

INDICE

CAPITOLO 1 - IPERTENSIONE ARTERIOSA ED IPERTENSIONE RESISTENTE

1.1 Definizione ed aspetti generali	3
1.2 Ipotesi fisiopatologiche dell'ipertensione resistente	3
1.3 Ipotesi neuro-adrenergica: iperattività del sistema simpatico nell'ipertensione essenziale	4
1.4 Iperattività del sistema simpatico: cause e conseguenze	7
1.5 Iperattività del sistema simpatico nell'ipertensione resistente	8

CAPITOLO 2 - ALTERAZIONE DEL TONO VASALE NELL'IPERTENSIONE

2.1 Aspetti generali	9
2.2 Milieu di regolazione della funzione vascolare: sostanze vasoattive e stimolazione adrenergica	10
2.3 Osteopontina	12
2.4 Adrenomedullina	13
2.5 Urotensina-II	14

CAPITOLO 3 - HEART RATE VARIABILITY

3.1 Definizione ed aspetti generali	16
3.2 Analisi del dominio del tempo	17
3.3 Analisi del dominio della frequenza	17
3.4 Significato prognostico dell'HRV	18
3.5 Variabili che influenzano l'HRV	19
3.6 HRV nell'ipertensione resistente	23

CAPITOLO 4 - EMODINAMICA CEREBRALE

4.1 Cenni di anatomia dei vasi cerebrali	25
4.2 Flusso ematico cerebrale: autoregolazione e vasoreattività	26
4.3 Alterazioni del flusso ematico cerebrale e della vasoreattività cerebrale nell'ipertensione	27

CAPITOLO 5 - TRANSCRANIAL DOPPLER E TRANSCARANIAL COLOR DOPPLER

5.1 Descrizione della metodica	30
--------------------------------	----

5.2 Principi fisici	31
5.3 Maggiori applicazioni	33
5.4 Breath Holding Index e vasoreattività cerebrale	33

CAPITOLO 6 - IL BILANCIO SIMPATO-VAGALE NELL'IPERTENSIONE RESISTENTE: RELAZIONE CON LA VASOREATTIVITA' CEREBRALE E CON BIOMARKERS DI REGOLAZIONE DEL TONO VASALE

6.1 Introduzione	36
6.2 Scopo dello studio	40
6.3 Materiali e metodi	41
6.4 Analisi statistica	45
6.5 Risultati	45
6.6 Discussione	48
6.7 Limiti dello studio	54
6.8 Conclusioni	54

ICONOGRAFIA E TABELLE	56
------------------------------	----

BIBLIOGRAFIA	62
---------------------	----

CAPITOLO 1 - IPERTENSIONE ARTERIOSA ED IPERTENSIONE ARTERIOSA RESISTENTE

1.1 Definizione ed aspetti generali

L'ipertensione arteriosa costituisce uno dei principali fattori di rischio per eventi avversi cardio e cerebro-vascolari. La prevalenza globale è del 30-45% della popolazione, diventando più comune con il progredire dell'età con una prevalenza >60% nella popolazione al di sopra dei 60 anni [1; 2]. Secondo le linee guida europee ESC/ESH 2018 viene definita da valori di pressione sistolica > 140 mmHg e/o da valori di pressione diastolica > 90 mmHg. Poiché la probabilità che gli eventi avversi cardio e cerebro-vascolari si verifichino è progressivamente più alta all'aumentare dei valori pressori [3], risulta fondamentale, nell'iter diagnostico-terapeutico, ottenere un controllo pressorio ottimale al fine di prevenire l'instaurarsi di complicanze. Nel caso in cui la pressione arteriosa rimanga non controllata nonostante l'utilizzo di tre agenti antipertensivi (compreso un diuretico) al massimo dosaggio tollerato, si parla di ipertensione resistente [4]. Escludendo le forme di ipertensione secondaria e le forme pseudo-resistenti causate da scarsa aderenza alla terapia, da una terapia medica subottimale e da un inappropriato stile di vita, la prevalenza stimata dell'ipertensione resistente risulta <10%. Questi pazienti sono a più alto rischio per sviluppare danni d'organo mediati dall'ipertensione stessa ed eventi cardio e cerebrovascolari [5; 6].

1.2 Ipotesi fisiopatologiche dell'ipertensione resistente

Nonostante siano note le caratteristiche cliniche dei pazienti con ipertensione resistente rispetto ai pazienti con ipertensione non resistente (più anziani, più obesi, con maggiore durata di malattia, più frequentemente afroamericani e più frequentemente affetti da OSAS, diabete, dislipidemia, ridotta funzionalità renale, microalbuminuria, ipertrofia del ventricolo sinistro e storia di eventi cardiovascolari) [7], risultano ancora in parte sconosciuti i meccanismi fisiopatologici in grado di generare una "resistenza" alla terapia medica. Diversi studi hanno tentato di investigare tali meccanismi descrivendo una genesi multifattoriale dell'ipertensione resistente data da: livelli più elevati di aldosterone (in assenza tuttavia di una condizione di iperaldosteronismo primitivo) e Angiotensina II ed espansione del volume intravascolare [8], un'aumentata attività del sistema nervoso simpatico [9] e dall'attivazione del sistema immune e della risposta infiammatoria.

1.3 Ipotesi neuro-adrenergica: iperattività del sistema simpatico nell'ipertensione essenziale

Il sistema nervoso simpatico esercita un controllo a breve ed a lungo termine della pressione arteriosa mediante la risposta barocettoriale e l'innervazione renale. Il riflesso barocettoriale prevede che un incremento della pressione arteriosa venga percepito meccanicamente dai barocettori aortici e carotidei i quali, agendo a livello dei centri cardio-acceleratore e vasomotorio troncoencefalici, determinano una inibizione del sistema simpatico e, agendo sul centro cardioinibitore, una stimolazione parasimpatica colinergica con conseguente riduzione della frequenza cardiaca e delle resistenze vascolari periferiche (meccanismo spiegato anche a livello renale mediante innervazione simpatica diretta delle cellule muscolari lisce dell'arteriola afferente, delle cellule juxtaglomerulari responsabili della produzione di renina e delle cellule tubulari responsabili del riassorbimento di sodio). L'opposto accade qualora si verifichi una riduzione della pressione arteriosa. In questo modo il riflesso barocettoriale, influenzando la frequenza cardiaca e le resistenze vascolari periferiche, garantisce una regolazione della pressione arteriosa momento per momento, minimizzando le sue alterazioni.

Diversi studi condotti negli ultimi due decenni su animali e umani hanno fornito evidenze circa il fatto che la stimolazione del sistema nervoso simpatico sul cuore e sui vasi periferici sia aumentata nell'ipertensione essenziale e che l'iperattività adrenergica sia una caratteristica peculiare di questa condizione [10-14]. Tali studi hanno inoltre evidenziato che questa anomalia diventa progressivamente più pronunciata all'aumentare del grado di pressione arteriosa [15-18] ed è potenziata dalla presenza concomitante di obesità, sindrome metabolica [19], scompenso cardiaco [20-21] e insufficienza renale [22-23].

