette smoking, diabetes, high cholesterol, and hypertension on all-cause mortality and cardiovascular disease mortality in Mexican Americans. The San Antonio Heart Study. Am J Epidemiol 1996; 144: 1058-65.
- 10) Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. Am Heart J 1988; 116: 1713-24.
- 11) Riscor-98. (programma per PC). Roma, Cardioricerca ed. 1998.
- 12) The Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Eur J Cardiovasc Prev Rehab 2003; 10:S1
- 13) Internet:www.cuore.iss.it, La carta del Rischio per Infarto. gennaio 2003
- 14) Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP,et al. SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular diseases in Europe: the SCORE project. Eur Heart J 2003; 24: 987-1003.
- 15) Mancia G, Bombelli M, Facchetti R, et al. Long-term risk of diabetes, hypertension and left ventricular hypertrophy associated with the metabolic syndrome in a general population. J Hypertens 2008; 26:1602-1611. Ovid Full Text Request Permissions
- 16) Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976; 16: 31-41.
- 17) Hallan S, Asberg A, Lindberg M, Johnsen H. Validation of the Modification of Diet in Renal Disease formula for estimating GFR with special emphasis on calibration of the serum creatinine assay. Am J Kidney Dis 2004; 44: 84-93
- 18) Muiesan ML, Salvetti M, Paini A, Monteduro C et al.. Inappropriate left ventricular mass changes during treatment adversely affects cardiovascular prognosis in hypertensive patients. Hypertension 2007; 49:1077-1083.
- 19) Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, et al. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. Circulation 2006; 113: 664-70.
- 20) Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. Hypertension 2001; 37: 1236-41.
- 21) Feringa HH, Bax JJ, van Waning VH,et al.. The long-term prognostic value of the resting and postexercise ankle-brachial index. Arch Intern Med 2006; 166: 529-35.
- 22) Devereux RB, Wachtell K, Gerds E,et al. Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. JAMA 2004; 292:2350-6.

- 23) Ibsen H, Olsen MH, Wachtell K, et al. Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension* 2005;45: 198-202.
- 24) de Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, et al. Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Circulation* 2004; 110: 921-7.
- 25) Olsen MH, Wachtell K, Ibsen H, et al. LIFE Study Investigators. Reductions in albuminuria and in electrocardiographic left ventricular hypertrophy independently improve prognosis in hypertension: the LIFE study. *J Hypertens* 2006; 24: 775-81.
- 26) Verdecchia P, Angeli F, Borgioni C, et al. Changes in cardiovascular risk by reduction of left ventricular mass in hypertension: a meta-analysis. *Am J Hypertens* 2003; 16: 895-9.
- 27) King DE, Everett CJ, Mainous AG 3rd, Liszka HA. Longterm prognostic value of resting heart rate in subjects with prehypertension. *Am J Hypertens* 2006; 19: 796-800.
- 28) WB. Prognostic implications of baseline electrocardiographic features and their serial changes in subjects with left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1994; 90: 1786-93.
- 29) Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991; 114: 345-52.
- 30) Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation* 1993; 87 (Suppl II): II56-II65.
- 31) Okin PM, Devereux RB, Jern S, et al. LIFE Study Investigators. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. *JAMA* 2004; 292: 2343-9.
- 32) Fagard RH, Staessen JA, Thijs L, et al. Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. Prognostic significance of electrocardiographic voltages and their serial changes in elderly with systolic hypertension. *Hypertension* 2004; 44: 459-64.
- 33) Reichek N, Devereux RB. Left ventricular hypertrophy: relationship of anatomic, echocardiographic and electrocardiographic findings. *Circulation* 1981; 63: 1391-8.
- 34) Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96: 1432-7.
- 35) Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 1998; 128: 262-9.
- 36) Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57: 450-8.
- 37) Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. American Society of Echocardiography's Nomenclature and Standards Committee; Task Force on Chamber Quantification; American College of Cardiology Echocardiography Committee; American Heart Association; European Association of Echocardiography. European Society of Cardiology. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 2006; 7: 79-108.
- 38) Zanchetti A, Bond MG, Hennig M et al. European Lacidipine Study on Atherosclerosis Investigators. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation* 2002; 106: 2422-7.
- 39) Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, et al. ELSA Investigators. Absolute and relative changes in carotid intima-media thickness and atherosclerotic plaques during long-term antihypertensive treatment: further results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA). *J Hypertens* 2004; 22: 1201-12.
- 40) Zanchetti A, Agabiti Rosei E, Dal Palu C, et al. The Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study (VHAS): results of long-term randomized treatment with either verapamil or chlorthalidone on carotid intima-media thickness. *J Hypertens* 1998; 16: 1667-76.
- 41) Burek KA, Sutton-Tyrrell K, Brooks MM, et al. Prognostic importance of lower extremity arterial disease in patients undergoing coronary revascularization in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI). *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 716-21.
- 42) Milani RV, Lavie CJ, Mehra MR, Ventura HO et al. Left ventricular geometry and survival in patients with normal left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol* 2006; 97:959-963. 6
- 43) Taylor HA, Penman AD, Han H, Dele-Michael A, et al. Left ventricular architecture and survival in African-Americans free of coronary heart disease (from the Atherosclerosis Risk In Communities [ARIC] study). *Am J Cardiol* 2007; 99:1413-1420.

