



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**TESI DI LAUREA**

**EFFETTO A LUNGO TERMINE DEL CONTROLLO DELLA  
PRESSIONE ARTERIOSA SUI PARAMETRI DI ALTERAZIONE  
VASCOLARE IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI IPERTESI  
ESSENZIALI**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. STEFANO TADDEI**

**Candidato:**

**GIANNI LORENZINI**

**Anno Accademico: 2007-2008**

## INDICE

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPITOLO 1.....</b>	<b>7</b>
<b>Rigidità arteriosa ed ipertensione arteriosa</b>	
<i>1.1 Invecchiamento.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2 Rigidità arteriosa ed onda sfigmica.....</i>	<i>10</i>
<i>1.3 La pressione arteriosa centrale.....</i>	<i>13</i>
<i>1.4 Significato clinico.....</i>	<i>14</i>
<i>1.5 Lo studio CAFE.....</i>	<i>17</i>
<b>CAPITOLO 2.....</b>	<b>19</b>
<b>Il ruolo dell'endotelio nell'ipertensione arteriosa</b>	
<i>2.1 L'Endotelio come organo endocrino.....</i>	<i>19</i>
<i>2.2 La disfunzione endoteliale.....</i>	<i>23</i>
<i>2.3 Lo studio della funzione endoteliale.....</i>	<i>23</i>
<i>2.4 La disfunzione endoteliale nel paziente iperteso.....</i>	<i>25</i>
<i>2.5 Il significato clinico della disfunzione endoteliale.....</i>	<i>27</i>
<b>CAPITOLO 3.....</b>	<b>29</b>
<b>Obiettivo dello studio</b>	
<i>3.1 Materiali e metodi.....</i>	<i>29</i>
<i>3.1.1 Selezione dei pazienti.....</i>	<i>29</i>
<i>3.2 Disegno dello studio.....</i>	<i>30</i>

<i>3.3 Studio della rigidità arteriosa</i> .....	30
<i>3.3.1 Pulse Wave Velocity (PWV)</i> .....	30
<i>3.3.2 Pulse Wave Analysis (PWA)</i> .....	31
<i>3.4 Studio della vasodilatazione endotelio indipendente ed endotelio dipendente</i> .....	33
<i>3.5 Misurazione della pressione arteriosa</i> .....	36
<b>CAPITOLO 4</b> .....	<b>37</b>
<b>Risultati</b>	
<b>CAPITOLO 5</b> .....	<b>43</b>
<b>Discussione</b>	
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>47</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>49</b>

## **Riassunto**

L'ipertensione arteriosa rappresenta uno dei principali fattori di rischio cardiovascolare e numerosi studi clinici hanno dimostrato il beneficio della riduzione dei valori pressori sulla mortalità e della morbilità cardiovascolare. Tale beneficio è stato dimostrato valutando la pressione arteriosa periferica misurata al livello dell'arteria omerale.

I pazienti con ipertensione arteriosa presentano alterazioni vascolari precoci come una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente a livello del circolo periferico e una aumentata rigidità arteriosa a livello aortico. Recenti studi clinici hanno suggerito che la disfunzione endoteliale e la rigidità arteriosa siano predittori indipendenti dello sviluppo di eventi cardiovascolari e che quindi possano costituire importanti fattori prognostici nei pazienti ipertesi.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'effetto del controllo efficace della pressione arteriosa ( $PA < 140/90$  mmHg) sui parametri di alterazione funzionale e strutturale vascolare in una popolazione di ipertesi essenziali dopo terapia antiipertensiva a lungo termine. A tale scopo in 98 pazienti ipertesi sono stati valutate la funzione endoteliale e la rigidità arteriosa in condizioni basali, in assenza di terapia farmacologica e dopo il trattamento antiipertensivo con un periodo di follow-up medio di circa tre anni. La funzione endoteliale è stata valutata a livello dell'arteria brachiale con tecnica ecografica come vasodilatazione indotta dall'aumento di flusso causato dall'iperemia reattiva post-ischemica dell'avambraccio (FMD) e come vasodilatazione indotta dalla somministrazione di nitroglicerina (NTG) sub-linguale. Per la valutazione della rigidità arteriosa è stata utilizzata tecnica tonometrica con successiva analisi della morfologia (con calcolo

dell'augmentation index, AIx) e della velocità dell'onda pressoria carotideo-femorale (aortica) e carotideo-radiale (periferica) (pulse wave velocity, PWV). Un efficace controllo della PA è stato ottenuto nel 53% dei pazienti, nei quali i valori pressori si riducevano da 152/94 mmHg a 127/79 mmHg, mentre nei pazienti non controllati i valori pressori in media andavano da 154/94 mmHg a 147/85 mmHg. I pazienti con PA non controllata sono risultati più anziani (52 vs 50 anni) e più frequentemente maschi (80 vs 63%), pertanto le analisi sono state corrette per età, sesso e PA media. La FMD, corretta anche per la risposta endotelio-indipendente alla NTG, era significativamente migliorata nei pazienti controllati (da 5.3 a 6.7%) ma non in quelli non controllati (da 5.7 a 6.3%). La PWV aortica era significativamente ridotta nei pazienti controllati (da 8.7 a 8.0 m/s) ma non in quelli non controllati (da 8.8 a 8.5 m/s). Infine la PWV periferica e l'AIx non erano significativamente modificati nei due gruppi di pazienti ipertesi.

In conclusione, un controllo efficace dei valori pressori si associa ad un miglioramento della funzione endoteliale dell'arteria omerale e della rigidità arteriosa centrale. Questi risultati suggeriscono che il beneficio della terapia antiipertensiva a lungo termine si possa esplicare anche attraverso la regressione delle alterazioni funzionali e strutturali vascolari.

## **Introduzione**

L'ipertensione arteriosa essenziale è il più importante fattore di rischio per la patologia cardiovascolare, rappresentando la principale causa alla quale sia attribuibile la mortalità non solo nei paesi occidentali ma anche in quelli in via di sviluppo <sup>1</sup>. Gli studi epidemiologici hanno dimostrato che il rischio di eventi cerebro-vascolari e coronarici nei pazienti ipertesi sia direttamente proporzionale all'aumento dei valori pressori per ogni categoria d'età, dai giovani adulti agli anziani <sup>2,3</sup>. Inoltre, la riduzione della PA ottenuta negli studi clinici controllati spiega largamente il beneficio della terapia antiipertensiva nella prevenzione degli eventi cardiovascolari <sup>4,5</sup>. Tuttavia, a parità di valori pressori, i pazienti ipertesi mostrano un rischio ancora superiore ai soggetti normotesi. Questa evidenza è spiegabile dalla considerazione che le complicanze cardiovascolari associate all'ipertensione arteriosa sono conseguenti anche alla presenza di condizioni cliniche associate (pregresse complicanze cardiovascolari e renali), di impegno degli organi bersaglio (ipertrofia ventricolare sinistra, ispessimento medio-intimale carotideo, modesta riduzione del filtrato glomerulare e microalbuminuria), nonché dalla associazione con altri fattori di rischio, che infatti devono essere considerati per una corretta stratificazione del rischio cardiovascolare globale dei pazienti con ipertensione arteriosa <sup>5</sup>. Oggi è possibile valutare anche alcune alterazioni vascolari precoci, sia funzionali che strutturali, che si associano all'ipertensione arteriosa, come l'aumento della rigidità arteriosa <sup>6</sup> e la disfunzione endoteliale <sup>7</sup>. Queste alterazioni, oltre a rappresentare meccanismi patogenetici di danno dell'ipertensione arteriosa, possono essere considerati elementi aggiuntivi del rischio cardiovascolare, tanto che le recenti linee guida dell'Ipertensione Arteriosa hanno incluso la rigidità delle grandi arterie nella valutazione del danno degli organi bersaglio <sup>5</sup>.

## **Capitolo 1: Rigidità arteriosa ed Ipertensione Arteriosa.**

Il rapporto fra valori della PA ed eventi cardiovascolari è stato messo chiaramente in evidenza con la classica misurazione dei valori pressori a livello dell'arteria omerale<sup>2-4</sup>. Questa relazione è documentabile sia per la PA sistolica (PAS), in modo più significativo nei pazienti con età superiore a 50 anni, che per quella diastolica (PAD)<sup>2-4</sup>. La PAS è prevalentemente funzione della gittata sistolica, della compliance arteriosa (ovvero della distensibilità della parete vascolare) e, in minor misura, delle resistenze vascolari periferiche; la PAD e la PA media (PAM) invece sono prevalentemente funzione della gittata cardiaca e delle resistenze vascolari periferiche. Da ciò si può concludere che la PAS e la pressione pulsatoria (PP) (PAS-PAD) sono strettamente correlate con la compliance arteriosa<sup>8</sup>. La distensibilità del vaso influenza la velocità di propagazione dell'onda pressoria, che ne è inversamente proporzionale. Assumendo come modello della propagazione quello per il quale l'albero arterioso viene assimilato ad un semplice tubo distensibile che termina in corrispondenza delle arterie periferiche, le cui proprietà elastiche permettono la generazione di onde di pressione che vengono trasmesse attraverso tutta la sua lunghezza, le onde anterograde generate vengono riflesse in periferia in considerazione delle alte resistenze distali e di conseguenza si formano delle onde retrograde<sup>9</sup>.

Le arterie elastiche di conduttanza, ed in modo particolare l'aorta, tendono a convertire il flusso da intermittente a continuo; durante la sistole infatti il sangue immesso in aorta dal ventricolo sinistro determina due effetti principali:

- progressione verso la periferia della colonna sanguigna;
- dilatazione dell'aorta e dei suoi rami.

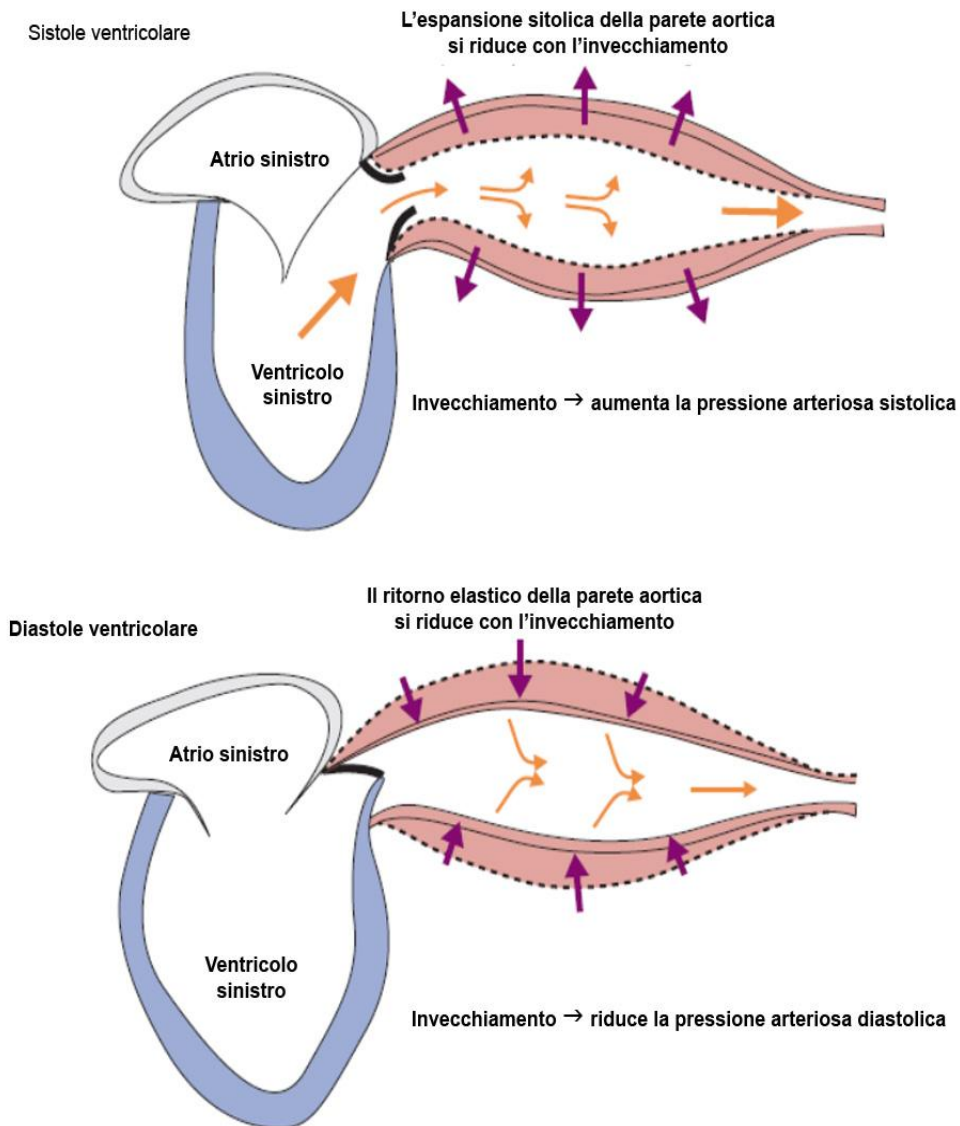
Ciò consente di mantenere costante la perfusione periferica durante la diastole, attraverso la conversione in energia cinetica dell'energia elastica immagazzinata dalla parete aortica in sistole. Quando la rigidità arteriosa aumenta, si riduce anche la spinta fornita dal ritorno elastico della parete aortica e di conseguenza si ha un aumento della PAS ed una riduzione della PAD (con inevitabile aumento della PP). La PP quindi può essere interpretata correttamente come un indice della pulsatilità e quindi dell'oscillazione delle pareti vascolari; questo determina un aumento del post-carico ventricolare e favorisce lo sviluppo di Ipertrofia Ventricolare Sinistra (IVS) ed è infatti considerata fattore di rischio indipendente, specie nella popolazione anziana. Tuttavia non è ancora ben chiaro quanto la PP sia causa di danno cardiovascolare (CV) o piuttosto un marker di ridotta distensibilità arteriosa, tanto più che allo stato attuale non si può neanche affermare con certezza che la riduzione del rischio cardiovascolare legato alla riduzione dei valori di pressione pulsatoria sia indipendente dalla riduzione dei valori di PA sistolica .

