



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO
E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE
INDIRIZZO IN GENETICA BIOCHIMICA E MOLECOLARE E DI MALATTIE RARE
CICLO XXIV

IMPATTO EMODINAMICO DOPO IMPIANTO DI STENT IN
REGIONE ISTMICA DELL'AORTA IN UN MODELLO ANIMALE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore :Ch.ma Prof.ssa Ornella Milanesi

Dottorando: Dott. Nicola Maschietto

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE	10
1.1 La coartazione aortica	10
1.2. Epidemiologia	10
1.3 Teorie eziopatogenetiche	10
1.4 Fisiopatologia	11
1.5 Storia Naturale	13
1.6 Correzione cardiocirurgica	13
1.6.1 Correzione termino-terminale allargata	14
1.6.2 Correzione con patch	14
1.6.3 Correzione con patch di succlavia	14
1.6.4 Bypass extra-anatomico	15
1.7 Trattamento percutaneo della coartazione aortica	15
1.7.1 Correzione mediante stent	16
1.8 Ipertensione arteriosa ricorrente e persistente dopo correzione della coartazione aortica	16
1.9 Incremento della rigidità aortica dopo stenting per coartazione aortica	17
1.10 Disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare	20
1.11 Metalloproteinasi e Caspasi nella disfunzione endoteliale	21
2. MATERIALI E METODI	23
2.1 Animale	23
2.2 Disegno dello studio sperimentale	23
2.3 Protocollo anestesilogico	24
2.4 Protocollo del primo cateterismo cardiaco	24
2.5 Protocollo del secondo cateterismo cardiaco	25
2.6 Parametri ecocardiografici	26
2.7 Analisi istologiche	27
2.8 Dosaggio degli ormoni renina-angiotensina-aldosterone	27

2.9 Studio dell'espressione genica	28
2.10 Analisi statistica	29
3. RISULTATI	30
3.1 Outcome	30
3.2 Accrescimento ponderale	30
3.3 Parametri ecocardiografici	31
3.4 Dati emodinamici	36
3.5 Renina-angiotensina-aldosterone	37
3.6 Istologia	37
3.7 Espressione genica	38
4. DISCUSSIONE	40
5. CONCLUSIONI	45
6. BIBLIOGRAFIA	46

RIASSUNTO

Obiettivi:

La coartazione istmica dell'aorta rappresenta il 5-7% di tutte le cardiopatie congenite. Nonostante un'efficace correzione anatomica, circa il 20-40% dei pazienti sviluppa un'ipertensione tardiva durante il follow-up. Studi di follow-up a lungo termine hanno dimostrato in questi malati una ridotta aspettanza di vita per un'aumentata incidenza di malattia coronarica e incidenti cerebro-vascolari.

L'eziopatogenesi dell'ipertensione tardiva sembra essere l'anomala risposta dei barocettori aortici conseguente all'aumentata rigidità dell'aorta ascendente presente sin dalla nascita in tutti i soggetti con coartazione aortica.

L'ipertensione arteriosa determinando un incremento dell'*afterload* del ventricolo sinistro causa ipertrofia dei miociti ventricolari che riducendo la loro capacità contrattile innesca un circolo vizioso che porta a scompenso cardiaco.

Al giorno d'oggi l'impianto di stent endovascolari ha sostituito le tradizionali tecniche chirurgiche nella correzione della coartazione aortica degli adolescenti e adulti. Nonostante gli eccellenti risultati immediati, non sono ancora disponibili dati certi del follow-up di questi pazienti a lungo termine. Sebbene sia stato dimostrato che la presenza di uno stent in regione istmica non sia in grado di alterare la compliance aortica, nulla si sa riguardo la possibile induzione di disfunzione endoteliale da alterazione del flusso ematico laminare a livello dell'interfaccia tra stent e aorta nativa.

Scopo del presente progetto di ricerca è studiare gli effetti emodinamici conseguenti all'impianto di uno stent sia in termini pressori che in termini di disfunzione endoteliale.

Materiali e Metodi:

Nel progetto sperimentale sono state impiegate otto pecore femmina di razza Alpagota. A un'età compresa tra tre e cinque mesi tutti gli animali sono stati sottoposti a un cateterismo cardiaco e in quattro è stato impiantato uno stent in

regione istmica. Tutti gli animali sono stati sottoposti a prima dello studio emodinamico a un'ecocardiografia completa per la determinazione della funzionalità sistolica e diastolica del ventricolo di sinistra così come per la determinazione dei volumi e spessori ventricolari.

A intervalli di tre mesi e per un totale di dodici mesi ciascun animale è stato sottoposto a regolari controlli ecocardiografici. A ciascun follow-up è stato poi prelevato un campione ematico per una successiva analisi dei livelli plasmatici della renina-angiotensina-aldosterone.

Al completamento dei dodici mesi di follow-up è stato ripetuto un nuovo studio emodinamico per la determinazione invasiva della pressione arteriosa di base e dopo stress test mediante infusione di dobutamina sino al dosaggio massimo di 10 mcg/kg/min. Terminato il cateterismo cardiaco ciascun animale è stato sacrificato e sottoposto a studio autoptico per il prelevamento di campioni tissutali dell'aorta ascendente e discendente e del miocardio del ventricolo di sinistra e dei reni per studi istologici e di biologia molecolare.

Risultati:

Dall'inizio dello studio nel giugno del 2008, un totale di dodici animali sono stati sottoposti a studio emodinamico e in otto è stato impiantato un stent metallico in regione istmica.

Delle otto pecore in cui uno stent è stato impiantato, una è deceduta in sede operatoria per dissezione aortica, due sono deceduti nella prima settimana di follow-up per sepsi, una è stata esclusa dallo studio per lo sviluppo di una insufficienza aortica durante il follow-up.

Otto animali hanno completato i dodici mesi di follow-up e sono stati sacrificati.

I due gruppi di animali non hanno mostrato differenze statisticamente significative né in termini del comportamento pressorio né in termini di funzionalità e volumetrica del ventricolo di sinistra. A livello istologico non abbiamo riscontrato differenze in termini di fibrosi e ipertrofia del ventricolo di sinistra e nell'architettura della parete aortica.

I livelli plasmatici degli ormoni renina-angiotensina-aldosterone non sono stati determinati vista la mancanza di differenza statisticamente significative delle variabili esplorate.

L'analisi dell'espressione genica dei geni attivati in condizioni di stress ossidativo (MMP-9 e Caspasi-3) non ha evidenziato differenze nei due gruppi.

Conclusioni:

I risultati di questo progetto sperimentale sembrerebbero suggerire l'ininfluenza della presenza di uno stent metallico sull'omeostasi pressoria. Nonostante vi siano delle differenze nei livelli di espressività delle MMP-9 a livello dell'aorta degli animali portatori di stent, queste differenze, verosimilmente a causa della bassa numerosità del campione oggetto di studio, non si sono dimostrate statisticamente significative.

I limiti maggiori del nostro progetto sperimentale risiedono nella bassa numerosità del campione di studio, nel periodo limitato di follow-up e nelle differenze strutturali esistenti tra l'aorta degli ovini e l'aorta dei soggetti affetti da coartazione aortica.

L'irrigidimento aortico caratteristico dei soggetti nati con coartazione aortica potrebbe essere secondario alla presenza di una disfunzione endoteliale e la presenza di uno stent in aorta potrebbe essere motivo di aggravamento di tale alterazione.

Ulteriori studi saranno necessari al fine di valutare l'appropriatezza delle nostre ipotesi.

ABSTRACT

Objectives:

The isthmic coarctation of the aorta accounts for 5-7% of all congenital heart diseases. Despite a full anatomic correction, almost 20-40% of the patients develop systemic hypertension later in their lives. Long-term follow-up studies demonstrate a reduced life expectancy for the patients born with an aortic coarctation because of increased risk for coronary artery disease and cerebral vascular incidents.

The pathogenesis of systemic hypertension following a coarctation repair seems to be related to the inappropriate response of the aortic baroreceptors to the increased stiffness of the ascending aorta, which is present in every patient affected by an aortic coarctation.

The systemic hypertension, increasing the afterload, determines hypertrophy of the myocytes of the left ventricle. The reduced contractility of the hypertrophied myocytes is responsible for driving new hypertrophy which eventually is responsible for heart failure.

Besides surgical therapies for relieving of the isthmic coarctation, nowadays the employment of endovascular stents have been successful in treating adolescents and adults affected by an aortic coarctation. Despite the extremely encouraging acute results of these endovascular techniques, no data are available regarding the long term results. Few data are available regarding the hemodynamic effect secondary to the presence of an stent and no data are available regarding the possible endothelial dysfunction secondary to the flow disturbance caused by the stent.

Aim of this animal study is to understand the hemodynamic impact of a bare metal stent in the isthmic region and how the disturbance of the normal laminar flow at the level of the stent might be responsible for dysfunction of the endothelium.

Materials and methods:

Eight female sheep of the same breed have been employed in this animal study. Between three to five months of age all the animals have been catheterized and in four of them a bare metal stent have been implanted in the aortic isthmus.

At the time of the first catheterization all the animals underwent a full echocardiographic examination collecting data regarding the systolic and diastolic functionality of the left ventricle as well as data of its dimension and thickness.

All the animals have been followed every three months for a total of twelve months after the first catheterization. Every three months the blood pressure of each animals has been checked as well a new echocardiographic evaluation has been performed. At the time of the follow-up windows blood has been drawn and stored for subsequent analysis of the renin-angiotensin-aldosterone levels and kidney function.

At the end of the twelve months a new catheterization was performed collecting two different subsets of hemodynamic data: baseline and under simulated stress condition by continuous infusion of Isoprenaline titrated up to 10 mcgs/kg/min. After this catheterization each animals were sacrificed in order to collect tissue samples of the ascending and descending aorta and the heart for microscopic and molecular biology evaluations.

Results:

Since the beginning of the study in June 2008, a total of twelve animals have been catheterized and in eight of them a bare metal stent was successfully implanted.

Three of the eight sheep in which a stent was implanted didn't survived: one animal died during the procedure because of aortic dissection, and two animals died in the first week of follow-up because of sepsis. Another animal was excluded from the study because it developed severe aortic insufficiency during the follow-up.

Eight animals completed the twelve months of follow-up and were sacrificed.

At the end of the follow-up there were no statistical differences in the weigh and growth between the sham and the stented animals as no differences were recorded in terms of blood pressure. From an echocardiographic point of view

the two groups didn't show any statistical difference in terms of LV hypertrophy and function.

The histological analysis failed to show any difference in terms of hypertrophy and fibrosis of the left ventricle and in the architecture of the ascending and descending aorta between the sham and operated animals.

Since the two groups of animals didn't differ in any of the variables analyzed, we decided to not analyze the renin-angiotensin-aldosterone levels since we didn't expect any difference between the two groups.

The analysis of the expression of genes involved in the oxidative stress (MMP-9 and Caspase-3) failed to demonstrate any statistical significance between the two groups of animals.

Conclusions:

In this animal model the presence of a rigid metallic stent doesn't seem to impact the homeostatic regulation of the cardiovascular system and it isn't responsible for the development of systemic arterial hypertension in a growing animal.

Despite a trend of significance in the different expression of the MMP-9 in the aorta of the animals with the stent compared to the sham ones, we cannot conclude the stent is responsible for the development of endothelial dysfunction.

The main limitations of this study are the small size of the sample, the limited time of follow-up and the different structure of the aorta of the sheep compared to the aorta of humans affected by coarctation of the aorta.

Our results might open new insights into the understanding of the development of the systemic hypertension after a coarctation repair. The increased stiffness of the aorta of these subjects might be secondary to the underline presence of endothelial dysfunction especially in those subjects corrected with implantation of a stent.

Further studies are needed to confirm our hypothesis.

1. INTRODUZIONE

1.1 La coartazione aortica

La coartazione aortica è un restringimento del lume dell'aorta toracica distalmente all'origine dell'arteria succlavia di sinistra nella zona limitrofa all'inserzione del dotto arterioso.

La coartazione aortica può esistere sia come forma associata a sindromi genetiche (sindrome di Turner, Noonan, Williams e Kabuki) [1] sia come forma isolata apparentemente sporadica. Tuttavia, le forme isolate spesso si accompagnano ad altre anomalie cardiovascolari "minori" come la valvola aortica bicuspide [2], la stenosi sub-aortica [3, 4], l'insufficienza mitralica [5, 6] e i difetti del setto interventricolare.

Nei neonati, la coartazione aortica è una entità fisiologica complessa spesso associata a un'ipoplasia significativa dell'arco aortico e a difetti del setto interventricolare [7] così come ad altre anomalie congenite complesse come il tronco arterioso comune, il ventricolo destro a doppia uscita e le sindromi univentricolari. Nei bambini e negli adulti, la coartazione aortica si presenta solitamente come una lesione isolata.

