



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CARDIOLOGICHE, TORACICHE E VASCOLARI

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E  
SPERIMENTALI

INDIRIZZO: SCIENZE CARDIOVASCOLARI

CICLO: XXV

***LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA NELLE  
PATOLOGIE ENDOCRINE ED INFIAMMATORIE***

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

**Supervisore :**Ch.mi Prof.ssa Annalisa Angelini

Dott. Francesco Tona

**Dottorando :** Giulia Famoso



## INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
CENNI STORICI.....	7
L'ENDOTELIO E L'OMEOSTASI VASCOLARE.....	8
DISFUNZIONE ENDOTELIALE, ATEROSCLEROSI E INFIAMMAZIONE.....	10
MALATTIE INFIAMMATORIE ATEROSCLEROSI E DISFUNZIONE MICROVASCOLARE.....	13
VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE.....	14
CARDIAC ALLOGRAFT VASCULOPATHY: VASCULOPATIA IMMUNO-MEDIATA.....	19
LO STUDIO DELLA RISERVA DI FLUSSO CORONARICO.....	31
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>33</b>
<b>DISFUNZIONE MICROVASCOLARE NELLE PATOLOGIE ENDOCRINE (Studi clinici)</b> .....	<b>35</b>
LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA INDOTTA DA IPERPARATIROIDISMO VIENE RIPRISTINATA DOPO PARAIDECTOMIA.....	36
LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE NELL'ACROMEGALIA.....	50
<b>DISFUNZIONE MICROVASCOLARE NELLE PATOLOGIE INFIAMMATORIE (Studi clinici)</b> .....	<b>65</b>
LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE NEGLI OBESI SENZAALTRI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI.....	66
LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA IN GIOVANI PAZIENTI AFFETTI DA PSORIASI SEVERA .....	83
<b>FISIOPATOLOGIA DELLA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE NEL TRAPIANTO CARDIACO</b> .....	<b>97</b>
LA RISERVA DI FLUSSO CORONARICO PRECEDE E PREDICE LA VASCULOPATIA.....	98
DEL GRAFT CARDIACO	
CORRELAZIONI ANATOMO-FUNZIONALI DELLA MALATTIA DEL MICROCIRCOLO.....	114
NEL TRAPIANTO DI CUORE	

<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>136</b>
<b>PROSPETTIVE FUTURE.....</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>132</b>

## **ABSTRACT**

It has recently been proven that endothelial dysfunction is an early step in the development of atherosclerosis and is mainly characterized by a reduction in the bioavailability of nitric oxide.

Nowadays atherosclerosis is considered as a complex inflammatory and immune-mediated process in which leukocytes and soluble factors are crucially involved in causing vessel injury.

Furthermore inflammatory and endocrine disease although demonstrated to be at increased risk for cardiovascular mortality, are poorly investigated on this point of view.

Emerging evidence indicates a significant role played by endothelium also in the onset and progression of the cardiac allograft vasculopathy (CAV), a peculiar type of coronary atherosclerosis which is considered the main limiting factor of long term outcome after heart transplantation.

CAV involves both major epicardial and intramyocardial vessels. The dysfunction of the microvascular system is a variable phenomenon over time, as in the epicardial tree.

In this thesis we aimed to investigate the coronary flow reserve (CFR) in patients without evidence for epicardial coronary disease, affected by inflammatory and endocrine disease.

Moreover we wanted to evaluate the coronary microvascular function in heart transplantation in order to better understand the CAV pathophysiology.

## **ABSTRACT**

La disfunzione endoteliale, che caratterizza la malattia aterosclerotica fin dagli esordi, è causata principalmente da una ridotta biodisponibilità di ossido nitrico.

Ai giorni d'oggi l'aterosclerosi è considerata un complesso processo infiammatorio-immunitario nel quale i leucociti, i fattori solubili e il complemento svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo e nel progredire di tale patologia.

Inoltre, oltre alle comuni patologie note per avere maggiore incidenza di aterosclerosi, quali il diabete, ve ne sono molte altre, quali quelle endocrine e infiammatorie, che sembrano avere un maggiore rischio cardiovascolare, ma poco chiari sono i meccanismi che sottendono a tale aumentato rischio.

Sempre maggiori evidenze indicano un ruolo della disfunzione endoteliale anche per quanto riguarda l'insorgenza e la progressione della vasculopatia cardiaca del graft, un tipo peculiare di aterosclerosi, a tutt'oggi considerata il maggiore fattore limitante la sopravvivenza del graft cardiaco.

La Vasculopatia cardiaca del graft coinvolge sia i vasi epicardici che il microcircolo. Come per l'albero coronarico epicardico, la disfunzione microvascolare è un fenomeno variabile nel tempo.

In questa tesi noi abbiamo voluto indagare la riserva di flusso coronarico (CFR) in pazienti senza evidenza di stenosi epicardiche, affetti da patologie infiammatorie ed endocrine.

Inoltre abbiamo voluto valutare la funzione microvascolare coronarica nel trapianto cardiaco per meglio comprendere la fisiopatologia della CAV.

# INTRODUZIONE

## CENNI STORICI

La prima descrizione del concetto di disturbo cardiovascolare risale all'età antica (II-III sec.), a Galeno, padre della fisiologia sperimentale, che per primo scoprì che le arterie contengono sangue invece di aria. Successivamente, durante il Rinascimento, importanti scoperte in campo anatomico furono fatte da Andrea Vesalio (1514-1564). Ma le più moderne conoscenze sulla circolazione e sul concetto di cuore come pompa si attribuiscono a William Harvey, medico inglese che studiò per molti anni a Padova e che nel 1628 scrisse *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*; per la prima volta Harvey, riunendo isolate scoperte dei suoi predecessori e avvalendosi del metodo sperimentale, fornisce una comprensione globale circa il sistema cardiovascolare per come lo conosciamo ai giorni d'oggi<sup>1</sup>.

Più tardi, in epoca più moderna, numerose scoperte in campo cardiovascolare sono da attribuirsi a E.H. Starling che nel 1920 descrisse le proprietà principali del muscolo cardiaco e come queste sono "protected modified and controlled" da meccanismi chimici, nervosi e meccanici che giocano un ruolo fondamentale nel fisiologico funzionamento del sistema cardiovascolare<sup>2</sup>.

L'aterosclerosi e le sue manifestazioni cliniche, quali l'angina pectoris, sono state per la prima volta riportate intorno al XVIII secolo, mentre precoci descrizioni di trattamenti farmacologici, quali l'utilizzo della nitroglicerina, risalgono al XIX secolo<sup>3</sup>.

L'aterosclerosi era conosciuta come causa di ischemia ed infarto nel cuore e in altri organi e gli eventi cardiovascolari ischemici acuti, quali infarto del miocardio o morte improvvisa, venivano frequentemente associati alla formazione di un trombo a livello arterioso; ma per molti decenni non si sono conosciuti i meccanismi fisiopatologici che sottendevano a tali eventi. Poco si conosceva, anche, circa i meccanismi che stanno alla base dell'ipertensione, sebbene si avesse consapevolezza che essa danneggia i vasi sanguigni e il microcircolo di diversi organi.

Il concetto rivoluzionario di biologia vascolare risale agli anni '70 del secolo scorso<sup>4</sup>, grazie ai primi studi effettuati sulle cellule vascolari in condizioni normali e patologiche grazie all'interesse scaturito dal framingham heart studi, uno studio epidemiologico su larga scala che comincia agli inizi del 1950 e che ha dimostrato una stretta associazione tra la coronaropatia, l'ictus, l'aterosclerosi con il diabete e l'età

Tradizionalmente le cellule muscolari lisce erano considerate come sede del controllo del tono vascolare nelle arterie di resistenza e nella circolazione periferica. Lo stesso concetto si può traslare alla regolazione della contrattilità delle arterie coronariche. In quest'ottica si credeva che uno spasmo coronarico o uno stato di aumentata contrattilità fossero in grado di provocare l'angina pectoris o di precipitare un infarto miocardico. Per lungo tempo l'endotelio è stato scarsamente conosciuto e appena menzionato come una semplice inerte barriera selettiva per la diffusione di macromolecole dal lume vasale dallo spazio interstiziale.

Questa concezione è stata rivoluzionata negli anni '80 del secolo scorso, anni in cui è stato sottolineato il ruolo delle cellule endoteliali nel rilascio di sostanze vasoattive<sup>6</sup>. Un'importante scoperta in campo di biologia vascolare ha fatto sì che Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad prendessero il Nobel nel 1998. Questi studiosi attraverso esperimenti in vitro dimostrarono come il rilascio delle arterie in risposta ad agonisti colinergici muscarinici avveniva solo in presenza di cellule endoteliali e che rimuovendo l'endotelio veniva abolita la vasodilatazione mediata quindi da sostanze derivate dall'endotelio chiamate EDRF successivamente scoperte essere rappresentata in massima parte da ossido nitrico<sup>7</sup>. Nei decenni successivi importanti studi hanno confermato in maniera decisiva come l'endotelio non sia solamente uno strato di cellule a contatto con il lume vasale, ma giochi un ruolo di regolazione nell'omeostasi del sistema cardiovascolare.

## **L'ENDOTELIO E L'OMEOSTASI VASCOLARE**

Le cellule endoteliali regolano in maniera attiva il tono vasale e agiscono in seguito a condizioni fisiologiche o patologiche, rispondendo a forze meccaniche, quali lo stress di parete e i mediatori neuro-ormonali, con il rilascio di fattori con conseguente rilascio o contrattura della parete<sup>7</sup>.

Infatti, in condizioni fisiologiche, l'azione sinergica dei fattori endoteliali consente il mantenimento del tono vascolare normale e la fluidità del sangue, limitando contemporaneamente il danno infiammatorio del vaso e la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Le cellule endoteliali producono sostanze ad azione vasodilatatoria e vasocostrittiva. Delle prime fa parte l'ossido nitrico o monossido di azoto (NO) che, prodotto dal catabolismo della L-arginina per mezzo dell'enzima NO sintasi (NOS)<sup>9</sup>, costitutivamente espresso dalle cellule endoteliali, è il più importante vasodilatatore. Viene liberato in seguito a stimoli diversi sia di tipo meccanico (shear stress di parete) che biochimico (acetilcolina, bradichinina, serotonina etc.) e, rilasciato dalla cellula endoteliale, esplica la sua azione sia sulle cellule muscolari lisce del vaso che sugli elementi corpuscolati del sangue (monociti, piastrine), sulle molecole di



adesione etc., attraverso l'attivazione della guanil-ciclastasi, cui consegue un aumento intracellulare del guanosinmonofosfato ciclico (GMP-C)<sup>10,11</sup>. In condizioni patologiche l'endotelio cambia le sue caratteristiche diventando suscettibile al danno, facilitandolo (promuovendo infiammazione e trombosi), perdendo il controllo attivo della permeabilità vascolare e la non adesività della superficie ai leucociti circolanti, (primum movens della formazione della placca aterosclerotica), ed in ultimo favorendo la vasocostrizione<sup>12</sup>. Le cellule endoteliali producono anche sostanze ad azione vasocostrittrice in presenza di patologie o di fattori di rischio cardiovascolare. Queste sono rappresentate dai prostanoidei (Trombossano A2, prostaglandine vasocostrittrici) derivate dall'azione della ciclossigenasi sull'acido arachidonico e dai radicali liberi che, oltre a provocare vasocostrizione "per sè", riducono la biodisponibilità di NO distruggendolo. Endotelina 1 e angiotensina II sono vasocostrittori e inoltre inducono crescita cellulare modificando la struttura vascolare<sup>12</sup>.

### **Il fenotipo endoteliale nell'aterosclerosi**

Il disadattamento del fenotipo endoteliale si rende manifesto nei soggetti umani già prima che compaia una franca aterosclerosi, infatti si associa sia con i tradizionali fattori di rischio, quali la ipercolesterolemia, l'ipertensione ed il diabete mellito, sia con quelli nuovi emergenti, quali la iperomocisteinemia, l'obesità, e l'infiammazione sistemica<sup>13</sup>.

Nei diversi stadi della malattia aterosclerotica vi sono prove cliniche secondo le quali la disfunzione endoteliale contribuisce alla sua progressione.

**1)** L'infusione intracoronarica di acetilcolina : a) causa costrizione coronarica nei soggetti con angina e documentata aterosclerosi coronarica e induce, invece, vasodilatazione coronarica nei soggetti con precordialgie atipiche e coronarie angiograficamente normali<sup>14</sup>; b) causa vasocostrizione di coronarie angiograficamente normali in pazienti che evidenziano i segni angiografici di aterosclerosi in altri rami coronarici; c) induce vasocostrizione coronarica in soggetti con coronarie normali o quasi all'angiografia, ma che esibiscono uno o più fattori di rischio<sup>15,16</sup>; d) provoca sia vasocostrizione che vasodilatazione (Fig. 1) in segmenti adiacenti della stessa coronaria in circa il 25% dei soggetti con grave aterosclerosi coronarica ostruttiva, angina pectoris cronica e test ergometrico positivo<sup>17</sup>.

**2)** La disfunzione endoteliale risulta essere più grave nella coronaria nella quale si evidenziano le lesioni che hanno causato l'angina instabile o l'infarto miocardico, rispetto a quella rilevata nelle altre arterie coronarie dello stesso paziente<sup>18,19</sup>.

3) Nelle condizioni che inducono ischemia come lo stress fisico o emozionale, la presenza di una disfunzione endoteliale inverte la risposta vascolare normale provocando una vasocostrizione patologica<sup>20</sup>.

4) Una dimostrazione inversa si basa sul fatto che gli interventi che mirano alla correzione dei fattori di rischio (ad esempio, terapia ipolipidica, ACE-inibitori, cessazione del fumo ed esercizio fisico) migliorano la vasodilatazione endotelio-dipendente nel circolo coronarico e periferico<sup>21,22</sup>.

### **Patogenesi della disfunzione endoteliale**

La capacità dei vasi sanguigni di reagire agli stimoli endoluminali, fisici e chimici, conferisce loro la caratteristica funzionale di autoregolazione, per cui possono modificare il tono vascolare, il calibro distrettuale e la quantità del flusso ematico regionale, in relazione con i cambiamenti dell'ambiente locale e delle richieste metaboliche. L'endotelio sente e risponde ad una miriade di stimoli esterni ed interni mediante complessi recettori di membrana e meccanismi di trasmissione del segnale, che conducono alla sintesi e alla liberazione di varie sostanze vasoattive, trombo-regolatorie e fattori di crescita.

Agendo direttamente sull'endotelio normale l'acetilcolina provoca la dilatazione del segmento arterioso corrispondente. Invece nei soggetti con precoce aterosclerosi o soltanto portatori dei fattori di rischio, prevale l'azione diretta dell'acetilcolina sui recettori muscarinici che provoca la contrazione dei muscoli lisci vasocostrittori<sup>14,16</sup>. In condizioni di riposo una grande varietà di stimoli costrittori e dilatatori locali, sistemici e metabolici, regola armonicamente il tono vascolare coronarico. Nei soggetti normali la vasodilatazione mediata dall'acetilcolina è completamente bloccata a livello delle arterie epicardiche e solo parzialmente a livello del microcircolo coronarico dalla L-N-monometilarginina, un antagonista che inibisce la sintesi dell'ossido nitrico<sup>23,24</sup>. Ma il blocco della sintesi dell'ossido nitrico anche in condizioni di base (senza cioè l'intervento dell'acetilcolina) diminuisce il diametro dei segmenti prossimali e distali dei vasi coronarici epicardici e aumenta la resistenza vascolare coronarica nel microcircolo, sia nei soggetti normali che anche, ma in misura molto minore, nei pazienti con aterosclerosi<sup>25</sup>.

### **DISFUNZIONE ENDOTELIALE, ATROSCLEROSI E INFIAMMAZIONE VASCOLARE**

La funzione endoteliale è stata largamente investigata attraverso la valutazione del tono vasomotore endotelio-dipendente. Infatti una compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente riflette una perdita della funzione endoteliale. I primi studi pubblicati confermano

una massiva importanza dell'endotelio nel controllo del tono vasomotore, e sempre più evidenze mostrano come le risposte endotelio-dipendenti siano compromesse nei modelli animali e nei pazienti con danno vascolare<sup>24</sup>. I primi studi che mettono in associazione la disfunzione endoteliale con lo sviluppo dell'aterosclerosi risalgono agli anni '80 del Novecento. Ludmer et al concludono che l'acetilcolina causa una dilatazione dose-dipendente delle arterie coronariche nei soggetti sani, mentre nei pazienti con patologia coronarica si osserva una vasocostrizione paradossa dovuta alla compromissione della vasomotilità coronarica endotelio-dipendente<sup>25</sup>. Più tardi uno studio dimostra che la ridotta risposta all'acetilcolina in pazienti con CAD o con fattori di rischio è in parte causata dalla ridotta disponibilità di ossido nitrico endotelio-dipendente<sup>26</sup>. Le anomalie della funzione endoteliale nel controllo vasomotore sono state evidenziate sia a carico dei vasi di grosso calibro che a carico del microcircolo in diverse patologie, quali lo scompenso cardiaco congestizio, l'ipertensione polmonare e sistemica. I fattori di rischio cardiovascolare, quali il diabete mellito, il fumo, la dislipidemia, l'ipertensione, sono anche conosciuti per avere effetti sulla funzione endoteliale. Gli studi successivi a queste osservazioni si sono volti a valutare se vi siano meccanismi comuni che possano portare alla compromissione della funzione endoteliale nelle diverse patologie. Inoltre era importante evidenziare come la disfunzione endoteliale sia collegata con la patogenesi dell'aterosclerosi. Gli studi che riguardano questi problemi mostrano tutti come sia proprio l'endotelio, interfaccia tra la parete vasale e la circolazione, ad essere il primo sito di trigger degli eventi cardiovascolari<sup>27</sup>.

Il modello dei cambiamenti vascolari nell'aterosclerosi e delle condizioni predisponenti la formazione della "sindrome del vaso malato" ha le seguenti caratteristiche: disfunzione endoteliale, conservato rilascio delle cellule muscolari lisce, esagerata risposta vasocostrittrice e cambiamenti strutturali / rimodellamento vascolare, inizialmente innescati da meccanismi di adattamento e di protezione ma che successivamente li portano ad essere dannosi e ad auto sostenersi<sup>28</sup>.

In condizioni patologiche l'endotelio ha una ridotta disponibilità dei fattori vasodilatatori, in particolar modo dell'NO, e un'aumentata produzione dei fattori vasocostrittori, processi che sinergicamente portano ad una vasodilatazione compromessa endotelio-dipendente. Inoltre è stato dimostrato che l'NO derivato dall'endotelio ha potenti effetti antinfiammatori e può per questo essere considerato come la più importante molecola antiaterogena endogena. La disfunzione endoteliale promuove l'infiammazione delle arterie e viceversa l'infiammazione cronica promuove un fenotipo di endotelio pro-infiammatorio<sup>29</sup>. Pertanto la disfunzione delle cellule endoteliali sembra partecipare al processo di aterosclerosi<sup>30,31</sup>.

Ormai da diversi anni si è affermata la convinzione di considerare l'aterosclerosi come una patologia cronica sistemica con focali complicazioni in differenti letti vasali. I meccanismi che rendono uno specifico sito più incline allo sviluppo degli eventi cardiovascolari non sono ancora del tutto conosciuti. Tuttavia, l'osservazione che tutte le fasi dell'aterosclerosi possano avere distanti e multiple localizzazioni simultaneamente, ma allo stesso tempo che il processo aterosclerotico possa risparmiare segmenti dello'intero letto vascolare fa ipotizzare che l'interfaccia e le interazioni tra la parete vasale e il sangue circolante siano il primo sito per lo sviluppo dei meccanismi sottostanti gli eventi cardiovascolari<sup>27</sup>. Un'altra scoperta è stata quella di capire l'importanza dei meccanismi ossidativi nella fisiologia e nelle risposte fisiopatologiche dei vasi. L'intrigante osservazione, venuta fuori da studi sul metabolismo delle lipoproteine, mostra che solo dopo l'esposizione di lipoproteine a bassa densità (LDL) alle cellule endoteliali si ha la formazione delle cellule schiumose<sup>32</sup>. Le modifiche delle LDL sembrano essere di natura ossidativa e queste LDL ossidate sembrano presentare svariate attività pro-infiammatorie, incluse la trascrizione di geni pro-aterogenici, la produzione di metalloproteasi inclusa l'inibizione dell'attività dell'NO e la promozione dell'apoptosi delle cellule muscolari lisce<sup>33</sup>.

Negli ultimi anni l'ipercolesterolemia è stata costantemente associata con la disfunzione endoteliale e ha rappresentato uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo dell'aterosclerosi. Le LDL ossidate antagonizzano la produzione dell'NO riducendo l'espressione dell'NOe<sup>34</sup>, diminuendo l'utake dell'L-arginina e aumentando i livelli di asyemtric dimetilarginina<sup>35</sup>. Sia nella circolazione coronarica che in quella periferica l'ipercolesterolemia è associata con una compromissione della biodisponibilità dell'ossido nitrico endoteliale, anche quando le coronarie sono angiograficamente normali<sup>36</sup>. Ci sono evidenze che l'abbassamento dei livelli di colesterolo anche all'interno del range di normalità possano migliorare la produzione e il rilascio di NO endoteliale e la funzione endoteliale stessa<sup>37</sup>. Inoltre l'abbassamento dei livelli di colesterolo in pazienti con CAD diminuisce l'incidenza di infarto miocardico e questo effetto protettivo potrebbe essere in parte dovuto al miglioramento della funzione endoteliale<sup>38</sup>. Recenti evidenze suggeriscono che l'esposizione cronica ad aumentati livelli di colesterolo plasmatico potrebbe compromettere la riparazione di lesioni endoteliali mediate dalle lipoproteine, probabilmente riducendo la disponibilità e la funzione dei progenitori endoteliali circolanti.

## **MALATTIE INFIAMMATORIE, ATEROSCLEROSI E DISFUNZIONE MICROVASCOLARE**

Nei pazienti con infiammazione sistemica si osserva un incremento della morbilità cardiovascolare della mortalità dovuta ad aterosclerosi accelerate e ad una precoce coronaropatia<sup>39,40</sup>.

Evidenze sperimentali sempre più solide suggeriscono che, in associazione ai fattori di rischio cardiovascolari classici, i fenomeni infiammatori ricoprono una posizione di rilievo nella dinamica del processo aterosclerotico in tutte le varie fasi e delle sindromi coronariche acute.. Alla base di tale processo ci sono delle complesse interazioni tra macrofagi, linfociti T e cellule muscolari lisce (CML), mediate da numerose citochine.

L'eccesso di rischio per patologia cardiovascolare osservato in questi pazienti appare essere dovuto principalmente agli effetti dell'infiammazione sistemica a livello dei vasi<sup>41</sup>, portando a ritenere l'infiammazione come un vero e proprio fattore di rischio cardiovascolare<sup>42</sup>. Inoltre, da molti anni, è stato evidenziato da studi sperimentali<sup>43</sup> e clinici<sup>44</sup> un complesso ruolo dell'infiammazione nella patogenesi dell'aterosclerosi, considerata ormai come un complesso processo infiammatorio e immuno-mediato in cui i leucociti e fattori quali anticorpi, citochine e complemento giocano un ruolo nell'accelerare questa patologia.

Studi sulla cardiopatia ischemica hanno mostrato come in questi pazienti siano rilevabili segni sistemici di reazione infiammatoria: la presenza di cellule infiammatorie circolanti in uno stato attivato (neutrofili, monociti e linfociti) e il riscontro di elevati livelli ematici di citochine pro-infiammatorie, tra cui interleuchina (IL)-1 e 6, e di proteine di fase acuta, in particolare la proteina C-reattiva (PCR). Quest'ultima si è rivelata come un importante predittore indipendente di eventi cardiaci avversi e morte, sia in pazienti con SCA sia in pazienti con cardiopatia ischemica in fase di stabilità e in soggetti apparentemente sani.

Il termine disfunzione microvascolare coronarica è stato introdotto per descrivere le anomalie nella regolazione del flusso sanguigno miocardico, quando esse non venivano spiegate da un danno ai vasi coronarici epicardici<sup>46</sup>. Pertanto la valutazione della funzione microvascolare, vista la sua almeno in parte reversibilità, appare interessante per guidare il timing di intervento allo scopo di ridurre il peso dei fattori di rischio e la progressione in aterosclerosi epicardica.

Uno studio di Recio-Mayeral et al ha analizzato quali siano gli effetti dell'infiammazione sistemica in pazienti affetti da artrite reumatoide e lupus eritematoso, due patologie con nota

infiammazione sistemica, che non presentavano evidenze angiografiche di coronaropatia. Gli autori mostrano come l'infiammazione cronica, in assenza di stenosi epicardiche e dei tradizionali fattori di rischio, sia associata con una disfunzione microvascolare, valutata tramite lo studio della riserva coronarica con la tomografia ad emissione di positroni (PET), e che questa disfunzione possa rappresentare un marker precoce di danno cardiovascolare, precedendo e contribuendo ad accelerare l'aterosclerosi in pazienti con artrite reumatoide e lupus sistemico<sup>47</sup>.

L'aumentata incidenza di malattie coronariche e l'aumentata mortalità cardiovascolare nei pazienti con malattie reumatiche autoimmuni non possono essere spiegate solo dai tradizionali fattori di rischio per l'aterosclerosi. Questo aumentato rischio, legato all'aterosclerosi precoce, è strettamente correlato al processo infiammatorio cronico e alla disregolazione autoimmune. La risposta infiammatoria cronica può promuovere lo sviluppo dell'aterosclerosi accelerata. Le citochine pro-infiammatorie, in particolare il Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF- $\alpha$ ), sono responsabili di alterazioni pro-aterogene che comprendono la disfunzione endoteliale, l'insulino-resistenza, una dislipidemia caratteristica e un effetto pro-trombotico. L'endotelio vascolare gioca un ruolo importante nel tono vascolare, nell'attività piastrinica e nei processi trombotici. In condizioni fisiologiche, l'endotelio rende possibile il mantenimento di un equilibrio antitrombotico e anticoagulante. Dopo lo stimolo infiammatorio, così come per effetto dei fattori di rischio cardiovascolare, l'endotelio perde queste proprietà, passando a uno stato pro-trombotico e pro-infiammatorio. Le cellule endoteliali esprimono così sulla loro superficie citochine, come interleuchina-1 (IL-1), chemochine, molecole di adesione, fattori di crescita cellulare, inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) e fattore di Von Willebrand, tutte modificazioni caratteristiche dell'inizio e dello sviluppo della placca aterosclerotica.

## **VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE**

Visto il ruolo centrale che l'endotelio gioca nella patogenesi del danno cardiovascolare nasce l'esigenza di un riproducibile, accurato e semplice test per valutare la funzione endoteliale. La funzione endoteliale potrebbe essere studiata sia a livello del circolo coronarico sia a quello dell'avambraccio, utilizzando l'infusione intrarteriosa di sostanze ad azione vasodilatatrice, quali l'acetilcolina, a dosi che non determinano effetti sistemici. Questi test sono basati sul concetto che alcuni stimoli funzionano da trigger per il rilascio di NO da parte dell'endotelio con conseguente dilatazione.

## **Distretto coronarico**

Il test per valutare la vasomotricità dell'endotelio coronarico può essere effettuato in sala di emodinamica durante angiografia, valutando il diametro coronarico prima e dopo la somministrazione di sostanze vasoattive, quali ad esempio l'acetilcolina che, come prima descritto, provoca una dilatazione dose-dipendente nelle arterie coronariche dei soggetti sani e una vasocostrizione paradossa nei soggetti con coronaropatia dovuta ad una compromissione della vasomotricità endoteliale<sup>25</sup>. La valutazione angiografica è ancora considerata il gold standard per la valutazione della funzione endoteliale, pur essendo una metodica costosa ed invasiva. Sfortunatamente anche l'IVUS recentemente introdotto, che consente non solo la valutazione della funzione endoteliale ma anche misure dei bordi dell'ateroma e del lume vasale, mostra le stesse limitazioni descritte per l'angiografia.

## **Distretto periferico**

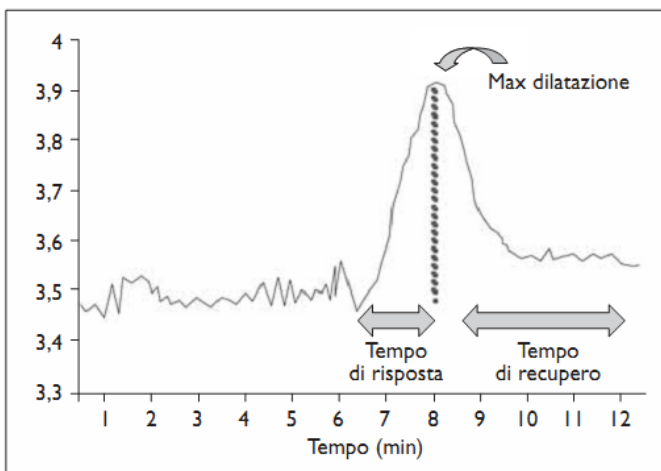
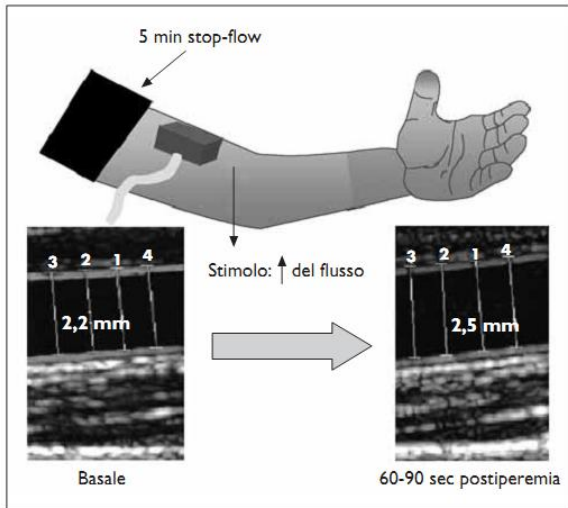
La pletismografia ad occlusione venosa permette una valutazione della funzione endoteliale grazie alla misurazione della capacità vasodilatatrice dei vasi dell'avambraccio durante arresto del flusso venoso con cuffia pneumatica, si possono anche infondere sostanze direttamente a livello del braccio. Quando si somministrano sostanze, tipicamente l'ach, a concentrazioni elevate nel distretto vascolare esplorato, ma trascurabili a livello sistemico, la pressione di perfusione del distretto vascolare dell'avambraccio non si modifica e pertanto gli eventuali incrementi di flusso sono indice di vasodilatazione locale. Viene così misurata la reattività vascolare endotelio-dipendente, che rappresenta una risposta esclusivamente locale all'infusione di sostanze agoniste e necessita di un endotelio integro per realizzarsi la presenza di un'alterata risposta all'infusione di Ach (alterazione della reattività vascolare endotelio-dipendente); in corso di esame pletismografico la reattività vascolare è risultata significativamente correlata alla comparsa di eventi cardiovascolari in pazienti con cardiopatia ischemica documentata alla coronarografia, ma è stata dimostrata anche negli ipercolesterolemici<sup>48</sup>, nei diabetici e in altri soggetti con elevato rischio cardiovascolare<sup>49,50</sup> o con deficit ormonali. In questi stessi gruppi di soggetti, la vasodilatazione indotta dalla somministrazione di dosi crescenti di nitroprussiato, un donatore di NO che stimola direttamente le fibrocellule muscolari, è conservata. Le alterazioni del tono vascolare riscontrate, pertanto, sono dovute esclusivamente alla disfunzione endoteliale, e quest'ultima è reversibile, come dimostrato dalla normalizzazione delle risposte pletismografiche provocata dall'uso di sostanze antiossidanti<sup>50,51</sup> o dalla terapia ormonale

sostitutiva. Tuttavia, la pletismografia è esame invasivo, difficilmente ripetibile nello stesso paziente ed eseguibile esclusivamente in ambiente protetto.

Nel 1992 sono comparsi i primi lavori in cui la reattività vascolare veniva studiata con metodica ultrasonografica, misurando la capacità dell'arteria brachiale di dilatarsi in risposta a un aumento del flusso ematico e più precisamente dello "shear stress" (flow-mediated dilation, FMD). Il mediatore principale della FMD è l'ossido nitrico (NO), che viene generato dall'attivazione dell'eNOS, presente nell'endotelio: anche la FMD, pertanto, può realizzarsi soltanto in presenza di endotelio integro. Dal punto di vista metodologico la tecnica prevede l'utilizzo di un ecografo con sonda lineare da 7,5-10 MHz. La FMD viene calcolata come differenza percentuale tra il massimo diametro post-ischemico raggiunto e il diametro medio basale:  $FMD = [(diámetro\ post-iperemia - diámetro\ basale) / diámetro\ basale]$  Sono considerati normali valori di FMD maggiori del 10% (Figure 1 e 2). Questa metodica, che ha il vantaggio di essere meno invasiva rispetto alla valutazione della funzione endoteliale nel circolo coronarico e alla pletismografia "strain-gauge", (Tabella 1) mostra però una certa variabilità intra- e interoperatore<sup>52</sup>.

Alcuni, ma non tutti gli studi, hanno mostrato un valore predittivo della FMD e della funzione endoteliale coronarica nel determinare la presenza e l'estensione della CAD<sup>53,54</sup>. Inoltre un recente studio ha evidenziato una correlazione tra i risultati ottenuti con la FMD e quelli ottenuti con la SPECT<sup>55</sup>.





**Figura 1:** Flow Mediated Dilatation

**Figura 2:** Curva velocimetrica Doppler correlata alla velocità di flusso ematico

**Tabella 1.** Confronto tra le tre diverse metodiche di studio della funzione endoteliale

	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b>Coronarografia con infusione di agonisti</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• quantificazione diretta della funzione endoteliale</li> <li>• valutazione delle risposte fisiologiche dell'endotelio</li> <li>• correlazione dose-risposta dopo infusione di agonisti e antagonisti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• invasività</li> <li>• costi</li> <li>• rischi connessi al cateterismo (ictus, infarto miocardico, ecc.)</li> </ul>
<b>Pletismografia "strain gauge"</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• accessibilità più facile rispetto alla coronarografia</li> <li>• valutazione delle risposte fisiologiche dell'endotelio</li> <li>• correlazione dose-risposta dopo infusione di agonisti e antagonisti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• invasività</li> <li>• lesione del nervo mediano, infezione, comparsa di ematomi, ecc.</li> </ul>
<b>Flow-mediated dilation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• non invasiva, più veloce e sicura delle altre metodiche</li> <li>• correlata con la disfunzione endoteliale nel circolo coronarico</li> <li>• le variazioni di flusso rappresentano uno stimolo alla vasodilatazione molto più fisiologico dell'infusione di agonisti, come l'Ach</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bassa risoluzione relativa al diametro dell'arteria brachiale</li> <li>• variabilità nelle misurazioni</li> <li>• operatore-dipendente</li> </ul>

## **Significato clinico della disfunzione endoteliale**

Nell'aterosclerosi sono presenti alterazioni vasali, sia strutturali sia funzionali: le prime comprendono ipertrofia della media, aumento di spessore dell'intima e deposito di esteri del colesterolo. Tali alterazioni strutturali determinano un ostacolo alla diffusione delle sostanze gassose, come l'NO, nel raggiungere la media e determinarne il rilascio. Si realizzano pertanto le alterazioni funzionali, determinate innanzitutto dalla riduzione della produzione, rilascio, attività ed emivita dell'ossido nitrico. La disfunzione endoteliale è precoce e sistemica, e l'alterazione della vasodilatazione mediata dall'NO è stata dimostrata sia nei pazienti con lesioni aterosclerotiche documentate sia nei soggetti con fattori di rischio cardiovascolari<sup>47,49</sup>. I pazienti con malattia coronarica, in particolare, hanno una ridotta vasodilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale ed è stata dimostrata una buona correlazione tra alterazioni della reattività vascolare nell'arteria brachiale e nel circolo coronarico<sup>56</sup>. Lo studio della FMD ha dato inoltre risultati concordanti con la miocardioscintigrafia perfusionale nel selezionare pazienti con cardiopatia ischemica in una popolazione di soggetti a basso rischio<sup>57</sup>. Data l'innocuità, la relativa semplicità e la documentata correlazione con la malattia coronarica, ci si è chiesto se lo studio della FMD possa essere considerato, al pari dello spessore intima-media carotideo, un marker surrogato di aterosclerosi. Un marker surrogato di aterosclerosi deve poter essere usato nell'identificazione precoce dei pazienti a rischio, deve essere correlato all'estensione della malattia aterosclerotica e deve mostrare una relazione causale con l'end point clinico considerato. Negli studi controllati, infine, i benefici clinici raggiunti dovrebbero essere deducibili dalle modifiche ottenute sul marker surrogato<sup>58</sup>. Per quanto riguarda l'identificazione precoce nei soggetti a rischio, è stato dimostrato che le alterazioni della FMD hanno un valore predittivo paragonabile a quello dell'aumento dello spessore parietale carotideo<sup>59</sup>, cui sono correlate anche nei giovani<sup>60</sup>. Nei diabetici, le alterazioni della FMD possono precedere la comparsa dell'aumento dell'IMT<sup>61</sup> e nei soggetti con cardiopatia ischemica documentata sono correlate all'estensione e alla gravità della malattia coronarica<sup>56</sup>. La metanalisi di Witte, che ha confrontato il valore predittivo di FMD e IMT, ha dimostrato che le alterazioni della FMD hanno il massimo valore predittivo nel gruppo di pazienti a basso rischio di eventi<sup>62</sup>. Modena et al., infine, hanno dimostrato che, in una popolazione di donne ipertese in post-menopausa con alterazioni della reattività vascolare, il gruppo in cui il raggiungimento dell'obiettivo terapeutico (normalizzazione dei valori pressori) si associava a un miglioramento della reattività vascolare (normalizzazione della FMD) mostrava una minore incidenza di eventi cardiovascolari al follow-

up<sup>63</sup>. La FMD potrebbe essere pertanto considerata un marker surrogato di aterosclerosi, con il massimo valore predittivo nei soggetti a basso rischio di eventi.

## **CAV: VASCULOPATIA IMMUNO-MEDIATA**

### **La vasculopatia coronarica nel cuore trapiantato (CAV)**

Nonostante un soddisfacente controllo del rigetto acuto del graft, l'insorgenza della CAV continua a limitare il successo a lungo termine del trapianto cardiaco; essa costituisce, infatti, la principale causa di morte dopo il primo anno post-trapianto. Secondo il registro dell'ISHLT, la prevalenza di CAV angiograficamente rilevabile nella popolazione di cardiotrapiantati è del 20% a 3 anni dal trapianto e raggiunge poi il 30% a 5 anni e il 45% a 8 anni (8) % con IVUS .

La CAV si manifesta in questi pazienti come una forma atipica e accelerata di aterosclerosi, che interessa non solo le arterie epicardiche, ma anche le vene e il microcircolo, con conseguente restringimento diffuso dell'albero vascolare del graft, compreso il segmento aortico del donatore, ma con risparmio degli altri distretti vascolari. L'eziologia di questo peculiare processo aterosclerotico è molto complessa; sembrano essere coinvolti meccanismi di tipo immunologico, che agiscono poi sinergicamente con svariati fattori non immunologici nel determinare l'insorgenza e la progressione della CAV. Il paziente che sviluppa questa coronaropatia è suscettibile di eventi cardiovascolari maggiori improvvisi (major adverse cardiac events, MACE) quali l'infarto miocardico acuto, lo scompenso cardiaco congestizio e la morte improvvisa; il rischio di MACE è aumentato nei pazienti in cui si osserva un inspessimento intimale nel primo anno post-trapianto<sup>64</sup>. Le tecniche di rivascularizzazione tradizionali ed endovascolari costituiscono unicamente un trattamento palliativo nel caso della CAV, poiché non migliorano la sopravvivenza a lungo termine; l'unica terapia valida è attualmente il re-trapianto. È importante ricordare come questo fenomeno non interessi esclusivamente il trapianto di cuore, ma sia stato riscontrato anche nel trapianto di polmone, di fegato e di rene; sia la presentazione istopatologica (con un infiltrato linfomonocitario subendoteliale che causa una proliferazione intimale di cellule infiammatorie, muscolari lisce e fibroblasti) che le implicazioni cliniche (progressiva occlusione del lume dei vasi del graft con lesioni ischemiche che portano al progressivo deterioramento della funzione dell'organo trapiantato) sono sovrapponibili a quelle della CAV<sup>65</sup>.

In questa forma peculiare di aterosclerosi, che colpisce i vasi di organi solidi trapiantati<sup>65</sup>, si riscontra, quindi, un infiltrato linfomonocitario sub-endoteliale, che causa una proliferazione intimale di cellule infiammatorie, muscolari lisce e fibroblasti. Questo processo conduce ad una

progressiva occlusione del lume dei vasi del graft, con lesioni ischemiche che portano al progressivo deterioramento della funzione dell'organo trapiantato.

### **Presentazione istopatologia**

La vasculopatia coronarica del cuore trapiantato è un'atipica forma di aterosclerosi che interessa esclusivamente i vasi del graft e si caratterizza per un inspessimento diffuso e concentrico della tonaca intima, che può portare progressivamente all'obliterazione dei vasi coinvolti. Questo processo si differenzia dalla normale patologia aterosclerotica a carico delle coronarie per numerose caratteristiche e presenta inoltre alcuni elementi in comune con l'arterite (infiltrato linfomonocitario in risposta a stimoli infiammatori o allo- immuni, che risparmia la lamina elastica interna e la tonaca media)<sup>66</sup>.