### **1.1 Invecchiamento**

L'invecchiamento si accompagna ad un aumento della rigidità arteriosa che si riflette sul piano clinico con un incremento della PAS e della PP <sup>10</sup>.

Infatti, un'aorta più rigida si caratterizza per una ridotta espansione sistolica, con conseguente maggiore energia cinetica ed aumento della PAS, mentre durante la diastole si ha un minor ritorno elastico che contribuisce alla riduzione della PAD (figura 1).





**Figura 1: Effetto dell'invecchiamento sulle pareti aortiche. L'aumento della rigidità determina un incremento della pressione sistolica ed una riduzione della diastolica con conseguente aumento della pressione pulsatoria.**

Le principali alterazioni istologiche si verificano a carico della tonaca intima (dove si osservano fenomeni di ipertrofia ed iperplasia) e soprattutto della media. Il carico sopportato da quest'ultima determina la perdita della corretta disposizione delle fibre elastiche e laminari che si osserva in giovane età, favorendo l'assottigliamento, la lacerazione e la frammentazione della parete vascolare<sup>11</sup>. A questo livello si assiste ad un vero e proprio riarrangiamento sia a livello

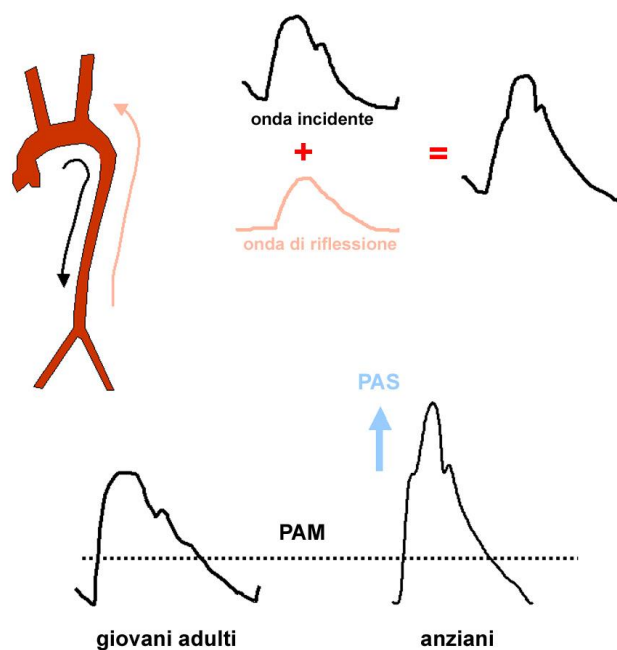
molecolare che strutturale: si verifica da un lato la ridotta sintesi e l'aumentata degradazione dell'elastina, e dall'altro un'aumentata sintesi di collagene di tipo I e III<sup>11,12</sup>, associata ad una riduzione numerica ed alla sdifferenziazione delle cellule muscolari lisce (CML), che, perdendo le loro capacità contrattili ed acquisendo capacità sintetiche, portano ad un'alterata interazione tra cellule muscolari lisce e molecole della matrice extracellulare<sup>11</sup>. L'età inoltre rappresenta un fattore importante nel determinare le caratteristiche dell'onda di riflessione arteriosa<sup>12,13</sup>. Infatti quando le arterie divengono rigide, l'aumento della velocità comporta che l'onda di riflessione ritorni all'aorta durante la fase sistolica precoce dove si somma con l'onda sfingica incidente aumentando la PAS, la PP ed il post-carico cardiaco (vedi dopo). Le alterazioni della parete arteriosa che si osservano nell'invecchiamento sono anticipate ed accelerate dalla presenza di ipertensione arteriosa<sup>8,14</sup>.

## **1.2 Rigidità arteriosa e riflessione dell'onda sfingica**

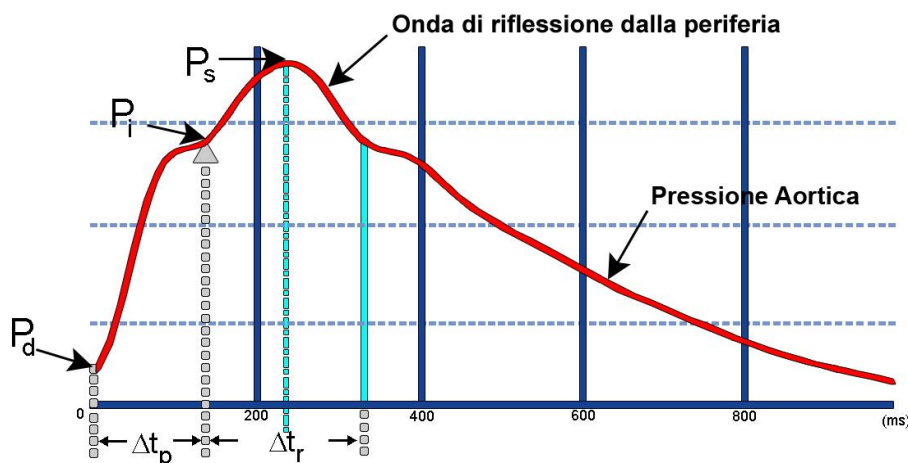
Le caratteristiche dell'onda incidente anterograda, cioè l'onda prodotta dall'eiezione ventricolare sinistra, dipendono essenzialmente dalla funzione contrattile ventricolare e dall'elasticità aortica<sup>12,15</sup>. Le onde di riflessione (vedi precedente paragrafo) prendono origine solitamente dai punti di ramificazione, dai restringimenti vascolari e dalle variazioni di distensibilità lungo l'albero arterioso. Le caratteristiche dell'onda di riflessione dipendono dall'elasticità di tutto l'albero arterioso (a. elastiche, muscolari ed in misura minore arteriole) e dal tempo impiegato per andare e tornare al cuore dalla periferia ( $\Delta t$ )<sup>12,15</sup>.

La velocità di propagazione è direttamente proporzionale alla rigidità arteriosa e si misura come Pulse Wave Velocity (PWV), ovvero il rapporto fra la distanza di due punti dell'albero arterioso ed il tempo impiegato per percorrere tale distanza.

Il contributo dell'onda riflessa può invece essere valutato attraverso l'Augmentation Index (AIx), ovvero la misura dell'aumento della pressione pulsatoria centrale dovuta al ritorno più o meno precoce dell'onda retrograda, espresso come percentuale della PP. L'onda di pressione aortica può essere ricavata da quella periferica utilizzando una funzione matematica di trasformazione validata<sup>12,13,16</sup>. Mentre la PWV dipende essenzialmente dalla rigidità arteriosa, l'AIx rappresenta invece un indice integrato perché dipende sia dai siti di riflessione (prevalentemente dallo stato del microcircolo) che dalla rigidità arteriosa centrale.



**Figura 2: Differente morfologia dell'onda pressoria nell'anziano rispetto al giovane adulto. Come si può notare l'incremento della rigidità arteriosa determina un aumento della PA sistolica.**



**Figura 3: Onda pressoria aortica.**  $P_s$  indica il picco della PA sistolica.  $P_i$  è il punto di inflessione che segna l'inizio della branca ascendente dell'onda di riflessione.  $P_d$  rappresenta il valore minimo di pressione diastolica.  $\Delta t_p$  è il tempo impiegato dall'onda incidente per andare dall'aorta ascendente al principale sito di riflessione e tornare indietro.  $\Delta t_r$  rappresenta la durata sistolica dell'onda di riflessione. Pressione Pulsatoria (PP) =  $(P_s - P_d) = (P_i - P_d) + (P_s - P_i)$ . Augmentation Index (AIx) =  $(P_s - P_i)(P_s - P_d)$ .

La conseguenza clinica di un aumento della PWV è ben spiegata nella figura 3: l'onda di riflessione si sovrappone all'onda incidente nella fase precoce della sistole (da qui l'aumento concomitante dell'AIx) determinando come risultante un valore di PAS maggiore di quella misurata nel soggetto normale; le conseguenze principali da un punto di vista clinico sono rappresentate da un aumento del post-carico cardiaco, una maggior sollecitazione delle pareti vascolari e una riduzione della pressione media durante la diastole con riduzione del flusso e con conseguente riduzione della perfusione coronarica.

In condizioni fisiologiche, l'albero arterioso si caratterizza per la presenza di un gradiente di rigidità determinato da un'eterogeneità molecolare, strutturale ed istologica della parete vascolare<sup>17</sup>. Le arterie centrali sono caratterizzate da un'elasticità che va progressivamente riducendosi verso la periferia, per aumento della componente muscolare a scapito di quella elastica, fino alle arterie distali più

rigide. Ciò fa sì che a livello del circolo periferico il fenomeno della riflessione si accentui (i siti di riflessione sono più vicini) determinando un'amplificazione dell'onda di pressione maggiore che a livello prossimale ("Amplification Phenomenon")<sup>18,19</sup>. Da ciò deriva che l'uso della pressione brachiale come surrogato della pressione aortica o carotidea può risultare inadeguato specie in soggetti giovani. Ovviamente il gradiente succitato si riduce e può anche invertirsi all'aumentare dell'età e nell'ipertensione in considerazione di quanto fin qui detto (si pensi che la rigidità della carotide comune in un settantenne normoteso è sei volte maggiore rispetto ad un ventenne sano)<sup>20</sup>.

Riassumendo, il modello accettato dal maggior numero di autori è un modello propagativo, consistente in un tubo viscoso-elastico, le cui proprietà consentono la generazione di un'onda anterograda che si propaga lungo questo, caratterizzato da numerose diramazioni e da terminazioni ad alta resistenza che generano onde retrograde. Maggiore è la rigidità arteriosa, maggiore sarà la velocità di propagazione delle onde retrograde ed anterograde.

### **1.3 La pressione arteriosa centrale**

La PAS e la PP periferiche, misurate a livello omerale, non dovrebbero essere confuse con la PAS e la PP centrali. Infatti, nelle arterie periferiche, i siti di riflessione sono più vicini rispetto a quelle centrali e le onde riflesse si propagano più velocemente in ragione della maggiore rigidità; quindi coerentemente con il "fenomeno dell'amplificazione" la PAS e la PP brachiali sovrastimano (nei soggetti giovani) la PAS e la PP centrali<sup>21</sup>. Dato che con l'avanzare dell'età, nell'ipertensione, nel diabete mellito i valori di PWV, AIx, PP e PAS centrale tendono ad aumentare e sono predittivi di danno degli organi bersaglio, vengono

usati indifferentemente come indice di rigidità arteriosa <sup>22</sup>. In realtà questa semplificazione appare eccessiva.

Innanzitutto i determinanti sono diversi: la PAS centrale, la PP centrale e l'Aix dipendono dalla velocità di propagazione dell'onda, dall'ampiezza dell'onda riflessa, dai siti di riflessione e dalla durata e dal pattern dell'eiezione ventricolare (in modo particolare in relazione ai cambiamenti della frequenza cardiaca e della contrattilità ventricolare). La PWV invece rappresenta un indice più diretto di rigidità arteriosa e ne è influenzato in minor misura <sup>23</sup>. In secondo luogo le condizioni fisiopatologiche ed i trattamenti farmacologici possono avere effetti diversi sui valori misurati: una riduzione (o un aumento) della PP e dell'Aix, in assenza di modificazioni della PWV, suggerisce un effetto predominante sulle onde di riflessione, sulla frequenza cardiaca o sulla frazione di eiezione rispetto alla rigidità arteriosa e viceversa <sup>22</sup>. Nello studio Anglo Cardiff <sup>25</sup> Collaborative Trial (su popolazione normale) è stato evidenziato che l'età influenza maggiormente l'Aix rispetto alla PWV prima dei 50 anni, mentre successivamente accade il contrario.

Ciò implica che l'analisi dell'onda di pressione deve essere integrata con la misurazione della PWV aortica ai fini di stabilire quale sia il contributo della rigidità arteriosa allo sviluppo dell'onda di riflessione e, di conseguenza, all'aumento dei valori di PAS centrale e PP centrale.

#### **1.4 Significato Clinico**

Lo sviluppo di IVS è una delle principali conseguenze dell'aumento della PP e della PAS, tuttavia è interessante notare come la rigidità arteriosa sia associata allo sviluppo di IVS anche nei pazienti normotesi <sup>26</sup>. La misurazione della rigidità aortica, che riflette anche le alterazioni della parete vascolare, può essere indicativa

della presenza di lesioni parallele in altre sedi come ad esempio il circolo coronarico. Infatti questa, oltre ad essere associata all'età e ad altri fattori di rischio CV, è causata da diversi meccanismi che comprendono la rottura delle fibre elastiche, la sintesi di collagene, l'infiammazione, la necrosi delle cellule muscolari lisce, calcificazioni e la diffusione di macromolecole nel contesto della parete arteriosa <sup>17</sup>. È noto che questi fenomeni accadono parallelamente anche al livello del circolo coronarico <sup>25</sup>.

Un aumento della rigidità arteriosa si associa ad eventi cerebro-vascolari attraverso l'aumento della PP centrale, influenzando il rimodellamento arterioso sia intra che extra-cranico, favorendo l'ispessimento medio-intimale e lo sviluppo di placche aterosclerotiche a livello della carotide. Sembra inoltre che la rigidità arteriosa determini una maggior prevalenza di patologie degenerative della sostanza bianca e ne influenzi la prognosi <sup>24</sup>. Non si deve poi dimenticare che lo scompenso cardiaco e la patologia coronarica sono fattori di rischio per eventi cerebrovascolari.

Molte condizioni fisiologiche e fisiopatologiche sono associate all'aumento della rigidità arteriosa quali età, menopausa, sedentarietà, fattori di rischio modificabili e non (fumo di tabacco, ipertensione, ipercolesterolemia, diabete), malattie cardiovascolari (cardiopatía ischemica, scompenso cardiaco, stroke), malattie non cardiovascolari (insufficienza renale terminale o moderata, artrite reumatoide, vasculiti sistemiche, lupus eritematoso sistemico) <sup>19,22,25</sup>.