Le evidenze hanno inoltre riscontrato che l'attivazione simpatica partecipa allo sviluppo dell'ipertensione complicata dal danno d'organo bersaglio, come nella disfunzione diastolica del ventricolo sinistro, nell'ipertrofia del ventricolo sinistro e nel rimodellamento vascolare. Nonostante la notevole quantità di informazioni raccolte sulle principali caratteristiche delle alterazioni neurogeniche correlate all'ipertensione, le cause dell'attivazione simpatica rimangono non definite, sebbene le alterazioni nella modulazione riflessa del drive adrenergico e/o la partecipazione dei fattori metabolici siano probabili candidati.

E' certamente possibile parlare oggi di «ipotesi neurogenica dell'ipertensione», che enfatizza la potenziale rilevanza fisiopatologica delle anomalie nervose simpatiche e parasimpatiche descritte nei pazienti con ipertensione essenziale [24].

In passato, diversi approcci sono stati utilizzati in vari modelli animali di ipertensione per dimostrare che l'iperattività simpatica è il fattore primario sottostante all'aumento della pressione sanguigna [25]. I tentativi sono stati compiuti anche per generare forme di ipertensione neurogena, alterando i meccanismi neurali di controllo cardiovascolare attraverso diversi approcci sperimentali. Nel ratto spontaneamente iperteso, un ceppo che è generalmente considerato come il miglior modello di ratto per lo studio dell'ipertensione umana essenziale, è stata ottenuta una evidenza chiara di iperattività simpatica con descrizione di un'amplificazione delle risposte vasocostrittrici neurogeniche alla varietà di stimoli eccitatori ed un aumento del turnover della noradrenalina nelle aree pressorie del sistema nervoso centrale [26]. In questo modello animale, lo sviluppo di ipertensione può essere prevenuto o ritardato da simpatectomia chimica o anche da denervazione renale [27].

L'origine neurale dell'ipertensione arteriosa è stata sostenuta anche da un approccio sperimentale basato sulla manipolazione delle zone riflesse cardiovascolari o di percorsi neurali coinvolti nell'omeostasi cardiovascolare [28-30]. In quasi tutte le specie testate, la denervazione chirurgica dei barocettori seno-aortici o la lesione della stazione di relay centrale del baroriflesso, il nucleo del tratto solitario, è stata seguita da un immediato aumento della pressione arteriosa [30].

Nuove informazioni sulle principali caratteristiche dell'ipertensione legata all'attivazione simpatica sono state ottenute da studi che dimostrano che le determinanti dell'anomalia neurogena possono essere di natura eterogenea. Tali determinanti includono: (1) alterazioni del ritmo respiratorio che portano ad ipossia cronica intermittente, quindi stimolazione chemorecettoriale [31, 32], (2) aumento dell'osmolarità plasmatica che attiva le aree ipotalamiche vasopressinergiche [33] (3) infiammazione vascolare del tronco encefalico [34], (4) eccitazione simpatica mediata dall'angiotensina II [35] e (5) modificazioni della relazione pressione-natriuresi mediate da attivazione simpatica renale [36]. Presi insieme, questi risultati supportano l'idea che l'ipertensione legata all'iperattivazione simpatica ha una origine multifattoriale, una conclusione che è in accordo con i dati ottenuti nell'ipertensione umana.

La rilevazione di un'aumentata attivazione simpatica nei pazienti ipertesi è stata effettuata in svariati studi tramite l'utilizzo di due indici piuttosto grezzi di trasmissione adrenergica: livelli plasmatici di noradrenalina e frequenza cardiaca. Un'indagine analitica degli studi che hanno impiegato la noradrenalina plasmatica come marcatore umorale di attività simpatica nei pazienti con ipertensione essenziale ha dimostrato che in circa il 40% degli studi l'ipertensione sanguigna è stata associata a elevati valori plasmatici di noradrenalina [37]. L'analisi dei dati di quattro diversi studi effettuati nel corso degli scorsi anni dal gruppo di Grassi et al. circa i livelli di noradrenalina

nel plasma [38-41] fornisce risultati simili, mostrando che nei pazienti con ipertensione essenziale i livelli plasmatici del neurotrasmettitore adrenergico sono il 25-30% maggiori rispetto ai soggetti normotesi di controllo di pari età.

I valori di frequenza cardiaca, che sono stati proposti per riflettere l'attività cardiaca adrenergica [42], sembrano essere un po' aumentati nei pazienti ipertesi rispetto ai soggetti normotesi, anche se non c'è alcun significato statistico rilevabile in termini di differenza di dati tra i gruppi selezionati nei suddetti studi.

E' tuttavia necessario fare due considerazioni. La prima è che un aumento di noradrenalina nel plasma non riflette necessariamente un'attività simpatica maggiore; può dipendere infatti da una ridotta ricaptazione del neurotrasmettitore nei terminali nervosi periferici e/o da una diminuzione della sua clearance tissutale [43]. La seconda considerazione è che gli elevati valori di frequenza cardiaca possono dipendere non solo da un deflusso adrenergico aumentato al cuore, ma anche da una ridotta inibizione da parte dell'attività parasimpatica sul nodo del seno [42].

L'approccio microneurografico, che consente di registrare la scarica di una singola fibra nervosa simpatica a livello dei muscoli scheletrici, ha confermato che nell'ipertensione essenziale è presente una marcata attivazione simpatica [44], e questa risulta essere una caratteristica peculiare di questa condizione, non riscontrandosi nell'ipertensione renovascolare o in altri casi di ipertensione secondaria [45]. E' stato altresì evidenziato come l'iperattività adrenergica non influenza il sistema circolatorio in maniera omogenea. Le uniche informazioni disponibili dalla microneurografia su questo tema si riferiscono alla dimostrazione che in numerose malattie cardiometaboliche (compresa l'ipertensione) e renali, mentre la scarica simpatica neurale muscolare subisce un notevole aumento, il traffico nervoso simpatico a livello della cute è normale [41, 46]. La tecnica di radiomarcatura della noradrenalina, sviluppata da ricercatori australiani, ha permesso invece una più completa comprensione dei modelli regionali dell'iperattività simpatica nello stato ipertensivo [47]. Questo approccio sofisticato, infatti, ha dimostrato che il rilascio centrale, cardiaco e renale di noradrenalina è notevolmente potenziato in pazienti ipertesi, con un potenziamento ulteriore quando l'ipertrofia ventricolare sinistra complica la malattia ipertensiva [47, 48]. Ancora una volta, tuttavia, sembra che alcuni letti cardiovascolari (circolazione polmonare, per esempio) non condividono l'iperattività adrenergica vista nelle circolazioni centrali cardiache e renali.