Per quanto riguarda la tipologia di vasi coinvolti, la CAV si manifesta a livello dell'intero albero coronarico, interessando sia le arterie epicardiche che i vasi intramurali; può presentarsi anche a livello delle vene coronariche, mentre vengono risparmiati i vasi privi di muscolatura liscia<sup>67</sup>. Le lesioni si riscontrano sull'intera lunghezza dei vasi coinvolti ed è stato evidenziato, grazie ad una serie di studi su riscontri autoptici, come la gravità delle stesse è comparabile tra le porzioni prossimali e distali delle arterie epicardiche, sia per quanto riguarda la percentuale di superficie interessata che per l'entità dell'inspessimento intimale. Nonostante angiograficamente si possa rilevare un progressivo assottigliamento del lume nelle porzioni distali o l'obliterazione dei rami secondari, questo è dovuto ad un fisiologico minor calibro originario di questi vasi, che necessitano quindi di un minor inspessimento intimale per tendere all'obliterazione, mentre la CAV è un processo uniforme prossimalmente e distalmente<sup>68</sup>. L'aterosclerosi, invece, si caratterizza per lesioni focali ed eccentriche che interessano quasi esclusivamente la porzione prossimale delle arterie epicardiche, con risparmio del circolo intramiocardico e delle vene coronariche. Anche i tempi di comparsa di questi due processi differiscono in maniera significativa; le lesioni aterosclerotiche a livello del cuore nativo si sviluppano lentamente a partire dalla pubertà e nella maggior parte dei casi si manifestano clinicamente solo dopo alcuni decenni. Nella CAV, invece, i primi cambiamenti a carico dell'intima avvengono già nelle prime settimane dopo il trapianto; queste lesioni iniziali si caratterizzano per un lieve inspessimento diffuso e concentrico dell'intima, dato dalla presenza di un infiltrato infiammatorio subendoteliale di linfociti e macrofagi, dalla proliferazione di cellule muscolari lisce vascolari (vascular smooth muscle cells, VSMCs) migrate nell'intima e dalla presenza di lieve fibrosi e aumento delle proteine della matrice extracellulare. Col progredire dei mesi si ha la comparsa di lesioni intermedie, sviluppatasi in seguito all'accumulo

nell'intima di foam cells (macrofagi schiumosi) e lipidi e all'accelerata proliferazione intimale di VSMCs modificate e fibroblasto, e di placche ateromatose, con un core lipidico ben formato costituito da colesterolo e da residui lipidici. A lungo termine queste lesioni intimali fibrose e fibrolipidiche portano ad un quadro di inspessimento intimale fibroso concentrico e diffuso e ad eventuali placche fibrose e fibroadipose (tardivamente sono più franche placche aterosclerotiche miste a un inspessimento intimale diffuso). La presentazione istopatologica di queste placche è sovrapponibile a quella riscontrata nella vasculopatia coronarica, ma l'incidenza di complicazioni, quali ulcerazioni della placca e formazione di trombi, è molto rara, così come i fenomeni di calcificazione. Un'altra differenza rispetto alla normale aterosclerosi, che interessa tutti gli strati della parete vascolare con distruzione della lamina elastica interna, è il fatto che la CAV sia un processo patologico che coinvolge principalmente la tonaca intima dei vasi; la lamina elastica interna rimane, infatti, relativamente intatta, mentre la tonaca media e l'avventizia, non interessate dall'aggressiva proliferazione intimale, sono progressivamente sostituita da tessuto fibroso. L'entità di questo processo fibrotico aumenta all'aumentare della severità del processo patologico a carico dell'intima. Un altro elemento caratteristico della CAV, che invece non si ritrova nell'aterosclerosi, è la presenza di un importante infiltrato infiammatorio monocito-macrofagico e T linfocitario sub-endoteliale, che contribuisce alla proliferazione neointimale<sup>69</sup>. Il ritrovamento occasionale di lesioni focali con deposizione di lipidi a livello dell'albero vascolare del graft deve far pensare, nel caso non si tratti di uno stadio molto avanzato di vasculopatia post-trapianto, ad una vasculopatia coronarica nativa non diagnosticata, già presente nel donatore al momento dell'espianto<sup>70</sup>.(Figura 2)



**Figura 2: La CAV (*anatomia patologica, Padova*)**

#### Patogenesi, fattori di rischio e storia naturale della CAV

Alla patogenesi della CAV, ancora non del tutto chiarita, si pensa contribuiscano sia fattori immunologici che non immunologici<sup>71</sup>; sembra che i primi giochino un ruolo fondamentale nell'insorgenza della patologia, mentre i secondi favoriscano la sua progressione e diffusione lungo l'albero vascolare<sup>72</sup>. Per quanto riguarda i fattori di rischio immunologici, assumono un'importanza rilevante il grado di incompatibilità HLA tra donatore e ricevente e il numero e la durata degli episodi di rigetto acuto. In particolare, uno studio pubblicato nel 2004 identificava un elevato Rejection Score (RS) per rigetti di grado severo (grado  $\geq 3A$ ) come fattore predittivo indipendente per l'insorgenza di CAV<sup>72</sup>. Questo stesso studio osservava come un'elevata dose cumulativa di ciclosporina A nei primi tre mesi correlasse con un aumentato rischio di insorgenza di CAV. L'interpretazione che veniva fornita per questo risultato era duplice. Innanzitutto, dal momento che i pazienti cui venivano somministrati dosaggi più elevati di ciclosporina A avevano un RS maggiore, l'associazione del dosaggio di questo farmaco con l'insorgenza di CAV potrebbe spiegarsi con il fatto che un aumentato dosaggio di farmaci immunosoppressivi veniva somministrato ai pazienti che presentavano una maggior frequenza di episodi di rigetto. In secondo

luogo, la richiesta di dosaggi terapeutici superiori allo standard poteva identificare i soggetti con scarso assorbimento e quindi più a rischio per rigetto acuto.

I fattori di rischio non immunologici includono la modalità di morte del donatore, il danno da ischemia e riperfusione, l'infezione da Citomegalovirus, l'età, il sesso e il peso elevato del donatore e del ricevente, oltre ai fattori di rischio comuni anche all'aterosclerosi, quali l'iperlipidemia, l'iperomocisteinemia, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito e il fumo di sigaretta<sup>73</sup>. Tutti questi fattori di rischio causano o contribuiscono al mantenimento e alla perpetuazione di una disfunzione endoteliale coronarica, che costituisce il *primum movens* ed è fondamentale nella patogenesi della CAV<sup>74,75</sup>.

Questo processo patologico a carico del graft comincia ancora prima dell'espianto, poiché è stato dimostrato come una morte cerebrale improvvisa provochi un aumento dei livelli circolanti di catecolamine, citochine infiammatorie, chemochine e molecole di adesione a livello dei vasi dell'organo da trapiantare; questa cascata di eventi provoca una risposta infiammatoria nel cuore, con conseguente danno vascolare<sup>76</sup>.

Nella fase perioperatoria il danno da ischemia e riperfusione gioca un ruolo importante nello sviluppo di una disfunzione endoteliale. L'entità del danno provocato dipende non solo dal tempo di ischemia, dalla qualità di conservazione dell'organo durante il trasporto, dallo stato emodinamico del donatore e dall'eventuale necessità di supporto inotropo con catecolamine, ma anche, paradossalmente, dalla stessa riperfusione<sup>69</sup>. Nelle fasi iniziali di questo processo si formano infatti dei radicali liberi dell'ossigeno che compromettono la capacità dell'endotelio di rilasciare ossido nitrico, andando ad alterare il tono vascolare coronarico. Gli stessi radicali liberi vanno inoltre ad attivare i leucociti e i macrofagi dell'ospite i quali, a loro volta, danno origine ad un circolo vizioso, tramite la produzione di ulteriori radicali liberi, di citochine proinfiammatorie e di chemochine. Il danno da ischemia e riperfusione provoca, inoltre, attivazione delle cellule endoteliali, con un aumento dell'espressione di molecole di adesione, stimola l'adesione piastrinica, l'attivazione del complemento e la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari. L'insieme di tutti questi processi porta alla disfunzione endoteliale conseguente al danno da ischemia e riperfusione<sup>71</sup>.

Il principale determinante nella patogenesi della CAV sembra essere, però, la risposta immunitaria del ricevente nei confronti dell'organo trapiantato, e in particolare dell'endotelio del graft. Queste cellule endoteliali rivestono, quindi, un ruolo chiave nello sviluppo di quest'atipica vasculopatia coronarica, in quanto fungono sia da cellule presentanti l'antigene (APCs), sia da bersaglio per la risposta immunitaria che esse stesse hanno contribuito ad innescare. Numerosi studi hanno infatti

dimostrato il ruolo centrale dell'attivazione dei linfociti T in seguito al riconoscimento di alloantigeni espressi dalle cellule endoteliali del graft. Le cellule T così attivate rilasciano diverse citochine, tra cui IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , che, oltre a stimolare la proliferazione del clone di cellule T alloreattive, stimolano l'espressione di ulteriori citochine e molecole di adesione (VCAM-1, ELAM-1). Grazie all'azione chemotattica delle citochine e alle molecole di adesione, segue il reclutamento e l'accumulo di macrofagi e linfociti attivati a livello della parete vascolare. Queste cellule secernono vari fattori di crescita, quali il Platelet derived Growth Factor (PDGF), l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), il Fibroblast Growth Factor (FGF), l'Epidermal Growth Factor (EGF) e il Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), che provocano una migrazione intima e una proliferazione incontrollata delle cellule muscolari lisce vascolari modificate, associata ad un'aumentata produzione di matrice extracellulare. Si assiste, quindi, ad un processo di rimodellamento strutturale dei vasi del circolo coronarico del graft. Questo processo si accompagna anche ad alterazioni funzionali, mediate sempre dall'azione di citochine e fattori di crescita che, aumentando la produzione di Endotelina-1 e riducendo quella di ossido nitrico (NO), provocano un'alterazione del tono vascolare in senso vasocostrittivo. Un endotelio normale è in grado di regolare molte funzioni importanti, come il tono vascolare, la coagulazione e i processi infiammatori e immunologici. Mentre la risposta immunitaria del ricevente nei confronti del graft, in sinergia con gli altri fattori di rischio sopra citati, determina la presenza di un danno endoteliale cronico e la comparsa di una disfunzione endoteliale, con perdita delle funzioni protettive dell'endotelio e predisposizione dello stesso alla flogosi. Il processo patologico che porta all'insorgenza della CAV è quindi innescato da vari fattori, come ad esempio il danno da ischemia e riperfusione o l'attivazione delle risposte immuni, che provocano una disfunzione endoteliale. I restanti fattori di rischio contribuiscono poi alla progressione della CAV e contribuiscono a determinarne la diffusione e la severità<sup>66,73</sup>.

### **Prognosi e trattamento**

La storia naturale di questa patologia consiste in un progressivo e inesorabile deterioramento della funzionalità del cuore trapiantato, a causa di una graduale obliterazione del circolo coronarico, sia a livello dei vasi epicardici che del microcircolo. La CAV rappresenta infatti la principale causa di morte post-trapianto, con un tasso di mortalità riportato dal registro dell'ISHLT del 30% a 5 anni dall'intervento<sup>77</sup>. Le opzioni terapeutiche ad oggi disponibili per la vasculopatia del trapiantato sembrano essere efficaci nel rallentarne la progressione, ma l'unico trattamento definitivo appare essere il re-trapianto cardiaco. Quest'opzione solleva però un problema etico, dato l'esiguo ed insufficiente numero di organi a disposizione. La prognosi dei pazienti che si sottopongono ad un



secondo trapianto è infatti peggiore rispetto a quella dei pazienti trapiantati per la prima volta, con un tasso di sopravvivenza ad un anno rispettivamente del 55% e dell'80%.

### **Terapia medica**

Diversi studi clinici hanno dimostrato l'efficacia della terapia ipolipemizzante con statine nel ridurre l'incidenza di rigetto severo, nel determinare un aumento della sopravvivenza e una riduzione della progressione della vasculopatia coronarica del graft<sup>78</sup>.

In uno studio del 1995, Kobashigawa e collaboratori hanno analizzato il ruolo della pravastatina nella prevenzione primaria della CAV<sup>79</sup>. Ad un anno dal trapianto il gruppo trattato con questa statina presentava, oltre ad un livello di colesterolemia inferiore a quello del gruppo di controllo, anche una minore incidenza di rigetto con compromissione emodinamica, una migliore sopravvivenza e una minor incidenza di CAV documentata all'angiografia e all'autopsia.

Un altro studio condotto da Wenke e collaboratori sull'utilizzo della simvastatina ha fornito risultati simili<sup>96</sup>; a 8 anni dal trapianto i pazienti in trattamento con simvastatina presentavano un aumentato tasso di sopravvivenza rispetto al gruppo di controllo (88,6% contro 59,9%) e una minor incidenza di vasculopatia coronarica angiograficamente rilevabile (24,4% contro 54,7%). È stato dimostrato, inoltre, come la terapia con simvastatina si associ a ridotti livelli di interleuchina 6 (IL-6) e TNF- $\alpha$ , ad una migliore funzionalità dell'endotelio coronarico e ad una minor vasocostrizione dei vasi epicardici<sup>80</sup>. I risultati di questo studio suggeriscono che l'inibizione dell'attività infiammatoria a livello del graft e l'attenuazione della disfunzione endoteliale rivestano un ruolo importante nell'azione di prevenzione primaria delle statine nei confronti della CAV. L'azione vasoprotettiva di questi farmaci è infatti probabilmente mediata non solo dall'azione sui livelli di colesterolo, ma anche da effetti immunomodulatori.

Tra i farmaci vasodilatatori, i calcio-antagonisti sembrano rallentare la progressione di CAV<sup>81</sup> ed aumentare la vasodilatazione coronarica<sup>82</sup>; inoltre il Diltiazem, grazie all'effetto inibitorio sul citocromo P450 3A4 (CYP450), aumenta la concentrazione ematica di ciclosporina, diminuendone così la dose richiesta.

Gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-I) migliorano la disfunzione endoteliale a livello del microcircolo, riducono lo stress ossidativo e si associano ad un regressione della placca aterosclerotica e ad un'aumentata sopravvivenza del graft<sup>83</sup>.

È stata inoltre descritta un'azione sinergica protettiva di Ca-antagonisti e ACE-inibitori nei confronti dello sviluppo di CAV, indipendentemente dal loro effetto antipertensivo<sup>84</sup>. Sono tuttavia necessari studi prospettici su più larga scala per confermare l'impatto di questi farmaci vasodilatatori sulla sopravvivenza a lungo termine nei pazienti cardiopiantati.

### **Terapia chirurgica e percutanea**

Numerose tecniche di rivascolarizzazione sono state studiate per valutarne l'efficacia e l'utilità nel trattamento della CAV.

Il bypass aorto-coronarico ha un limitato valore terapeutico in questi pazienti poiché la vasculopatia del graft interessa il circolo coronarico in modo diffuso, con frequente coinvolgimento dei piccoli vasi. Questa procedura chirurgica è inoltre gravata da un'elevata mortalità perioperatoria (fino al 40%) e da un limitato successo a medio-lungo termine<sup>85</sup>.

L'angioplastica percutanea (Percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) rappresenta un trattamento palliativo per quei pazienti che presentano stenosi focali dei vasi più prossimali e quindi aggredibili con questa metodica; l'incidenza di restenosi è però molto alta, con un indice di restenosi che in alcuni studi raggiunge il 60% a sei mesi dall'intervento<sup>86</sup>. Il posizionamento di stent riduce l'insorgenza di questa complicazione a breve e medio termine, ma a lungo termine la prevalenza di restenosi (fino al 70%), l'incidenza di nuove lesioni coronariche e la necessità di ulteriori interventi di rivascolarizzazione sono simili, indipendentemente dal posizionamento di uno stent durante la procedura. Uno studio ha recentemente dimostrato come l'utilizzo di stent medicati (Drug-Eluting Stents, DES), seppur associato ad un successo procedurale del 100%, sia comunque gravato da una percentuale<sup>87</sup> di restenosi a 6-12 mesi del 35-40%; questi risultati confermano la parziale inutilità degli interventi di rivascolarizzazione percutanea.

Alcuni studi hanno valutato l'efficacia della rivascolarizzazione laser transmiocardica, che sembrerebbe in grado di migliorare la sintomatologia e la perfusione miocardica in gruppi selezionati di pazienti<sup>88</sup>; i risultati a lungo termine però devono ancora essere validati.

### **Prevenzione**

La prevenzione della CAV viene effettuata non solo tramite la profilassi con le terapie farmacologiche precedentemente descritte (statine, calcio-antagonisti, ACE inibitori), ma anche mediante il controllo dei fattori di rischio, immunologici e non, che predispongono all'insorgenza di

CAV e ad una sua più rapida progressione. Va inoltre ricordata l'importanza di una corretta alimentazione, di una moderata ma regolare attività fisica e dell'astinenza assoluta dal fumo.

### **Presentazione clinica e diagnosi strumentale nella vasculopatia del trapiantato (CAV)**

A causa della denervazione del cuore al momento del trapianto, la maggior parte dei pazienti cardiotrapiantati affetti da CAV non lamenta il sintomo dell'angina, che rappresenta invece un importante campanello d'allarme nei pazienti affetti da una normale coronaropatia; solo nel 10-30% dei trapianti si assiste ad un processo di reinnervazione del graft<sup>89</sup>. Una diagnosi precoce della CAV è resa difficile non solo dalla mancanza di sintomi clinici dell'ischemia miocardica, ma anche dall'insensibilità della coronarografia (attuale metodo diagnostico standard) nel riconoscimento degli stadi iniziali della patologia, dal coinvolgimento del microcircolo e dal fatto che le alterazioni funzionali spesso precedano le tipiche modificazioni morfologiche. Spesso la vasculopatia coronarica viene quindi diagnosticata a stadi più avanzati, quando la sintomatologia è dettata da un'importante disfunzione del graft causata da multipli microinfarti. I pazienti sintomatici si presentano quindi con un quadro di scompenso cardiaco congestizio, con sintomi sovrapponibili a quelli che accusavano prima del trapianto, come intolleranza allo sforzo, ortopnea e dispnea da sforzo e a riposo; le altre presentazioni cliniche più frequenti sono l'infarto miocardico silente, le aritmie o la morte improvvisa<sup>101</sup>.

### **Tecniche diagnostiche invasive**

L'angiografia coronarica costituisce attualmente il gold standard per la diagnosi di CAV; grazie al costo contenuto e alla facile accessibilità, nella maggior parte dei centri la routine prevede che i pazienti cardiotrapiantati si sottopongano ogni anno a questo esame per il monitoraggio dell'insorgenza e della progressione della vasculopatia del graft. Tuttavia questa metodica tende a sottostimare l'incidenza e la gravità della patologia poiché la natura diffusa della CAV la rende in molti casi angiograficamente silente, soprattutto negli stadi iniziali. La limitata sensibilità di questa tecnica è stata evidenziata da studi istopatologici<sup>90</sup> che hanno osservato una sottostima delle lesioni nel caso queste non determinino un restringimento marcato del lume, e dal confronto con l'ultrasonografia intravascolare (IVUS)<sup>91,92</sup>. La coronarografia, quindi, non riesce ad evidenziare l'ispessimento intimale diffuso a carico di tutto l'albero vascolare tipico della CAV mentre è efficace nel rilevare stenosi focali a livello delle arterie epicardiche; queste sono però un reperto tardivo e si associano ad una cattiva prognosi, per imminente compromissione funzionale dell'organo<sup>93</sup>.

Infine bisogna ricordare che essa, pur essendo un esame che si associa ad una bassissima mortalità, non è una procedura priva di complicanze anche gravi e di rischi per il paziente; nella somministrazione del mezzo di contrasto, inoltre, è importante tener conto del deterioramento della funzione renale, che spesso caratterizza i pazienti cardiotrapiantati.

Sono state sviluppate metodiche combinate tra angiografia e Doppler intracoronarico (Doppler Flow Wire) che permettono la misurazione della riserva di flusso coronarico (Coronary Flow Reserve, CFR); una diminuzione della CFR è indice di una lesione a livello delle arterie epicardiche o del microcircolo ed è un marcatore precoce di CAV<sup>94</sup>. La CFR, grazie alla tecnica della termodiluizione descritta da De Bruyne et al.<sup>95</sup>, può essere misurata insieme alla riserva di flusso frazionale (Fractional Flow Reserve, FFR) con l'utilizzo di un solo cavo guida (single coronary pressure wire)<sup>115</sup>; la misurazione simultanea di questi due parametri fornisce informazioni aggiuntive sullo stato funzionale del circolo coronarico e permette di differenziare la sede della patologia coronarica, tra epicardica e microcircolatoria<sup>96</sup>. È stato osservato, inoltre, grazie a studi su modelli animali, che la CFR misurata con quest'ultima tecnica risulta più rappresentativa dell'effettivo flusso coronarico rispetto a quella misurata con il Doppler<sup>97</sup>.

Lo sviluppo di una disfunzione endoteliale è rilevabile attraverso l'infusione intracoronarica di acetilcolina, precede lo sviluppo di una coronaropatia angiograficamente visibile ed è un fattore predittivo indipendente di eventi cardiovascolari acuti<sup>98</sup>.

L'ultrasonografia intravascolare (Intravascular ultrasound, IVUS) è una metodica che permette lo studio in vivo dell'anatomia e della fisiologia dell'albero coronarico e fornisce informazioni non solo sul diametro del vaso, ma anche sulla morfologia della parete vascolare. È stato osservato come le prime alterazioni a carico del circolo coronarico compaiano precocemente nel primo anno post-trapianto; tuttavia, mentre un inspessimento intimale è riscontrabile già nelle prime fasi, il lume dei vasi rimane inizialmente invariato o solo lievemente diminuito. Questo rende ragione del fatto che l'IVUS sia più sensibile dell'angiografia coronarica (che rileva solo restringimenti luminali) per la diagnosi di CAV, soprattutto agli stadi iniziali. La sensibilità diagnostica dell'IVUS varia in base al numero di vasi indagati: nello studio di Kapadia et al.<sup>99</sup> a seconda che si fossero visualizzati uno, due o tre vasi la prevalenza di lesioni coronariche era rispettivamente del 27%, 41% e 58% ad un anno dal trapianto e del 39%, 55% e 74% a tre anni. Si può comunque notare come in ogni caso essa sia maggiore di quella evidenziata della coronarografia, che a tre anni rileva una prevalenza di CAV del 20%<sup>70</sup>. Numerosi studi hanno dimostrato come il riscontro tramite IVUS di un inspessimento intimale precoce  $\geq 0,5$  mm (Maximal Intimal Thickness, MIT) nel primo anno post-

trapianto rappresenti un importante fattore predittivo per l'insorgenza di CAV angiograficamente visibile nei 5 anni successivi e correli con un aumento di morbilità e mortalità nei pazienti cardiotrapiantati. La presenza di questa CAV "rapidamente progressiva" si associa infatti ad un aumentato rischio di morte ed eventi cardiovascolari maggiori<sup>100</sup>. Tuttavia, se da una parte è più sensibile dell'angiografia coronarica, dall'altra questa metodica risulta essere più costosa, non sempre disponibile, non utilizzabile in pazienti pediatrici e più invasiva (maggior incidenza di dissezioni e spasmi coronarici). Altri svantaggi sono il numero limitato di vasi visualizzabili (consente di esaminare solo la parte prossimale dell'albero coronarico, non il microcircolo), l'operatore-dipendenza e la mancanza di una standardizzazione delle scale d'interpretazione dei dati. Inoltre l'utilizzo di IVUS in una singola coronaria, che costituisce l'utilizzo più frequente e validato di questa tecnica, presuppone che la CAV sia uniforme in tutto il circolo coronarico; l'eterogeneità di questo processo patologico è invece stata descritta come un'eventualità piuttosto frequente<sup>101</sup>. Ad oggi l'IVUS costituisce un'importante metodica a livello sperimentale, mentre l'utilizzo clinico rimane per il momento limitato<sup>102</sup>.

### **Tecniche diagnostiche non invasive**

Il riscontro di alterazioni della cinetica parietale all'ecocardiografia da stress con dobutamina (Eco-DSE) rappresenta un fattore predittivo per eventi cardiovascolari maggiori, indipendentemente dai reperti angiografici; questa osservazione suggerisce che questa tecnica possa individuare alterazioni non solo a livello dei vasi epicardici, ma anche del microcircolo<sup>103</sup>. La dobutamina è un agonista noradrenergico  $\alpha 1$  specifico e  $\beta$  non specifico, con effetti dose-dipendenti. A basse dosi si osserva infatti un aumento della contrattilità, determinato dall'effetto inotropo positivo, mentre a dosi maggiori compare tachicardia per l'azione cronotropa positiva. Si osserva inoltre un progressivo incremento dello stress e della tensione parietali e del consumo di ossigeno; queste modificazioni avvengono fisiologicamente durante l'esercizio fisico, ma vengono anche riprodotte dalla dobutamina, più fedelmente rispetto al dipiridamolo. L'aumento della contrattilità del ventricolo sinistro, della frequenza cardiaca e dello stress di parete, provocati dall'infusione di dobutamina, inducono un'ischemia miocardica nei pazienti affetti da coronaropatia che si traduce in anomalie della cinetica di parete. Secondo uno studio del 1995, la sensibilità e la specificità dell'Eco-DSE nel diagnosticare una CAV sono rispettivamente del 86% e 91%; anche in presenza di malattia giudicata non significativa all'angiografia, la sensibilità resta pressoché invariata<sup>104</sup>.

In uno studio del 1999, Spes e collaboratori<sup>105</sup> hanno valutato il valore diagnostico e prognostico dell'Eco-DSE e comparato questa metodica con l'angiografia coronarica e l'IVUS; in questo lavoro

la sensibilità dell'Eco-DSE risultava essere del 72%. Dei pazienti con ecostress anormale, il 90% aveva un IVUS suggestivo di CAV ma solo il 50% presentava alterazioni angiografiche; si osservava ancora una volta la scarsa sensibilità della coronarografia nella diagnosi di CAV. Secondo questo studio un'Eco-DSE normale sarebbe in grado di predire una storia clinica priva di eventi significativi da un punto di vista cardiaco; gli stessi Autori, in un'altra pubblicazione, hanno constatato tuttavia come non vi fosse correlazione tra il reperto Eco-DSE e la CFR valutata al Doppler intracoronarico .

In uno studio prospettico terminato nel 2004 è stata dimostrata una buona sensibilità dell'Eco-DSE nel predire l'insorgenza di eventi cardiovascolari e suggerito il suo utilizzo come metodo diagnostico di screening per l'insorgenza di CAV, riservando le metodiche invasive ai pazienti che presentano un Eco-DSE alterato<sup>106</sup>. Tuttavia la notevole operatore-dipendenza di questa tecnica e la possibilità che le anomalie della cinetica parietale possano essere dovute a fattori diversi dalla CAV, rappresentano dei limiti ad un utilizzo di routine di questa tecnica per lo screening e il monitoraggio della vasculopatia del graft cardiaco.

L'Eco-Dipiridamolo consiste nella valutazione delle alterazioni della cinetica parietale cardiaca a riposo e dopo infusione di dipiridamolo ad alte dosi. È stata dimostrata una correlazione tra queste alterazioni ed eventi cardiovascolari<sup>107</sup>; la reversibilità di anomalie della cinetica con l'infusione di dipiridamolo indicherebbe una prognosi favorevole<sup>108</sup>. Nonostante questa metodica abbia un potere predittivo superiore a quello dell'angiografia coronarica, l'elevata operatore-dipendenza che la caratterizza ne limita l'affidabilità così come già visto per l'Eco-DSE.

Per quanto riguarda la Tomografia Computerizzata ad emissione di singolo fotone, l'evidenza finora raccolta suggerisce come la SPECT sarebbe in grado di predire la CAV e le complicanze maggiori ad essa correlate<sup>109</sup> e costituirebbe un importante fattore predittivo della sopravvivenza a 5 anni<sup>110</sup>. Uno studio condotto nel 2000 ha utilizzato la SPECT come metodica di screening annuale per la diagnosi di CAV, confrontando i reperti angiografici di 58 pazienti con i reperti ottenuti alla SPECT; ha osservato una buona correlazione tra una SPECT negativa e l'assenza di CAV angiograficamente rilevante. Dato il suo elevato valore predittivo negativo, si suggeriva quindi l'utilizzo di questa metodica come indagine di primo livello, con un risparmio del ricorso all'angiografia nel 92% dei casi<sup>111</sup>. Tuttavia tutti gli studi sopra riportati hanno coinvolto un numero troppo esiguo di pazienti e non hanno seguito un protocollo uniforme tra i vari centri; questi limiti non permettono al momento di proporre la SPECT in sostituzione alle metodiche standard attualmente in uso.

La Tomografia Assiale Computerizzata (TC), e in particolare la 64-slice Multidetector CT (MDCT), fornisce immagini di ottima qualità ed è in grado di rilevare la presenza di CAV con una sensibilità superiore a quella dell'angiografia coronarica<sup>112</sup>. La qualità delle immagini risulta tuttavia ridotta in presenza di un'eventuale obesità del paziente e di un'elevata frequenza cardiaca, anche se in trattamento con  $\beta$ -bloccanti; inoltre si ha una scarsa visualizzazione dei vasi coronarici distali obliterati. Oltre ai limiti appena elencati, gli altri fattori che ne limitano l'utilizzo di routine nel post-trapianto sono la dose cumulativa di radiazioni, molto più elevata rispetto a quella dell'angiografia, e la necessità di somministrare mezzo di contrasto in pazienti che spesso presentano una funzionalità renale compromessa.

Un recente studio ha validato la Risonanza Magnetica (RM) con gadolinio come metodica per la diagnosi di CAV, tramite la valutazione della riserva di perfusione miocardica (Myocardial Perfusion Reserve, MPR) e del rapporto di perfusione miocardica (inteso come il rapporto tra flusso endocardico ed epicardio, Endo/Epi ratio) a riposo e dopo infusione endovenosa di adenosina<sup>113</sup>. Un valore di  $MPR > 2,3$  ha permesso

di escludere la presenza di CAV con una sensibilità e una specificità rispettivamente del 100% e dell'85%. Nonostante i risultati siano promettenti, è necessaria una validazione di questi dati su popolazioni numericamente maggiori e un'attenta valutazione del costo-beneficio dell'uso della risonanza magnetica.

### **LA RISERVA DI FLUSSO COROARICO (CFR)**

Lo stato funzionale del circolo coronarico può essere clinicamente valutato andando a misurare la riserva di flusso coronarico (CFR), definita come il rapporto tra la velocità del flusso diastolico iperemico massimale e quello diastolico basale. Il valore della CFR rappresenta quindi la capacità di entrambe le componenti dell'albero vascolare coronarico, ossia la resistenza vascolare a livello epicardio e quella a livello microvascolare, di rispondere ad uno stimolo iperemizzante per ottenere un flusso coronarico massimale. In soggetti non cardiotrapiantati il valore di CFR è normalmente superiore a 2,5. Si assiste ad una diminuzione dei valori di CFR quando questi soggetti presentano stenosi a livello delle arterie epicardiche o condizioni, come l'ipertensione arteriosa o il diabete mellito, che possono portare allo sviluppo di una disfunzione del microcircolo coronarico. In assenza di stenosi epicardiche, è stato dimostrato come il valore di CFR rappresenti un valido marker di funzionalità del microcircolo<sup>114</sup>. Grazie all'uso della biopsia endomiocardica, alcuni studi hanno confrontato le modificazioni istologiche presenti nella microangiopatia coronarica con la riduzione della CFR e hanno documentato una correlazione tra le alterazioni morfologiche e quelle

emodinamiche<sup>115,116</sup>. Nel caso dei pazienti cardiopiantati affetti da CAV, la CFR è in grado di riconoscere questa temibile complicanza ad uno stadio più precoce rispetto alla coronarografia, cioè quando si ha una patologia manifesta a livello del microcircolo ma vasi epicardici angiograficamente indenni. In uno studio pubblicato nel 2006, un valore di CFR < 2,7 all'ecocontrastografia transtoracica (individuato come ottimale all'analisi della curva di Roc) possedeva una sensibilità e una specificità rispettivamente dell'82% e dell'87% nell'identificare i pazienti che presentavano una CAV, con un'accuratezza diagnostica dell'85%<sup>117</sup>. Inoltre un ridotto valore di CFR in questi pazienti rappresenta un importante fattore prognostico per lo sviluppo di una disfunzione ventricolare sinistra<sup>118</sup> e costituisce il principale fattore predittivo indipendente per il presentarsi di eventi cardiovascolari maggiori, quali morte improvvisa, scompenso cardiaco che richiede trattamento in regime ospedaliero, infarto miocardico e necessità di un intervento di rivascularizzazione percutanea<sup>119</sup>.

La determinazione di questo parametro può quindi essere molto importante ai fini dell'inquadramento prognostico di questi pazienti, ma affinché ciò sia possibile su larga scala è necessario l'utilizzo di una metodica semplice e non invasiva.

È possibile ottenere una misurazione strumentale della CFR attraverso metodiche invasive, quali il Doppler intracoronarico (nell'ambito di un esame angiografico), metodiche semi-invasive, quali l'ecocardiografia transesofagea, o metodiche non invasive, quali l'ecocontrastografia transtoracica (CE-TTE), il test ergometrico, la risonanza magnetica (RMN) e la tomografia ad emissione di positroni (PET)<sup>120,121</sup>. Gli stimoli farmacologici più comunemente utilizzati per indurre iperemia del circolo coronarico sono il dipiridamolo e l'adenosina. L'utilizzo del dipiridamolo prevede una somministrazione in due tempi; ad una prima dose di 0,56mg/kg in 4 minuti segue un intervallo libero ed un'ulteriore dose di 0,28mg/kg in 2 minuti. Il farmaco più utilizzato è l'adenosina, che può essere somministrata sia per infusione endovenosa (0,14mg/kg/min per 5 minuti) che per infusione intracoronarica.

Nel nostro studio la misurazione della CFR è stata valutata con l'ecografia transtoracica (TTE) a livello della porzione distale della coronaria discendente anteriore (DA). Questa metodica, introdotta e validata da Caiati et al nel 1999<sup>122,123</sup>, permette la misurazione della CFR in modo non invasivo anche a livello della coronaria destra e dell'arteria circonflessa, ma con una minore probabilità di riuscita (50-87% e 43-72% rispettivamente).



## SCOPO DELLA TESI

Viste le premesse presentate verranno analizzate patologie a carattere infiammatorie ed endocrino a noto rischio cardiovascolare, ma di cui non si conoscono bene i meccanismi pato-fisiologici alla base.

Questo lavoro ha pertanto, da un lato, lo scopo di valutare la presenza di disfunzione microvascolare coronarica mediante lo studio della riserva di flusso coronarico effettuato con Doppler transtoracico con infusione di Adenosina, in patologie infiammatorie ed endocrine e se questa possa spiegare la fisiopatologia di tali disturbi,

Dall'altro vuole analizzare, all'interno del trapianto cardiaco, la cui complicanza maggiore è la vasculopatia cardiaca del graft,:

- se la disfunzione microcircolatoria preceda la comparsa di stenosi epicardiche e se questo processo sia l'evoluzione del precedente.
- se una  $CFR \leq 2.5$ , indice di una disfunzione microcircolatoria, è un fattore predittivo indipendente per l'insorgenza di CAV in pazienti con coronarie angiograficamente sane.
- la correlazione anatomico-clinica tra il dato funzionale della riserva di flusso coronarica (CFR) e il substrato patologico micro vascolare



**DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA  
NELLE PATOLOGIE ENDOCRINE**

*Studi clinici*



# **LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA INDOTTA DA IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO VIENE RIPRISTINATA DOPO PARAIDECTOMIA**

## **INTRODUZIONE**

Il paratormone regola l'omeostasi del calcio, dei fosfati e della vitamina D e gioca un ruolo cruciale nel metabolismo minerale e nel turnover osseo. L'iperparatiroidismo primario non trattato è caratterizzato da un cronico elevato livello di paratormone e da conseguente ipercalcemia con alterazioni a livello osseo e renale. Inoltre è associato ad un incremento della mortalità e della morbilità cardiovascolare<sup>108</sup>. E' stato dimostrato che nell'iperparatiroidismo primitivo (IPP) sintomatico la paratiroidectomia è in grado di ridurre la mortalità cardiovascolare<sup>109</sup>. D'altra parte è anche vero che al giorno d'oggi vi è un numero nettamente inferiore di casi in cui è manifesta una condizione clinica associata all'iperparatiroidismo clinico con severa ipercalcemia, calcoli renali, coinvolgimento neuromuscolare, mentre sono aumentati i casi di iperparatiroidismo diagnosticato in fase asintomatica, perlopiù occasionalmente durante esami biochimici di routine<sup>110</sup>.

I dati in letteratura circa il coinvolgimento cardiovascolare nei pazienti asintomatici con IPP sono scarsi, e non è ben chiaro se possa essere l'ipercalcemia o l'iperparatiroidismo ad aumentare il rischio cardiovascolare già dalle prime fasi<sup>109,111</sup>. Un recente studio effettuato su 958 soggetti ha mostrato come un lieve aumento del paratormone circolante sia un predittore di mortalità cardiovascolare<sup>112</sup>. Tuttavia non vi è evidenza che la riduzione dei livelli di paratormone possa ridurre il rischio cardiovascolare<sup>112</sup>. Inoltre è ancora controverso quale sia il timing ottimale per l'iperparatiroidectomia tale da ridurre il rischio cardiovascolare<sup>113</sup>.

Tradizionalmente l'aumento del rischio cardiovascolare nei pazienti affetti da IPP è stato associato all'aumento dell'incidenza dei fattori di rischio cardiovascolari quali diabete, dislipidemia, ipertensione<sup>108</sup>. Tuttavia recenti studi hanno mostrato che il paratormone agisce a livello vasale interagendo con specifici recettori presenti a livello dell'endotelio e delle cellule muscolari lisce<sup>115,116</sup> e che potrebbero essere queste alterazioni strutturali e funzionali cardiovascolari pth-mediate ad essere responsabili dell'aumento delle ospedalizzazioni per problemi cardiovascolari<sup>117</sup>. Inoltre la reversibile disfunzione vascolare dopo paraidectomia supporta ulteriormente la tesi di uno specifico ruolo del paratormone nella patogenesi dei disturbi cardiovascolari IPP-associati<sup>118,119,121</sup>.

## SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'influenza del paratormone nella funzione microvascolare coronarica, stimata attraverso lo studio della riserva coronarica con doppler transtoracico, in soggetti sani e in pazienti con un asintomatico phpt e senza evidenza di stenosi epicardiche significative (valutate attraverso tac coronarica multislides).

## MATERIALI E METODI

### POPOLAZIONE STUDIATA

Nel nostro studio abbiamo controllato 100 pazienti affetti da iperparatiroidismo primitivo, perlopiù dovuto a singolo adenoma PTH secernente (80 donne, con età di  $58 \pm 12$  anni). Sono stati esclusi i pazienti con storia di patologie cardiopolmonari, renali o epatiche, nonché con storia di infezioni in atto. I dati demografici, ecocardiografici e laboratoristici sono evidenziati nella tabella I.

Il gruppo di controllo era costituito da 50 soggetti sani abbinati in maniera omogenea con il gruppo di studio in esame. Nessun paziente presentava una coronaropatia all'entrata nello studio. Tutti i soggetti del gruppo di controllo erano asintomatici e non presentavano alcuna storia di patologie cardiovascolari. Criteri di esclusione per tutti i soggetti sono stati: anomalie vascolari cerebrali, stenosi carotidee o periferiche, anomalie del ritmo, storia di angina o infarto miocardico, utilizzo di farmaci vasodilatatori, alcolismo. Tutti i partecipanti allo studio presentavano un ECG normale a riposo e durante iperemia indotta da adenosina. L'assenza di CAD è stata valutata dalla storia clinica, dall'esame obiettivo e dall'ECG. Lo studio è stato approvato dal comitato etico e tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato.

**Tabella I**                      **Caratteristiche della popolazione studiata**

	<b>Controlli</b>	<b>IPP</b>	<b>P</b>
	<b>(n=50)</b>	<b>(n=100)</b>	
età	59 ± 12	58 ± 12	0.6
sesso maschile, n (%)	10 (20)	20 (20)	0.8
PTH, pmol/L	2 (0.8-2.4)	20 (15-29)	<0.0001

calcemia, mmol/L	2.3 ± 0.1	2.95 ± 0.1	<0.0001
------------------	-----------	------------	---------

### **Cardiovascular risk factors**

Fumo attivo, n (%)	6 (12)	12 (12)	0.8
--------------------	--------	---------	-----

Ipertensione, n (%)	22(44)	45(45)	0.7
---------------------	--------	--------	-----

Diabete, n (%)	5(10)	10(10)	0.8
----------------	-------	--------	-----

Obesità, n (%)	8(16)	12(12)	0.5
----------------	-------	--------	-----

Dislipidemia, n (%)	11(22)	23(23)	0.7
---------------------	--------	--------	-----

### **Caratteristiche ecocardiografiche**

IVSd, mm	9.0 ±2.2	8.4±1.5	0.2
----------	----------	---------	-----

PWTd, mm	8.4 ±1.4	8.1±1.4	0.5
----------	----------	---------	-----

LVIDd, mm	53 ±4.9	51.6±5.9	0.4
-----------	---------	----------	-----

LVIDs, MM	32.6±6.4	32.4±7	0.9
-----------	----------	--------	-----

LV mass, g	170 ±53	158±49	0.2
------------	---------	--------	-----

LV mass index, g/m <sup>2</sup>	102 ±26	100±26	0.4
---------------------------------	---------	--------	-----

WT relativa	0.32 ±0.05	0.32±0.09	0.9
-------------	------------	-----------	-----

FE %	65 ±4	66±3	0.7
------	-------	------	-----

Onda E, cm/sec	80.1 ±14.1	78.1±12.2	0.7
----------------	------------	-----------	-----

Onda A, cm/sec	60.2 ±10.2	59.1±14.1	0.8
----------------	------------	-----------	-----

E/A	1.32 ±0.21	1.35±0.42	0.8
-----	------------	-----------	-----

DT, ms	192 ±15	197±17	0.5
--------	---------	--------	-----

IVRT, ms	70 ±5	73±4	0.6
----------	-------	------	-----

E/E' del setto	7.41 ±1.42	7.61±1.71	0.7
----------------	------------	-----------	-----

E/E' parete laterale	6.51 ±1.34	6.38±1.72	0.5
Grado di disfunzione diastolica, n(%)			0.8
Nessuna	23(46)	43(43)	
Disfunzione diastolica lieve, n(%)	20(40)	43(43)	
Disfunzione diastolica moderata, n(%)	7(14)	13(13)	
Disfunzione diastolica severa, n(%)	0(0)	1(1)	

---

## STUDIO DELLA RISERVA DI FLUSSO CORONARICO

Le immagini sono state ottenute con un trasduttore di 7 MHz. Posto il volume campione a livello della porzione distale della discendente anteriore con Doppler pulsato è stata valutata la velocità di flusso in condizioni basali e dopo infusione di adenosina. Il protocollo prevedeva un'infusione di 140 µg/Kg/min per circa 3 minuti. La CFR è stata stimata dal rapporto tra la velocità di picco durante iperemia e la velocità di picco in condizioni basali<sup>122</sup>. Un valore di CFR < di 2.5 è stato considerato patologico. E' stata misurata la variabilità intraosservatore e tra osservatori , che è risultata rispettivamente del 4.3% e 5.8%.

I pazienti che presentavano una CFR patologica sono stati sottoposti ad Angiotc coronarica al fine di escludere eventuali stenosi epicardiche.