Quanto detto fino a ora tuttavia non chiarisce fino in fondo il ruolo della rigidità arteriosa nello sviluppo di malattie CV, ovvero, rimane da stabilire se si possa affermare con certezza che questa sia un marker o un fattore di rischio indipendente. La maggior parte degli studi effettuati in questo senso ha evidenziato che la rigidità arteriosa misurata come PWV carotido-femorale ha un valore

predittivo indipendente di mortalità e morbilità CV in pazienti con Ipertensione Essenziale non complicata, diabete mellito di tipo 2, insufficienza renale terminale e nella popolazione generale<sup>26</sup>. Non solo ma, dopo l'aggiornamento del Framingham risk score, è stato messo in evidenza che questa in realtà ha un valore predittivo maggiore di ogni singolo classico fattore di rischio <sup>26,27,28</sup>, suggerendo che la PWV è misura di un danno arterioso che si è sviluppato in lungo periodo di tempo. La glicemia, l'emoglobina glicata, la PA ed i lipidi plasmatici sono inevitabilmente soggetti a delle fluttuazioni ed è quindi difficile quantificare i danni che hanno procurato nel lungo periodo. Un'altra possibile spiegazione è che nei pazienti con aumento della PWV i fattori di rischio si sono effettivamente concretizzati in un danno alla parete vascolare <sup>29</sup>.

L'Aix centrale e la PP centrale, misurate entrambe con la tonometria carotidea <sup>28,29</sup> o derivate attraverso una funzione matematica dalla tonometria dell'arteria radiale <sup>30,31</sup> sono fattori di rischio indipendenti in pazienti con insufficienza renale terminale <sup>27,28</sup>, in pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica percutanea <sup>29</sup> e negli ipertesi dello studio CAFE' <sup>30</sup>.

Se da un lato il valore prognostico dell'aumento della rigidità arteriosa è oramai noto, ciò che deve essere ancora definito è il ruolo che una sua riduzione, associata quindi ad una riduzione della PA centrale, della PWV e dell'Aix, ha nel ridurre il rischio cardiovascolare, indipendentemente dalla normalizzazione dei fattori di rischio cardiovascolare classici. La riduzione della rigidità arteriosa potrebbe riflettere la reale riduzione del danno alla parete arteriosa; infatti PA, lipidi plasmatici, glicemia possono ridursi nell'arco di poche settimane con trattamento farmacologico, determinando quindi una riduzione consistente del rischio cardiovascolare, ma senza ancora aver determinato alcun miglioramento delle



lesioni aterosclerotiche e della rigidità arteriosa. Quindi esiste un gap temporale fra riduzione dei fattori di rischio e riduzione della rigidità arteriosa <sup>23</sup>.

Gli unici dati a disposizione indicano che la mancata riduzione della PWV, associata ad una riduzione dei valori pressori in pazienti in insufficienza renale terminale, è un predittore indipendente di mortalità <sup>30</sup>. L'impatto in termini di mortalità cardiovascolare sulla popolazione è ancora da stabilire, in modo particolare per quei soggetti che si attestano ad un livello di rischio aumentato, ad esempio nell'ipertensione, dislipidemia, diabete, insufficienza renale lieve-moderata. Per quanto riguarda la PP centrale esistono delle evidenze indirette, ma non è ancora possibile affermare che la sua riduzione determini una concomitante riduzione della mortalità CV indipendentemente dai fattori di rischio classici. Lo studio REASON ha messo in evidenza come solo l'associazione perindopril/indapamide riduceva significativamente la riflessione a livello carotideo <sup>31,32</sup>, determinando una riduzione selettiva dei valori di PAS e PP centrale, che ha portato ad una regressione dell'IVS <sup>32</sup>; al contrario, la monoterapia con atenololo non ha determinato la riduzione di PP carotidea e la regressione dell'IVS.

### **1.5 Lo studio CAFE**

Lo studio CAFE <sup>30</sup>, un sotto-studio del trial ASCOT, ha confrontato gli effetti di due diverse terapie antiipertensive (atenololo +/- tiazidico di base vs amlodipina +/- perindopril di base) sulla PA centrale in più di 2199 pazienti in un periodo di più di 4 anni. Nonostante una riduzione simile della pressione brachiale, lo schema con amlodipina ha portato ad una riduzione maggiore della PA centrale rispetto allo schema contenente atenololo ( $\Delta$ PAS aortica centrale 4,3 mm Hg;  $\Delta$ PP aortica centrale 3 mm Hg;  $\Delta$ AIx 6,5%). Lo studio ha quindi dimostrato che la riduzione della pressione misurata a livello brachiale non riflette necessariamente l'impatto

clinico della riduzione della PA centrale; inoltre i meccanismi con i quali i farmaci agiscono possono avere efficacia diversa sulla PA centrale, nonostante determinino un abbassamento simile della pressione misurata al livello della brachiale, e quindi avere anche un significato in termini di riduzione di eventi cardiovascolari e di incidenza di danno d'organo bersaglio diverso. Ciò spiegherebbe quindi perché alcuni farmaci hanno miglior profilo di prevenzione del danno d'organo rispetto ad altri.

E' tuttora argomento di dibattito l'eventualità di praticare di routine lo studio attraverso la tonometria della PWV, della PWA e della PAC in pazienti ipertesi come un indicatore terapeutico e diagnostico <sup>31</sup>.

## **Capitolo 2: Il ruolo dell'endotelio nell'ipertensione arteriosa**

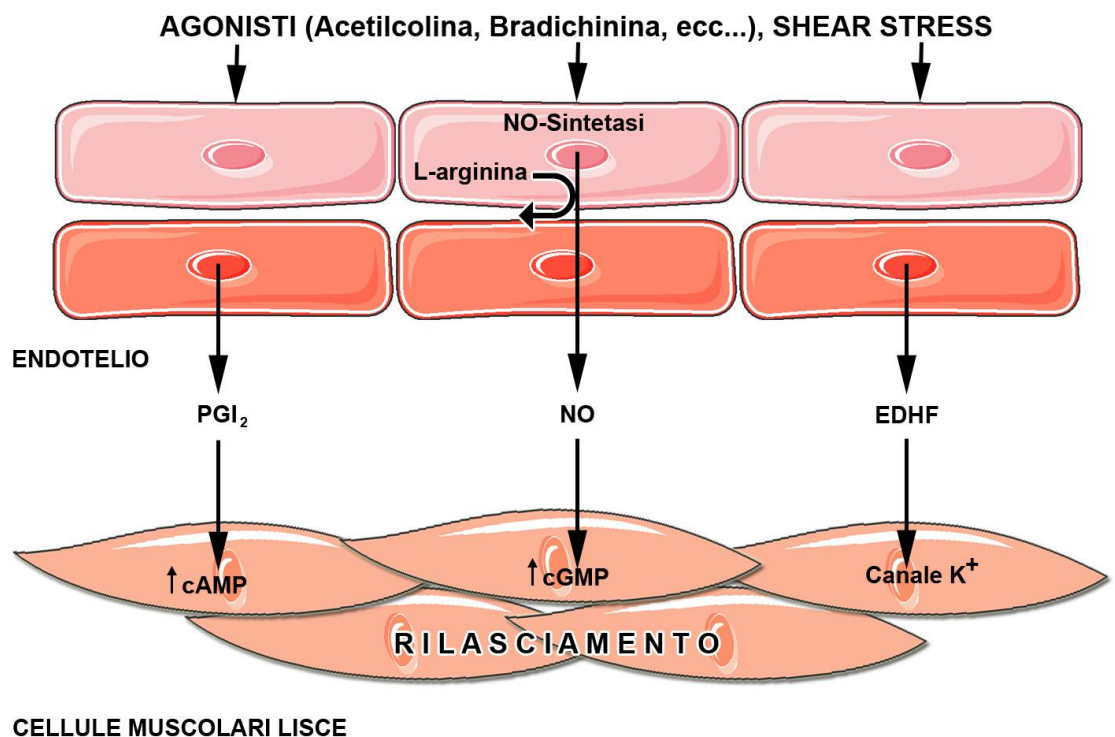
### **2.1 L'endotelio come organo endocrino**

L'endotelio ad oggi può essere considerato a pieno titolo uno dei più estesi organi autocrini-paracrini dell'organismo. La principale sostanza prodotta è rappresentata dal NO, sintetizzata a partire dalla L-Arginina ad opera dell'enzima NO-sintetasi (NOS)<sup>33</sup>, la cui attività viene stimolata da numerose sostanze, quali la bradichinina, l'acetilcolina, la sostanza P e da forze meccaniche, principalmente lo shear stress<sup>34</sup>. Il NO è caratterizzato da un'emivita di pochi secondi; diffondendo verso le sottostanti cellule muscolari lisce ne determina il rilasciamento attraverso l'aumento intracellulare di c-GMP e la conseguente riduzione del calcio intracellulare<sup>34</sup>. Sono state individuate tre diverse isoforme di NOS: eNOS (endoteliale), iNOS (inducibile) e la nNOS (neuronale). eNOS ed nNOS sono espresse costitutivamente nelle cellule e la loro attività è Ca-calmodulina-dipendente. Viceversa l'attività della iNOS è indotta principalmente dall'infiammazione e non necessita del complesso Ca-calmodulina. La sintesi di NO richiede l'attivazione della NOS in presenza di alcuni cofattori tra cui la nicotamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH), la flavina adenina dinucleotide (FAD), la tetraidrobiopterina (BH4) e l'eme. La biodisponibilità di BH4 è essenziale per l'attività catalitica della NOS. Infatti la L-arginina è prima idrossilata come prodotto intermedio che poi va incontro ad ossidazione per essere convertita in NO e L-citrullina; entrambe le fasi richiedono ossigeno, NADPH e BH4. Gli elettroni necessari al processo sintetico derivano dalla NADPH e, attraverso le flavine ridotte vengono veicolati al gruppo eme<sup>35</sup>.

Il NO, oltre a determinare vasodilatazione, è un potente antiaggregante piastrinico, un inibitore della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce,

dell'adesione dei monociti, dell'espressione di molecole di adesione e della sintesi di endotelina; questi meccanismi sono risultati coinvolti nella patogenesi della placca aterosclerotica e nella trombosi <sup>34,36</sup>.

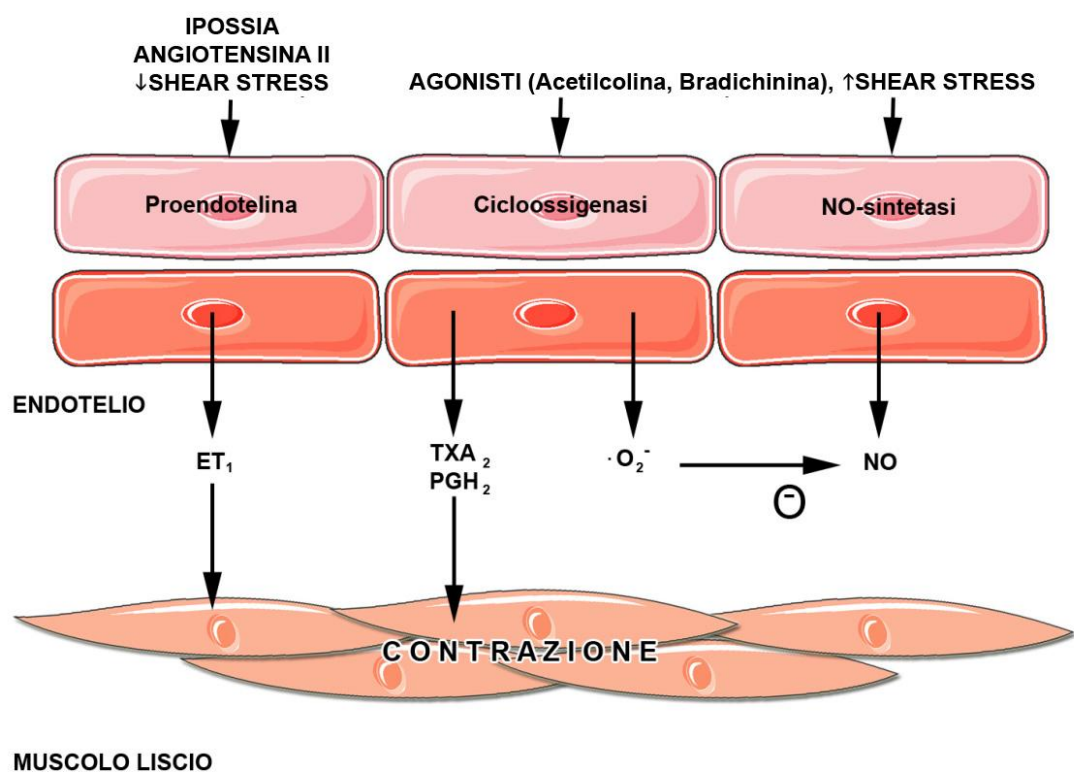
Esistono inoltre altre sostanze vasodilatanti, ma il loro ruolo è marginale o ancora poco definito rispetto a quello del NO. La prostaciclina può essere prodotta anche dalle cellule muscolari lisce del vaso, ma la sua azione sembra essere particolarmente importante per il mantenimento della perfusione renale anche se non si può escludere un effetto benefico in altri distretti <sup>35</sup>.



**Figura 4: Rappresentazione schematica dei meccanismi endotelio-dipendenti responsabili della vasodilatazione. Numerosi agonisti, interagendo con specifici recettori di membrana delle cellule endoteliali, o stimoli meccanici come lo shear-stress sono in grado di indurre vasodilatazione attraverso meccanismi diversi. PGI: prostaglandina I<sub>2</sub> o prostaciclina; cAMP: adenosin monofosfato ciclico; NO: ossido nitrico; cGMP: guanosin monofosfato ciclico; EDHF: endothelium derived hyperpolarizing factor.**

Infine, le cellule endoteliali possono produrre una sostanza non ancora ben caratterizzata, che determina vasodilatazione mediante l'iperpolarizzazione delle cellule muscolari lisce. Tale sostanza è stata denominata EDHF (endothelium derived hyperpolarizing factor) ed è di particolare interesse in quanto sembra possa svolgere un ruolo di compenso a situazioni di ridotta biodisponibilità di NO. Non è noto tuttavia se tale molecola possieda altre proprietà oltre a quelle vasodilatanti <sup>35</sup>.