1.4 Iperattività del sistema simpatico: cause e conseguenze.

A causa dell'origine multifattoriale dell'ipertensione e delle evidenze che dimostrano come siano molti i fattori coinvolti nel controllo simpatico cardiovascolare, la gamma dei "candidati" ai meccanismi responsabili dell'iperattività adrenergica risulta essere ampia. Un'ipotesi accreditata da tempo sostiene che l'ipertensione connessa all'attività simpatica ha un'origine centrale, a causa delle anomalie funzionali nella modulazione della scarica simpatica proveniente dal sistema nervoso centrale e/o di risposta adrenergica esagerata agli stimoli stressanti [29]. Uno stato di iperattività simpatica può tuttavia anche essere innescato dalla compromissione della funzione inibitoria fisiologicamente esercitata dalle zone riflessogene (barocettori arteriosi, recettori cardiopolmonari e chemocettori) sull'attività adrenergica [41]. Si pensa che anche i meccanismi metabolici e umorali siano coinvolti nello sviluppo e nella progressione dell'ipertensione correlata all'iperattivazione simpatica. Questa ipotesi si basa sulle seguenti prove in animali da esperimento come pure negli esseri umani: (1) effetti simpatici eccitatori di insulina e leptina, che possono essere di origine centrale; (2) l'angiotensina II che provoca un marcato aumento dell'attività simpatica [30, 36]. Presi insieme, questi dati hanno condotto all'ipotesi, confermata almeno in parte da studi ad hoc, che l'ipertensione legata all'iperattività simpatica possa essere provocata da un potenziamento degli effetti eccitatori di insulina, leptina e angiotensina II sulla scarica adrenergica centrale.

Oltre a contribuire all'inizio, al mantenimento e alla progressione dello stato ipertensivo, l'iperattività simpatica partecipa anche alla genesi di complicanze maggiori legate all'ipertensione, come l'insufficienza cardiaca congestizia, eventi ischemici coronarici, le principali aritmie cardiache e morte improvvisa [41]. Come accennato in precedenza, è stato dimostrato che i meccanismi nervosi simpatici possano partecipare allo sviluppo del danno d'organo bersaglio, come l'ipertrofia ventricolare sinistra, la disfunzione diastolica, la ridotta compliance arteriosa e l'aterosclerosi vascolare [41]. Il coinvolgimento dell'attivazione simpatica nel processo aterogeno può avvenire tramite meccanismi sia diretti che indiretti, tenendo conto della ben nota capacità dei neurotrasmettitori simpatici di influenzare sfavorevolmente il metabolismo lipidico e la sintesi del colesterolo.

Dato che diverse questioni legate all'attivazione simpatica nell'ipertensione essenziale sono meritevoli di indagini in futuro, una priorità della ricerca è quella di caratterizzare ancora meglio i fenomeni patogenetici alla base dell'iperattivazione simpatica e sviluppare nuove strategie terapeutiche in grado di esercitare effetti simpaticomodulatori.

1.5 Iperattività del sistema simpatico ed ipertensione resistente.

Gli studi di Grassi et al. hanno descritto la presenza di un'iperattivazione del sistema simpatico anche nell'ipertensione resistente [49]. Selezionando gruppi di pazienti ipertesi resistenti non affetti da altre condizioni (quali scompenso cardiaco, elevato BMI, OSA di grado moderato-severo ed insufficienza renale cronica) che potessero giustificare la presenza di un'iperattivazione adrenergica, hanno dimostrato, con metodica microneurografica al nervo peroneale, un'attività muscolare nervosa simpatica (MSNA, muscle sympathetic nerve activity) nettamente maggiore (circa il 50% in più) nei soggetti con ipertensione resistente rispetto ai soggetti con ipertensione non resistente ed ai soggetti non ipertesi. Tale dimostrazione consente di affermare con certezza che l'iperattività del simpatico costituisce una caratteristica della "resistenza" alla terapia medica indipendentemente dalla presenza di altre comorbidità. L'iperattività del sistema nervoso simpatico risulta probabilmente correlata ad una incapacità del riflesso barocettoriale di esplicare il suo ruolo di inibizione della stimolazione adrenergica. Come accennato anche in merito all'ipertensione essenziale tali dimostrazioni hanno anche risvolti terapeutici poiché l'attivazione simpatica costituisce il target della terapia non farmacologica dei soggetti con ipertensione resistente costituita dalla denervazione simpatica renale, mediante un catetere a radiofrequenza [50], e dalla cronica stimolazione barocettoriale [51] attraverso l'impianto di un device elettrico. Entrambe queste tecniche possono essere impiegate quando il trattamento con più farmaci contemporaneamente non riesce ad abbassare in maniera efficace i livelli di pressione arteriosa.

CAPITOLO 2 - ALTERAZIONE DEL TONO VASALE NELL'IPERTENSIONE

2.1 Aspetti generali

Il concetto di adattabilità della parete vascolare fu introdotto per la prima volta da Glagov et al. nel 1987, quando, conducendo studi sull'aterosclerosi, riscontrarono che il restringimento luminale dei vasi affetti da aterosclerosi non derivava semplicemente da un ingrandimento della placca, ma bensì da modificazioni della parete stessa delle arterie per preservare il flusso ematico [52]. Questa "adattabilità" delle arterie è un concetto fondamentale nella fisiopatologia cardiovascolare e possiamo affermare che l'ipertensione stessa deriva da un'alterata risposta della parete vasale alle modificazioni emodinamiche [53]. Un aspetto fondamentale nella patologia ipertensiva, infatti, risiede nell'incremento delle resistenze vascolari periferiche legato a cambiamenti permanenti strutturali e funzionali a livello delle arterie di grosso calibro (arterie di conduttanza) e di piccolo calibro (arterie di resistenza). Nelle arterie sane, cambiamenti umorali e meccanici locali inducono adattamenti strutturali e funzionali a livello delle varie cellule presenti nei differenti strati della parete vascolare al fine di mantenere una corretta omeostasi della pressione arteriosa. Negli stati patologici questi cambiamenti adattativi tendono a non ritornare alla condizione di base, instaurando delle alterazioni permanenti che vengono appunto definite oggi come "rimodellamento vascolare" [54].

La parete delle arterie contiene diverse componenti comprese cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vasali (vascular smooth muscle cells, VSMCs), fibre di elastina, fibroblasti ed una matrice extracellulare che interagiscono tra loro come un sistema autocrino-paracrino, ed è suddivisa in tre strati differenti: la tonaca intima, la tonaca media e la tonaca esterna (o avventizia). La tonaca intima è la più interna e contiene un singolo strato di cellule endoteliali; la tonaca esterna è costituita da tessuto connettivo formato da collagene e fibre di elastina; la tonaca media è compresa tra le due precedenti e le sue componenti variano a seconda del calibro delle arterie considerate. I vasi di grosso calibro, di "conduttanza", come l'aorta o le carotidi, presentano una tonaca media a minore contenuto di cellule muscolari lisce e maggior contenuto di elastina: ciò facilita la risposta a flussi ematici ad alta pressione come quelli provenienti dal cuore; al contrario le arterie di più piccolo calibro presentano un più alto contenuto di cellule muscolari lisce e minore di elastina fino a quando questa non scompare completamente nei cosiddetti vasi di "resistenza" [54, 55].