1.2. Epidemiologia

La coartazione aortica rappresenta il 5-7% di tutte le cardiopatie congenite [8] con un'incidenza di 1:12.000 nati vivi [9]. E' la quarta causa più comune che richiede cateterismo cardiaco o intervento chirurgico durante il primo anno di vita [10]. E' più frequente nel sesso maschile che nel sesso femminile con un rapporto che varia tra 1,27:1 e 1,74:1 [11]. Circa il 35% delle pazienti con sindrome di Turner è affetta da una coartazione aortica [12, 13].

1.3 Teorie eziopatogenetiche

A oggi l'esatto meccanismo alla base di uno sviluppo di una coartazione aortica non è ancora completamente chiaro, diverse ipotesi sono state formulate, ma le due più frequentemente sostenute sono: la teoria emodinamica e la teoria del tessuto duttale ectopico.

Secondo la teoria emodinamica lo sviluppo della coartazione aortica sarebbe diretta conseguenza di un anomalo flusso preduttale e/o un'anomala inserzione tra il dotto arterioso e l'aorta discendente toracica che a loro volta determinerebbero in epoca pre-natale da un lato un incremento dello shunt destro-sinistro a livello duttale e dall'altro una riduzione del flusso ematico attraverso l'istmo aortico. Con la chiusura post-natale del dotto arterioso si renderebbe manifesta la stenosi della regione istmica. A supporto di tale teoria vi sono il riscontro di un alto tasso d'incidenza di coartazione aortica nei soggetti con difetti cardiaci congeniti che riducono durante la vita fetale il flusso aortico anterogrado e la pressoché' assenza di questa patologia nei soggetti affetti da lesioni ostruttive delle sezioni cardiache di destra [14, 15].

Alla base della seconda teoria eziopatogenetica vi sarebbe la colonizzazione della parete posteriore dell'aorta da parte di tessuto ectopico duttale. Dopo la nascita, alla chiusura del dotto arterioso, le cellule duttali ectopiche determinerebbero con la loro contrazione una retrazione della parete posteriore dell'aorta sviluppando così una coartazione [16-21]. Il limite maggiore di questa teoria risiede nella sua incapacità di spiegare i diversi gradi d'ipoplasia dell'arco aortico e della regione istmica che spesso si associano alla coartazione aortica.

1.4 Fisiopatologia

Gli effetti fisiopatologici della coartazione aortica sono funzione diretta della differenza di pressione esistente tra il distretto a monte e a valle dell'ostacolo. L'incremento della pressione nel distretto arterioso sovrastante la stenosi si traduce in un incremento del post-carico e dello stress di parete del ventricolo sinistro che causano un'ipertrofia compensatoria dei miociti.

In base alla rapidità con cui si sviluppa l'aumento del post-carico ventricolare, i meccanismi di compenso fisiologici possono o meno riequilibrare la stabilità emodinamica del malato. Nei neonati con coartazione aortica severa, alla chiusura del dotto arterioso, l'aumento del post-carico è di solito improvviso. Il ventricolo di sinistra non avendo il tempo di sviluppare un'ipertrofia compensatoria non è in grado di far fronte all'ipertensione sistolica e diviene rapidamente disfunzionante. La disfunzione di pompa ventricolare determina pertanto un incremento della pressione telediastolica ventricolare che si traduce dapprima in un'ipertensione dell'atrio sinistro e successivamente in ipertensione polmonare con conseguente scompenso ventricolare destro. Se alla nascita l'ostruzione istmica non è severa, alla chiusura del dotto arterioso, il graduale incremento del post-carico ventricolare permette da un lato al ventricolo sinistro di sviluppare un'ipertrofia compensatoria e dall'altro favorisce lo sviluppo di circoli collaterali decompressivi. Non è raro che i soggetti con circoli collaterali ben rappresentati rimangano asintomatici per lungo tempo e che la diagnosi di coartazione aortica venga fatta in seguito al riscontro occasionale dell'ipertensione arteriosa o al verificarsi di complicanze secondarie allo stato ipertensivo.

Il meccanismo fisiopatologico per cui questi malati sviluppano un'ipertensione arteriosa non è completamente noto: delle diverse ipotesi formulate, sicuramente un ruolo chiave è giocato sia dall'ostacolo meccanico in se' sia dal sistema renina-angiotensina-aldosterone.

Secondo la teoria meccanica l'ipertensione arteriosa maggiore sarebbe necessaria per mantenere un adeguato flusso ematico sia attraverso il segmento aortico ostruito sia attraverso i circoli collaterali. Tuttavia questa teoria non sembra spiegare perché non sussista una relazione lineare tra la severità dell'ipertensione arteriosa e il grado della stenosi del segmento coartato, così come perché le resistenze arteriolarie sistemiche siano aumentate anche a valle dell'ostruzione e perché una volta eliminato l'ostacolo non si abbia un ritorno immediato a uno stato eusfigmico.

Per la teoria umorale, il ridotto flusso ematico renale dovuto alla presenza dell'ostacolo in regione istmica, porterebbe all'attivazione del sistema renina-

angiotensina-aldosterone che con i suoi effetti sul sistema cardiovascolare spiegherebbe la maggior parte delle manifestazioni cliniche presentate dai soggetti affetti da questa patologia [22-24]. Diversi studi clinici hanno di fatto confermato la presenza di un'anomala attivazione di questo asse nei soggetti affetti da coartazione aortica [25], così come in altri studi è stata messa in evidenza un'alterata attivazione del sistema nervoso simpatico centrale il quale anche contribuirebbe alla genesi dello stato ipertensivo [26]. La contemporanea attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e del simpatico centrale incrementano da un lato la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca [27] e dall'altro inducono il rilascio della vasopressina dalla neuro-ipofisi che aggrava lo stato ipertensivo aumentando a livello renale la ritenzione idrica e inducendo a livello sistemico vasocostrizione delle arteriole. Come spesso accade, i meccanismi di compenso messi in atto dal sistema cardiovascolare per far fronte all'aumento del post-carico conseguente alla coartazione aortica divengono essi stessi responsabili di un ulteriore incremento del post-carico e dello stress di parete ventricolare e a loro volta favoriscono lo sviluppo d'ipertrofia ventricolare con un'evoluzione a lungo termine in scompenso cardiaco congestizio.

1.5 Storia Naturale

In era pre correzione chirurgica, il tasso di mortalità dei soggetti con coartazione aortica non corretta era del 90% a 50 anni con un'età media al decesso di 35 anni. Oggi, la mortalità per coartazione aortica è influenzata dall'età del paziente, dalle sue dimensioni e dalla presenza di anomalie cardiovascolari maggiori. Contribuiscono alla mortalità e morbilità' per questa condizione patologica l'ipertensione arteriosa, le emorragie cerebrali, la dissezione aortica, l'endocardite e lo scompenso cardiaco congestizio [28].

1.6 Correzione cardiocirurgica

Le prime correzioni chirurgiche della coartazione aortica risalgono agli anni '40 descritte da Gross e Hufnagel nel 1945 e da Crafoord e Nylin sempre nel 1945

[29, 30]. Da allora la terapia chirurgica è stata per molti anni il gold standard per il trattamento di questa condizione. Diverse tecniche sono state descritte (resezione con anastomosi termino-terminale, aortoplastica con patch, aortoplastica con flap dell'arteria succlavia di sinistra, bypass extra-anatomici con graft tubulari), ciascuna caratterizzata da vantaggi e svantaggi.

1.6.1 Correzione termino-terminale allargata

La descrizione originale di questa tecnica risale al 1945 da parte di Crafoord e Naylin [29] e tuttora rimane in molti centri la tecnica di scelta nei pazienti affetti da coartazione aortica [31-34]. I vantaggi di questa tecnica chirurgica risiedono nella completa escissione del segmento stenotico e delle regioni limitrofe, nel non impiego di materiale protesico e nella preservazione dell'arteria succlavia di sinistra. Data l'elevata incidenza di restenosi al follow-up [35] la tecnica di sutura dei monconi aortici è stata successivamente modificata rispetto alla descrizione originale con sutura circonferenziale continua impiegando una tecnica a punti staccati con fili riassorbibili che ha ridotto la recidiva a circa il 10-14% dei malati [31, 32, 36].

1.6.2 Correzione con patch

Tecnica descritta nel 1961 da Vossschulte [37] prevede l'allargamento del tratto stenotico mediante impiego di patch in Dacron o Gore-Tex. Rispetto alla resezione termino-terminale questa tecnica non necessita di mobilizzazione dei monconi aortici e non sacrifica le arterie intercostali che originano dal segmento coartato. Tuttavia richiede l'impiego di materiale protesico ed è gravata da un'alta incidenza di aneurismi al follow-up [38, 39].

1.6.3 Correzione con patch di succlavia

Tecnica descritta da Waldhausen nel 1966 [40]. Prevede l'impiego di un lembo mobile di succlavia che ribaltato sull'area stenotica funge da patch di

allargamento autologo; non richiede ne' la mobilizzazione dell'aorta ne' l'impiego di materiale protesico così come non prevede suture circolari continue. Lo svantaggio di questa tecnica consiste nel sacrificio dell'arteria succlavia di sinistra che può compromettere lo sviluppo somatico dell'arto superiore di sinistra [41].

1.6.4 Bypass extra-anatomico

Tecnica descritta nel 1973 da Weldon [42] utilizza protesi tubulari per bypassare letteralmente l'ostacolo. L'utilizzo di questa tecnica è pressoché' esclusivo nei soggetti adulti con coartazione nativa o con recoartazione laddove i trattamenti percutanei abbiano fallito. Non necessita di clampaggio aortico e di resezione del segmento stenotico ed evita di eseguire suture su un vaso divenuto con l'età sclerotico, anelastico e friabile [43, 44].

1.7 Trattamento percutaneo della coartazione aortica

La tecnica dell'angioplastica percutanea con palloncino descritta inizialmente da Gruntzig nel 1977 [45] venne utilizzata nel trattamento della coartazione aortica da Sos nel 1979 [46], da Singer nel 1982 [47] e da Sperling nel 1983 [48] rispettivamente in un cadavere, in una recoartazione post-chirurgica e in una coartazione nativa. Oggi grazie all'alto tasso di successo, al pressoché' assente dolore post-operatorio e ai contenuti costi è divenuta il trattamento di scelta in molti centri [49-51].

La tecnica prevede l'esecuzione di una dilatazione per via retrograda della sede stenotica con un catetere a palloncino che abbia un diametro circa doppio rispetto al punto di massima ostruzione ma non superiore alle dimensioni dell'arco trasverso o dell'aorta discendente a livello del diaframma [52, 53]. L'angioplastica nei vasi stenotici si definisce efficace quando determina in essi delle micro lacerazioni a livello della tonaca media e intima. In studi sperimentali eseguiti nell'animale, si è evidenziato come dopo circa 8 settimane dall'angioplastica si abbia una completa riparazione della tonaca intima e un

assottigliamento della tonaca media senza formazione di aneurismi laddove si erano create le micro lacerazioni [54].

1.7.1 Correzione mediante stent

Nei primi anni '90 l'impiego in modelli animali degli stent espandibili su pallone per il trattamento della coartazione aortica si dimostrò da subito efficace e sicura [55, 56]

Tra i molti teorici vantaggi di questa tecnica rispetto all'angioplastica semplice, il più importante risiede nella forza radiale dello stent che supportando la parete vasale ne previene il recoil riducendo le restenosi residue o ricorrenti [57, 58]. Per creare la rottura intimale "terapeutica" e migliorare così il diametro vasale l'angioplastica richiede un sovradimensionamento del diametro del pallone a diametri superiori rispetto a quelli del vaso da dilatare. Gli stent invece non necessitano mai di un sovradimensionamento e pertanto riducono di molto il trauma della parete vasale.

1.8 Ipertensione arteriosa ricorrente e persistente dopo correzione della coartazione aortica.

La prognosi a lungo termine dopo correzione chirurgica o interventistica della coartazione aortica è strettamente legata allo sviluppo o alla persistenza dell'ipertensione arteriosa sistemica. Quest'ultima, causando lo sviluppo e la rapida progressione dell'arteriopatia arteriosclerotica, diviene responsabile di precoci eventi cardiovascolari maggiori [59-63].

In diversi studi è stato evidenziato come fino al 75% dei pazienti sviluppino questa complicanza dopo 20-30 dalla correzione chirurgica [62, 64]. Sebbene inizialmente si pensasse che questa entità clinica fosse esclusiva dei soggetti con età avanzata al momento della correzione, studi successivi hanno dimostrato che anche nei soggetti sottoposti a correzione precoce vi sia una tendenza a sviluppare tale stato patologico e che solo una piccola percentuale di questi soggetti presenti un ostacolo residuo a livello istmico. [65].