L'endotelio tuttavia può produrre sostanze che determinano vasocostrizione, definite genericamente con la sigla EDCF (endothelium derived contracting factors) <sup>35</sup>, attivate in condizioni patologiche o parapatologiche (invecchiamento, ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, aterosclerosi) dagli stessi mediatori che determinano la sintesi di NO.



**Figura 5: Rappresentazione schematica dei meccanismi endotelio-dipendenti che inducono vasocostrizione.** Stimoli fisici e numerosi agonisti, attraverso l'attivazione di specifici recettori localizzati sulle cellule endoteliali, sono capaci di indurre la produzione di sostanze che causano direttamente vasocostrizione (ET<sub>1</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>) o di anione superossido ( $\text{O}_2^-$ ) che distrugge l'NO. ET<sub>1</sub>:endotelina-1; TXA<sub>2</sub>:trombossano A<sub>2</sub>; PGH<sub>2</sub>:prostaglandina H<sub>2</sub>; NO: ossido nitrico.

Parallelamente alla produzione di EDCF, si ha anche la produzione di radicali liberi dell'ossigeno e di fattori derivati dall'attivazione della ciclossigenasi endoteliale come il trombossano A-2 e la prostaglandina H-2 <sup>37</sup>.

Menzione a parte merita l'endotelina (ET), polipeptide costituito da 21 aminoacidi che rappresenta uno dei più potenti vasocostrittori biologici (circa 10 volte più dell'angiotensina) <sup>38</sup>. L'ET è rappresentata da tre isoforme, ET1, ET2 ed ET3. La prima viene prodotta dalle cellule endoteliali e dalle cellule muscolari lisce, la seconda a livello renale ed intestinale e la terza a livello del SNC. Gli effetti biologici finora noti sono identificabili con quelli di ET1. Questa viene sintetizzata a partire dalla preproET1, che viene trasformata in proET1, la quale a sua volta, ad opera dell'enzima ECE1 (Endothelin-1 Converting Enzyme) viene convertita in ET1. I recettori di ET sono rappresentati da ETA, presente sulla cellula muscolare liscia e che determina vasocostrizione, e da ETB, presente anche sull'endotelio oltre che a livello della cellula muscolare liscia. I recettori presenti, indipendentemente che siano A o B, sulle cellule muscolari determinano vasocostrizione, mentre quelli endoteliali, rappresentati solo da ETB, stimolano il rilascio di NO <sup>39,40</sup>. Questo spiega perché l'infusione di ET1 esogena può determinare transitoria vasodilatazione seguita da profonda vasocostrizione <sup>37</sup>. L'ET1 possiede anche azione mitogena per le cellule muscolari lisce vascolari, chemiotattica per i macrofagi e stimola la secrezione di vari ormoni, tra i quali aldosterone, vasopressina e catecolamine <sup>34,36</sup>. Vista la potenza e la lunga emivita (45 minuti circa), non è razionale ritenere che l'ET1 abbia un ruolo a breve termine sulla regolazione del tono vascolare, mentre è più probabile che intervenga nei fenomeni trofici vascolari sia direttamente che indirettamente <sup>37</sup>.

## **2.2 La disfunzione endoteliale**

Il termine “disfunzione endoteliale” identifica quella condizione patologica caratterizzata da cellule endoteliali anatomicamente integre, ma la cui attivazione, invece di determinare esclusivamente la produzione di NO, attiva in modo parallelo la produzione di specie reattive dell’ossigeno (radicali) che determinano la distruzione del NO stesso. In definitiva, la disfunzione endoteliale è una condizione patologica caratterizzata dalla ridotta biodisponibilità di NO (che può anche dipendere da una ridotta produzione, come in carenza del substrato L-arginina, o da una minore attività dell’eNOS).

Quale siano i meccanismi che determinano un aumento dello stress ossidativo è solo parzialmente conosciuto. Uno dei sistemi più noti è quello della ciclossigenasi; a seconda del modello sperimentale considerato, è stato messo in evidenza come l’attivazione della ciclossigenasi possa determinare sia la produzione di endoperossidi vasocostrittori quali il trombossano A-2 e la prostaglandina H-2 che di radicali liberi dell’ossigeno. Gli endoperossidi svolgono un ruolo di antagonismo funzionale al NO, infatti vengono prodotti ed agiscono in maniera indipendente da questo; i ROS invece agiscono attraverso la distruzione del NO stesso <sup>37</sup>. Un’ulteriore condizione di ridotta biodisponibilità di NO si ha quando l’attivazione della e-NOS in presenza di bassi livelli di BH4 determina disaccoppiamento tra riduzione dell’ossigeno e ossidazione della L-arginina che determina la produzione di radicali liberi dell’ossigeno <sup>37</sup>.

## **2.3 Lo studio della funzione endoteliale**

La misurazione dei mediatori endoteliali è molto difficile in vivo, in quanto, ad esempio, la brevissima emivita del NO non consente il suo dosaggio nei liquidi

biologici. Sono dosabili invece i suoi cataboliti stabili (nitriti e nitrati plasmatici ed urinari), ma questo dosaggio è sicuramente grossolano; infatti non si può conoscere quale isoenzima ne sia la fonte, risentono fortemente della dieta e, nel caso del dosaggio urinario, i risultati possono essere inficiati a causa di infezioni batteriche. Inoltre non si può sapere se l'aumento dei cataboliti sia legato ad una maggior produzione o ad una aumentata degradazione del NO. Al momento attuale i metodi migliori per valutare la funzione endoteliale sono gli studi di reattività vascolare <sup>41,42</sup>.

La tecnica che al momento viene maggiormente utilizzata, perché non invasiva ed erroneamente ritenuta di facile applicazione, è la cosiddetta “flow-mediated dilatation” (FMD) <sup>42,43</sup>. Si applica agli arti, in genere al braccio a livello dell'omero, e consiste nel misurare con un ecografo vascolare l'aumento del diametro del vaso indotto dall'aumento del flusso arterioso e quindi dallo shear stress dopo ischemia dell'avambraccio. Poiché vengono misurate delle variazioni di decimi di mm, sono necessari, per poter essere precisi ed affidabili, alcuni accorgimenti quali un reggisonda a regolazione micrometrica ed un software che permetta un'analisi continuativa del diametro vascolare. Solo così si ottengono dei risultati riproducibili <sup>44</sup>.

L'entità della vasodilatazione è misura della funzione endoteliale, in quanto tanto maggiore è la risposta allo stimolo, tanto maggiore è la funzionalità endoteliale. Utilizzando tali metodiche è opportuno confrontare l'entità della risposta ad agonisti endotelio-dipendenti (FMD, bradichinina, sostanza P, serotonina etc...) con la risposta a vasodilatatori endotelio indipendenti, al fine di escludere che eventuali differenze siano in realtà causate da un'alterata risposta contrattile delle cellule muscolari lisce. Infine in caso di alterata funzione endoteliale, è possibile



caratterizzare i meccanismi implicati in tale disfunzione valutando sia la via L-arginina-NO mediante la sua inibizione con la L-NMMA<sup>35</sup> e la sua attivazione con L-arginina, mentre la produzione di fattori vasocostrittori ciclossigenasi-dipendenti può essere valutata mediante l'infusione di indometacina, inibitore della ciclossigenasi<sup>45</sup>. Infine, per valutare la presenza di stress ossidativo, si può utilizzare la vitamina C, potente antiossidante<sup>45</sup>.

In conclusione lo studio della reattività vascolare nell'uomo richiede condizioni sperimentali estremamente rigorose; infatti la FMD può essere influenzata da numerosi fattori. Il primo problema è rappresentato dalla selezione dei pazienti, ad esempio l'invecchiamento tende ad accompagnarsi in una certa misura alla disfunzione endoteliale, con possibili bias già in questa fase dello studio<sup>46</sup>. Inoltre la disfunzione endoteliale caratterizza molti dei fattori di rischio cardiovascolari<sup>41</sup>; è molto frequente trovare pazienti con fattori di rischio associati, per cui ad esempio se si vuole studiare il contributo dell'ipertensione all'alterata FMD, si devono escludere pazienti diabetici, fumatori, dislipidemici etc.

#### **2.4 La disfunzione endoteliale nel paziente iperteso**

Nel 1990 Panza et al dimostrarono che la risposta del microcircolo a dosi incrementali di acetilcolina era significativamente ridotta in 18 pazienti ipertesi essenziali che avevano sospeso ogni terapia antiipertensiva da almeno due settimane, rispetto ad un gruppo di soggetti normotesi. Al contrario, la risposta al nitroprussiato di sodio era simile nei due gruppi studiati, dimostrando che la ridotta risposta era specificatamente endoteliale<sup>47</sup>. Un risultato del tutto analogo fu raggiunto in Europa da Linder et al<sup>48</sup>. Studi successivi hanno poi confermato tali risultati<sup>46,49-53</sup>. Un solo studio sembra contrastare con i precedenti<sup>21</sup>, ma in quel

caso sono state usate dosi di acetilcolina infusa inferiore ai precedenti. La ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente è stata dimostrata poi anche con altri agonisti come la metacolina <sup>51</sup>, la sostanza P <sup>54</sup>, la bradichinina <sup>55,56</sup> e nelle forme secondarie di ipertensione <sup>57,58</sup>. Anche a livello del macrocircolo i pazienti con ipertensione arteriosa essenziale presentano una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente a livello delle arterie epicardiche <sup>59,60,61</sup> e dell'arteria omerale <sup>62-64</sup>. Da notare come nei pazienti ipertesi secondari la disfunzione endoteliale può essere secondaria all'aumento dei valori pressori, in quanto regredisce a seguito della normalizzazione indotta dopo rimozione di un adenoma surrenalico <sup>49</sup> o dalla rivascolarizzazione renale <sup>65</sup>. Al contrario, nell'ipertensione arteriosa essenziale la ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente non sembra essere in relazione ai valori pressori. Infatti è stato dimostrato che nel microcircolo dell'avambraccio di soggetti normotesi con familiarità per ipertensione arteriosa si ha una ridotta dilatazione endotelio-dipendente rispetto ai soggetti senza familiarità <sup>66</sup>. Inoltre non è correlata con i valori della PA <sup>46</sup> e non è normalizzata dalla semplice riduzione della PA <sup>37</sup>. L'insieme di questi dati consente quindi di affermare che la riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente si associa all'ipertensione arteriosa essenziale senza una relazione causa-effetto diretta <sup>37</sup>. Nei pazienti con ipertensione è stato dimostrato che la ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente è mediata da una ridotta biodisponibilità di NO <sup>67</sup>, determinata dallo stress ossidativo <sup>68</sup>. Vari studi condotti sia sull'animale <sup>68,70</sup>, che nell'uomo <sup>49,71</sup> hanno dimostrato come la ciclossigenasi possa svolgere nel paziente iperteso, attraverso la produzione di ROS, un ruolo decisivo. Nei pazienti ipertesi essenziali l'attivazione delle cellule endoteliali determina la produzione di fattori ciclo ossigenasi dipendenti che determinano la degradazione del NO; quando l'attività della ciclossigenasi viene bloccata, si ripristina immediatamente la biodisponibilità di NO. Questa ipotesi è

poi supportata da altri studi che hanno valutato altre possibili fonti enzimatiche di stress ossidativo, quale la xantina-ossidasi, che hanno dato risultati negativi <sup>72</sup>.

## **2.5 Il significato clinico della disfunzione endoteliale**

Oltre che nell'ipertensione, la disfunzione endoteliale, come già accennato in precedenza, caratterizza la gran parte dei fattori di rischio cardiovascolari noti. L'invecchiamento è inequivocabilmente legato alla disfunzione endoteliale sia al livello del microcircolo, che nelle arterie epicardiche <sup>73,74</sup>. Al livello del macrocircolo periferico è stato osservato che in una popolazione di soggetti sani la FMD si riduce progressivamente con l'età sia nei soggetti di sesso maschile che in quelli di sesso femminile <sup>75</sup>, anche in pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale <sup>76</sup>. Il motivo di questo progressivo declino sembra essere legato alla riduzione della biodisponibilità del NO, che dopo i 60 anni risulta compromessa; lo stesso meccanismo si evidenzia negli ipertesi essenziali, ma con età di inizio intorno ai 35 anni <sup>76</sup>. Nelle donne il rapido declino della funzione endoteliale, cui si assiste superati i 50 anni (al contrario del maschio nel quale inizia superati i 40 anni, ma è costante) sembra suggerire che, oltre all'invecchiamento, agisca sulla riduzione dell'FMD anche la menopausa <sup>75</sup>.

Nell'ipercolesterolemia la riduzione della funzione endoteliale sembra legata ad una riduzione dei livelli di NO <sup>77,78</sup>. Tale alterazione non è causata verosimilmente da un singolo difetto, ma da vari meccanismi tra cui l'aumento dello stress ossidativo sembra essere il più importante. Nei soggetti dislipidemicici infatti l'infusione di vitamina C <sup>79</sup> ed il trattamento protratto con vitamina E <sup>80</sup> hanno dimostrato migliorare la FMD a livello dell'arteria radiale. Molte evidenze suggeriscono inoltre che anche il diabete di tipo I e di tipo II si associno a disfunzione endoteliale sia a livello epicardico <sup>81</sup> che nel tessuto vascolare

dell'avambraccio<sup>82-84</sup> e nei vasi di conduttanza<sup>85-89</sup>, legata ad una riduzione di NO a seguito dello stress ossidativo. Infine esistono dati convincenti che il fumo di sigaretta sia attivo che passivo determina una riduzione del FMD significativa rispetto ai controlli<sup>90</sup>, probabilmente a causa di un aumento dello stress ossidativo.

