



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Medicina del Benessere, Nutrigenomica e Malattie Degenerative
Dipartimento ProMISE (Department of Health Promotion, Mother and Child Care,
Internal Medicine and Medical Specialties)
MED/09

Il calcio coronarico è indipendentemente associato alla rigidità arteriosa e al *cholesterol burden* nei pazienti con ipercolesterolemia familiare

IL DOTTORE
DR. ALESSANDRO MATTINA

IL COORDINATORE
PROF. ANTONIO PINTO

IL TUTOR
PROF. EMILIO NARDI

CICLO - XXXIII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO – 2021

Sommario

Introduzione	3
Il colesterolo.....	3
Metabolismo del colesterolo	5
Colesterolo e aterosclerosi	7
Ipercolesterolemia familiare	9
Calcificazioni coronariche e calcium score	11
Aterosclerosi e stiffness arteriosa	14
Metodi	18
Popolazione.....	18
Parametri clinici e fattori di rischio CV tradizionali.....	18
Parametri di scansione TC	19
Valutazione della rigidità arteriosa	19
Analisi dei lipidi e valutazione genetica	20
Calcolo del cholesterol burden.....	21
Analisi statistica	22
Risultati.....	23
Discussione.....	28
Conclusioni	31
Bibliografia	32

Introduzione

Il colesterolo

Il colesterolo è un costituente necessario delle membrane cellulari e il precursore degli ormoni steroidei. Esiste soprattutto sotto forma libera, all'interno delle membrane, e sotto forma esterificata nei vacuoli di riserva. Il colesterolo è il substrato della sintesi degli ormoni steroidei nelle ghiandole endocrine e nelle gonadi, della vitamina D nella pelle e degli acidi biliari nel fegato. Tuttavia, le cellule hanno una scarsa capacità di immagazzinarlo fatta eccezione per gli epatociti, gli adipociti, i macrofagi e le cellule steroidogeniche¹.

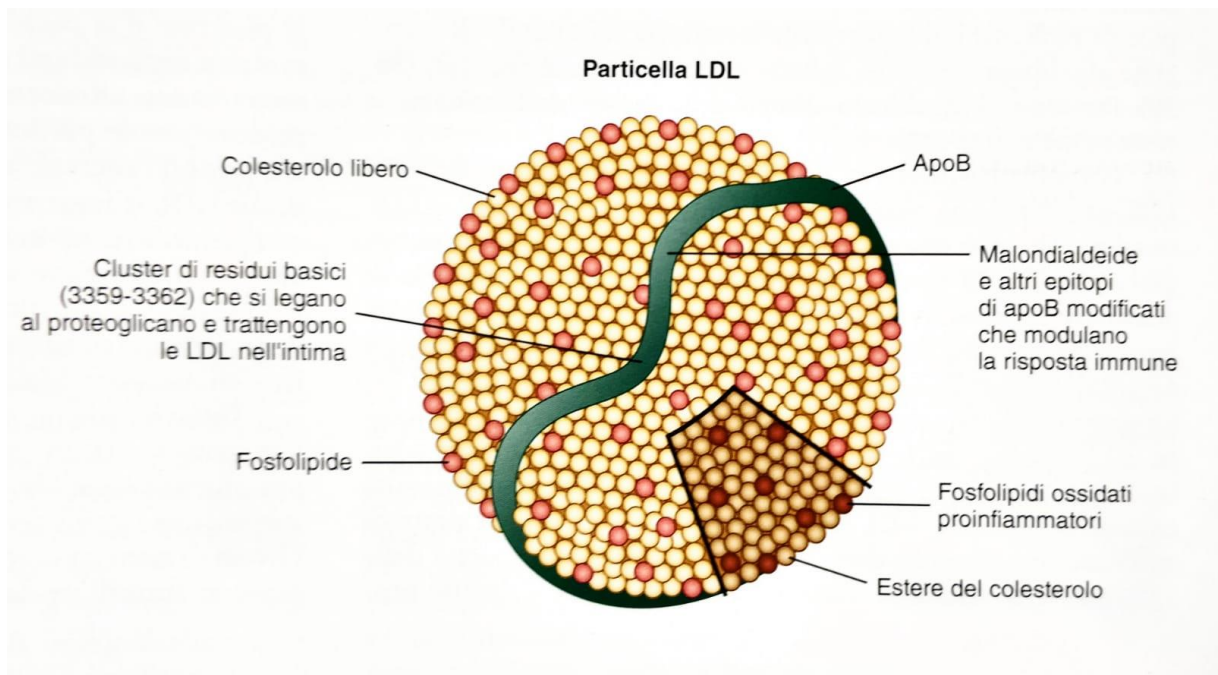
Il colesterolo, come i trigliceridi, è veicolato dalle lipoproteine plasmatiche, la cui dinamica è uno degli elementi fondamentali dell'omeostasi dei lipidi. Ogni alterazione di questa, d'origine nutrizionale, ambientale o genetica, è associata a patologie quali obesità, diabete, aterosclerosi e malattie da accumulo².

Le lipoproteine plasmatiche sono identificate in quattro tipi:

- i **chilomicroni**, prodotti dagli enterociti a partire dal colesterolo e soprattutto dai trigliceridi introdotti con la dieta, che, dopo aver distribuito il loro contenuto lipidico ai tessuti, vengono degradati a livello epatico;
- le **lipoproteine a bassissima densità** (VLDL), prodotte dal fegato, che raggiungono i tessuti periferici adiposi e muscolari;
- le **lipoproteine a bassa densità** (LDL), prodotte dal progressivo scambio di lipidi e apolipoproteine da parte delle VLDL, che veicolano nel circolo soprattutto colesterolo esterificato e sono i principali responsabili della formazione delle placche aterosclerotiche nelle pareti vascolari;

- le **lipoproteine ad alta densità** (HDL), sintetizzate dal fegato o provenienti dalla lipolisi di particelle ricche in trigliceridi, sono responsabili del trasporto inverso del colesterolo dalla periferia al fegato.

Figura 1. La particella LDL è una struttura approssimativamente sferica con un nucleo centrale o core costituito in gran parte da esteri del colesterolo, incapsulati da un rivestimento o mantello più idrofilo contenente fosfolipidi e colesterolo non esterificato