- 44) Yasuno S, Ueshima K, Oba K, Fujimoto A et al. Clinical significance of left ventricular hypertrophy and changes in left ventricular mass in high-risk hypertensive patients: a subanalysis of the Candesartan Antihypertensive Survival Evaluation in Japan trial. *J Hypertens* 2009;27:1705-1712. Ovid Full Text Request Permissions
- 45) Bombelli M, Facchetti R, Carugo S et al. Left ventricular hypertrophy increases cardiovascular risk independently of in- and out-of office blood pressure values. *J Hypertens* 2009. [Epub ahead of print]
- 46) Zanchetti A, Hennig M, Hollweck R et al. Baseline values but not treatment induced changes in carotid intima media thickness predict incident cardiovascular events in treated hypertensives. Findings in the ELSA. *Circulation* 2009; 120:1084-1090.
- 47) Sehested T, Jeppesen J, Hansen TW et al. Which markers of subclinical organ damage to measure in individuals with high normal blood pressure? *J Hypertens* 2009; 27:1165-1171. Ovid Full Text Request Permission
- 48) Cirillo M, Lanti MP, Menotti A et al. kidney dysfunction as a cardiovascular risk factor: use of urinary albumin excretion and estimated glomerular filtration rate. *Arch Intern Med* 2008; 168:617-624.
- 49) Ruilope LM, Zanchetti A, Julius et al. VALUE Investigators. Prediction of cardiovascular outcome by estimated glomerular filtration rate and estimated creatinine clearance in the high-risk hypertension population of the VALUE trial. *J Hypertens* 2007; 25:1473-1479. Ovid Full Text Request Permissions
- 50) Waeber B, de la Sierra A, Ruilope LM. Target organ damage: how to detect it and how to treat it? *J Hypertens* 2009; 27(Suppl 3):S13-S18. Ovid Full Text Request Permissions
- 51) de Zeeuw D. Albuminuria: a target for treatment of type 2 diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007; 27:172-181.
- 52) Kearney-Schwartz A, Rossignol P, Bracard S et al. Vascular structure and function is correlated to cognitive performance and white matter hyperintensities in older hypertensive patients with subjective memory complaints. *Stroke* 2009; 40:1229-1236. Ovid Full Text
- 53) Henskens LH, van Oostenbrugge RJ, Kroon AA, et al. Detection of silent cerebrovascular disease refines risk stratification of hypertensive patients. *J Hypertens* 2009; 27:846-853. Ovid Full Text Request Permissions
- 54) Stewart R, Xue QL, Masaki K et al. Change in blood pressure and incident dementia. A 32-Year Prospective Study. *Hypertension* 2009; 54:233-240. Ovid Full Text
- 55) Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006; 354: 2473-83.
- 56) Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67: 2089-100.
- 57) Price TR, Manolio TA, Kronmal RA, et al. Silent brain infarction on magnetic resonance imaging and neurological abnormalities in community-dwelling older adults: the Cardiovascular Health Study. *Stroke* 1997; 28: 1158-64. OS.
- 58) Liao D, Cooper L, Cai J, et al. Presence and severity of cerebral white matter lesions and hypertension, its treatment, and its control: the ARIC Study. *Stroke* 1996; 27: 2262-70.
- 59) Skoog I, Lernfelt B, Landahl S ,et al. 15-year longitudinal study of blood pressure dementia. *Lancet* 1996; 347: 1141-5.
- 60) Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB,et al. Retinal arteriolar narrowing and risk of coronary heart disease in men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA* 2002; 287: 1153-9.
- 61) Wong TY, Klein R, Sharrett AR, et al. ARIC Investigators. Atherosclerosis Risk in Communities Study. Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet* 2001; 358: 1134-40.
- 62) Martinez-Perez ME, Hughes AD, Stanton AV, T et al. Retinal vascular tree morphology: a semiautomatic quantification. *IEEE Trans Biomed Eng* 2002; 49: 912-7.
- 63) Harrison Principi di medicina interna XVI edizione.
- 64) Robbins Le basi patologiche delle malattie.
- 65) Celermajer DS: Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Col Cardiol* 1997, 30: 325-333
- 66) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et Al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, 322: 411-415.

- 67) Pekkanen J, Linn S, Heiss G et al. Ten year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 1990; 322:1700-1717.
- 68) Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Current Opinion Lipidology* 2001 ; 12:383-389.
- 69) Vlachopoulos C, Terentes-Printzios D, Dima I, Aznaouridis K, Stefanadis .Polymorphisms of inflammatory markers/mediators and arterial stiffness. *Hypertension*. 2009 Jun;53(6):e39;
- 70) Dong ZM, Chapman SM, Brown AA. The combined role of P and E selectin in atherosclerosis. *Journal of clinical investigation* 1998, 102: 145.
- 71) Regnault V, Lacolley P, Safar ME. Fibrinogen, genes, and arterial stiffness. *Hypertens*. 2009 Jul;27(7):1350-1.