## RISULTATI

### Caratteristiche cliniche e valutazione CFR

Le caratteristiche dei pazienti sono presentate nella tabella I. La CFR è più bassa nei pazienti con iperparatiroidismo rispetto al gruppo controllo ( $3.0 \pm 0.8$  contro  $3.8 \pm 0.7$ ;  $p < 0.0001$ ). La prevalenza di CFR < 2.5 è più alta rispetto al gruppo di controllo (27% contro 4 ; odds ratio, 8.9;  $p=0.0008$ ). In otto pazienti con iperparatiroidismo vi era una riduzione severa della CFR (CFR<2) mentre non era presente in nessun paziente del gruppo controllo. Lo studio della CFR è stato sempre tollerato. Durante l'infusione di adenosina, rispetto alle condizioni a riposo, in tutti i pazienti sono stati registrati un aumento della frequenza cardiaca e una diminuzione della pressione cardiaca, così come non sono stati rilevati significativi cambiamenti ecografici o anomalie della cinetica



ventricolare. Quattordici pazienti erano in trattamento con statine, 10 con aspirina, 2 con nitrati, 14 con aceinibitori, 8 con calcioantagonisti e 18 con betabloccanti.

### **Parametri emodinamici**

La frequenza cardiaca a riposo e durante infusione di adenosina è stata più alta in pazienti con CFR patologica ( $80 \pm 13$  contro  $72 \pm 11$  bpm,  $P=0.005$ ; e  $100 \pm 16$  contro  $92 \pm 15$  bpm,  $P= 0.04$ , rispettivamente). Nei pazienti con CFR patologica la pressione sistolica a riposo è più alta ( $138 \pm 17$  contro  $130 \pm 16$ ;  $P= 0.03$ ). La velocità di flusso diastolico basale è più alta in pazienti con CFR patologica ( $26 \pm 9$  contro  $22 \pm 4$  cm/sec;  $P<0.002$ ). La velocità di flusso diastolico durante iperemia e la CFR sono significativamente più basse nei pazienti con CFR patologica rispetto a quelli con CFR normale ( $57 \pm 15$  contro  $74 \pm 16$  cm/sec,  $P<0.002$  e  $2.0 \pm 0.4$  contro  $3.4 \pm 0.6$ ,  $p<0.0001$ ).

### **Caratteristiche dei pazienti con disfunzione microvascolare coronarica**

Le caratteristiche cliniche dei pazienti con CFR normale e di quelli con CFR patologica sono riportate nella tabella II. I livelli di PTH più alti nei pazienti con CFR patologica (Figura I). I pazienti con disfunzione microvascolare coronarica erano più vecchi e avevano una maggiore prevalenza di ipertensione. La disfunzione diastolica e i livelli plasmatici di calcio erano confrontabili nei due gruppi così come i parametri ecocardiografici. Non vi erano differenze terapeutiche nei due gruppi. I 26 pazienti con CFR patologica non avevano stenosi epicardiche all'angioTC. Solo un paziente aveva una lieve stenosi (<50%) sulla coronaria destra.

**Tabella II: Confronto tra pazienti con disfunzione microvascolare e pazienti con riserva di flusso coronarico normale.**

	CFR $\leq$ 2.5 (n=27)	CFR $>$ 2.5 (n=73)	P
Età	63 $\pm$ 12	57 $\pm$ 12	0.03
sesso maschile, n (%)	5(18)	15(20)	0.8
tempo dalla diagnosi	8(4-25)	8(4-21)	0.7
PTH, pmol/L	26.4(16-37)	18(13-25)	<0.007

calcemia, mmol/L	2.9±0.1	2.8±0.3	0.1
------------------	---------	---------	-----

### **Cardiovascular risk factors**

Fumo attivo, n (%)	3(11)	9(12)	0.8
--------------------	-------	-------	-----

Ipertensione, n (%)	17 (63)	28(38)	0.02
---------------------	---------	--------	------

Diabete, n (%)	3(11)	7(9.5)	0.8
----------------	-------	--------	-----

Obesità, n (%)	4(15)	8(11)	0.6
----------------	-------	-------	-----

Dislipidemia, n (%)	9(33)	14(19)	0.1
---------------------	-------	--------	-----

### **Caratteristiche ecocardiografiche**

IVSd, mm	8.6±2	8.3±1.2	0.5
----------	-------	---------	-----

PWTd, mm	8.3±1.3	8.1±1.1	0.6
----------	---------	---------	-----

LVIDd, mm	52±4.1	51±5	0.7
-----------	--------	------	-----

LVIDs, MM	33.4±6	31.3±5	0.4
-----------	--------	--------	-----

LV mass, g	160±51	156±47	0.3
------------	--------	--------	-----

LV mass index, g/m <sup>2</sup>	100±22	99±19	0.4
---------------------------------	--------	-------	-----

WT relativa	0.32±0.04	0.31±0.07	0.8
-------------	-----------	-----------	-----

FE %	63±2	65±5	0.8
------	------	------	-----

Onda E, cm/sec	77.2±13.1	79.1±11.2	0.6
----------------	-----------	-----------	-----

Onda A, cm/sec	62.1±10.1	58.1±11.1	0.3
----------------	-----------	-----------	-----

E/A	1.32±0.21	1.37±0.32	0.3
-----	-----------	-----------	-----

DT, ms	199±13	195±16	0.4
--------	--------	--------	-----

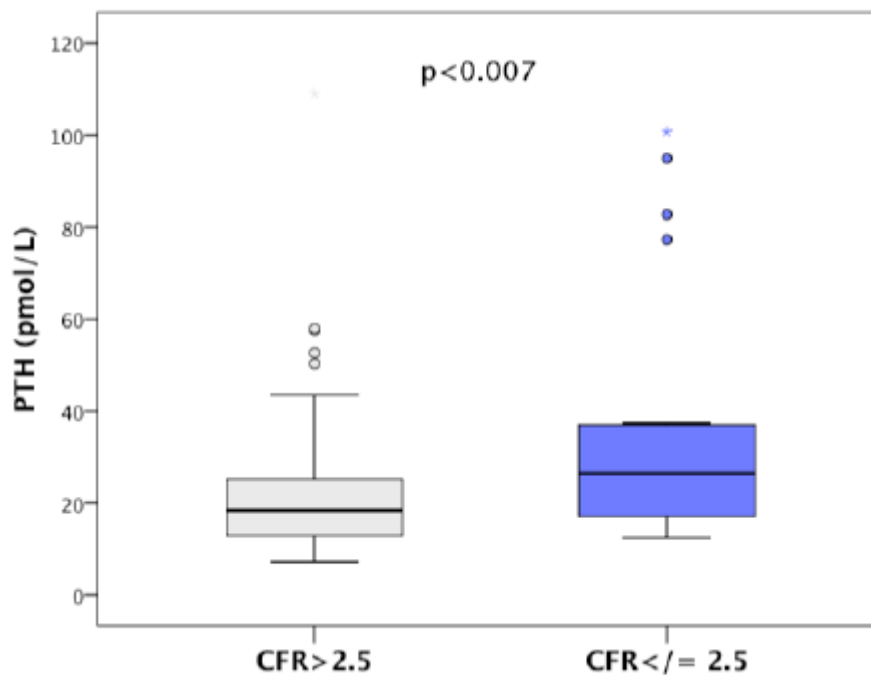
IVRT, ms	72±5	75±5	0.4
----------	------	------	-----

E/E' del setto	7.81±1.32	7.53±1.61	0.5
----------------	-----------	-----------	-----

E/E' parete laterale	6.41±1.21	6.39±1.51	0.4
Grado di disfunzione diastolica, n(%)			0.8
Nessuna	12(44)	31(42)	
Disfunzione diastolica lieve, n(%)	12(44)	31(42)	
Disfunzione diastolica moderata, n(%)	3(12)	10(14)	
Disfunzione diastolica severa, n(%)	0	1(2)	

---

**Figura I: Box Plot del PTH in pazienti con CFR normale e patologica**



### Fattori associati a CFR

In un'analisi di regressione lineare aggiustata il PTH (P=0.004), l'età (P=0.01), la frequenza cardiaca (P=0.007) e la pressione sistolica (P=0.02) erano associati alla CFR. In un'analisi multivariata, solo il paratormone (P=0.01), l'età (P=0.04) e la frequenza cardiaca (P=0.006) sono indipendentemente correlati con il PTH (tabella 3). Solo il PTH era indipendentemente correlato con la velocità diastolica di picco durante adenosina (P=0.01). Esclusi dall'analisi l'ipertensione e il

diabete, il PTH (P=0.01), l'età (P=0.02), e la frequenza cardiaca (P=0.01) rimanevano gli unici fattori correlati alla CFR.

**Tabella III. Analisi multivariata tra CFR (variabile dipendente) e fattori di rischio o condizioni cliniche (variabile indipendente)**

	Analisi		
	Analisi, P	Multivariata	
		$\beta$	P
Età	0.01	- 0.232	0.04
Sesso maschile, n (%)	0.5	- 0.127	0.2
Tempo dalla diagnosi	0.8	0.046	0.6
PTH	0.004	- 0.242	0.01
Calcemia	0.2	0.034	0.7
Fumo	0.1	- 0.174	0.07
Iperensione	0.09	- 0.049	0.6
Diabete mellito	0.6	0.167	0.1
Obesità	0.4	0.02	0.8
Dislipidemia	0.1	- 0.126	0.2
Frequenza cardiaca	0.007	- 0.265	0.006
Pressione sistolica	0.02	- 0.052	0.6
EF	0.3	- 0.078	0.4
Disfunzione diastolica	0.7	0.077	0.4

**Tabella IV Fattori indipendentemente associati con la riduzione di riserva di flusso coronarico**

	OR	95% ic	p
<u>Modello 1</u> : ottenuto dalla regressione a step (C statistica=0.79; R <sup>2</sup> =0.31)			
PTH	3.03	1.56-5.9	0.01
Frequenza cardiaca basale	1.08	1.02-1.13	0.02
<u>Modello 2</u> : ottenuto senza frequenza cardiaca basale (C statistica=0.75; R <sup>2</sup> =0.28)			
PTH	2.71	1.50-5.19	0.03
<u>Modello 3</u> : ottenuto includendo anche le variabili marginalmente statistiche (C statistica=0.80; R <sup>2</sup> =0.34)			
PTH	3.01	1.51-6.04	0.01
Frequenza cardiaca basale	1.08	1.02-1.14	0.02
<u>Modello 4</u> : ottenuto forzando altre variabili (C statistica=0.81; R <sup>2</sup> =0.37)			
PTH	3.00	1.51-5.90	0.01
Frequenza cardiaca basale	1.08	1.02-1.15	0.03

### **Fattori associati ad una disfunzione microvascolare coronarica**

In un'analisi di regressione logistica erano significativi il paratormone (P<0.01), l'età (P<0.03), la storia di ipertensione (P=0.03), la pressione sistolica (P=0.03), la frequenza cardiaca (P<0.004), la storia di dislipidemia (P=0.08) e la disfunzione diastolica (P=0.06). I fattori che indipendentemente sono associati ad una CFR patologica sono riassunti in Tabella IV.

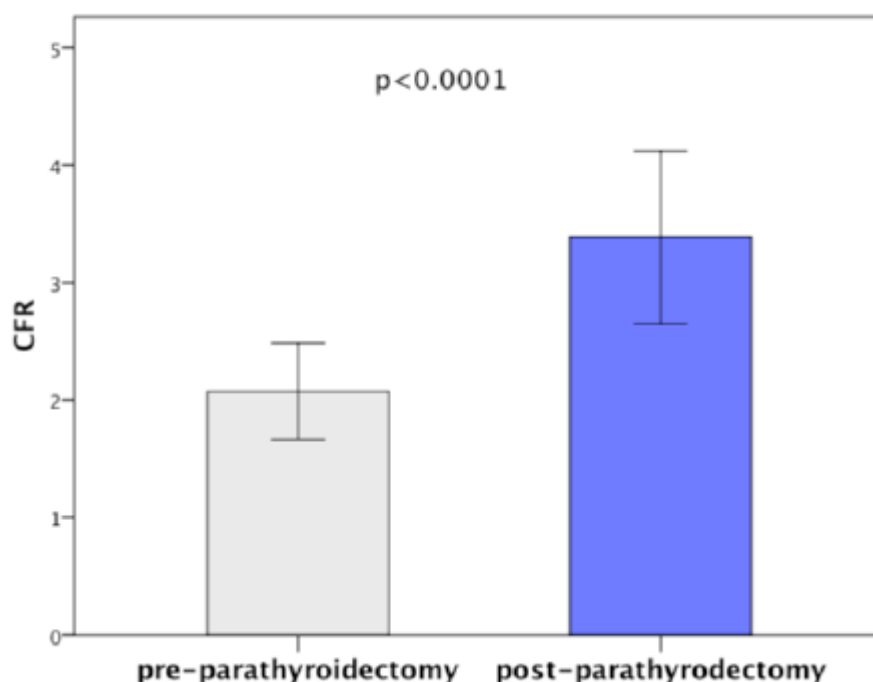
Utilizzando un modello di regressione a step, aggiustato per differenze di base, si osserva che i fattori che indipendentemente sono associati con una CFR patologica sono il PTH (odds ratio 3.03; IC 95%,1.56-5.9; P=0.01) e la frequenza cardiaca (odds ratio, 1.08, IC 95%, 1.02-1.13, P=0.02; Table IV). Per escludere l'effetto modulatore di altre variabili noi abbiamo anche aggiunto variabili

marginalmente significative in un'analisi di regressione logistica aggiustata (Modello 3). Quando altre caratteristiche (sesso, tempo dalla diagnosi, fumo attivo, storia di diabete mellito, uso di statine o nitrati) sono a forza inserite nel modello il paratormone e la frequenza cardiaca rimangono associati con la CFR patologica ( $P=0.01$  e  $P=0.03$  rispettivamente).

### CFR dopo paraidectomia

Tutti i 27 pazienti con una CFR patologica prima dell'intervento hanno una completa normalizzazione dei valori di CFR (CFR,  $2.1 \pm 0.5$  contro  $3.3 \pm 0.7$ ;  $P<0.0001$ ) **effettuata**/valutata dopo 6 mesi dalla paraidectomia (Figura II). Dopo l'intervento, inoltre, risultano ridotti il paratormone e i livelli di calcemia nel sangue ( $26.4$  pmol/L contro  $5.7$  pmol/L;  $P<0.0001$  per il paratormone e  $2.9 \pm 0.1$  contro  $2.1 \pm 0.1$  mmol/L,  $P<0.001$  per il calcio).

**Figura II** CFR prima e dopo paraidectomia



## DISCUSSIONE

Il nostro studio dimostra che pazienti affetti da un iperparatiroidismo primitivo di recente insorgenza, per lo più ancora asintomatico, presentano una disfunzione microvascolare coronarica in assenza di coronaropatia all'angioTC, che, dopo breve tempo dalla paraidectomia, si osserva una completa normalizzazione di tale disfunzione, suggerendo/sottolineando in tal modo un ruolo del paratormone nella patofisiologia del danno cardiovascolare.

Aumentati livelli di paratormone, sia essi responsabili di un iperparatiroidismo primitivo che secondario<sup>114,124</sup>, sono stati associati ad un'alta mortalità e morbilità per cause cardiovascolari<sup>109</sup>. Pazienti con iperparatiroidismo primitivo o secondario hanno un aumentato rischio cardiovascolare che permane anche dopo l'iperparatiroidectomia e ciò implica la presenza di un danno cardiovascolare irreversibile<sup>109</sup>, che storicamente era attribuito ad una tossicità simil uremica da parte di costanti livelli paratormone uniti alla presenza di multipli fattori di rischio cardiovascolari<sup>108,124</sup>. Ai nostri giorni, nei paesi occidentali l'iperparatiroidismo viene diagnosticato in una fase precoce quando le complicazioni a livello osseo, renale e cardiovascolare non si sono ancora del tutto sviluppate. Tuttavia la letteratura ci insegna che anche lievi aumenti del paratormone al di sopra dei livelli fisiologici sono associati ad un alta incidenza di eventi cardiovascolari in pazienti senza alterazioni del metabolismo minerale osseo<sup>112</sup>. Inoltre, sia in pazienti che hanno eseguito una coronarografia che in pazienti con una CAD stabile (con un follow-up di 8 anni)<sup>132</sup> i livelli di paratormone sono stati associati ad un aumentata mortalità cardiovascolare e in pazienti con CAD stabile ad un aumento dell'incidenza per secondi eventi cardiovascolari<sup>132</sup>.

Come conseguenza a ciò sopra detto l'ipotesi di una specifica azione del paratormone sull'apparato cardiovascolare si è evoluta nel tempo ed è stata supportata da sempre più numerosi lavori<sup>108,112,114,129</sup>. Interessante sono anche tanti lavori che mostrato come il paratormone, in diversi tessuti, possa avere un effetto ionoforetico, causando un sovraccarico di calcio intracellulare<sup>125,129,133</sup> e una compromissione delle difese antiossidanti cellulari, con conseguente danno cellulare e morte<sup>133</sup>. In particolar modo l'accumulo intracellulare di calcio pth-mediato associato all'induzione di un eccessivo stress ossidativo sui mitocondri dei cardiomiociti è stato associato a morte cellulare e successiva riparazione fibrosa del tessuto miocardico. A lungo termine, la progressiva perdita del parenchima e il processo riparativo fibrosi che si innescano compromettono la funzione cardiaca, causando scompenso cardiaco. Inoltre l'eccesso di calcio è stato associato anche ad un rimodellamento elettrico con maggiore incidenza di aritmie<sup>129</sup>.

La complessità delle funzioni del paratormone è ulteriormente evidenziata dalla presenza di un link bidirezionale tra il paratormone e il sistema renina-angiotensina-aldosterone, che potrebbe essere rilevante nella regolazione del metabolismo del calcio e nella patogenesi del danno cardiovascolare<sup>129,134</sup>. In particolar modo il paratormone può stimolare la secrezione dell'aldosterone da parte delle surrenali, noto mediatore nella patogenesi del danno cardiovascolare e nell'aterosclerosi<sup>136</sup>, sia direttamente<sup>134</sup> che indirettamente modulando la produzione dell'angiotensina II.

D'altronde nell'iperaldosteronismo primitivo o secondario la presenza di ipocalcemia e ipomagnesia, dovuta principalmente ad una minore escrezione dei cationi, causa iperparatiroidismo secondario. La surrenectomia e il blocco dei recettori per i mineralcorticoidi normalizzano i livelli di paratormone nei pazienti con aldosteronismo primitivo<sup>127</sup>. Interessante è uno studio che mostra come, in corso di aldosteronismo secondario con iniziale iperparatiroidismo, l'eccesso di calcio intracellulare pth-mediato e lo stress ossidativo promuovano un fenotipo infiammatorio nelle cellule immunitarie infiltranti le coronarie, suggerendo come l'eccesso di calcio pth mediato e lo stress ossidativo giochino un ruolo nel rimodellamento cardiovascolare, mediato dall'aldosterone<sup>137</sup>. In aggiunta a quanto detto nell'iperparatiroidismo primitivo i livelli di aldosterone sono elevati e correlano positivamente con i valori di paratormone<sup>138</sup>.

Per quanto riguarda gli effetti che il paratormone ha sui vasi, i dati in letteratura sono controversi. Da numerosi studi analizzati sembra che a breve termine vi sia un effetto vasodilatatore da parte del paratormone<sup>115,139</sup>, mentre un suo cronico aumento si accompagna ad un'eccessiva reazione ossidativa, che contribuisce alla contrazione delle cellule muscolari lisce<sup>140</sup>, e ad un danno delle proprietà vasoprotettive dell'endotelio<sup>118,119</sup>, che sinergicamente promuovono l'aterosclerosi<sup>141,142</sup>. Su questa linea Viridis e co mostra come nell'iperparatiroidismo primitivo la ridotta biodisponibilità di ossido nitrico si associ con disfunzione endoteliale reversibile dopo paraidectomia<sup>119</sup>.

Sebbene i meccanismi molecolari che regolano la funzione coronarica nell'iperparatiroidismo non siano ancora del tutto conosciuti, è concepibile che sia l'eccesso di calcio a giocare un ruolo importante a livello del microcircolo coronarico e che sia proprio l'eccesso di calcio pth mediato a livello delle cellule endoteliali coronariche responsabile dell'induzione dello stress ossidativo, conosciuto per diminuire la biodisponibilità dell'ossido nitrico, potente vasodilatatore e antiaterosclerotizzante<sup>143</sup>.

In questo modo sarebbe la ridotta biodisponibilità di ossido nitrico ad essere il maggiore determinante di una compromissione della funzione microvascolare osservata nei nostri pazienti ed il fattore che spiegherebbe l'alto rischio cardiovascolare tipico dell'iperparatiroidismo. In particolare il paratormone controllerebbe l'attività e l'espressione dell'ossido nitrico sintetasi<sup>116</sup>.

Nell'iperparatiroidismo secondario ad insufficienza renale cronica vi era una riduzione dell'ossido nitrico sintetasi della produzione di NO, biodisponibilità di NO che veniva ripristinata dopo paraidectomia<sup>144</sup>.



Nelle cellule endoteliali, il paratormone induce l'apertura dei canali del calcio ad opera dell'attivazione della fosfochinasi<sup>145</sup>. Alcune isoforme di fosfochinasi sono conosciute per attivare lo stress ossidativo e promuovere la produzione di radicali liberi con effetti dannosi sulla parete vasale.

Dal punto di vista patofisiologico la riduzione di CFR può risultare dalla combinazione di diversi eventi, quali la compromissione della dilatazione, l'aumento della risposta vasocostrittrice e il rimodellamento strutturale della microcircolazione coronarica. Nell'iperparatiroidismo è stato riportato un coinvolgimento vascolare sia endoteliodipendente che indipendente. Il flusso coronarico basale era alto in pazienti con CFR ridotta rispetto a quelli con CFR normale, fatto riconducibile ad una vasodilatazione basale che da sola potrebbe spiegare la riduzione della CFR. Questo potrebbe essere riconducibile agli effetti vasodilatatori endotelio-indipendenti pth mediati che avvengono nelle cellule muscolari lisce<sup>115,151</sup>. Interessante è, però, notare come in alcuni pazienti una riduzione della CFR è dovuta ad una riduzione di velocità di flusso coronarico durante adenosina. Sebbene lo studio della CFR con adenosina non distingua tra alterazioni endotelio-dipendenti e endotelio-indipendenti<sup>152</sup>, le alterazioni funzionali possono essere ricondotte ad un danno precoce nel processo che porta alla microvasculopatia. Non si può escludere la presenza di anomalie strutturali presenti nel microcircolo (calcificazioni o rimodellamenti arteriolari), ma la normalizzazione della CFR dopo paraidectomia sembra escludere la presenza di danni irreversibili, almeno nei nostri pazienti in cui l'iperparatiroidismo era lieve.

Una recente valutazione della perfusione miocardica condotta con tomografia ad emissione di fotoni ha mostrato che la CFR è significativamente ridotta nell'iperparatiroidismo senza presenza di CAD, dipendendo questa dalla durata della malattia<sup>153</sup>. Al contrario, nella nostra popolazione sono l'età, la frequenza cardiaca e i livelli di PTH ad essere correlati indipendentemente con la CFR e non la durata della malattia. Questa differenza sembra essere spiegata da una breve mediana del tempo di durata della malattia che riflette una fase precoce nello sviluppo di anomalie cardiovascolari nel PTPT. Tuttavia, poiché la relazione tra CFR e durata della malattia era stata descritta<sup>153</sup>, nel nostro studio abbiamo aggiustato il modello di analisi multivariata per la variabile tempo. Inoltre, mentre nello studio di Marini non vi era nessuna data di follow up, nel nostro la valutazione della CFR con una tecnica non invasiva, quale quella del doppler trans toracico, appare uno strumento semplice e rapido per controllare nel tempo la disfunzione microvascolare. Infatti la valutazione della CFR ha permesso di osservare un completo recupero della funzione micro vascolare coronarica dopo paraidectomia.

## **CONCLUSIONI**

Dai nostri dati emerge che uno specifico ruolo del paratormone nella precoce disfunzione microvascolare e che una paraidectomia precoce è in grado di riparare a tale disfunzione. Nel nostro studio il paratormone è correlato indipendentemente da altri fattori di rischio cardiovascolari o da altri determinanti del metabolismo minerale con la CFR. I nostri dati pertanto aiutano a spiegare perchè l'iperparatiroidismo è associato ad un incremento della mortalità cardiovascolare, nonostante siano necessari in futuro altri studi riguardo ai meccanismi molecolari di tale patologia.

# DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA NELL'ACROMEGALIA

## INTRODUZIONE

L'acromegalia è una patologia rara (incidenza annuale è di 3-4 casi/milione di abitanti)<sup>155,156</sup>, cronica e disabilitante causata da un'eccessiva secrezione dell'ormone della crescita (GH) e dell'Insulin Growth Factor-I (IGF-I). Alla base di questa patologia c'è, nella maggior parte dei casi, un tumore ipofisario benigno monoclonale. Le manifestazioni cliniche sono conseguenza sia dell'ipersecrezione di GH che dell'effetto della massa tumorale. L'eccesso di GH conduce a progressive alterazioni somatiche e sistemiche accompagnate da importanti complicanze cardiovascolari, osteoscheletriche e respiratorie<sup>157</sup>.

## GH

Il GH (secreto in due forme: 191 amminoacidi e 176 amminoacidi) è prodotto in maniera pulsatile e regolata da molti fattori sia stimolanti che inibenti. La secrezione del GH è regolata in senso stimolatorio dal GHRH e in senso inibitorio dalla SRIH<sup>158</sup>.

La concentrazione di GH normale è pari a 0.2 µg/L, ma aumenta fino a 30 µg/L durante i 10 normali picchi di pulsatilità delle 24 ore.

Per quanto riguarda il sistema cardiovascolare il GH è coinvolto nello sviluppo del cuore e nel mantenimento della sua struttura attraverso meccanismi autocrini e paracrini<sup>159</sup>.

## IGF-1

L'insulin-like growth factor è un peptide la cui secrezione è regolata dai livelli di GH e che è prodotto soprattutto a livello epatico. L'IGF-I circolante è per il 99% legato al carrier IGFBP-3 a all'acid-labile subunit ALS. L'IGF-I esplica la sua azione attraverso il legame al suo recettore IGF-IR, strutturalmente simile al recettore dell'insulina<sup>160</sup>.

Il ruolo principale dell'IGF-I è la regolazione della crescita postnatale e la mediazione degli effetti promuoventi la crescita postnatale la crescita del GH<sup>161</sup>

Per quanto riguarda il sistema cardiovascolare, i recettori di GH e IGF-I sono espressi sui cardiomiociti. L'IGF-I aumenta il contenuto intracellulare di calcio e ne aumenta la sensibilità da parte dei miofilamenti. La stimolazione dei cardiomiociti indotta da GH e IGF-I è associata a uno status

conformazionale a bassa energia, mediato da una bassa attività della miosina ATPasi. Inoltre il GH e IGF-I influenzano direttamente la contrattilità dei cardiomiociti incrementando il contenuto intracellulare di calcio e aumentando la responsività dei miofilamenti di calcio.

### **Complicanze Cardiovascolari**

GH e IGF-I esercitano il loro effetto sul sistema cardiovascolare sia direttamente, con meccanismi endocrini, autocrini e paracrini, sia indirettamente aumentando i fattori di rischio cardiovascolare e l'ipertensione arteriosa<sup>162</sup>.

#### Cardiomiopatia acromegalica

I recettori di GH e IGF-I sono espressi sui cardiomiociti<sup>162,163</sup>. L'IGF-I aumenta il contenuto intracellulare di calcio e ne aumenta la sensibilità da parte dei mio filamenti<sup>164</sup>. La stimolazione dei cardiomiociti, indotta da GH e IGF-I è associata a uno status conformazionale a bassa energia, mediato da una bassa attività della miosina ATPasi<sup>165</sup>. Inoltre GH e IGF-I influenzano direttamente la contrattilità dei cardiomiociti incrementando il contenuto intracellulare di calcio e aumentando la responsività dei miofilamenti al calcio<sup>166,167</sup>.

All'istologia, la fibrosi interstiziale rappresenta la più importante alterazione del cuore ipertrofico acromegalico<sup>168</sup>. Successivamente l'aumento della deposizione di collagene, il riarrangiamento delle miofibrille, la comparsa di aree di necrosi e l'infiltrazione da parte di cellule linfo-monocitarie cambiano la struttura cardiaca configurando un quadro di miocardite<sup>168</sup>.

L'ipertrofia cardiaca dell'acromegalico è un evento precoce e che peggiora progressivamente con il progredire della malattia<sup>169</sup>.

L'iniziale cardiomiopatia è caratterizzata dalla diminuzione del riempimento diastolico. La diminuzione dell'elasticità delle fibre miocardiche causa invece un allungamento del tempo di rilasciamento isovolumetrico<sup>168</sup>. Questa alterazione può rimanere asintomatica per anni prima del riscontro di segni clinici e strumentali. La cardiomiopatia acromegalica si sviluppa in fasi successive:

- nei pazienti giovani, con una durata di malattia inferiore a 5 anni, inizia con un aumento di volume cardiaco associato ad aumento della frazione di eiezione configurando una sindrome ipercinetica<sup>170</sup>.
- Se l'eccesso di GH e di IGF-I persiste per 5-15 anni la cardiomiopatia progredisce in ipertrofia cardiaca con segni di disfunzione diastolica e/o sistolica durante lo sforzo.

- Nei pazienti anziani con una durata di malattia si può osservare disfunzione sistolica a riposo e, raramente, insufficienza cardiaca franca con segni di cardiomiopatia dilatativa<sup>171,172</sup>.

### Acromegalia e coinvolgimento delle coronarie

La perfusione delle coronarie non è stata approfondita in maniera adeguata, ma nei diversi studi è stata riportata una prevalenza di coronaropatia compresa tra il 3 e il 37%. Da studi post-mortem e dopo cateterizzazione cardiaca risulta presente il coinvolgimento dei piccoli vasi e un aumento dei vasi intramurali nel 22% dei casi<sup>168</sup>. Le arterie prossimali sono generalmente normali ma possono essere ingrandite o tortuose o, raramente stenotiche. Sebbene episodi di angina pectoris siano riscontrati raramente, patologie coronariche sono descritte nel 20% dei casi e la presenza di ischemia miocardica cronica non può essere esclusa<sup>173</sup>.

Hermann et al hanno dimostrato, in uno studio con EBCT (electron beam computed tomography), che la durata della malattia e i disordini metabolici associati sembrano influenzare il grado di calcificazione delle arterie coronarie nei pazienti acromegalici. Queste osservazioni sottolineano l'importanza di un trattamento precoce ed adeguato nei pazienti acromegalici ad alto rischio<sup>174</sup>.

### Iperensione arteriosa

L'ipertensione arteriosa sistemica è uno dei più rilevanti fattori prognostici negativi di mortalità. Essa è presente in un terzo dei pazienti acromegalici. Un ruolo importante è giocato anche dalla resistenza insulinica e dal diabete. Si trovano infatti valori di pressione arteriosa più elevati nei pazienti con acromegalia associata a ridotta tolleranza al glucosio o diabete rispetto ai pazienti con normale tolleranza glucidica.

### Eventi aritmici

Disordini del sistema di conduzione sono riportati nel 41% dei pazienti al momento della diagnosi<sup>175</sup>. La frequenza dei complessi ventricolari prematuri aumenta col progredire della patologia e la severità delle aritmie ventricolari è correlata alla massa ventricolare sinistra<sup>175</sup>.

### Danno vascolare

Attualmente sono disponibili ancora pochi dati sul coinvolgimento vasale nell'acromegalia.

Chanson et al.<sup>176</sup> riportano una riduzione del flusso nell'arteria brachiale associato ad un aumento delle resistenze vascolari locali; questo può essere spiegato da un'eterogeneità nella distribuzione dell'output cardiaco.

In uno studio recente Maison et al.<sup>177</sup> hanno dimostrato un'alterazione dei meccanismi di vasodilatazione endotelio-dipendenti con una risposta esagerata agli stimoli vasocostrittori mediati dal simpatico.

Studi con la flussimetria laser hanno recentemente confermato la presenza di disfunzioni endoteliali a livello della circolazione cutanea della mano. Le cellule muscolari lisce vasali conservano la capacità di indurre vasodilatazione cutanea, ma la vasodilatazione endotelio-dipendente risulta alterata e la vasocostrizione simpatico-mediata è aumentata nei pazienti acromegalici<sup>177</sup>.

Gli studi sul microcircolo periferico hanno mostrato un'alterazione dei capillari sia nei pazienti affetti da ipertensione e diabete che in quelli che non ne erano affetti. Questi studi hanno mostrato una riduzione nel numero e nella lunghezza dei capillari a fronte di un aumento dei capillari con andamento tortuoso e serpeggiante<sup>178</sup>.

L'aumento dello spessore medio intimale (IMT) carotideo, che viene considerato un marker precoce di aterosclerosi, è stato osservato in pazienti con acromegalia sia attiva che controllata<sup>179</sup>, benchè i dati non siano univoci<sup>180</sup>. Tuttavia la prevalenza delle placche aterosclerotiche non è maggiore rispetto ai soggetti di controllo.

La flussimetria doppler ha confermato la presenza di disfunzione endoteliale a livello della circolazione cutanea della mano, incompleta vasodilatazione endotelio-dipendente ed aumentata risposta vasocostrittiva simpatico-mediata in pazienti acromegalici normotesi<sup>177</sup>.

## **SCOPO DEL LAVORO**

Valutare la presenza di alterazioni della riserva di flusso coronarico in una popolazione di pazienti acromegalici attraverso l'ecocardiografia transtoracica con stress farmacologico dopo infusione e.v. di adenosina e in pazienti sani. Successivamente è stata valutata l'eventuale correlazione tra la disfunzione microvascolare, in termini di ridotta riserva di flusso coronarico, e l'attività della malattia

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione studiata**

### **Valutazione clinica strumentale**

#### Anamnesi ed Esame obiettivo

Tutti i pazienti sono stati indagati mediante:

- Anamnesi: familiare, fisiologica remota e prossima
- Esame obiettivo con il rilievo di peso, altezza, indice di massa corporea e circonferenza vita e fianchi.

Indagini di Laboratorio

Ecografia e Riserva coronarica

AngioTc

L'angioTC coronarica è stata eseguita in tutti i pazienti con valori di CFR patologica al fine di escludere la presenza di stenosi epicardiche significative.

Holter Pressorio delle 24 ore

ECG Holter delle 24 ore

## **RISULTATI**

### **Caratteristiche cliniche della popolazione e valutazione della CFR**

Le caratteristiche sono presentate nella tabella 1

	<b>Controlli</b>	<b>Acromegalici</b>	<b>P</b>
	<b>(n=48)</b>	<b>(n=39)</b>	
Acromegalia attiva, n (%)	...	28 (72)	...
Età, anni	53 ± 12	52 ± 11	0.8
Età alla diagnosi, anni	...	44 ± 11	...
Tempo dalla comparsa dei sintomi, anni	...	6.7 ± 5	...
Genere maschile, n (%)	25 (52)	22 (56)	0.6
GH, µg/L	...	5.5 (2.8-10)	...
IGF-I, µg/L	...	389 (207-728)	...
IGF-I SDS	...	1.83 (0.97-3.18)	...
Colesterolo totale, mmol/L	4.0 ± 0.9	4.7 ± 1.2	0.6

HDL, mmol/L	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.5
LDL mmol/L	2.8 ± 0.7	3.0 ± 0.9	0.2
Trigliceridi, mmol/L	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.7	0.6
Glucosio, mmol/L	4.1 ± 0.9	5.8 ± 1.4	0.02
BMI	27 ± 3	27 ± 5	0.9
<b>Fattori di rischio cardiovascolare</b>			
Fumo, n (%)	20 (42)	17 (44)	0.5
Ipertensione, n (%)	22 (46)	19 (49)	0.3
Diabete, n (%)	5 (10)	14 (36)	<b>0.01</b>
Obesità, n (%)	8 (17)	8 (20)	0.4
Ipercolesterolemia, n (%)	15 (31)	13 (33)	0.9
Framingham risk score, %	4 (1-5)	5 (1-9)	0.2
<b>Parametri ecocardiografici</b>			
SIVd, mm	9.0 ± 2.2	12 ± 1.6	<b>0.03</b>
PPd, mm	8.4 ± 1.4	12 ± 1.4	<b>0.03</b>
DTD, mm	51 ± 4	32 ± 7	0.8
Massa, g	170 ± 53	200 ± 32	<b>0.02</b>
Indice di massa, g/m <sup>2</sup>	102 ± 26	128 ± 26	<b>0.03</b>
Ipertrofia, indice di massa, n(%)	17 (35)	32 (82)	<b>0.004</b>
Frazione di eiezione, %	65 ± 4	63 ± 7	0.8
Onda E, cm/s	58.1 ± 10.1	56.1 ± 12.2	0.7
Onda A, cm/sec	70.2 ± 10.2	70.1 ± 14.1	0.8
E/A	0.9 ± 0.21	0.8 ± 0.36	0.1
TD, ms	198 ± 15	213 ± 58	0.08



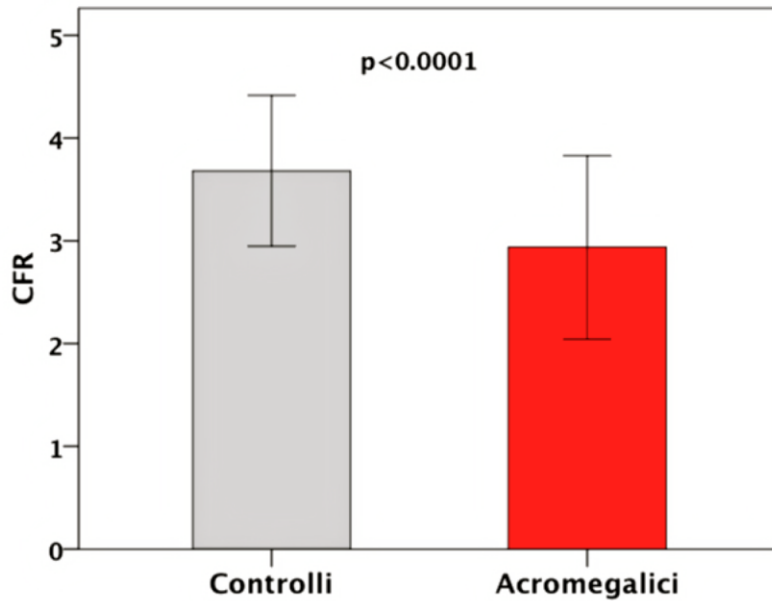
TRI, ms	88 ± 5	91 ± 4	0.2
<b>Grado di disfunzione diastolica</b>			<b>0.04</b>
Assente, n (%)	23 (48)	14 (36)	
Lieve, n (%)	25 (52)	25 (64)	
Moderata, n (%)	0 (0)	0 (0)	
Severa, n (%)	0 (0)	0 (0)	

La CFR era più bassa nei pazienti acromegalici rispetto ai controlli ( $2.9 \pm 0.8$  vs  $3.8 \pm 0.7$ ;  $p < 0.0001$ ) (Tabella 2 e Figura 1)

**Tabella 2: Parametri emodinamici nei controlli e nei pazienti acromegalici (n=87)**

	<b>Controlli</b>	<b>Acromegalici</b>	<b>P</b>
	<b>(n=48)</b>	<b>(n=39)</b>	
FC basale, battiti/min	75 (67-82)	76 (67-84)	0.9
FC durante adenosina, battiti/min	96 (86-110)	95 (81-104)	0.7
PAS basale, mmHg	120 (110-127)	120 (110-140)	0.8
PAS durante adenosina, mmHg	100 (95-115)	110 (100-125)	0.3
PAD basale, mmHg	80 (67-83)	80 (70-82)	0.6
PAD durante adenosina, mmHg	60 (60-70)	70 (60-80)	0.3
VDP basale, cm/s	22 (18-28)	22 (19-26)	0.8
VDP durante adenosina, cm/s	84 (64-97)	68 (53-79)	<b>&lt;0.0001</b>
CFR	$3.8 \pm 0.7$	$2.9 \pm 0.8$	<b>&lt;0.0001</b>

**Figura 1: Confronto CFR nei pazienti acromegalici e CFR nei controlli**



La prevalenza di  $CFR \leq 2.5$  era maggiore nei pazienti rispetto ai controlli (33.3% vs 0%; odds ratio 10.2;  $p < 0.0001$ ).