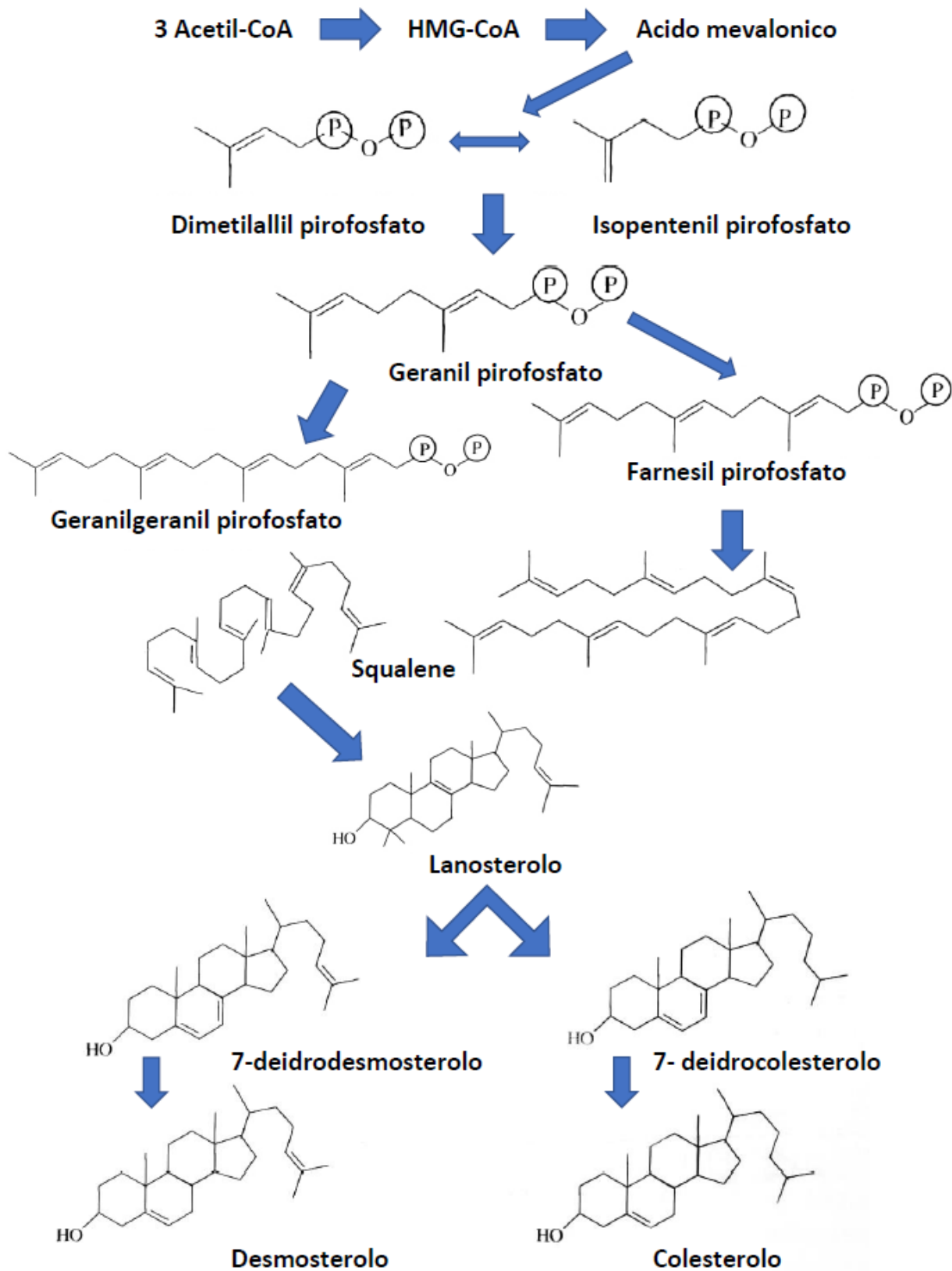


Metabolismo del colesterolo

La prima fonte di colesterolo delle cellule è quello veicolato dalle lipoproteine plasmatiche, captato dal circolo attraverso recettori specifici. Solo quando la quantità di colesterolo importato è insufficiente si attiva il processo di sintesi endocellulare. Anche se tutte le cellule possono sintetizzare il colesterolo, i più attivi sono di gran lunga gli epatociti e gli enterociti. La sintesi del colesterolo si effettua principalmente nel reticolo endoplasmatico a partire dall'acetil-CoA o, in particolari casi, a partire dai corpi chetonici (Figura 2). Tre molecole di acetil-CoA si condensano per dare successivamente l'acetoacetil-CoA e il β -idrossi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), tappa catalizzata dall'HMG-CoA sintetasi, che gioca un ruolo regolatorio maggiore. L'espressione del suo gene è sotto il controllo del livello di colesterolo intracellulare. Nel momento in cui il colesterolo diventa insufficiente, l'espressione del gene è stimolata dall'intermediario del fattore di trascrizione *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP). Quando il tasso intracellulare di colesterolo si riduce, l'enzima è rapidamente degradato³.

L'HMG-CoA è in seguito ridotto in mevalonato dall'HMG-CoA reduttasi, che è anch'esso un enzima regolato dal colesterolo intracellulare; l'HMG-CoA reduttasi è inoltre il bersaglio dell'azione delle statine. La formazione del colesterolo prevede varie altre tappe intermedie che vedono come primo precursore insolubile nell'acqua lo squalene e poi il lanosterolo².

Figura 2. Sintesi del colesterolo



Mentre le vie di biosintesi del colesterolo sono presenti in tutte le cellule, solo il fegato è in grado di degradarne la struttura tetraciclica ed eliminarlo verso il lume intestinale sotto forma libera o attraverso la sintesi degli acidi biliari. Questi sono anche indispensabili per la secrezione biliare stessa, per l'emulsione e la digestione dei grassi alimentari e per l'assorbimento intestinale di lipidi e vitamine⁴.

Colesterolo e aterosclerosi

Lo sviluppo dell'aterosclerosi è associato all'evoluzione di lesioni attive dell'intima arteriosa, in perpetuo rimodellamento sotto l'effetto di fattori di rischio endoluminali e/o endoparietari a cui i diversi componenti cellulari e molecolari della placca offrono risposte più o meno adeguate. Secondo l'equilibrio fra i fattori di protezione e quelli di stress, il rimodellamento della placca aterosclerotica evolve verso la stabilizzazione o verso la rottura.

L'accumulo anormale di colesterolo nelle cellule e negli spazi extracellulari della parete arteriosa costituisce una delle maggiori anomalie all'origine dell'aterosclerosi e soprattutto della sua progressione⁵.

Come già detto, il colesterolo è una molecola indispensabile per la costituzione delle membrane cellulari degli eucarioti ed è il precursore dei segnali essenziali alla sopravvivenza. Ma è un lipide e come tale necessita di un sistema di trasporto specifico nel mezzo extracellulare. Non potendo essere degradato dalla maggior parte delle cellule, il solo mezzo di prevenirne gli effetti di accumulo intracellulare è la neutralizzazione in forma esterificata, il blocco del suo ingresso nelle cellule tramite i recettori specifici o il trasporto verso il fegato attraverso le HDL⁶.

Figura 3. Potenziale ruolo delle LDL come antigene che promuove l'aterosclerosi

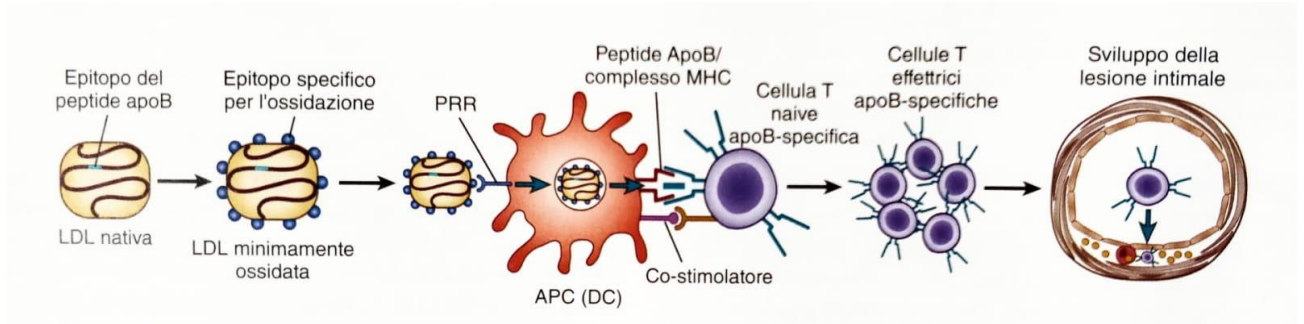
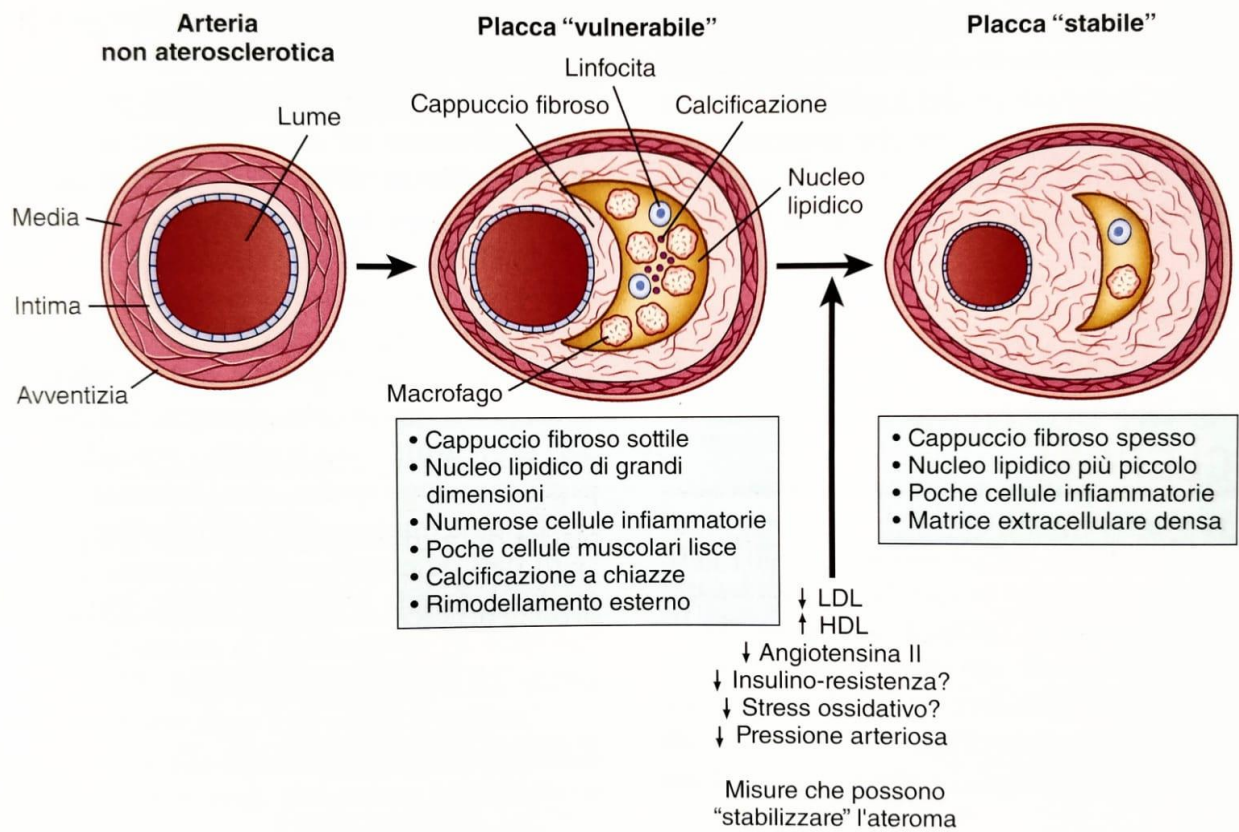


Figura 4. Evoluzione e stabilizzazione delle placche aterosclerotiche vulnerabili



Ipercolesterolemia familiare

Le dislipidemie possono essere secondarie a diverse patologie come il diabete, l'ipotiroidismo, la sindrome nefrosica, l'insufficienza renale cronica e l'ipercorticismo, e alla somministrazione di particolari classi di farmaci (ad es. diuretici tiazidici, betabloccanti, steroidi, immunosoppressori, ecc...). Le dislipidemie sono tradizionalmente distinte in sei tipi secondo la classificazione di Fredrickson (Tabella 1), basata sulle modificazioni elettroforetiche della ripartizione delle lipoproteine⁷. La classe IIa rappresenta l'unica forma di ipercolesterolemia pura, le classi I, IV e V di ipertrigliceridemia pura e la IIb e III sono considerate forme miste.