- 72) McGill HC Jr, McMahan CA, Zieske et Al. Association of coronary heart disease risk factors with the intermediate lesion of atherosclerosis in youth: the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth research group. *Atherosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 2000, 20: 1998-2004
- 73) Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults: the Bogalusa Heart Study. *New England Journal of Medicine* 1998, 338: 1650-1656.
- 74) Peter I, Kelley-Hedgpeath A, Huggins GS et al. Association between arterial stiffness and variations in oestrogen-related genes. *J Hum Hypertens*. 2009 Oct;23(10):636-44.
- 75) Rossi R, Grimaldi T, Orgiliani et Al. Menopause and cardiovascular risk. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2002, 32: 325-328
- 76) Cambien F, Tiret L. Atherosclerosis: from genetic polymorphisms to system genetics. *Cardiovasc Toxicol*. 2005;5:143–152.
- 77) Barbaux S, Tregouet D, Nicaud V, et al. Polymorphisms in 33 inflammatory genes and risk of myocardial infarction -A system genetics approach. *J Mol Med*. In press
- 78) Iwai N, Kazuaki K, Yoshihiro K et Al. Extensive genetic analysis of 10 candidate gene for hypertension in Japanese. *Hypertension* 2006;48:901-907
- 79) Coon H, Leppert MF, Kronenberg F, et al. Evidence for a major gene accounting for mild elevation in LDL cholesterol: the NHLBI Family Heart Study. *Ann Hum Genet*. 1999;63:401– 412.
- 80) Alvim RO, Freitas SR, Ferreira NE, Santos PC et al. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. *Lipids Health Dis*. 2010 Nov 8;9:128
- 81) Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*. 2004;141:137–147.
- 82) Hemminki K, Lorenzo Bermejo J, Forsti A. The balance between heritable and environmental aetiology of human disease. *Nat Rev Genet*. 2006;7:958 –965.
- 83) Tiret L. Gene-environment interaction: a central concept in multifactorial diseases. *Proc Nutr Soc*. 2002;61:457– 463.
- 84) Khare A, ghosh K, Shetty S et Al. Combination of thrombophilia markers in acute myocardial infarction of the young. *Indian Journal Medicine Science*. 2004 58: 381-8.
- 85) Lekakis JP, Papamichael CM, Cimponeriu AT. Atherosclerotic changes of extracoronary arteries are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *American Journal of Cardiology* 2000;l 15:85(8):949-952.
- 86) Kannel WB. Blood pressure as cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *Archive Of Internal Medicine* 1999 nov 24; 157(21):2143-46.
- 87) Ferranti, Perna, Pica e De Sati. Ultrasound monitoring of carotid lesion in hypertension. *High Blood Pression Cardiovascular Prevention* 2004; 11 (1): 35-41
- 88) Verdecchia P, Borgioni C, Ciucci A, et al. Prognostic significance of blood pressure variability in essential hypertension. *Blood Pressure Monitoring* 1996; 1:3-11
- 89) Verschuren WM, Jacobs DR, Bloemberg BP et al. Serum total cholesterol and long term coronary heart disease mortality in different cultures: 25 year follow up of the Seven Country Study. *JAMA* 1995; 274:131-136.
- 90) Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 365222 primary screeners of the multiple risk factor intervention trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256:2823-2828.
- 91) Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993;87:1781-1791.

- 92) Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *American Journal of Cardiology* 1998; 81: 7B-12B.
- 93) Tuomilehto J, Rastenyte D, Jousilahti P, Sarti C, Vartiainen E. Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke: prospective study of the middle aged Finnish population. *Stroke* 1996; 27:210-215.
- 94) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB. Ascorbate restores endothelium dependent vasodilatation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001;103:1618-1623.
- 95) Hafer-macko CE, Ivey FM, Gyure KA. Thrombomodulin deficiency in human diabetic nerve microvasculature. *Diabetes* 2002;51:1957-1963.
- 96) Paul D. Thompson Textbook of Cardiovascular Medicine *Cardiologia Preventiva* Second edition
- 97) Dempsey RJ, Moore RW. Amount of smoking independently predicts carotid artery atherosclerosis severity. *Stroke* 1992 May vol 23, No 5: 693-696
- 98) Giannattasio C, Mancina G, Arterial distensibility in human. Modulating mechanism, alteration in diseases and effects of treatment. *J Hypertens.* 2002, 20: 2889-99
- 99) McDonald DA. Blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles 4th ed London: Arnold 1998. 77-142. 216-269, 283-359, 398-437.
- 100) Hansen TW, Staessen JA, Torp-Pederson C et Al. Prognostic value of pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population *Circulation* 2006; 113:664-670
- 101) Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R et Al. Aortic Stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 37: 1236
- 102) Nichols WW. Clinical Measurement of arterial stiffness obtained from non invasive pressure waveforms. *AJH* 2005, 18:35-105
- 103) Nichols WW, O'Rourke MF McDonald's et al. Blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles Third Edition, Ed Arnold, London, Melbourne, Auckland 1990, pp 77-142, 216-269, 283-359, 398-437
- 104) Intengan HD, Deng L, Li J, et al: Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33:569-74
- 105) Stephen P, Glasser and Donna K. Arnett. Vascular Stiffness and the "Chicken-or-the-Egg" Question. *Hypertension* 2008;51;177-178.