Diverse variabili sono state chiamate in causa nella patogenesi di questo stato morboso: la ridotta compliance arteriosa e la ridotta sensibilità dei riflessi barorecettoriali ([66, 67], l'alterata funzione vascolare [68, 69] e l'iperattività del sistema RAA [70]. Tuttavia nessuna di queste variabili è in grado di spiegare da sola la genesi di questa condizione ed è quindi verosimile ipotizzare che più fattori giochino contemporaneamente. Notevole interesse a riguardo riveste la possibile correlazione tra la riduzione della compliance aortica e l'alterazione delle risposte barocettoriali in quanto diversi studi hanno ormai confermato un incremento della rigidità aortica nei soggetti dopo correzione chirurgica [68, 71]. Già nel 1982 Sehested et al. Dimostrarono che [72] esisteva una relazione tra l'alterata risposta barocettoriale e l'anomala struttura della parete aortica e ipotizzarono che a parità di pressione i barocettori dell'aorta ascendente potessero avere una minor attivazione rispetto a quelli collocati in aorta discendente nei soggetti con coartazione aortica. Tale ipotesi derivava da due constatazioni: i frammenti di aorta provenienti dalle zone pre stenosi esibivano una minor contrazione isometrica dopo stimolo con potassio, noradrenalina e prostaglandine rispetto ai frammenti provenienti dalle aree situate dopo l'ostacolo. E inoltre dal punto di vista istologico i frammenti dell'aorta ascendente si caratterizzavano per un maggior contenuto di collagene e una minor quantità di cellule muscolari lisce. Questo studio concludeva che la minor attivazione dei barocettori dell'aorta ascendente rendeva il distretto arterioso pre ostruzione più tollerante all'ipertensione.

Studiando le relazioni tra sensibilità dei barocettori e compliance aortica negli adolescenti con e senza ipertensione arteriosa dopo correzione di coartazione, è stato dimostrato come, inizialmente, l'aumento della rigidità aortica sia compensato da un'aumentata sensibilità dei barocettori e successivamente al fallire di questo labile compenso divenga manifesta la latente ipertensione arteriosa [73].

Che i soggetti affetti da coartazione aortica abbiano una precoce disregolazione del controllo autonomico della pressione arteriosa è confermato da studi effettuati in pazienti neonati. Comparando neonati con coartazione a neonati sani

si è visto che i primi hanno una ridotta sensibilità dei barorecettori e una ridotta variabilità del ritmo cardiaco [66].

Per quanto riguarda l'effetto della presenza di una coartazione aortica sulla rigidità delle pareti vascolari è ormai stato chiaramente dimostrato come, nei soggetti con coartazione aortica, l'aorta ascendente sia più rigida e meno distensibile rispetto ai controlli sani. Vogt [67] analizzando questi parametri a livello dell'aorta ascendente e discendente dei neonati prima e dopo correzione chirurgica e comparando i risultati a quelli ottenuti da un campione di neonati sani, ha di fatto dimostrato come l'aorta ascendente dei soggetti malati sia più rigida e meno distensibile sia prima che dopo l'intervento chirurgico a differenza dell'aorta discendente che risulta sovrapponibile per caratteristiche nei due gruppi.

Le stesse variabili analizzate a tre anni di distanza hanno dimostrato una persistenza della rigidità e della scarsa distensibilità a livello dell'aorta ascendente dei soggetti operati rispetto a controlli sani [74] ed è stata dimostrata esistere una correlazione lineare tra la pressione aortica e il grado di rigidità aortica [73].

1.9 Incremento della rigidità aortica dopo stenting per coartazione aortica

Nonostante la correzione della coartazione aortica mediante impianto di stent sia diventata progressivamente la terapia di scelta in molti centri per la minor invasività per il paziente, il tempo di degenza più breve, il minore dolore post-operatorio e i costi economici più bassi, rimane tuttavia ancora dibattuto se il segmento di aorta stentato, divenendo non compliant, possa alterare negativamente la compliance di tutta l'aorta e divenire esso stesso responsabile di sequele emodinamiche negative [75-83].

La ridotta compliance del segmento in cui è stato impiantato uno stent causando una perdita dell'energia pulsatile potrebbe aumentare l'impedenza al flusso ematico riducendo la perfusione distale, aumentando la riflessione delle onde di pressione e incrementando lo stress meccanico a livello dell'interfaccia tra stent e arteria nativa [84], divenendo pertanto causa d'ipertensione arteriosa, di

riduzione della perfusione coronarica e di riduzione della tolleranza allo sforzo [82, 85, 86].

Da un punto di vista fisico le precedenti affermazioni non trovano alcun riscontro in quanto la lunghezza del segmento aortico irrigidito dallo stent non è paragonabile all'intera lunghezza dell'aorta. Infatti, in un modello fisico teorico, la velocità di un'onda è uguale al prodotto della frequenza per la lunghezza d'onda ($c=f\lambda$ dove c è la velocità, f è la frequenza e λ la lunghezza d'onda). Nei soggetti dopo correzione di coartazione aortica la velocità media della propagazione dell'onda sfigmica è circa 9 metri/sec [68], assumendo una frequenza cardiaca media di 60/min, si evince che la lunghezza dell'onda pressoria è di circa 9 metri e pertanto da un punto di vista teorico uno stent la cui lunghezza è di pochi centimetri non può influire sulla propagazione delle onde pressorie e di flusso che hanno lunghezza di diversi metri.

Grazie a tecniche di simulazione computazionali delle dinamiche dei fluidi, è stato possibile riprodurre in maniera accurata la fisiologia del flusso ematico attraverso una coartazione aortica così come è stato possibile studiare le modifiche della pressione e della deformazione aortica. E' stato inoltre possibile simulare i cambiamenti della proprietà elastiche della parete aortica indotte dalle diverse tecniche correttive [87-89]. Anche da queste simulazioni paziente-specifiche, è emerso il risultato che la compliance dell'aorta a monte della coartazione è ridotta rispetto ai segmenti a valle e che la presenza di uno stent non altera negativamente la compliance aortica e pertanto non incrementa il carico di lavoro cardiaco se paragonato all'intervento chirurgico tradizionale [87].

A conferma dei modelli sperimentali di simulazione al computer, test in vivo su animali hanno raggiunto i medesimi risultati [90].

Confutata l'ipotesi che la presenza di uno stent possa influire negativamente sulla compliance di tutta l'aorta, resta da indagare se le proprietà meccaniche degli stent stessi possano alterare i flussi ematici a livello delle zone di confine tra aorta native e aorta "stentata". Teoricamente lo stent potrebbe favorire una separazione dei flussi ematici con aumento dello "shear stress" endoteliale,

innesco di danno endoteliale da induzione di stress ossidativo e conseguente induzione di fibrosi e morte delle cellule endoteliali stesse.

1.10 Disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare

L'endotelio con la sua capacità di risposta a numerosi stimoli autacrini e paracrini e alla sua capacità di rispondere a diversi stimoli fisiologici quali lo stress pulsatile, le "shear stress forces" del flusso ematico e la tensione parziale di ossigeno è un target precoce dei fattori di rischio cardiovascolari e delle malattie cardiovascolari quali l'ipertensione arteriosa.

L'endotelio partecipa alla regolazione della pressione arteriosa rilasciando numerose sostanze sia con effetto vasodilatatorio come l'ossido nitrico, le prostaciline e il fattore iperpolarizzante derivato dall'endotelio (EDHF), sia con effetto vasoconstrictorio come l'endotelina [91, 92]. Tra queste sostanze l'ossido nitrico riveste un ruolo chiave per le sue capacità di regolazione del tono vascolare, d'inibizione dell'aggregazione piastrinica e della proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali [93, 94].

Alterazioni della vasodilatazione dipendente dall'endotelio sono state dimostrate a livello delle arterie dell'avambraccio, delle coronarie e dei vasi renali dei pazienti affetti da ipertensione [95-101], dislipidemia [102, 103], diabete mellito [104-106] e malattia coronarica [107-111].

Un normale funzione endoteliale deriva dall'equilibrio tra i livelli di ossido nitrico e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sembra giocare un ruolo chiave nello sviluppo delle malattie del sistema cardiovascolare. Un'aumentata produzione di ROS, definito come stress ossidativo, altera questo equilibrio ed è alla base della patogenesi nell'uomo di molte malattie cardiovascolari quali l'ipertensione, le dislipidemie, il diabete mellito, l'aterosclerosi, l'infarto miocardico e lo scompenso cardiaco [112-115] [116, 117] e in modelli animali dell'ipertensione arteriosa [118-120]

In condizioni di stress ossidativo si ha l'attivazione a livello intracellulare di numerose cascate del segnale e di fattori trascrizionali sensibili agli agenti

riducenti che regolano la proliferazione, l'ipertrofia, l'apoptosi e l'infiammazione delle cellule muscolari lisce vasali, delle cellule endoteliali e dei miociti.

1.11 Metalloproteinasi e Caspasi nella disfunzione endoteliale

A livello intracellulare, in condizioni di stress ossidativo si ha l'induzione dell'espressione genica e l'attivazione delle metalloproteinasi della matrice (MMP) [121, 122].

Le MMP giocano un ruolo fondamentale nella degradazione delle proteine della matrice extracellulare, tra cui l'elastina, i proteoglicani e il collagene e giocano un ruolo fondamentale nel fisiologico rimodellamento vascolare [123, 124]. Tuttavia, con un'eccessiva espressione e attività delle MMP, si può determinare un rimodellamento cardiovascolare inappropriato che può esitare in arteriosclerosi, formazione di aneurismi e restenosi [125-130].

La MMP-9 è un membro importante di questa famiglia ed è in grado di degradare la gelatina e frammenti del collagene tipo IV che costituiscono parte della membrana basale [131]. Nell'ipertensione arteriosa, nei soggetti con coronaropatia e diabete di tipo II e nell'arteriosclerosi precoce sono stati riscontrati livelli circolanti aumentati di MMP-9 [125, 132, 133]. Livelli aumentati di questo enzima sembrerebbero essere in grado di predire la mortalità nei soggetti con coronaropatia e associarsi a un'aumentata rigidità aortica [134, 135]. Quando la produzione di collagene è accelerata a spese dell'elastina, le arterie divengono progressivamente più rigide [135].

Se da un lato lo stress ossidativo attiva il sistema delle MMP, dall'altro è responsabile della morte delle cellule muscolari lisce vasali per via apoptotica. La morte cellulare apoptotica è conseguenza della lisi di proteine cellulari critiche ad opera di specifiche proteasi intracellulari chiamate Caspasi [136] tra cui la Caspasi-3, mediatore chiave dei processi apoptotici delle cellule dei mammiferi [137-139].

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un fenomeno ben noto in molti sistemi cellulari [140] e gioca un ruolo determinante nello sviluppo tissutale e degli organi. Sia nell'uomo [141, 142] sia in modelli animali d'ipertensione

arteriosa [143] l'apoptosi delle cellule muscolari lisce vasali è stata dimostrata essere in parte responsabile dell'ipertrofia fisiologica e del rimodellamento delle arterie che si verifica in corso d'ipertensione arteriosa, arteriosclerosi e restenosi dopo angioplastica.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Animale

Lo studio è stato condotto su femmine di pecore della razza Alpagota. Gli animali sono stati stabulati in accordo alle raccomandazioni della legge 116/92. Durante le varie fasi dello studio gli animali sono stati stabulati all'interno di box del Dipartimento di Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova, in un numero massimo di 6 animali per box. L'alimentazione degli animali era costituita da fieno e acqua ad libitum in aggiunta al mangime complementare specifico "Compli Sheep" (TECNOZOO - Torreselle di Piombino Dese (PD) – ITALY).

2.2 Disegno dello studio sperimentale

Otto pecore femmine di razza Alpagota sono state ugualmente divise in un gruppo sperimentale e un gruppo di controllo. Ad un'età compresa tra i tre e i cinque mesi tutti gli animali sono stati sottoposti dapprima a un'ecocardiografia completa in sedazione e successivamente a studio emodinamico invasivo. Solo nel gruppo sperimentale al termine dello studio emodinamico invasivo è stato impiantato uno stent in regione istmica.

Con cadenza trimestrale e per un totale di 12 mesi di follow-up ciascun animale è stato sottoposto a periodici controlli ecocardiografici di controllo e campioni di sangue sono stati prelevati e conservati in azoto liquido per eventuali future analisi per la determinazione dei livelli degli ormoni del sistema renina-angiotensina-aldosterone.

Al termine del dodicesimo mese di follow-up ciascun animale è stato nuovamente sottoposto a un secondo studio emodinamico invasivo. Nel corso di questo secondo cateterismo cardiaco sono stati raccolti due diversi set di dati pressori: di base e in corso di stress farmacologico con infusione continua di dobutamina titrata sino a un massimo dosaggio di 10 mcg/kg/min con il fine di ricreare le condizioni emodinamiche che si verificano in corso di esercizio fisico.

Al termine del secondo cateterismo cardiaco ciascun animale è stato sacrificato e sottoposto a studio autoptico con prelievo di frammenti di tessuto cardiaco, renale, dell'aorta ascendente e dell'aorta discendente.

2.3 Protocollo anestesiológico

Due differenti protocolli anestesiológicos sono stati adottati durante lo studio.

Sedazione per esecuzione dei controlli ecocardiografici: premedicazione endovenosa con Midazolam 0,3 mg/kg e Metadone 0,2 mg/kg e successiva sedazione profonda con Propofol al dosaggio di 4-6 mg/kg.