Tabella 1. *Classificazione fenotipica delle dislipidemie di Frederickson⁷*

WHO ICD and OMIM numbers	Frederickson HLP phenotype	Elevated lipid	Elevated lipoprotein	Genetics
E78.3 238600	HLP type 1 (also known as familial chylomicronaemia or LPL deficiency)	TG	CM	Primarily paediatric presentation, but also in young adults; monogenic; autosomal recessive form is due to mutant <i>LPL</i> or <i>APOC2</i> ; other forms involve mutant <i>APOA5</i> , <i>LMF1</i> and possibly <i>GPIHBP1</i>
E78.0 143890	HLP type 2A (also known as heterozygous and homozygous familial hypercholesterolaemia); severe molecular subtypes	TC (top fifth percentile)	LDL (top fifth percentile)	Many forms are polygenic, ~10% are monogenic; heterozygous form is due to mutant <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> or <i>PCSK9</i> ; homozygous form is due to mutant <i>LDLR</i> or <i>LDLRAP1</i>
E78.4 144250	HLP type 2B (also known as combined hyperlipoproteinaemia)	TC, TG (both top fifth percentile)	VLDL, LDL (top fifth percentile)	Polygenic, multiple etiologies; some cases are due to <i>USF1</i> , <i>APOB</i> or <i>LPL</i> ; ~35% of subjects show <i>APOA5</i> S19W or -1131T>C
E78.2 107741	HLP type 3 (also known as dysbetalipoproteinaemia)	TC, TG (both top fifth percentile)	IDL	Polygenic; mutant <i>APOE</i> or homozygosity for E2 allele of <i>APOE</i> is necessary but not sufficient; dominant form is due to mutant <i>APOE</i> ; ~40% of subjects show <i>APOA5</i> S19W or -1131T>C
E78.1 144600, 145750	HLP type 4 (also known as primary hypertriglyceridaemia)	TG (top fifth percentile)	VLDL	Polygenic; ~35% of subjects show <i>APOA5</i> S19W or -1131T>C
E78.3 144650	HLP type 5 (also known as mixed hyperlipidaemia)	TC, TG (both top fifth percentile)	VLDL, CM	Polygenic; ~10% of cases have mutant <i>LPL</i> , <i>APOC2</i> and <i>APOA5</i> ; ~55% of subjects show <i>APOA5</i> S19W or -1131T>C; also small effects from <i>APOE</i> , <i>TRIB1</i> , <i>CHREBP</i> , <i>GALNT2</i> , <i>GCKR</i> and <i>ANGPTL3</i>

L'ipercolesterolemia familiare (FH, OMIM #143890) è una forma di ipercolesterolemia pura su base genetica autosomica dominante. È caratterizzata da almeno tre condizioni genetiche distinte dovute a mutazioni nei geni per il recettore LDL (*LDLR*), l'apolipoproteina B

(*APOB*), e la proproteina della convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (*PCSK9*). A seconda che la mutazione sia stata ereditata da uno o da entrambi i genitori, si determina una condizione di eterozigosi (HeFH) o di omozigosi (HoFH)⁸. Molti individui considerati fenotipicamente omozigoti sono portatori di due diverse mutazioni nel gene *LDLR* (definiti eterozigoti composti), ovvero sono portatori di una mutazione nel gene *LDLR* ed un'altra mutazione in un altro dei geni candidati *APOB* o *PCSK9* (definiti doppi eterozigoti)⁹. Questi difetti monogenici si traducono in una ridotta efficienza nella rimozione delle LDL plasmatiche da parte degli epatociti. Il conseguente incremento dei livelli del colesterolo totale e di LDL nel sangue è il principale fattore determinante e la causa scatenante del danno endoteliale vascolare, della differenziazione dei monociti in macrofagi, della conseguente formazione di cellule schiumose e quindi dello sviluppo di lesioni aterosclerotiche¹⁰.

La diagnosi di FH è di solito basata sulla storia familiare, la presenza di manifestazioni cutanee e tendinee (xantelasmi e xantomî), l'aumento di LDL, e, nella maggior parte dei casi, la diagnosi molecolare. I pazienti con FH eterozigote sono circa 1 ogni 250 abitanti in Europa, mentre la forma omozigote è una condizione rara, colpendo circa un individuo ogni 300.000. Se non trattati, questi soggetti hanno un drammatico aumento del rischio di sviluppare malattia coronarica prematura (dopo i 20 anni gli HeFH, nell'infanzia gli HoFH)¹¹ così come arteriopatia periferica¹² e stenosi dei tronchi sovraortici¹³.

La valutazione del rischio cardiovascolare nei pazienti FH è impegnativa. Gli algoritmi tradizionali di calcolo del rischio (come il Framingham Risk Score) sono spesso inadeguati perché non tengono conto dei valori elevati di colesterolo a cui questi soggetti sono esposti da tutta la vita e non possono essere applicati efficacemente per determinare quando iniziare il trattamento nei pazienti giovani.

In tal senso alcuni autori in letteratura hanno proposto vari metodi per il calcolo del carico cumulativo di colesterolo (*cholesterol burden* - CB) come stima dell'esposizione durante la vita a elevati livelli plasmatici di colesterolo. IL CB è risultato associato alla presenza di aterosclerosi carotidea e allo spessore medio-intimale (*intima-media thickness* - IMT) carotideo^{13,14}, alla rigidità arteriosa¹⁵ e alle calcificazioni coronariche e aortiche¹⁶ in coorti di pazienti affetti da FH eterozigote e omozigote.

Calcificazioni coronariche e calcium score

Lo sviluppo delle calcificazioni a livello delle arterie coronariche è un processo cellulare attivo simile alla mineralizzazione ossea ed è parte integrante del processo aterosclerotico. Anche se il rilevamento tramite mezzi di *imaging* del calcio coronarico (CAC) non può identificare una lesione stenotica o una placca vulnerabile, esso può essere in grado di definire globalmente il rischio di eventi coronarici di un paziente in virtù della sua forte associazione con il carico totale di malattia aterosclerotica¹⁷. Il CAC ha dimostrato di correlare con l'estensione complessiva della malattia coronarica identificata dalla presenza di stenosi nelle coronarie di soggetti sottoposti ad autopsia¹⁸. Questa elevata deposizione di calcio può verificarsi nella parete del vaso senza protrudere nel lume ma causandone una riduzione della sezione trasversale. Queste lesioni spesso non limitano il flusso sanguigno dell'arteria coronarica in misura tale da causare angina, difetti di perfusione miocardica sotto stress o ipocinesie della parete all'ecocardiografia da stress. Tuttavia, individui asintomatici con una maggiore frequenza di CAC hanno un rischio maggiore di infarto miocardico e morte cardiaca improvvisa^{19,20}. Normalmente la presenza di calcificazioni caratterizza uno stadio avanzato dello sviluppo della placca e generalmente ne definisce la stabilità²¹. Per comprendere questo apparente conflitto tra la stabilità delle lesioni calcifiche e la

correlazione fra CAC e eventi coronarici, occorre tener presente che l'estensione della malattia aterosclerotica è associata a una maggiore frequenza di placche sia calcifiche che non calcifiche¹⁷. In altre parole, i pazienti che presentano placche calcifiche hanno anche una maggiore probabilità di avere placche non calcifiche o placche “soft” che sono più propense alla rottura e alla trombosi coronarica acuta¹⁷. In uno studio di He et al²² sono stati identificati 3895 pazienti prevalentemente asintomatici con CAC presente. Una parte di questi pazienti ha successivamente eseguito un esame scintigrafico di perfusione miocardica, la cui positività è risultata ben correlata con il *calcium score* coronarico (CACS). Questo lavoro, insieme ad altri studi prospettici sull'incidenza di eventi cardiovascolari in pazienti asintomatici sottoposti a TC coronarica per il calcolo del CAC^{23,24}, ha permesso di stabilire dei livelli indicativi di rischio cardiovascolare (Tabella 2). Inoltre le linee guida americane del 2013 sulla valutazione del rischio cardiovascolare hanno posto a >300 la soglia che valida l'utilizzo del CACS in aggiunta ai fattori di rischio tradizionali per una più precisa determinazione dei pazienti in cui è necessario intraprendere un trattamento farmacologico²⁵.