- 106) Giannattasio C, Failla M, Lucchina S, et al. Arterial stiffening influence of sympathetic nerve activity: evidence from hand transplantation in humans. *Hypertension* 2005;45:608-611.
- 107) Lehoux S, Lemarie C, Esposito B, et al: Pressure induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 2004; 109: 1041-47
- 108) Sie MP, Yazdanpanah M, Mattace-Raso FU, Uitterlinden AG, et al. Genetic variation in the renin-angiotensin system and arterial stiffness. The Rotterdam Study. *Clin Exp Hypertens.* 2009 Jul;31(5):389-99.
- 109) Tsuda S, Okazaky M, Uesono Y, et al: Activation of extracellular signal-regulated kinase is essential for pressure-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2002; 446:15-24
- 110) Arnett DK, Evans GW, Riley WA. Arterial stiffness: a new cardiovascular risk factor? *Am J Epidemiol* 1994;140:669-82.
- 111) Giannattasio C, Failla M, Capra A et al. Increased arterial stiffness in normoglycemic normotensive offspring of type 2 diabetic parents. *Hypertension.* 2008;51:182-187.
- 112) Heiskanen M, Kähönen M, Hurme M, Lehtimäki T, et al. Polymorphism in the IL10 promoter region and early markers of atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis.* 2010 Jan;208(1):190-6. Epub 2009 Jul 8.
- 113) McEniery CM, Yasmin, Hall IR et al.. Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1753-1760.
- 114) Sharon ML, Wallace, Yasmine, et al. Isolated systolic hypertension characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2007; 50: 228-233
- 115) Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1994;330:1036-1040.
- 116) Lind L. Systolic and diastolic hypertension impair endothelial vasodilatory function in different types of vessels in the elderly: the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *J Hypertens.* 2006;24:1319-1327.
- 117) Nagano M, Nakamura M, Sato K, Tanaka F, Segawa T, Hiramori K Association between serum C-Reactive Protein levels and Pulse Wave Velocity: a population-based cross-sectional study in a general population Atherosclerosis 2005; 180:189-195.

- 118) Kampus P, Muda P, Kals J, Ristimae T, Fischer K, Teesalu R, Zilmer M The relationship between inflammation and arterial stiffness in patients with essential hypertension *International Journal of Cardiology* 2006; 112:46-51
- 119) McEniery CM, Wallace S, Mackenzie IS, Cockcroft JR, Wilkinson IB C-Reactive Protein is associated with Arterial Stiffness in apparently healthy individuals *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004; 24:969
- 120) Mancia G, Giannattasio C. Arterial distensibility and the sympathetic nervous system. *Handbook of Hypertension*. 2006; Vol 23: 213-221.
- 121) Boutouyrie P, Lacolley P, Girerd X, Beck L, Safar M, Laurent S. Sympathetic activation decreases medium-sized arterial compliance in humans. *Heart Circ Physiol* 1994; 36: H1368-H1376
- 122) Perret F, Mooser V, Tardy Y, Meister JJ, Mooser E, et al. Effect of cold pressor test on internal diameter of the radial artery. *Am J Hypertens* 1989; 2:727-728
- 123) Failla M, Grappiolo A, Cargo S, Calchera I, Giannattasio C, Mancia G. Effects of cigarette smoking on carotid and radial artery distensibility. *J Hypertens* 1997;15:1659-1664.
- 124) Randall OS, Esler MD, Bulloch EG, Maisel AS, Ellis CN, Zweifler AJ, et al. Relationship of age and blood pressure to baroflex sensitivity and arterial compliance in man. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976;3:357s-360ss
- 125) Giannattasio C, Achilli F, Failla M et al. Carotid and aortic distensibility in congestive heart failure: effect of high dose angiotensin-converting enzyme inhibitor or low-dose association with angiotensin type1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(8):1275-1282.
- 126) Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27:2588 –2605.
- 127) Blacher J, Kakou A, Lacombe JM, Safar ME. Preferential association of aldosterone synthase gene polymorphism with central blood pressure and wave reflections in hypertensive individuals. *J Hum Hypertens*. 2010 Apr;24(4):291-9.
- 128) Jung JY, Hwang YH, Lee H, Ro H, Lee H, et al. Association of AHSG gene polymorphisms and aortic stiffness in peritoneal dialysis patients. *J Nephrol*. 2010;31(6):510-7.
- 129) Iemitsu M, Murakami H, Sanada K et al. Lack of carotid stiffening associated with MTHFR 677TT genotype in cardiorespiratory fit adults. *Physiol Genomics*. 2010 Jul 7;42(2):259-65.
- 130) Schillaci G, Pirro M, Vaudo G, et al: Metabolic Syndrome is associated with aortic stiffness in untreated essential hypertension. *Hypertension* 2005; 45:1078-8
- 131) Williams B, Lacy PS, Thom SM et al. M. CAFE Investigators; Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Investigators; CAFE Steering Committee and Writing Committee. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation*. 2006;113:1213–1225.
- 132) Weber T, Auer J, O'Rourke MF et al. Increased arterial wave reflections predict severe cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J*. 2005;26:2657–2663.