Anestesia generale per esecuzione degli studi emodinamici invasivi: premedicazione endovenosa con Midazolam 0,3 mg/kg e Metadone 0,2 mg/kg, induzione dell'anestesia generale con Propofol 4-6 mg/kg e mantenimento dell'anestesia generale dopo intubazione oro-tracheale mediante Isoflurano.

2.4 Protocollo del primo cateterismo cardiaco

Dopo induzione dell'anestesia generale l'animale veniva posto in decubito laterale destro e la sede d'incannulazione arteriosa veniva preparata mediante tricotomia e disinfezione con Betadine.

La sede e la modalità d'incannulazione arteriosa differiva tra il primo e il secondo cateterismo cardiaco. Al primo intervento si procedeva a isolamento ed esposizione chirurgica dell'arteria carotide comune di sinistra. Dopo confezionamento di una borsa di tabacco con un filo di sutura in prolene 5/0 si procedeva all'introduzione con tecnica di Seldinger di un introduttore valvolato 12 fr all'interno del lume vascolare (Check-Flo Performer Introducer 12 fr – Cook Medical).

Ottenuto l'accesso vascolare, sotto monitoraggio fluoroscopico continuo (sistema Radius S9 – Multi Image – Italy), si eseguiva un cateterismo cardiaco sinistro completo con misurazioni dirette della pressione in ventricolo sinistro, aorta ascendente e aorta discendente. Per misurare la pressione nei diversi distretti si utilizzava un catetere angiografico 5 fr tipo Gensini (Balt Extrusion –

Montmorency –France) collegato a un trasduttore di pressione che a sua volta era collegato a un monitor pressorio CardioCap II (Datex – Olanda).

Tutte le misurazioni pressorie venivano salvate su supporto digitale al fine di poter eseguire un'analisi off-line delle registrazioni al termine della procedura.

Al termine dello studio emodinamico si procedeva a esecuzione di un'aortografia in tutti i due gruppi di animali (gruppo sperimentale e gruppo sham).

Nel gruppo sperimentale si procedeva a questo punto a impianto in regione istmica di uno stent CP8Z39 in Platino-Iridio-Oro della lunghezza di 39 mm (NuMed Inc. – Cornwall – Canada) espanso sino a un diametro finale di 23 mm con l'ausilio di un catetere da valvuloplastica Crystal Balloon 23x40 mm (Balt Extrusion – Montmorency – France). Una volta impiantato lo stent si procedeva a una nuova misurazione della pressione in aorta discendente e in aorta ascendente e all'esecuzione di un'aortografia di controllo.

Terminato il cateterismo cardiaco si rimuoveva l'introduttore valvolato dalla carotide comune di sinistra chiudendo la borsa di tabacco e si procedeva a chiusura della breccia chirurgica con sutura a strati.

2.5 Protocollo del secondo cateterismo cardiaco

Il protocollo del secondo cateterismo cardiaco prevedeva, dopo l'induzione dell'anestesia generale e l'intubazione oro-tracheale dell'animale, l'impiego dell'arteria femorale comune di destra come accesso vascolare. Dopo tricotomia e accurata disinfezione della cute, si procedeva a incannulazione percutanea con tecnica di Seldinger dell'arteria femorale comune di destra e introduzione di un introduttore valvolato 8 fr (Check-Flo Performer Introducer 8 fr – Cook Medical). Ottenuto l'accesso vascolare si procedeva in entrambi i gruppi di animali alla misurazione diretta della pressione in ventricolo sinistro, aorta ascendente e discendente. Terminato lo studio di base veniva eseguito un secondo studio emodinamico simulando un esercizio fisico somministrando per via endovenosa continua della Dobutamina che veniva titrata sino al dosaggio massimo di 10 mcg/kg/min.

Al termine del secondo studio emodinamico si procedeva al sacrificio dell'animale mediante somministrazione di soluzione Tanax (Embutramide, Mebrenzonio ioduro e Tatraccaina).

2.6 Parametri ecocardiografici

Per ogni parametro ecocardiografico raccolto sono state ottenute tre misurazioni successive. Ai fini dell'analisi statistica è stata considerata la media delle tre misurazioni.

Sono stati valutati i seguenti parametri ecocardiografici: spessore del setto interventricolare in diastole e in sistole (IVSd, IVSs), spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in diastole e in sistole (PWd, PWs), diametro telediastolico e telesistolico del ventricolo di sinistra (LVIDd, LVIDs). Ciascuno dei parametri sopracitati è stato misurato da un M-MODE di un asse corto parasternale.

Sono stati inoltre valutati il volume telediastolico e telesistolico del ventricolo di sinistra (EDV e ESV) ottenuti con il metodo Teicholz a partire dal diametro telediastolico e telesistolico del ventricolo di sinistra misurati da un M-MODE di un asse corto parasternale. La frazione di eiezione del ventricolo di sinistra è stata derivata poi a partire del EDV e ESV.

Sono state registrate le curve Doppler trans-valvole aortica e mitralica. Dalla curva Doppler trans-valvola mitrale sono state determinati i valori delle onde E e A espressione rispettivamente del riempimento ventricolare rapido e del riempimento ventricolare dovuto alla sistole atriale e il valore del rapporto E/A.

I seguenti parametri sono stati ricavati dagli spettri Doppler trans valvolare aortico e trans-valvolare mitralico:

- Pre-ejection Period (PEP) corrispondente alla durata delle sistole isovolumetrica. Si calcola misurando l'intervallo di tempo tra l'inizio del QRS all'ECG e la comparsa di flusso anterogrado trans-aortico.

- Ejection Time (ET) corrispondente al tempo della sistole meccanica. Si determina calcolando l'intervallo tra la comparsa di flusso anterogrado attraverso la valvola aortica e la chiusura dei lembi della medesima valvola.
- IsoVolumic Relaxation Time (IVRT) corrispondente al tempo di rilasciamento isovolumetrico tra un ciclo cardiaco e il successivo. E' l'intervallo di tempo trascorso tra la chiusura delle valvole semilunari e l'apertura della valvole atrioventricolari. Un allungamento di questo indice è espressione di una disfunzione diastolica del ventricolo di sinistra.
- Systolic Time Interval dato dal rapporto PEP/ET. Un allungamento di tale rapporto è espressione di un deficit della funzionalità sistolica ventricolare.

2.7 Analisi istologiche

Al sacrificio dell'animale si procedeva al prelievo di campioni dei seguenti tessuti:

- Ventricolo sinistro (miocardio della parete libera e del setto interventricolare)
- Rene
- Aorta (un campione proveniente dall'aorta ascendente e un campione proveniente dall'aorta discendente al di sotto della regione istmica)

Da ciascun animale si prelevava un campione da ciascuna delle sedi sopradescritte che veniva conservato in soluzione di Formalina per le analisi istologiche classiche. Dalla aorta invece si prelevavano due ulteriori campioni che dopo un'iniziale fissazione in soluzione RNALater venivano successivamente congelati in azoto liquido e stoccati alla temperatura di -80 C per lo studio dell'espressione genica tissutale.

2.8 Dosaggio degli ormoni renina-angiotensina-aldosterone

A ogni fase dello studio (primo cateterismo cardiaco, follow-up ecocardiografici e secondo cateterismo cardiaco) da ciascun animale è stato prelevato un campione

ematico per la determinazione, a studio completato, dei livelli plasmatici della renina-angiotensina-aldosterone.

2.9 Studio dell'espressione genica

A studio completato si è proceduto ad estrazione del RNA previa omogeneizzazione dei tessuti con l'ausilio dello strumento MagNA Lyser (Roche). Dal tessuto omogenizzato sono stati estratti gli RNA con l'impiego dei kit RNeasy Fibrous Tissue (Qiagen). La purezza e la quantificazione del RNA è stata determinata tramite spettrofotometria (260/280 nm) e l'integrità del RNA è stata valutata con un 2100 BioAnalyzer Agilent impiegando un RNA Nano LabChips.

Il primo filamento di cDNA è stato sintetizzato con 1 µg di RNA estratto utilizzando il kit di sintesi iScript cDNA (Bio-Rad, Hercules, CA) come da istruzioni del costruttore. L'analisi della reazione polimerasica a catena quantitativa in tempo reale è stata eseguita all'interno di un Thermal Cycler (CFX96, Bio-Rad, Hercules, CA).

In breve, il cDNA è stato amplificato in una reazione PCR in tempo reale contenente sia 400 nmol di ciascun primer che 5X SYBR Green SuperMix (Bio-Rad, Hercules, CA). Ciascuna reazione è stata eseguita su piastre con 96 pozzetti in triplice copia. Un controllo negativo contenente tutti i reagenti ma non il cDNA è stato incluso in ciascuna reazione. La PCR real-time è stata eseguita seguendo il seguente schema termico: 95°C per tre minuti per denaturare, 45 cicli a 95°C per 30 secondi per denaturare e 60°C per un minuto per appaiamento ed estensione. I primer sono stati disegnati da sequenze estrapolate dal database GenBank utilizzando Primer 3 (Whitehead Institute, Cambridge, Massachusetts, USA). I primer impiegati sono i seguenti:

Caspase-3: aatgttgaattaatgagcgac (forward) and aggtgctgtagaatatgcata (reverse);

MMP-9: ccgacgacatgctctggtgc (forward) tcgtagttagcagtggtggc (reverse);

β-actin: ctggcaccagcagcatgaa (forward) cctgcgctccaacaagtctt (reverse).

La β -actin è stata utilizzata come gene housekeeping. L'analisi dei dati è stata eseguita con il software iQ™ Optical System (Bio-Rad, Hercules, CA).

L'analisi quantitativa è stata valutata in relazione al gene housekeeping beta-actina. I prodotti di amplificazione così ottenuti sono stati analizzati quantitativamente mediante un metodo di comparazione dei cicli soglia (ct) per ogni campione ($\Delta\Delta ct$)[144]

2.10 Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. Le differenze tra i due gruppi sono state analizzate mediante t-test a due code, le differenze intra-gruppo sono state analizzate mediante t-test per dati appaiati, le differenze delle diverse variabili nel tempo sono state analizzate mediante test di ANOVA ad una via. Un valore della $p < 0,05$ è stata considerata significativa.

Le analisi sono state condotte con l'impiego del Software SPSS 15 (SPSS, Chicago, IL).

3. RISULTATI

3.1 Outcome

Dal luglio 2008 a marzo 2011 un totale di 12 animali sono stati arruolati nello studio e in 8 di questi è stato impiantato con successo uno stent in regione istmica.

Degli 8 animali sottoposti a stent tre sono deceduti: un animale è deceduto in sede operatoria per dissezione aortica causata dallo stent, due animali sono deceduti durante il follow-up a 2 e 3 giorni dall'impianto per sepsi. Un quarto animale è stato escluso dallo studio durante il follow-up per il riscontro, durante un'ecocardiografia di controllo, di una severa insufficienza della valvola aortica, verosimilmente esito di un'endocardite batterica.

Le restanti 8 pecore, 4 appartenenti al gruppo *sham* e 4 appartenenti al gruppo in cui è stato posizionato lo stent, sono state sacrificate alla fine del periodo previsto di dodici mesi di follow-up previsto.

3.2 Accrescimento ponderale

I dati relativi all'accrescimento ponderale degli animali appartenenti ai due gruppi sono riassunti in tabella 1. Tra i due gruppi non è stata riscontrata alcuna differenza nella crescita ponderale.

	Sham	Stent	p
Peso base	30,6 ± 2,07	29,3 ± 2,11	ns
90 giorni	38,5 ± 2,78	37,9 ± 4,80	ns
180 giorni	48,2 ± 3,93	48,7 ± 4,56	ns
270 giorni	56,0 ± 5	59,5 ± 3,95	ns
360 giorni	57,8 ± 4,69	62,2 ± 4,08	ns

Tabella 1. Accrescimento ponderale degli animali durante lo studio. I valori sono in kilogrammi ed espressi come media \pm deviazione standard (ns non significatività statistica).

3.3 Parametri ecocardiografici

Nelle tabelle 2-6 sono riassunti i dati ecocardiografici raccolti rispettivamente al momento dell'esecuzione del primo cateterismo cardiaco e a 90-180-270 e 360 giorni. I due gruppi di animali hanno mostrato un andamento sovrapponibile dei parametri studiati. In particolar modo, il gruppo degli animali in cui è stato impiantato uno stent non ha mostrato alcun segno d'ipertrofia e/o disfunzione sistolica e/o diastolica del ventricolo di sinistra.