Esistono due tipi di rimodellamento vascolare che coinvolgono i vasi di resistenza nei pazienti ipertesi:

- “inward eutrophic remodeling”: caratterizzato da incremento del rapporto media/lume (M/L) per una riduzione del lume (la sezione della tonaca media rimane invariata), con riarrangiamento della stessa quantità di materiale [56]. I meccanismi sottostanti a questo rimodellamento non sono ancora del tutto chiari, verosimilmente derivano da una compensazione di processi di apoptosi a livello della porzione esterna del vaso e processi di crescita cellulare sul versante interno [57]. Nell’uomo, questo tipo di rimodellamento è spesso osservato nell’ipertensione primaria [56], mentre in vitro lo ritroviamo nei ratti spontaneamente ipertesi (Spontaneously Hypertensive Rats).
- “inward hypertrophic remodeling”: caratterizzato da incremento del rapporto M/L per incremento della sezione della tonaca media data da ipertrofia delle VSMCs o aumento della deposizione di proteine extracellulari. Tale tipo di rimodellamento è stato descritto negli ipertesi diabetici [58], e nelle forme di ipertensione secondaria come ipertensione reno-vascolare, iperaldosteronismo primitivo e feocromocitoma [59]. E’ stato descritto inoltre nelle arteriole cerebrali e sarebbe dipendente dalla stimolazione da parte di Angiotensina II (Ang II): (1) l’utilizzo di basse dosi di ace-inibitore (perindopril) nei topi spontaneamente ipertesi (Spontaneously Hypertensive Rats, SHR) predisposti allo stroke inibisce il rimodellamento vascolare sebbene sia meno efficace delle alte dosi nel ridurre la pressione arteriosa [60]; (2) l’utilizzo di bloccanti beta-adrenergici (propranololo) non inibisce il rimodellamento concentrico [60]; (3) l’infusione continua di Ang II nei topi determina rimodellamento concentrico dei vasi cerebrali [61].

Tali modificazioni strutturali costituiscono un meccanismo protettivo a breve termine, in quanto riducono lo stress di parete indotto dall’incremento della pressione endoluminale [53], ma patologico a lungo termine poiché riducono la compliance dilatativa aumentando la “rigidità” arteriosa (arterial stiffness) con conseguente riduzione della perfusione.

2.2 Milieu di regolazione della funzione vascolare: sostanze vasoattive e stimolazione adrenergica

Come già noto, il rimodellamento vascolare è un processo attivo di modificazioni strutturali che coinvolge diversi tipi di pathways: crescita cellulare, apoptosi, migrazione cellulare, sintesi e degradazione di matrice extracellulare. Tali processi derivano non solo da stimoli meccanici emodinamici, ma anche da interazioni tra fattori di crescita locali, mediatori d’inflammatione, stimolazione nervosa adrenergica e sostanze vasoattive con effetto vasodilatatore o vasocostrittore.

Tra le sostanze vasodilatatrici ha una rilevanza particolare il monossido di azoto (NO), inizialmente identificato come “fattore rilassante di derivazione endoteliale” (Endothelium-Derived Relaxing Factor, EDRF). Viene prodotto dalle cellule endoteliali a partire dalla L-arginina tramite l'enzima NO-sintetasi endoteliale (eNOS), dopo stimolazione parasimpatica (colinergica) o come conseguenza dello “shear stress” esercitato sulle pareti arteriose ed è importante per l'adattamento del diametro vasale al flusso ematico e controlla inoltre il tono vascolare e la pressione arteriosa. NO agisce sulle cellule muscolari lisce determinandone un rilasciamento attraverso l'aumento intracellulare di cGMP e conseguente riduzione del calcio intracellulare. L'ipossia e citochine infiammatorie come TNF-alfa inibiscono invece l'attività di eNOS riducendo la disponibilità di NO. L'NO ha inoltre un effetto inibitorio nei confronti della proliferazione delle VSMCs, dell'aggregazione piastrinica, della produzione di fattore tissutale e nei confronti dell'espressione di molecole di adesione cellulare (e-selectina, VCAM-1, ICAM-1). Una riduzione della disponibilità di NO si verifica in condizioni di “disfunzione endoteliale” ed è causata dalla formazione di specie reattive dell'ossigeno responsabili dell'inattivazione dell'NO e della produzione di perossinitriti. In questo setting vengono favoriti processi infiammatori, trombotici, di proliferazione delle VSMCs e di vasocostrizione. L'endotelio produce anche sostanze vasocostrittrici come l'endotelina (ET) e l'angiotensina II, responsabili inoltre della proliferazione delle VSMCs inducendo un rimodellamento ipertrofico.

Studi della scorsa decade condotti su ratti e umani hanno suggerito che l'attività del sistema nervoso simpatico e la funzione vascolare, entrambi fattori chiave nell'instaurarsi della patologia ipertensiva e delle patologie cardiovascolari e nella loro progressione, sono interconnesse su più livelli. In particolare, gli stessi pathways attivi nella regolazione autonoma centrale e periferica sono coinvolti anche nella regolazione della funzione vascolare, indicando che l'omeostasi vascolare è mantenuta da vie di segnale attivate sia a livello nervoso autonomico che a livello vascolare vero e proprio, conducendo ad una risposta multidistrettuale integrata [62, 63]. In particolare studi condotti su umani hanno dimostrato che markers di disfunzione vascolare sono correlati ad un'alterata stimolazione adrenergica e che la disfunzione endoteliale nelle malattie cardiovascolari è presente tanto quanto l'iperattività simpatica. Nell'ipertensione, in particolare, come già accennato precedentemente facendo riferimento agli studi di Grassi et al., l'iperattivazione simpatica è una caratteristica peculiare a tutti i livelli di patologia, dalle forme lievi a quelle più severe e resistenti, e si realizza sia a livello del sistema nervoso centrale [64], sia a livello periferico tramite una down-regulation dei recettori alfa-adrenergici, ridotta ricaptazione della noradrenalina dalle terminazioni

nervose simpatiche ed alterata interazione tra adrenalina, noradrenalina, angiotensina II e peptidi attivi metabolicamente come insulina e leptina a livello della parete vasale [65].