- 133) McEniery CM, Yasmin, Hall IR, Qasem A et al. Normal vascular aging : differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1753–1760.
- 134) Tine Hansen, Jan A Staessen, et al: Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation* 2006;113; 664-670
- 135) Cheol Ung Choi, Eun Bum Park, Soon Yong Suh et al. Impact of Aortic Stiffness on cardiovascular disease in patient with chest pain. *Am J Hypertens* 2007; 20:1163-1169.
- 136) Dijk, Algra, van der GY et al Carotid stiffness and the risk of new vascular events in patients with manifest cardiovascular disease. The SMART study. *Eur Heart J*. 2005; 26:1213-1220
- 137) Nichols, O'Rourke. McDonald's. *Blood flow in arteries; Theoretical, experimental and clinical principles*. Third Edition. Ed, Ardnold E, London, Melbourne, Auckland, 1990, pp 77-142, 216-269, 283-359, 398-437
- 138) London; Blacher et al Aterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertension*. 2001; 38:434-438
- 139) Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Cardiovascular disease in the dialysis population: prognostic significance of arterial disorders. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15:105–110.
- 140) Dart, A. M. and Kingwell, B. A. (2001) Pulse pressure: a review of mechanisms and clinical relevance. *J. Am. Coll. Cardiol*. 37, 975–984
- 141) Chae, C. U., Pfeffer, M. A., Glynn, R. J. et al. (1999) Increased pulse pressure and risk of heart failure in the elderly. *JAMA, J. Am. Med. Assoc*. 281, 634–639

- 142) Sutton-Tyrell K, Mackey RH, Holubkov R et al. Measurement variation of aortic pulse wave velocity in the elderly; *Am J Hypertens* 2001; 14:463-468.
- 143) Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM et al. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens.* 1998; 16:2074-2084.
- 144) Mohiaddin RH, Firmin DN, Longmore DB. Age related changes of human aortic flow wave velocity measured noninvasively by magnetic resonance imaging. *J Appl Physiol.* 1993; 74:492-497.
- 145) Karimi R, Zhu T, Bouma BE, Mofrad MR. Estimation of nonlinear mechanical properties of vascular tissues via elastography. *Cardiovasc Eng.* 2008 Dec;8(4):191-202.
- 146) Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME, London G. Stiffness of capacitive and conduit arteries: prognostic significance for end-stage renal disease patients. *Hypertension* 2005;45:592–596.
- 147) Wang X, Keith JC Jr, Struthers AD, Feuerstein GZ. Assessment of arterial stiffness, a translational medicine biomarker system for evaluation of vascular risk. *Cardiovasc Ther.* 2008 Fall;26(3):214-23.
- 148) McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488
- 149) Agabiti-Rosei E, Porteri E, Rizzoni D. Arterial stiffness, hypertension, and rational use of nebivolol. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):353-60.
- 150) Li Y, Wang J, Dolan E, et al: Ambulatory arterial stiffness index derived from 24 hours ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension* 2006; 47:359-64
- 151) Benetos S, Lacolley R: From 24-hour blood pressure measurements to arterial stiffness. A valid short cut? *Hypertension* 2006; 47:327-8
- 152) Dolan E, Thijs L, et al: Ambulatory arterial stiffness index as a predictor of cardiovascular mortality in the Dublin Outcome Study. *Hypertension* 2006, 47:365-70
- 153) Stephane Laurent, John Cockcroft, Luc Van Bortel et al.-Boudier on behalf of the European Network for Noninvasive Investigation of Large Arteries: Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European Heart Journal* (2006) 27, 2588–2605
- 154) Chiu YC, Arand PW, Shroff SG, Feldman T, Carroll JD. Determination of pulse wave velocities with computerized algorithms. *Am Heart J* 1991;121:1460–1470.
- 155) Paul K. HAMILTON, Christopher J. LOCKHART, Cathy E. QUINN and Gary E. McVEIGH. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement and treatment. *Clinical Science* (2007) 113, 157–170
- 156) Asmar R, Benetos A, Topouchian J et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995;26:485–490.
- 157) Burton AC: Relation of structure to function of the tissue of the wall to blood pressure. *Am J Physiol* 1947; 149: 389-99
- 158) Bussy C, Boutouyrie P, Lacolley P, Challande P, Laurent S. Intrinsic stiffness of the carotid artery wall material in essential hypertensives. *Hypertension* 2000;35:1049–1054.
- 159) Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension* 1995;26:355–362.
- 160) Tardy Y, Meister JJ, Perret F, Brunner HR, Arditi M. Non-invasive estimate of the mechanical properties of peripheral arteries from ultrasonic and photoplethysmographic measurements. *Clin Phys Physiol Meas* 1991;12:39–54.
- 161) Hoeks AP, Brands PJ, Smeets FA, Reneman RS. Assessment of the distensibility of superficial arteries. *Ultrasound Med Biol* 1990;16:121–128.
- 162) Girerd X, Giannattasio C, Moulin C, Safar M, Mancía G, Laurent S. Regression of radial artery wall hypertrophy and improvement of carotid artery compliance after long term antihypertensive treatment: the Pericles study. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1064–1073.