### Parametri emodinamici in base al valore di CFR

I pazienti con  $CFR \leq 2.5$  tendevano ad avere una velocità diastolica di picco in condizioni basali più elevata dei pazienti con  $CFR > 2.5$  ( $p = 0.08$ ). la velocità diastolica di picco in condizioni di iperemia e la CFR erano significativamente più basse nei pazienti con  $CFR \leq 2.5$  ( $p < 0.0001$  per entrambe le variabili). (Tabella 3)

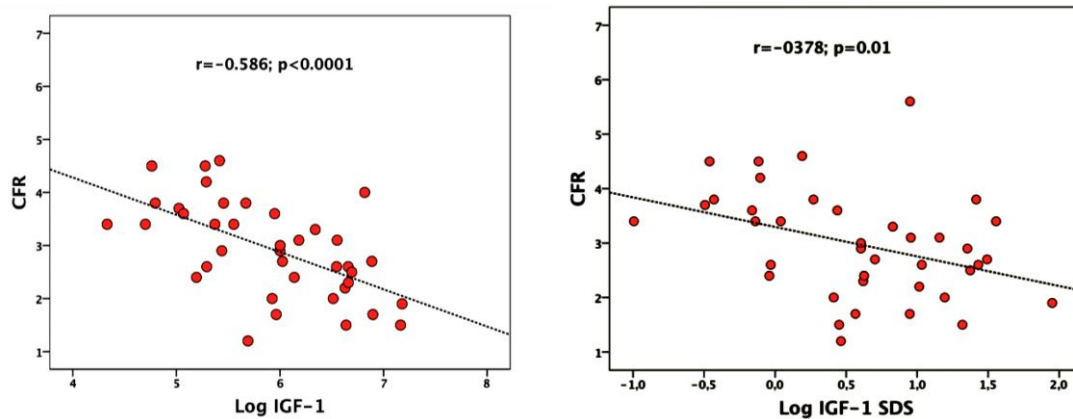
**Tabella 3: Parametri emodinamici nei pazienti con disfunzione micro vascolare ( $CFR \leq 2.5$ ) e nei pazienti con CFR normale (n=39)**

	<b>CFR <math>\leq</math> 2.5</b>	<b>CFR &gt; 2.5</b>	<b>P</b>
	<b>(n=13)</b>	<b>(n=26)</b>	
FC basale, battiti/min	73 (65-85)	77 (68-84)	0.6
FC durante adenosina, battiti/min	92 (75-116)	95 (83-102)	0.9
PAS basale, mmHg	130 (120-140)	120 (108-140)	0.2
PAS durante adenosina, mmHg	120 (107-125)	110 (100-126)	0.2
PAD basale, mmHg	80 (70-82)	80 (70-80)	0.8

PAD durante adenosina, mmHg	70 (60-80)	65 (57-70)	0.08
VDP basale, cm/s	25 (21-31)	21 (19-23)	0.08
VDP durante adenosina, cm/s	43 (38-64)	74 (67-84)	<b>&lt;0.0001</b>
CFR	1.9 ± 0.4	3.4 ± 0.6	<b>&lt;0.0001</b>

### Correlazioni tra la CFR e le caratteristiche cliniche e di laboratorio

L'analisi di correlazione bivariata ha evidenziato una correlazione inversa e significativa tra CFR e IGF-I ( $r=0.586$ ;  $p<0.0001$ ) e tra CFR e IGF-1 SDS ( $r=0.378$ ;  $p=0.01$ ). Al contrario non vi era una correlazione tra CFR ed i livelli di GH ( $r=0.229$ ;  $p=0.2$ ). non sono emerse altre correlazioni significative



### Caratteristiche dei pazienti con disfunzione coronarica micro vascolare (CFR ≤ 2.5)

Le caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti con CFR ≤ 2.5 e dei pazienti con CFR > 2.5 sono presentate nella Tabella 4

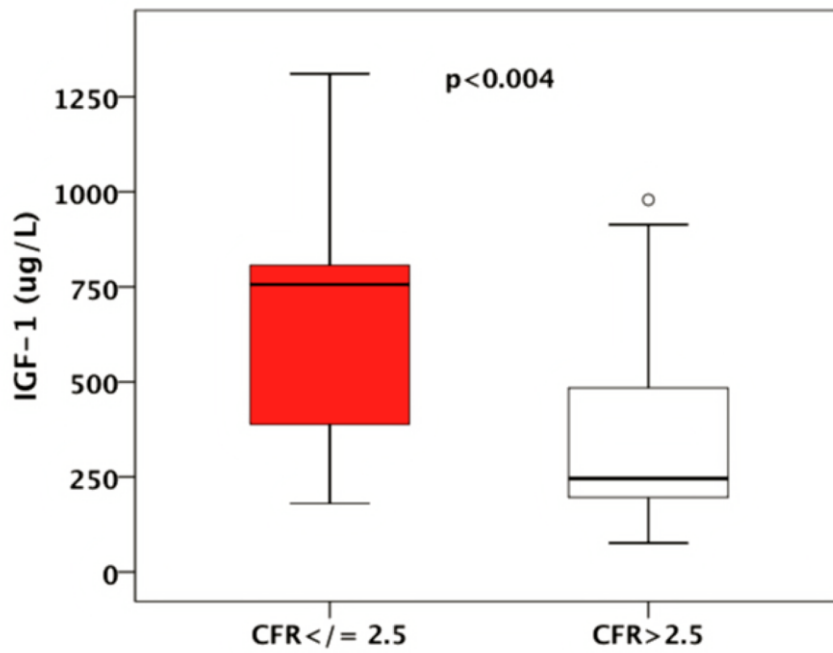
**Tabella 4: Confronto tra i pazienti con disfunzione micro vascolare (CFR ≤ 2.5) e i pazienti con CFR normale**

	CFR ≤ 2.5	CFR > 2.5	P
	(n=13)	(n=26)	
Acromegalia attiva, n (%)	12 (92)	16 (61)	<b>0.04</b>

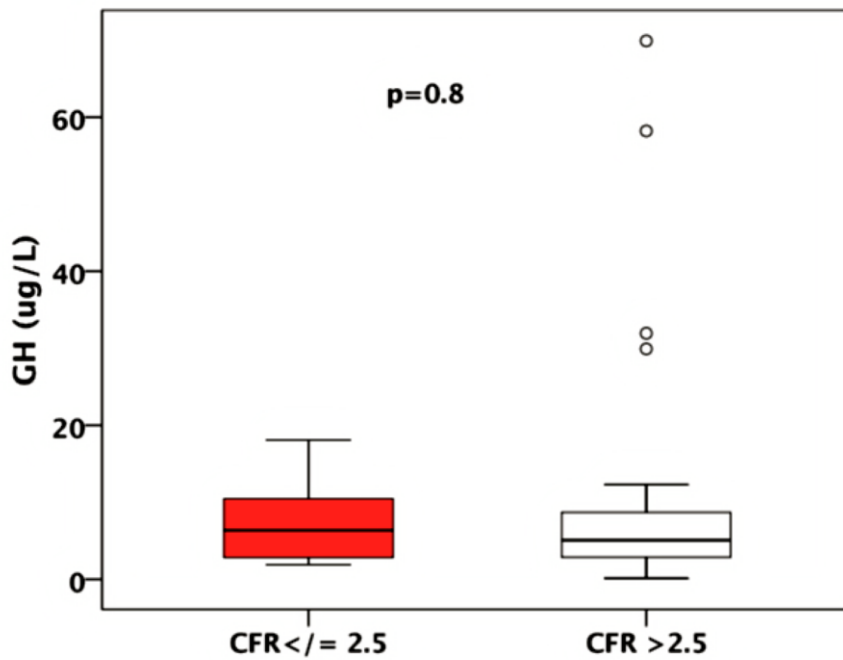
Età, anni	55 ± 9	49 ± 12	0.1
Età alla diagnosi, anni	46 ± 10	42 ± 9	0.3
Tempo dalla comparsa dei sintomi, anni	7 (1-15)	5 (2.7-10)	0.4
Genere maschile, n (%)	7 (54)	15 (56)	0.8
GH, µg/L	6.3 (2.8-13.7)	5.0 (2.8-8.9)	0.8
IGF-I, µg/L	756 (381-898)	246 (186-484)	<b>&lt;0.004</b>
IGF-I SDS	1.6 (0.8-2.1)	2.2 (1.1-3.8)	0.1
Colesterolo totale, mmol/L	4.4 ± 1.2	4.9 ± 1.3	0.2
HDL, mmol/L	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.3	0.4
LDL mmol/L	2.7 ± 0.9	3.2 ± 0.9	0.1
Trigliceridi, mmol/L	1.1 ± 0.7	1.1 ± 0.7	0.8
Glucosio, mmol/L	6.0 ± 1.4	5.8 ± 1.4	0.6
BMI	26 ± 4	27 ± 5	0.7
<b>Fattori di rischio cardiovascolare</b>			
Fumo, n (%)	4 (31)	13 (50)	0.2
Iperensione, n (%)	5 (38)	14 (54)	0.5
Diabete, n (%)	6 (46)	8 (31)	0.3
Obesità, n (%)	3 (23)	5 (19)	0.7
Ipercolesterolemia, n (%)	2 (15)	11 (42)	0.1
Framingham risk score, %	4 (1-11)	5 (1-9)	0.9
<b>Parametri ecocardiografici</b>			
SIVd, mm	11.9 ± 1.5	10.9 ± 1.6	0.08
PPd, mm	11.8 ± 1.4	10.8 ± 1.4	<b>0.05</b>

DTD, mm	50 ± 4	53 ± 9	0.4
Massa, g	215 ± 40	195 ± 30	<b>0.03</b>
Indice di massa, g/m <sup>2</sup>	130 ± 22	115 ± 20	<b>0.04</b>
Ipertrofia, indice di massa, n(%)	11 (84)	15 (58)	<b>0.02</b>
Frazione di eiezione, %	60 ± 5	65 ± 7	<b>0.02</b>
Onda E, cm/s	53.3 ± 10.1	57.1 ± 11.2	0.4
Onda A, cm/sec	72.3 ± 11.2	71.1 ± 11.1	0.7
E/A	0.9 ± 0.31	1.0 ± 0.34	0.6
TD, ms	220 ± 46	210 ± 64	0.6
TRI, ms	88 ± 5	91 ± 4	0.2
<b>Grado di disfunzione diastolica</b>			<b>0.3</b>
Assente, n (%)	5 (38)	9 (35)	
Lieve, n (%)	8 (62)	17 (65)	
Moderata, n (%)	0 (0)	0 (0)	
Severa, n (%)	0 (0)	0 (0)	

La prevalenza di acromegalia in fase attiva era più alta nei pazienti con CFR  $\leq 2.5$  ( $p=0.04$ ). I livelli plasmatici di IGF-1 erano molto maggiori nei pazienti con disfunzione micro vascolare (CFR  $\leq 2.5$ ) ( $p<0.004$ ) (Figura 5).



Non è emersa alcuna differenza tra i due gruppi di pazienti nei livelli plasmatici di GH ( $p=0.8$ ) (Figura 6)



## DISCUSSIONE

Il nostro studio dimostra che pazienti affetti da acromegalia presentano una disfunzione microvascolare coronarica in assenza di coronaropatia all'angioTC e che questa disfunzione è correlata all'aumento dei livelli di IGF-I suggerendo un ruolo del IGF-I nella patofisiologia del danno microvascolare.

L'acromegalia è una patologia che può determinare, se non viene adeguatamente curata, una mortalità prematura soprattutto a causa delle complicanze a carico del sistema cardiovascolare

Gli effetti dannosi sul sistema cardiovascolare in corso di acromegalia sono da imputarsi non tanto l'azione del GH ma quanto agli aumentati livelli di IGF-I.

Il ruolo dell'IGF sul sistema cardiovascolare è ambiguo.

Livelli bassi di IGF-I come nel panipopituitarismo sono stati associati a un'elevata mortalità e morbilità per cause cardiovascolari<sup>181</sup>. Questo è verosimilmente dovuto alla capacità dell'IGF-I di interagire con affinità elevata, a siti di legame endoteliali, contribuendo alla produzione e al rilascio di ossido nitrico, noto potente vasodilatatore<sup>182</sup>. A livello del microcircolo, invece, la vasodilatazione operata dall'IGF sembra essere garantita grazie a meccanismi dipendenti dai canali del K, con un meccanismo endotelio indipendente<sup>183</sup>.

L'effetto protettivo dell'IGF-I è stato evidenziato da *Vasaran et al* che hanno osservato un aumento dell'incidenza di scompenso cardiaco associato a bassi livelli di IGF-I<sup>184</sup> inoltre alcuni studi hanno ipotizzato che l'aumento di IGF-I sia il meccanismo attraverso cui gli ACE inibitori agiscono (Giovannini S, Cesari M, Marzetti E, et al. Effects of ACE- inhibition on IGF-1 and IGFBP-3 concentrations in old- er adults with high cardiovascular risk profile. *J Nutr Health Aging* 2010;14:457-60), infatti la relazione esistente tra angiotensina II e IGF-I è supportata da numerosi studi osservazionali<sup>185</sup>.

D'altra parte livelli patologicamente elevati di IGF-I, come quelli osservati in corso di acromegalia sono stati associati a una più elevata mortalità e a una maggiore prevalenza di malattie cardiovascolari<sup>168,169</sup>. Le azioni negative di livelli costantemente elevati di GH e IGF-I sul sistema cardiovascolare hanno trovato ampia conferma sia negli studi clinici che sperimentali, e più recentemente anche negli studi effettuati sui modelli animali<sup>186</sup>. Tuttavia, se da un lato le alterazioni riguardanti la funzione contrattile sono state ampiamente indagate, meno note sono invece le compromissioni a carico dei vasi, sia a livello del circolo coronarico che a livello periferico. E ancor

minori sono gli studi sul microcircolo coronarico. Solo in un precedente studio<sup>187</sup> effettuato peraltro con metodica scintigrafica (Tallio) era stato ipotizzato che le alterazioni della perfusione miocardica del paziente acromegalico potessero essere imputabili ad una alterazione della micro circolazione.

Nel nostro studio vi è una riduzione della riserva coronarica nei pazienti acromegalici rispetto al gruppo di controllo

Dal punto di vista patofisiologico la riduzione di CFR può risultare dalla combinazione di diversi eventi quali la compromissione della dilatazione, l'aumento della risposta vasocostrittrice e il rimodellamento strutturale della microcircolazione coronarica. Nell'acromegalia è stato riportato un coinvolgimento vascolare con vasodilatazione sia endotelio dipendente (ad opera dell'azione dell'IGF sullo stimolo alla produzione di NO) che indipendente (grazie all'azione diretta dell'IGF-I su specifici recettori che interagiscono con i canali del potassio). Interessante è notare come la riduzione della CFR sia riconducibile ad una diminuzione del flusso durante adenosina e non del flusso basale, riduzione correlata all'aumento dell'IGF-I. A ulteriore riprova della presenza di significative riduzioni delle alterazioni del flusso coronarico e della correlazione dei livelli di IGF-I sono sempre i nostri dati che mostrano una CFR normale rispetto al gruppo di controllo nei pazienti con acromegalia non attiva e non elevati livelli di IGF-I. Nel nostro studio non siamo in grado di dimostrare se la riduzione della CFR possa essere imputabile ad un danno anatomico o funzionale della microcircolazione coronarica del paziente acromegalia. Entrambi questi aspetti tuttavia devono essere tenuti presenti. Sebbene lo studio della CFR con adenosina non distingue tra alterazioni endotelio dipendenti e endotelio indipendenti<sup>189</sup>, le alterazioni riscontrate possono essere ricondotte ad un danno precoce nel processo che porta alla microvasculopatia. Non si può escludere, infatti, la presenza di anomalie strutturali presenti nel microcircolo (calcificazioni o rimodellamenti arteriolar) peraltro già descritte da Schiavon et al che hanno mostrato un danno strutturale con rarefazione dei capillari<sup>178</sup>.

D'altra parte dobbiamo tenere conto che lo stimolo con adenosina induce un aumento del flusso coronarico agendo direttamente sulle miocellule della parete vasale favorendone il rilasciamento e, quindi, la vasodilatazione che è causa dell'iperafflusso misurato a livello della coronaria discendente anteriore. L'iperemia post adenosina è tuttavia almeno in parte mediata anche dall'ulteriore rilascio di sostanze vasoattive prodotte dall'endotelio per effetto dello stress di parete. Sotto questo profilo è stato ad esempio ben dimostrato a livello periferico dei che i pazienti acromegalici possano presentare un aumento delle resistenze o un alterazione del flusso vasale a diversi stimoli farmacologici a causa di una disfunzione endoteliale<sup>177</sup>.



Peraltro nonostante, quindi, la riduzione della CFR possa essere imputabile alle anomalie strutturali presenti nel microcircolo e descritte in letteratura<sup>178</sup> il riscontro di un valore normale di CFR nei pazienti con malattia non attiva (che verosimilmente si possono considerare come controllo post trattamento) sembra escludere la presenza di danni irreversibili, almeno in un sottogruppo di pazienti acromegalici.

## **CONCLUSIONI**

In conclusione dai nostri dati emerge uno specifico ruolo dell'IGF-I nella precoce disfunzione micro vascolare. Nel nostro studio L'IGF-I è correlato indipendentemente da altri fattori di rischio cardiovascolari o da altri determinanti metabolici quali il GH. I nostri dati pertanto aiutano a spiegare perché l'acromegalia è associata ad un incremento della mortalità cardiovascolare, nonostante siano necessari in futuro altri studi riguardo ai meccanismi molecolari di tale patologia.



**DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA  
NELLE PATOLOGIE INFIAMMATORIE**

*Studi Clinici*



# **LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE NEI PAZIENTI OBESI, SENZA ALTRI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI**

## **INTRODUZIONE**

L'obesità è una malattia ad andamento cronico che si caratterizza per un eccessivo accumulo di tessuto adiposo non solo a livello viscerale e sottocutaneo, ma anche in altri tessuti corporei determinando diverse patologie che in Europa, ad esempio, risultano responsabili di circa il 6% dei costi per la salute e causano 1 milione di morti su base annua<sup>190</sup>. La gravità dell'impatto socio-sanitario ed economico dell'obesità è resa ancor più drammatica dalla consapevolezza che l'obesità di per sé e il diabete, che è la complicanza più frequente dell'obesità, sono importanti fattori di rischio cardiovascolare.

Nel 1998 l'OMS ha raccomandato, per la popolazione occidentale, di classificare l'obesità in base all'indice di massa corporea (Body Mass Index, BMI), dato dalla formula: PESO (espresso in Kg) diviso ALTEZZA (espressa in m<sup>2</sup>). Il semplice BMI però non è in grado di distinguere la composizione corporea tra massa magra, massa grassa e componente liquida, e soprattutto non permette di descrivere la distribuzione del grasso corporeo. Un indice che maggiormente correla con il rischio cardiometabolico è il waist, ovvero il diametro della circonferenza vita. Particolare attenzione si è concentrata su questa misurazione, utilizzata come indice indiretto di accumulo a livello viscerale del tessuto adiposo. E' stato dimostrato, quindi, che il rischio di infarto miocardico è statisticamente aumentato negli uomini con circonferenza vita maggiore di 102 cm e nelle donne con circonferenza vita maggiore di 88 cm<sup>191</sup>.

### **L'organo adiposo**

Nell'uomo il tessuto adiposo è prevalentemente tessuto adiposo bianco e si concentra soprattutto nelle regioni sottocutanee e viscerali. Oltre ai ruoli di riserva energetica, protezione contro gli urti, sostegno meccanico a vari organi e isolamento termico, non si può dimenticare che l'adipe è un vero e proprio organo metabolicamente attivo, con un ruolo centrale nel metabolismo dei lipidi e del glucosio e con capacità di secernere una notevole quantità di molecole bioattive, come:

- substrati energetici (acidi grassi liberi, corpi chetonici, glicerolo etc)
- ormoni steroidei quali androgeni ed estrogeni
- alcune proteine chiamate adipocitochine.

Le adipocitochine, in particolare, sono una scoperta relativamente recente che ha permesso di considerare il tessuto adiposo un vero e proprio organo endocrino, in grado di svolgere un ruolo nella regolazione di molteplici processi fisiologici. Oltre al metabolismo di glucidi e lipidi, le adipocitochine contribuiscono, infatti, alla regolazione dell'introito di cibo, della sensibilità insulinica, dell'infiammazione, dell'immunità, della pressione arteriosa, dell'omeostasi vascolare e della coagulazione. La prima adipocitochina a essere stata trovata, sequenziata e studiata, è stata la leptina nel 1994<sup>192</sup>, seguita poi da un numero sempre maggiore di altre proteine, fino ai giorni nostri, nei quali si annoverano oltre 50 molecole prodotte e secrete dall'organo adiposo<sup>193</sup>.

Tra le principali adipocitochine ricordiamo alcune interleuchine, in particolare l'IL-6, il PAI-1, l'angiotensinogeno, i fattori D e C3a del complemento, la leptina, la resistina, l'adiponectina e il TNF  $\alpha$ . Alcune di queste proteine sono prodotte esclusivamente dal tessuto adiposo, sia a livello degli adipociti che delle cellule stromali, altre invece vengono prodotte e secrete in molteplici organi. L'azione delle adipocitochine si esplica mediante meccanismi sia endocrini che paracrini che autocrini, con numerosi bersagli che includono il sistema nervoso centrale, il fegato, il muscolo scheletrico, il pancreas e le cellule endoteliali.

Il tessuto adiposo viscerale è maggiormente implicato nell'insorgenza delle complicanze legate all'obesità rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo; infatti gli adipociti della regione gluteo-femorale sono molto sensibili agli estrogeni e all'insulina e poco sensibili alle catecolamine, mentre gli adipociti omentali hanno un'elevatissima sensibilità lipolitica alle catecolamine, sono spiccatamente sensibili al cortisolo e al testosterone e sono assai poco sensibili all'effetto antilipolitico dell'insulina<sup>194</sup>, inoltre presentano un'importante attività proteino-sintetica, già ampiamente descritta, e una maggiore irrorazione da parte del flusso sanguigno

Il *tessuto adiposo bruno* (BAT), invece, è abbondante durante la vita embrionale e presente in piccole quantità nel neonato, ma è praticamente assente o scarsamente rappresentato nell'adulto, dove generalmente si colloca nelle regioni paracervicali e sopraclaveari

## COMPLICANZE DELL'OBESITA'

Sistema / Organo	Malattie varie
------------------	----------------

Sistema cardiovascolare	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ipertensione arteriosa (RR 2-3)</li> <li>2. Cardiopatia ischemica (RR 2-3)</li> <li>3. Scompenso cardiaco</li> <li>4. Cuore polmonare</li> <li>5. Insufficienza venosa degli arti inferiori</li> <li>6. Tromboembolia polmonare</li> <li>7. Ictus cerebri</li> </ol>
Sistema respiratorio	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dispnea da sforzo ed a riposo (RR &gt;&gt; 3)</li> <li>2. Sdr. delle apnee ostruttive notturne (RR &gt;&gt; 3)</li> <li>3. Sdr. da ipoventilazione (sdr di Pickwich)</li> <li>4. Ipertensione polmonare</li> <li>5. Aumentato rischio post-operatorio (RR 1-2)</li> </ol>
Sistema endocrino – metabolico	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Insulino-resistenza e DM di tipo II (RR &gt;&gt; 3)</li> <li>2. Dislipidemie (RR &gt;&gt; 3)</li> <li>3. Sdr. metabolica (RR &gt;&gt; 3)</li> <li>4. Sdr. dell'ovaio policistico (RR 1-2)</li> <li>5. Alterazioni della funzione riproduttiva (RR 1-2)</li> <li>6. Iperuricemia e gotta (RR 2-3)</li> </ol>
Sistema nervoso centrale	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ansia/alterazioni del tono dell'umore</li> <li>2. Depressione</li> <li>3. Disturbi alimentari</li> </ol>
Sistema gastrointestinale	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Malattia da reflusso gastroesofageo</li> <li>2. Colelitiasi (RR &gt;&gt; 3)</li> <li>3. Ernie addominali</li> </ol>
Sistema muscolo-scheletrico	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Osteoartriti (RR 2-3)</li> <li>2. Ernie discali (RR 1-2)</li> </ol>
Sistema genito-urinario	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Incontinenza urinaria</li> </ol>

Patologie neoplastiche	1.	Mammella (in età post-menopausale) (RR 1-2)
	2.	Ovaio
	3.	Endometrio (RR 1-2)
	4.	Esofago
	5.	Stomaco
	6.	Pancreas
	7.	Colon-retto (RR 1-2)
	8.	Rene
	9.	Prostata

**Tab. I: Complicanze dell'obesità.**

### *Aterosclerosi*

Nel paziente obeso le cause di aterosclerosi sono molteplici. Le malattie correlate all'obesità (ipertensione, dislipidemia, diabete) sarebbero di per sé sufficienti a giustificare l'insorgenza di placche aterosclerotiche nel sistema vascolare di questi pazienti. A questi fattori si associa l'azione specifica delle adipocitochine con elevati livelli di TNF $\alpha$  e IL-6 associati all'insulino-resistenza provocano una riduzione dell'attività dell'Ossido Nitritico Sintetasi con conseguente riduzione del NO e disfunzione endoteliale secondaria all'aumentata vasocostrizione. Lo stato infiammatorio cronico provoca inoltre un aumento della concentrazione dei radicali liberi dell'ossigeno, che ulteriormente peggiorano il danno endoteliale. I bassi livelli di adiponectina provocano una maggior espressione delle molecole di adesione leucocitaria e favoriscono l'uptake del colesterolo all'interno dei macrofagi, che si trasformano così in cellule schiumose. L'aumento del PAI-1, che nel soggetto con obesità centrale può raggiungere anche valori patologici compatibili con uno stato ipofibrinolitico, porta alla formazione di microtrombi e alla inibizione della migrazione indotta dal plasminogeno delle cellule muscolari lisce vasali nelle placche aterosclerotiche, rendendole maggiormente esposte alla rottura. L'aggregazione piastrinica è favorita dall'iperleptinemia ed è presente uno stato procoagulativo secondario alla produzione del fattore tissutale (TF), da parte del tessuto adiposo, implicato nell'attivazione della via estrinseca della cascata coagulativa; infine alcuni fattori della coagulazione sono maggiormente prodotti dal fegato sotto lo stimolo di IL-6 e probabilmente anche per la presenza degli elevati livelli di FFA<sup>195</sup>.

### *Il paradosso dell'obesità*



L'obesità sicuramente favorisce la genesi e la progressione delle malattie cardiovascolari appena citate. Tuttavia alcuni studi hanno rilevato come il calo di peso in pazienti sovrappeso o obesi, già affetti da una qualsiasi patologia cardiaca, può aumentare il rischio di mortalità. Si è visto infatti che soggetti sovrappeso o con obesità di basso grado affetti da cardiopatia ischemica cronica hanno una prognosi sia quod vitam sia verso eventi cardiovascolari maggiori migliore rispetto a pazienti magri<sup>196</sup>. Anche i pazienti affetti da scompenso cardiaco hanno mostrato una prognosi migliore se sovrappeso o obesi<sup>197</sup>. Infine un'analisi post-hoc dello studio canadese APPROACH ha mostrato una minore mortalità nei pazienti andati incontro a rivascolarizzazione coronarica percutanea o chirurgica<sup>198,199</sup>. Questi dati possono in parte correlare con il fatto che il paziente obeso ha una maggior disponibilità di riserve energetiche per contrastare lo stato di catabolismo presente ad esempio nel caso dello scompenso cardiaco cronico, alla maggior attenzione dei medici alla terapia farmacologica in questa tipologia di pazienti e a una migliore tollerabilità alla politerapia a cui va incontro il paziente cardiopatico.

Infine non si deve dimenticare che a fronte di una maggior produzione di TNF  $\alpha$  si ha anche una maggior produzione da parte del tessuto adiposo del suo recettore, che può così ridurre gli effetti biologici avversi. Di contro, altri studi, che non hanno tenuto conto del solo peso o del BMI ma anche del grasso corporeo e della massa magra, hanno evidenziato che i soggetti che presentano un calo ponderale a carico della massa grassa hanno registrato un minor tasso di mortalità.

Tali evidenze pongono ulteriormente l'accento sull'importanza di una accurata diagnostica dell'obesità.

### **L'obesità non complicata<sup>200</sup>**

Storicamente l'obesità è stata considerata un importante fattore di rischio cardiovascolare. Benché questo concetto sia ovviamente tuttora valido, recenti e sempre maggiori evidenze mostrano come l'obesità non sia obbligatoriamente e costantemente associata con un profilo cardiovascolare sfavorevole. Nella pratica clinica, infatti, non è così raro incontrare pazienti affetti anche da obesità grave che non presentano alcun fattore di rischio cardiovascolare. Numerosi e recenti studi hanno mostrato come questa tipologia di pazienti raggiunga circa il 30% di tutta la popolazione obesa, permettendo così di definire l'obesità non complicata come una vera e propria entità clinica.

Come si è visto anche nel caso del paradosso dell'obesità, l'esistenza di un'obesità non complicata deve far riflettere nella ridefinizione dei tipi di obesità che non possono essere distinti solo in base al BMI, ma devono essere classificati in base alla circonferenza vita e quindi alla presenza di tessuto adiposo disfunzionale.

## **OBBIETTIVI DELLO STUDIO**

L'obesità è considerata universalmente un fattore indipendente di rischio cardiovascolare. Un numero sempre maggiore di studi sta però dimostrando che non è la semplice presenza di tessuto adiposo in eccesso a causare il danno d'organo, ma è la presenza di tessuto adiposo disfunzionale, nel quale prevale la produzione di citochine pro-infiammatorie. Pertanto gli obiettivi del nostro studio sono stati quelli di:

- verificare se i pazienti obesi, senza complicanze cardiovascolari note, sviluppino alterazioni della funzione microcircolatoria coronarica in fase ancora subclinica ed eventualmente ricercare i determinanti di tale danno.
- verificare se un calo ponderale significativo comporti un miglioramento del danno d'organo e dei suoi determinanti.

## **MATERIALI E METODI**

Tra Settembre 2008 e Gennaio 2011, abbiamo esaminato 86 pazienti obesi (27% maschi e 73% femmine) rivoltisi consecutivamente e spontaneamente alla nostra Unità Bariatrica facente parte dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Sono stati esaminati inoltre 48 controlli non obesi, scelti per confrontabilità di sesso, età e fattori di rischio. Di questi 86 pazienti obesi 17 hanno a tutt'oggi eseguito follow-up completo dopo significativo calo ponderale (> del 10%), ottenuto o tramite approccio chirurgico (sono stati sottoposti a intervento di chirurgia bariatrica restrittiva) o tramite approccio internistico-dietologico. Il follow up ha compreso la completa rivalutazione internistica per tutti e la rivalutazione cardiologia (in 12 pazienti) per quei pazienti che avevano presentato alla prima valutazione una riserva coronarica ridotta.

### ***Valutazione internistica***

La valutazione internistica, espletata in regime ambulatoriale, è stata eseguita in tre momenti diversi: durante la prima visita è si è provveduto alla raccolta anamnestica e all'esame obiettivo; successivamente ogni paziente è stato sottoposto a prelievo ematico con dosaggio dei marcatori di rischio cardio-vascolare e metabolico. In particolare a ogni paziente è stato eseguito: emocromo con formula leucocitaria, indici di funzionalità renale e ionemia, curva da carico di glucosio prolungata (180 minuti) con dosaggio di glicemia, insulinemia e peptide c, AST, ALT, indici di funzionalità tiroidea, cortisolo libero urinario (per escludere la presenza di un'obesità

secondaria a malattia/sindrome di Cushing), leptinemia, colesterolo totale, LDL, HDL, trigliceridemia, Apo A e Apo B, Acido Urico, Proteina C reattiva ultrasensibile, TNF  $\alpha$  e IL-6. La terza valutazione è stata comprensiva di esame antropometrico, valutazione del dispendio di energia tramite l'utilizzo della calorimetria indiretta a circuito chiuso, valutazione della composizione corporea mediante bioimpedenziometria e colloquio con la dietista con correzione del diario alimentare e indicazioni approfondite, fornite anche in base al risultato della calorimetria, per seguire un regime dietetico ipocalorico/ipolipidico associato ad adeguata attività fisica.

#### *Calorimetria indiretta*<sup>201</sup>

Il calorimetro è un sistema che permette di valutare il metabolismo basale, cioè la spesa energetica a riposo di una persona, mediante la misurazione del volume di O<sub>2</sub> consumato e del volume di CO<sub>2</sub> prodotto. Il rapporto tra questi due volumi determina il quoziente respiratorio (RQ). Affinché la misurazione sia veritiera è necessario che il paziente sia a digiuno da almeno 12 ore, sia posto in un ambiente con una temperatura per lui adeguata e non subisca stimoli fisici o psichici per l'intera durata dell'esame. L'esame ha durata di circa mezz'ora, durante la quale viene raccomandato al paziente di non muoversi, non parlare e non addormentarsi.

Il metabolismo basale, calcolato in Kcal/m<sup>2</sup>, rappresenta circa il 70% della spesa energetica giornaliera totale ed è determinato dalla termogenesi obbligatoria che avviene soprattutto a livello del SNC, del cuore, del fegato e dei reni.

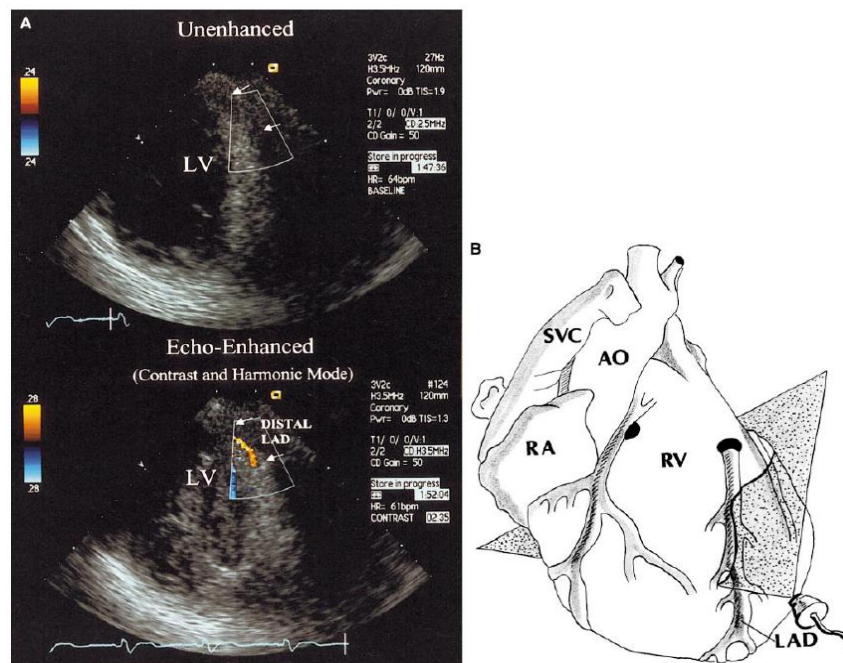
#### *Bioimpedenziometria*

La bioimpedenziometria è un esame che permette di valutare l'idratazione corporea in qualsiasi condizione clinica indipendentemente dal peso corporeo. Vengono applicati al paziente quattro elettrodi cutanei, una coppia sul dorso della mano (preferita la destra), uno sull'articolazione metacarpo-falangea del III dito (elettrodo iniettore) e l'altro sull'articolazione radio-ulnare (elettrodo sensore), e una coppia sul dorso del piede omolaterale, uno sull'articolazione metatarso-falangea del III dito (iniettore) e l'altro sull'articolazione tibiotarsica (sensore). Il paziente viene posto in posizione supina e una corrente di 50 kHz attraversa il corpo del paziente. Sfruttando il principio che i tessuti biologici si comportano come conduttori, semiconduttori o isolanti, si ottiene una stima della composizione corporea..

#### **Valutazione cardiologica**

La valutazione cardiologica ha previsto l'esecuzione di un ecocolordoppler cardiaco con lo studio della riserva coronarica mediante infusione di adenosina (Figura I).

In seguito, pazienti che presentavano a questa prima valutazione una CFR patologica sono stati sottoposti ad una AngioTC coronarica al fine di escludere eventuali stenosi dei vasi coronarici epicardici.



**Figura 1: Metodica ecocardiografica, in particolare è stato messo in evidenza il tratto distale dell'arteria ascendente anteriore su cui è consigliato svolgere lo studio della CFR.**

## ANALISI STATISTICA

Per le analisi statistiche è stato utilizzato il software SPSS versione 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Le variabili in esame con distribuzione continua sono state espresse come valori medi  $\pm$  la deviazione standard.

Si sono quindi utilizzati il test t di Student per le variabili indipendenti, il chi-quadrato ed il Test esatto di Fischer quando appropriati.

Per le correlazioni bivariate della riserva coronarica con le condizioni cliniche si è fatto ricorso al test di Pearson.

Sono state effettuate analisi di regressione lineare multivariata tra la riserva coronarica e i parametri clinici e laboratoristici che si sono dimostrati significativamente correlati ad essa ( $p < 0,1$ ) all'analisi univariata.

Le variabili a distribuzione significativamente diverse dalla normalità ( $p < 0,01$  al test di Schapiro-Wilk) come la circonferenza dei fianchi (HIP), del TNF  $\alpha$  e dell'IL 6, sono state utilizzate dopo essere state trasformate in logaritmo in base 10.

## RISULTATI

Come si può vedere dalla tabella, la popolazione obesa è risultata confrontabile per età, sesso e fattori di rischio rispetto ai controlli (Tabella 1). Il gruppo dei pazienti obesi era costituito soprattutto da grandi obesi con BMI medio superiore a  $40 \text{ kg/m}^2$ , nella maggioranza donne (72%) con età media di  $44 \pm 12$  anni.

Variabile	Controlli (n=48)	Obesi (n=86)	P
Body Mass Index, $\text{kg/m}^2$	$23 \pm 1$	$41 \pm 8$	<0.0001
Circonferenza Vita, cm	$72 \pm 3$	$119 \pm 15$	<0.0001
Indice Vita / Fianchi	$0.75 \pm 0.1$	$0.93 \pm 0.09$	<0.0001
Età, anni	$43 \pm 10$	$44 \pm 12$	0.6
F, n (%)	31 (65)	62 (72)	0.4
Fumatori, n (%)	12 (25)	19 (22)	0.6
Ipertesi, n (%)	20 (42)	40 (46)	0.3
Diabetici, n (%)	9 (18)	21 (24)	0.2
Ipercolesterolemici, n (%)	13 (28)	24 (28)	0.9

**Tabella 1: Caratteristiche demografiche, antropometriche e fattori di rischio presenti nella popolazione obesa confrontati con i casi controllo.**

Dalle indagini biumorali è emerso un profilo lipidico sovrapponibile tra pazienti obesi e controlli, fatta eccezione per i livelli di trigliceridemia che sono risultati significativamente aumentati nei pazienti obesi.

Significativamente più sfavorevole è risultato invece, il metabolismo glucidico con livelli di glicemia e insulinemia media a digiuno più elevati nella popolazione obesa, pur rimanendo nei range di normalità. Contemporaneamente, anche la resistenza insulinica, calcolata mediante l'HOMA (homeostasis model assessment), è risultata significativamente più alta, presentando

nella popolazione obesa valori patologici (se consideriamo come cut-off per patologia valori di HOMA > 2,5).

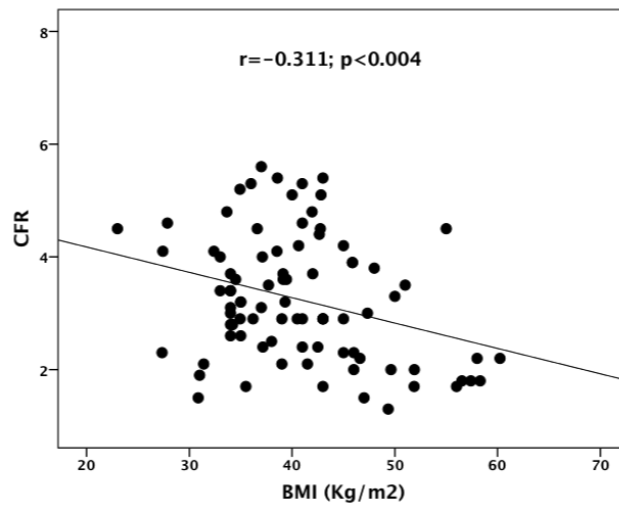
Per quanto concerne il pattern pro-infiammatorio, la nostra popolazione di pazienti obesi non ha smentito i dati noti in letteratura, mostrando livelli di IL-6, TNF  $\alpha$  e hs PCR significativamente aumentati rispetto alla popolazione di controllo (Tabella 2).

Variabile	Controlli (n=48)	Obesi (n=86)	P
Colesterolo totale (mg/dL)	178 $\pm$ 35	210 $\pm$ 146	0,5
LDL (mg/dL)	128 $\pm$ 20	133 $\pm$ 33	0.3
HDL (mg/dL)	49 $\pm$ 9	47 $\pm$ 13	0.7
Trigliceridi (mg/dL)	98 $\pm$ 41	137 $\pm$ 71	<0,05
Glicemia media (mg/dL)	88 $\pm$ 14	98 $\pm$ 13	<0,05
Insulinemia media ( $\mu$ UI/ml)	9 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3	<0,001
HOMA-index	1,4 $\pm$ 0,3	3,44 $\pm$ 1,2	<0,001
IL-6 (pg/ml)	1,1 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 1,2	<0,0001
TNF $\alpha$ (pg/ml)	3,1 $\pm$ 1,3	11,4 $\pm$ 3,4	<0,0001
PCR (mg/L)	0,7 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 1,5	<0,0001

**Tabella 2: Caratteristiche ematochimiche nella popolazione obesa e nella popolazione di controllo**

Infine, i valori medi della riserva coronarica non sono risultati significativamente diversi tra i pazienti normopeso e i pazienti obesi (3,3  $\pm$  0,6 vs 3,2  $\pm$  1 con p = 0,4), ma tra la popolazione obesa vi è un numero significativamente maggiore di soggetti con riserva coronarica patologica. Inoltre è necessario sottolineare come la riserva coronarica dei pazienti obesi, quando patologica, sia particolarmente ridotta con un valore medio di 1,9  $\pm$  0,3.

Proseguendo l'analisi statistica e facendo la correlazione tra i valori di riserva coronarica e il BMI, si è vista la presenza di una significativa correlazione inversa ( $p < 0,004$ ) : all'aumentare del BMI si ha infatti una progressiva riduzione della CFR. (Figura 2).