2.3 Osteopontina

L'osteopontina (OPN) è stata descritta per la prima volta nel 1985 da Franzen et al. ed è una fosfoproteina secreta da differenti tipi di cellule quali osteoblasti, linfociti, macrofagi, cellule epiteliali e VSMCs [66] che si comporta come proteina della matrice extracellulare e come citochina proinfiammatoria. OPN è altrimenti conosciuta come fosfoproteina secreta 1 e proteina di attivazione precoce dei linfociti T, sottolineando il suo ruolo nei processi infiammatori e la sua interazione col sistema immunitario. E' coinvolta in diversi processi fisiologici e patologici quali adesione cellulare, migrazione, proliferazione cellulare e riparazione tissutale attraverso interazione con integrine o recettori CD44 e attivando vie di segnale con produzione di fattori di crescita, citochine, chemochine e proteasi [67]. Gioca un ruolo importante nella risposta ad insulti vascolari andando a stimolare la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali, la sintesi di ECM ed il processo di aterogenesi [68, 69]. Gli stimoli che promuovono l'espressione di OPN sono i medesimi che causano la cosiddetta "disfunzione endoteliale", ovvero ROS, angiotensina II, ipossia. Diversi studi condotti su animali hanno dimostrato la presenza di aumentati livelli plasmatici di OPN nel caso di ipertensione arteriosa essenziale (con livelli crescenti all'aumentare della pressione sistolica), hanno inoltre descritto i pathways di attivazione delle VSMC e del rimodellamento vascolare mediato dalle metalloproteinasi di matrice (MMP) [70] ed hanno evidenziato che un'iperespressione forzata di OPN induce a livello vasale un ispessimento della tonaca media ed una proliferazione della tonaca intima a seguito di un insulto [71]. Il ruolo dell'OPN nel rimodellamento vascolare e nel processo di aterogenesi è stato dimostrato anche da studi condotti sull'uomo in cui sono stati descritti elevati livelli plasmatici di OPN nell'ipertensione essenziale, nell'aterosclerosi carotidea [72] e nella CAD (coronary artery disease). Lo studio trasversale condotto da Kurata et al. ha voluto correlare i livelli di OPN con la presenza di aterosclerosi carotidea valutata ecograficamente nei soggetti con ipertensione essenziale, trovando una correlazione diretta tra livelli di OPN e ispessimento medio intimale (IMT), quest'ultimo già considerato come predittore di eventi cardiovascolari [72, 73]. Altri studi hanno evidenziato come l'espressione di OPN sia up-regolata in pazienti con obesità e diabete mellito, considerando anche in questo caso OPN come predittore di eventi cardio-vascolari in questi pazienti [67]. Anche

pazienti con scompenso cardiaco presentano livelli di OPN più alti nel confronto con pazienti sani e con livelli direttamente correlati al grado di classificazione NYHA [74].

2.4 Adrenomedullina

L'adrenomedullina (ADM) è un peptide strutturalmente simile al CGRP (Calcitonin-gene related peptide) che fu isolato e caratterizzato per la prima volta nel 1993 da tessuto umano di feocromocitoma [75]. Studi successivi hanno messo in luce la presenza di ADM anche in altri tessuti come rene, apparato gastro-intestinale e cellule endoteliali cerebrali [76, 77]. ADM è presente inoltre nel sistema cardiovascolare dove viene sintetizzata sia dalle cellule endoteliali che dalle VSMCs ed è in grado di attivare pathways di proliferazione cellulare, migrazione cellulare ed interazione con fattori neuro-ormonali (peptidi natriuretici) con azione vasodilatatoria e natriuretica [76, 78, 79]. Studi condotti sui ratti hanno chiarito i pathways tramite cui ADM esercita un effetto di modulazione del tono vasale: lo shear stress di parete determina un rilascio di ADM da parte delle cellule endoteliali tramite il canale PIEZO1; il recettore di ADM, RAMP (Receptor activity-modifying proteins), è accoppiato all'enzima Adenilato Ciclasi e pertanto i suoi effetti sono determinati da accumulo intracellulare di cAMP; questo porta ad una fosforilazione e dunque attivazione di eNOS con conseguente rilascio di NO e vasodilatazione [78]. Oltre alla vasodilatazione, ADM sembra giocare un ruolo importante nel preservare l'integrità endoteliale: ratti mancanti del gene responsabile della codifica del recettore per ADM RAMP2 hanno mostrato una maggiore permeabilità vascolare ed edema sistemico [80]. Considerati questi effetti pleiotropici di ADM, sono stati condotti diversi studi che hanno documentato elevate concentrazioni plasmatiche di ADM in condizioni patologiche quali lo scompenso cardiaco, la sepsi, l'insufficienza renale ed anche l'ipertensione arteriosa [81]. Nel 1995 è stato riportato per la prima volta da Jougasaki et al. un riscontro di valori di ADM 3-4 volte superiori nei pazienti con scompenso cardiaco cronico rispetto a soggetti sani. La riduzione dei livelli di ADM in questi pazienti dopo trattamento con diuretici e digitale ha portato all'assunto che l'espansione di volume e l'iperattivazione simpatica sono implicati in questo incremento [82]. Da allora diversi studi sono stati condotti in pazienti con scompenso cardiaco cronico, mettendo inoltre in evidenza un incremento dei valori di ADM con outcome avversi [83] ed una linearità tra valori di ADM e severità di malattia [82, 84]. Ulteriori ricerche in ambito clinico hanno correlato i livelli plasmatici di ADM con quelli dei peptidi natriuretici (ANP e BNP) nei pazienti con ipertensione essenziale ed

ipertensione maligna, risultando più elevati rispetto ai soggetti non ipertesi e con un incremento lineare in base al grado di ipertensione, suggerendo un ruolo sinergico di tali molecole nel contrastare gli incrementi pressori in questo setting di pazienti [85-87]. ADM è stata inoltre correlata alla presenza di aterosclerosi indipendentemente dai valori di pressione arteriosa [88], è stata riscontrata una iperespressione del gene per ADM nei pazienti con ictus ischemico associata con la severità dell'ictus stesso [89] ed infine è stata descritta una correlazione lineare tra concentrazioni plasmatiche di ADM e severità delle lesioni cerebrovascolari [90] suggerendo un ruolo di ADM nella patogenesi delle vasculopatie cerebrali.