Tabella 2. Linee guida sul CACS

EBCT CALCIUM SCORE	PLAQUE BURDEN	PROBABILITY OF SIGNIFICANT CAD	IMPLICATIONS FOR CV RISK	RECOMMENDATIONS
0	No identifiable plaque	Very low, generally < 5%	Very low	Reassure patient while discussing general public health guidelines for primary prevention of CV diseases
1–10	Minimal identifiable plaque burden	Very unlikely, < 10%	Low	Discuss general public health guidelines for primary prevention of CV diseases
11–100*	Definite, at least mild atherosclerotic plaque burden	Mild or minimal coronary stenoses likely	Moderate	Counsel about risk-factor modification, strict adherence with NCEP ATP II primary prevention cholesterol guidelines, daily ASA [†]
101–400*	Definite, at least moderate atherosclerotic plaque burden	Nonobstructive CAD highly likely, although obstructive disease possible	Moderately high	Institute risk-factor modification and secondary prevention NCEP ATP II guidelines. Consider exercise testing for further risk stratification
> 400*	Extensive atherosclerotic plaque burden	High likelihood (≥ 90%) of at least 1 "significant" coronary stenosis	High	Institute very aggressive risk-factor modification. Consider exercise or stress pharmacologic stress imaging to evaluate for inducible ischemia

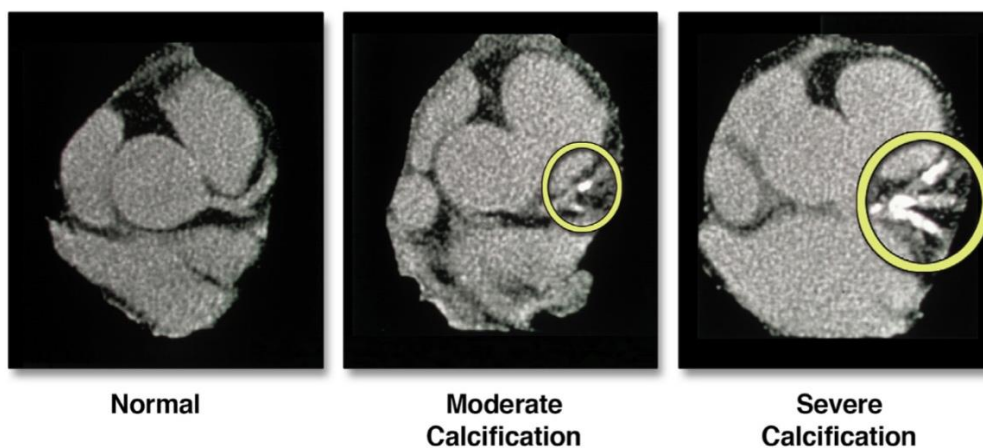
*If score > 75th percentile for age/gender, advance to recommendations for next calcium score range.

[†]Oral administration of 80 to 325 mg.

ASA = acetylsalicylic acid; CAD = coronary artery disease; CV = cardiovascular; EBCT = electron-beam computed tomography; NCEP ATP II = National Cholesterol Education Program (Adult Treatment Panel II).

REPRINTED WITH PERMISSION FROM RUMBERGER JA, BRUNDAGE BH, RADER DJ, KONDOS G. ELECTRON BEAM COMPUTED TOMOGRAPHIC CORONARY CALCIUM SCANNING: A REVIEW AND GUIDELINES FOR USE IN ASYMPTOMATIC PERSONS. MAYO CLIN PROC 1999; 74:243–252.

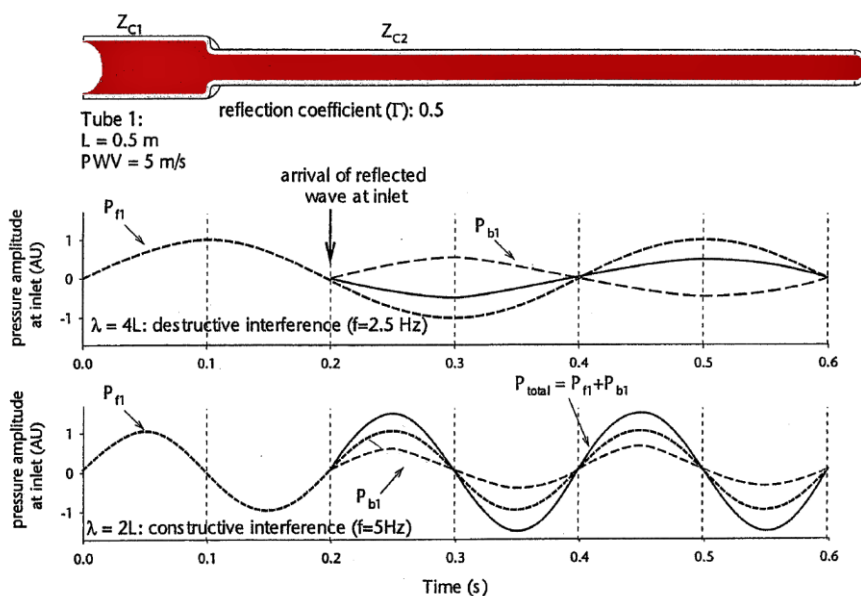
Figura 5. Esempi di scansione delle arterie coronariche²⁴



Aterosclerosi e stiffness arteriosa

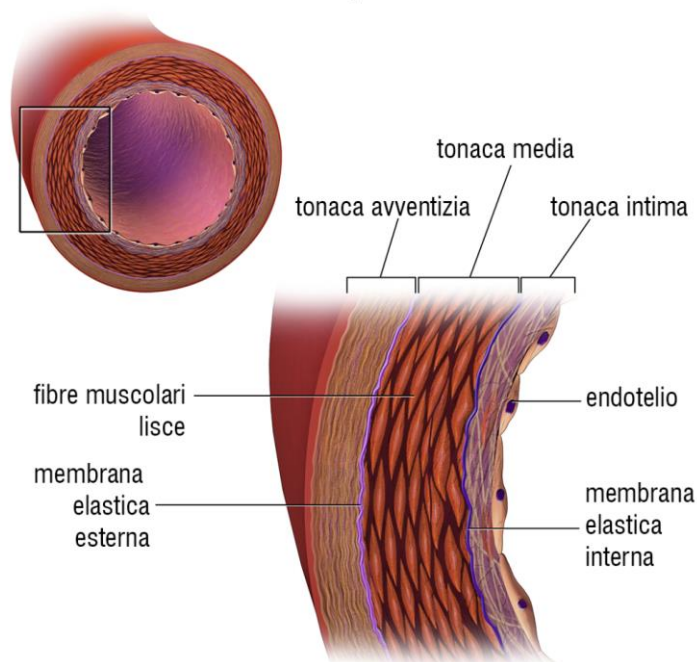
Quando il ventricolo sinistro espelle il sangue nell'aorta, dà origine a un'onda di pressione anterograda (forward wave). Mentre questa onda viaggia verso la periferia, l'aumento lungo la traiettoria dà luogo alla generazione di onde riflesse che costituiscono l'onda retrograda (backward wave) che torna verso il cuore. In condizioni fisiologiche normali, l'onda di pressione riflessa si aggiunge all'onda anterograda, aumentando la pressione centrale. Conoscendo la pressione centrale ed il flusso, è possibile valutare l'esatta ampiezza e forma delle onde anterograda e retrograda. L'invecchiamento e le malattie cardiovascolari influenzano le proprietà delle arterie e alterano l'ampiezza e il tempo delle onde. L'analisi della riflessione dell'onda e della pressione centrale può aiutare a comprendere meglio la fisiopatologia dell'aterosclerosi.

Figura 6. Il risultato netto dell'onda di riflessione dipende dal tempo di percorrenza dell'onda riflessa. Un'onda riflessa può diminuire (interferenza distruttiva) o aumentare (interferenza costruttiva) la pressione totale a seconda della lunghezza d'onda, della velocità dell'onda di polso, della natura e della posizione della riflessione



Le modificazioni strutturali della parete arteriosa che si verificano nei pazienti affetti da aterosclerosi, infatti, provocano una profonda alterazione delle proprietà elastiche dei vasi²⁶. Questo processo porta ad una riduzione della compliance arteriosa e ad una maggiore rigidità²⁷. La rigidità delle grandi arterie dipende non solo dalla quantità dei loro principali costituenti (elastina, collagene e muscolo liscio) ma anche dall'organizzazione spaziale e dalle interazioni meccaniche tra questi componenti. Queste interazioni possono essere mediate dalle proteine di adesione della matrice extracellulare e dai recettori delle integrine di membrana²⁸.