	Sham	Stent	P
SIV_D	0,78 \pm 0,11	0,82 \pm 0,14	Ns
SIV_S	1,05 \pm 0,06	1,00 \pm 0,2	Ns
DTDVS	3,44 \pm 0,48	3,35 \pm 0,36	Ns
DTSVS	2,53 \pm 0,3	2,49 \pm 0,26	Ns
PP_D	0,79 \pm 0,11	0,73 \pm 0,07	Ns
PP_S	1,25 \pm 0,09	1,12 \pm 0,11	Ns
VTD	43,55 \pm 12,46	46,59 \pm 12,13	Ns
VTS	21,51 \pm 6,92	22,46 \pm 5,53	Ns
GS	27,17 \pm 10,72	24,13 \pm 9,98	Ns
FA	26,28 \pm 3,15	25,3 \pm 8,29	Ns
FE	52,55 \pm 4,83	50,4 \pm 13,9	Ns
TVI	14,03 \pm 5,26	17,65 \pm 3,02	Ns
Aos	1,90 \pm 0,08	1,91 \pm 0,21	Ns
FC	107 \pm 31,37	114 \pm 5,29	Ns
PEP	67,0 \pm 7,89	52,2 \pm 3,68	Ns
ET	244,55 \pm 74,22	295,36 \pm 35,12	Ns
Onda E MV	0,53 \pm 0,04	0,45 \pm 0,10	Ns
Onda A MV	0,51 \pm 0,01	0,39 \pm 0,02	Ns
IVRT VS	56,44 \pm 20,59	71,1 \pm 10,7	Ns

Tabella 2 Parametri ecocardiografici raccolti all'ecocardiografia basale, antecedente l'esecuzione del primo cateterismo cardiaco. SIV_D spessore del setto interventricolare in diastole, SIV_S spessore del setto interventricolare in sistole, DTDVS diametro telediastolico del ventricolo di sinistra, DTSVS diametro tele sistolico del ventricolo di sinistra, PP_D spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in diastole, PP_S spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in sistole, VTD volume tele diastolico del ventricolo di sinistra, VTS volume tele sistolico del ventricolo di sinistra, GS gittata sistolica, FA frazione di accorciamento del ventricolo di sinistra, FE frazione di eiezione del ventricolo di sinistra, TVI time velocity integral trans-aortico, Aos diametro della radice aortica, FC frequenza cardiaca, PEP pre-ejection period, ET ejection time, Onda_E MV velocità dell'onda E diastolica trans-mitralica, Onda_A MV velocità dell'onda A diastolica trans-mitralica, IVRT VS tempo di rilasciamento isovolumetrico del ventricolo di sinistra.

	Sham	Stent	P
SIV_D	0,82 ± 0,02	0,76 ± 0,59	Ns
SIV_S	1,08 ± 0,06	0,93 ± 0,14	Ns
DTDVS	3,32 ± 0,18	2,75 ± 1,19	Ns
DTSVS	2,36 ± 0,11	2,67 ± 0,59	Ns
PP_D	0,73 ± 0,07	0,86 ± 0,13	Ns
PP_S	1,21 ± 0,03	1,32 ± 0,17	Ns
VTD	45 ± 6,03	47,22 ± 9,07	Ns
VTS	19,47 ± 2,35	21,2 ± 4,2	Ns
GS	25,5 ± 4,03	25,96 ± 12,38	Ns
FA	28,79 ± 1,84	27,3 ± 10,44	Ns
FE	56,61 ± 2,76	53,05 ± 14,9	Ns
TVI	16,01 ± 5,11	16,61 ± 3,18	Ns
Aos	2,23 ± 0,23	2,13 ± 0,21	Ns
FC	114 ± 20,8	96,2 ± 12,71	Ns
PEP	48,57 ± 7,86	62,8 ± 19,00	Ns
ET	295,78 ± 72,5	337,74 ± 65,07	Ns
Onda E MV	0,46 ± 0,14	0,41 ± 0,08	Ns
Onda A MV	0,49 ± 0,17	0,36 ± 0,05	Ns
IVRT VS	95,48 ± 13,16	80,82 ± 8,47	Ns

Tabella 3 Parametri ecocardiografici raccolti a 90 giorni dall'esecuzione del primo cateterismo cardiaco. SIV_D spessore del setto interventricolare in diastole, SIV_S spessore del setto interventricolare in sistole, DTDVS diametro telediastolico del ventricolo di sinistra, DTSVS diametro tele sistolico del ventricolo di sinistra, PP_D spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in diastol3, PP_S spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in sistole, VTD volume tele diastolico del ventricolo di sinistra, VTS volume tele sistolico del ventricolo di sinistra, GS gittata sistolica, FA frazione di accorciamento del ventricolo di sinistra, FE frazione di eiezione del ventricolo di sinistra, TVI time velocity integral trans-aortico, Aos diametro della radice aortica, FC frequenza cardiaca, PEP pre-ejection period, ET ejection time, Onda_E MV velocità dell'onda E diastolica trans-mitralica, Onda_A MV velocità dell'onda A diastolica trans-mitralica, IVRT VS tempo di rilasciamento isovolumetrico del ventricolo di sinistra.

	Sham	Stent	P
SIV_D	0,92 ± 0,09	0,85 ± 0,1	Ns
SIV_S	1,15 ± 0,11	1,16 ± 0,19	Ns
DTDVS	3,49 ± 0,23	3,62 ± 0,17	Ns
DTSVS	2,65 ± 0,16	2,74 ± 0,2	Ns
PP_D	0,90 ± 0,17	0,85 ± 0,13	Ns
PP_S	1,29 ± 0,08	1,33 ± 0,14	Ns
VTD	51,43 ± 9,27	55,44 ± 6,73	Ns
VTS	26,04 ± 3,93	28,3 ± 5,2	Ns
GS	26,04 ± 3,93	27,13 ± 4,31	Ns
FA	23,83 ± 6,35	24,3 ± 3,94	Ns
FE	48,03 ± 10,96	49,01 ± 6,56	Ns
TVI	15,8 ± 2,03	19,18 ± 5,19	Ns
Aos	2,24 ± 0,22	2,17 ± 0,09	Ns
FC	86 ± 18,6	75,2 ± 7,58	Ns
PEP	55,55 ± 19,02	49,83 ± 20,29	Ns
ET	280,71 ± 7,48	379,95 ± 35,67	Ns
Onda E MV	0,52 ± 0,22	0,40 ± 0,08	Ns
Onda A MV	0,35 ± 0,08	0,33 ± 0,09	Ns
IVRT VS	79,46 ± 6,47	102,31 ± 23,78	Ns

Tabella 4 Parametri ecocardiografici raccolti a 180 giorni dall'esecuzione del primo cateterismo cardiaco. SIV_D spessore del setto interventricolare in diastole, SIV_S spessore del setto interventricolare in sistole, DTDVS diametro telediastolico del ventricolo di sinistra, DTSVS diametro tele sistolico del ventricolo di sinistra, PP_D spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in diastol3, PP_S spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in sistole, VTD volume tele diastolico del ventricolo di sinistra, VTS volume tele sistolico del ventricolo di sinistra, GS gittata sistolica, FA frazione di accorciamento del ventricolo di sinistra, FE frazione di eiezione del ventricolo di sinistra, TVI time velocity integral trans-aortico, Aos diametro della radice aortica, FC frequenza cardiaca, PEP pre-ejection period, ET ejection time, Onda_E MV velocità dell'onda E diastolica trans-mitralica, Onda_A MV velocità dell'onda A diastolica trans-mitralica, IVRT VS tempo di rilascio isovolumetrico del ventricolo di sinistra.

	Sham	Stent	P
SIV_D	0,94 ± 0,07	0,90 ± 0,12	Ns
SIV_S	1,21 ± 0,07	1,22 ± 0,19	Ns
DTDVS	3,59 ± 0,11	3,49 ± 0,26	Ns
DTSVS	2,5 ± 0,07	2,52 ± 0,32	Ns
PP_D	0,97 ± 0,06	0,90 ± 0,03	Ns
PP_S	1,46 ± 0,09	1,38 ± 0,20	Ns
VTD	54,4 ± 4,05	50,9 ± 9,01	Ns
VTS	22,44 ± 1,65	23,3 ± 7,1	Ns
GS	32 ± 3,22	27,49 ± 3,34	Ns
FA	30,39 ± 1,69	27,81 ± 4,17	Ns
FE	58,72 ± 2,43	54,78 ± 6,87	Ns
TVI	16,05 ± 2,34	16,40 ± 1,29	Ns
Aos	2,37 ± 0,19	2,14 ± 0,05	Ns
FC	92 ± 15,6	89,3 ± 12,66	Ns
PEP	61,98 ± 9,47	61,41 ± 22,27	Ns
ET	321,05 ± 26,6	288,19 ± 52,1	Ns
Onda E MV	0,46 ± 0,91	0,35 ± 0,06	Ns
Onda A MV	0,42 ± 0,03	0,35 ± 0,13	Ns
IVRT VS	118,36 ± 25,36	89,05 ± 25,61	Ns

Tabella 5 Parametri ecocardiografici raccolti a 270 giorni dall'esecuzione del primo cateterismo cardiaco. SIV_D spessore del setto interventricolare in diastole, SIV_S spessore del setto interventricolare in sistole, DTDVS diametro telediastolico del ventricolo di sinistra, DTSVS diametro tele sistolico del ventricolo di sinistra, PP_D spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in diastol3, PP_S spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in sistole, VTD volume tele diastolico del ventricolo di sinistra, VTS volume tele sistolico del ventricolo di sinistra, GS gittata sistolica, FA frazione di accorciamento del ventricolo di sinistra, FE frazione di eiezione del ventricolo di sinistra, TVI time velocity integral trans-aortico, Aos diametro della radice aortica, FC frequenza cardiaca, PEP pre-ejection period, ET ejection time, Onda_E MV velocità dell'onda E diastolica trans-mitralica, Onda_A MV velocità dell'onda A diastolica trans-mitralica, IVRT VS tempo di rilasciamento isovolumetrico del ventricolo di sinistra.

	Sham	Stent	P
SIV_D	0,99 ± 0,04	0,94 ± 0,22	Ns
SIV_S	1,24 ± 0,08	1,21 ± 0,13	Ns
DTDVS	3,54 ± 0,46	3,64 ± 0,57	Ns
DTSVS	2,63 ± 0,29	2,8 ± 0,58	Ns
PP_D	0,99 ± 0,08	0,94 ± 0,82	Ns
PP_S	1,6 ± 0,06	1,45 ± 0,3	Ns
VTD	53,5 ± 16,35	57,7 ± 21,37	Ns
VTS	25,88 ± 7,23	31,1 ± 15,0	Ns
GS	27,6 ± 10,19	26,61 ± 8,62	Ns
FA	25,42 ± 3,59	23,55 ± 6,04	Ns
FE	50,99 ± 5,53	47,57 ± 10,26	Ns
TVI	15,37 ± 2,39	16,40 ± 4,3	Ns
Aos	2,19 ± 0,07	2,28 ± 0,05	Ns
FC	86 ± 19,4	89,5 ± 14,84	Ns
PEP	89,33 ± 24,85	72,59 ± 19,05	Ns
ET	301,04 ± 178,35	329,42 ± 47,99	Ns
Onda E MV	0,39 ± 0,07	0,45 ± 0,46	Ns
Onda A MV	0,32 ± 0,07	0,35 ± 0,51	Ns
IVRT VS	85,29 ± 19,90	112,41 ± 46,23	Ns

Tabella 6 Parametri ecocardiografici raccolti prima dell'esecuzione del secondo cateterismo cardiaco. SIV_D spessore del setto interventricolare in diastole, SIV_S spessore del setto interventricolare in sistole, DTDVS diametro telediastolico del ventricolo di sinistra, DTSVS diametro tele sistolico del ventricolo di sinistra, PP_D spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in diastol3, PP_S spessore della parete posteriore del ventricolo di sinistra in sistole, VTD volume tele diastolico del ventricolo di sinistra, VTS volume tele sistolico del ventricolo di sinistra, GS gittata sistolica, FA frazione di accorciamento del ventricolo di sinistra, FE frazione di eiezione del ventricolo di sinistra, TVI time velocity integral trans-aortico, Aos diametro della radice aortica, FC frequenza cardiaca, PEP pre-ejection period, ET ejection time, Onda_E MV velocità dell'onda E diastolica trans-mitralica, Onda_A MV velocità dell'onda A diastolica trans-mitralica, IVRT VS tempo di rilasciamento isovolumetrico del ventricolo di sinistra.

3.4 Dati emodinamici

Nella tabella 7 sono riassunti i dati pressori di base nei due gruppi di animali (gruppo *sham* e gruppo sperimentale sottoposto a impianto di stent). Al momento del primo studio emodinamico non si è evidenziata alcuna differenza pressoria tra i due gruppi.

Nella tabella 8 sono riassunti i dati pressori pre e post impianto dello stent nel gruppo d'intervento. Dopo l'impianto dello stent non si è registrata alcuna differenza statisticamente significativa della pressione tra aorta ascendente e aorta discendente.

	Pressione sistolica		Pressione diastolica	
	Aorta ascendente	Aorta discendente	Aorta ascendente	Aorta discendente
Sham	87,57± 19,19	88,14± 18,58	76,9± 22,52	73,78± 18,08

Sperimentali	94±	95,3±	73,6±	72,6±
	19,07	17,5	21,03	19,03
P	ns	ns	ns	ns

Tabella 7. Pressioni sistoliche e diastoliche registrate in aorta ascendente e in aorta discendente nel gruppo sperimentale prima e dopo l'impianto dello stenti in sede istmica. I dati sono espressi in mmHg come media ± deviazione standard.