- 163) Bussy C, Boutouyrie P, Lacolley P, Challande P, Laurent S. Intrinsic stiffness of the carotid artery wall material in essential hypertensives. *Hypertension* 2000;35:1049–1054.
- 164) Kelly R, Hayward C, Avolio A, O'Rourke MF. Noninvasive determination of age-related changes in the human arterial pulse. *Circulation* 1989; 80:1652–1659
- 165) R.V. Stadler, W.C. Karl and R.S. Lees “The application of echo-tracking methods to endothelium-dependent vasoreactivity and arterial compliance measurements” *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1996; 22: 35-42
- 166) P. Boutouyrie. New techniques for assessing arterial stiffness. *Diabetes & Metabolism* 34 (2008) S21-S26

- 167) Chen C-H, Ting C-T, Nussbacher A, Nevo E, et al. Validation of carotid artery tonometry as a means of estimating augmentation index of ascending aortic pressure. *Hypertension* 1996;27:168–175.
- 168) Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension* 2001;38:932–937.
- 169) Adji A, O'Rourke MF. Determination of central aortic systolic and pulse pressure from the radial artery pressure waveform. *Blood Press Monit* 2004;9:115–121.
- 170) Millasseau SC, Patel SJ, Redwood SR, Ritter JM, Chowienczyk. Pressure wave reflection assessed from the peripheral pulse. Is a transfer function necessary? *Hypertension* 2003;41:1016–1020.
- 171) Lacolley P, Challande P, Osborne-Pellegrin M, Regnault V. Genetics and pathophysiology of arterial stiffness. *Cardiovasc Res.* 2009 Mar 1;81(4):637-48. Epub 2008 Dec 20. Review.
- 172) Weber T, Auer J, O'Rourke MF et al. Increased arterial wave reflections predict severe cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* 2005;26:2657–2663.
- 173) Progetto genoma umano [www.ornl.gov](http://www.ornl.gov) .
- 174) Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past success for Mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003; 33: 228-237
- 175) [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)
- 176) The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005;437:1299 –1320. [hapmap.ncbi.nlm.nih.gov](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov)
- 177) Patil N, Berno AJ, Hinds DA et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science.* 2001;294:1719 –1723.
- 178) Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002; 296:2225–2229.
- 179) Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2003;4:587–597.
- 180) Conrad DF, Jakobsson M, Coop G et al. A worldwide survey of haplotype variation and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet.* 2006;38:1251–1260.
- 181) Zeggini E, Rayner W, Morris AP et al. An evaluation of HapMap sample size and tagging SNP performance in large-scale empirical and simulated data sets. *Nat Genet.* 2005;37:1320 –1322.
- 182) de Bakker PI, Burtt NP, Graham RR et al. Transferability of tag SNPs in genetic association studies in multiple populations. *Nat Genet.* 2006;38:1298 –1303.
- 183) Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007;316:1491
- 184) Schunkert H, Gotz A, Braund P et al. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 2008;117:1675-1684.
- 185) Holdt L, Beutner F, Markus S et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:620-627.
- 186) Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension.* 2001;37:1236 –1241.
- 187) Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension.* 2002;39:10 –15.
- 188) Laurent S, Katsahian S, Fassot C et al. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke.* 2003;34:1203–1206.
- 189) Laurent S, Boutouyrie and Lacolley P. Structural and Genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 2005;45:1050-1055
- 190) Tsipouras P, Del Mastro R, Sarfarazi M et al. Genetic linkage of the Marfan syndrome, ectopia lentis, and congenital contractural arachnodactyly to the fibrillin genes on chromosomes 15 and 5. The International Marfan Syndrome Collaborative Study. *N Engl J Med.* 1992;326: 905–909.
- 191) Jondeau G, Boutouyrie P, Lacolley P et al. Central pulse pressure is a major determinant of ascending aorta dilatation in Marfan syndrome. *Circulation.* 1999;99:2677–2681.
- 192) Morris CA, Demsey CA, Leonard CO et al. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr.* 1988; 113:318 –326.
- 193) Aggoun Y, Sidi D, Levy BI et al. Mechanical properties of the common carotid artery in Williams syndrome. *Heart.* 2000;84:290 –293.
- 194) Riley WA, Freedman DS, Higgs NA et al. Decreased arterial elasticity associated with cardiovascular disease risk factors in the young. Bogalusa Heart Study. *Arteriosclerosis.* 1986; 6:378 –386.