Figura 7. *Struttura della parete arteriosa*

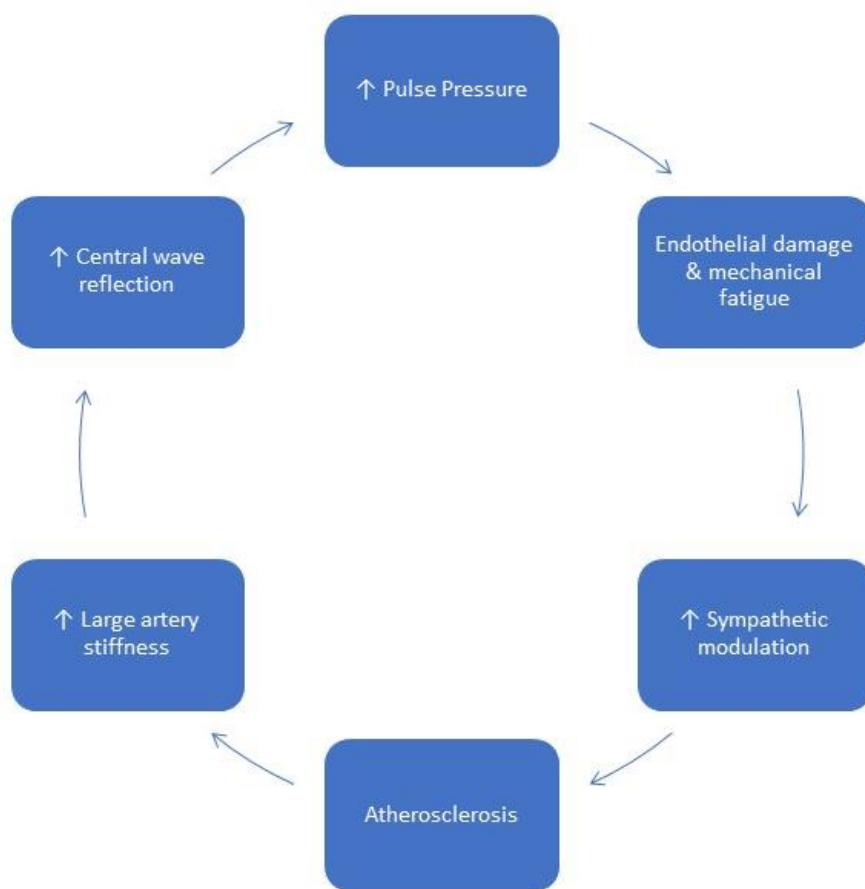


Va ricordato che la rigidità della parete arteriosa è fortemente influenzata da diversi fattori di rischio come l'invecchiamento, la pressione sanguigna, l'ipercolesterolemia e l'iperglicemia²⁹. Tra i vari fattori fisiopatologici coinvolti nell'irrigidimento arterioso, il più rilevante è probabilmente il sistema nervoso simpatico: può agire sia direttamente aumentando il tono dei vasi, sia indirettamente attraverso un aumento della frequenza cardiaca^{29,30}. La distensibilità arteriosa è un importante predittore di malattie cardiache. Esiste una forte associazione tra aumento della rigidità arteriosa e malattie cardiache e aterosclerosi³¹.

La misurazione della velocità dell'onda di polso (PWV) è un metodo indiretto per valutare la rigidità arteriosa³². La PWV carotido-femorale (cf-PWV) è stata ampiamente utilizzata per identificare l'aterosclerosi nelle prime fasi. È stato anche dimostrato che la cf-PWV è un predittore di malattie cardiovascolari (CV) e ha un ruolo nella prognosi della sindrome coronarica acuta³³. Dati molto recenti provenienti da una meta-analisi sulla PWV comprendente 6 studi hanno dimostrato l'efficacia di questa tecnica nel predire la mortalità cardiovascolare e per tutte le cause, specialmente quando si considera la PWV carotideo-femorale³⁴.

Lo scopo di questo studio era quello di valutare il rischio CV in una popolazione di HeFH attraverso la misurazione della rigidità arteriosa, espressa come cf-PWV, e dell'aterosclerosi coronarica rilevata tramite TC al fine di migliorare le indicazioni su tempi e impostazione della terapia.

Figura 8. Arterial stiffness: cause e conseguenze dell'aterosclerosi (adattato da Dart A and Kingwell B JACC 2001; 37-975-984)



Metodi

Popolazione

Cento pazienti sono stati reclutati consecutivamente presso l'ambulatorio di dislipidemie genetiche, Dipartimento di Scienze della Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro". Solo i pazienti con diagnosi genetica di HeFH in follow-up regolare dal momento della diagnosi erano eleggibili per l'arruolamento in questo studio.

I criteri di esclusione erano il rifiuto del consenso informato, controindicazioni alla tomografia computerizzata (TC), ipertensione non controllata o trigliceridi (TG) > 400 mg / dl (4,52 mmol / l). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a esami clinici di routine e test di laboratorio. La PWV carotideo-femorale è stata valutata mediante il sistema SphygmoCor®, come specificato nella relativa sezione.

Lo studio è stato condotto secondo i principi delineati nella Dichiarazione di Helsinki. È stata ottenuta l'approvazione del Comitato Etico locale e il consenso informato è stato firmato da tutti i partecipanti.

Parametri clinici e fattori di rischio CV tradizionali

Sono state ricavate dalle cartelle cliniche dei pazienti informazioni anamnestiche riguardo eventuale presenza di cardiopatia ischemica, ictus, vasculopatia periferica grave (nel complesso indicate come prevenzione secondaria), ipertensione arteriosa (AH) e diabete di tipo 2 (T2D). Sono stati valutati anche il fumo di sigaretta (sì / no), l'indice di massa corporea (BMI) (peso in chilogrammi diviso per il quadrato dell'altezza in metri) e la presenza di xantomi (sì / no).

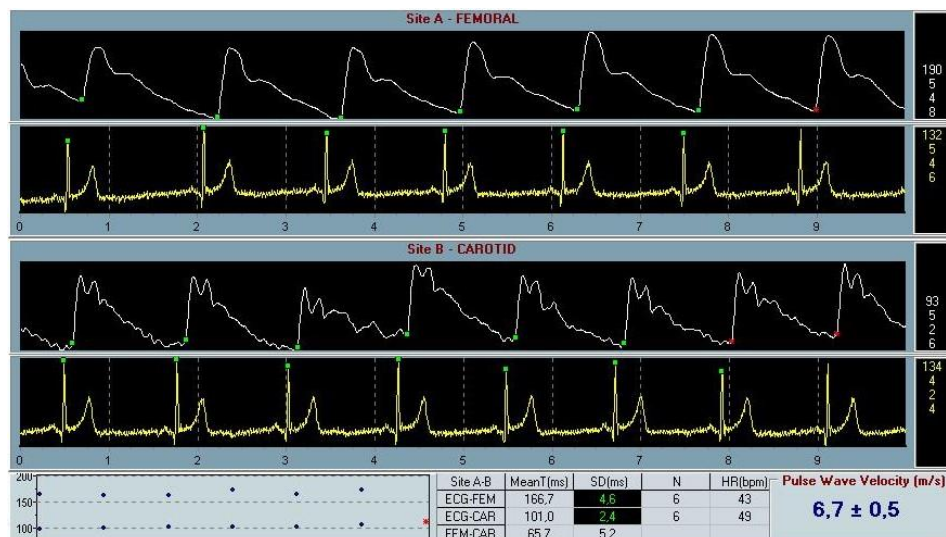
Parametri di scansione TC

Il *calcium score* delle arterie coronariche è stato valutato mediante TC cardiaca senza mezzo di contrasto. È stata utilizzata una macchina a 128 strati (Definition AS, Siemens Healthcare, Forchheim, Germania) con protocollo standard (spessore della fetta 3 mm, gating prospettico, estensione cranio caudale dalla carena tracheale al diaframma). I dataset delle immagini sono stati trasferiti su una workstation dedicata (Leonardo, Siemens, Germania) con uno specifico software di post-elaborazione (Syngo Via Cardiac, Siemens, Germania). Le immagini sono state valutate da un singolo radiologo con una vasta esperienza nella TC cardiaca. Il calcio coronarico è stato quantificato con il metodo Agatston. La dose di radiazioni somministrata ai pazienti era $< 1,5$ mSv.

Valutazione della rigidità arteriosa

La PWV è stata valutata tramite SphygmoCor® da un singolo ricercatore. Dopo aver ottenuto la misurazione della pressione arteriosa brachiale, è stata eseguita la tonometria ad appianazione sulle arterie carotide e femorale con un segnale elettrocardiografico registrato simultaneamente. La differenza tra i tempi di transito del sangue carotideo e femorale divisa per la stima della lunghezza del percorso arterioso ha consentito il calcolo del cf-PWV. Lo SphygmoCor® è un dispositivo di misurazione emodinamica non invasivo convalidato e raccomandato per la valutazione indiretta della rigidità arteriosa³⁵.

Figura 9. Esempio di analisi della velocità dell'onda di polso tramite SphygmoCor®



Analisi dei lipidi e valutazione genetica

I campioni di sangue dei pazienti (10 ml) sono stati raccolti in provette semplici e contenenti EDTA (1 mg / ml). TC, TG e HDL-C sono stati misurati utilizzando procedure enzimatico-colorimetriche standard (Instrumentation Laboratory, NY, USA) nell'autoanalizzatore ILAB 300 Plus Clinical Chemistry System (Instrumentation Laboratory, NY, USA). L'LDL-C è stato calcolato con la formula di Friedewald solo per pazienti con livelli di TG <250 mg / dl³⁶.

Il test dell'attività del recettore LDL nei fibroblasti cutanei in coltura è stato eseguito come riportato in precedenza³⁷. Questo test è stato eseguito in tutti i pazienti portatori di due alleli *LDLR* mutanti e in altri pazienti eterozigoti semplici per mutazioni *LDLR* o eterozigoti doppi per mutazioni *LDLR* e *PCSK9*^{37,38}.

Il DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico mediante procedura standard. Il gene *LDLR* è stato analizzato mediante sequenziamento diretto³⁵. La ricerca dei principali

riarrangiamenti genici è stata eseguita mediante Southern blot³⁴ o mediante *multiple ligation-dependent probe amplification* (MLPA) (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands)³⁹. Il risequenziamento dell'intero gene *PCSK9* e dell'estremità 3' dell'esone 26 del gene *APOB* (da c.9216 a c.11788 +152 nt dell'introne 26) è stato eseguito in tutti i pazienti negativi per mutazioni LDLR e in tutti i pazienti con le caratteristiche cliniche coerenti con la diagnosi di FH omozigote in cui era stato trovato un solo allele mutante *LDLR*³⁵.