**Figura 2: Rappresentazione grafica della correlazione tra CFR e BMI**

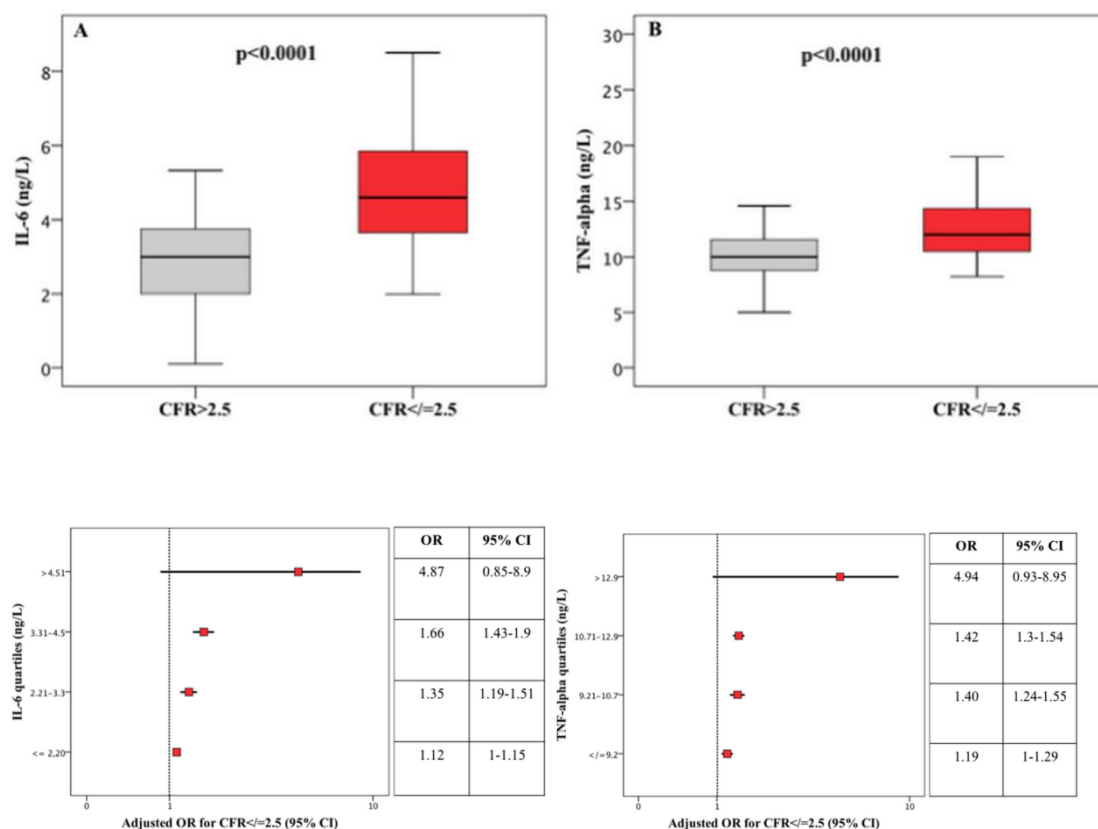
In un secondo tempo si è deciso di analizzare le differenze presenti tra i pazienti obesi con riserva coronarica ridotta e i pazienti obesi con riserva coronarica conservata, le cui caratteristiche sono riportate alla tabella 3

	Obesi con Ris. Cor. $\leq 2.5$ (n=27)	Obesi con Ris. Cor. $> 2.5$ (n=59)	<i>P</i>
M, n (%)	9 (33)	15 (25)	0.4
Colesterolemia totale, mg/dl	217 $\pm$ 46	197 $\pm$ 39	0.1
LDL, mg/dl	143 $\pm$ 31	121 $\pm$ 43	0.06
HDL, mg/dl	40 $\pm$ 8	48 $\pm$ 9	0.1
Trigliceridemia, mg/dl	147 $\pm$ 34	133 $\pm$ 59	0.6
Glicemia, mg/dl	102 $\pm$ 12	95 $\pm$ 12	0.1
Insulinemia, $\mu$ UI/ml	15 (9-31)	13 (7-17)	0.3
HOMA index	3.8 (1.9-7.8)	3.2 (1.7-4)	0.2
hsCRP, mg/l	6.2 (2.6-8.5)	4.4 (1.5-7.2)	0.07
Leptina, $\mu$ g/ml	28 $\pm$ 9	24 $\pm$ 12	0.2

Fumatori, n (%)	5 (18)	10 (17)	0.8
Ipertesi, n (%)	16 (59)	24 (41)	0.1
Diabetici, n (%)	8 (29)	13 (22)	0.4
Ipercolesterolemici, n (%)	7 (26)	17 (29)	0.7

**Tabella 3: Caratteristiche cliniche ed ematochimiche della popolazione obesa suddivisa in due gruppi**

Significativamente aumentati risultano inoltre i livelli delle citochine pro- infiammatorie dosate, TNF  $\alpha$  e IL-6 (rispettivamente in pg/ml 12 vs 10 e 4,6 vs 3 con  $p < 0,0001$ ) (Figura 3).



**Figura 3: Correlazione tra i livelli di citochine infiammatorie e i due sottogruppi della popolazione obesa**

Da un'analisi di regressione lineare univariata si evidenzia che i determinanti con maggiore significatività sono il BMI, i valori delle citochine infiammatorie TNF  $\alpha$  e IL-6, i valori della pressione arteriosa sistolica e, con minor significatività, la circonferenza vita, l'età, la frequenza



cardiaca e i valori di LDL. All'analisi di regressione multivariata, invece, gli unici parametri che hanno confermato il proprio ruolo di determinanti indipendenti nei confronti della CFR sono stati le adipocitochine infiammatorie TNF  $\alpha$  e IL-6 (Tabella 4).

	Analisi Univariata	Analisi Multivariata	
	<i>p</i>	Coefficiente standard $\beta$	<i>P</i>
<b>Body Mass Index, kg/m<sup>2</sup></b>	<b>0.004</b>	-0.19	0.2
Circonferenza Vita, cm	0.05	-0.10	0.5
Età, anni	0.07	-0.04	0.8
Sesso Maschile	0.7	0.13	0.4
Leptina, $\mu\text{g/ml}$	0.3	-0.18	0.2
Log hsCRP, mg/l	0.2	-0.07	0.7
<b>Log IL 6, pg/ml</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.37	<b>0.02</b>
<b>Log TNF <math>\alpha</math>, pg/ml</b>	<b>&lt;0.0001</b>	-0.36	<b>0.02</b>
Log Adiponectina, $\mu\text{g/ml}$	0.8	0.03	0.8
HOMA index	0.4	-0.15	0.4
<b>Pressione Sistolica, mmHg</b>	<b>0.001</b>	-0.15	0.3
<b>Frequenza Card., bpm</b>	<b>0.02</b>	-0.27	0.08
Diabete Mellito	0.1	0.01	0.9
Tabagismo	0.9	-0.18	0.2
Colesterolemia, mg/dl	0.09	0.12	0.4
LDL, mg/dl	0.05	0.19	0.2
HDL, mg/dl	0.6	-0.13	0.4
Trigliceridemia, mg/dl	0.7	-0.06	0.6

**Tabella 4: Analisi di regressione lineare univariata e multivariata tra riserva coronarica (variabile dipendente) e parametri clinici (variabile indipendente) dei soggetti obesi. *p* (ANOVA) del modello multivariato = 0,001.  $R^2$  del modello multivariato = 0,632.**

Da ultimo abbiamo cercato di capire se un calo ponderale significativo ( $\geq 10\%$  del proprio peso corporeo iniziale) comportasse un miglioramento del danno d'organo e dei suoi determinanti. Degli 87 pazienti obesi presi in considerazione in questo studio, 17 a tutt'oggi hanno presentato un calo ponderale significativo. Le loro caratteristiche sono espresse nella **tabella 5**. Di questi 17 pazienti, 12 /hanno registrato una riserva coronarica ridotta. Dato che i valori medi di CFR tra la popolazione obesa e la popolazione normopeso non sono risultati significativamente differenti, si è deciso di ripetere lo studio solo su quei pazienti che avevano una riserva coronarica ridotta.

Dei 17 pazienti che hanno eseguito il follow up 10 erano donne (58%), 3 erano affetti da diabete mellito di tipo 2 (18%), 8 erano ipertesi (47%), 3 i pazienti fumatori (18%) e 6 ipercolesterolemici (35%). 6 pazienti hanno ottenuto il calo ponderale seguendo un percorso internistico-dietologico (35%), 11 sono invece stati sottoposti a intervento di sleeve gastrectomy (65%), continuando però a seguire una dieta ipolipidica/ipocalorica. La scelta tra l'intervento di chirurgia bariatrica restrittiva e l'approccio dietologico si è basata sulla presenza/assenza di indicazioni specifiche all'intervento (età, obesità grave o obesità di II grado in presenza di comorbidità) e sulla volontà espressa dal paziente. Come è evidente dalla tabella V, quasi tutti i parametri studiati sono significativamente migliorati dopo il calo ponderale. I pazienti sono passati da un grado di obesità severo a un'obesità di II grado, con una significativa riduzione della circonferenza vita e di conseguenza del tessuto adiposo disfunzionale. A sottolineare la riduzione di questo tipo di tessuto è la consensuale significativa diminuzione delle citochine infiammatorie e il netto miglioramento del profilo glucidico.

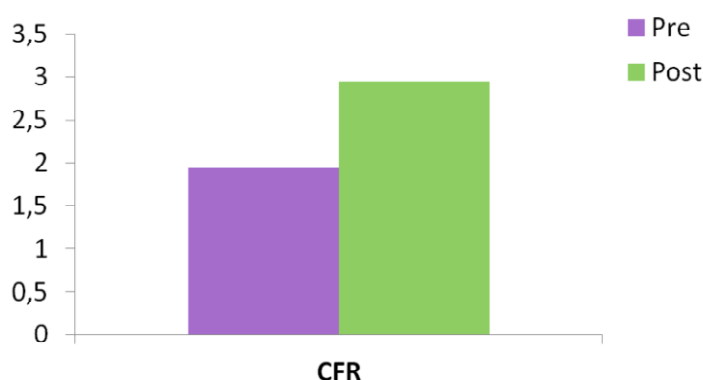
Nessuna significativa modificazione si è invece osservata nel profilo lipidico, fatta eccezione per un lieve miglioramento dei livelli di trigliceridemia.

	<b>Pazienti pre-calò</b>	<b>Pazienti post-</b>	
	<b>ponderale</b>	<b>calò ponderale</b>	<b>P</b>
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	47 ± 10	36 ± 6	<b>&lt;0,0005</b>
Waist (cm)	130,5 ± 15	109,5 ± 12	<0, 0001
Colesterolo (mmol/L)	Tot. 5,37 ± 0,9	5,1 ± 1,2	0,5
HDL (mmol/L)	1,18 ± 0,2	1,22 ± 0,16	0,5
LDL (mmol/L)	3,6 ± 0,8	3,3 ± 0,9	0,4
TGL (mmol/L)	1,8 ± 0,9	1,08 ± 0,5	<b>&lt;0,05</b>

Glicemia (mmol/L)	5,7 ± 0,9	4,5 ± 0,3	< <b>0,0001</b>
Insulina (mU/L)	27,4 ± 17,5	9,4 ± 7	< <b>0,01</b>
HOMA index	6,6 ± 4,7	1,8 ± 1,4	< <b>0,001</b>
hsPCR (mg/L)	7,3 ± 4,8	3,4 ± 3,3	< <b>0,01</b>
IL-6 (pg/ml)	3,9 ± 1,7	2,5 ± 0,9	< <b>0,01</b>
TNF α (pg/ml)	11,5 ± 2,9	8,4 ± 1,6	< <b>0,001</b>

**Tabella 5: Parametri antropometrici e biochimici dei 17 pazienti studiati prima e dopo calo ponderale.**

Tutti i 12 pazienti hanno mostrato un netto miglioramento della riserva coronarica che da patologica, con una media di 1,9, è tornata nei range di norma, con una media di 3,3. (P= 0.002) (Figura 4)



**Figura 4: Valutazione della riserva di flusso coronarico prima e dopo calo ponderale**

## DISCUSSIONE

L'obesità è una patologia che sta assumendo caratteristiche di tipo endemico. Rappresenta un fattore di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari<sup>202,203,197</sup> ed è associata a un rischio di maggiore morbilità e mortalità per tutte le cause. Esiste però un'entità clinica, ancora oggetto di studio, rappresentata da circa un 30% di pazienti obesi che non hanno e non sviluppano complicanze cardiovascolari in un significativamente lungo periodo di osservazione<sup>200</sup>. Tale fatto implica che il semplice aumento di peso e di adipe non è di per sé sufficiente a definire con

certezza un fenotipo esposto ad un più elevato rischio cardiovascolare. Alcuni aspetti qualitativi, piuttosto che la mera valutazione quantitativa del tessuto adiposo, sono essenziali per la definizione dello stato di malattia, per cui numerose ricerche scientifiche hanno infatti posto l'attenzione soprattutto sulla distribuzione dell'eccesso di adipe. E' noto, infatti, che soprattutto il tessuto adiposo bianco viscerale è correlato con un aumentato rischio cardiovascolare ed è responsabile della produzione di numerose citochine pro-infiammatorie e dell'insorgenza dell'insulino-resistenza<sup>204,205</sup>. Da ascrivere al comparto del tessuto viscerale è anche il tessuto adiposo epicardico, che si ipotizza avere un ruolo diretto sul danno coronarico, non essendo separato dal muscolo cardiaco e dai suoi vasi da nessuna fascia.

Il nostro studio ha cercato quindi di valutare la possibile presenza di complicanze cardiovascolari in fase subclinica tramite la combinazione di due metodiche non invasive, come l'ecocardiografia color-doppler trans toracica con adenosina (valutazione della riserva coronarica) e l'angio-TAC, per evidenziare alterazioni aterosclerotiche della parete delle coronariche. I risultati hanno mostrato che la media della CFR nella popolazione obesa è sovrapponibile alla media di quella riscontrata nella popolazione normopeso. Ad una più approfondita analisi dei due gruppi di pazienti si è evidenziato che una CFR patologicamente ridotta (pazienti con  $CFR < 2,5$ ), indicativa di un danno microcircolatorio dei vasi epicardici, è presente in oltre il 30% degli obesi rispetto al 5% della popolazione di controllo. La mancata rilevazione di alterazioni a carico del circolo coronarico nei soggetti con CFR ridotta ha ulteriormente avvalorato l'ipotesi che la riduzione della CFR possa essere ascritta ad un danno primario del microcircolo cardiaco.

Consensualmente ai dati presentati in precedenti lavori scientifici, in cui si è evidenziato un ruolo delle adipocitochine coinvolte nei processi di flogosi cronica nella genesi di complicanze cardiovascolari, anche nel nostro studio la popolazione obesa che presentava una riserva coronarica patologica ha mostrato livelli di TNF  $\alpha$  e IL-6 significativamente aumentati associati a un BMI e a una circonferenza vita significativamente maggiori, rispetto ai soggetti obesi con normale CFR.

La mancata rilevazione di danni a carico del circolo coronarico nei soggetti con CFR ridotta ci ha spinto a considerare come target dei fenomeni infiammatori, che sembrano determinare la riduzione della CFR, la porzione del microcircolo cardiaco.

Se consideriamo che tra i due gruppi (obesi con CFR patologica e obesi con CFR normale) il profilo lipidico, glucidico, i livelli di pressione arteriosa non differivano in maniera significativa, si avvalorava ancora di più l'ipotesi che il danno microvascolare sia a carico della condizione pro-infiammatoria presente in quei pazienti con tessuto adiposo disfunzionale. A ulteriore sostegno

di questa ipotesi è l'analisi di regressione lineare multivariata che indica nel TNF $\alpha$  e nell'IL 6 gli unici due determinanti indipendenti della riserva coronarica.

La principale incognita che si è aperta con la formulazione dell'ipotesi di un danno microcircolatorio sostenuto da fenomeni infiammatori correlati all'obesità riguarda la possibile reversibilità di tale danno.

Per questo motivo si è proceduto ad una rivalutazione complessiva dei pazienti che avevano ottenuto un significativo calo ponderale a distanza di circa 6 mesi.

I dati preliminari, sebbene estremamente esigui dal punto di vista della numerosità campionaria, hanno dimostrato che tutti i pazienti che hanno eseguito lo studio della riserva coronarica dopo calo ponderale hanno mostrato un decremento delle citochine infiammatorie, con una consensuale normalizzazione dei livelli di CFR. Chiaramente l'esiguità del campione non permette di elaborare dei dati con significatività statistica, ma, oltre a non smentire l'ipotesi iniziale, risulta particolarmente incoraggiante, lasciando supporre una assoluta reversibilità del danno microcircolatorio.

## **CONCLUSIONI**

Alla luce del dato globalmente condiviso, che la presenza di una condizione di flogosi cronica è uno dei meccanismi coinvolti nello sviluppo di aterosclerosi e quindi del potenziale sviluppo di vasculopatia sistemica e coronarica, l'evidenza fin qui emersa, che il calo ponderale è in grado di determinare un miglioramento del pattern infiammatorio e di conseguenza di determinare una potenziale reversibilità del danno microcircolatorio, dovrebbe far concentrare maggiormente gli sforzi degli operatori sanitari sulla prevenzione e sul trattamento precoce dell'obesità.

# **LA DISFUNZIONE MICROVASCOLARE CORONARICA IN GIOVANI PAZIENTI AFFETTI DA PSORIASI SEVERA**

## **INTRODUZIONE**

La psoriasi è una patologia cronica infiammatoria molto comune che colpisce il 2-3% della popolazione generale<sup>1</sup>. La distribuzione della malattia ha un andamento bimodale presentando due picchi: 12-27 anni e 50-60 anni. Una predisposizione ereditaria è stata riscontrata nel 30% dei casi: la modalità di trasmissione più accreditata è quella autosomica dominante a ridotta penetranza o con ereditarietà poligenica multifattoriale<sup>3</sup>. La patogenesi della psoriasi è immunomediata: un'associazione di fattori genetici e ambientali innesca una reazione immunologica T-mediata (Th1 e Th17). A questa attivazione immunologica segue un'alterazione della cinetica di proliferazione epidermica. Lo stato infiammatorio è mantenuto da numerose citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e in alcuni casi di psoriasi severa si osservano elevati livelli di PCR. Al giorno d'oggi anche l'aterosclerosi è considerata un complesso processo infiammatorio e immuno-mediato in cui i leucociti e fattori solubili quali citochine infiammatorie, complemento e anticorpi svolgono un ruolo cruciale<sup>208</sup>. Un crescente numero di studi mostra un'augmentata prevalenza di malattia cardiovascolare nei pazienti con psoriasi di grado severo, analogamente a quanto già dimostrato per l'artrite reumatoide o il LES, patologie infiammatorie croniche mediate da linfociti Th1. Tale associazione sembra essere indipendente rispetto ai tradizionali fattori di rischio cardiovascolari (diabete, dislipidemia, ipertensione, fumo, obesità) e potrebbe essere mediata da un'alterazione della funzione microvascolare<sup>209-210</sup>.

### **Strumenti di valutazione del grado di severità della psoriasi**

La severità attribuita alla patologia è un concetto che non può prescindere dalla percezione soggettiva sia del medico che effettua l'esame che del paziente.

Dal punto di vista del medico, la psoriasi si deve considerare di grado "severo" se diffusa estesamente sulla superficie cutanea, se intensamente eritematosa, desquamante o infiltrata, se presente nelle varianti eritrodermica o pustolosa generalizzata, se refrattaria alle terapie (specialmente dopo trattamenti intensivi e a lungo termine o ricoveri) e se fonte di forte disagio per il paziente<sup>211</sup>.

I principali metodi a disposizione del clinico per la valutazione del grado di severità della psoriasi sono rappresentati dai seguenti sistemi di punteggio: Body Surface Area (BSA),

Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI), Physician's Global Assessment (PGA), Self-Administered PASI (SAPASI), Psoriasis Symptom Assessment (PSA) e Dermatology Life Quality Index (DLQI)<sup>212</sup>.

La raccolta di questi indici durante la visita contribuisce a dare una definizione comune del grado di severità della malattia, che tenga conto sia del punto di vista

del medico che di quello del paziente: infatti, il SAPASI, il PSA ed il DLQI vengono calcolati sulla base di questionari compilati dal paziente o di scale analogiche visive (VAS) e riguardano la percezione soggettiva della malattia e la qualità di vita.

Il BSA corrisponde alla percentuale di superficie corporea affetta da psoriasi; per valutarne l'estensione si può utilizzare il metodo del palmo (considerando che il palmo della mano (incluse le dita) del paziente corrisponde all'1% dell'intera superficie corporea) o la "regola del 9" di Fallace (il capo e gli arti superiori equivalgono ciascuno al 9%, ciascun arto inferiore equivale al 18% e il tronco al 36% della superficie corporea totale).

Il PASI integra la valutazione dell'estensione della malattia sulla superficie corporea con la valutazione della severità delle lesioni. Si considerano separatamente 4 regioni corporee: testa, tronco, arti superiori e arti inferiori. L'estensione della malattia in ciascuna delle quattro regioni è quantificata tramite l'attribuzione di un punteggio su scala da 0 a 6 a seconda della percentuale di coinvolgimento cutaneo.

La severità delle lesioni si calcola considerando il grado di eritema, di infiltrazione e di desquamazione: a ognuna di queste tre caratteristiche lesionali (eritema, infiltrato e desquamazione) si attribuisce un punteggio da 0 a 4. Con un'apposita formula (che tiene conto della porzione di tegumento rappresentata da ciascuna regione rispetto al totale della superficie corporea) si integrano i punteggi (ottenuti per ognuna della 4 regioni esaminate) relativi all'estensione di malattia e alla severità delle lesioni e si otterrà il PASI, il cui valore può andare da 0 (assenza di malattia) a 72 (massima severità della malattia) punti.

L'utilizzo del PASI nella pratica clinica garantisce: una buona correlazione con i punteggi ottenuti usando altre tecniche di valutazione del quadro clinico, una buona correlazione fra i punteggi PASI di uno stesso paziente calcolati nel corso di valutazioni ripetute a distanza di tempo dallo stesso esaminatore e tra quelli calcolati simultaneamente da diversi esaminatori, la facilità nell'esecuzione<sup>213</sup>.

Il PASI, pertanto, si deve considerare un ottimo strumento di valutazione nel follow-up del paziente perché riflette miglioramenti e peggioramenti della clinica e quindi l'efficacia delle terapie. Anche la ricerca si avvale dell'indice PASI, dal momento che può fungere da parametro di confronto tra studi diversi: nei trials clinici condotti per la valutazione dell'efficacia dei farmaci, quest'ultima è spesso espressa come percentuale di pazienti che abbiano ottenuto una riduzione del PASI del 90%, 75% e 50% (tali decrementi vengono definiti rispettivamente PASI90, PASI75, PASI50)<sup>214</sup>.

Il metodo PASI, tuttavia, non è scevro da svantaggi: tale punteggio non tiene conto né della percezione della malattia da parte del paziente né della qualità di vita, la valutazione dell'estensione della malattia da parte del medico è spesso imprecisa, i punteggi risultano quasi sempre compresi tra 1 e 10, non vengono considerate aree particolari come le mucose e le unghie<sup>213</sup>. Tutti questi elementi suggeriscono che il PASI non sia sufficiente a definire la severità della psoriasi e vada necessariamente integrato con altri indici.

Il NAPSI può essere utile, accanto al PASI, per un'adeguata valutazione dell'onicopatia psoriasica. Si suddivide ogni unghia in quattro quadranti tramite due linee immaginarie: una longitudinale e una trasversale. In ogni quadrante si valutano separatamente le alterazioni indice di patologia della matrice ungueale (pitting, linee di Beau, onicoressi) e quelle indice di patologia del letto ungueale (chiazze "a macchia d'olio", ipercheratosi sub-ungueale, onicolisi). A ciascuno di questi due tipi di alterazioni si attribuisce un punteggio da 0 a 4

Il PGA è un indice che rappresenta la valutazione complessiva della malattia da parte del medico: l'esaminatore esprime una stima della psoriasi utilizzando una scala comprendente sette gradi di severità della patologia, con lo 0 corrispondente all'assenza di lesioni e il 6 alla malattia molto severa.

Lo svantaggio di questo metodo diagnostico è chiaramente quello di dipendere totalmente dal metro di giudizio del medico, apportando una valutazione estremamente soggettiva. Tuttavia, rispetto al PASI, il PGA è di immediata comprensione anche per altri specialisti in quanto presenta maggiore analogia con i metodi di valutazione clinica usati in altri ambiti della pratica medica; pertanto, questo indice viene frequentemente associato al PASI nella valutazione globale del paziente psoriasico.

Il SAPASI è frutto di una valutazione effettuata autonomamente dal paziente. Per il calcolo di quest'indice, il paziente deve annerire, in base alla propria valutazione personale, due silhouette



(rappresentanti la superficie anteriore e quella posteriore del corpo) in corrispondenza delle aree affette e deve indicare il grado medio di intensità delle lesioni secondo la propria stima in tre scale VAS relative a eritema, infiltrato e desquamazione. Il medico, osservando le silhouette annerite dal paziente, attribuisce un punteggio a ciascuna delle quattro regioni considerate nel calcolo del PASI (testa, tronco, arti superiori ed inferiori), utilizzando la stessa scala di punteggio del PASI: da zero a sei, intendendo con 0 l'assenza di lesioni (e quindi nessun segno grafico apportato dal paziente in quella regione della silhouette) e con 6 la presenza di lesioni coinvolgenti un'area compresa tra il 90 e il 100% di quella regione (annerimento di tutta o quasi tutta la regione da parte del paziente sulla silhouette). Ciascuna delle tre scale VAS è lunga 10 centimetri e millimetrata, pertanto ognuna di esse include valori compresi tra zero e cento. L'eritema, l'infiltrato e la desquamazione vengono indicati rispettivamente come "rossore", "spessore" e "friabilità" delle lesioni per facilitare la valutazione da parte del paziente, che pertanto è capace di apportare un segno sul punto della scala che meglio definisce le caratteristiche cliniche delle proprie lesioni. La stima del livello di severità dell'eritema, dell'infiltrato e della desquamazione è rappresentata quindi dalla lunghezza in millimetri del tratto della VAS corrispondente compreso tra 0 e il segno apportato dal paziente (range 0-100). Il SAPASI si ottiene tramite una formula che integra la percentuale di superficie cutanea coinvolta, calcolata sulla base dell'annerimento delle silhouette da parte del paziente, e la severità delle lesioni indicata dal paziente stesso tramite le scale VAS.

Il DLQI è il più utilizzato indice di valutazione della qualità della vita del paziente psoriasico: si ottiene sommando i punti attribuiti a ogni risposta data (in scala da 0 a 3) ad un questionario composto da dieci domande relative al disagio creato dalla psoriasi nello svolgere le attività quotidiane (studio, lavoro, sport, attività ricreative) e nella vita di relazione, allo stato emotivo del paziente rispetto alla propria malattia e all'impatto delle terapie sulla qualità di vita<sup>215</sup>.

L'interpretazione dei risultati del DLQI è stata oggetto di numerosi studi volti a definire il range di punteggio corrispondente a una seria compromissione della qualità di vita. Uno di questi ha stabilito che il range 0-1 corrisponde a nessun effetto sulla qualità della vita, il range 2-5 a un deterioramento moderato, il range 11-20 a un deterioramento grave e il range 21-30 a un deterioramento gravissimo della qualità di vita<sup>216</sup>. Durante il follow-up dei pazienti in trattamento, i cambiamenti del DLQI correlano con l'efficacia della terapia: per definire una terapia efficace, il punteggio DLQI ottenuto deve essere incluso nel range 0-1 o 2-5 ( $DLQI < 5$ )<sup>211</sup>; quindi, a differenza del PASI, nel caso del DLQI non sono da considerare le riduzioni relative del punteggio ma il range di punteggio assoluto raggiunto dopo il trattamento.

Secondo l'American Academy of Dermatology, la scelta delle terapie da adottare per la psoriasi dovrebbe considerare la qualità della vita del paziente<sup>217</sup>. Pertanto, anche il DLQI dovrebbe essere utilizzato nella stima del grado di severità della psoriasi.

Nella scelta della strategia terapeutica da usare, la severità della psoriasi rappresenta un fattore determinante: è un requisito fondamentale per poter candidare un paziente all'impiego di trattamenti sistemici o caratterizzati da significativi effetti collaterali<sup>218</sup>. Numerose proposte sono state avanzate per individuare criteri standard nella definizione di psoriasi di grado “severo”. Una delle possibilità è l'applicazione della “regola del dieci”: BSA>10%, PASI>10, DLQI>10<sup>216</sup>. Se a questi tre indici si affiancano il SAPASI e il PSA (che sono parametri relativi alla percezione soggettiva della malattia da parte del paziente), si avrà una stima ancora più precisa del reale grado di severità della psoriasi. Secondo le Linee Guida Italiane la psoriasi è “severa” se coinvolge più del 25% della superficie corporea (BSA>25%) o meno del 25% ma con importanti effetti psicologici e sociali e se non risponde alla terapia topica o se coinvolge meno del 25% della superficie corporea ma è caratterizzata da instabilità e progressione rapida. Sono considerate “severe” anche le varianti artropatica e pustolosa di Hallopeau

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo del presente studio è di valutare la CFR che corrisponde, in assenza di stenosi a carico dei vasi coronarici epicardici, alla funzione del microcircolo coronarico, in pazienti giovani e affetti da psoriasi di grado severo. Inoltre abbiamo valutato l'associazione tra una sua eventuale riduzione e una serie di variabili demografiche, cliniche e laboratoristiche.

## **MATERIALI E METODI**

### **I pazienti**

Tra il 2010 e il 2012 abbiamo analizzato 85 pazienti reclutati presso la Clinica Dermatologica dell'Università di Padova. L'età media dei pazienti era 36±7 anni.

### **Strumenti per la stima del grado di severità della psoriasi.**

Per la valutazione della severità della psoriasi abbiamo utilizzato il metodo PASI (Psoriasis Area and Severity Index) (Tabella IV e Figure 12, 13 e 14). Questo indice è stato calcolato al momento dello

studio della riserva di flusso coronarico (CFR) prima del trattamento sistemico della psoriasi e dopo quest'ultimo.

Tabella I: Gradazione del PASI

<b>PASI</b>	<b>0</b> <b>NO</b>	<b>1</b> <b>LIEVE</b>	<b>2</b> <b>MODERATO</b>	<b>3</b> <b>GRAVE</b>	<b>4</b> <b>MOLTO GRAVE</b>
<b>ERITEMA (E)</b>	no	Rossore lieve	Rossore moderato	Rossore intenso	Rossore molto intenso
<b>SPESSORE INFILTRATO (I)</b>	no	Appena palpabile	Facilmente palpabile	Rilevato	Molto rilevato
<b>DESQUAMAZIONE (D)</b>	no	Squame fini, alcune lesioni prive di squame	Squame più spesse, alcune lesioni prive di squame	Squame più spesse, tutte le lesioni sono coinvolte	Squame molto spesse, tutte le lesioni sono coperte

#### **Studio della riserva coronarica mediante doppler transtoracico:**

L'ecocardiografia transtoracica con prove farmacodinamiche è stata la metodica utilizzata per lo studio della CFR: per calcolare questo parametro, i pazienti sono stati sottoposti prima a un'ecocardiografia di base e poi a un'ecocardiografia con stimolo adenosinico.

I diametri ventricolari sinistri telediastolici e telesistolici sono stati misurati mediante M-mode dall'approccio parasternale in asse corto. I volumi ventricolari e le frazioni di eiezione sono stati misurati mediante approccio apicale in proiezione a quattro e due camere con metodo area-lunghezza biplano. La massa ventricolare è stata calcolata secondo la formula di Devereux e indicizzata per la superficie corporea. La funzione diastolica del ventricolo sinistro è stata valutata analizzando il profilo di riempimento diastolico a livello distale dei lembi valvolari mitralici, calcolando il rapporto E/A. Il flusso coronarico è stato localizzato avvalendosi del color-Doppler opportunamente tarato (scala 16-20 cm/s) con adeguato aggiustamento dei filtri di parete e campionando con il Doppler pulsato, massimizzando il campione e ottenendo una rappresentazione della velocità come profilo bifasico, è stato quindi misurato il picco di flusso diastolico in condizioni basali.

La velocità di flusso coronarico è stata valutata a livello della porzione distale della LAD in condizioni di riposo e dopo stimolo con adenosina, somministrata mediante infusione endovenosa (140 µg/kg al minuto per 3 minuti)

Ogni paziente era a digiuno da sostanze contenenti metilxantine (caffè, the, cioccolato, bevande contenenti caffeina) da almeno 48 ore antecedenti l'esame. La CFR è stata calcolata come rapporto tra le velocità massime di flusso diastoliche in condizioni iperemiche e basali rispettivamente, misurate avendo l'accortezza di eseguire il campionamento sempre nello stesso segmento di coronaria. 4.

#### **Analisi statistica**

**Il nostro studio è prospettico, singolo-cieco (dal momento che il cardiologo non conosceva le condizioni cliniche del paziente e l'eventuale miglioramento della psoriasi).**

**Le variabili continue sono state espresse come media±deviazione standard o mediana (IQR) a seconda che avessero una distribuzione normale o anormale; le variabili categoriche sono state espresse come percentuali.**

### **ANALISI STATISTICA**

La differenza tra i gruppi è stata analizzata mediante il test t di Student per dati con distribuzione normale (sia per gruppi di dati indipendenti che appaiati) oppure mediante i test non parametrici di Mann-Whitney e di Wilcoxon (rispettivamente per gruppi di dati indipendenti o appaiati).

La correlazione tra variabili continue è stata valutata attraverso l'analisi della correlazione di Pearson.

L'associazione tra una CFR patologica (<2,5) e il miglioramento della stessa dopo terapia e le singole variabili (demografiche, cliniche e laboratoristiche) è stata analizzata attraverso la regressione logistica multivariata con metodica backward per valutare il peso delle singole covariate

### **RISULTATI**

Abbiamo studiato 64 pazienti adulti affetti da psoriasi e 44 controlli sani con lo studio della riserva coronarica mediante doppler transtoracico con infusione di adenosina.

Le caratteristiche cliniche, laboratoristiche ed emodinamiche sono descritte nella tabella 2

**Tabella 2: Caratteristiche cliniche della popolazione studiata**

	<b>Controlli</b>	<b>Psoriasi</b>	<b>P</b>
	<b>(n=48)</b>	<b>(n=64)</b>	
Età, anni	38 ± 12	36 ± 7	0.8
PASI	...	12 ± 4	...
IL-6 (ng/L)	...	3.7±2.1	...
PCR (ng/L)	...	3.2±2.7	...
TNFα(mg/L)	...	14.7±12	...
Durata della psorisi, anni	7 ± 5	7 ± 5	...
Genere maschile, n (%)	25 (52)	44 (69)	0.06
Artrite psoriasica	...	49 (76)	...
Colesterolo totale, mmol/L	4.0 ± 0.9	4.6 ± 1.2	0.6
HDL, mmol/L	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.5
LDL mmol/L	2.8 ± 0.7	3.0 ± 0.6	0.2
Trigliceridi, mmol/L	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.8	0.6
BMI	27 ± 3	27 ± 4	0.9
<b>Fattori di rischio cardiovascolare</b>			
Fumo, n (%)	20 (42)	34 (52)	0.6
Ipertensione, n (%)	12 (32)	6 (10)	0.04
<b>Parametri ecocardiografici</b>			
SIVd, mm	9.0 ± 2.2	10 ± 1.6	<b>0.6</b>
PPd, mm	8.4 ± 1.4	9 ± 1.4	<b>0.2</b>

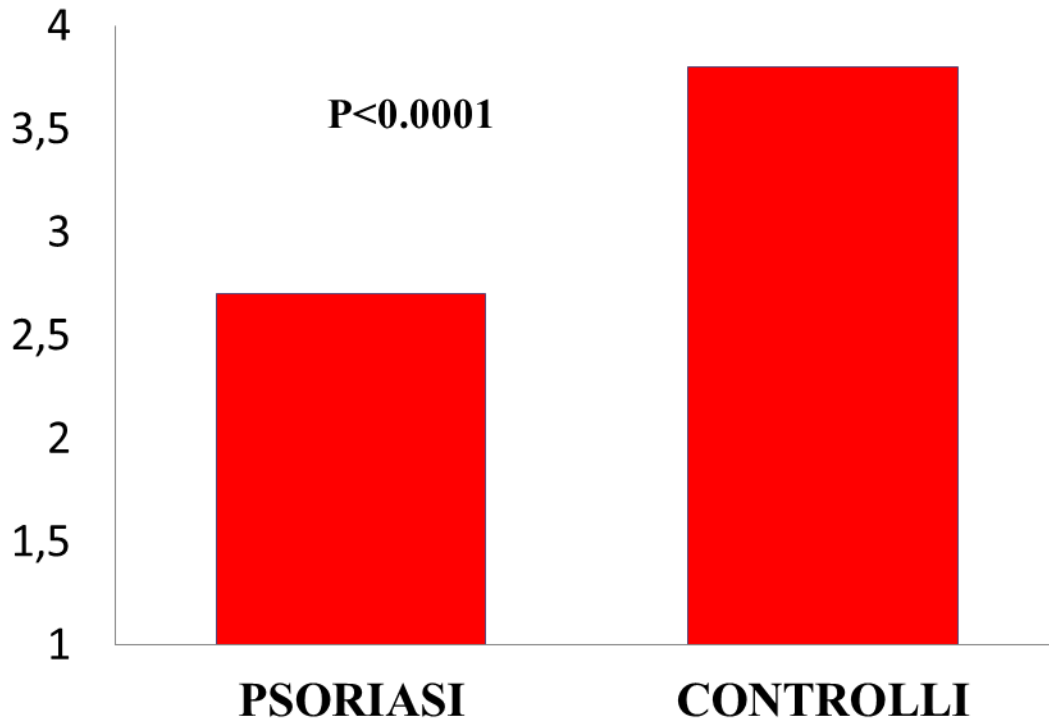
DTD, mm	51 ± 4	45 ± 7	0.8
Frazione di eiezione, %	65 ± 4	63 ± 7	0.8
Onda E, cm/s	58.1 ± 10.1	56.1 ± 12.2	0.7
Onda A, cm/sec	70.2 ± 10.2	70.1 ± 14.1	0.8
E/A	0.9 ± 0.21	0.8 ± 0.36	0.1

La CFR era più bassa nei pazienti psoriasici rispetto ai controlli ( $2.8 \pm 0.8$  vs  $3.8 \pm 0.7$ ,  $p < 0.0001$ ) (Tabella 3 e Figura 1)

**Tabella 3. Caratteristiche emodinamiche della popolazione studiata**

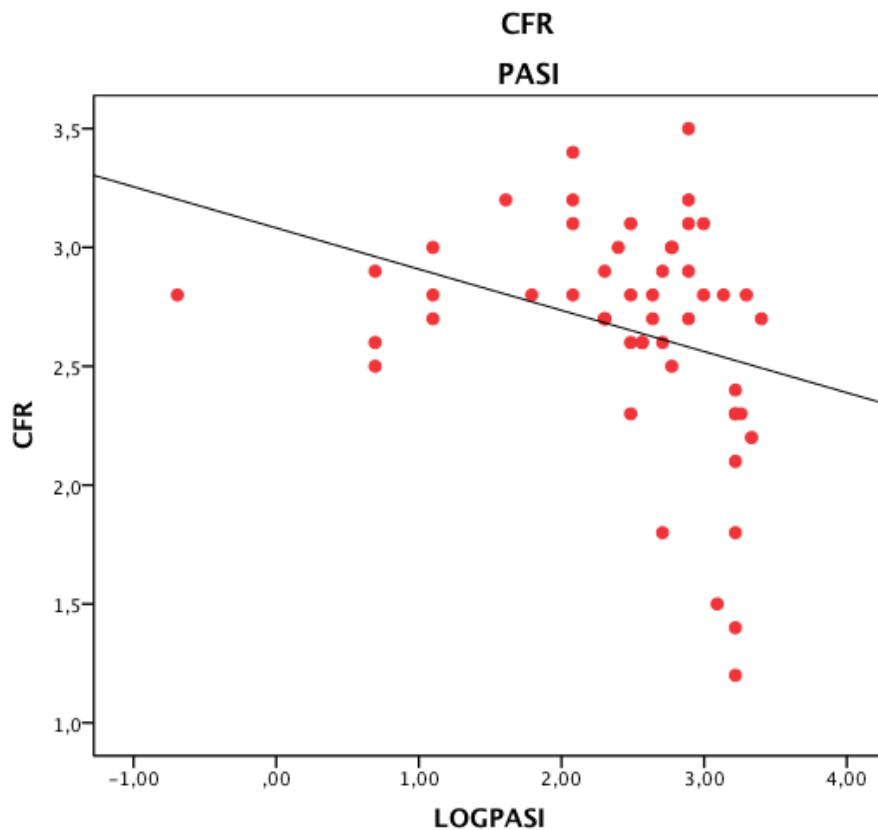
	<b>Controlli</b>	<b>Psoriasi</b>	<b>P</b>
	<b>(n=48)</b>	<b>(n=64)</b>	
FC basale, battiti/min	75 (67-82)	74 (66-84)	0.8
FC durante adenosina, battiti/min	96 (86-110)	94 (84-106)	0.6
PAS basale, mmHg	120 (110-127)	120 (110-130)	0.6
PAS durante adenosina, mmHg	100 (95-115)	100 (100-120)	0.7
PAD basale, mmHg	80 (67-83)	80 (70-80)	0.8
PAD durante adenosina, mmHg	60 (60-70)	65 (60-75)	0.5
VDP basale, cm/s	22 (18-28)	21 (18-25)	0.2
VDP durante adenosina, cm/s	84 (64-97)	60 (53-79)	<b>&lt;0.0001</b>
CFR	$3.8 \pm 0.7$	$2.8 \pm 0.8$	<b>&lt;0.0001</b>

**Figura 3. Confronto CFR tra la popolazione psoriasica e il gruppo controllo**



**Figura 1: Confronto CFR psoriasi e gruppo controllo**

L'analisi di correlazione bivariata ha evidenziato una correlazione inversa e significativa tra CFR e PASI ( $r=-0,085$ ;  $p<0.0001$ ) (Figura 2)

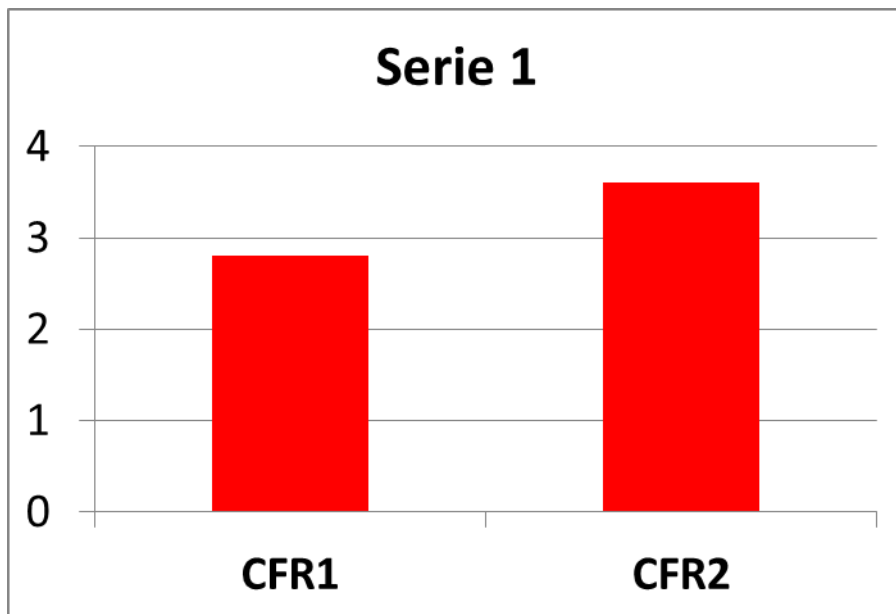


### Follow-up

La mediana di follow up era di 13 mesi (12-20) mesi. Due pazienti, un uomo e una donna hanno avuto NSTEMI. Entrambi avevano la  $CFR < 2.5$ . La coronarografia mostrava una lieve stenosi coronarica senza stenosi significativa della DA nel primo caso e un albero coronarico privo di stenosi epicardiche significative nel secondo ( $X^2=7.6$ ; OR1.2, 95% CI 1.07-1.54,  $p=0.006$ ). Il PASI era  $>15$  in entrambi i pazienti.

Dopo 6 mesi di terapia abbiamo ripetuto la CFR in 42 pazienti. La seconda CFR risultava  $3.6 \pm 0.6$  (vs CFR1,  $p < 0.0001$ ). Figura 2.