Da quanto detto finora risulta chiaro che quando si manifestano quelle condizioni cliniche caratterizzate da disfunzione endoteliale, si ha la prevalenza di sostanze quali gli endoperossidi, l'endotelina, l'angiotensina II che, oltre ad essere dei potenti vasocostrittori, favoriscono anche l'aggregazione piastrinica, la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce e l'adesione e la migrazione dei monociti. Pertanto un endotelio disfunzionale non perde solo la capacità di proteggere il vaso, ma diventa esso stesso induttore di quei processi che sono coinvolti nell'aterosclerosi e nella trombosi. Inoltre, l'alterazione della vasomotilità endotelio-dipendente può contribuire alla genesi degli eventi cardiovascolari riducendo la stabilità di placca, la riserva coronarica e favorendo il vasospasmo. È da notare infatti come, in studi longitudinali, la disfunzione endoteliale è stata associata con l'incidenza di eventi cardiovascolari.

### **Capitolo 3: Obiettivo dello studio**

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'effetto di un controllo efficace della PA (valori pressori < 140/90) sui parametri di alterazione funzionale e strutturale vascolare in una popolazione di ipertesi essenziali dopo terapia antiipertensiva a lungo termine. A tal fine in 98 pazienti ipertesi essenziali sono stati valutati la funzione endoteliale e la rigidità arteriosa in condizioni basali, in assenza di terapia farmacologica e dopo trattamento antiipertensivo per un periodo medio di follow-up di circa tre anni.

#### **3.1 Materiali e metodi**

##### **3.1.1 Selezione dei pazienti**

Sono stati reclutati 98 pazienti (69 maschi), con ipertensione essenziale lieve-moderata (PAS 140-179 mmHg, PAD 90-109 mmHg) di età media 49 anni (range 30-69 anni), afferenti all'ambulatorio del Centro Ipertensione.

I pazienti presentavano recente riscontro di ipertensione arteriosa e non erano mai stati trattati farmacologicamente o avevano una storia di trattamento discontinuo sospeso da almeno 1 mese.

I criteri di inclusione sono stati rappresentati da: età compresa tra 30 e 70 anni, PA misurata in ambito medico, in posizione seduta dopo 10 minuti di riposo, compresa tra 140-90 e 179-109 mmHg, valutata in due occasioni diverse a distanza di un mese l'una dall'altra, in accordo con le linee guida delle Società Europee di Ipertensione Arteriosa e di Cardiologia<sup>5</sup>.

I criteri di esclusione sono stati i seguenti: presenza di danno d'organo, patologia cardiovascolare pregressa o in atto, diabete mellito, dislipidemia, BMI maggiore di 30 Kg/m<sup>2</sup>, consumo di alcool maggiore di 50 g/die, fumo di sigaretta, uso abituale

di integratori minerali o vitaminici, farmaci antiipertensivi, statine e attività fisica di tipo agonistico.

### **3.2 Disegno dello studio**

Studio prospettico con durata media del periodo di osservazione di 3 anni sull'efficacia del controllo di valori di PA sui parametri di rigidità arteriosa e di funzione endoteliale.

### **3.3 Studio della rigidità arteriosa**

#### **3.3.1 Pulse Wave Velocity (PWV).**

L'aorta è il vaso di maggior interesse nel determinare la rigidità arteriosa, infatti l'aorta toracica ed addominale danno il maggior contributo alla funzione elastica dell'albero arterioso<sup>9,17</sup> e la PWV aortica è un predittore indipendente di outcome in una varietà di popolazioni<sup>22</sup>. La misurazione di quest'ultima viene considerata come la più semplice e riproducibile tecnica per la valutazione della rigidità arteriosa. La PWV carotido-femorale (CFPWV) è una misura diretta che viene eseguita lungo l'asse aortico ed aorto-iliaco ed è la più rilevante da un punto di vista clinico, dal momento che l'aorta ed i suoi rami più prossimali sono coinvolti nella maggior parte dei meccanismi fisiopatologici determinati sul ventricolo sinistro dall'aumento della rigidità arteriosa e della pressione centrale. CFPWV è stata usata per studi epidemiologici, dimostrando un valore predittivo per eventi cardiovascolari<sup>22</sup>. Le onde di pressione sono di solito ottenute a livello della carotide comune e della femorale omolaterale attraverso un tonometro transcutaneo; il tempo di transito o "delay time" viene invece misurato come ritardo che intercorre fra il piede della due onde. La PWV viene quindi misurata come rapporto fra la distanza D e il tempo di transito Dt ( $PWV = D/Dt$ ) ed espressa in metri al secondo. Il metodo più comunemente usato per stimare il Dt è, come già

accennato, il metodo foot-to-foot. Il piede dell'onda coincide con l'inizio della sistole. Esistono diverse tecniche per procedere nella misurazione; nello studio in questione le onde di pressione vengono registrate in sequenza da diversi siti (nel nostro caso carotide comune e femorale) ed il tempo di transito è calcolato registrando simultaneamente l'ECG. Lo SphygmoCor System (AtCor, Sydney, Australia) prevede che un solo tonometro ad alta fedeltà (Millar) ottenga le due registrazioni in sequenza ed un software calcoli la PWV ricavando il Dt dal diverso ritardo rispetto all'onda R dell'ECG <sup>91</sup>: il tempo che separa il piede dell'onda più distale dall'onda R viene sottratto dal tempo che separa il piede dell'onda più prossimale dall'onda R ottenendo così il tempo di transito dell'onda che può essere visto anche come ritardo, rispetto all'onda R, fra le due onde (delay time).

### **3.3.2 Pulse Wave Analysis (PWA).**

Come già precedentemente descritto, l'onda di pressione è composta dall'onda anterograda determinata dalla contrazione del ventricolo sinistro e dall'onda retrograda riflessa. Quando i vasi sono elastici, dal momento che la PWV è bassa, l'onda riflessa ritorna alla radice aortica nella fase avanzata della sistole o addirittura in diastole; nel caso di arterie più rigide invece la PWV aumenta, determinando un ritorno precoce al livello delle arterie centrali e una sovrapposizione con l'onda anterograda. Questo fenomeno viene quantificato attraverso l'Augumentation Index (AIx), determinato dal rapporto fra la differenza fra il secondo ed il primo picco sistolico (P2-P1 o Augumentation Pressure, di fatto la pressione che nell'onda si situa al di sopra della prima inflessione) e la PP, espresso come percentuale di questa <sup>92</sup>. Come già affermato in precedenza oltre ad un aumento del PWV, anche la variabilità dei siti di riflessione influenza l'AIx. La PWA dovrebbe essere eseguita a livello centrale ed in modo particolare al livello

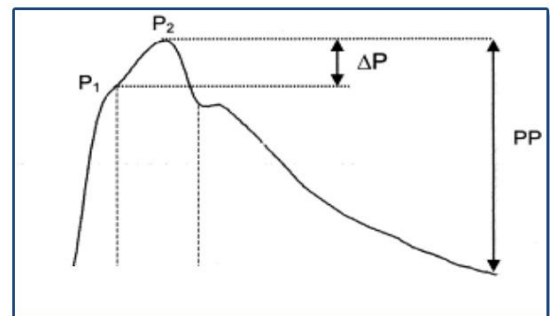
dell'aorta ascendente, dal momento che questa rappresenta il reale carico a cui viene sottoposto il ventricolo sinistro e le pareti delle arterie centrali di grosso calibro. L'onda di pressione aortica viene derivata solitamente da quella radiale o da quella della carotide comune. La tecnica usata in maniera più diffusa prevede di registrare l'onda pressoria a livello radiale con un tonometro; da questa poi viene derivata, attraverso una funzione matematica di trasferimento, la forma dell'onda pressoria aortica <sup>19,91,92</sup>.

### PWA: pulse wave analysis radiale

Onda di polso periferica  
 Calibrazione con PA omerale  
 Funzione di trasformazione validata  
 ↓  
 Onda di pressione centrale aortica

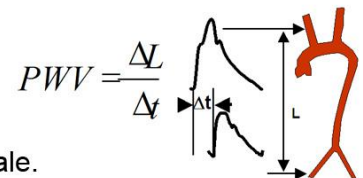
$$AI\%: \Delta P/PP$$

$$PP= PAS-PAD$$



### PWV: pulse wave velocity omerale ed aortica

Onda di polso periferica registrata in due sedi (radiale-carotidea, femorale-carotidea) in modo sequenziale.  
 Misura della distanza delle due sedi; ECG simultaneo  
 Tempo di transito: ritardo medio tra l'inizio delle due onde di polso  
 Velocità: distanza / tempo di transito (m/s)



**Figura 6: Metodi per la misurazione della rigidità arteriosa nell'uomo. PAS: PA sistolica; PAD: PA diastolica; PP: pressione di pulsazione; AIx: augmentation index; PWV: velocità dell'onda sfingica; ΔL: distanza percorsa dall'onda sfingica tra i due siti di registrazione; Δt: tempo di propagazione determinato dal ritardo tra l'inizio delle due onde sfingiche.**



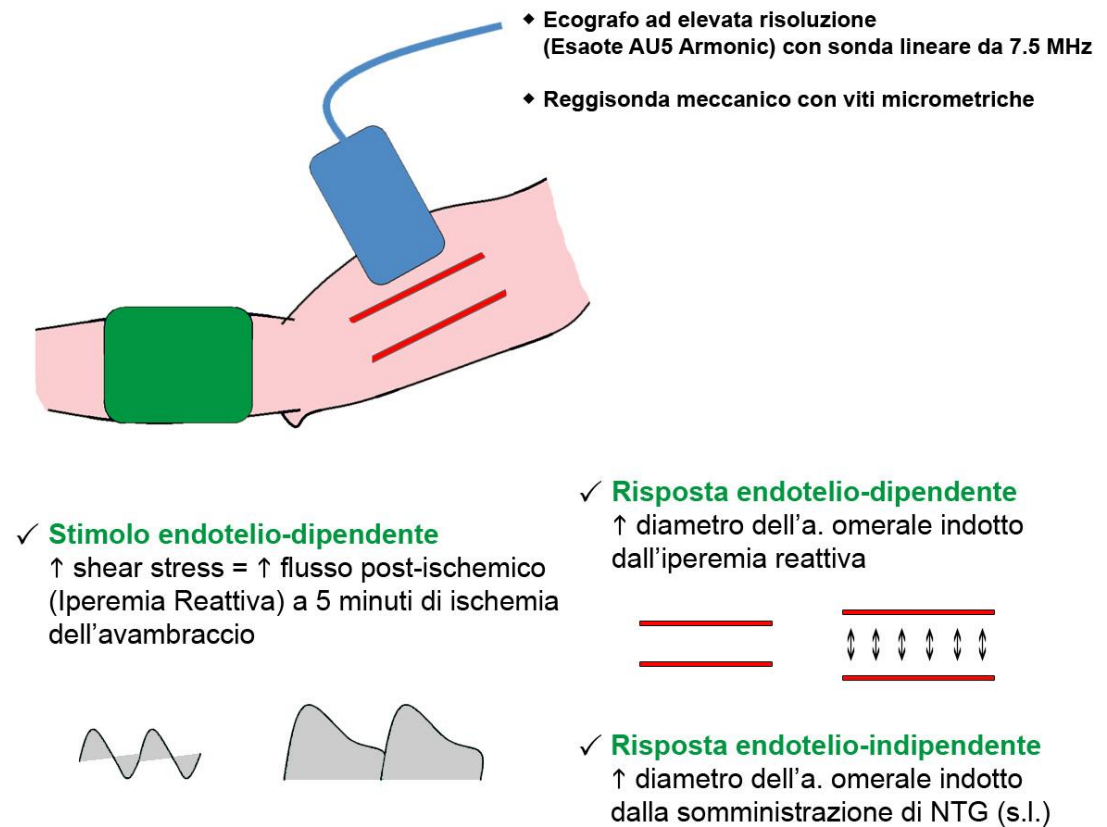
### **3.4 Studio della vasodilatazione endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente**

La flow-mediated dilatation (FMD) rappresenta il miglior metodo non invasivo per misurare la vasodilatazione endotelio-dipendente nell'uomo, dal momento che, come è stato dimostrato, viene mediata dalla produzione di NO. La procedura prevede di ottenere una scansione longitudinale (B-mode) della arteria omerale da 5 a 10 cm sopra la piega del gomito, utilizzando un ecografo ad alta risoluzione con sonda lineare da 7,5 MHz; questa viene mantenuta in posizione durante la scansione da un supporto dotato di una vite micrometrica che permette l'aggiustamento in continuo dell'immagine. Le immagini sono acquisite su personal computer attraverso una specifica scheda di acquisizione. La FMD è rappresentata dalla dilatazione dell'arteria omerale causata dall'aumento di flusso dovuto all'iperemia reattiva al termine di un periodo di 5 minuti di ischemia dell'avambraccio ottenuta gonfiando a 200 mmHg un bracciale da sfigmomanometro.