	Pressione sistolica		Pressione diastolica	
	Pre stent	Post stent	Pre stent	Post stent
Aorta	94±	100±	73,6±	78,3±
Ascendente	19,07	19,97	21,03	21,07
Aorta	95,3±	101,33±	72,6±	74±
Discendente	17,5	26,63	19,03	26,45
P	/	ns	/	Ns

Tabella 8. Rilevazioni pressorie di base in aorta ascendente e in aorta discendente nel gruppo sperimentale e nel gruppo sham. I dati sono espressi in mmHg come media ± deviazione standard.

3.5 Renina-angiotensina-aldosterone

I livelli plasmatici degli ormoni renina, angiotensina e aldosterone, previsitati originariamente nel disegno sperimentale, non sono stati determinati data la mancanza di differenze pressorie ed ecocardiografiche statisticamente significativamente tra i due gruppi.

3.6 Istologia

L'analisi anatomica e istologica non ha mostrato significative differenze ne' a livello miocardico, ne' a livello renale ne' a livello della parete aortica.

3.7 Espressione genica

In tabella 9 sono riassunti i livelli di espressione degli mRNA per la Caspase-3 e per la MMP-9 a livello dell'aorta ascendente e discendente nei due gruppi di animali. Anche per queste variabili non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa nei due gruppi di animali.

Dal confronto del livello di espressione dei medesimi geni nell'aorta ascendente e discendente dei soggetti portatori di stent non è emersa alcuna differenza, come si può notare nella tabella 10.

	Caspasi-3		MMP-9		P	
	Sham	Stent	Sham	Stent	*	#
Aorta Ascendente	0,95± 0,09	0,97± 0,09	0,94± 0,24	1,66± 0,68	Ns	0,09
Aorta Discendente	0,94± 0,43	1,01± 0,1	1,25± 0,3	0,95± 0,92	Ns	0,11

Tabella 9. Livelli di espressione degli mRNA dei geni per la Caspasi-3 e per la MMP-9 nell'aorta ascendente e discendente sia nel gruppo degli animali di controllo sia nel gruppo di animali sperimentali. I valori sono espressi come media ± deviazione standard. * confronto statistico tra espressione della Caspasi-3 nell'aorta dei soggetti sham e portatori di stent, # confronto statistico tra espressione della MMP-9 nell'aorta dei soggetti sham e portatori di stent.

	Caspasi-3	MMP-9
Aorta Ascendente	0,97± 0,09	1,66± 0,68
Aorta Discendente	1,01± 0,1	0,95± 0,92
P	Ns	0,13

Tabella 10. Livelli di espressione degli mRNA dei geni per la Caspasi-3 e per la MMP-9 nell'aorta ascendente e discendente nel gruppo di animali sperimentali. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard.

4. DISCUSSIONE

Dopo correzione di una coartazione aortica, sia essa chirurgica o interventistica, lo sviluppo o la persistenza di un'ipertensione arteriosa rimane il principale motivo di morbilità' o mortalità [64, 143, 145-147] essendo presente in una percentuale variabile tra il 20% e il 40% dei pazienti [62, 65, 148, 149]. Il fatto che la coartazione aortica sia associata a morbilità' nonostante il trattamento induce a ritenere possibile l'esistenza di alterazioni emodinamiche e biomeccaniche proprie di questa malattia al di là dell'anomalia morfologica del vaso di per se'. La comprensione che la coartazione aortica non è un semplice restringimento focale dell'istmo aortico ma una vera e propria aortopatia che porta all'irrigidimento di tutte le arterie collocate a monte dell'ostruzione [150, 151] è stata la svolta nel comprenderne l'eziopatogenesi.

Già 50 anni fa era stata postulata l'ipotesi che lo stress di parete potesse condurre all'esaurimento delle capacità elastiche proprie dell'aorta che inizialmente si difende aumentando il proprio tono, poi lo spessore, con innesco di un circolo vizioso irreversibile. [152]. La spiegazione che sembra ottenere oggi il maggior consenso è che la conformazione anatomo funzionale distintiva dell'aorta ascendente e del primo tratto aortico che conferisce a questo vaso delle capacità uniche per conservare le caratteristiche di regolarità del flusso del sangue durante la sistole e consegnarla al resto del corpo durante la diastole viene probabilmente interrotta dalla coartazione aortica con la formazione di turbolenze del flusso che aumentano lo stress di parete con conseguente disorganizzazione della tonaca media vasale con ispessimento della stessa e sviluppo di ipertensione [151, 153, 154]. L'ipertensione arteriosa pertanto si verrebbe a sviluppare come conseguenza di un'alterata risposta dei sistemi barocettori [66, 67, 72] conseguenti all'alterazione della compliance dell'aorta ascendente che contraddistingue tutti i soggetti affetti da coartazione aortica sin dalla nascita sia prima che dopo correzione [66, 68, 71, 73, 74] ed esisterebbe una relazione lineare tra rigidità dell'aorta e pressione arteriosa.

Chiarita l'eziopatogenesi, nel 2007, quando questo progetto sperimentale è stato ideato, rimaneva aperta la questione se la presenza di un ulteriore fattore di irrigidimento aortico, qual'è uno stent in regione istmica, fosse in grado di compromettere ulteriormente la compliance arteriosa e divenire pertanto responsabile di un peggioramento del quadro clinico stesso [78-83]. Da un punto di vista teorico l'ulteriore irrigidimento secondario alla presenza di un segmento metallico anelastico potrebbe causare un'ulteriore perdita di energia pulsatile che da un lato incrementando l'impedenza al flusso ematico ridurrebbe la perfusione distale, dall'altro aumentando la riflessione delle onde di pressione incrementerebbe lo stress meccanico a livello dell'interfaccia tra stent e arteria nativa [84] divenendo causa d'ipertensione arteriosa, di riduzione della perfusione coronarica e della tolleranza allo sforzo [82, 85, 86].

Nel nostro studio sperimentale non abbiamo trovato differenza alcuna nel comportamento della pressione arteriosa basale tra animali portatori di stent e animali di controllo ne' in acuto ne' dopo 12 mesi di follow-up. La simulazione di un esercizio fisico mediante infusione di dobutamina non ha inoltre dimostrato nessun comportamento diverso ne' della frequenza cardiaca ne' della pressione arteriosa, confutando così l'ipotesi che l'ipotetico aumento dell'impedenza aortica secondaria allo stent possa divenire responsabile d'ipertensione arteriosa sotto sforzo [155-157]. I nostri dati sono in accordo con quanto rilevato nello studio di Pihkala et al. [90] dove gli autori studiando gli effetti della presenza di uno stent in regione istmica in un modello animale, avevano dimostrato dopo sette settimane di follow-up che la presenza di uno stent non alterava ne' la compliance aortica ne' la pressione arteriosa, ne' l'increzione degli ormoni dell'asse renina-angiotensina-aldosterone.

Non solo dall'analisi del comportamento pressorio nei due gruppi di animali troviamo un riscontro che la presenza dello stent è ininfluenza sulle proprietà meccaniche dell'aorta, ma anche lo studio ecocardiografico ci conferma che l'*afterload* del ventricolo sinistro non subisce alcuna modificazione. Da un punto di vista ecocardiografico non abbiamo riscontrato differenze ne' in termini d'ipertrofia ne' in termini di funzionalità sistolica e diastolica del ventricolo sinistro.

Recentissimi studi di simulazione computazionale dei fluidi non solo hanno definitivamente sfatato l'ipotesi dell'alterazione della compliance aortica ad opera di uno stent, ma hanno anche dimostrato che in termini di proprietà elastiche, l'aorta presenta le stesse caratteristiche sia dopo correzione chirurgica sia dopo stenting [87-89].

A livello dell'interfaccia tra stent e arteria nativa si ha un'alterazione del normale flusso ematico laminare, e poiché da ciò potrebbe derivare una disfunzione endoteliale da stress ossidativo, siamo andati ad analizzare l'espressione della MMP-9 e della Caspasi-3. La scelta è ricaduta su questi due geni in quanto sono gli unici, tra quelli che si attivano in condizioni di stress ossidativo, di cui è nota la sequenza genica, data la parziale sequenziazione del genoma ovino.

Sebbene lo sviluppo e la progressione del rimodellamento vascolare, come quello che può verificarsi nella coartazione aortica, sia per certo un processo multifattoriale, l'attivazione di percorsi proteolitici e apoptotici può contribuire ai cambiamenti strutturali che si verificano all'interno della matrice extracellulare e nella componente cellulare muscolare liscia della parete vascolare.

Un meccanismo attraverso il quale è regolato il rimodellamento extracellulare all'interno della parete vascolare è attraverso l'induzione e l'attivazione delle metallo proteinasi della matrice (MMP). MMP-9 è stato implicato nel rimodellamento vascolare in diversi stati di malattia. Oltre alle forze emodinamiche, l'espressione di MMP-9 può essere indotta da stimoli neuro-ormonali quali l'angiotensina II. Capire come queste diverse forze possano integrarsi per avviare e propagare il rimodellamento vascolare nella coartazione aortica e quale influenza possano avere nell'espressione del MMP-9 potrebbe essere di cruciale importanza per cercare delle nuove strategie terapeutiche e per un più adeguato giudizio prognostico.

L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata associata con l'attivazione delle caspasi, in particolare della caspasi-3 e negli ultimi anni, la morte programmata delle cellule è emersa come un importante meccanismo di rimodellamento cardiovascolare. Studi sperimentali nei ratti spontaneamente

ipertesi (SHR), trattati con farmaci antiipertensivi, hanno evidenziato che la regressione dell'ipertrofia aortica coincide con l'avvio di processi apoptotici a carico delle muscolari lisce (SMC) gettando una nuova luce sui meccanismi di rimodellamento vascolare [158, 159]. Questa ipotesi è stata successivamente confermata in ratti SHR trattati con un pan-inibitore della caspasi [160].

La MMP-9, degradando la matrice extracellulare, e la Caspasi-3, inducendo la morte cellulare programmata sia delle cellule muscolari lisce vasali sia delle cellule endoteliali stesse appaiono pertanto tra i principali attori del rimodellamento arterioso sia secondario a uno stress ossidativo [125, 132, 133, 141, 142, 143] sia conseguenza di un normale processo d'invecchiamento [161, 162].

Nel nostro modello sperimentale, lo shear stress endoteliale secondario al disturbo del flusso ematico laminare non si sarebbe dimostrato in grado di causare una situazione di stress ossidativo e conseguente disfunzione endoteliale, in quanto non abbiamo trovato differenze statisticamente significative nel grado di espressione dei due geni, sebbene ci sia un trend di significatività statistica per quanto riguarda il gene della MMP-9. E' plausibile ritenere che la non significatività statistica sia imputabile alla bassa numerosità del campione e che lo stesso studio effettuato su di un campione più numeroso possa evidenziare una reale differenza tra soggetti portatori di stent e *sham*.

L'aggravamento dell'ipertensione arteriosa secondaria alla presenza di uno stent troverebbe pertanto giustificazione non nell'irrigidimento dei pochi centimetri di aorta coperti dallo stent ma ben sì dal rimodellamento sia dell'aorta ascendente che discendente secondario alla disfunzione endoteliale causata dal disturbo del normale flusso ematico laminare a livello dell'interfaccia stent-aorta nativa. E' indiscusso tuttavia che per verificare la fondatezza di questa ipotesi saranno necessarie ulteriori ricerche condotte su campioni sperimentali più grandi e per follow-up più lunghi.

La correlazione tra disfunzione endoteliale e malattie cardiovascolari qual'è l'ipertensione arteriosa è oggetto di numerosi studi recenti e ormai sembra assodato il vincolo di causa-effetto tra le due [112-117], nulla però era noto sino

ad ora rispetto il possibile nesso tra presenza di uno stent e disfunzione endoteliale.

5. CONCLUSIONI

Tenendo presente le limitazioni di qualsiasi modello sperimentale animale possiamo, alla luce dei dati raccolti, ragionevolmente concludere che la presenza di uno stent di pochi centimetri in regione istmica potrebbe alterare l'omeostasi pressoria non per modificazione della compliance aortica risultante dall'irrigidimento di pochi centimetri ma per alterazione a lungo termine della compliance di tutta l'arteria conseguente alla disfunzione endoteliale.

La coartazione aortica, intesa come restringimento focale del lume arterioso, oggi non può che essere considerata solo la punta di un iceberg molto più grande: un'aortopatia "irrigidente" le arterie collocate al di sopra dell'istmo aortico.

I limiti di questo studio sono rappresentati dalla scarsa numerosità del campione analizzato, dalla relativa brevità del follow-up, dalla diversa struttura presentata da un'aorta di un animale sano rispetto all'aorta di un paziente affetto da coartazione aortica. La non completa sequenziatura del genoma ovino non ci ha permesso un'indagine esaustiva dell'espressione dei geni attivati in condizioni di stress ossidativo.