L'analisi dell'mRNA delle LDLR è stata eseguita in soggetti con FH portatori di importanti riarrangiamenti genici o mutazioni introniche sospette di influenzare lo splicing, i cui fibroblasti cutanei erano disponibili nella nostra banca cellulare³⁴.

La previsione in silico dell'effetto delle mutazioni missenso dei geni *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* è stata eseguita utilizzando PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT Human Protein (<http://sift.jcvi.org/>), refined SIFT⁴⁰ e Mutation Taster (<http://neurocore.charite.de/MutationTaster/>).

La previsione in silico dell'effetto delle varianti introniche è stata eseguita utilizzando NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/HSF.html>) e Automated Splice Site Analysis (<https://splice.uwo.ca>).

Calcolo del cholesterol burden

Il carico cumulativo di colesterolo LDL (*LDL-cholesterol burden* – LDL-CB) è stato calcolato secondo Hoeg et al⁴¹ utilizzando tuttavia l'LDL-C al posto del colesterolo totale. L'LDL-CB totale è la somma del carico di colesterolo LDL alla diagnosi (dLDL-CB) e del

carico di colesterolo post-diagnosi (pdLDL-CB). Il dLDL-CB si ottiene moltiplicando il valore iniziale di LDL per l'età del paziente al momento della diagnosi o comunque prima dell'inizio della terapia. Il pdLDL-CB viene calcolato sommando i valori di LDL-C dosati annualmente durante il follow-up, utilizzando le cartelle dei pazienti.

LDL Cholesterol burden alla diagnosi (dLDLCB) = valore di LDL-C x età del paziente alla diagnosi

LDL Cholesterol burden post diagnosi (pdLDLCB) = somma dei valori di LDL-C annuali dalla diagnosi all'ultima visita

LDL Cholesterol burden totale = dLDLCB + pdLDLCB

Analisi statistica

Tutte le variabili continue sono riportate come media \pm deviazione standard (SD) per variabili parametriche continue, mediana (intervallo interquartile) per variabili continue non parametriche e come frequenza (percentuale) per variabili categoriali. Le correlazioni tra due variabili sono state valutate utilizzando un modello di regressione lineare, fornendo il coefficiente di correlazione di Pearson (r) o il rho di Spearman per le variabili non parametriche. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante il test t di Student per le variabili continue e il test χ^2 per le variabili categoriali. L'analisi di regressione lineare multivariata è stata utilizzata per valutare il contributo indipendente delle variabili. L'età non è stata considerata separatamente, poiché era già inclusa nell'equazione LDL-CB. Un valore $p < 0,05$ è stato considerato significativo. Per i calcoli statistici è stato utilizzato il software statistico JMP®, SAS Institute Inc., Cary, NC.

Risultati

In questo studio sono stati arruolati 100 pazienti affetti da HeFH con diagnosi genetica (50 maschi e 50 femmine). La tabella 3 mostra i dati clinici di coorte. L'età media della popolazione HeFH studiata era $45,9 \pm 16,2$ anni e l'età media del trattamento ipolipemizzante (LLT) era $29,3 \pm 14,2$ anni.

25 pazienti erano affetti anche da ipertensione arteriosa e 24 erano in trattamento con farmaci antipertensivi. Sette pazienti erano affetti da diabete tipo 2 e 31 erano fumatori. Solo 13 pazienti erano in prevenzione secondaria. Inoltre, 88 pazienti erano in terapia con statine, 45 con ezetimibe e solo 8 con il nuovo anticorpo monoclonale anti-PCSK9 (alirocumab).

Tabella 3. Parametri clinici dell'intera coorte

Caratteristiche cliniche	n	100
	Età, anni	45.9 ± 16.2
	Genere, uomini (%)	50 (50)
	PWV, m/s	7.44 ± 2.36
	Xantomi, n (%)	21 (21)
	Età di inizio trattamento, anni	29.3 ± 14.2
	Pressione sistolica, mmHg	128.8 ± 21.4
	Pressione diastolica, mmHg	73.2 ± 11.3
	Pressione media, mmHg	93.7 ± 13.0
Fattori di rischio CV	Prevenzione secondaria, n (%)	13 (13)
	Fumo, n (%)	31 (31)
	Diabete tipo 2, n (%)	7 (7)
	BMI, kg ² /h	27.4 ± 4.9
	Ipertensione, n (%)	23 (23)
Terapia	Trattamento antipertensivo, n (%)	24 (24)
	Statine, n (%)	88 (88)
	Ezetimibe, n (%)	45 (45)
	Alirocumab, n (%)	8 (8)
Profilo lipidico	Colesterolo totale, mmol/L	5.7 (4.8-7.1)
	LDL-C, mmol/L	3.7 (2.8-4.7)
	HDL-C, mmol/L	1.4 (1.2-1.6)
	Trigliceridi, mmol/L	1.0 (0.7-1.6)
	Colesterolo non-HDL, mmol/L	4.2 (3.3-5.4)
LDL-C burden	LDL-cholesterol burden pre-diagnosi, mmol-anno/L	181.4 (133.7-286.6)
	LDL-cholesterol burden post-diagnosi, mmol-anno/L	70.9 (33.7-111.5)
	LDL-cholesterol burden total, mmol-anno/L	259.7 (186.6-338.7)
CAC	Agatston calcium score, log	2.14 ± 2.69

PWV: pulse wave velocity; CV: cardiovascolari; BMI: body mass index; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; CAC: coronary artery calcium

La Tabella 4 e la Figura 10 mostrano la correlazione del CAC con i parametri di studio. Il CAC era correlato positivamente con PWV ($r = 0,52$ $p < 0,0001$) e carico totale di C-LDL ($r = 0,52$ $p < 0,0001$) nelle analisi univariate.

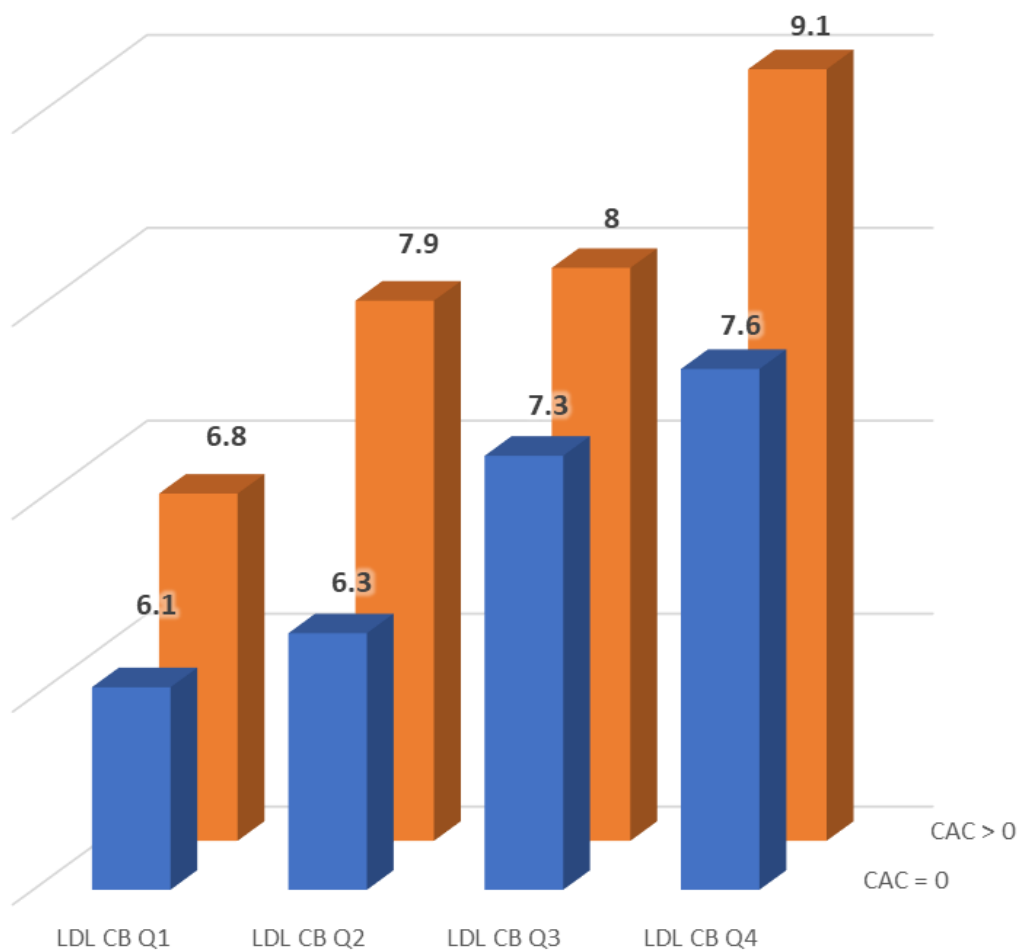
Tabella 4. Correlazioni tra coronary artery calcium log (logCAC) e i principali parametri della popolazione