**Figura 2: Confronto CFR prima e dopo terapia**

## **DISCUSSIONE**

Il nostro studio dimostra che i pazienti affetti da psoriasi, per lo più grave, presentano una disfunzione micro vascolare coronarica in assenza di coronaropatia all'AngioTC, e che dopo terapia immunosoppressiva si osserva una completa normalizzazione della funzione micro circolatoria coronarica suggerendo un precoce danno micro vascolare correlato alla psoriasi.

Sempre più evidenze mostrano come la Psoriasi sia associata ad un'aterosclerosi accelerata e ad un aumentato rischio di coronaropatia come riportato in altre patologie a carattere infiammatorie come l'artrite reumatoide e il lupus eritematoso sistemico.

Interessante è notare come nei nostri pazienti il rischio di disfunzione micro vascolare, valutato in termini di riduzione della riserva coronarica, è più alto nei pazienti con più alto grado di severità di psoriasi, valutato dal PASI score, indipendentemente dai classici fattori di rischio cardiovascolari. PASI è un affidabile, semplice, riproducibile sistema per valutare l'attività della psoriasi<sup>221</sup> e ai giorni d'oggi è considerato il gold standard per la stadiazione della severità delle manifestazioni cutanee della psoriasi. Inoltre è stato riportato che il PASI correla con gli alti livelli di PCR, interferon-gamma, TNF-alfa, IL-7<sup>222,223</sup>.

I meccanismi che contribuiscono ad un'aterosclerosi accelerata e all'incremento del rischio di eventi cardiovascolari nella psoriasi sono in gran parte sconosciuti e multifattoriali. I nostri risultati supportano il concetto che sia l'infiammazione cronica sistemica a rappresentare un fattore di rischio

per la coronaropatia a causa del danno prolungato e nocivo che provoca a livello dei vasi<sup>224</sup>. In accordo con questo nel nostro gruppo di pazienti giovani affetti da psoriasi hanno una riduzione della riserva coronarica, indice, in assenza di stenosi epicardi che di disfunzione micro vascolare, correlata con il pattern infiammatorio. Svitati meccanismi cellulari e molecolari contribuiscono alla disfunzione micro vascolare osservata nei nostri pazienti; in primo luogo lo stress ossidativo con conseguente riduzione della biodisponibilità dell'ossido nitrico<sup>226</sup>. Inoltre la psoriasi è associata all'incremento dei livelli di citochine pro infiammatorie, in particolar modo al TNF- $\alpha$ <sup>223</sup> che è conosciuto per provocare disfunzione endoteliale e micro vascolare.

## **CONCLUSIONI**

I nostri dati mostrano che la CFR è ridotta in giovani pazienti con severa psoriasi. Pertanto il microcircolo coronarico potrebbe rappresentare un nuovo target per la diagnosi e le scelte terapeutiche e lo studio della riserva coronarica mediante TTE un nuovo strumento per la stratificazione, ancor più per il fatto che è un sistema non invasivo e riproducibile.

Le correnti linee guida in tema di rischio cardiovascolare nella psoriasi si basano quasi esclusivamente sui tradizionali fattori di rischio<sup>210</sup>; la valutazione non invasiva della CFR potrebbe aiutare a capire il rischio cardiovascolare presente in questa patologia.

**FISIOPATOLOGIA DELLA DISFUNZIONE  
MICROVASCOLARE NEL TRAPIANTO CARDIACO**

*Studi clinici*



# LA RISERVA DI FLUSSO CORONARICA PREVIENE E PREDICE L'INSORGENZA DELLA CORONAROPATIA DEL GRAFT CARDIACO

## INTRODUZIONE

### Il trapianto cardiaco

Il trapianto cardiaco, nonostante le nuove scoperte in campo di assistenza ventricolare meccanica, rimane il gold standard per il trattamento dei pazienti affetti da scompenso cardiaco in fase terminale, ritenuto irreversibile, non più suscettibile di terapia medica o chirurgica conservativa e con un'aspettativa di vita non superiore a 6-12 mesi<sup>227</sup>.

La selezione dei pazienti da inserire in lista d'attesa per trapianto cardiaco e la definizione dei criteri di priorità rappresentano un problema clinico importante e tuttora aperto sia per la mancanza di sicuri indici di prognosi nei pazienti con cardiopatia in fase avanzata, sia per il numero insufficiente di organi a disposizione. Ciò rende necessaria un'attenta selezione dei candidati al trapianto per poter garantire che venga data la precedenza ai pazienti in base alla prognosi post intervento<sup>228</sup>.

L'indicazione al trapianto si pone sicuramente e con criterio di priorità per i pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva e che dipendono, per sopravvivere, dalla somministrazione di farmaci inotropi o, addirittura, dall'assistenza meccanica cardiocircolatoria e/o respiratoria.

Secondo la 24° Bethesda Conference i criteri di selezione vengono schematicamente divisi in tre distinte classi di indicazioni:

#### 1) Sicure:

- consumo di O<sub>2</sub> massimo durante test spirometrico (VO<sub>2</sub>) < 10 ml/kg/min con raggiungimento della soglia anaerobica;
- angina grave e invalidante, non trattabile con tecniche di rivascolarizzazione quali bypass o angioplastica;
- aritmie ventricolari sintomatiche e ricorrenti, refrattarie alla terapia.

#### 2) Dubbie:

- consumo massimo di O<sub>2</sub> durante test spirometrico (VO<sub>2</sub>) < 14 ml/kg/min e importanti limitazioni nello svolgimento delle attività quotidiane;
- angina instabile e ricorrente con coronarie non suscettibili di rivascolarizzazione;
- instabilità del bilancio di liquidi e/o della funzione renale nonostante l'impostazione di una corretta terapia e una buona compliance del paziente.

### 3) Inadeguate:

- consumo massimo di O<sub>2</sub> durante test spirometrico (VO<sub>2</sub>) > 15 ml/kg/min;
- frazione di eiezione ventricolare sinistra inferiore al 20%;
- sintomi inquadrabili in III o IV classe NYHA;
- pregresse aritmie ventricolari<sup>236,237</sup>.

## Risultati e complicanze

La sopravvivenza media è di 11 anni per l'intera coorte di pazienti adulti e pediatrici trapiantati da quando è stato istituito il (1982) Registro dell'ISHLT nel 1982 ed ha raggiunto i 14 anni nei cardiotrapiantati che sopravvivono al primo anno post-trapianto; ad oggi quasi 100 pazienti hanno vissuto più di 25 anni dal trapianto.

## Rigetto

Il cuore trapiantato è soggetto all'azione del sistema immunitario del ricevente, che reagisce ai tessuti esogeni del graft con risposte immunitarie umorali B-mediate, ma soprattutto cellulari, mediate dai linfociti T. Queste reazioni sono alla base del fenomeno del rigetto di ogni organo trapiantato e, se non adeguatamente controllate, portano alla distruzione dello stesso; il rigetto quindi è una delle maggiori cause di morbilità e mortalità sia a breve che a lungo termine. A seconda della rapidità di comparsa, viene classificato in iperacuto, acuto (cellulare o umorale) e cronico.

Il rigetto iperacuto si verifica quando sono presenti anticorpi preformati anti-HLA o anti-endotelio nel siero del ricevente. Nel momento in cui il cuore trapiantato viene riperfuso, questi anticorpi si legano ad antigeni endoteliali del donatore; il legame tra anticorpo e antigene specifico attiva il complemento con conseguente comparsa di infiltrato infiammatorio acuto, che determina una necrosi fibrinoide dei vasi del graft. Il risultato è un rigetto immediato e catastrofico che porta ad

un'insufficienza completa del cuore appena trapiantato; si manifesta peri-operatoriamente, da pochi minuti a poche ore dall'intervento. Una selezione dei pazienti con tipizzazione ABO ha eliminato il problema del rigetto dovuto ad anticorpi preformati anti-ABO; inoltre, grazie alla valutazione pre-operatoria della reazione tra il siero del ricevente e i linfociti T e B del donatore con la "reazione di cross-match", gli episodi di rigetto iperaucuto sono ormai molto rari<sup>229</sup>.

Il rigetto acuto cellulo-mediato rappresenta la risposta naturale dell'ospite verso gli alloantigeni del donatore. Il 20-40% dei cardiotrapianti presenta almeno un episodio di rigetto acuto nel primo anno post-trapianto, con un'incidenza maggiore in assoluto nei primi sei mesi dall'intervento; questa complicanza può però potenzialmente ripresentarsi in qualunque momento del follow-up di un trapianto. Questo tipo di rigetto è una risposta immunitaria mediata dalle cellule T attivate e si caratterizza per la presenza a livello miocardico di un infiltrato di macrofagi e linfociti; queste cellule provocano un danno miocardico attraverso meccanismi quali una citolisi mediata da enzimi proteolitici rilasciati dai linfociti T citotossici o tramite l'attivazione della via di trasduzione del segnale Fas/FasL. Dal punto di vista clinico, questi episodi possono presentarsi in maniera del tutto asintomatica (a causa soprattutto della denervazione del cuore trapiantato) o leggermente sintomatica, con leggera dispnea e una ridotta tolleranza allo sforzo; nei casi di rigetto più severo possono comparire segni di disfunzione ventricolare sinistra e alterazioni elettrocardiografiche, quali turbe della conduzione, aritmie sopraventricolari e riduzione dei voltaggi del QRS.

La tecnica più accurata per la diagnosi di rigetto acuto è la biopsia endomiocardica, eseguita di norma a livello della porzione settale del ventricolo destro con accesso tramite la vena giugulare interna destra. La classificazione dei reperti biopistici avviene secondo un sistema di stadiazione redatto dall'ISHLT nel 1990 (Tabella V) e riconosciuto a livello internazionale<sup>230</sup>. Per episodi di rigetto acuto di stadio  $\geq 3A$  il trattamento consiste in corticosteroidi in bolo ad alte dosi e nel potenziamento della terapia immunosoppressiva già in atto<sup>231,232</sup>.

Il rigetto acuto umorale (o vascolare) avviene più precocemente, da qualche giorno a qualche settimana dopo l'intervento, ed è mediato da alloanticorpi diretti contro antigeni HLA o endoteliali del donatore<sup>233</sup>. Il rigetto acuto umorale, con un'incidenza del 7% circa, è molto meno frequente di quello cellulare; fattori di rischio sono costituiti dal sesso femminile, da un importante mismatch degli antigeni HLA del donatore rispetto al ricevente e dalla positività per Citomegalovirus. La diagnosi è data dalla presenza di immunoglobuline e del complemento nei vasi del graft all'analisi di una biopsia endomiocardica. La lesione dell'endotelio dei vasi del graft mediata dagli anticorpi può condurre in modo progressivo alla disfunzione endoteliale, alla coagulazione microvascolare,

all'ischemia miocardica e alla disfunzione del cuore trapiantato; il rigetto umorale si accompagna infatti in quasi la metà dei casi ad un'importante compromissione emodinamica e rappresenta la causa diretta di morte nel 6% dei casi. Questi episodi di rigetto sono trattati con un'intensificazione della terapia immunosoppressiva in associazione a trattamenti specifici per la modulazione della produzione di anticorpi o per la rimozione degli stessi come la ciclofosfamide, il trattamento con immunoglobuline specifiche o la plasmateresi. La disfunzione e il danno endoteliale che caratterizzano questo tipo di rigetto rendono ragione della sua presenza tra i fattori di rischio per l'insorgenza di CAV<sup>234,235</sup>.

## **SCOPO DEL LAVORO**

- Valutare la probabilità di CAV angiograficamente evidente e la probabilità di microvasculopatia, diagnosticata mediante misurazione della riserva di flusso coronarico con metodica ecocardiografica.
- Valutare se la disfunzione microcircolatoria preceda la comparsa di stenosi epicardiche e se questo processo sia l'evoluzione del precedente.
- Stabilire se una  $CFR \leq 2.5$ , indice di una disfunzione microcircolatoria, è un fattore predittivo indipendente per l'insorgenza di CAV in pazienti con coronarie angiograficamente sane.

## **MATERIALI E METODI**

### **I Pazienti**

Tra gennaio 2005 e luglio 2012, presso l'ospedale di Padova, abbiamo studiato 153 pazienti sottoposti a trapianto cardiaco (122 di sesso maschile, con un'età media al momento del trapianto di 52 anni, in un range d'età compreso tra 9 e 73 anni; un tempo medio di ischemia di  $181 \pm 45$  minuti).

La durata media del follow up post trapianto al momento dell'entrata in studio era di 8.5 anni (con un range compreso tra 13 mesi e 19 anni).

Il protocollo immunosoppressivo utilizzato nei pazienti consisteva prevalentemente in una triplice terapia costituita da Ciclosporina, Azatioprina e Prednisone; una minoranza di pazienti era in terapia con Miclofenolato Mofetil e con Tacrolimus. La dose giornaliera di Ciclosporina veniva aggiustata in base alla funzionalità renale del paziente (verificata attraverso la



misurazione della creatininemia) e ai livelli target desiderati (C0): 50-400 ng/mL nei primi tre mesi; 150-300 ng/mL dal 4° al 12° mese; 100-250 ng/mL dopo 12 mesi dal trapianto. Prednisone per via orale veniva associato a una dose pari a 0.1 mg/Kg/die nei primi 6 mesi, quindi sospeso. Solo in caso di rigetto o di insufficienza renale, tali da richiedere una riduzione del dosaggio di Ciclosporina, veniva continuato a basse dosi.

Di questi 153 pazienti abbiamo considerato un sottogruppo costituito da 105 pazienti (79 di sesso maschile, con un'età media al momento del trapianto di  $52,15 \pm 12,2$  anni) che all'inizio dello studio presentavano tutti un angiogramma normale.

### **Rejection Score e dose cumulativa di farmaci immunosoppressori**

Il monitoraggio di un eventuale rigetto acuto veniva effettuato mediante biopsie endomiocardiche secondo protocolli prestabiliti (1 volta a settimana nel 1° mese, 1 volta ogni 2 settimane fino al 3° mese, 1 volta al mese fino al 1° anno; in presenza di un rigetto di grado 2 una biopsia veniva eseguita dopo 10-15 giorni). Alle biopsie è stato assegnato un rejection score basato su una modifica della gradazione dei reperti dell'ISHLT come segue 1A=1, 1B=2, 2=3, 3A=4, 3B=5 e 4=6.

Non **venivano** eseguite biopsie dopo il 1° anno dal trapianto, a meno che non fossero indicate da un quadro clinico sospetto per rigetto acuto. Per ogni paziente **venivano** calcolati il rejection score totale (TRS), il rejection score relativo al 1° anno (RS 1 anno), il TRS comprensivo dei rigetti severi ( $\geq 3^\circ$ ) e il RS 1 anno relativo ai rigetti severi (RS sev 1 anno). Tutti i punteggi **venivano** normalizzati dividendo la somma dei punteggi per il numero di biopsie eseguite sul singolo paziente.

### **3.3 Diagnosi di CAV: ruolo dell'angiografia**

Il cateterismo cardiaco veniva eseguito entro 24 ore dalla valutazione della CFR mediante CE-TTE in tutti i pazienti cardiotrapiantati.

I risultati coronarografici venivano analizzati secondo la stessa classificazione angiografica della CAV utilizzata in un importante studio multicentrico di Costanzo et al e poi validata dal consensus dell'ISHLT del 2010

La CAV è stata definita:

non significativa (ISHLT CAV0) in assenza di lesioni angiograficamente rilevabili;

lieve (ISHLT CAV1) in presenza di una stenosi del tronco comune (left main, LM) < 50%, o di una stenosi di un vaso principale <70%, o di una stenosi di un qualunque vaso secondario < 70%, in assenza di disfunzione del graft;

moderata (ISHLT CAV2) corrispondente ad una stenosi di LM < 50%, o ad una singola stenosi in un vaso principale  $\geq 70\%$ , o a stenosi isolate di vasi secondari  $\geq 70\%$  in 2 sistemi, in assenza di disfunzione del graft;

severa (ISHLT CAV3) corrispondente ad una stenosi di LM  $\geq 50\%$ , o ad almeno 2 stenosi in vasi principali  $\geq 70\%$ , a stenosi isolate di vasi secondari  $\geq 70\%$  in tutti e tre i sistemi, o a una CAV lieve o moderata associata ad una disfunzione del graft.

Sono stati considerati: vasi principali il terzo prossimale e medio dell'arteria discendente anteriore, dell'arteria circonflessa sinistra e dell'arteria coronaria destra dominante (o co-dominante) con l'arteria discendente posteriore e i rami posterolaterali; vasi secondari il terzo distale dei vasi primari o qualunque segmento di un ramo perforatore del setto, i rami diagonali, i marginali ottusi e un qualunque segmento di un'arteria coronaria destra non dominante.

**Tabella n 1** Classificazione angiografica della CAV; ISHLT, 2010

<p><b>ISHLT CAV<sub>0</sub> (Not significant):</b> No detectable angiographic lesion</p> <p><b>ISHLT CAV<sub>1</sub> (Mild):</b> Angiographic left main (LM) &lt;50%, or primary vessel with maximum lesion of &lt;70%, or any branch stenosis &lt;70% (including diffuse narrowing) without allograft dysfunction</p> <p><b>ISHLT CAV<sub>2</sub> (Moderate):</b> Angiographic LM &lt;50%; a single primary vessel <math>\geq 70\%</math>, or isolated branch stenosis <math>\geq 70\%</math> in branches of 2 systems, without allograft dysfunction</p> <p><b>ISHLT CAV<sub>3</sub> (Severe):</b> Angiographic LM <math>\geq 50\%</math>, or two or more primary vessels <math>\geq 70\%</math> stenosis, or isolated branch stenosis <math>\geq 70\%</math> in all 3 systems; or ISHLT CAV1 or CAV2 with allograft dysfunction (defined as LVEF <math>\leq 45\%</math> usually in the presence of regional wall motion abnormalities) or evidence of significant restrictive physiology (which is common but not specific; see text for definitions)</p> <p style="text-align: center;"><i>Definitions</i></p> <p>a). A "Primary Vessel" denotes the proximal and Middle 33% of the left anterior descending artery, the left circumflex, the ramus and the dominant or co-dominant right coronary artery with the posterior descending and posterolateral branches.</p> <p>b). A "Secondary Branch Vessel" includes the distal 33% of the primary vessels or any segment within a large septal perforator, diagonals and obtuse marginal branches or any portion of a non-dominant right coronary artery.</p> <p>c). Restrictive cardiac allograft physiology is defined as symptomatic heart failure with echocardiographic E to A velocity ratio &gt;2 (&gt;1.5 in children), shortened isovolumetric relaxation time (&lt;60 msec), shortened deceleration time (&lt;150 msec), or restrictive hemodynamic values (Right Atrial Pressure &gt;12mmHg, Pulmonary Capillary Wedge Pressure &gt;25 mmHg, Cardiac Index &lt;2 l/min/m<sup>2</sup>)</p>
---

I 105 pazienti con coronarie angiograficamente indenni all'entrata dello studio eseguivano una seconda coronarografia dopo  $3,5 \pm 1.9$  anni.

### **Valutazione della CFR: Ecocontrastografia Doppler trans-toracica**

La valutazione della CFR è stata effettuata utilizzando l'ecocontrastografia, prima e dopo infusione endovenosa di adenosina. La riserva di flusso coronarico è stata misurata lungo la porzione distale della coronaria discendente anteriore da una proiezione a due camere

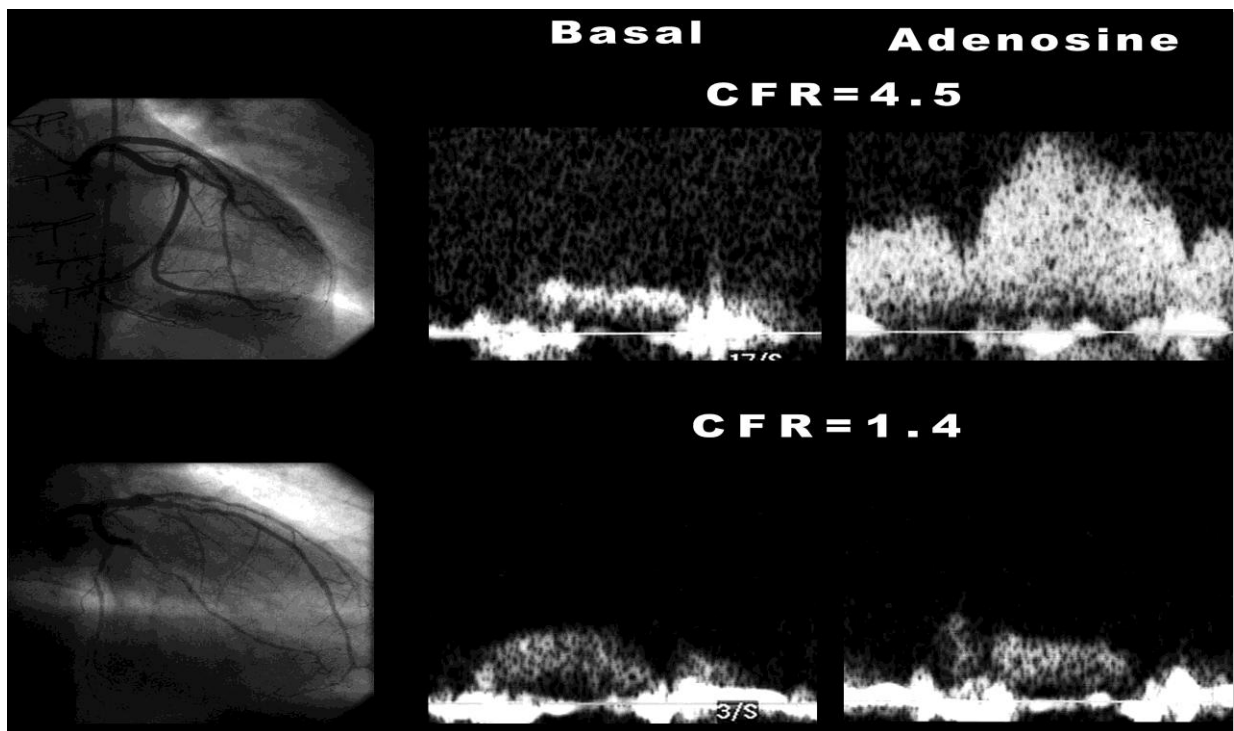
modificata; qualora la valutazione del flusso della porzione distale non fosse realizzabile, è stata utilizzata una proiezione parasternale asse corto alla base cardiaca.

Nel caso in cui l'angolo tra il color flow e l'impulso Doppler fosse maggiore di 20°, è stata effettuata una correzione con il software apposito incluso nello strumento. La somministrazione di contrasto (Levovist, Shering AG, Berlin, Germany) è stata attuata sia prima sia durante l'infusione endovenosa di adenosina, qualora la qualità del segnale Eco-Doppler lo avesse richiesto.

### **Valutazione della velocità di flusso coronarico**

Tutti i pazienti dello studio avevano una registrazione Doppler del flusso della DA durante l'infusione di adenosina al dosaggio di 0.14 mg/Kg/min per 3 minuti. I farmaci cardioattivi non erano interrotti prima del test, eccezion fatta per alimenti o farmaci contenenti metilxantine, sospesi 48 ore prima dello studio. La CFR, ovvero il rapporto tra la velocità di flusso diastolico basale e quello iperemico, veniva valutata da un esperto ecocardiografista. Per ciascuna variabile nel calcolo della CFR veniva fatta la media di 3 cicli cardiaci (Figura 1).

Per definire normale la CFR dei pazienti, **veniva** posto un valore di cut-off >2,5. Alcuni studi hanno infatti dimostrato come questo valore abbia un impatto prognostico sia nei trapiantati sia nei pazienti dopo l'esecuzione di un'angioplastica andata a buon fine.



**Figura 1:** Differenze nella modifica del flusso coronarico in risposta all'adenosina in assenza di CAV (A) e in presenza di CAV diffusa (B); velocità basale (a sinistra) e dopo stimolo iperemizzante (a destra) valutate mediante CE-TTE

## ANALISI STATISTICA

Le variabili numeriche sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard. Le variabili categoriche sono state espresse come percentuali. Il confronto tra medie è stato eseguito mediante il T test di Student per campioni indipendenti ed appaiati o il test esatto di Fischer. Il confronto tra frequenze è stato eseguito mediante test del Chi-quadrato con la valutazione del coefficiente di associazione (K) per valutare la corrispondenza degli indici di diffusione della malattia.

Abbiamo utilizzato un modello di regressione logistica per valutare la probabilità, espressa con OR, di sviluppare CAV angiografica o danno microcircolatorio ( $CFR \leq 2.5$ ), dopo aver aggiustato il modello per le variabili determinanti il danno microvascolare e la CAV angiografica. Sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (PPD) e valore predittivo negativo (NPD) sono stati calcolati in base alle definizioni standard.

L'evidenza angiografica di nuova comparsa di CAV è stata presa come riferimento positivo. L'analisi della curva di Roc è stata effettuata per discriminare il cut off di CFR, più accurato nell'identificare i pazienti con insorgenza di stenosi coronariche.

Le sopravvivenze libere da coronaropatie sono state valutate mediante test di Kaplan-Meier e confrontate mediante test di Long-Rank.

È stata eseguita un'analisi univariata per l'insorgenza della CAV, inserendo sia variabili cliniche che strumentali. Per l'analisi multivariata sono stati costruiti tre modelli (il primo utilizzando le variabili continue, il secondo utilizzando le variabili categoriali e il terzo utilizzando la CFR come variabile categoriale e le altre come variabili continue). I modelli di analisi multivariata di Cox sono stati costruiti utilizzando le variabili risultate predittive o al limite della predittività di insorgenza di CAV, sia al confronto tra gruppo sia all'analisi multivariata di Cox.

La variabilità intra e interosservatore e la riproducibilità del metodo sono state valutate mediante regressione lineare ed espresse come coefficiente di regressione  $r$  ed errore standard della media (dal metodo di Bland-Altman); e mediante coefficiente di correlazione intraclassa. La riproducibilità è stata considerata soddisfacente se il coefficiente di correlazione intraclassa era compreso tra 0.8 e 1.

L'analisi statistica è stata condotta con software SPSS versione 18 (Chicago, SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando la p raggiungeva un valore < 0,05.

## RISULTATI

### Caratteristiche cliniche dei pazienti

Le caratteristiche cliniche e diagnostiche di base del donatore e del ricevente sono riportate in tabella n 2 .

**Tabella n 2 : Caratteristiche cliniche e diagnostiche dei riceventi e dei donatori**

	<b>Totale pazienti (n=153)</b>
Follow up (anni)	7,6 ± 4,8
Età al trapianto (anni)	52 ± 12,5
Sesso maschile (%)	80
Iperensione dopo trapianto (%)	73
Diabete dopo trapianto (%)	15
Fumo (%)	33
Dislipidemia (%)	40
Colesterolo sierico (mmol/L)	5,2 ± 1
Trigliceridi nel siero (mmol/L)	1,7 ± 0,9
Frequenza cardiaca (battiti/min)	86 ± 12
Pressione Arteriosa Sistolica (mmHg)	138 ± 20
Pressione Arteriosa Diastolica (mmHg)	85 ± 14
FE all'eco (%)	67 ± 9
Età del donatore (anni)	35 ± 12
Sesso maschile del donatore (%)	60,5
Differenza di sesso tra donatore e ricevente (%)	12,4

Tempo di ischemia (min)	181 ± 45
CAV (%)	30,7
CAV lieve (ISHLT CAV1)	35,4
CAV moderata (ISHLT CAV2)	16,5
CAV severa (ISHLT CAV3)	13,9
TRS	1,18 ± 0,58
RS 1 anno	1,23 ± 0,64
TRS sev	0,43 ± 0,42
RS sev 1 anno	0,50 ± 0,54

### Valutazione del flusso coronarico

L'ecocontrastografia è stata ben tollerata in tutti i pazienti. Durante l'infusione di adenosina aumentava la frequenza cardiaca rispetto alla condizione basale ( $92 \pm 16$  bpm vs  $86 \pm 12$  bpm,  $p < 0.0001$ ), la pressione sistolica diminuiva ( $126 \pm 23$  mmHg vs  $138 \pm 20$  mmHg,  $p < 0.0001$ ) così come la pressione diastolica ( $78 \pm 14$  mmHg vs  $85 \pm 14$  mmHg,  $p < 0.0001$ ).

Nell'intero gruppo di 153 pazienti (con e senza CAV angiografica), la CFR è di  $2.79 \pm 0.85$  (in un range compreso tra 1.08 e 4.90), risultando minore nei pazienti di sesso maschile o con CAV angiograficamente visibile, in quelli che presentavano una stenosi  $\geq 70\%$  a livello di DA o con diagnosi pre-trapianto di cardiopatia ischemica. A 5, 10, 15 anni dal trapianto cardiaco la probabilità di  $CFR \leq 2.5$  risulta più alta della probabilità di insorgenza di CAV ( $p < 0.0001$ ) (Figura 2).

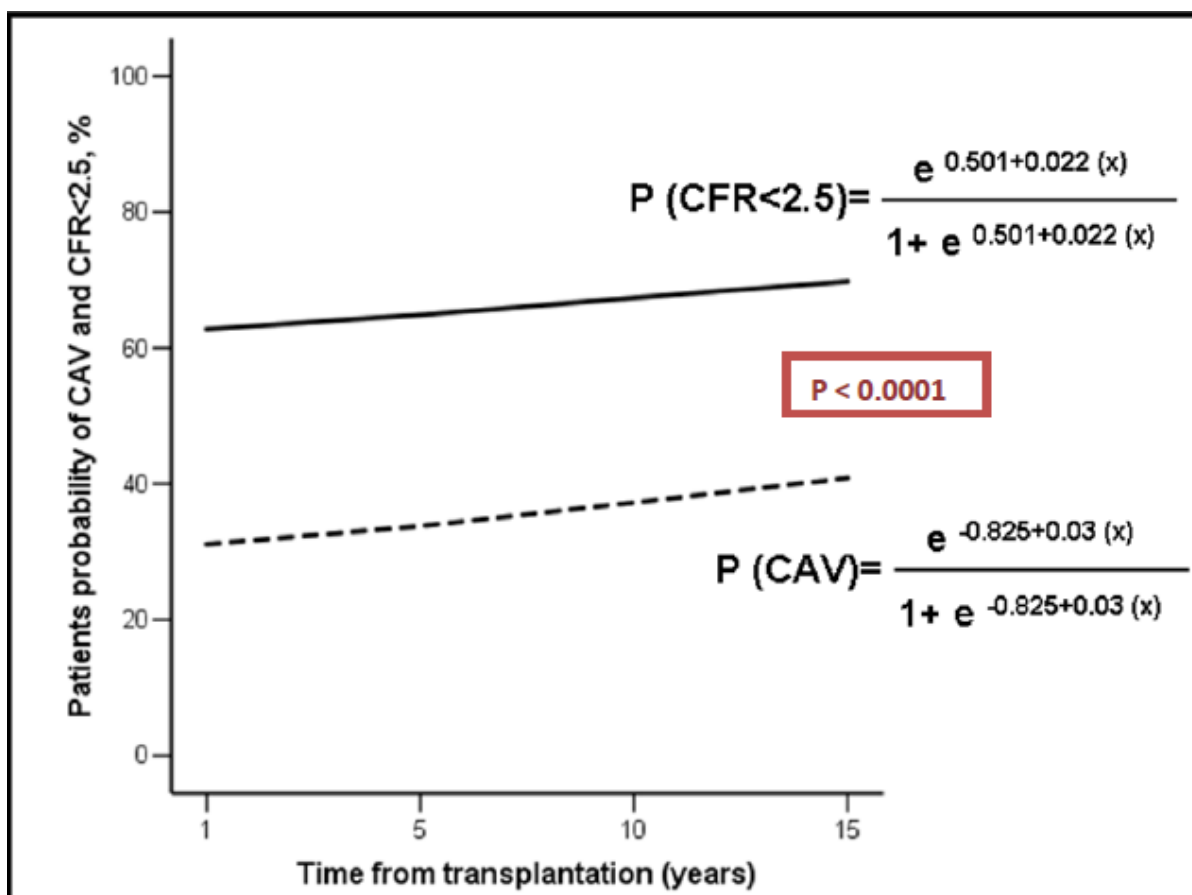


Figura 2: correlazione temporale della probabilità di CAV e di CFR

Dei 105 pazienti con coronarie indenni al reclutamento, 31 (29.5%) presentava una CAV new onset alla seconda CVG e, tra questi, 15 (48%) caratterizzati da un valore di CFR  $\leq 2.5$  al primo studio con CE-TTE. Dei 74 (70,5%) pazienti esenti da CAV alla 2° CVG 65 (87,8%) avevano una CFR  $> 2.5$  concomitante alla 1°CVG.

Nei 31 pazienti che presentavano CAV new onset la CFR è inferiore rispetto a quella riscontrata nei pazienti esenti da tale complicanza (rispettivamente  $2.6 \pm 0.8$  contro;  $p < 0.0001$ ) (Figura 3).

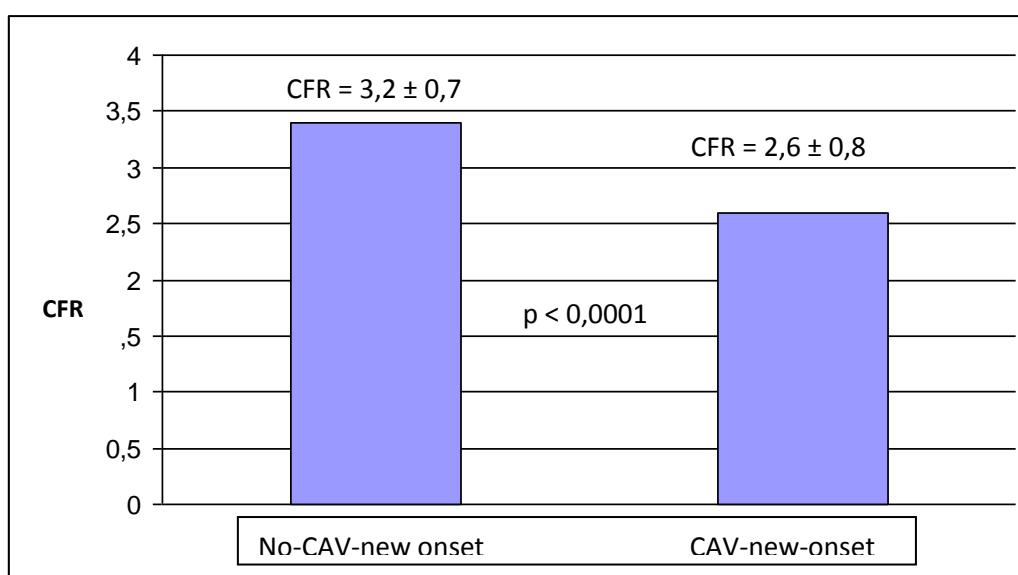
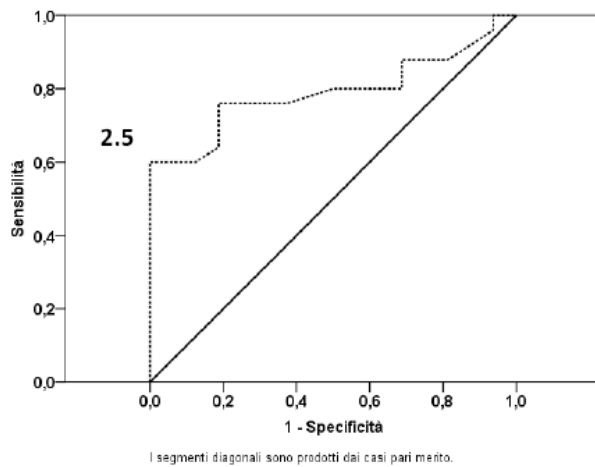


Figura 3: Relazione tra valore di CFR e insorgenza di CAV

All'analisi della curva di Roc, un valore di CFR  $\leq 2.5$  è risultato essere il più accurato nell'identificare i pazienti con nuova comparsa di coronaropatia (figura 4).

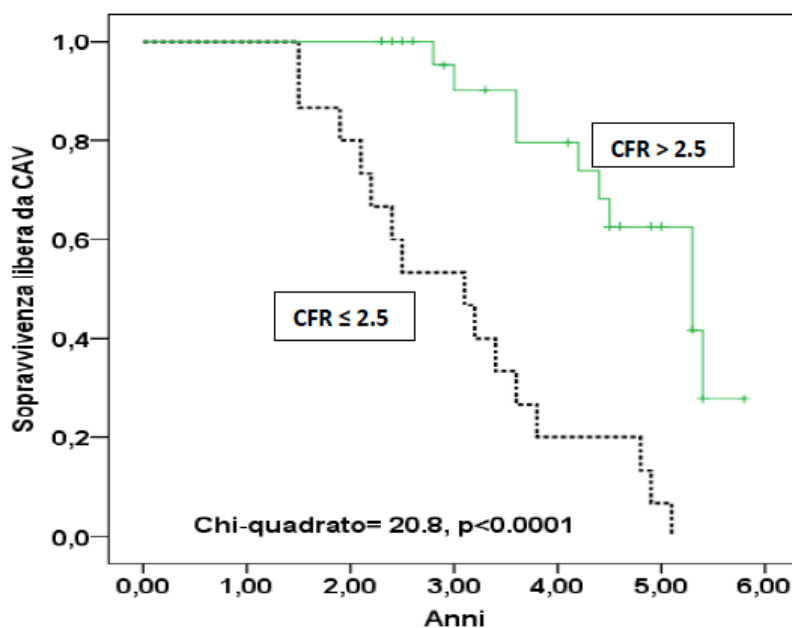


**Figura 4: Curva di Roc**

La sensibilità e il NPV sono di 48% e 80% rispettivamente. La specificità e il PPV sono di 88% e 62,5% rispettivamente. L'accuratezza diagnostica è risultata essere del 76 %.

La probabilità d'insorgenza di CAV in pazienti con CFR  $\leq 2.5$  risulta più di tre volte maggiore (RR = 3,16) rispetto ai pazienti con CFR  $> 2.5$ .

La sopravvivenza libera da CAV angiografica è risultata essere significativamente minore nei pazienti che, a coronarie angiograficamente normali, avevano una riserva di flusso coronarico  $\leq 2.5$  (P = 0.002) (Figura 5).



**Figura 5** Curva di Sopravvivenza libera da CAV



### Fattori determinanti l'insorgenza di CAV angiograficamente rilevabile

Dall'analisi univariata risulta che CFR, RS severo totale e RS severo del primo anno, espressi sia come variabili continue che categoriche, siano fattori predittivi per l'insorgenza di CAV angiograficamente rilevabile. Altri fattori predittivi evidenziati da quest'analisi sono stati il tempo dal trapianto, espresso come variabile continua, e l'età al momento del trapianto, espressa come variabile categorica.

<b>Variabile</b>	<b>RR</b>	<b>95% CI</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
<b>CFR</b>	2,12	1,32-3,42	9,933	<b>&lt;0,002</b>
<b>CFR &lt; 2.5</b>	3,15	1,55-6,43	11,16	<b>&lt;0,002</b>
<b>Tempo dal tx (anni)</b>	1,22	1,06-1,41	7,77	<b>&lt;0,006</b>
Sesso	0,67	0,27-1,64	0,765	0,3
Età al tx (anni)	0,99	0,97-1,02	0,06	0,8
Ipertensione	1,15	0,56-2,33	0,15	0,7
Dislipidemia	1,31	0,4-4,3	0,2	0,6
Diabete	2,1	0,5-9,1	1,2	0,3
<b>RS severo 1 anno</b>	3,7	1,6-8,2	10,9	<b>&lt;0,001</b>
<b>RS severo totale</b>	2,3	1,3-4,1	9,2	<b>0,003</b>
<b>Mediana RS severo 1 anno</b>	2,4	1,12-5,1	5,4	<b>0,02</b>
<b>Mediana RS severo totale</b>	2,4	1,08-5,15	5	<b>0,03</b>
Mediana del tempo dal trapianto (anni)	1,8	1,13-3,6	2,7	0,1
Mediana età al trapianto	1,9	0,9-4,1	3,1	<b>0,08</b>

Dall'analisi multivariata, in tutti e tre i modelli, la CFR espressa sia come variabile continua che categorica risulta essere un fattore predittivo indipendente per l'insorgenza di CAV angiograficamente rilevabile. Anche il RS severo del primo anno, il tempo dal trapianto e l'età al trapianto, espressi come variabili categoriche, risultano essere fattori predittivi indipendenti per l'insorgenza di CAV angiograficamente rilevabile.

**Tabella 3: Relazione dell'insorgenza di CAV con variabili continue**

$\chi^2$	Variabili	RR	95% CI	p
	CFR	2,5	1,5 – 4,3	< 0,001
	Tempo dal trapianto	1,2	1,1 – 1,4	< 0,003
	RS severo 1 anno	3,6	1,5 – 8,5	< 0,005

25.869 p < 0,0001

**Tabella 4 : Relazione dell'insorgenza di CAV con variabili categoriche**

Variabili	RR	95% CI	p
CFR < 2,5	4,8	2,1 – 11,0	< 0,0001
Mediana del tempo dal trapianto	2,6	1,2 – 5,8	< 0,017
Mediana età al trapianto	3,2	1,4 – 7,3	< 0,006
Mediana RS severo 1 anno	2,0	1,1 – 4,4	< 0,083

$\chi^2$  25.383 p < 0,0001

**tabella 5** : Relazione dell'insorgenza di CAV con variabili continue e categoriche

	<b>Variabili</b>	<b>RR</b>	<b>95% CI</b>	<b>p</b>
$\chi^2$	CFR < 2,5	3,5	1,7 – 7,2	< 0,001
	Tempo dal trapianto	1,2	1,1 – 1,4	< 0,007
	RS severo 1 anno	3,6	1,5 – 8,6	< 0,005

27.824 p < 0,0001

Dall'analisi multivariata risulta che CFR e tempo dal trapianto, espresse sia come variabili continue che categoriche, siano fattori predittivi indipendenti per l'insorgenza di CAV angiograficamente rilevabile. Anche il RS severo del primo anno, espresso come variabile continua, e l'età al trapianto, espressa come variabile categorica, risultano essere fattori predittivi indipendenti.

## **DISCUSSIONE:**

La vasculopatia del paziente cardiotrapiantato (CAV) è un processo patologico diffuso, coinvolgente l'intero albero coronarico, compreso il microcircolo: in presenza di una cav angiograficamente rilevabile (caforio 2004).

Dai nostri dati emerge che la probabilità di una disfunzione microvascolare, valutata in termini di CFR ridotta ( $CFR \leq 2.5$ ) è maggiore della probabilità di sviluppare una CAV definita come la presenza di stenosi coronariche epicardiche. In quest'ottica il nostro studio ha anche dimostrato che la disfunzione microvascolare, valutata mediante la misurazione della riserva di flusso coronarico (CFR) è un predittore indipendente di insorgenza di vasculopatia epicardica.