Riteniamo comunque importanti i risultati ottenuti per gettare le basi scientifiche per ulteriori studi sul possibile ruolo del danno endoteliale nella genesi o aggravamento dell'ipertensione arteriosa nei soggetti sottoposti a correzione di coartazione aortica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Brandt, B., 3rd, et al., *Surgical treatment of coarctation of the aorta after balloon angioplasty*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1987. **94**(5): p. 715-9.
2. Tawes, R.L., Jr., C.L. Berry, and E. Aberdeen, *Congenital bicuspid aortic valves associated with coarctation of the aorta in children*. Br Heart J, 1969. **31**(1): p. 127-8.
3. Levine, J.C., et al., *The risk of having additional obstructive lesions in neonatal coarctation of the aorta*. Cardiol Young, 2001. **11**(1): p. 44-53.
4. Shiokawa, Y. and A.E. Becker, *The surgical anatomy of the left ventricular outflow tract in hearts with ventricular septal defect and aortic arch obstruction*. Ann Thorac Surg, 1998. **65**(5): p. 1381-7.
5. Bouhour, J.B., et al., [*Study of the association between aortic coarctation and congenital mitral insufficiency (excluding atrioventricular canals)*]. Arch Mal Coeur Vaiss, 1977. **70**(4): p. 337-45.
6. Freed, M.D., et al., *Coarctation of the aorta with congenital mitral regurgitation*. Circulation, 1974. **49**(6): p. 1175-84.
7. Pellegrino, A., et al., *Aortic coarctation in the first three months of life. An anatomopathological study with respect to treatment*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1985. **89**(1): p. 121-7.
8. Jenkins, N.P. and C. Ward, *Coarctation of the aorta: natural history and outcome after surgical treatment*. QJM, 1999. **92**(7): p. 365-71.
9. Abbott, M., *Coarctation of the aorta of the adult type, II: a statistical study and historical retrospective of 200 recorded cases with autopsy of stenosis or obliteration of the descending arch in subjects above the age of 2 years.* . Am Heart J, 1928. **3**: p. 574-618.
10. Talner, C.N., *Report of the New England Regional Infant Cardiac Program, by Donald C. Fyler, MD, Pediatrics, 1980;65(suppl):375-461*. Pediatrics, 1998. **102**(1 Pt 2): p. 258-9.
11. Campbell, M. and P.E. Polani, *The aetiology of coarctation of the aorta*. Lancet, 1961. **1**(7175): p. 463-8.
12. Moss, A.J., et al., *Moss and Adams' Heart Diseases in infants, children, and adolescents: including the fetus and the young adult*. 7° ed. 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
13. Johnson, W.H. and J.H. Moller, *Pediatric cardiology*. 2001: Lippincott Williams & Wilkins.
14. Talner, N.S. and M.A. Berman, *Postnatal development of obstruction in coarctation of the aorta: role of the ductus arteriosus*. Pediatrics, 1975. **56**(4): p. 562-9.
15. Rudolph, A.M., M.A. Heymann, and U. Spitznas, *Hemodynamic considerations in the development of narrowing of the aorta*. Am J Cardiol, 1972. **30**(5): p. 514-25.

16. Ho, S.Y. and R.H. Anderson, *Coarctation, tubular hypoplasia, and the ductus arteriosus. Histological study of 35 specimens.* Br Heart J, 1979. **41**(3): p. 268-74.
17. Elzenga, N.J. and A.C. Gittenberger-de Groot, *Localised coarctation of the aorta. An age dependent spectrum.* Br Heart J, 1983. **49**(4): p. 317-23.
18. Elzenga, N.J., A.C. Gittenberger-de Groot, and A. Oppenheimer-Dekker, *Coarctation and other obstructive aortic arch anomalies: their relationship to the ductus arteriosus.* Int J Cardiol, 1986. **13**(3): p. 289-308.
19. Russell, G.A., et al., *Patterns of ductal tissue in coarctation of the aorta in the first three months of life.* J Thorac Cardiovasc Surg, 1991. **102**(4): p. 596-601.
20. Cassels, D., *The Ductus Arteriosus.* 1973, IL: Springfield.
21. Skoda, J., *Demonstration eines Falles Ven Obliteration de Aorta.* . Wochenblatt Zeitschrift de kaiserlichen-Konighiche Gesellschaft der Aerttze Zur Wien., 1995. **1**: p. 710-720.
22. Goldblatt, H., J.R. Kahn, and R.F. Hanzal, *Studies on Experimental Hypertension : Ix. The Effect on Blood Pressure of Constriction of the Abdominal Aorta above and Below the Site of Origin of Both Main Renal Arteries.* J Exp Med, 1939. **69**(5): p. 649-74.
23. Scott, H.W., Jr. and H.T. Bahnson, *Evidence for a renal factor in the hypertension of experimental coarctation of the aorta.* Surgery, 1951. **30**(1): p. 206-17.
24. Scott, H.W., Jr., et al., *Additional observations concerning the physiology of the hypertension associated with experimental coarctation of the aorta.* Surgery, 1954. **36**(3): p. 445-59.
25. Alpert, B.S., et al., *Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive children with coarctation of the aorta.* Am J Cardiol, 1979. **43**(4): p. 828-34.
26. Bagby, S.B. *Dissection of pathogenetic factors: I. coarctation hypertension.* in *Proceedings of the NHLBI Workshop on Juvenile Hypertension.* 1984. New York, NY: Biomedical Informatio Corp.
27. Cody, R.J., *Congestive Heart Failure: Pathophysiology, Diagnosis and Comprehensive Approach to Management.* . 2nd ed. ed2000: Lippincott Williams & Wilkins: 2000:199-212.
28. Campbell, M., *Natural history of coarctation of the aorta.* Br Heart J, 1970. **32**(5): p. 633-40.
29. Crafoord, C. and G. Nylin, *Congenital coarctation of the aorta and its surgical treatment.* J Thorac Surg 1945. **14**: p. 347-61.
30. Gross, R.E., *Surgical correction for coarctation of the aorta.* Surgery, 1945. **18**: p. 673-8.
31. Wood, A.E., et al., *Is extended arch aortoplasty the operation of choice for infant aortic coarctation? Results of 15 years' experience in 181 patients.* Ann Thorac Surg, 2004. **77**(4): p. 1353-7; discussion 1357-8.
32. Wright, G.E., et al., *Extended resection and end-to-end anastomosis for aortic coarctation in infants: results of a tailored surgical approach.* Ann Thorac Surg, 2005. **80**(4): p. 1453-9.
33. Brouwer, R.M., et al., *Influence of age on survival, late hypertension, and recoarctation in elective aortic coarctation repair. Including long-term*

- results after elective aortic coarctation repair with a follow-up from 25 to 44 years. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1994. **108**(3): p. 525-31.
34. Manganas, C., et al., *Reoperation and coarctation of the aorta: the need for lifelong surveillance*. *Ann Thorac Surg*, 2001. **72**(4): p. 1222-4.
 35. Beekman, R.H., et al., *Reoperation for coarctation of the aorta*. *Am J Cardiol*, 1981. **48**(6): p. 1108-14.
 36. Pearl, J.M., et al., *Risk of recoarctation should not be a deciding factor in the timing of coarctation repair*. *Am J Cardiol*, 2004. **93**(6): p. 803-5.
 37. Vossschulte, K., *Surgical correction of coarctation of the aorta by an "isthmusplastic" operation*. *Thorax*, 1961. **16**: p. 338-45.
 38. Parks, W.J., et al., *Incidence of aneurysm formation after Dacron patch aortoplasty repair for coarctation of the aorta: long-term results and assessment utilizing magnetic resonance angiography with three-dimensional surface rendering*. *J Am Coll Cardiol*, 1995. **26**(1): p. 266-71.
 39. Serfontein, S.J. and I.L. Kron, *Complications of coarctation repair*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, 2002. **5**: p. 206-11.
 40. Waldhausen, J.A. and D.L. Nahrwold, *Repair of coarctation of the aorta with a subclavian flap*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1966. **51**(4): p. 532-3.
 41. van Son, J.A., et al., *Detrimental sequelae on the hemodynamics of the upper left limb after subclavian flap angioplasty in infancy*. *Circulation*, 1990. **81**(3): p. 996-1004.
 42. Weldon, C.S., et al., *A simple, safe, and rapid technique for the management of recurrent coarctation of the aorta*. *Ann Thorac Surg*, 1973. **15**(5): p. 510-9.
 43. Attenhofer Jost, C.H., et al., *Spectrum of reoperations after repair of aortic coarctation: importance of an individualized approach because of coexistent cardiovascular disease*. *Mayo Clin Proc*, 2002. **77**(7): p. 646-53.
 44. Kanter, K.R., et al., *Extra-anatomic aortic bypass via sternotomy for complex aortic arch stenosis in children*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. **120**(5): p. 885-90.
 45. Gruntzig, A. and H.J. Schneider, *[The percutaneous dilatation of chronic coronary stenoses--experiments and morphology]*. *Schweiz Med Wochenschr*, 1977. **107**(44): p. 1588.
 46. Sos, T., et al., *Percutaneous transluminal dilatation of coarctation of thoracic aorta post mortem*. *Lancet*, 1979. **2**(8149): p. 970-1.
 47. Singer, M.I., M. Rowen, and T.J. Dorsey, *Transluminal aortic balloon angioplasty for coarctation of the aorta in the newborn*. *Am Heart J*, 1982. **103**(1): p. 131-2.
 48. Sperling, D.R., et al., *Percutaneous transluminal angioplasty of congenital coarctation of the aorta*. *Am J Cardiol*, 1983. **51**(3): p. 562-4.
 49. Forbes, T.J., et al., *Procedural results and acute complications in stenting native and recurrent coarctation of the aorta in patients over 4 years of age: a multi-institutional study*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2007. **70**(2): p. 276-85.
 50. Hamdan, M.A., et al., *Endovascular stents for coarctation of the aorta: initial results and intermediate-term follow-up*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **38**(5): p. 1518-23.

51. Mahadevan, V.S., I.F. Vondermuhll, and M.J. Mullen, *Endovascular aortic coarctation stenting in adolescents and adults: angiographic and hemodynamic outcomes*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2006. **67**(2): p. 268-75.
52. Tynan, M., et al., *Balloon angioplasty for the treatment of native coarctation: results of Valvuloplasty and Angioplasty of Congenital Anomalies Registry*. *Am J Cardiol*, 1990. **65**(11): p. 790-2.
53. Hellenbrand, W.E., et al., *Balloon angioplasty for aortic recoarctation: results of Valvuloplasty and Angioplasty of Congenital Anomalies Registry*. *Am J Cardiol*, 1990. **65**(11): p. 793-7.
54. Ho, S.Y., et al., *Transluminal balloon dilation of resected coarcted segments of thoracic aorta: histological study and clinical implications*. *Int J Cardiol*, 1988. **19**(1): p. 99-105.
55. Hijazi, Z.M. and R.L. Geggel, *Balloon angioplasty for postoperative recurrent coarctation of the aorta*. *J Interv Cardiol*, 1995. **8**(5): p. 509-16.
56. Morrow, W.R., et al., *Balloon angioplasty with stent implantation in experimental coarctation of the aorta*. *Circulation*, 1994. **89**(6): p. 2677-83.
57. Diethrich, E.B., et al., *Endovascular techniques in adult aortic coarctation: the use of stents for native and recurrent coarctation repair*. *J Endovasc Surg*, 1995. **2**(2): p. 183-8.
58. Krasemann, T., et al., *Results of stent implantation for native and recurrent coarctation of the aorta-follow-up of up to 13 years*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2011. **78**(3): p. 405-12.
59. Toro-Salazar, O.H., et al., *Long-term follow-up of patients after coarctation of the aorta repair*. *Am J Cardiol*, 2002. **89**(5): p. 541-7.
60. Chen, R.H., G.J. Reul, and D.A. Cooley, *Severe internal mammary artery atherosclerosis after correction of coarctation of the aorta*. *Ann Thorac Surg*, 1995. **59**(5): p. 1228-30.
61. Bhat, M.A., et al., *Fate of hypertension after repair of coarctation of the aorta in adults*. *Br J Surg*, 2001. **88**(4): p. 536-8.
62. Cohen, M., et al., *Coarctation of the aorta. Long-term follow-up and prediction of outcome after surgical correction*. *Circulation*, 1989. **80**(4): p. 840-5.
63. Presbitero, P., et al., *Long term results (15-30 years) of surgical repair of aortic coarctation*. *Br Heart J*, 1987. **57**(5): p. 462-7.
64. Hager, A., et al., *Coarctation Long-term Assessment (COALA): significance of arterial hypertension in a cohort of 404 patients up to 27 years after surgical repair of isolated coarctation of the aorta, even in the absence of restenosis and prosthetic material*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007. **134**(3): p. 738-45.
65. O'Sullivan, J.J., G. Derrick, and R. Darnell, *Prevalence of hypertension in children after early repair of coarctation of the aorta: a cohort study using casual and 24 hour blood pressure measurement*. *Heart*, 2002. **88**(2): p. 163-6.
66. Polson, J.W., et al., *Evidence for cardiovascular autonomic dysfunction in neonates with coarctation of the aorta*. *Circulation*, 2006. **113**(24): p. 2844-50.