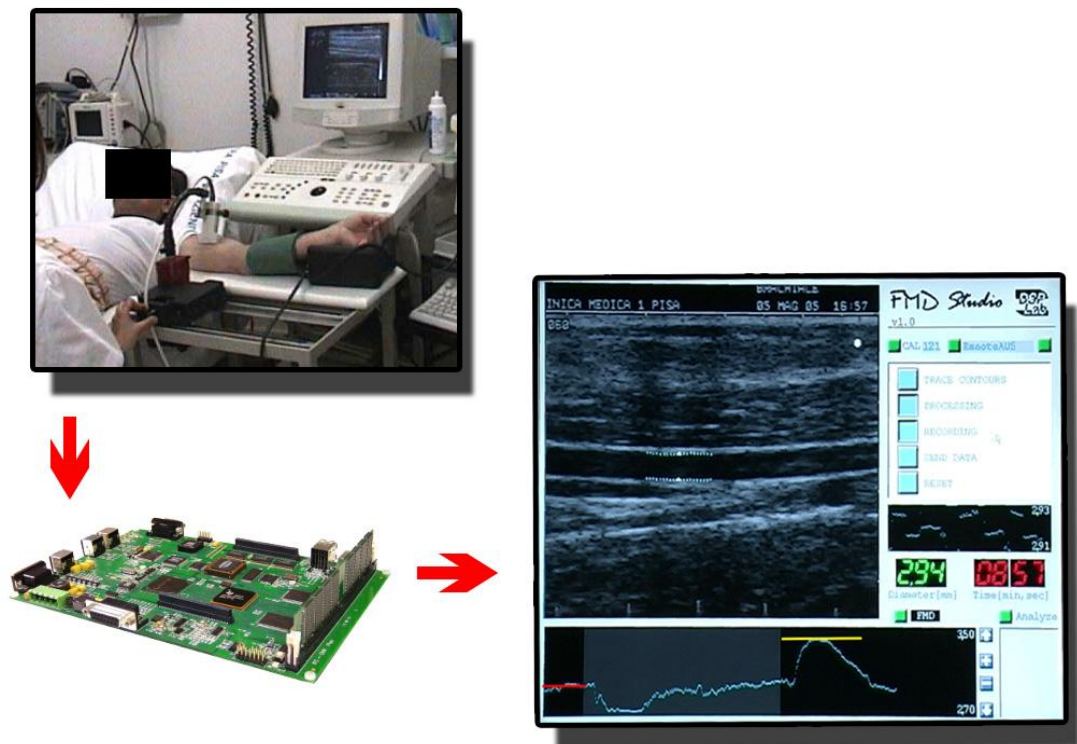
La risposta endotelio-indipendente è ottenuta somministrando per via sublinguale una dose bassa (25 microgrammi) di nitroglicerina (NTG). In questo caso le immagini vengono acquisite prima in condizioni basali per un minuto e nei cinque minuti successivi alla somministrazione della NTG, considerando la dilatazione massima ottenuta in questo periodo. La risposta alla NTG e la FMD sono calcolate come massimo incremento percentuale del diametro dell'arteria omerale dalle immagini acquisite con un sistema automatico di riconoscimento e di analisi dei bordi<sup>93</sup>.

Il flusso sanguigno viene calcolato moltiplicando la velocità di flusso Doppler (corretta per l'angolo) per la frequenza cardiaca e per l'area di sezione del vaso

( $\pi r^2$ ). L'iperemia reattiva viene calcolata come massimo incremento percentuale del flusso rispetto al basale. La cascata di segnale responsabile della conversione dello stimolo meccanico nel rilascio di molecole vasoattive non è stato ancora del tutto chiarificata. Attualmente diversi meccanismi sono stati suggeriti: un canale del potassio endoteliale accoppiato con una proteina G sensibile alla tossina pertussica, variazioni conformazionali sodio-dipendenti da parte dei glicosaminoglicani di membrana, un'iniziale attivazione della fosfolipasi C calcio-dipendente associata ad una attivazione di lunga durata della kinasi C e della Tyrosin Kinasi calcio indipendente.<sup>94,95</sup>



**Figura 7: Vasodilatazione endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente.**



**Figura 8: FMD (Flow-mediated dilation) dell'arteria omerale. Metodo non invasivo per misurare la vasodilatazione endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente nell'uomo.**

Più recentemente è stato dimostrato che lo shear stress induce la fosforilazione di residui serinici alterando la sensibilità della eNOS alla concentrazione di Ca intracellulare, determinando così l'aumento della sintesi di NO<sup>96</sup>. La FMD dipende in maniera critica dall'attività di eNOS a livello delle arterie di conduttanza<sup>97-104</sup>. Molti stimoli possono influenzare acutamente l'FMD: un solo pasto ad elevato contenuto lipidico<sup>105</sup>, lo stress psicologico in relazione probabilmente ai livelli di catecolamine<sup>89</sup>, i livelli di estrogeni e progesterone circolanti<sup>97</sup>, fumo, rapide variazioni della glicemia<sup>106</sup>, la sodiemia e la calcemia<sup>89</sup>. L'aumento acuto dello stress ossidativo che si verifica durante l'emodialisi è stato messo in relazione con un peggioramento dell'FMD che al contrario non sembra essere influenzata dalla viscosità ematica totale.

### **3.5 Misurazione della pressione arteriosa**

La PA clinica è stata misurata con un apparecchio automatico (OMRON-950 CP) e calcolata come media dei valori ottenuti da tre misurazioni eseguite ad intervalli di 3 minuti l'una dall'altra.

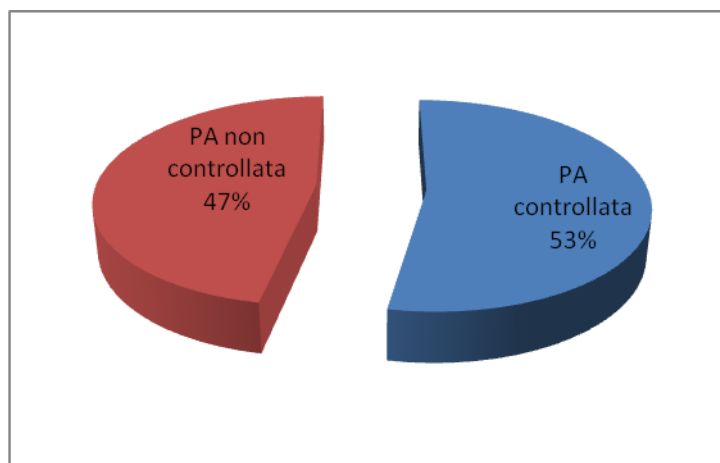
#### Capitolo 4: Risultati

Le caratteristiche cliniche dei pazienti all'arruolamento (Basale) e al termine del periodo di osservazione sono riportate in tabella 1.

*Tabella 1. Parametri clinici della popolazione dello studio all'arruolamento (Basale) e al termine del periodo di osservazione (follow-up). \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.0001$*

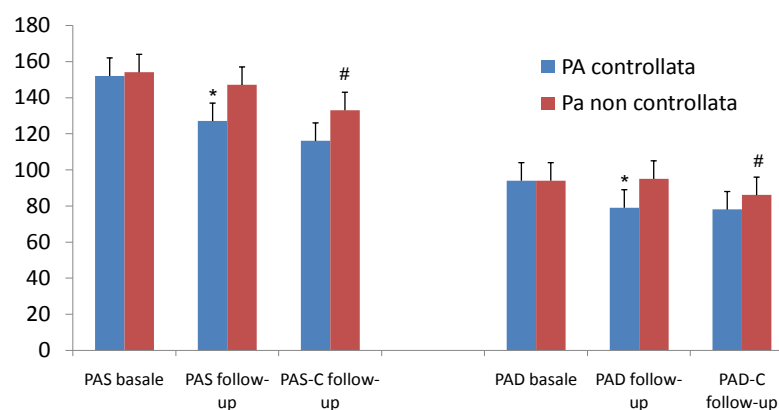
Parametro	Basale	Follow-up
Creatinina (mg/dl)	0,96 ±0,67	0,95±0,71
Colesterolemia totale (mg/dl)	203 ± 41	207±33
Colesterolemia HDL (mg/dl)	53±20	60±16*
Trigliceridemia (mg/dl)	133±97	117±66
Glicemia a digiuno (mg/dl)	96±13	95±12
PA sistolica (mmHg)	152±13	137±14**
PA diastolica (mmHg)	94±9	81±9**
Frequenza cardiaca (bpm)	68±13	67±10

Nella popolazione dello studio i valori pressori erano significativamente ridotti dal trattamento antipertensivo (tabella 1). In parallelo si osservava un aumento significativo del Colesterolo HDL, mentre la riduzione dei trigliceridi e della frequenza cardiaca non risultavano statisticamente significativi. Alla fine del periodo di osservazione il 53% dei pazienti presentava un efficace controllo della PA, assumendo come tale un valore di PA misurata al livello dell'arteria omerale minore di 140/90 mmHg (figura 9).



**Figura 9: Distribuzione della popolazione al termine del follow-up in base al controllo della PA arteriosa; in blu sono indicati i pazienti con PA controllata in rosso sono indicati quelli con PA non controllata.**

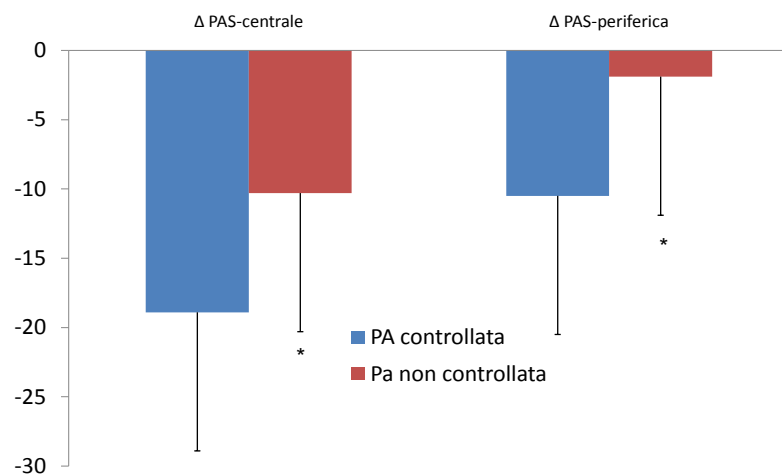
Nei pazienti controllati i valori pressori medi scendevano da  $152 \pm 23 / 94 \pm 13$  mmHg a  $127 \pm 13 / 79 \pm 10$  ( $p < 0.0001$ ), mentre in quelli non controllati i valori pressori medi andavano da  $154 \pm 25 / 94 \pm 12$  a  $147 \pm 17 / 95 \pm 14$  mmHg ( $p < 0.01$ ; figura 10).



**Figura 10: Valori pressori periferici basali, dopo follow-up e valori di PA centrale dopo follow-up nel gruppo dei pazienti con PA controllata in quello di pazienti con PA non controllata. \*,  $p < 0.05$  vs. basale; #,  $p < 0.05$  vs pazienti con PA controllata.**

Nell'ambito dei pazienti controllati, la PA aortica risultava essere significativamente inferiore ( $116,13 \pm 8,6 / 78,1 \pm 7,1$  mmHg) rispetto a quella dei pazienti con PA non controllata ( $133,9 \pm 12,5 / 86,2 \pm 9,1$  mmHg;  $p < 0,01$ ; Figura 10).

Quindi i pazienti con PA controllata hanno ottenuto in media una riduzione dei valori di PA centrale significativamente superiore a quella dei pazienti con PA non controllata. Infatti, nei pazienti con PA controllata l'entità della riduzione in termini assoluti della PAS aortica rispetto al basale ( $-18.9 \pm 9.9$  mmHg) era significativamente ( $p < 0.05$ ) superiore a quella dei pazienti con PA non controllata ( $-10.3 \pm 11.0$  mmHg) (Figura 11).



**Figura 11: Entità delle variazioni assolute dei valori pressori centrali e periferici nel gruppo di pazienti con PA controllata (sinistra) e non controllata (destra). \*,  $p < 0.05$  vs pazienti con PA controllata.**

I pazienti con valori di PA non controllata sono risultati essere più anziani (52 vs 50 anni) e più frequentemente maschi; pertanto le analisi sono state corrette per età, sesso e PA media.

La funzione endoteliale, valutata come vasodilatazione endotelio-dipendente (FMD) anche corretta per la risposta endotelio-indipendente alla NTG, era significativamente migliorata nei pazienti con PA controllata ma non in quelli non controllati (tabella 2 e figura 12).

Tabella 2: andamento dei valori dell’FMD dopo follow-up di tre anni nei due gruppi di pazienti. I dati sono presentati come media  $\pm$ SEM (\* $p < 0,01$  follow-up vs basale)

	BASALE	FOLLOW-UP
FMD (%) in PA controllata	5,3 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 0,5*
FMD (%) in PA non controllata	5,7 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 0,6

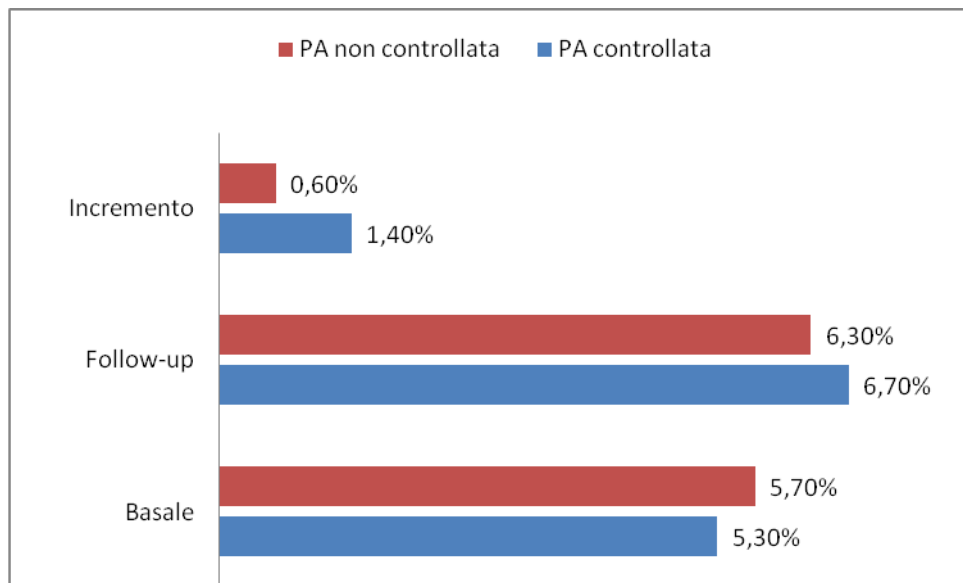


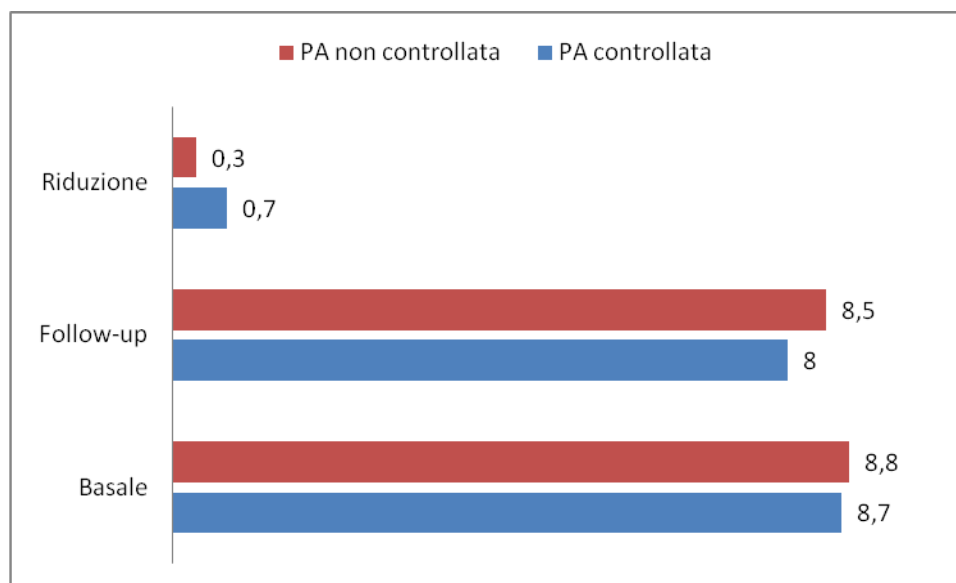
Figura 12: Confronto fra il basale ed il follow-up in termini di incremento percentuale dell’FMD. Come si può notare tale incremento nei pazienti con PA controllata è più del doppio rispetto a quelli con PA non controllata.