- 195) Yasmin, Falzone, R. and Brown, M. J. (2004) Determinants of arterial stiffness in offspring of famiglie with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 17, 292–298
- 196) Gaeta, G., DeMichele, M., Cuomo, S. et al. (2000) Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 343, 840–846
- 197) Sayed-Tabatabaei, F. A., van Rijn, M. J., Schut, A. F. et al. (2005) Heritability of the function and structure of the arterial wall: findings of the Erasmus Rucphen Family (ERF) study. *Stroke* 36, 2351–2356
- 198) Mitchell, G. F., DeStefano, A. L., Larson, M. G. et al. (2005) Heritability and a genome-wide linkage scan for arterial stiffness, wave reflection, and mean arterial pressure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 112,194–199
- 199) Benetos, A., Gautier, S., Ricard, S. et al. (1996) Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 94, 698–703
- 200) Taniwaki, H., Kawagishi, T., Emoto, M. et al. (1999) Association of ACE gene polymorphisms with arterial stiffness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22, 1858–1864
- 201) Mattace-Raso, F. U., van der Cammen, T. J., Sayed-Tabatabaei, F. A. et al. (2004) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and common carotid stiffness. The Rotterdam study. *Atherosclerosis* 174, 121–126
- 202) Balkestein, E. J., Wang, J. G., Struijker-Boudier, H. A. et al. (2002) Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian population. *J. Hypertens.* 20, 1551–1561
- 203) Lajemi, M., Labat, C., Gautier, S. et al. (2001) Angiotensin II type 1 receptor -153A/G and 1166A/C gene polymorphisms and increase in aortic stiffness with age in hypertensive subjects. *J. Hypertens.* 19, 407–413
- 204) Wojciechowska, W., Staessen, J. A., Stolarz, K. et al. (2004) Association of peripheral and central arterial wave reflections with the CYP11B2 -344C allele and sodium excretion. *J. Hypertens.* 22, 2311–2319
- 205) Benetos, A., Topouchian, J., Ricard, S. et al. (1995) Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 26, 44–47
- 206) Gardier, S., Vincent, M., Lantelme, P., et al. (2004) A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor, blood pressure and arterial stiffness in hypertension. *J. Hypertens.* 22,2135–3142
- 207) Wojciechowska, W., Staessen, J. A., Stolarz, K. et al. (2004) Association of peripheral and central arterial wave reflections with the CYP11B2 -344C allele and sodium excretion. *J. Hypertens.* 22, 2311–2319
- 208) Blacher J, Kakou A, Lacombe JM, Safar ME. Preferential association of aldosterone synthase gene polymorphism with central blood pressure and wave reflections in hypertensive individuals. *J Hum Hypertens.* 2010 Apr;24(4):291-9
- 209) Safar, M. E., Cattan, V., Lacolley, P. et al. (2005) Aldosterone synthase gene polymorphism, stroke volume and age-related changes in aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension. *J. Hypertens.* 23, 1159–1166
- 210) Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T. et al. (1988) Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 238, 249–252
- 211) Nicaud, V., Poirier, O., Behague, I. et al. (1999) Polymorphisms of the endothelin-A and -B receptor genes in relation to blood pressure and myocardial infarction: the Etude Cas-TACmoins sur l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) study. *Am. J. Hypertens.* 12, 304–310
- 212) Jin, J. J., Nakura, J.W. Z., Yamamoto, M. et al. (2003) Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 41, 163–167
- 213) Lajemi, M., Gautier, S., Poirier, O. et al. (2001) Endothelin variants and aortic and cardiac structure in never treated hypertensives. *Am. J. Hypertens.* 14, 755–760
- 214) Iemitsu M, Maeda S, Otsuki et Al. Polymorphism in endothelin-related genes limits exercise-induced decreases in arterial stiffness in older subjects. *Hypertension.* 2006;47:928-936
- 215) Farfel, Z., Bourne, H. R. and Iiri, T. (1999) The expanding spectrum of G protein disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 1012–1020
- 216) Siffert, W. (2000) G protein  $\alpha 3$  subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15, 1298–1306
- 217) Benjafield, A. V., Jeyasingam, C. L., Nyholt, D. R., Griffiths, L. R. and Morris, B. J. (1998) G-protein  $\alpha 3$  subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 32, 1094–1097

- 218) Dong, Y., Zhu, H., Sagnella, G. A., Carter, N. D., Cook, D. G. and Cappuccio, F. P. (1999) Association between the C825T polymorphism of the G protein  $\beta$ 3-subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension* 34, 1193–1196
- 219) Nurnberger, J., Saez, A. O., Mitchell, A. et al. The T-allele of the C825T polymorphism is associated with higher arterial stiffness in young healthy males. *J. Hum. Hypertens.* 2004; 18, 267–271
- 220) Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526
- 221) Rees, D. D., Palmer, R.M. and Moncada, S. (1989) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3375–3378
- 222) Chen, W., Srinivasan, S. R., Bond, M. G. et al. (2004) Nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) influences arterial stiffness in adults: The Bogalusa Heart Study. *Am. J. Hypertens.* 17, 553–559
- 223) Lacolley, P., Gautier, S., Poirier, O. et al. (1998) Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J. Hypertens.* 16,31–35
- 224) Li, D. Y., Brooke, B., Davis, E. C., Mecham, R. P. et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998;393, 276–280