		logCAC	
		r	p
Caratteristiche cliniche			
	Età, anni	0.65	< 0.0001
	Genere, uomini (%)	0.14	0.1803
	PWV m/s	0.52	< 0.0001
	Xantomi, n (%)	0.26	0.0104
Fattori di rischio CV			
	Prevenzione secondaria, n (%)	0.45	< 0.0001
	Fumo, n (%)	-0.05	0.6560
	Diabete tipo 2, n (%)	0.38	< 0.0001
	BMI, kg ² /h	0.28	0.0044
	Ipertensione, n (%)	0.51	< 0.0001
	Pressione sistolica, mmHg	0.46	< 0.0001
	Pressione diastolica, mmHg	0.21	0.0381
	Pressione media, mmHg	0.37	0.0001
Terapia			
	Trattamento antipertensivo, n (%)	0.49	< 0.0001
	Statine, n (%)	-0.09	0.3509
	Ezetimibe, n (%)	0.28	0.0051
	Alirocumab, n (%)	0.27	0.0059
Profilo lipidico			
	Colesterolo totale, mmol/L	-0.10	0.3051
	LDL-C, mmol/L	-0.12	0.2420
	HDL-C, mmol/L	-0.07	0.4968
	Trigliceridi, mmol/L	0.12	0.2536
	Colesterolo non-HDL, mmol/L	-0.09	0.3564
LDL-C burden			
	LDL-cholesterol burden pre-diagnosi, mmol-anno/L	0.49	< 0.0001
	LDL-cholesterol burden post-diagnosi, mmol-anno/L	0.23	0.0228
	LDL-cholesterol burden total, mmol-anno/L	0.55	< 0.0001

PWV: pulse wave velocity; CV: cardiovascolari; BMI: body mass index; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein

Il CAC era anche correlato ai classici fattori di rischio CV come l'età ($r = 0,65$ $p < 0,0001$), il diabete di tipo 2 ($r = 0,38$ $p < 0,0001$) e l'ipertensione ($r = 0,51$ $p < 0,0001$). Non sono state trovate associazioni con altri parametri lipidici. Inoltre, è stato riscontrato che il sesso maschile, il fumo attuale e la terapia con statine non erano correlati al CAC in questi pazienti.

Figura 10. Pulse wave velocity (m/s) nei quartili di LDL Cholesterol Burden e presenza o assenza di calcificazioni coronariche



LDL CB: low density lipoprotein cholesterol burden. Q: quartile. CAC: coronary artery calcification

L'analisi multivariata (Tabella 5) ha mostrato che il CAC era indipendentemente associato con PWV aggiustato per sesso, carico totale di LDL-C, ipertensione, fumo, LDL-C e HDL-C.

Tabella 5. Variabili associate indipendentemente a coronary artery calcium Log (logCAC)

	R²	Log CAC β (SE)	p
Overall Model	0.48		< 0.0001
PWV (m/s)		0.337 (0.109)	0.0026
LDL-C Burden (mmol/L)		0.009 (0.002)	< 0.0001
Genere (uomini = 1)		0.820 (0.486)	0.0954
Pressione media (mmHg)		0.013 (0.019)	0.5004
Fumo (sì = 1)		0.200 (0.454)	0.6597
LDL-C (mmol/l)		-0.007 (0.004)	0.0993
HDL-C (mmol/l)		-0.018 (0.018)	0.3205
Statine (sì = 1)		-1.057 (0.750)	0.1622

PWV: pulse wave velocity; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol

Discussione

In questo studio, la rigidità arteriosa è risultata correlata in modo indipendente con il calcio coronarico nei pazienti HeFH con carico di colesterolo LDL e profilo di rischio CV simili.

Il nostro studio mostra la stretta correlazione tra CAC e PWV, così come tra CAC e LDL-CB (Tabella 2).

I pazienti con FH hanno un'esposizione per tutta la vita a livelli di colesterolo LDL molto elevati e il processo di irrigidimento arterioso potrebbe quindi essere più esteso, interessando non solo le arterie a maggiore componente muscolare ma anche a maggiore componente elastica⁴². L'ipercolesterolemia dovuta alla mutazione del gene per il recettore LDL nei pazienti con FH ha un ruolo potenziale nel determinare direttamente infiammazione arteriosa e deposizione di calcio nella parete vascolare di soggetti giovani⁴³. Questo potrebbe spiegare in parte l'aumento della rigidità arteriosa.

Precedenti studi hanno riportato un irrigidimento delle arterie in pazienti a maggior rischio di malattie aterosclerotiche, compresi i pazienti ipercolesterolemici⁴⁴⁻⁴⁶. Una recente meta-analisi ha analizzato 8 studi che hanno coinvolto 317 pazienti FH confrontati con 244 individui normocolesterolemici e ha scoperto che il gruppo FH non ha mostrato alcuna differenza significativa nella PWV rispetto al gruppo di controllo⁴⁷. Tuttavia, la PWV è sicuramente un forte predittore di mortalità cardiovascolare e per tutte le cause e molti studi volti alla valutazione della PWV all'interno della popolazione FH hanno trovato correlazioni interessanti con altri parametri vascolari³⁴. Anche l'associazione tra aterosclerosi e rigidità arteriosa nei pazienti con FH è stata valutata in studi caso-controllo. Cheng et al¹⁵ hanno trovato una correlazione tra *cholesterol burden*, spessore intima-media carotideo (cIMT) e PWV in un piccolo gruppo di pazienti con FH. Plana et al⁴⁸ hanno scoperto che la rigidità

arteriosa misurata tramite *augmentation index* (Aix) era un determinante indipendente della cIMT e ha proposto Aix come marker di rischio vascolare da tenere in considerazione nei pazienti con FH. Martinez et al⁴⁹ hanno valutato diversi parametri aterosclerotici e lipidici, inclusi CAC, LDL year score (LYS) e cIMT. Gli autori non concordavano sulla rilevanza dell'imaging e dei marker infiammatori plasmatici per la previsione della malattia coronarica (CHD) nei pazienti con FH. Tuttavia, hanno calcolato il LYS solo moltiplicando l'età in anni per l'LDL-C non tenendo in considerazione i livelli di LDL-C pre-trattamento e della loro alta variabilità per tutta la vita. Inoltre, hanno trovato una correlazione indipendente tra cIMT e PWV. Più recentemente, Tada et al⁵⁰ hanno suggerito che la rigidità arteriosa valutata tramite PWV è significativamente associata a CHD nei pazienti con FH. In giovani uomini con FH, non è stata trovata alcuna correlazione tra *compliance* arteriosa e variabili lipidiche classiche⁵¹. Altre osservazioni hanno suggerito che il *cholesterol burden* gioca un ruolo importante nella fisiopatologia della struttura e della funzionalità delle arterie¹⁵. Inoltre, la rigidità e lo spessore della parete dell'arteria carotidea e femorale migliorano significativamente dopo 1 anno di trattamento con statine nei pazienti con FH⁴⁶.

L'imaging TC rileva il carico di calcio e non può identificare una placca vulnerabile, ma può essere in grado di definire globalmente il rischio di eventi coronarici del paziente^{17,52}. Una maggiore rigidità della parete arteriosa potrebbe aumentare il rischio di rottura della placca e potrebbe eventualmente contribuire allo sviluppo di eventi ischemici acuti⁵³.

Per quanto a nostra conoscenza, questo è il primo studio che valuta la relazione tra CAC, rigidità arteriosa e LDL-*cholesterol burden* nei pazienti con FH in prevenzione primaria e secondaria in terapia ipolipemizzante. L'analisi multivariata (Tabella 3) ha mostrato che in pazienti FH con LDL-*cholesterol burden* e fattori di rischio CV simili, il calcio delle arterie coronariche è fortemente associato a una maggiore rigidità arteriosa. Ciò conferma che

esistono altri fattori oltre ai parametri lipidici coinvolti nel danno aterosclerotico nei pazienti FH, associabili alle proprietà elastiche e all'infiammazione dei vasi. Il rischio CV in questi pazienti è difficile da definire e la valutazione della rigidità arteriosa può aiutare a identificare i pazienti ad alto rischio.

Questo studio presenta alcune limitazioni: la riproducibilità della PWV è piuttosto bassa ed è dipendente dall'età e dalla pressione sanguigna. Tuttavia, è uno strumento non invasivo e validato per discriminare facilmente la compromissione vascolare, specialmente in un campione di pazienti omogeneo e per lo più giovane come il nostro. Inoltre, la valutazione PWV nel nostro studio è stata effettuata da un singolo medico per eliminare quantomeno la variabilità inter-operatore. Sebbene la dimensione del campione fosse piuttosto piccola, il calcolo del carico di colesterolo LDL ha richiesto un'accurata selezione dei pazienti seguiti sin dalla diagnosi di FH. Inoltre, non esiste un campione di controllo che potrebbe rafforzare i risultati dello studio. Tuttavia, nel nostro studio trasversale, il carico di colesterolo LDL era una variabile fondamentale per gli scopi che ci siamo prefissati e il suo calcolo non è affidabile in pazienti di controllo non FH.