La PWV aortica risultava significativamente ridotta nei pazienti con PA controllata ma non in quelli con PA non controllata (Tabella 3, Figura 13).

Tabella 3: andamento dei valori della PWV dopo follow-up di tre anni nei due gruppi di pazienti. I dati sono presentati come media  $\pm$ SEM \*( $p < 0,01$  follow-up vs basale)

	BASALE	FOLLOW-UP
PWV aortica m/s in PA controllata	8,7 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,2*
PWV aortica m/s in PA non controllata	8,8 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,2
PWV periferica m/s in PA controllata	9,3 $\pm$ 0,2	9,3 $\pm$ 0,2
PWV periferica m/s in PA non controllata	9,6 $\pm$ 0,2	9,4 $\pm$ 0,2





**Figura 13: Confronto fra il basale ed il follow-up in termini di riduzione della PWV espressa in m/s. Da notare che la riduzione della PWV nei pazienti con PA controllata è più del doppio rispetto a quelli con PA non controllata.**

I valori della PWV periferica invece non erano variati significativamente (Tabella 3) così come i valori dell'Aix (dati non mostrati).

Per quanto riguarda la distribuzione di alcuni fra i fattori di rischio cardiovascolare maggiore non esistono differenze sostanziali in termini di stratificazione del rischio fra le rilevazioni svolte in occasione del primo incontro e quelle del follow-up (Tabella 4).

*Tabella 4: Valore medio di creatinina, lipidi plasmatici, glicemia a digiuno nel follow up, nei pazienti con PA controllata e non (\*p<0,05)*

Valori medi	PA controllata	PA non controllata
Creatinina (mg/dl)	0,9±0,68	0,9±0,76
Colesterolemia totale (mg/dl)	202±43	204±38
Colesterolemia HDL (mg/dl)	65±19	56±10*
Trigliceridemia (mg/dl)	108±71	126±61
Glicemia a digiuno (mg/dl)	95±12	95±11

Si può tuttavia affermare che nell'ambito del follow-up i pazienti con PA controllata presentano un aumento statisticamente significativo dei valori del colesterolo HDL.

## Capitolo 5: Discussione

Il raggiungimento di un efficace controllo della PA misurata con metodica tradizionale a livello dell'arteria omerale, ottenuto sia con terapia farmacologica che non-farmacologica, si è dimostrata efficace nel ridurre significativamente la PWV aortica e nel migliorare significativamente la FMD. Questa evidenza è rafforzata dal fatto che nei pazienti con PA non controllata questi due indici non variavano in modo significativo, suggerendo che il raggiungimento dell'obiettivo pressorio di 140/90 mmHg sia necessario per ottenere un miglioramento della funzione endoteliale ed una riduzione della rigidità arteriosa.

L'Aix così come la PWV periferica, non hanno subito variazioni significative. Tuttavia, come già discusso in precedenza, l'Aix non dipende solo dalla rigidità arteriosa ma anche dai siti di riflessione e dalle condizioni del microcircolo. Ciò implica che la terapia volta al controllo della PA possa esercitare un effetto più marcato sulla rigidità delle grosse arterie mentre non sembrerebbe determinare alcun significativo miglioramento al livello del microcircolo. A questo livello potrebbero avere maggiore importanza il tipo di farmaci antiipertensivi utilizzati, come discusso in seguito. Le considerazioni che ne derivano vertono sostanzialmente su quale sia il valore prognostico che va attribuito a questi risultati, se esista o meno una correlazione fra riduzione dei valori di rigidità arteriosa e miglioramento della prognosi e se esistano terapie che agiscono più di altre sulla rigidità arteriosa e sulla disfunzione endoteliale. Come già trattato nell'introduzione, la maggior parte degli studi effettuati in questo senso ha evidenziato che la rigidità arteriosa misurata come PWV carotidea-femorale ha un valore predittivo indipendente di mortalità e morbilità cardiovascolare in pazienti con Ipertensione Essenziale non complicata, diabete mellito di tipo 2, insufficienza renale terminale e nella popolazione generale<sup>26</sup>. Non solo, ma è stato messo in

evidenza che questa in realtà ha un valore predittivo maggiore di ogni singolo classico fattore di rischio <sup>26</sup>, suggerendo che la PWV è misura di un danno arterioso che si è sviluppato in un lungo periodo di tempo. Per quanto riguarda invece il ruolo dell'Aix sulla mortalità e morbilità cardiovascolare, non esistono studi che ne hanno precisato il suo significato nella popolazione globale; infatti, fino a questo momento, è stato definito come fattore di rischio indipendente solo in pazienti con insufficienza renale terminale<sup>27,28</sup>, in pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica percutanea <sup>29</sup> e negli ipertesi dello studio CAFE' <sup>30</sup>.

Se da un lato il valore prognostico dell'aumento della rigidità arteriosa è oramai noto, ciò che deve essere ancora chiarito è il ruolo che una sua riduzione, associata quindi ad una riduzione della PA centrale, della PWV e dell'Aix, ha nel ridurre il rischio cardiovascolare, indipendentemente dalla normalizzazione dei fattori di rischio tradizionali. Gli unici dati a disposizione indicano che la mancata riduzione della PWV, associata ad una riduzione dei valori pressori in pazienti in insufficienza renale terminale, è un predittore indipendente di mortalità <sup>30</sup>.

Non è comunque illogico affermare, pur non conoscendo il reale valore prognostico di una riduzione della rigidità arteriosa, che un controllo della PA arteriosa, associandosi ad una riduzione della PWV ed a un miglioramento della FMD determini un effetto benefico sotto molti punti di vista. E' stato evidenziato nei pazienti con efficace controllo della PA periferica si assisteva ad una maggiore riduzione della PAS centrale. Ciò implica che, in corso di terapia antiipertensiva riducendo la rigidità strutturale aortica e di conseguenza aumentando la compliance dei grossi vasi e riducendo i valori di PA centrale, si riduce il post-carico "reale" ovvero l'effettivo gradiente pressorio contro il quale il ventricolo sinistro è costretto a compiere un lavoro e di conseguenza il principale stimolo allo sviluppo dell'IVS.

In secondo luogo il controllo della PA ha determinato un miglioramento dell'FMD, contrastando quindi la disfunzione endoteliale, condizione che si associa, pur senza una chiara relazione causa-effetto diretta, all'ipertensione<sup>37</sup> ed alla gran parte dei fattori di rischio cardiovascolare (invecchiamento, menopausa, ipercolesterolemia, diabete mellito, fumo di sigaretta). L'endotelio disfunzionante non perde solo la capacità di proteggere il vaso, ma diventa esso stesso promotore di quei processi che sono coinvolti nell'aterosclerosi e nella trombosi. Inoltre, l'alterazione della vasomotilità endotelio-dipendente può contribuire alla genesi degli eventi cardiovascolari riducendo la stabilità di placca, la riserva coronarica e favorendo il vasospasmo. Ciò suggerisce che un miglioramento della funzione endoteliale riduca la possibilità di eventi cardiovascolari su base aterosclerotica e trombotica.

I risultati di questo studio sottolineano ancora una volta che il beneficio sulle alterazioni funzionali e strutturali vascolari che fanno parte del danno d'organo associato all'ipertensione arteriosa, sia in gran parte dipendente dalla riduzione della PA. Tuttavia non si può escludere che la regressione di tali alterazioni possa anche contribuire a mantenere un controllo efficace dei valori pressori. Infatti, ciò che ancora non è stato ben chiarito dagli studi eseguiti fin ora è il diverso contributo, in termini quantitativi, che determinate classi di farmaci forniscono nel miglioramento dell'FMD, nella riduzione della PWV e dell'Aix. Lo studio REASON ha messo in evidenza come solo l'associazione perindopril/indapamide riduceva significativamente la riflessione a livello carotideo<sup>31,32</sup>, determinando una riduzione selettiva dei valori di PAS e PP centrale, che ha portato ad una regressione dell'IVS<sup>32</sup>; al contrario, la monoterapia con atenololo non ha determinato la riduzione di PP carotidea e la regressione dell'IVS. Lo studio CAFE<sup>30</sup>, un sotto-studio del trial ASCOT, ha confrontato gli effetti di due diverse terapie antiipertensive (atenololo +/- tiazidico di base vs amlodipina +/- perindopril di

base) sulla PA centrale in più di 2199 pazienti in un periodo di più di 4 anni. Nonostante una riduzione simile della pressione brachiale, lo schema con amlodipina ha portato ad una riduzione maggiore della PA centrale rispetto allo schema contenente atenololo ( $\Delta$ PAS aortica centrale 4,3 mm Hg;  $\Delta$ PP aortica centrale 3 mm Hg;  $\Delta$ AIx 6,5%). Lo studio ha quindi dimostrato che la riduzione della pressione misurata al livello brachiale non riflette necessariamente allo stesso modo la PA centrale; pur non potendo fare affermazioni definitive a proposito della terapia, è comunque da evidenziare come a valori di PA periferica uguali, possono corrispondere valori di pressione centrale, di PWV e di AIx diversi, suggerendo che questo possa essere uno dei meccanismi alla base del diverso impatto delle classi farmacologiche sul ridurre l'incidenza di danno d'organo o di quadri clinici.

Da notare infine come i valori dei colesterolo HDL siano significativamente più elevati nei pazienti con PA controllata, risultato che potrebbe essere influenzato dalla migliore aderenza alla terapia e non dalla sola riduzione dei valori pressori. Tuttavia, limitandoci alla semplice analisi descrittiva è interessante notare come esista una tendenza nei pazienti con PA controllata al miglioramento del profilo metabolico, che non si riscontra nel gruppo di pazienti con PA non controllata.

## **Capitolo 6: Conclusioni**

Come più volte ricordato l'ipertensione arteriosa è associata ad un aumento della rigidità arteriosa ed alla disfunzione endoteliale.

I risultati di questa tesi indicano che nei pazienti con valori pressori minori di 140/90 esiste una significativa riduzione della PWV aortica ed un significativo aumento della FMD. Questi dati analizzati alla luce delle premesse formulate ci permettono di affermare che un controllo efficace della PA si associa ad una riduzione della rigidità arteriosa ed a un miglioramento della funzione endoteliale.

Ciò suggerisce inoltre come l'effetto benefico a lungo termine della terapia possa esplicarsi anche attraverso il miglioramento degli indici strutturali vascolari e della funzione endoteliale, anche se non si può escludere l'effetto del miglior controllo metabolico osservato nei pazienti controllati.

Rimane da definire il ruolo che le diverse classi di farmaci giocano nella riduzione della rigidità arteriosa e nel miglioramento della FMD. Infatti in una popolazione di circa 100 individui non è stato possibile giungere ad una conclusione significativa. Il prossimo passo, tuttavia, sarà quello di allargare lo studio a più individui in modo tale da riuscire a trarre delle conclusioni in questo senso.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Professor Stefano Taddei per avermi offerto l'opportunità di frequentare gli ambulatori del Centro dell'Ipertensione ed il reparto di Medicina Generale e per gli insegnamenti ricevuti durante il corso di laurea.

Ringrazio i medici del Centro dell'Ipertensione, la Dottoressa Elena Daghini, il Dottor Daniele Versari, il Dottor Francesco Stea, la Dottoressa Rosa Maria Bruno ed il Dottor Agostino Viridis per il supporto materiale e morale, per la loro cortesia e simpatia.

Ringrazio in modo particolare il Dottor Ghiadoni per avermi aiutato, supportato, consigliato e per aver, con molta pazienza, corretto e revisionato il mio lavoro.

Un ringraziamento speciale va al Dottor Arturo Corchia dell'UO di Medicina Interna dell'ospedale di Cecina per aver sempre creduto in me.

Ringrazio in fine i miei familiari (in special modo mio padre, mia madre e mia sorella), Elena ed i miei amici, la sola presenza dei quali ha reso possibile questo traguardo.



## Bibliografia

1. Ezzati M, Lopez AD, Rogers A, Vander Hoorn S, Murray CJ. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 2002;360:1347-60.
2. Franklin SS, Larson MG, Khan SA, et al. *Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study.* *Circulation* 2001;103:1245-9.
3. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. *Age specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies.* *Lancet* 2002;360:1903-13.
4. Turnbull F; Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet.* 2003;362:1527-35.
5. *2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension.* *J Hypertens* 2003;21:1011-53.
6. Laurent S, Boutouyre 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.