Dallo studio PITA emerge come in presenza di una CAV angiograficamente rilevabile, oltre alla stenosi dei vasi epicardici sia presente un danno microvascolare. Tuttavia è stato dimostrato come la comparsa di stenosi epicardiche sia un riscontro tardivo mentre il processo patologico a carico dell'albero coronarico inizia precocemente nel primo anno post trapianto, con ispessimento intimale diffuso e rimodellamento della parte vascolare ma conservazione iniziale del lume soprattutto a livello dei vasi epicardici (9). A conferma di questo Fearon et al, ha dimostrato, accoppiando la misurazione della CFR alla misurazione della Fractional Flow Reserve la presenza di una disfunzione microcircolatoria in pazienti privi di CAV angiograficamente

significativa. Il valore della CFR rappresenta un'indicazione dello stato funzionale dell'intero sistema coronarico ed una sua eventuale diminuzione identifica quindi la presenza di una lesione ma non la sede della stessa. La FFR, misurando la differenza di pressione a monte e a valle di una stenosi epicardica, fornisce una valutazione più accurata sull'impatto funzionale di tale stenosi. La misurazione simultanea di questi due parametri fornisce quindi informazioni aggiuntive sullo stato funzionale del circolo coronarico e permette di differenziare la sede della patologia coronarica, tra epicardica e microcircolatoria. Nel 15% dei pazienti studiati si osservava una diminuita CFR associata ad una normale FFR, in questi pazienti quindi un'alterata risposta allo stimolo iperemizzante era dovuta esclusivamente ad una microvasculopatia<sup>236</sup>.

I due processi patologici che portano ad una disfunzione microcircolatoria e all'insorgenza della CAV sono in realtà manifestazioni diverse di una stessa entità patologica. Infatti, dalla letteratura si evince che i determinanti sono gli stessi, ovvero che siano prevalentemente episodi di rigetti acuti avuti in passato a determinare disfunzione endoteliale ed ad avere indotto la formazione di piccole cicatrici fibrose a livello miocardico e che quindi sia un unico fenomeno immunomediato ad essere responsabile della CAV nel cardiotrapiantato cui contribuiscono poi numerosi fattori non immunologici<sup>237</sup>.

A conferma ulteriore di questo sono proprio i nostri dati: nel gruppo di pazienti cardiotrapiantati con coronarie angiograficamente indenni considerati nel nostro studio, il rischio relativo di comparsa di stenosi coronariche risulta tre volte maggiore nei pazienti con  $CFR \leq 2.5$  rispetto a quelli con  $CFR > 2.5$ . Secondo la nostra analisi statistica, una disfunzione microvascolare in termini di ridotta CFR costituisce un fattore predittivo indipendente per l'insorgenza di CAV angiograficamente rilevabile. In assenza di stenosi epicardiche una diminuita CFR è indice di alterazioni a carico del microcircolo coronarico; la disfunzione microcircolatoria, diagnosticata in modo non invasivo grazie alla misurazione di CFR tramite TTE, costituisce quindi un fattore predittivo per l'insorgenza di CAV epicardica.

## **CONCLUSIONI**

In conclusione possiamo affermare che la probabilità di una disfunzione microvascolare è più alta della probabilità di CAV angiografica e che tale rimane nel tempo. In secondo luogo possiamo dire che una disfunzione microvascolare, in termini di ridotta riserva di flusso coronarica, è un predittore indipendente di insorgenza di CAV diagnosticabile con la coronarografia.

# **CORRELAZIONI ANATOMO-FUNZIONALI DELLA MALATTIA DEL MICROCIRCOLO NEL TRAPIANTO DI CUORE**

## **INTRODUZIONE**

La vasculopatia dell'allograft rappresenta il maggiore fattore limitante la sopravvivenza del paziente trapiantato di cuore<sup>236</sup>. Il 15% dei pazienti sviluppa a lungo termine una disfunzione del graft, pur in presenza di coronarie angiograficamente indenni, identificando un sottogruppo di pazienti in cui la patologia si esplica a livello microcircolatorio indipendentemente dal danno alle coronarie epicardiche e ne condiziona negativamente la prognosi. Dal punto di vista istopatologico, circa il 40% dei trapiantati di cuore sviluppa un quadro di rimodellamento ipertrofico/iperplastico a carico della tonaca media arteriolare osservabile a livello della biopsia endomiocardica per il monitoraggio post trapianto. Tale parametro costituisce un fattore prognostico negativo indipendente di outcome a lungo termine, sia dal punto di vista d'insorgenza di eventi cardiaci avversi maggiori, che di sviluppo di vasculopatia del graft a livello epicardico.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Il nostro studio si propone di valutare nel follow-up a lungo termine di pazienti sottoposti a trapianto cardiaco e privi di malattia coronarica dell'allograft a livello epicardico, valutata alla coronarografia, i seguenti punti:

- 1) il rimodellamento strutturale del microcircolo, con morfometrica su biopsia endomiocardica;
- 2) la correlazione anatomico-clinica tra il dato funzionale della riserva di flusso coronarica (CFR) e il substrato patologico microvascolare;
- 3) l'esistenza di un determinato profilo clinico-biochimico dei pazienti trapiantati che nel follow-up sviluppano microvasculopatia, indagando se esista correlazione tra parametri quali età del donatore, sesso del ricevente, sex mismatch del trapianto, diabete, ipertensione ed il profilo anatomico-funzionale dei pazienti.

## **MATERIALI E METODI**

Tra gennaio 2004 e maggio 2012 presso l'ospedale di Padova sono stati studiati un sottogruppo di 28 pazienti (25 di sesso maschile) dei 105 pazienti sottoposti a trapianto cardiaco presso l'ospedale di Padova.

Il protocollo immunosoppressivo utilizzato nei pazienti consisteva prevalentemente in una triplice terapia costituita da Ciclosporina, Azatioprina e Prednisone. La dose giornaliera di Ciclosporina veniva aggiustata in base alla funzionalità renale del paziente e ai livelli target desiderati (C0): 50-400 ng/mL nei primi tre mesi; 150-300 ng/mL dal 4° al 12° mese; 100-250 ng/mL dopo 12 mesi dal trapianto.

Il Prednisone per via orale veniva associato a una dose pari a 0.1 mg/Kg/die nei primi 6 mesi, quindi sospeso. Solo in caso di rigetto o insufficienza renale tale da richiedere una riduzione dei dosaggi di Ciclosporina veniva continuato a basse dosi.

Le biopsie sono state scelte nella serie delle biopsie eseguite nel follow-up da protocollo internazionale del primo anno, e per i pazienti per i quali la CFR è misurata nel follow-up a lungo termine è stata considerata la biopsia più recente.

### **Diagnostica clinica**

#### 1) Misurazione della CFR.

#### 2) Coronarografia

La coronarografia viene effettuata tramite iniezione selettiva di mezzi di contrasto radiopachi all'interno della circolazione coronarica. L'esame dura circa 30 minuti e prevede un digiuno da almeno 8 ore ed eventuale premedicazione in caso di pazienti con allergia a mezzo di contrasto.

Si parte con l'introduzione di un catetere tramite accesso dall'arteria radiale, femorale e brachiale. La tecnica più utilizzata è quella di Judkins, con approccio percutaneo all'arteria tramite puntura percutanea con ago di Seldinger.

Il protocollo di follow-up coronarografico del paziente cardiotrapiantato prevede:

- ogni settimana nei primi 3 mesi

- ogni 15 giorni nel secondo trimestre
- ogni mese dai 6 ai 12 mesi
- ogni uno-due anni

La CAV viene classificata secondo l'attuale schema proposto dalla ISHLT 2010<sup>237</sup>

## **Diagnostica patologica**

### 1) Biopsia endomiocardica

Il protocollo attuale di follow-up del paziente trapiantato prevede:

- prima biopsia nel 7° giorno del post trapianto;
- biopsia settimanale nel primo mese;
- biopsia ogni 15 giorni nel 2°-3° mese;
- biopsia mensile dal 4° al 12° mese;
- biopsia di controllo dopo 10-15 giorni da un episodio di rigetto visualizzato all'anatomia patologica come grado ISHLT di almeno 2.

Le biopsie a più di un anno dal trapianto sono effettuate in presenza di: rialzo della temperatura corporea in assenza di un quadro infettivo, aritmie cardiache e segni di disfunzione del graft o malessere generale, quadri che pongono la verifica diagnostica di rigetto in corso.

Nella biopsia la presenza di rigetto cellulare è classificata secondo le attuali linee guida ISHLT 2004.

La procedura si svolge in sala di emodinamica e prevede l'esecuzione di un cateterismo cardiaco destro tramite accesso da una grossa vena (giugulare, succlavia o femorale). L'inserzione di un biotomo sospinto fino al ventricolo destro consente l'estrazione di un frammento endomiocardico di dimensioni minime di 2 mm. La sensibilità della biopsia endomiocardica e l'accuratezza del grading dipendono dal numero di frammenti adeguati, quindi dalla quantità di tessuto miocardico disponibile per l'analisi, e dal numero delle sezioni esaminate. Il protocollo approvato dalla comunità internazionale prevede la valutazione di almeno tre frammenti di endomiocardio studiati su tre livelli diversi per ridurre il più possibile errori di "sampling" (Stewart 2005).

## 2) Rejection Score

Il rejection score è stato calcolato associando al punteggio del grading ISHLT di rigetto cellulare acuto un punteggio ordinario crescente (come riportato nella tabella 1) ad ogni singolo episodio di rigetto

**Tabella 1. Grading istopatologico ISHLT**

<b>Grading istopatologico ISHLT</b>	<b>Punteggio</b>
I A	1
I B	2
2	3
3 A	4
3 B	5
4	6

Successivamente per calcolare il Totale Rejection Score (TRS) è stata effettuata la sommatoria dei punteggi di tutti i rigetti, indicizzati per il numero dei rigetti del paziente, ottenendo un parametro ordinale categorico. Per il calcolo del RS del primo anno, RS 1year, si è utilizzata la stessa procedura considerando solo i rigetti avvenuti entro il primo anno dal trapianto. Per calcolare il RS degli episodi più gravi di rigetto sevTRS si sono considerati nel calcolo solo gli episodi con grading superiore o uguali a 3°, mentre per il RS degli episodi gravi nel primo anno sevRS 1year sono stati computati solo quelli del primo anno<sup>238</sup>.

## 3) Analisi istologica e immunoistochimica



Per ogni paziente si è proceduto considerando la biopsia più recente rispetto al tempo di realizzazione della coronarografia e CFR. Per ogni paziente è stata considerata un'unica biopsia ottenuta durante follow-up istopatologico. Ogni biopsia endomiocardica considerata è stata ottenuta in un periodo di stabilità clinica del paziente. Nessuna biopsia è stata ottenuta durante episodi di rigetto cellulare acuto: sono state considerate biopsie con grado ISHLT 0-1°. L'effetto Quilty è stato considerato non significativo di rigetto.

Il materiale è stato fissato con formalina 4% in tampone fosfato 0.1M (PH=7.2), disidratato in una serie crescente di alcoli e dopo passaggio in xilolo, incluso paraffina.

Da ciascuna biopsia sono state ottenute sezioni di 4  $\mu$ m di spessore colorate con Ematossilina ed Eosina (EE) e Azan-Mallory modificata Heidenhain per l'analisi istologica.

Ulteriori sezioni di 4  $\mu$ m sono state sottoposte ad immunistochemical. Gli anticorpi utilizzati sono : anti-actina muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA 1:200, Dako-Cytomation) per l'analisi dell'ispessimento arteriosclerotico e anti CD31 ( $\alpha$ -CD31 1:200, Dako-Cytomation) per l'analisi della densità capillare. In breve: le sezioni dopo trattamento con acqua ossigenata per bloccare l'attività perossidasi endogena sono state intubate con l'anticorpo primario per un'ora a temperatura ambiente. Dopo lavaggio sono state incubate con anticorpo secondario coniugato (DAB, Dako-Cytomation) che fornisce una colorazione marrone nei siti di avvenuta reazione.

#### 4) Studio morfometrico

Le misurazioni morfometriche eseguite per ogni paziente sono: diametro miocitario (valutato con sezioni in EE), percentuale di tessuto fibroso (valutato con sezioni di Azan-Mallory), ispessimento medio arteriolare (valutato con immunistochemical per CD31). Per ogni parametro studiato sono stati acquisiti 3 campi a medio ingrandimento (20X). Per l'acquisizioni delle immagini e l'analisi dei loro parametri è stato utilizzato un sistema d'analisi Olympus BH2 con telecamera digitale e software di morfometrica Image Pro 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring MA, U.S.A.)

Image Pro Plus 6.0

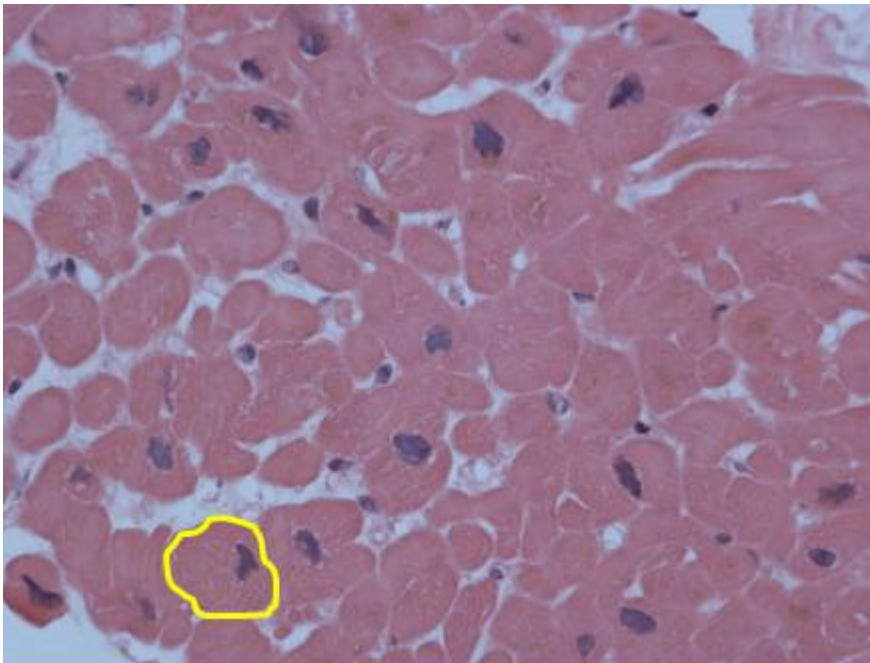
Le immagini sono state ottenute tramite il programma per l'analisi morfologica anatomo-patologica, ottenendone un formato digitale. I calcoli matematici per ottenere ogni parametro sono stati condotti su

ogni singola immagine utilizzando il software del programma stesso, ed i dati estratti da ognuno dei singoli tre campi per variabile sono stati poi inseriti in un foglio di calcolo Excel.

Le analisi morfometriche sono state condotte in cieco rispetto ai risultati di coronarografia e CFR ed i valori ottenuti sono stati rivisti in modo indipendente da due patologi, un senior ed un junior ottenendo risultati concordi.

#### Parametri

- Diametro miocitario: la conta è stata eseguita su tre campi ottenuti a 20X dal campione trattato in EE. In ogni campo considerato la sezione dei cardiomiociti è trasversale, in modo che le miocellule risultino tagliate lungo il loro asse (Figura 1)



**Figura 1: Misura del diametro medio dei miociti, valutati all'ematossilina ed eosina**

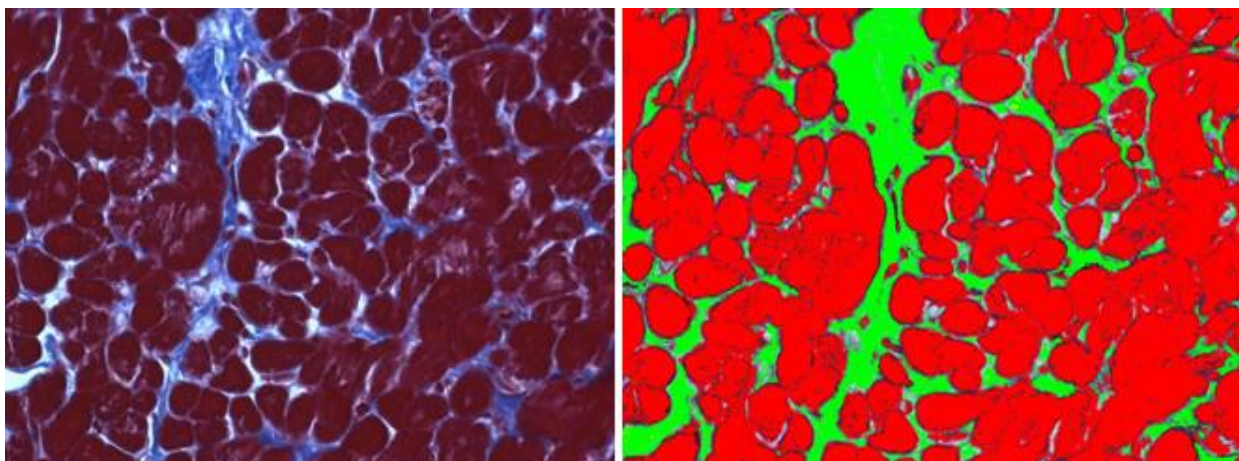
- Quantificazione percentuale di fibrosi: è stata condotta su tre sezioni di tessuto miocardico a 20X di ingrandimento colorato con Azan-Mallory. Ogni campo microscopico è stato suddiviso in tre aree cumulative rappresentanti:

area 1: tessuto miocardico vascolare

area 2: tessuto fibrotico

area 3: interstizio

Il dato finale rappresenta un media della percentuale ottenuta sui tre campi in AZ.(Figura 2)



**Figura 2: Quantificazione della fibrosi. Colorazione con Azan-Mallory a sinistra, immagine creata dal programma di morfometria a destra**

- Densità capillare: è stata realizzata con la colorazione immunohistochimica per CD31, detta anche PECAM-1, antigene della superfamiglia delle immunoglobuline, che funge da recettore per la diapedesi leucocitaria, l'angiogenesi e l'attivazione integrinica. Questo marker è stato utilizzato per evidenziare l'endotelio dei capillari. Sono stati calcolati nelle tre sezioni a 20X tutti i capillari presenti nella sezioni, ottenendo infine un valore medio dai differenti campi.
- Ispessimento medio delle arteriole: è stato calcolato sull'intera sezione bioptica, campo per campo, considerando tutte le arteriole presenti purché tagliate trasversalmente. Sono state analizzate 818 arteriole in totale, con una media di 30 arteriole per paziente. Per mezzo della colorazione immunohistochimica per actina-muscolo-liscio le cellule lisce vascolari della tonaca media delle arteriole risultano evidenziate in marrone rispetto al tessuto circostante. L'area interna ed esterna della tonaca media, di ogni arteriola è stata ricondotta dal software a superfici circolari equivalenti. Dalla differenza tra questi due valori si è ottenuta l'area di una corona circolare corrispondente alla tonaca media. Per svincolare, quindi, l'area della tonaca media dal diametro del vaso è stato calcolato il rapporto tra l'area della corona circolare e l'area racchiusa dalla circonferenza esterna. Tramite questa semplice formula matematica è possibile ricavare per ogni arteriola un valore di ispessimento percentuale della tonaca media sull'area totale del vaso, e successivamente, mediando tutti i valori delle arteriole della biopsia, calcolare un valore medio di ispessimento arteriolare per ogni paziente. Il raggio medio delle arteriole, ottenuto dalle aree circolari equivalenti rientra in un range di 3-50  $\mu\text{m}$ .

## Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard; le variabili dicotomiche sono state espresse come numero di pazienti e con percentuale. La distribuzione delle singoli variabili è stata valutata mediante test di Shapiro-Wilk. Il confronto tra gruppi indipendenti è stata eseguita mediante t-test di Student e test del  $X^2$

## RISULTATI

Come mostrato nella tabella, la statistica descrittiva dei 28 pazienti ha mostrato che la CFR media risulta di  $2.7 \pm 0.8$ , l'ispessimento medio sul raggio  $4 \pm 0.9 \mu\text{m}$ .; il rimodellamento arteriolare, inteso come percentuale di area della tonaca media sull'area totale di media-intima e lume, è di  $68 \pm 7\%$ , la densità media è di  $16,2 \pm 41,3$  capillari per capo a 20X, la fibrosi espressa come media percentuale di area fibrotica su area fibrotica e cellulare è di  $7.7 \pm 4.9\%$ , il diametro medio dei miociti espresso in  $\mu\text{m}$  risulta  $20.85 \pm 6.7$ .

L'età media al trapianto cardiaco era  $54,2 \pm 10,3$ , il tempo al trapianto della misurazione della CFR era di  $7.7 \pm 5$  anni.

Nell'analisi descrittiva dei parametri clinici l'età media del donatore è risultata di  $34.4 \pm 12.9$ ; il tempo medio di ischemia di  $166,1 \pm 43,9$  minuti, il severe Rejection Score è risultato in media  $0.5 \pm 0.4$ , il Severe Rejection Score al primo anno in media è risultato di  $0.6 \pm 0.6$ .

**Tabella: Analisi descrittiva delle variabili continue**

<b>N= 28 pz</b>	<b>Media <math>\pm</math> dev. standard</b>
CFR	$2.7 \pm 0.8$
FC di base	$84.7 \pm 9.7$
PAS di base	$132.8 \pm 17.2$
PAD di base	$81.8 \pm 11.9$

Velocità massima di base	27.8±10.1
FC adenosina	89.7±12.7
PAS adenosina	118.2±16.4
PAD adenosina	72.1±11.1
Velocità massima adenosina	76.6±28.2
Ispessimento del raggio	4±0.9
Rimodellamento % in area	68±7
Densità capillare	167.2±41.3
Fibrosi	7.7±4.9
Diametro dei miociti	20.8±3.7
Hb	13.6±1.3
Creatinina	164±102.9
Colesterolo	5±0.7
Trigliceridi	1.7±0.7
Età al trapianto	54.2±10.3
Età del donatore	34.4±12.9
Tempo di ischemia	166.1±43.95
Tempo dal trapianto alla CFR	7.7±5
Sev-RS totale	0.5±0.4
Sev-RS al primo anno	0.6±0.6

**Tabella: Analisi descrittiva delle variabili dicotomiche**

<b>Variabile</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Sesso maschile	25	89,3
Sesso del donatore maschile	22	78,6
Sex mismatch presente	6	21,4
Ipertensione	12	49,9
Diabete	2	7,1
Cardiopatìa ischemica	11	39,3
CFR >2.5	17	60,7

Per analizzare l'eventuale correlazione tra il valore della CFR e gli indici morfologici, clinici e biochimici, i pazienti sono stati suddivisi in due categorie in base al valore della CFR, scegliendo come cut-off tra valori indicativi di riserva normale e patologica 2.5. Il primo gruppo dei pazienti, pertanto, mostra valori di  $CFR \leq 2.5$  e il secondo gruppo presenta una riserva coronarica  $> 2.5$  ( $p < 0.0001$ ).

**Tabella Analisi statistica delle variabili continue**

<b>Variabile</b>	<b>CFR <math>\leq</math> 2.5</b>	<b>CFR <math>&gt;</math> 2.5</b>	<b><i>P</i></b>
<b>CFR</b>	2 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.6	0.0001
<b>FC base</b>	81.2 $\pm$ 12.3	87 $\pm$ 7.1	0.174
<b>PAS base</b>	136.8 $\pm$ 16.8	130.3 $\pm$ 17.5	0.334
<b>PAD base</b>	81.8 $\pm$ 11.7	81.8 $\pm$ 12.4	0.991
<b>Vel max di base</b>	28.2 $\pm$ 8.2	27.5 $\pm$ 11.4	0.850
<b>FC adenosina</b>	87.6 $\pm$ 18.2	91 $\pm$ 7.8	0.504
<b>PAS adenosina</b>	125 $\pm$ 18.6	113.8 $\pm$ 13.8	0.105
<b>PAD adenosina</b>	73.2 $\pm$ 11.7	71.5 $\pm$ 11.1	0.704

<b>Vel max adenosina</b>	63.7±24.6	85±27.8	0.045
<b>Ispessimento del raggio</b>	4.2±1.3	3.9±0.7	0.36
<b>Rimodellamento % in aerea</b>	72.3±8	65.2±4.7	<0.007
<b>Densità capillare</b>	157.2±42.4	174.7±40.6	0.35
<b>Fibrosi</b>	6.8±5	8.3±4.9	0.46
<b>Diametro miociti</b>	20.5±3.7	21.1±3.7	0.704
<b>Hb</b>	14.1±1.1	13.3±1.4	0.085
<b>Creatinina</b>	146.9±44.4	175.3±127.6	0.409
<b>Colesterolo</b>	5.1±0.6	4.9±0.7	0.523
<b>Trigliceridi</b>	1.9±0.7	1.6±0.7	0.346
<b>Età al trapianto</b>	52.5±12.2	55.4±9.2	0.500
<b>Età del donatore</b>	39.7±18.2	31.8±9.1	0.234
<b>Tempo d'ischemia</b>	185.8±46.3	156.3±41.1	0.218
<b>Tempo dal trapianto CFR</b>	8.7±4.5	31.8±9.1	0.402
<b>RS-sev totale</b>	0.5±0.3	0.5±0.4	0.802
<b>RS-sev primo anno</b>	0.6±0.5	0.6±0.8	0.902

**Tabella. Analisi statistica delle variabili dicotomiche**

<b>Variabile</b>	<b>CFR ≤ 2.5</b>	<b>CFR &gt; 2.5</b>	<b>P</b>
<b>Sesso maschile</b>	10 (90.9%)	15 (88.2%)	0.823
<b>Sesso del donatore maschile</b>	11 (100%)	11 (66.7%)	0.109
<b>Sex mismatch presente</b>	0 (0%)	6 (33.3%)	0.109

<b>Ipertensione</b>	4 (36.4%)	8 (47.1%)	0.676
<b>Diabete</b>	1 (9.1%)	1 (5.9%)	0.747
<b>Trapianto per malattia ischemica</b>	4 (33.3%)	7 (41.7%)	0.732

La percentuale di rimodellamento arteriolare calcolata sull'area del vaso è risultata significativamente maggiore nei pazienti con CFR < 2.5 ad indicare come nei pazienti con alterazioni funzionali a carico del microcircolo (si ricordi infatti che il campione consta unicamente di pazienti a coronarie sane) sia anche presente un rimodellamento strutturale a carico delle arteriole di minor calibro, con ispessimento della tonaca muscolare.

Tra le altre variabili è interessante notare come non vi sia una differenza significativa tra i due gruppi riguardo la velocità massima del flusso in condizioni di base, mentre si è dimostrata una differenza significativa per le velocità massime di flusso in condizioni di iperemia adenosina-indotta. Per quanto riguarda le altre variabili, al contrario, è stato dimostrato che la differenza nella loro distribuzione non è significativa: da un lato la mancanza di differenze concerne le variabili cliniche e biologiche, quali età al trapianto, tempo trascorso dal trapianto alla misurazione della CFR, età del donatore, tempo di ischemia, rejection, sta a dimostrare come i gruppi di pazienti siano uniformi nella distribuzione di queste variabili che quindi non fungono da fattori di confondimento; dall'altro lato la non significatività di parametri morfologici, quali diametro di miociti, percentuale di fibrosi e densità capillare, comporta interessanti considerazioni di correlazione anatomo-funzionale. Anche le variabili dicotomiche sono state analizzate, per vedere se la loro distribuzione fosse significativamente differente nei due gruppi di pazienti.

## **DISCUSSIONE**

### **Danno istologico a carico del microcircolo nel cardiotrapiantato**

I dati hanno dimostrato come nel paziente cardiotrapiantato, in assenza di malattia cardiaca angiografica dei grandi vasi epicardici, si instauri un rimodellamento strutturale a carico delle porzioni distali arteriose dell'albero coronarico, già evidenziabile nelle arteriole di 6-100 µm di diametro, e come questa alterazione si estrinsechi a livello clinico con la diminuzione della riserva del flusso coronarico.



I nostri dati confermano nel followup a lungo termine i risultati ottenuti da altri autori. Clausell et al (CIT) hanno evidenziato la presenza di un rimodellamento strutturale a carico delle arteriole muscolari intramiocardiche, che interessa sia la tonaca media che l'intima, e hanno dimostrato come tale rimodellamento si estrinsechi in

- rigonfiamento cellulare delle cellule endoteliali o “cellular swelling” o ispessimento del monostato endoteliale, e deposizione di matrice extracellulare o migrazione di “foamy cells”, derivate da linee macrofagiche e muscolari lisce vasali
- ispessimento della tonaca media da ipertrofia ed iperplasia delle cellule muscolari lisce vascolari

Anche Hiemann et al.<sup>239</sup> in un successivo lavoro hanno dimostrato il coinvolgimento dell'intima e della tonaca media nel processo di rimodellamento, formulando per la prima volta anche dati quantitativi. Gli stessi autori<sup>240</sup> hanno di concerto evidenziato che il rimodellamento micro vascolare, valutato in termini qualitativi e quantitativi all'analisi morfologica, si instaura in modo indipendente dalle modificazioni precoci a livello dei grandi vasi epicardici, intese come ispessimento intimale all'IVUS e test funzionale all'acetilcolina<sup>240</sup>, e come il rimodellamento della tonaca media, e non le alterazioni intimali di per sè, incida in modo negativo sulla prognosi a lungo termine dei pazienti<sup>239</sup> in modo indipendente dalla presenza di CAV epicardica angiograficamente significativa. L'ispessimento della tonaca media si è rilevato un fattore predittivo indipendente di sviluppo di CAV epicardica e di minor sopravvivenza di MACE<sup>239</sup>.

### **Valutazione funzionale del microcircolo**

Come appena considerato per i dati morfologici, è noto come lo studio funzionale del flusso miocardico tramite CFR da stress all'adenosina, condotto in modo non invasivo per mezzo dell'ecocardiografia transtoracica, possa categorizzare i pazienti trapiantati in due gruppi a prognosi differente, sfruttando un valore cut off di 2.6<sup>240</sup> come indicatore di riserva coronarica ridotta. Il valore della CFR, inoltre, correla con la sopravvivenza libera da MACE nel post trapianto e nel follow-up a lungo termine correla inversamente con lo sviluppo di CAV epicardica valutata all'IVUS in pazienti a coronarie angiograficamente indenni<sup>241</sup>. Il contributo originale dello studio consiste nella correlazione tra il dato strutturale del microcircolo e quello funzionale, nei pazienti la cui CFR non viene influenzata emodinamicamente dallo stato dei vasi epicardici, dal momento che si sono valutati unicamente pazienti angiograficamente negativi per lesioni coronariche.

La possibilità che un danno strutturale quale un ispessimento della tonaca media vascolare possa avere ripercussioni sull'emodinamica funzionale è già stato studiato nella vasculopatia ipertensiva: anche in

questa patologia, infatti, il processo di rimodellamento si manifesta con fenomeni di iperplasia ed ipertrofia nel comparto delle cellule muscolari lisce arteriolari, verificandosi un aumento dello spessore della tonaca media rispetto al diametro del lume vasale. Questo processo è alla base del meccanismo fisiopatologico *dell'amplificatore strutturale di Folko*<sup>242</sup>. Esso consente di spiegare come il rimodellamento ipertrofico concentrico della parete vasale arteriosa sia alla base dell'aumento delle resistenze al flusso, secondo la legge di Poiseville, in modo direttamente proporzionale alla quarta potenza del raggio. Le neo caratteristiche geometriche del vaso sono alla base dell'aumento delle resistenze in seguito a stimoli vasocostrittori e della ridotta risposta alla vasodilatazione. Si evince quindi come, nel trapianto cardiaco, una modificazione strutturale possa ripercuotersi sulla funzionalità del microcircolo del graft. Nel dettaglio le caratteristiche della risposta emodinamica all'adenosina stress-test, misurata con ecografia transtoracica, ed espressa come CFR, sembrano proprio avvalorare l'ipotesi di un danno arteriolare nella risposta vasodilatatrice, dal momento che la velocità di flusso in condizioni è confrontabile tra pazienti con riserva funzionale ridotta e maggior rimodellamento e quelli con riserva più conservata e minor rimodellamento. Al contrario sotto stimolo all/dell'adenosina il sottogruppo di pazienti con CFR ridotta e maggior danno strutturale mostrano una riduzione della capacità di reclutare la riserva di flusso. Lo studio morfometrico ha inoltre dimostrato come l'impairment funzionale considerato frutto dell'alterata risposta di superficie del microcircolo, che si sarebbe potuta esprimere come eventuale riduzione della densità capillare, sia come maggiore area di tessuto fibrotico all'interno del miocardio. Questo dato appare in contraddizione rispetto agli studi morfometrici di Tsagalou et al (9), condotti in un differente modello di malattia quale la cardiomiopatia dilatativa, ove gli autori dimostrano una correlazione diretta tra CFR e densità capillare alla biopsia endomiocardica. questo dato non è emerso nel nostro studio su pazienti cardiopiantati. Il nostro studio appare valido dal punto di vista fisiopatologico, dal momento che la maggiore quota di resistenze che determinano il flusso nell'albero coronarico è confinata al distretto delle arteriole muscolari, a fronte di un contributo del letto capillare inferiore all'1%<sup>245</sup>

### **Danno istologico e correlazioni con la riserva circolatoria funzionale**

La dimostrazione di come il rimodellamento istopatologico sia associato ad un'incapacità da parte di questi pazienti di reclutare la riserva di flusso, spiega come questo sottogruppo di pazienti, pur scevri da malattia coronarica all'epicardio, dimostrino una prognosi a lungo termine post trapianto cardiaco peggiore rispetto ai pazienti con CFR conservata<sup>246</sup>).

In condizioni di aumentata richiesta metabolica miocardica, i pazienti a CFR ridotta non sono in grado di adattare la risposta microvascolare, con conseguente squilibrio perfusorio ed ischemia. Questo dato

completa l'osservazione di Hiemann et al.<sup>239</sup>, i quali hanno dimostrato, tramite uno studio su 9713 biopsie di routine, che le modificazioni istopatologiche microvascolari non sono rare e sono associate ad una peggiore prognosi, i quadri biotipici con lesioni microvascolari stenotizzanti si associano ad un impatto prognostico significativamente peggiore sulla sopravvivenza post trapianto cardiaco, esplicitandosi in eventi cardiaci maggiori in modo indipendente dalla presenza o assenza di vasculopatia dei vasi epicardici maggiori. Il nostro studio, infatti, permette di individuare all'interno dell'insieme dei pazienti con alterazioni morfologiche alla biopsia, un sottogruppo nel quale esse sono associate a decurtazione funzionale di riserva coronarica, determinante eziologico della loro peggiore prognosi. Allo stesso tempo la CFR, quando ridotta a valori inferiori a 2.5, funge da efficace marker diagnostico nei pazienti a coronarie epicardiche angiograficamente indenni per identificare il sottogruppo a prognosi peggiore che necessita pertanto di un più stretto monitoraggio diagnostico-terapeutico.

### **Danno istopatologico, rigetto umorale ed everolimus**

Il riscontro di danno istopatologico alle biopsie ottenute durante il follow-up dei pazienti cardiotrapiantati, e il fatto che esso si espliciti mediante risposta iperplastica e ipertrofica a carico delle cellule muscolari lisce vascolari, pone un interessante focus sulla patogenesi del danno, anche e soprattutto in considerazione di eventuali nuove strategie terapeutiche. Il risultato, seppur preliminare, dell'analisi sul nostro campione non ha dimostrato correlazione tra CFR e Rejection Scores RS, polarizzando l'interesse verso le vie di signalling innescate dai mediatori di rigetto umorale, e relativo pathways di proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari. La disponibilità di farmaci immunosoppressori, quali l'everolimus, che esplicano la loro azione su mTOR, può infatti bloccare queste vie mitogene con possibile rallentamento o blocco del processo di sviluppo della CAV. Si può anche pensare che come lo sviluppo di CAV epicardica sia collegato al rigetto acuto cellulare (espresso tramite il Rejection Score), come dimostrato in letteratura, in modo indipendente, il microcircolo risenta principalmente degli effetti del rigetto umorale cronico. La suddivisione topografica lungo l'albero coronarico dei due meccanismi fisiopatogenetici potrebbe essere il risultato delle differenti condizioni emodinamico-immunologiche nei due distretti: con prevalenza a livello epicardico dei meccanismi aterogenetici mediati dallo shear stress, agenti in sinergia con l'attivazione clonale T; e con preponderanza a livello microcircolatorio, a regimi rallentati di flusso, della deposizione endoteliale anticorpale e dell'attivazione di segnali mitogenici a livello citologico vascolare.

## CONCLUSIONI

Nei pazienti cardiotrapiantati in follow-up a lungo termine, a coronarie angiograficamente indenni, è evidente alla biopsia un rimodellamento ipertrofico/iperplastico della tonaca vascolare media delle arteriole di diametro inferiore ai 300  $\mu\text{m}$  senza che sia interessato il letto capillare.

Tale substrato anatomico-patologico sta alla base della decurtazione della riserva coronarica: ad una diminuita riserva coronarica corrisponde un maggior rimodellamento vascolare a livello delle arteriole di resistenza, tale da rendere la microvasculopatia un marker istologico per individuare un sottogruppo di pazienti a prognosi peggiore proprio a causa della minor possibilità di fronteggiare insulti ischemici.

L'identificazione di un meccanismo di rimodellamento per mezzo di una risposta ipertrofica e iperplastica delle cellule muscolari lisce vascolari appare interessante dal punto di vista non solo prognostico, ma anche per future prospettive terapeutiche. La prevenzione della microvasculopatia del graft nel cardiotrapiantato potrebbe in futuro essere un ulteriore target terapeutico verso cui indirizzare gli studi sui nuovi farmaci immunosoppressori disponibili, quali l'everolimus, che interagiscono proprio **con** le vie molecolari di proliferazione che si attivano in queste cellule vascolari.

## CONCLUSIONI

Questo studio apre una finestra sul microcircolo coronarico che è sempre stato trascurato nella letteratura, nonostante, in assenza di patologie a carico dei vasi pericardici, sia il distretto maggiormente responsabile della riserva coronarica.

Le anomalie coronariche funzionali rappresentano il primo marker del processo aterosclerotico coronarico.

La riduzione della CFR si è dimostrata essere un fattore prognostico negativo per successivi eventi cardiovascolari, in particolare laddove era correlabile a patologie coinvolgenti i vasi epicardici come ad esempio nel post infarto (Rigo et al, 2006). Va segnalato tuttavia che, quando viene esclusa la presenza di stenosi significative a carico dei vasi epicardici la riduzione della CFR costituisce comunque un potenziale indicatore di danno della funzione micro vascolare coronarica con possibili alterazioni secondarie della funzione ventricolare sinistra. Questo aspetto è stato ben dimostrato, ad esempio, nella popolazione diabetica in cui indipendentemente dalla presenza di coronarosclosi la riduzione della CFR e quindi un danno al microcircolo è considerato un marker precoce di danno vasale, indipendentemente correlato con la mortalità cardiovascolare (Galderisi 2006)

La disfunzione microvascolare, valutata in termini di ridotta riserva di flusso coronarico, è compromessa nelle patologie a carattere infiammatorio ed endocrino con noto rischio cardiovascolare.

Tale disfunzione potrebbe spiegare l'aumentato rischio cardiovascolare indipendente dai convenzionali fattori di rischio presente in queste patologie.

Nel cardiotrapiantato la riduzione della riserva di flusso coronarico, a cui corrisponde un substrato anatomico-patologico caratterizzato da un maggior rimodellamento vascolare a livello delle arteriole di resistenze, un è in grado di predire l'insorgenza della CAV, maggiore fattore limitante la sopravvivenza dell'allograft cardiaco.

Pertanto la CF potrebbe diventare di rilevanza clinica nella gestione e nelle trattamento precoce di tutte queste patologie

## PROSPETTIVE FUTURE

Visti gli incoraggianti risultati presentati in questa tesi, il nostro laboratorio ha intenzione di continuare questo lavoro, incrementando la casistica (nell'acromegalia), aggiungendo controlli post-trattamento delle patologie studiate (obesità, iperparatiroidismo, psoriasi), in modo da rafforzare il ruolo della CFR nella scelta del timing terapeutico.

Inoltre vi sono altre patologie a carattere infiammatorie ed endocrino di elevato interesse quali l'ipogonadismo, le paraodontopatie, il lupus eritematoso sistemico e la depressione.

Quest'ultima recentemente è oggetto di numerosi studi che mostrano come nella depressione lo stato immunologico è alterato quanto quello neurologico

Le conseguenze di questa alterazione psico-neuro-immunologica si ripercuotono nello stato del cuore e ne influenzano la salute al pari di altri fattori di rischio, da sempre considerati importanti, come il fumo, l'obesità, la qualità del colesterolo, il diabete, la mancanza di regolare esercizio fisico, nonché l'assunzione massiccia di farmaci e di ormoni.

Uno studio, pubblicato su Archives of General Psychiatry, ha analizzato 7641 persone di età compresa tra i 17 e i 39 anni scoprendo che in particolare aver tentato il suicidio, nelle persone più giovani dei 40 anni, incide in maniera importante sul rischio di morire per attacchi cardiaci<sup>106</sup>

Un'altra patologia a cui ci stiamo interessando è l'iperprolattinemia. Un recente studio pubblicato sull'European Heart Journal ha studiato 3929 soggetti, categorizzati secondo i livelli di prolattina. Haring et al concludono evidenziando come la prolattina sia un fattore di rischio indipendente per mortalità da tutte le cause e cardiovascolari, sebbene ancora poco conosciuti siano i meccanismi fisiopatologici alla base di tale evidenza<sup>247</sup>.