Conclusioni

Questo studio conferma il ruolo dei determinanti del rischio cardiovascolare del *calcium score* coronarico nei pazienti con ipercolesterolemia familiare in prevenzione primaria e secondaria. I nostri dati suggeriscono anche che la rigidità arteriosa potrebbe riflettere la presenza e la gravità della compromissione coronarica nei pazienti FH identificando coloro che hanno una compromissione vascolare maggiore pur avendo lo stesso LDL-*cholesterol burden*. La valutazione della rigidità arteriosa con il semplice metodo di misurazione del cf-PWV può aiutare a stabilire meglio il rischio cardiovascolare dei pazienti FH e quindi essere considerata un supporto per l'adozione di appropriate scelte terapeutiche.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Maurizio Averna per le competenze trasmesse e la fiducia nei miei confronti. Insieme a lui anche la sua equipe, il Prof. Emilio Nardi, Prof. Angelo Baldassare Cefalù, Prof. Davide Noto e Prof. Carlo Barbagallo, Dott.ssa Antonina Giammanco e gli studenti e assistenti in formazione di Medicina Interna che sono stati coinvolti a vario livello nel presente studio, in particolare la Dott.ssa Antonella Cardella e Carla Di Benedetto.

Ringrazio il laboratorio di biochimica, biologia e genetica “Laura Notarbartolo”, in particolare Francesca Fayer e Rossella Spina per l’analisi genetica e gli esami di laboratorio.

Infine ringrazio il Dott. Ludovico La Grutta del dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata diretto dal Prof. Massimo Midiri per la collaborazione negli esami di diagnostica per immagini.

Bibliografia

1. Ghayee, H. K. & Auchus, R. J. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **8**, 289–300 (2007).
2. Cerqueira, N. M. F. S. A. *et al.* Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* **55**, 5483–5506 (2016).
3. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331–340 (1997).
4. Norlin, M. & Wikvall, K. Enzymes in the Conversion of Cholesterol into Bile Acids. *Curr. Mol. Med.* **7**, 199–218 (2007).
5. Tabas, I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* **110**, 905–911 (2002).
6. Grimaldi, A. *Dyslipidémie et athérogenèse.* (2004).
7. FREDRICKSON, D. S. & LEES, R. S. A SYSTEM FOR PHENOTYPING HYPERLIPOPROTEINEMIA. *Circulation* **31**, 321–7 (1965).
8. Hovingh, G. K., Davidson, M. H., Kastelein, J. J. P. P. & O'Connor, A. M. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Eur. Heart J.* **34**, 962–971 (2013).
9. Cuchel, M. *et al.* Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.* **35**, 2146–57 (2014).
10. Descamps, O. S., Gilbeau, J. P., Leysen, X., Van Leuven, F. & Heller, F. R. Impact of genetic defects on atherosclerosis in patients suspected of familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* **31**, 958–965 (2001).
11. Wiegman, A. *et al.* Familial hypercholesterolemia in children and adolescents: Gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *European Heart Journal* **36**, 2425–2437 (2015).
12. Kroon, A. A., Ajubi, N., van Asten, W. N. & Stalenhoef, A. F. The prevalence of peripheral vascular disease in familial hypercholesterolaemia. *J Intern Med* **238**, 451–9. (1995).

13. Tonstad, S. *et al.* Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial hypercholesterolaemia mutations and control subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**, 971–979 (1998).
14. Raal, F. J. *et al.* Bulk Is the Pivotal Determinant of Hypercholesterolemia. **9149**, (1999).
15. Cheng, H. M., Ye, Z. X., Chiou, K. R., Lin, S. J. & Charng, M. J. Vascular stiffness in familial hypercholesterolaemia is associated with C-reactive protein and cholesterol burden. *Eur. J. Clin. Invest.* **37**, 197–206 (2007).
16. Schmidt, H. H. J. *et al.* Relation of cholesterol-year score to severity of calcific atherosclerosis and tissue deposition in homozygous familial hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* **77**, 575–580 (1996).
17. Greenland, P. *et al.* ACCF/AHA 2007 Clinical Expert Consensus Document on Coronary Artery Calcium Scoring By Computed Tomography in Global Cardiovascular Risk Assessment and in Evaluation of Patients With Chest Pain. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 378–402 (2007).
18. Sangiorgi, G. *et al.* Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: A histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**, 126–133 (1998).
19. Detrano, R. *et al.* Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med* **358**, 1336–1345 (2008).
20. Becker, A., Leber, A., Becker, C. & Knez, A. Predictive value of coronary calcifications for future cardiac events in asymptomatic individuals. *Am. Heart J.* **155**, 154–160 (2008).
21. Huang, H. *et al.* The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* **103**, 1051–6 (2001).
22. He, Z. X. *et al.* Severity of coronary artery calcification by electron beam computed tomography predicts silent myocardial ischemia. *Circulation* **101**, 244–251 (2000).
23. Raggi, P. *et al.* Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography. *Circulation* **101**, 850–855 (2000).
24. Hecht, H. S. Coronary artery calcium scanning: Past, present, and future. *JACC Cardiovasc.*

Imaging **8**, 579–596 (2015).

25. Goff, D. C. *et al.* 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* **63**, 2935–2959 (2014).
26. Cocciolone, A. J. *et al.* Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **315**, H189–H205 (2018).
27. Ziemann, S. J., Melenovsky, V. & Kass, D. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 932–943 (2005).
28. Intengan, H. D. & Schiffrin, E. L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: Role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* **36**, 312–318 (2000).
29. Giannattasio, C. *et al.* Effects of heart rate changes on arterial distensibility in humans. *Hypertension* **42**, 253–256 (2003).
30. Boutouyrie, P. *et al.* Sympathetic activation decreases medium-sized arterial compliance in humans. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **267**, (1994).
31. Giannattasio, C. *et al.* Relationship between arterial distensibility and coronary atherosclerosis in angina patients. *J. Hypertens.* **25**, 593–598 (2007).
32. Laurent, S. *et al.* Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur. Heart J.* **27**, 2588–2605 (2006).
33. Levisianou, D. *et al.* Arterial stiffness predicts risk for long-term recurrence in patients with type 2 diabetes admitted for acute coronary event. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **99**, 315–20 (2013).
34. Sequí-Domínguez, I. *et al.* Accuracy of Pulse Wave Velocity Predicting Cardiovascular and All-Cause Mortality. A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* **9**, 2080 (2020).
35. Wilkinson, I. B. *et al.* ARTERY Society guidelines for validation of non-invasive haemodynamic measurement devices: Part 1, arterial pulse wave velocity. *Artery Res.* **4**, 34–40 (2010).
36. Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin.*

- Chem.* **18**, 499–502 (1972).
37. Bertolini, S. *et al.* Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 408–418 (1999).
 38. Pisciotta, L. *et al.* Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **186**, 433–440 (2006).
 39. Rabacchi, C. *et al.* An apparent inconsistency in parent to offspring transmission of point mutations of LDLR gene in Familial Hypercholesterolemia. *Clin. Chim. Acta* **406**, 75–80 (2009).
 40. Leigh, S. E. A., Foster, A. H., Whittall, R. A., Hubbart, C. S. & Humphries, S. E. Update and analysis of the university college London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann. Hum. Genet.* **72**, 485–498 (2008).
 41. Hoeg, J. M., Feuerstein, I. M. & Tucker, E. E. Detection and quantitation of calcific atherosclerosis by ultrafast computed tomography in children and young adults with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 1066–1074 (1994).
 42. Smilde, T. J. *et al.* Carotid and femoral artery wall thickness and stiffness in patients at risk for cardiovascular disease, with special emphasis on hyperhomocysteinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1958–63 (1998).
 43. Mattina, A. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity is increased in patients with definite familial hypercholesterolemia compared with other forms of hypercholesterolemia. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (2018). doi:10.1016/j.numecd.2018.01.012
 44. Cernes, R., Zimlichman, R. & Shargorodsky, M. Arterial Elasticity in Cardiovascular Disease: Focus on Hypertension, Metabolic Syndrome and Diabetes. in *Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets* **45**, 65–81 (KARGER, 2008).
 45. Wang, X., Keith, J. C., Struthers, A. D. & Feuerstein, G. Z. Assessment of arterial stiffness, a translational medicine biomarker system for evaluation of vascular risk. *Cardiovasc. Ther.* **26**, 214–23 (2008).
 46. Smilde, T. J. *et al.* The effect of cholesterol lowering on carotid and femoral artery wall

- stiffness and thickness in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**, 473–80 (2000).
47. Reiner, Ž. *et al.* Pulse wave velocity as a measure of arterial stiffness in patients with familial hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis. *Archives of Medical Science* **15**, 1365–1374 (2019).
 48. Plana, N. *et al.* Heterozygous familial hypercholesterolaemic patients have increased arterial stiffness, as determined using the augmentation index. *J. Atheroscler. Thromb.* **18**, 1110–6 (2011).
 49. Martinez, L. R. C. *et al.* No correlation and low agreement of imaging and inflammatory atherosclerosis' markers in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **200**, 83–88 (2008).
 50. Tada, H. *et al.* Assessment of arterial stiffness in patients with familial hypercholesterolemia. doi:10.1016/j.jacl.2017.12.002
 51. Toikka, J. O. *et al.* Large-artery elastic properties in young men : relationships to serum lipoproteins and oxidized low-density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 436–41 (1999).
 52. Mattina, A. *et al.* Polyvascular subclinical atherosclerosis in familial hypercholesterolemia: the role of cholesterol burden and gender. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (2019). doi:10.1016/J.NUMECD.2019.06.015
 53. Arroyo, L. & Lee, R. T. Mechanisms of plaque rupture mechanical and biologic interactions. *Cardiovasc. Res.* **41**, 369–375 (1999).