7. Taddei S, Salvetti A. Endothelial *dysfunction in essential hypertension: clinical implications*. J Hypertension 2002;20:1671-4.
8. Izzo JL jr. *Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome*. Curr Opin Cardiol. 2004;19:341-52.
9. Nichols WW, O'Rourke MF. *McDonald's blood flow in arteries. Theoretical, Experimental and Clinical Principles*. 5<sup>th</sup> ed. Oxford University Press. 2005:p624.
10. Lakatta EG, Levy D. *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease*. Circulation. 2003;107:139-46.
11. Lakatta EG. *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging*. Circulation. 2003;107:490-7.
12. Nichols WW, O'Rourke MF. *McDonald's blood flow in arteries. Theoretical, Experimental and Clinical Principles*. 5<sup>th</sup> ed. Oxford University Press. 2005.
13. O'Rourke MF, Pauca AL. *Augmentation of the aortic and central arterial pressure waveform*. Blood Press Monit 2004;9:179-85.
14. Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H. *Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases*. Circulation 2003;107:2864-9.
15. London GM, Asmar RG, O'Rourke MF, Safar ME. *Mechanism(s) of selective systolic blood pressure reduction after a low-dose combination of*

*perindopril/indapamide in hypertensive subjects: comparison with atenolol.* J Am Coll Cardiol 2004;43:92-9.

16. Nichols WW, Edwards DG. *Arterial elastance and wave reflection augmentation of systolic blood pressure: deleterious effects and implication of therapy.* J Cardiovascular Pharmacol Ther 2001;6:5-21.
17. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. *Structural and genetic bases of arterial stiffness.* Hypertension. 2005;45:1050-5.
18. Izzo JL jr. *Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome.* Curr Opin Cardiol. 2004;19:341-52.
19. O'Rourke MF, Adij A. *An updated clinical primer on large artery mechanism: implications of pulse waveform analysis and arterial tonometry.* Curr Opin Cardiol. 2005;20:275-81.
20. Benetos A, Laurent S, Hoeks AP, Boutouyrie PH, Safar ME. *Arterial alterations with aging and high blood pressure. A non invasive study of carotid and femoral arteries.* Arteriscler Thromb. 1993;13:90-7.
21. Wilkinson IB, Franklin SS, Hall IR, Tyrrell S, Cockcroft JR. *Pressure amplification explain why pulse pressure is unrelated to risk in young subjects.* Hypertension. 2001;38:1461-6.
22. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannatasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. *Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical application.* Eur Heart J. 2006;27:2588-605.

23. Oparil S, Izzo JL Jr. Pulsology rediscovered: commentary on the Conduit Artery Function evaluation. *Circulation*. 2006 Mar 7;113(9):1213-25.
24. McEniery CM, Yasmin, Hall IR, Qasem A, Wilkinson IB, Cockcroft JR. *Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo Cardiff Collaborative Trial (ACCT)*. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1753-60.
25. Schwartzkopff B, Motz W, Frenzel H, Vogt M, Krauner S, Strauer BE. *Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with hypertension*. *Circulation*. 1993;88:993-1003.
26. Boutouyre P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, Laurent S. *Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study*. *Hypertension*. 2002;39:10-5.
27. London GM, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchias SJ, Safar ME. *Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure*. *Hypertension*. 2001;38:434-8.
28. Safar ME, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchias SJ, Safar ME. *Arterial wave reflections and survival in end stage renal disease*. *Hypertension*. 2002;39:735-8.
29. Weber T, Auer J, O'Rourke M F, Kvas E, Lassnig E, Lamm G, Stark N, Rammer M, Eber B. *Increased arterial wave reflections predict severe cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary intervention*. *Eur Heart J*. 2005;26:2657-63. Epub 2005 Sep 23.

30. Guerin AP, Blacher J, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. *Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end stage renal failure*. Circulation. 2001;103:987-92.
31. Asmar RG, London GM, O'Rourke ME, Safar ME. *Improvement in blood pressure, arterial stiffness and wave reflections with a very-low-dose perindopril/indapamide combination in hypertensive patient: a comparison with atenolol*. Hypertension. 2001;38:922-6.
32. De Luca N, Asmar RG, London GM, O'Rourke MF, Safar ME. *Selective reduction of cardiac mass and central blood pressure on low-dose combination perindopril/indapamide in hypertensive subjects*. J Hypertens. 2004;22:1623-30.
33. Ross R. *Atherosclerosis, an inflammation disease*. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
34. Luscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium: modulator of cardiovascular function*. Boca Raton, FL: CRC Press: 1-215; 1990.
35. Vallance P, Collier J, Moncada S. *Effects of endothelium derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man*. Lancet . 1989; 2:997-1000.
36. Ross R. NEJM 1999 *The endothelium, modulator of cardiovascular function*. Boca Raton, FL: CRC Press: 1\_215; 1996.
37. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Versari D, Salvetti A. *Endothelium, aging and hypertension*. Curr Hypertens Rep. 2006 Apr; 8:84-9.
38. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. *A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and*

*modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels.* J Hypertension suppl. 1988;6:S188-91.

39. Haynes WG, Webb DJ. *Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone.* Lancet. 1994;344:852-4.
40. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Panza JA. *Interactions between nitric oxide and endothelium in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo.* Hypertension. 2000;35:1237-41.
41. Luscher TF, Noll G. *Endothelial function as an end-point in interventional trials: concepts, methods and current data.* J Hypertension Suppl. 1996; 14:S111-19; discussion S119-21.
42. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. *Non invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.* Lancet. 1992;340:1111-5.
43. Coretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerarard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force.* J Am Coll Cardiol. 2002;39:257-65.
44. Beux F, Carmassi S, Salvetti MV, Ghiadoni L, Huang Y, Taddei S, Salvetti A. *Automatic evaluation of arterial diameter variation from vascular echographic images.* Ultrasound Med Biol. 2001;27:1621-9

45. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension.* Circulation. 1998;97:2222-9
46. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. *Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension.* Circulation 1995;91:1981-7.
47. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension.* N Eng J Med. 1990;323:22-7.
48. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. *Indirect evidence for release of endothelium-derived grow relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension.* Circulation. 1990;81:1762-7.
49. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. *Vasodilatation to acetylcholine in primary and secondary forms of human Hypertension.* Hypertension. 1993;21:929-33.
50. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Natali A, Ferranini E, Salvetti A. *Effect of insulin on acetylcholine-induced vasodilation in a normotensive subjects and patients with essential hypertension.* Circulation 1995;92:2911-8.
51. Creager MA, Roddy MA. *Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients.* Hypertension. 1994;24:499-505.
52. Taddei S, Mattei P, Viridis A, Sudano I, Ghiadoni L, Salvetti A. *Effect of potassium on vasodilatation to acetylcholine in essential hypertension.* 1994;23:485-90.

53. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. *Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension.* N Engl J Med. 1994;330:1036-40.
54. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. *Impaired endothelium-dependent vasodilatation in patient with essential hypertension: evidence that the abnormality is not at the muscarinic receptor level.* J Am Coll Cardiol. 1994;23:1610-6.
55. Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO. *Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway.* Circulation 1995;91:1732-8.
56. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Buralli S, Salvetti A. *Vasodilatation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients.* Circulation. 1999;100:1400-5.
57. Taddei S, Mattei P, Viridis A, Sudano I, Ghiadoni L, Salvetti A. *Forearm vasodilatation in response to acetylcholine is increased by potassium in essential hypertensive patients.* J Hypertens Suppl. 1993;11:S144-5.
58. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Tiberio G, Giulini SM, Rossi G, Bernini G, Agabiti-Rosei E. *Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure.* Hypertension. 1998;31:335-41.
59. Treasure CB, Manoukian SV, Klein JL, Vita JA, Nabel EG, Renwick GH, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P. *Epicardial coronary artery responses to*



- acetylcholine are impaired in Hypertensive patients. Circ Res. 1992;71:776-81.*
60. Egashira K, Suzuki S, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Imaizumi T, Takeshita A. *Impaired endothelium-dependent vasodilatation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension. Different responses to acetylcholine and substance P. Hypertension. 1995;25:201-6.*
61. Antony I, Aptecar E, Lerebours G, Nitenberg A. *Coronary artery constriction caused by the cold pressor test in human hypertension. Hypertension. 1994;24:24:212-9.*
62. Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Hunter LM, Biegelsen ES, Huang A, Keaney JF jr, Vita JA. *Effect of ascorbic acid treatment on conduit vessel endothelial dysfunction in patients with hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;280:H528-34.*
63. Gocke N, Holbrook M, Duffy SJ, Demisse S, Cupples LA; Biegelsen E, Keaney JF jr, Loscalzo J, Vita JA. *Effects of race and hypertension on flow-mediated and nitroglycerin-mediated dilation of brachial artery. Hypertension. 2001;38:1349-54.*
64. Park JB, Charbonneau, Schiffrin EL. *Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. J Hypertensions. 2001;19:415-20.*
65. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. *Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. N Eng J Med 2002; 346:1954-62.*

66. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. *Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients.* Circulation 1996;94:1928-303.
67. Quyyumi AA, Mulcahy D, Andrews NP, Husain S, Panza JA, Cannon RO, 3<sup>rd</sup>. *Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. Comparison of acetylcholine and substance P.* Circulation. 1997;95:104-10.
68. Gryglewsky RJ, Palmer RM, Moncada S. *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor.* Nature. 1986;320:454-6.
69. Luscher TF, Vanhoutte PM. *Endothelium dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat.* 1986;8:344-8.
70. Cosentino F, Sill JC, Katusic. *Role of superoxide anions in the mediation of endothelium dependent contractions.* Hypertension. 1994;23:229-35.
71. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. *Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension.* Hypertension. 1997;29:274-9.
72. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Quyyumi AA, Panza JA. *Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients.* Hypertension. 1997;30:57-63.
73. Yasue H, Matsuyama K, Okumura K, Morikami Y, Ogawa H. *Response of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection*

*of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. Circulation. 1990;81:482-90.*

74. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Kuga T, Urabe Y, Takeshita A. *Effects of age on endothelium-dependent vasodilatation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. Circulation. 1993; 88:77-81.*
75. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. *Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. J Am Coll Cardiol. 1994;24:1468-74.*
76. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, Salvetti A. *Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. Hypertension 2001;38:274-9.*
77. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA. *The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. Circulation. 1993;88:2541-7.*
78. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, Donald AE, Taylor M, Vallance P, Deanfield JE, McAllister RJ. *Heterogeneous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. Circ Res. 2001;88:145-51.*
79. Ting HH, Timmi FK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. Circulation. 1997;95:2617-22.*

80. Katusic ZS. *Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role?* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;281:H981-6.
81. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali JR. *Impairment of coronary vascular reserve and Ach-induced vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function.* Diabetes. 1993;42:1017-25.
82. Makimattila S, Liu ML, Vakkilainen J, Schlenzka A, Lahdenpera S, Syvanne M, Mantysaari M, SummanenP, Bergholm R, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. *Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL and antioxidants.* Diabetes Care. 1999;22:973-81.
83. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type 2 diabetes mellitus.* Diabetologia. 2000;43:1435-8.
84. Chowienczyk PJ, Brett SE, Gopaul NK, Meeking D, Marchetti M, Russel-Jones DL, Anggard EE, Ritter JM. *Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type 2 diabetes.* Diabetologia 2000;43:974-7.
85. Goodfellow J, Ramsey MW, Luddington LA, Jones CJ, Coates PA, Dunstan F, Lewis MJ, Owens DR, Henderson AH. *Endothelium and inelastic arteries: an early marker of vascular dysfunction in non-insulin dependent diabetes.* BMJ. 1996;312:744-5.
86. Enderle MD, Benda N, Schmuelling RM, Haering HU, Pfohl M. *Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM, compared with healthy subjects.* Diabetes Care. 1998;21:271-7.

87. Sheu WH, Juang BL, Chen YT, Lee WJ. *Endothelial dysfunction is not reversed by simvastatin treatment in type 2 patients with hypercholesterolemia*. Diabetes Care. 1999;22:1224-5.
88. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. *Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk in type 2 diabetes*. Diabetes. 1999;48:1856-62.
89. Ghiadoni L, Donald AE, Croley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. *Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans*. Circulation. 2000;102:2473-83.
90. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. *Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults*. N Eng J Med. 1996;334:150-4.
91. O'Rourke MF, Steassen JA, Vlachopoulos C, Duprez D, Plante GE. *Clinical application of arterial stiffness; definition and reference values*. Am J Hypertension. 2002;15:426-44.
92. Nichols WW, Singh BM. *Augmentation index as a measure of peripheral vasculare disease state*. Curr Opin Card 2002;17:543-51.
93. Gemignani V, Bianchini E, Faita F, Giannarelli C, Platinga Y, Ghiadoni L, Demi M. *Ultrasound measurement of the brachial artery flow-mediated dilatation without ECG gating*. Ultrasound Med Biol. 2008 Mar; 34(3):385-91.

94. Bevan, JA. *Flow regulation of vascular tone. Its sensitivity to changes in sodium and calcium. Hypertension* 22: 273-281, 1993
95. Niebauer, J, and Cooke JP. *Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. J Am Coll Cardiol* 28: 1652-1660, 1996
96. Dimmeler, S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM. *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature* 399: 601-605, 1999
97. Clarkson, P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubb M, World M, and Deanfield JE. *Exercise training enhances endothelial function in young men. J Am Coll Cardiol* 33: 1379-1385, 1999
98. Duffy SJ, Castle SF, Harper RW, and Meredith IT. *Contribution of vasodilator prostanoids and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilation, and flow-mediated dilation in human coronary circulation. Circulation* 1999; 100: 1951-1957
99. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, and Lüscher TF. *Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. Circulation* 1995; 91: 1314-1319
100. Joannides, R, Richard V, Haefeli WE, Linder L, Lüscher TF, and Thuillez C. *Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. Hypertension* 1995; 26: 327-331
101. Quyyumi, AA. *Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. Am J Med* 1998; 105: 32S-39S

102. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, and Hintze TH. *Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression.* Circ Res 1994; 74: 349-353
103. Zeiher, AM, Drexler H, Saurbier B, and Just H. *Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans.* J Clin Invest 1993; 92: 652-662.
104. Zeiher, AM, Drexler H, Wollschläger H, and Just H. *Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of atherosclerosis.* Circulation 1991; 83: 391-401,
105. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. *Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects.* Am J Cardiol 1997; 79: 350-354.
106. Kawano, H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, and Yasue H. *Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery.* J Am Coll Cardiol 1999; 34: 146-154.