2.5 Urotensina II

Un altro marker dell'omeostasi cardiovascolare su cui dal ventennio scorso si è focalizzata la ricerca scientifica è l'Urotensina II (UT-II). E' un neuropeptide ciclico isolato per la prima volta nel 1985 a livello del sistema neurosecretorio dei pesci teleostei [91]. La scoperta del recettore dell'UT-II avvenne qualche anno dopo, e fu riconosciuto nel GPR14 (G-protein coupled receptor). Isoforme di UT-II sono state successivamente isolate anche in diversi mammiferi (topi, cani, maiali, macachi) in cui è stata riscontrata una variabilità nella risposta vasale alla UT-II in termini di vasocostrizione ma anche vasodilatazione, descrivendo tuttavia nei macachi (*Cynomolgus monkey*) un'azione vasocostrittrice maggiore rispetto alla ET-1 [92, 93]. Nell'uomo UT-II risulta espressa in diversi tessuti tra cui SNC, rene, surrene e anche nel sistema cardiovascolare e nelle placche aterosclerotiche suggerendone un ruolo nell'omeostasi del tono vasale e nelle patologie cardiovascolari. Esperimenti condotti da Pernow et al. [94] hanno individuato come risposta predominante legata alla stimolazione da parte di UT-II in vivo, la vasocostrizione. Stirrat et al. descrivono invece una risposta vasodilatatoria nelle arterie di resistenza addominali e polmonari isolate in vitro [95]. Wilkinson et al. hanno studiato l'effetto di UT-II iniettata ev a livello dell'avambraccio di uomini volontari sani non riscontrando alcuna risposta significativa in termini di variazione del tono vascolare (arterioso e venoso) o sull'emodinamica sistemica imputando questo dato alla probabile minore densità di recettori di UT-II a livello di tale distretto (arterie periferiche del braccio) come parte della variabilità riscontrata tra le specie [96]. Da tali dati si evince che il ruolo di UT-II nella fisiologia e nella fisiopatologia umana non sia chiarito fino in fondo. Sono stati descritti dei livelli di UT-II più elevati in soggetti con scompenso cardiaco [97, 98], diabete mellito di tipo 2 [99], rispetto ai controlli sani. I dati in letteratura in merito ai livelli di UT-II nei pazienti ipertesi sono invece contrastanti. Uno studio caso-controllo, eseguito su un

piccolo gruppo di pazienti ipertesi confrontati con pazienti sani [100], ha evidenziato come UT-II risulta significativamente aumentata nei soggetti ipertesi rispetto ai controlli sani e direttamente correlata alla pressione arteriosa sistolica. Questi risultati sono stati confermati da un ulteriore studio caso controllo, condotto qualche anno dopo, su un campione più numeroso, che confrontava i livelli di UT-II in controlli sani e pazienti ipertesi [101]. Uno studio prospettico eseguito su circa 1800 soggetti sani in Cina ha voluto esplorare l'associazione dei livelli di Endotelina-1 (ET-1) e UT-II e il rischio di sviluppare ipertensione arteriosa eseguendo il dosaggio plasmatico di tali peptidi al tempo zero e dopo 5 anni, valutando l'eventuale insorgenza di ipertensione arteriosa: nei 700 soggetti che hanno sviluppato ipertensione arteriosa hanno riscontrato dei livelli di ET-1 incrementati al tempo 0 rispetto ai pazienti normotesi. Tale discrepanza non è stata riscontrata invece per UT-II [102]. Infine non sono state riscontrate differenze nelle concentrazioni plasmatiche di UT-II di pazienti con ipertensione essenziale trattata rispetto a pazienti con ipertensione essenziale non trattata [100], dimostrando quindi che i meccanismi con i quali agisce UT-II non sono ancora del tutto noti.

CAPITOLO 3 - HEART RATE VARIABILITY

3.1 Definizione ed aspetti generali

La frequenza cardiaca in un soggetto normale anche in condizioni di riposo e senza influenze provenienti dall'ambiente esterno o da processi emozionali, non è mai costante. Essa infatti presenta un certo grado di variabilità dipendente dall'interazione tra diversi meccanismi fisiologicamente attivi. Tra questi, i principali sono rappresentati da pressione arteriosa, sistema endocrino e ormoni circolanti, respirazione e bilancio simpato-vagale.

Le due sezioni del sistema nervoso vegetativo agiscono contemporaneamente sul nodo del seno generando un certo equilibrio, in modo tale da garantire una modulazione battito-battito della frequenza cardiaca. Il sistema nervoso simpatico, agendo con una stimolazione noradrenergica, è responsabile di un incremento nella scarica del nodo del seno; il sistema parasimpatico, invece, agendo con una stimolazione colinergica, determina una riduzione della depolarizzazione spontanea del nodo del seno, assieme ad altri effetti a livello del nodo atrioventricolare, tessuto di conduzione etc. Tutto ciò provoca variazioni dell'intervallo R-R ad ogni battito.

La misura della variazione degli intervalli tra due battiti cardiaci consecutivi (RR) prende il nome di Heart Rate Variability (HRV). Poiché, come abbiamo già detto, la frequenza cardiaca è dettata prevalentemente dalla stimolazione autonoma estrinseca del cuore, l'HRV riflette la capacità del cuore di adattarsi a differenti sollecitazioni offrendo una stima indiretta dell'attività del bilancio simpato-vagale [103]. Per tale motivo e per la sua facile acquisizione e riproducibilità, costituisce uno strumento molto utilizzato nell'ambito della ricerca. Nei casi in cui il sistema nervoso autonomo sia normofunzionante, e quindi con un bilancio simpato-vagale equilibrato, si registreranno continue fisiologiche variazioni del ciclo sinusale (intervallo RR) [103]; nei casi in cui invece questo equilibrio venga meno a causa di un'iperattività del simpatico o di una riduzione del tono vagale o di entrambe le condizioni, si registreranno minori variazioni degli intervalli e quindi una ridotta HRV [103]. Bisogna comunque ricordare che diversi fattori fisiologici influenzano l'HRV come il sesso, l'età, i ritmi circadiani, la respirazione e la posizione corporea [104]. Da un punto di vista prettamente pratico, la misurazione dell'HRV può essere eseguita attraverso monitoraggi ECG delle 24 ore (long term recordings) o con registrazioni più brevi che possono andare dai 30 secondi ai 5 minuti (short term recordings). Al giorno d'oggi quasi tutti gli apparecchi per il monitoraggio Holter presentano incorporato un software per l'elaborazione dei parametri HRV in automatico. Ciononostante rimane comunque necessaria un'analisi preliminare da parte di

un operatore esperto al fine di distinguere artefatti, battiti normali e battiti ventricolari prima dell'analisi della variabilità della frequenza cardiaca [103].

I parametri della variabilità della frequenza cardiaca si distinguono in indici del dominio del tempo e indici del dominio della frequenza.