- 225) Li, D. Y., Faury, G., Taylor, D. G., Boyle, W. A. et al. (1998) Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J. Clin. Invest.* 102, 1783–1787
- 226) Tromp, G., Christiano, A., Goldstein, N., Indik, Z. et al. (1991) A to G polymorphism in the ELN gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 4314
- 227) Raybould, M. C., Birley, A. J. and Hulten, M. (1994) A Bg1 I polymorphism in the human elastin gene (ELN). *Clin. Genet.* 46, 212–213
- 228) Hanon, O., Luong, V., Mourad, J. J. et al. (2001) Ageing, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans. *Hypertension* 38, 1185–1189
- 229) Brull, D. J., Murray, L. J., Boreham, C. A. et al. (2001) Effect of a COL1A1 Sp1 binding site polymorphism on arterial pulse wave velocity: an index of compliance. *Hypertension* 38, 444–448
- 230) Medley, T. L., Cole, T. J., Gatzka, et al. (2002) Fibrillin-1 genotype is associated with aortic stiffness and disease severity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 105, 810–815
- 231) Powell, J. T., Turner, R. J., Sian, M., et al. (2005) Influence of fibrillin-1 genotype on the aortic stiffness in men. *J. Appl. Physiol.* 99,1036–1040
- 232) Terashima, M., Akita, H., Kanazawa, K., Inoue, N. et al. (1999) Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation* 99, 2717–2719
- 233) Yoon, S., Tromp, G., Vongpunswad, S. et al. (1999) Genetic analysis of MMP3, MMP9 and PAI-1 in Finnish patients with abdominal aortic or intracranial aneurysms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 563–568
- 234) Gnasso, A., Motti, C., Irace, C. et al. (2000) Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1600–1605
- 235) Ghilardi, G., Biondi, M. A., DeMonti, M. et al. (2002) Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke* 33, 2408–2412
- 236) Ye, S., Watts, G. F., Mandalia, S., Humphries, S. and Henney, A. M. (1995) Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br. Heart J*
- 237) Medley, T. L., Kingwell, B. A., Gatzka, C. D., Pillay, P. and Cole, T. J. (2003) Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ. Res.* 92, 1254–1261
- 238) Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Poirier, O. et al. (2003) Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 107, 1579–1585
- 239) Montaner, J., Molina, C. A., Monasterio, J. et al. (2003) Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 107, 598–603
- 240) Medley, T. L., Cole, T. J., Dart, A. M., Gatzka, C. D. and Kingwell, B. A. (2004) Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1479–1484
- 241) Franklin, S. S., Gustin, I. V. W., Wong, N. D. et al. (1997) Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure: The Framingham Heart Study. *Circulation* 96, 308–315
- 242) Atwood LD, Samallow PB, Hixson JE et Al. Genome wide linkage analysis of pulse pressure in Mexican Americans. *Hypertension* 2001;37:425-428.

- 243) Camp NJ, Hopkins PN, Hasstedt SJ et Al. Genome wide multipoint parametric linkage analysis of pulse pressure in large, extended Utah pedigrees. *Hypertension* 2003;42:322-328
- 244) DeStefano AL, Larson MG, Mitchell GF et Al. Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framminghan Heart Study. *Hypertension* 2004;44:152-155
- 245) Turner ST, Fornage M, Jack CR Jr et Al. Genomic susceptibility loci for brain atrophy in hypertensive sibships from GENOA study. *Hypertension* 2005;45:793-798.
- 246) Franceschini N, MacCluer JW, Rose KM et Al. Genome-wide linkage analysis of pulse pressure in American Indians: the Strong Heart Study. *Am J Hypertens*; 2008;21:194-199
- 247) Mitchell GF, DeStefano AL, Larson MG et Al. Heritability and a genome-wide linkage scan for arterial stiffness, wave reflection and mean arterial pressure: the Frammingam Heart Study. *Circulation* 2005;112:194-199
- 248) Bjorck HM, Alehagen U, Persson K et Al. Association of genetic variation on chromosome 9p21.3 and arterial stiffness. *J of Internal Medicine* 2008, 373.
- 249) Tarasov K, Sanna S, Scuteri A et Al. COL4A1 is associated with arterial stiffness by genome wide association sca. *Circ Cardiovasc Genet*; 2009;2:151-158
- 250) World Medical Association Declaration of Helsinki: Recommendations guiding medical doctors in biomedical research involving human subjects.
- 251) Cambien F, Tiret L. Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome. *Circulation* 2007;116:1714-1724.
- 252) Gschwendtner, Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S et al. A sequence variant in ZFH3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):876-8. Epub 2009 Jul 13.
- 253) Wahlstrand B, Orho-Melander M, Delling et al. The myocardial infarction associated CDKN2A/CDKN2B locus on chromosome 9p21 is associated with stroke independently of coronary events in patients with hypertension. *J Hypertens.* 2009 Apr;27(4):769-73.
- 254) Van Bortel LMAB, Struijker-Boudier HAJ, Safar ME Pulse Pressure, Arterial Stiffness and Drug Treatment of hypertension *Hypertension* 2001; 38:914
- 255) Franceschini N, Rose KM, Storti KL Social- and behavioral-specific genetic effects on blood pressure traits: the Strong Heart Family Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009 Aug;2(4):396-401.
- 256) Seidlerová J, Bochud M, Staessen JA .Heritability and intrafamilial aggregation of arterial characteristics. *J Hypertens.* 2008 Apr;26(4):721-8
- 257) Fava C, Ricci MS, Burri P, Minuz P, Melander O. Heritability of the ambulatory arterial stiffness index in Swedish families. *J Hum Hypertens.* 2008 Apr;22(4):298-300.