Noi stiamo valutando la funzione microvascolare coronarica in pazienti affetti da ipogonadismo, paraodontopatie, lupus eritematoso sistemico da depressione maggiore, e, a breve, da iperprolattinemia al fine di indagare le prime fasi coinvolte nella patologia cardiovascolare associata a queste patologie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Opie L. The Heart: Physiology, from Cell to circulation Lippincott Williams e Wilkins 1998
2. Starling EH, Visscher MB. The regulation of the energy output of the heart. *J Physiol.* 1927; 62 (3): 243-261
3. Panza J. Endothelium nitric oxide, and atherosclerosis; 1999
4. Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular diseases. *Science.* 1996; 272 (5262): 689-693
5. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stoker J, 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease-six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1961; 55: 33-50.
6. Furchgott RF, Zawadzki VJ. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288 (5789): 373-376
7. Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta physiol Scand.* 1992; 145 (3):201-227
8. Cosentino F, Luscher TF. Maintenance of vascular integrity. Role of nitric oxide and other bradykinin mediators. *Eur Heart J.* 1995; 16 Suppl K: 4-12
9. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329 (27): 2002-2012
10. Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation reserarch.* 1996; 78 (2): 225-230
11. Kubes P, Suzuki M, Granger DN, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88 (11): 4651-4655.
12. Lusher TF, Barton M. biology of the endothelium. *Clin cardiol.* 1997; 20 (11 Suppl 2): II-3-10
13. Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. Endotheliopathies: clinical manifestation of endothelial dysfunction. In: Loscalzo J. Shafer AI, eds. Thrombosis and Hemorrhage. Baltimore, Md: *Williams and Wilkins*; 1998:901-924.
14. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook THL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315:1046-1051.
15. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1990;81:491-497.
16. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, et al. Modulation of coronary vasomotor tone in humans: progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1991;84:391-340.

17. El-Tamini H, Mansour M, Wargovich TJ, et al. Constrictor and dilator responses to intracoronary acetylcholine in adjacent segments of the same coronary artery in patients with coronary artery disease, endothelial function revisited. *Circulation*. 1994;89:45-51.
18. Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, et al. Effect of acetylcholine on the highly stenotic coronary artery: difference between the constrictor response of the infarct-related artery. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:752-758.
19. Bogaty P, Hackett O, Davies G, et al. Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*. 1994;90:5-11.
20. Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, et al. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med*. 1991;325:1551-1556.
21. Vita JA, Keaney JF Jr. Exercise: toning up the endothelium? *N Engl J Med*, 2000;342:503-505.
22. Zieher AM, Schächinger V, Hohnloser SH, et al. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans: elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation*. 1994;89:2525-32.
23. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, et al. Nitric oxide activity in the human coronary circulation: impact of risk factor for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1995;95:1747-1755.
24. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-42.
25. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986; 315 (17): 1046-1051
26. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO, 3rd. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1995; 95 (4): 1747-1755.
27. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Atherosclerosis. Thrombosis and vascular biology*. 2003; 32 (2):168-175.
28. Heistad DD, Armstrong ML. Sick vessel syndrome. Can atherosclerotic arteries recover? *Circulation*. 1994; 89 (5):2447-2450.
29. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 19-26 2002; 420 (6917): 868-874.
30. Libby P. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352 (16): 1685-1695
31. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352 (16): 1685-1695.
32. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81 (12): 3883-3997.



33. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 947:199-205
34. Steffen Y, Jung T, Klotz LO, Schewe T, Grune T, Sies H. Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by -epicatechin. *Free radical biology e medicine.* 2007; 42 (7):955-970.
35. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation.* 2004; 109 (15):1813-1818.
36. Quyyimi AA, Mulcahy D, Andrews NP, Husain S, Panza JA, Cannon RO, 3rd. Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. Comparison of acetylcholine and substance P. *Circulation.* 1997; 95 (1):104-110.
37. Masumoto A, Hirooka Y, Hironga K, Eshima K, Setoguchi S, Egashira K, Takeshita A. Effect of pravastatin on endothelial function in patients with coronary artery disease (cholesterol-independent effect of pravastatin). *The American journal of cardiology.* 2001; 88 (11): 1291-1294.
38. Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, Garcia CE, Quyyimi AA, Cannon RO, 3rd. Selective loss of microvascular endothelial function in human hypercholesterolemia. *Circulation.* 1994;90 (1):35-41.
39. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-43
40. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a prospective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-808
41. Biasucci LM, D'Onofrio G, Liuzzo G, Zini G, Monaco C, Caligiuri G et al. Intracellular neutrophil peroxidase is reduced in unstable angina and myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 611-616.
42. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002; 347:5-12
43. Neri Serneri GG, Abbate R, Gori AM, Attanasio M, Martini F, Giusti B et al. Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. *Circulation* 1992; 86:790-797.
44. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999; 103: 571-517
45. Biasucci L.M, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99:855-860.
46. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 102:2883-2888.

47. Recio-Mayoral, Justin C. Mason, Juan C. Kaski, Michael B. Rubens, Olivier A. Hazari, P. Camici Chronic inflammation and coronary microvascular dysfunction in patients without risk factors for coronary artery disease. *European Heart Journal* 2009, 30, 1837-1843
48. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1993;88:2541-2547
49. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21:929-933
50. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996;94:6-9
51. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998;97:2222-2229
52. Gonzalez AS, Kostine A, Gomez-Flores JR, et al. Non-invasive assessment of endothelial function. Intra and inter-observer variability. *Arch Cardiol Mex* 2006;76:397-400
53. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creanger MA, Yeung AC et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *Journals of the American College of Cardiology*. 1995; 26 (5): 1235-1241.
54. Takase B, Hamable A, Satomura K, Akima T, Uehata A, Matsui T, Ohsuzu F, Ishihara M, Kurita A. Comparable prognostic value of vasodilator response to acetylcholine in brachial and coronary arteries for predicting long term cardiovascular events in suspected coronary artery disease. *Circ J* 2006; 70(1):49-56.
55. Wu WC, Sharma SC, Choudhary G, Coulter L, Coccio E, Eaton CB. Flow-mediated vasodilatation predicts the presence and extent of coronary artery disease assessed by stress thallium imaging. *J Nucl Cardiol*. 2005;12 (5):538-544.
56. Amir O, Jaffe R, Shiran A, Flugelman MY, Halon DA, Lewis BS. Brachial reactivity and extent of coronary artery disease in patients with first ST-elevation acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2006;98:754-757
57. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1843-1849
58. de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, et al. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:33-38
59. Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:616-623
60. Juonala M, Viikari JS, Laitinen T, et al. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation* 2004;110:2918-2923

61. Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:661-665
62. Witte DR, Westerink J, de Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Bots ML. Is the association between flow-mediated dilation and cardiovascular risk limited to low-risk populations? *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1987-1993
63. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:505-510
64. Tuzcu EM, Kapadia SR, Sachar R, Ziada KM, Crowe TD, Feng J, et al. Intravascular ultrasound evidence of angiographically silent progression in coronary atherosclerosis predicts long-term morbidity and mortality after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(9):1538-42.
65. Miller LW. Allograft vascular disease: A disease not limited to hearts. *J Heart Lung Transplant*. 1992 May-Jun;11(3 Pt 2):S32-7. 84. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: A review. *Can J Surg*. 2005;48(4):319-27.
66. Billingham ME. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant*. 1992; 11(3 Pt 2):S38-44.
67. Lin H, Wilson JE, Kendall TJ, Radio SJ, Cornhill FJ, Herderick E, et al. Comparable proximal and distal severity of intimal thickening and size of epicardial coronary arteries in transplant arteriopathy of human cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant*. 1994;13(5):824-33.
68. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res*. 2006; 99(8):801-15
69. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Deckers JW, et al. Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure the rotterdam study. *Eur Heart J*. 2004; 25(18):1614-9.
70. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dobbels F, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: Twenty-eighth adult heart transplant Report—2011. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2011 10;30(10):1078-94.
71. Costanzo MR, Augustine S, Bourge R, Bristow M, O'Connell JB, Driscoll D, et al. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. A statement for transplantation of the council on clinical cardiology, american heart association. *Circulation*. 1995;92(12):3593-612.
72. Caforio AL, Tona F, Fortina AB, Angelini A, Piaserico S, Gambino A, et al. Immune and nonimmune predictors of cardiac allograft vasculopathy onset and severity: Multivariate risk factor analysis and role of immunosuppression. *Am J Transplant*. 2004; 4(6):962-70.
73. Mehra MR. Contemporary concepts in prevention and treatment of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant*. 2006; 6(6):1248-56.

74. Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, Charbonneau F, Ganz P, Selwyn AP, et al. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant. *Circulation*. 1996; 93(3):457-62.
75. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, Scherer M, Burns D, Tamburro P, et al. Changes in coronary endothelial function predict progression of allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2004; 23(3):265-71.
76. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation*. 2000; 102(19):2426-33.
77. Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: Recent developments. *Circulation*. 2008; 117(16):2131-41.
78. Johnson MR. Transplant coronary disease: Nonimmunologic risk factors. *J Heart Lung Transplant*. 1992; 11(3 Pt 2):S124-32.
79. Beniaminovitz A, Itescu S, Lietz K, Donovan M, Burke EM, Groff BD, et al. Prevention of rejection in cardiac transplantation by blockade of the interleukin-2 receptor with a monoclonal antibody. *N Engl J Med*. 2000; 342(9):613-9.
80. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Krobot K, et al. Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation*. 2003; 107(1):93-7.
81. Chroeder JS, Gao SZ, Alderman EL, Hunt SA, Johnstone I, Boothroyd DB, et al. A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1993; 328(3):164-70.
82. Weis M, Pehlivanli S, von Scheidt W. Vasodilator response to nifedipine in human coronary arteries with endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 39(2):172-80
83. Miller LW. Allograft vascular disease: A disease not limited to hearts. *J Heart Lung Transplant*. 1992 May-Jun; 11(3 Pt 2):S32-7.
84. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: A review. *Can J Surg*. 2005; 48(4):319-27.
84. Kapadia SR, Ziada KM, L'Allier PL, Crowe TD, Rincon G, Hobbs RE, et al. Intravascular ultrasound imaging after cardiac transplantation: Advantage of multi-vessel imaging. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19(2):167-72.
85. Schwarzacher SP, Uren NG, Ward MR, Schwarzkopf A, Giannetti N, Hunt S, et al. Determinants of coronary remodeling in transplant coronary disease: A simultaneous intravascular ultrasound and doppler flow study. *Circulation*. 2000; 101(12):1384-9.
86. Mehra MR, Benza R, Deng MC, Russell S, Webber S. Surrogate markers for late cardiac allograft survival. *Am J Transplant*. 2004; 4(7):1184-91.
87. Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, Ensminger SM, Hiemann NE, Kobashigawa JA, et al. International society for heart and lung transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant*. 2010; 29(7):717-27.

88. Lewis JF, Selman SB, Murphy JD, Mills RM, Jr, Geiser EA, Conti CR. Dobutamine echocardiography for prediction of ischemic events in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 1997; 16(4):390-3.
89. Spes CH, Klauss V, Mudra H, Schnaack SD, Tammen AR, Rieber J, et al. Diagnostic and prognostic value of serial dobutamine stress echocardiography for noninvasive assessment of cardiac allograft vasculopathy: A comparison with coronary angiography and intravascular ultrasound. *Circulation.* 1999; 100(5):509-15.
90. Bacal F, Moreira L, Souza G, Rodrigues AC, Fiorelli A, Stolf N, et al. Dobutamine stress echocardiography predicts cardiac events or death in asymptomatic patients long-term after heart transplantation: 4-year prospective evaluation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2004 11;23(11):1238-44.
91. Ciliberto GR, Ruffini L, Mangiavacchi M, Parolini M, Sara R, Massa D, et al. Resting echocardiography and quantitative dipyridamole technetium-99m sestamibi tomography in the identification of cardiac allograft vasculopathy and the prediction of long-term prognosis after heart transplantation. *Eur Heart J.* 2001; 22(11):964-71.
92. Ciliberto GR, Parodi O, Cataldo G, Mangiavacchi M, Alberti A, Parolini M, et al. Prognostic value of contractile response during high-dose dipyridamole echocardiography test in heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2003; 22(5):526-32.
93. Elhendy A, van Domburg RT, Vantrimpont P, Poldermans D, Bax JJ, van Gelder T, et al. Prediction of mortality in heart transplant recipients by stress technetium-99m tetrofosmin myocardial perfusion imaging. *Am J Cardiol.* 2002; 89(8):964-8.
94. Verhoeven PPAM, Lee FA, Ramahi TM, Franco KL, de Leon CM, Amatruda J, et al. Prognostic value of noninvasive testing one year after orthotopic cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 1996 7;28(1):183-9.
95. Carlsen J, Toft JC, Mortensen SA, Arendrup H, Aldershvile J, Hesse B. Myocardial perfusion scintigraphy as a screening method for significant coronary artery stenosis in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2000; 19(9):873-8.
96. Muehling OM, Wilke NM, Panse P, Jerosch-Herold M, Wilson BV, Wilson RF, et al. Reduced myocardial perfusion reserve and transmural perfusion gradient in heart transplant arteriopathy assessed by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2003 9/17;42(6):1054-60.
97. Dimitrow PP, Galderisi M, Rigo F. The non-invasive documentation of coronary microcirculation impairment: Role of transthoracic echocardiography. *Cardiovasc Ultrasound.* 2005; 3:18.
98. Krams R, Kofflard MJ, Duncker DJ, Von Birgelen C, Carlier S, Kliffen M, et al. Decreased coronary flow reserve in hypertrophic cardiomyopathy is related to remodeling of the coronary microcirculation. *Circulation.* 1998; 97(3):230-3.
99. Schwartzkopff B, Motz W, Frenzel H, Vogt M, Knauer S, Strauer BE. Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension. *Circulation.* 1993; 88(3):993-1003.

100. Tona F, Caforio AL, Montisci R, Angelini A, Ruscazio M, Gambino A, et al. Coronary flow reserve by contrast-enhanced echocardiography: A new noninvasive diagnostic tool for cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant.* 2006; 6(5 Pt 1):998-1003.
101. Weis M, Hartmann A, Olbrich HG, Hor G, Zeiher AM. Prognostic significance of coronary flow reserve on left ventricular ejection fraction in cardiac transplant recipients. *Transplantation.* 1998; 65(1):103-8.
102. Tona F, Caforio AL, Montisci R, Gambino A, Angelini A, Ruscazio M, et al. Coronary flow velocity pattern and coronary flow reserve by contrast-enhanced transthoracic echocardiography predict long-term outcome in heart transplantation. *Circulation.* 2006; 114(1 Suppl):I49-55.
103. Iliceto S, Marangelli V, Memmola C, Rizzon P. Transesophageal doppler echocardiography evaluation of coronary blood flow velocity in baseline conditions and during dipyridamole-induced coronary vasodilation. *Circulation.* 1991; 83(1):61-9.
104. Rodrigues AC, Frimm Cde C, Bacal F, Andreolli V, Tsutsui JM, Bocchi EA, et al. Coronary flow reserve impairment predicts cardiac events in heart transplant patients with preserved left ventricular function. *Int J Cardiol.* 2005; 103(2):201-6.
105. Caiati C, Montaldo C, Zedda N, Bina A, Iliceto S. New noninvasive method for coronary flow reserve assessment: Contrast-enhanced transthoracic second harmonic echo doppler. *Circulation.* 1999; 99(6):771-8.
106. Caiati C, Montaldo C, Zedda N, Montisci R, Ruscazio M, Lai G, et al. Validation of a new noninvasive method (contrast-enhanced transthoracic second harmonic echo doppler) for the evaluation of coronary flow reserve: Comparison with intracoronary doppler flow wire. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34(4):1193-200.
107. J.Shah, E. Veleadar, Y. Hong, J. D. Bremner, V. Vaccarino. Depression and History of Attempted Suicide as Risk Factors for Heart Disease Mortality in Young Individuals. *Archives of General Psychiatry*, 2011; 68 (11): 1135 DOI:
108. Andersson P, Rydberg E, Willenheimer R. Primary hyperparathyroidism and heart disease--a review. *Eur Heart J.* 2004;25:1776-1787
109. Silverberg SJ, Shane E, Jacobs TP, Siris E, Bilezikian JP. A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. *N Engl J Med.* 1999;341:1249-1255
110. Khan AA, Bilezikian JP, Potts JT, Jr. The diagnosis and management of asymptomatic primary hyperparathyroidism revisited. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:333-334
111. Almqvist EG, Bondeson AG, Bondeson L, Nissborg A, Smedgard P, Svensson SE. Cardiac dysfunction in mild primary hyperparathyroidism assessed by radionuclide angiography and echocardiography before and after parathyroidectomy. *Surgery.* 2002;132:1126-1132; discussion 1132
112. Hagstrom E, Hellman P, Larsson TE, Ingelsson E, Berglund L, Sundstrom J, Melhus H, Held C, Lind L, Michaelsson K, Arnlov J. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. *Circulation.* 2009;119:2765-2771

113. Rubin MR, Bilezikian JP, McMahon DJ, Jacobs T, Shane E, Siris E, Udesky J, Silverberg SJ. The natural history of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery after 15 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3462-3470
114. Anderson JL, Vanwoerkom RC, Horne BD, Bair TL, May HT, Lappe DL, Muhlestein JB. Parathyroid hormone, vitamin d, renal dysfunction, and cardiovascular disease: Dependent or independent risk factors? *Am Heart J.* 2011;162:331-339 e332
115. Nickols GA. Increased cyclic amp in cultured vascular smooth muscle cells and relaxation of aortic strips by parathyroid hormone. *Eur J Pharmacol.* 1985;116:137- 144
116. Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates the endothelial nitric oxide synthase through protein kinase a and c pathways. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:2831-2837
117. Hagstrom E, Ingelsson E, Sundstrom J, Hellman P, Larsson TE, Berglund L, Melhus H, Held C, Michaelsson K, Lind L, Arnlov J. Plasma parathyroid hormone and risk of congestive heart failure in the community. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:1186-1192
118. Kosch M, Hausberg M, Vormbrock K, Kisters K, Gabriels G, Rahn KH, Barenbrock M. Impaired flow-mediated vasodilation of the brachial artery in patients with primary hyperparathyroidism improves after parathyroidectomy. *Cardiovasc Res.* 2000;47:813-818
119. Viridis A, Cetani F, Giannarelli C, Banti C, Ghiadoni L, Ambrogini E, Carrara D, Pinchera A, Taddei S, Bernini G, Marcocci C. The sulfaphenazole-sensitive pathway acts as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in patients with primary hyperparathyroidism. Effect of surgical treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:920-927
120. Rubin MR, Maurer MS, McMahon DJ, Bilezikian JP, Silverberg SJ. Arterial stiffness in mild primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:3326-3330
121. Schillaci G, Pucci G, Pirro M, Monacelli M, Scarponi AM, Manfredelli MR, Rondelli F, Avenia N, Mannarino E. Large-artery stiffness: A reversible marker of cardiovascular risk in primary hyperparathyroidism. *Atherosclerosis.* 2011;218:96-101
122. Caiati C, Montaldo C, Zedda N, Bina A, Iliceto S. New noninvasive method for coronary flow reserve assessment: Contrast-enhanced transthoracic second harmonic echo doppler. *Circulation.* 1999;99:771-778
123. Rubinshtein R, Yang EH, Rihal CS, Prasad A, Lennon RJ, Best PJ, Lerman LO, Lerman A. Coronary microcirculatory vasodilator function in relation to risk factors *Circulation* AHA/2011/081307
124. Peiris AN, Youssef D, Grant WB. Secondary hyperparathyroidism: Benign bystander or culpable contributor to adverse health outcomes? *South Med J.* 2012;105:36-42
125. Massry SG, Smogorzewski M. The effects of serum calcium and parathyroid hormone and the interaction between them on blood pressure in normal subjects and in patients with chronic kidney failure. *J Ren Nutr.* 2005;15:173-177
126. Resnick LM, Laragh JH, Sealey JE, Alderman MH. Divalent cations in essential hypertension. Relations between serum ionized calcium, magnesium, and plasma renin activity. *N Engl J Med.* 1983;309:888-891

127. Rossi E, Sani C, Perazzoli F, Casoli MC, Negro A, Dotti C. Alterations of calcium metabolism and of parathyroid function in primary aldosteronism, and their reversal by spironolactone or by surgical removal of aldosterone-producing adenomas. *Am J Hypertens*. 1995;8:884-893
128. Shane E, Mancini D, Aaronson K, Silverberg SJ, Seibel MJ, Adesso V, McMahon DJ. Bone mass, vitamin d deficiency, and hyperparathyroidism in congestive heart failure. *Am J Med*. 1997;103:197-207
129. Rutledge MR, Farah V, Adeboye AA, Seawell MR, Bhattacharya SK, Weber KT. Parathyroid hormone, a crucial mediator of pathologic cardiac remodeling in aldosteronism. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2012.
130. Zittermann A, Fischer J, Schleithoff SS, Tenderich G, Fuchs U, Koerfer R. Patients with congestive heart failure and healthy controls differ in vitamin d-associated lifestyle factors. *Int J Vitam Nutr Res*. 2007;77:280-288
131. Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Boehm BO, Grammer TB, Marz W. Parathyroid hormone level is associated with mortality and cardiovascular events in patients undergoing coronary angiography. *Eur Heart J*. 2010; 31:1591-1598
132. Grandi NC, Breitling LP, Hahmann H, Wusten B, Marz W, Rothenbacher D, Brenner H. Serum parathyroid hormone and risk of adverse outcomes in patients with stable coronary heart disease. *Heart*. 2011; 97:1215-1221
133. Kamalov G, Ahokas RA, Zhao W, Shahbaz AU, Bhattacharya SK, Sun Y, Gerling IC, Weber KT. Temporal responses to intrinsically coupled calcium and zinc dyshomeostasis in cardiac myocytes and mitochondria during aldosteronism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298:H385-394
134. Tomaschitz A, Ritz E, Pieske B, Fahrleitner-Pammer A, Kienreich K, Horina JH, Drechsler C, Marz W, Ofner M, Pieber TR, Pilz S. Aldosterone and parathyroid hormone: A precarious couple for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2012; 94:10- 19
135. Isales CM, Barrett PQ, Brines M, Bollag W, Rasmussen H. Parathyroid hormone modulates angiotensin ii-induced aldosterone secretion from the adrenal glomerulosa cell. *Endocrinology*. 1991; 129:489-495
136. Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension*. 2006; 47:312-318
137. Vidal A, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC, Weber KT. Calcium paradox of aldosteronism and the role of the parathyroid glands. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290:H286-294
138. Brunaud L, Germain A, Zarnegar R, Rancier M, Alrasheedi S, Caillard C, Ayav A, Weryha G, Mirallie E, Bresler L. Serum aldosterone is correlated positively to parathyroid hormone (pth) levels in patients with primary hyperparathyroidism. *Surgery*. 2009; 146:1035-1041
139. Kalinowski L, Dobrucki LW, Malinski T. Nitric oxide as a second messenger in parathyroid hormone-related protein signaling. *J Endocrinol*. 2001; 170:433-440  
*CIRCULATIONAHA/2011/081307 R1* 19



140. Roman RJ, Maier KG, Sun CW, Harder DR, Alonso-Galicia M. Renal and cardiovascular actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2000; 27:855-865
141. Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates endothelial expression of atherosclerotic parameters through protein kinase pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292:F1215-1218
142. Tanaka M, Tokunaga K, Maruyama T, Otagiri M, Tominaga Y, Itoh K, Matsushita K, Komaba H, Fukagawa M. Parathyroidectomy markedly reduces oxidative stress in a patient with primary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial*. 2011; 15 Suppl 1:38-41
143. Vita JA. Endothelial function. *Circulation*. 2011;124:e906-912
144. Vaziri ND, Ni Z, Wang XQ, Oveisi F, Zhou XJ. Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: Role of excess pth. *Am J Physiol*. 1998; 274:F642-649
145. Throckmorton D, Kurscheid-Reich D, Rosales OR, Rodriguez-Commes J, Lopez R, Sumpio B, Zhong Q, Ding KH, McCarthy R, Barrett PQ, Isales CM. Parathyroid hormone effects on signaling pathways in endothelial cells vary with peptide concentration. *Peptides*. 2002; 23:79-85
146. Yan SF, Harja E, Andrassy M, Fujita T, Schmidt AM. Protein kinase c beta/early growth response-1 pathway: A key player in ischemia, atherosclerosis, and restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:A47-55
147. Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, Del Sal G, Pelicci PG, Rizzuto R. Protein kinase c beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66shc. *Science*. 2007; 315:659-663
148. Nechama M, Uchida T, Mor Yosef-Levi I, Silver J, Naveh-Many T. The peptidyl-prolyl isomerase pin1 determines parathyroid hormone mrna levels and stability in rat models of secondary hyperparathyroidism. *J Clin Invest*. 2009; 119:3102-3114
149. Chiasson VL, Munshi N, Chatterjee P, Young KJ, Mitchell BM. Pin1 deficiency causes endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension*. 2011; 58:431-438
150. Isales CM, Sumpio B, Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Du W, Rodriguez-Commes J, Lopez R, Rosales OR, Gasalla-Herraiz J, McCarthy R, Barrett PQ. Functional parathyroid hormone receptors are present in an umbilical vein endothelial cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279:E654-662
151. Nickols GA, Metz MA, Cline WH, Jr. Endothelium-independent linkage of parathyroid hormone receptors of rat vascular tissue with increased adenosine 3',5'- monophosphate and relaxation of vascular smooth muscle. *Endocrinology*. 1986; 119:349-356
152. Buus NH, Bottcher M, Hermansen F, Sander M, Nielsen TT, Mulvany MJ. Influence of nitric oxide synthase and adrenergic inhibition on adenosine-induced myocardial hyperemia. *Circulation*. 2001; 104:2305-2310
153. Marini C, Giusti M, Armonino R, Ghigliotti G, Bezante G, Vera L, Morbelli S, Pomposelli E, Massollo M, Gandolfo P, Minuto F, Sambuceti G. Reduced coronary flow

- reserve in patients with primary hyperparathyroidism: A study by g-spect myocardial perfusion imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010; 37:2256-2263
154. Maniero C, Fassina A, Seccia TM, Toniato A, Iacobone M, Plebani M, De Caro R, Calo LA, Pessina AC, Rossi GP. Mild hyperparathyroidism: A novel surgically correctable feature of primary aldosteronism. *J Hypertens*. 2012; 30:390-395
  155. Nachtigall L, Delgado A, Swearingen B, Lee H, Zerikly R, Klibanski A. Changing patterns in diagnosis and therapy of acromegaly over two decades. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2008; 93 (6):2035-2041.
  156. Holdaway IM, Bolland MJ, Gamble GD. A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly. *Eur. J. Endocrinol*. 2008; 159 (2):89-95
  157. Acromegaly: a handbook of history, current therapy and future prospects. *Oxford, UK: JAH Wass*; 2009
  158. Faglia G., Beck-Peccoz P. Malattie del sistema endocrino e del metabolismo. 4 ed: *McGraw-Hill*; 2006
  159. Ben-Shlomo A, Melmed S. Acromegaly. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am*. 2008; 37 (1): 101-22, viii.
  160. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev*. 1996;76 (4):1005-1026
  161. Baserga R. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Ongene* 2000; 19 (49):5574-5581
  162. Isgaard J, Nilsson A, Vikman K, Isaksson OG. Growth hormone regulates the level of insulin-like growth factor-ImRNA in rat skeletal muscle. *J Endocrinol* 1989; 120(1):107-112.
  163. Delafontaine P. Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1995; 30 (6): 825-834.
  164. Freestone NS, Ribaric S, Mason WT. The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility. *Mol.Cell.Biochem*. 1996; 163-164:223-229.
  165. Rubin SA, Buttrick P, Malhora A, Melmed S, Fishbein MC. Cardiac physiology, biochemistry and morphology in response to excess growth hormone in the rat. *J Mol.Cell.Cardiol* 1990; 22(4):429-438.
  166. Timsit J, Riou B, Bertherat J, Wisnewsky C, Kato NS, Weisberg AS, et al. Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern and myosin adenosine triphosphatase activity of rat left ventricle. *J Clin. Invest*. 1990; 86 (2):507-515
  167. Stromer H, Cittadini A, Douglas PS, Morgan JP. Exogenously administered growth hormone and insulin-like growth factor-I alter intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and enhance cardiac performance. In vitro evaluation in the isolated isovolumic buffer-perfused rat heart. *Circ. Res*. 1996; 79 (2):227-236

168. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis and management. *Endocr. Rev.* 2004; 25(1):102-152
169. Calao A, Spinelli L, Cuocolo A, Spiezia S, Pivonello R, di Somma C, et al. Cardiovascular consequences of early-onset growth hormone excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(7):3097-3104
170. Thuesen L, Christensen SE, Weeke J, Orskov H, Hemmingsen P. The cardiovascular effects of octreotide treatment in acromegaly: an echocardiographic study. *Clin Endocrinol. (Oxf)*. 1989; 30 (6):619-625.
171. Lopez-Velasco R, Escobar-Morreale HF, Vega B, Villa E, Sancho JM, Moya-Mur JL, et al. Cardioac involvement in acromegaly: specific myocardiopathy or consequence of systemic hypertension? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82(4):1047-1053
172. Clayton RN. Cardiovascular function in acromegaly. *Endocr. Rev.* 2003; 24(3):272-277.
173. Fazio S, Cittadini A, Cuocolo A, Merola B, Sabatini D, Colao A et al. Impaired cardiac performance is a distinct feature of uncomplicated acromegaly. *J Clin endocrinol Metab.* 1994; 79(2): 441-446.
174. Hermann BL, Severing M, Shmermund A, Berg C, Budde T, Erbel R et al. Impact of disease duration on coronary calcification in patients with acromegaly. *Exp Clin Endocrinol. Diabetes* 2009; 117 (8): 417-422
175. Mandinov L, Eberli FR, Seiler C, Hess OM. Diastolic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000; 45(4):813-825
176. Chanson P, Megnien JL, del Pino M, Coirault C, Merli I, Houdouin L, et al. Decreased regional blood flow in patients with acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49 (6):725-731
177. Maison P, Demolis P, Young J, Schaison G, Giudicelli JF, Chanson P. Vascular reactivity in acromegalic patients: preliminary evidence for regional endothelial dysfunction and sympathetic vasoconstriction. *Clin endocrinol. (Oxf)* 2000; 53 (4) 445-451
178. Schiavon F, Maffei P, Martini C, De Carlo E, Fais C, Todesco S, et al. Morphologic study of microcirculation in acromegaly by capillaroscopy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84 (9): 3151-3155.
179. Colao A, Spiezia S, Cerbone G, Pivonello R, Marullo P, Ferone D, et al. Increase arterial intima-media thickness by B-M mode echodoppler ultrasonography in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*2001; 54 (4): 515-524.
180. Otsuki M, Kasayama S, Yamamoto H, Saito H, Sumitani S, Kouhara H et al. Characterization of premature atherosclerosis of carotid arteries in acromegalic patients. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 2001; 54 (6): 791-796.
181. Rosen T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease. *Lancet* 1990;336:285-288
182. Schini-Kerth VB. Dual effects of insulin-like growth factor-I on the constitutive and inducible nitric oxide (NO) synthase-dependent formation of NO in vascular cells. *J Endocrinol Invest* 1999; 22 (Suppl 5):82-88.).

183. Oltman, Kane et al Mechanism of coronary vasodilation to insulin and insulin-like growth factor I is dependent on vessel size; *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E176–E181, 2000
184. Vasaran RS, Sullivan LM, D’Agostino RB, et al. Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 2003;139:642-8
185. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, et al. Relation of angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment to insulin-like growth factor-1 serum levels in subjects > 65 years of age (the InCHIANTI study). *Am J Cardiol* 2006;97:1525-9
186. Giovannini S, Cesari M, Marzetti E, et al. Effects of ACE-inhibition on IGF-1 and IGFBP-3 concentrations in older adults with high cardiovascular risk profile. *J Nutr Health Aging* 2010;14:457-60)
187. Ashley S., Izzard A, Mixhael Emerson A, Sukhpal Prehar A, Ludwing Neyses A, Peter Trainer A, Edward O, List B, John J, Kopchick B, Anthon M. Heagerty. The cardiovascular phenotype of a mouse model of acromegaly. *Growth Hormone e IGF Research* 2009 (19); 413-419
188. Hermann BL, Brandt-Mainz K, Saller B., Bruch C., Wieneke H., Kugler C, Ferdin S, Hahn S, Herbel R, Bockisch A, Mann K; Myocardial perfusion abnormalities in patients with active acromegaly. *Horm Metab Res* 2003; 35 (3): 183-188
189. Chanson P, Megnien JL, del Pino M, Coirault C, Merli I, Houdouin L, et al, Decreased regionale blood flow in patients with acromegaly. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 1998; 49 (6): 725-731
190. World Health Organization. *European Charter on counteracting obesity*. 2006.
191. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai P Jr, Razak F, Sharma AM, Anand SS; INTERHEART Study Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005; 366: 1640-9
192. Zhang Y, Proenca R, Maffeo M, Barone M, Leopold L, Fredman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue *Nature* 1994; 372:425-432
193. Lago F, Dieguez C, Gomez Reino J, Guailillo O: Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature Clinicial Practice Rahumatology* 2007; 12: 425-432
194. Richelsen B, Pedersen SB, Moller Pedersen T, Bak JF: Regional difference in triglyceride breakdown in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin and prostaglandine E2. *Metabolism* 1991; 40: 990-996
195. Faber DR, De Groot G, Visseren FLJ: Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis
196. Steinberg BA, Cannon CP, Hernandez AF, Pan W, Peterson AD, Fonarow GC. Medical therapies and invasive treatments for coronary artery disease by body mass: the “obesity paradox” in the Get With The Guidelines database. *Am J Cardiol*. 2007; 100: 1331-1335.

197. Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, et al: The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Card* 2001; 38: 789 – 795.
198. Oreopoulos A, McAlister FA, Kalantar-Zadeh K, Padwal R, Ezekowitz JA, Sharma AM, Kovesdy CP, Fonarow GC, Norris CM. The relationship between body mass index, treatment, and mortality in patients with established coronary artery disease: a report from APPROACH. *Eur Heart J*. 2009; 30: 2584-2592.
199. Hastie CE, Padmanabhan S, Slack R, Pell ACH, Oldroyd KG, Flapan AD, Jennings KP, Irving J, Eteiba H, Dominiczak AF, Pell JP. Obesity paradox in a cohort of 4880 consecutive patients undergoing Percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2010; 31: 222-226.
200. Iacobellis G, Sharma A M: Obesity and the heart: redefinition of relationship. *Obesity*. 2007; 8: 35-39.
201. Rotella CM, Mannucci E, Ricca V: L'obesità. Manuale per la diagnosi e la terapia. Edizione SEE Firenze. 1997, 94-102
202. JM Baena-Diez, AO Byram, M Grau, C Gomez-Fernandez et all: Obesity is an independent risk factor for heart failure: zona franca cohort study, *Clin Cardiol* 2010; 33 (12): 760-764
203. Lavie CJ, Dilani RV, Ventura HO: Obesity and risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347:305-313
204. Ahima RS, Flier JS, Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000. 62: 413-437
205. Dubey L, Hesong Z: Role of leptin in atherogenesis. *Exp Clin Cardiol* 2006; 11:269-275
206. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009;361:496-509.
207. Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol* 2010;130:1213-26.
208. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685-95.
209. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA* 2006; 296:1735-41.
210. Friedewald VE, Cather JC, Gelfand JM, et al. AJC editor's consensus: psoriasis and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2008; 102:1631-43.
211. Finlay A. Current severe psoriasis and the role of tens. *British Journal of Dermatology* 2005;152:861-7.27.
212. Weisman S, CR. P, Gottshalk R. Psoriasis disease severity measures: comparing efficacy of treatments for severe psoriasis. *J Dermatol Treat*:2003; 14:158-65.
213. Schmitt J, Wozel G. The Psoriasis Area and Severity Index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology* 2005; 210:194-9.

214. Carlin CS, Feldman SR, Krueger JG, Menter A, Krueger GG. A 50% reduction in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI 50) is a clinically significant endpoint in the assessment of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004;50:859-66.
215. Finlay A, Khan G. Dermatology Life Quality Index (DLQI)--a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol* 1994;19:210-6.
216. Hongbo Y, Thomas CL, Harrison MA, Salek MS, Finlay AY. Translating the Science of Quality of Life into Practice: What Do Dermatology Life Quality Index Scores Mean[quest]. *J Investig Dermatol* 2005; 125:659-64.
217. Callen JP, Krueger GG, Lebwohl M, et al. AAD consensus statement on psoriasis therapies. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2003; 49:897-9.
218. Sterry W, Barker J, Boehncke WH, et al. Biological therapies in the systemic management of psoriasis: *International Consensus Conference. Br J Dermatol* 2004; 151:3-17
219. Ishimori ML, Martin R, Berman DS, et al. Myocardial ischemia in the absence of obstructive coronary artery disease in systemic lupus erythematosus. *J Am Coll Cardiol Img* 2011; 4:27-33.
220. Bremmer S, Van Voorhees AS, Hsu S, et al; National Psoriasis Foundation. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63:1058-69.
221. Paul C, Gourraud PA, Bronsard V, et al. Evidence-based recommendations to assess psoriasis severity: systematic literature review and expert opinion of a panel of dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24 Suppl 2:2-9.
222. Coimbra S, Oliveira H, Reis F, et al. C-reactive protein and leucocyte activation in psoriasis vulgaris according to severity and therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24:789-96.
223. Takahashi H, Tsuji H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Serum cytokines and growth factor levels in Japanese patients with psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35:645-49.
224. Libby P, Crea F. Clinical implications of inflammation for cardiovascular primary prevention. *Eur Heart J* 2010; 31:777-83.
225. Morsy H, Kamp S, Thrane L, et al. Optical coherence tomography imaging of psoriasis vulgaris: correlation with histology and disease severity. *Arch Dermatol Res* 2010; 302:105- 11.
226. Nakai K, Yoneda K, Maeda R, et al. Urinary biomarker of oxidative stress in patients with psoriasis vulgaris and atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23:1405-08.
227. Boffa GN, Caforio ALP, Gambino A, Tona F, Gerosa G. Il trapianto cardiaco. In: Dalla Volta S., Daliento L, Razzolini R, editor. *Malattie del cuore e dei vasi*. 3<sup>o</sup>ed. Milano, Italy: *Mc Graw Hill Publ*; 2005: 263-72.

228. Costanzo MR, Augustine S, Bourge R, Bristow M, O'Connell JB, Driscoll D, et al. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. A statement for transplantation of the council on clinical cardiology, American heart association. *Circulation*. 1995; 3593-612.
229. Dreyfus G, Jebara V, Mihaileanu S, Carpentier AF. Total orthotopic heart transplantation: an alternative to the standard technique. *Ann Thorac Surg*. 1991; 52(5): 1181-4
230. Yacoub M, Mankad P, Ledingham S. Donor procurement and surgical techniques for cardiac transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 1990; 2(2): 153-61
231. Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, et al Drug therapy in the heart transplant recipient: Part I: Cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation*. 2004; 110(24); 3734-40
232. Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, et al. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: Pathologic observation and clinical implication. *J Heart Transplant*. 1989; 8(6): 430-43
233. Michaels PJ, Espejo ML, Kobashigawa J, Alejos JC, Burch C, Takemoto S, et al. Humoral rejection in cardiac transplantation: Risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant*. 2003; 22(1):58-69.
234. Uber WE, Self SE, Van Bakel AB, Pereira NL. Acute antibody-mediated rejection following heart transplantation *Am J Transplant*. 2007; 7(9): 2064-74.
235. Weis M, Hartmann A, Olbrich HG, Hor G, Zeiher AM. Prognostic significance of coronary flow reserve on left ventricular ejection fraction in cardiac transplant recipients. *Transplantation*. 1998; 65(1): 103-8.
236. Marelli D, Kobashigawa J, Hamilton MA, Moriguchi JD, Kermani R, Ardehali A, Patel J, Noguchi E, Beygui R, Laks H, Plunkett M, Shemin R, Esmalian F. Long term outcomes of heart transplantation in older recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27:830-834.
237. Tona F, Caforio AL, Montishi R, Angelini A, Ruscazio M, Gambino A, Ramondo A, Thiene G, Gerosa G, Iliceto S. Coronary flow reserve by contrast-enhanced echocardiography. A new noninvasive diagnostic tool for cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2006; 6: 998-1003
238. Caforio AL, Tona F, Fortina AB, Angelini A, Piaserico S, Gambino A, Feltrin G, Ramondo A, Valente M, Iliceto S, Thiene G, Gerosa G. Immune and nonimmune predictors of cardiac allograft vasculopathy onset and severity: Multivariate risk factor analysis and role of immunosuppression *Am J Transplant*. 2004; 4: 962-970

239. Hiemann NE, Wellnhofer E, Knosalla C, Lehmkuhl, Stein J, Hetzer R, Meyer R. Prognostic impact of microvasculopathy on survival after heart transplantation: Evidence from 9713 endomyocardial biopsies. *Circulation* 2007; 116: 1274-1282
240. Clausell N, Butany J, Molossi S, Lonn E, Gladstone P, Rabinovitch M, Daly PA. Abnormalities in intramyocardial arteries detected in cardiac transplant biopsy specimens and lack of correlation with abnormal intracoronary ultrasound or endothelial dysfunction in large epicardial coronary arteries. *J Am Cardiol.* 1995; 26: 110-119
241. Tona F, Caforio AL, Montisci R, Gambino A, Angelini A, Ruscazio M, Toscano G, Feltrin G, Ramondo A, Gerosa G, Iliceto S. Coronary flow velocity pattern and coronary flow reserve by contrast-enhanced transthoracic echocardiography predict long-term outcome in heart transplantation. *Circulation* 2006; 114:149-155
242. Tona F, Osto E, Tarantini G, Gambino A, Cavallin F, Feltrin G, Montisci R, Caforio AL, Gerosa G, Iliceto S. Coronary flow reserve by transthoracic echocardiography predicts epicardial intimal thickening in cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant.* 2010; 10: 1668-1676
243. Folkow B. Hypertensive structural changes in systemic precapillary resistance vessels: how important are they for in vivo haemodynamics? *J Hypertens* 1995; 13:1546-1559
244. Tsagalou EP, Anastasiou-Nana M, Agapitos E, Gika a, Drakos SG, Terrovitis JV, Ntalianis A, Nanas JN. Depressed coronary flow reserve is associated with decreased myocardial capillary density in patients with heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:1391-1398
245. Tona F, Marra MP, Fedrigo M, Famoso G, Bellu R, Thiene G, Gerosa G, Angelini A, Iliceto S. Recent developments on coronary microvasculopathy after heart transplantation: a new target in the therapy of cardiac allograft vasculopathy. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012
246. Tona F, Caforio AL, Montisci R, Angelini A, Ruscazio M, Gambino A, Ramondo A, Thiene G, Gerosa G, Iliceto S. Coronary flow reserve by contrast-enhanced echocardiography: a new noninvasive diagnostic tool for cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant.* 2006; 6:998-1003
247. Haring R, Friedrich N, Völzke H, Vasan RS, Felix SB, Dörr M, Meyer Zu Schwabedissen HE, Nauck M, Wallaschofski H. Positive association of serum prolactin concentrations with all-cause and cardiovascular mortality. *Eur Heart J* (2012)