3.2 Analisi del dominio del tempo

Gli indici del dominio del tempo valutano le variazioni della FC nel tempo o la variabilità degli intervalli compresi tra battiti cardiaci consecutivi (viene riconosciuto ogni singolo complesso QRS e viene calcolato l'intervallo RR normale - intervallo NN). Le variabili più semplici del dominio del tempo che vengono calcolate sono: la media degli intervalli NN, la FC media, la differenza tra l'NN più lungo e più breve, la differenza tra la FC diurna e notturna e la differenza tra FC massima e minima [105]. Possono altresì essere calcolate delle variabili statistiche più complesse derivate dalla misurazione o dalla differenza degli intervalli NN. Le più utilizzate sono: deviazione standard degli intervalli NN (SDNN), ovvero la radice quadrata della varianza che fornisce la misura dell'espressione globale dell'HRV in tutto il periodo di registrazione ed è subordinata alla durata di quest'ultimo (la durata delle registrazioni su cui determinare SDNN deve essere quindi standardizzata) [105]; deviazione standard della media degli intervalli NN calcolata su tutti i segmenti di 5 minuti dell'intera registrazione (SDANN), che rappresenta un indice sensibile per basse frequenze di variabilità nonché della variabilità legata alla attività fisica, alle variazioni posturali ed al ritmo circadiano [103]; media delle deviazioni standard degli intervalli NN calcolate su ogni periodo di 5 min dell'intera registrazione (SDNN index), che meglio si adatta alla misurazione delle variazioni di frequenza per intervalli di breve durata. Queste tre misure (SDNN, SDANN e SDNN index) rappresentano l'attività combinata del sistema nervoso simpatico e parasimpatico presentando bassi valori in presenza di iperattività simpatica [103; 105-107]. Infine RMSSD e pNN50 sono le variabili derivate dalle differenze degli intervalli RR più utilizzate [103]. Esse rispecchiano le variazioni della FC nel breve periodo e l'attività del sistema nervoso parasimpatico; non risentono quindi del ritmo circadiano [103]. La definizione matematica ed il significato delle principali variabili del dominio del tempo sono riassunte nella Tabella 1.

3.3 Analisi del dominio della frequenza

Gli indici del dominio della frequenza misurano le oscillazioni periodiche della FC scomponendole per frequenza e ampiezza e fornendo informazioni sulla varianza. Il calcolo di tali misure viene

generalmente effettuato mediante spettro di potenza attraverso la trasformata di Fourier che converte i vari intervalli NN rivelati dal software in bande con differenti frequenze spettrali [103]. Lo spettro di potenza può essere classificato in 4 bande: HF (High frequency), componente oscillatoria ad alta frequenza, tra 0,15 e 0,40 Hz, sincrona con la frequenza respiratoria e determinata dalla modulazione vagale sul nodo del seno; LF (Low frequency), componente a bassa frequenza, tra 0,04 e 0,15 Hz, corrispondente all'oscillazione ritmica della pressione arteriosa e secondaria all'attività modulatrice del sistema nervoso simpatico; VLF (Very Low frequency), compresa tra 0,01 e 0,04 Hz, dovuta in parte all'attività del Sistema Nervoso Simpatico che interviene nei processi di termoregolazione ed emozionali; ULF (Ultra Low Frequency), inferiore a 0,03 Hz, il cui significato non risulta ancora chiaro, seppure siano stati ipotizzati come possibili fattori responsabili le variazioni circadiani sonno/veglia o le variazioni in rapporto all'attività fisica ed al riposo. Poiché le interazioni tra sistema simpatico e parasimpatico sono molteplici e numerosi sono le variabili esterne che possono contribuire alle modificazioni dell'HRV, sarebbe fin troppo semplicistico considerare una componente come espressione esclusiva di una sola branca. Per taleragione il rapporto LF/HF può essere considerato l'indice più attendibile del bilancio simpato-vagale globale [103].

3.4 Significato prognostico dell'HRV

Lo studio dell'HRV sia nel dominio del tempo che in quello della frequenza è stato ed è ancora oggi oggetto di numerosi studi che coinvolgono cardiopatia ischemia e aritmica e altre patologie non cardiache. Attualmente però soltanto in due condizioni cliniche ben precise la valutazione dell'HRV è ritenuta una sicura e accettata metodica con capacità di predire il rischio di mortalità: nel post-IMA e come precoce indicatore di neuropatia diabetica. Diversi studi [108-111] hanno dimostrato che una riduzione della variabilità totale nel post-infarto è associata ad un aumento del rischio di mortalità cardiaca rispetto a coloro che non presentano alterazioni della variabilità fisiologica degne di nota. Su tali studi si basa anche il razionale dell'utilizzo in questi pazienti dei betabloccanti e della loro efficacia nel ridurre la mortalità post-infarto. Questi farmaci infatti garantiscono un buon controllo del tono simpatico riportando il rapporto LF/HF nei limiti fisiologici. Il valore predittivo dell'HRV è indipendente da altri fattori già riconosciuti come la frazione di eiezione del ventricolo sinistro, l'incremento dell'attività ectopica ventricolare e la presenza di potenziali tardivi. Nel predire il rischio di mortalità per qualunque causa, l'HRV è simile alla frazione di eiezione ma è superiore nel predire eventi aritmici. Nei pazienti diabetici [108, 109] invece caratteristicamente lo

spettro di potenza mostra una potenza totale significativamente più bassa senza variazione del rapporto LF/HF. Infatti la neuropatia diabetica è caratterizzata da una precoce e diffusa degenerazione neuronale delle piccole fibre nervose appartenenti al sistema simpatico e parasimpatico. Le manifestazioni cliniche sono ubiquitarie ed includono ipotensione posturale, tachicardia persistente, alterazioni gustative, gastroparesi, atonia vescicale e diarrea notturna. Non appena compare la sintomatologia clinica della neuropatia, la mortalità stimata a 5 anni è maggiore del 50%. La rilevazione subclinica della neuropatia diabetica è un importante indice per la stratificazione del rischio e per il management del paziente.

3.5 Variabili che influenzano l'HRV

3.5.1 HRV ed età

Numerose sono le condizioni fisiologiche e patologiche che possono determinare delle modificazioni dei parametri HRV sia nell'analisi del dominio del tempo che nell'analisi del dominio della frequenza attraverso delle influenze esercitate su una o entrambe le sezioni del sistema nervoso vegetativo. Tra queste, l'effetto che l'età e il fisiologico invecchiamento sembrano possedere nei riguardi dell'HRV rappresenta uno dei fattori più studiati. Nonostante il grande interesse e la gran quantità di analisi che negli anni si sono susseguite, non si è giunti ancora ad una visione unanime riguardo ogni aspetto che caratterizza il complesso rapporto tra età e HRV.

Interessante [112], in tal senso, è lo studio di Angelink et al. effettuato su 309 pazienti sani o che non presentavano patologie rilevanti, né assumevano farmaci in grado di determinare variazioni conosciute dei parametri HRV. I risultati di questo lavoro mostravano una correlazione inversa tra età e HRV per entrambi i sessi. Tale relazione si evidenziava soprattutto prendendo in considerazione alcuni dei parametri come HRr, CVR e RMSSDr. Il rapporto LF/HF invece non sembrava subire variazioni significative con l'età. Le correlazioni più forti dunque sono state riscontrate nei parametri dell'analisi del dominio del tempo e nelle componenti HF e LF. Come già esposto precedentemente, la componente HF è influenzata maggiormente dall'attività del sistema parasimpatico mentre LF è correlata al sistema ortosimpatico. Secondo i dati di questo studio vi sarebbe una diminuzione sia dell'attività simpatica che dell'attività vagale con il progressivo invecchiamento, confermando di fatto l'assunto secondo il quale la frequenza cardiaca non sarebbe correlata all'età come dimostrato da molti altri studi [113-117].