67. Vogt, M., et al., *Impaired elastic properties of the ascending aorta in newborns before and early after successful coarctation repair: proof of a systemic vascular disease of the prestenotic arteries?* *Circulation*, 2005. **111**(24): p. 3269-73.
68. de Divitiis, M., et al., *Vascular dysfunction after repair of coarctation of the aorta: impact of early surgery.* *Circulation*, 2001. **104**(12 Suppl 1): p. 1165-70.
69. Brili, S., et al., *Evidence of vascular dysfunction in young patients with successfully repaired coarctation of aorta.* *Atherosclerosis*, 2005. **182**(1): p. 97-103.
70. Parker, F.B., Jr., et al., *Preoperative and postoperative renin levels in coarctation of the aorta.* *Circulation*, 1982. **66**(3): p. 513-4.
71. Ou, P., et al., *Increased central aortic stiffness and left ventricular mass in normotensive young subjects after successful coarctation repair.* *Am Heart J*, 2008. **155**(1): p. 187-93.
72. Sehested, J., U. Baandrup, and E. Mikkelsen, *Different reactivity and structure of the prestenotic and poststenotic aorta in human coarctation. Implications for baroreceptor function.* *Circulation*, 1982. **65**(6): p. 1060-5.
73. Kenny, D., et al., *Relationship of aortic pulse wave velocity and baroreceptor reflex sensitivity to blood pressure control in patients with repaired coarctation of the aorta.* *Am Heart J*, 2011. **162**(2): p. 398-404.
74. Kuhn, A., et al., *Impaired elastic properties of the ascending aorta persist within the first 3 years after neonatal coarctation repair.* *Pediatr Cardiol*, 2009. **30**(1): p. 46-51.
75. Mullen, M.J., *Coarctation of the aorta in adults: do we need surgeons?* *Heart*, 2003. **89**(1): p. 3-5.
76. Hornung, T.S., L.N. Benson, and P.R. McLaughlin, *Interventions for aortic coarctation.* *Cardiol Rev*, 2002. **10**(3): p. 139-48.
77. Rosenthal, E., *Stent implantation for aortic coarctation: the treatment of choice in adults?* *J Am Coll Cardiol*, 2001. **38**(5): p. 1524-7.
78. De Caro, E., et al., *Stenting of aortic coarctation and exercise-induced hypertension in the young.* *Catheter Cardiovasc Interv*, 2010. **75**(2): p. 256-61.
79. Sanders, S.P., *Endovascular stent treatment of aortic coarctation.* *Am Heart J*, 2000. **139**(6): p. 936-8.
80. Magee, A.G., et al., *Stent implantation for aortic coarctation and recoarctation.* *Heart*, 1999. **82**(5): p. 600-6.
81. Boshoff, D., et al., *Stenting of hypoplastic aortic segments with mild pressure gradients and arterial hypertension.* *Heart*, 2006. **92**(11): p. 1661-6.
82. Ong, C.M., et al., *Increased stiffness and persistent narrowing of the aorta after successful repair of coarctation of the aorta: relationship to left ventricular mass and blood pressure at rest and with exercise.* *Am Heart J*, 1992. **123**(6): p. 1594-600.
83. Kim, G.B., et al., *Elastic properties of the ascending aorta in young children after successful coarctoplasty in infancy.* *Int J Cardiol*, 2004. **97**(3): p. 471-7.
84. Back, M., et al., *Changes in arterial wall compliance after endovascular stenting.* *J Vasc Surg*, 1994. **19**(5): p. 905-11.

85. Ohtsuka, S., et al., *Chronically decreased aortic distensibility causes deterioration of coronary perfusion during increased left ventricular contraction.* J Am Coll Cardiol, 1994. **24**(5): p. 1406-14.
86. Kim, S.Y., et al., *Effect of an inelastic aortic synthetic vascular graft on exercise hemodynamics.* Ann Thorac Surg, 1995. **59**(4): p. 981-9.
87. Coogan, J.S., et al., *Computational fluid dynamic simulations of aortic coarctation comparing the effects of surgical- and stent-based treatments on aortic compliance and ventricular workload.* Catheter Cardiovasc Interv, 2011. **77**(5): p. 680-91.
88. LaDisa, J.F., Jr., et al., *Computational simulations demonstrate altered wall shear stress in aortic coarctation patients treated by resection with end-to-end anastomosis.* Congenit Heart Dis, 2011. **6**(5): p. 432-43.
89. LaDisa, J.F., Jr., et al., *Computational simulations for aortic coarctation: representative results from a sampling of patients.* J Biomech Eng, 2011. **133**(9): p. 091008.
90. Pihkala, J., et al., *The effect of implantation of aortic stents on compliance and blood flow. An experimental study in pigs.* Cardiol Young, 2001. **11**(2): p. 173-81.
91. Luscher, T.F., *Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension?* Am J Hypertens, 1990. **3**(4): p. 317-30.
92. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium.* N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 27-36.
93. Vallance, P., J. Collier, and S. Moncada, *Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man.* Lancet, 1989. **2**(8670): p. 997-1000.
94. Vanhoutte, P.M., *Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture.* Hypertension, 1989. **13**(6 Pt 2): p. 658-67.
95. Egashira, K., et al., *Impaired endothelium-dependent vasodilation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension. Different responses to acetylcholine and substance P.* Hypertension, 1995. **25**(2): p. 201-6.
96. Higashi, Y., et al., *Effects of L-arginine infusion on renal hemodynamics in patients with mild essential hypertension.* Hypertension, 1995. **25**(4 Pt 2): p. 898-902.
97. Higashi, Y., et al., *Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide.* Circulation, 1999. **100**(11): p. 1194-202.
98. Linder, L., et al., *Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension.* Circulation, 1990. **81**(6): p. 1762-7.
99. Panza, J.A., et al., *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension.* N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 22-7.
100. Raij, L. and P.J. Shultz, *Endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide: effects on and production by mesangial cells and the glomerulus.* J Am Soc Nephrol, 1993. **3**(8): p. 1435-41.

101. Treasure, C.B., et al., *Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels*. *Circulation*, 1993. **87**(1): p. 86-93.
102. Creager, M.A., et al., *Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(1): p. 228-34.
103. Gilligan, D.M., et al., *Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia*. *J Am Coll Cardiol*, 1994. **24**(7): p. 1611-7.
104. Ting, H.H., et al., *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(1): p. 22-8.
105. McVeigh, G.E., et al., *Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 1992. **35**(8): p. 771-6.
106. Clarkson, P., et al., *Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels*. *J Am Coll Cardiol*, 1996. **28**(3): p. 573-9.
107. Levine, G.N., et al., *Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease*. *Circulation*, 1996. **93**(6): p. 1107-13.
108. Zeiher, A.M., et al., *Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(2): p. 652-62.
109. Soga, J., et al., *Measurement of flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a comparison of measurements in the seated and supine positions*. *Circ J*, 2007. **71**(5): p. 736-40.
110. Treasure, C.B., et al., *Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(8): p. 481-7.
111. Hambrecht, R., et al., *Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(7): p. 454-60.
112. Schachinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease*. *Circulation*, 2000. **101**(16): p. 1899-906.
113. Heitzer, T., et al., *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2673-8.
114. Neunteufl, T., et al., *Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain*. *Am J Cardiol*, 2000. **86**(2): p. 207-10.
115. Gokce, N., et al., *Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study*. *Circulation*, 2002. **105**(13): p. 1567-72.
116. Higashi, Y., et al., *Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(25): p. 1954-62.
117. Redon, J., et al., *Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension*. *Hypertension*, 2003. **41**(5): p. 1096-101.

118. Landmesser, U., et al., *Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 511-5.
119. Nishiyama, A., et al., *Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats*. Hypertension, 2004. **43**(4): p. 841-8.
120. Tanito, M., et al., *Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(1): p. 89-97.
121. Huang, Y., M. Mironova, and M.F. Lopes-Virella, *Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2640-7.
122. Rajagopalan, S., et al., *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability*. J Clin Invest, 1996. **98**(11): p. 2572-9.
123. Jacob, M.P., *Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions*. Biomed Pharmacother, 2003. **57**(5-6): p. 195-202.
124. Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart*. Circ Res, 2002. **90**(5): p. 520-30.
125. Noji, Y., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis*. Clin Chem Lab Med, 2001. **39**(5): p. 380-4.
126. Prall, A.K., et al., *Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice*. J Vasc Surg, 2002. **35**(5): p. 923-9.
127. Nataatmadja, M., et al., *Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm*. Circulation, 2003. **108 Suppl 1**: p. II329-34.
128. Fedak, P.W., et al., *Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(3): p. 797-806.
129. Boyum, J., et al., *Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **127**(3): p. 686-91.
130. Ikonomidis, J.S., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with bicuspid or tricuspid aortic valves*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007. **133**(4): p. 1028-36.
131. Zhang, B., et al., *Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis*. Circulation, 1999. **99**(14): p. 1788-94.
132. Derosa, G., et al., *Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension*. Endothelium, 2006. **13**(3): p. 227-31.

133. Marx, N., et al., *Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(2): p. 283-8.
134. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. *Circulation*, 2003. **107**(12): p. 1579-85.
135. Yasmin, et al., *Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(2): p. 372.
136. Logue, S.E. and S.J. Martin, *Caspase activation cascades in apoptosis*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 1): p. 1-9.
137. Kothakota, S., et al., *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis*. *Science*, 1997. **278**(5336): p. 294-8.
138. Li, H., et al., *Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats*. *Stroke*, 2000. **31**(1): p. 176-82.
139. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(10): p. 7320-6.
140. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
141. Teiger, E., et al., *Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(12): p. 2891-7.
142. Hamet, P., et al., *Apoptosis in target organs of hypertension*. *Hypertension*, 1995. **26**(4): p. 642-8.
143. Brosnan, M.J., et al., *Different effects of antihypertensive agents on cardiac and vascular hypertrophy in the transgenic rat line TGR(mRen2)27*. *Am J Hypertens*, 1999. **12**(7): p. 724-31.
144. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
145. Bobby, J.J., et al., *Operative survival and 40 year follow up of surgical repair of aortic coarctation*. *Br Heart J*, 1991. **65**(5): p. 271-6.
146. Celermajer, D.S. and K. Greaves, *Survivors of coarctation repair: fixed but not cured*. *Heart*, 2002. **88**(2): p. 113-4.
147. Corno, A.F., et al., *Surgery for aortic coarctation: a 30 years experience*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2001. **20**(6): p. 1202-6.
148. de Divitiis, M., P. Rubba, and R. Calabro, *Arterial hypertension and cardiovascular prognosis after successful repair of aortic coarctation: a clinical model for the study of vascular function*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005. **15**(5): p. 382-94.
149. Ou, P., et al., *Late systemic hypertension and aortic arch geometry after successful repair of coarctation of the aorta*. *Eur Heart J*, 2004. **25**(20): p. 1853-9.
150. Vriend, J.W., et al., *Carotid intima-media thickness in post-coarctectomy patients with exercise induced hypertension*. *Heart*, 2005. **91**(7): p. 962-3.

151. Vriend, J.W., et al., *Increased carotid and femoral intima-media thickness in patients after repair of aortic coarctation: influence of early repair*. Am Heart J, 2006. **151**(1): p. 242-7.
152. Wolinsky, H. and S. Glagov, *A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals*. Circ Res, 1967. **20**(1): p. 99-111.
153. Menon, A., et al., *A coupled experimental and computational approach to quantify deleterious hemodynamics, vascular alterations, and mechanisms of long-term morbidity in response to aortic coarctation*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2011.
154. Gardiner, H.M., et al., *Arterial reactivity is significantly impaired in normotensive young adults after successful repair of aortic coarctation in childhood*. Circulation, 1994. **89**(4): p. 1745-50.
155. Agnoletti, G., et al., *Mid-term effects of implanting stents for relief of aortic recoarctation on systemic hypertension, carotid mechanical properties, intimal medial thickness and reflection of the pulse wave*. Cardiol Young, 2005. **15**(3): p. 245-50.
156. Ebeid, M.R., L.R. Prieto, and L.A. Latson, *Use of balloon-expandable stents for coarctation of the aorta: initial results and intermediate-term follow-up*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(7): p. 1847-52.
157. Chessa, M., et al., *Results and mid-long-term follow-up of stent implantation for native and recurrent coarctation of the aorta*. Eur Heart J, 2005. **26**(24): p. 2728-32.
158. deBlois, D., et al., *Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 340-9.
159. Tea, B.S., et al., *Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo*. Hypertension, 2000. **35**(5): p. 1069-73.
160. Marchand, E.L., et al., *Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats*. Circ Res, 2003. **92**(7): p. 777-84.
161. Mateos-Caceres, P.J., et al., *New and old mechanisms associated with hypertension in the elderly*. Int J Hypertens, 2012. **2012**: p. 150107.
162. Seals, D.R., K.L. Jablonski, and A.J. Donato, *Aging and vascular endothelial function in humans*. Clin Sci (Lond), 2011. **120**(9): p. 357-75.