Solo pochi studi non hanno riscontrato alcuna associazione tra componenti LF, HF ed età. Low et al. [118] hanno constatato che la modulazione vagale dell'HRV diminuisce con l'aumentare degli anni, mentre la funzione simpatica postgangliare sarebbe scarsamente colpita dall'età. Altri hanno dimostrato che l'attività nervosa simpatica subirebbe un incremento con l'età [119-121]. Segal et al. [122] hanno invece riscontrato nei propri studi una diminuzione delle componenti LF e HF proporzionale all'età dei pazienti interpretando i dati ottenuti come evidenza delle modificazioni del bilancio autonomo cardiaco secondarie all'invecchiamento.

In un altro lavoro di Stein et al. [123], tutti gli indici dell'analisi del dominio del tempo e della frequenza si presentavano significativamente diminuiti nei soggetti anziani di sesso maschile rispetto ai giovani e alle donne della stessa età. Inoltre il rapporto LF/HF risultava significativamente più elevato negli anziani durante le ore del mattino. Tali risultati secondo gli autori confermerebbero l'associazione tra età e declino della modulazione totale della frequenza cardiaca come supportato dal significativo decremento degli indici HRV correlati all'attività parasimpatica.

Questi dati si distinguono da quelli ottenuti in altri studi come nel lavoro di Bigger et al. [124] che evidenziava una diminuzione degli indici dell'analisi del dominio del tempo sia nelle donne che negli uomini. Anche se in questo studio la popolazione presa in esame come campione era in media più giovane di 10 anni.

In un altro studio di Umetani et al. [125] prendendo in considerazione solo gli indici dell'analisi del dominio del tempo, si è evidenziato che, tra i parametri HRV considerati il declino più rapido e più precoce correlabile all'età sembra essere quello del PNN50. Questa misura correla in maniera stretta con la componente HF che riflette l'attività parasimpatica. Tale dato sembrerebbe essere in accordo con gli studi di Shannon et al. [126] e Korkushko et al. [127] che dimostravano un effettivo declino dell'attività vagale. Al contrario rMSSD, che correla con HF, sembrerebbe diminuire più gradualmente. Questo decremento dell'HRV sembra stabilizzarsi nei soggetti con età maggiore di 60 anni secondo i risultati di Umetani et al., che in tal senso si allontanano da quanto evidenziato da Shannon et al. [126] che evidenziavano una significativa diminuzione dell'HF dai 9 ai 30 anni a cui seguiva una stabilizzazione. È importante però sottolineare una sostanziale differenza nella metodologia dei due studi. Nel lavoro di Shannon et al. infatti, sono state utilizzate registrazioni a breve termine mentre in quello di Umetani et al. le registrazioni erano tutte di 24 ore. Secondo il già citato studio di Bigger et al. [124] le correlazioni più deboli tra parametri HRV ed età erano esibite da SDNN e SDANN.

Infine Bonnemeier et al. [128] in un loro studio mostrano una progressiva riduzione di tutti i parametri HRV con l'aumento dell'età per ogni decade, con il decremento maggiore osservato tra la seconda e la terza decade. Successivamente con il progredire degli anni, i parametri HRV diminuiscono solo gradualmente rispetto ai livelli basali riscontrati in sesta decade di età. Questa correlazione negativa dei parametri del dominio del tempo con il fisiologico invecchiamento sembrerebbe sostanzialmente dovuto alla stretta correlazione tra HRV e prime decadi di vita. Tra i parametri considerati mostravano un'associazione maggiore: SDNNi, sNN50 e rMSSD. Inoltre nello stesso studio gli autori sottolineano un picco notturno caratteristico dei parametri associati all'attività vagale che va progressivamente riducendosi con gli anni a causa di una perdita della ritmicità circadiana. Quest'ultimo dato trova riscontro in numerosi altri studi [129, 130] dove è stata segnalata una diminuzione dell'attività simpatica significativa tra la fase di veglia e il quarto stadio del sonno REM. Quest'ultima fase del sonno infatti subisce un importante accorciamento con l'età con conseguente assenza del fisiologico calo adrenergico.

3.5.2 HRV e sesso

Anche per ciò che concerne l'associazione tra HRV e sesso e la differenza di variabilità nei due sessi non vi è ancora unicità di vedute. Nel già citato lavoro di Angelinik et al. [112] le donne mostravano una componente LF più bassa e un rapporto LF/HF minore rispetto agli uomini di pari età. Inoltre nelle donne con età superiore ai 55 anni si è notato un aumento del HRr medio rispetto al sesso maschile come già messo in luce in altri lavori [114, 115, 117, 131-133]. Dunque nelle donne maggiori di 55 anni è stato riscontrato un decremento della componente LF e del rapporto LF/HF rispetto agli uomini, dati che confermano i risultati di alcuni studi [116, 120] ma che ne smentiscono degli altri [132]. Gli autori suggeriscono che alla base di tale differenza tra i due sessi vi possano essere le influenze ormonali, soprattutto in termini di calo di estrogeni che si registra in età post menopausale. La bassa attività simpatica e l'alto grado di attivazione vagale riscontrata nelle giovani donne invece, è potenzialmente correlabile alla bassa morbidità e mortalità cardiovascolare riscontrata in questa popolazione rispetto a soggetti maschi di pari età.

In un altro studio di Stein et al. si notava come nelle donne soltanto alcuni parametri come SDNNIDX, rMSSD e pNN50 risultavano significativamente minori in età avanzata. Ciononostante nei soggetti anziani non si evidenziavano sostanziali differenze riconducibili al sesso. Al contrario nella popolazione giovane si è notato un aumento di alcuni indici come SDNN, AVGNN e SDNNIDX e del rapporto LF/HF negli uomini piuttosto che nelle giovani donne. Come già

accennato precedentemente, questi dati contrastano con quelli ottenuti da studi simili ma differenti per scelte metodologiche come quello di Bigger et al. dove si riscontrava una diminuzione degli indici del dominio del tempo e della frequenza sia nelle donne che negli uomini.

Secondo il lavoro di Umetani et al. [80] le differenze di HRV evidenziate tra i due sessi sembrerebbero scomparire dopo i 50 anni. Nei soggetti più giovani le differenze più pronunciate sarebbero a carico del pNN50. Tutti gli altri indici risultano variati in misura minore ma comunque significativa. Poiché pNN50 e rMSSD correlano con l'attività parasimpatica, le differenze tra i sessi che sono state osservate potrebbero riflettere livelli inferiori di attività vagale nelle giovani donne.

In un altro studio di Bonnemeier et al. [128] si evidenziava una riduzione dell'intervallo medio R-R, SDNN, e SDNNi nel sesso femminile ma solo nelle prime decadi di età mentre nella popolazione più anziana il solo parametro SDANN sembra differire per comportamento tra le popolazioni appartenenti ai due sessi. Anche in questo caso si evidenzia una minore attività simpatica nelle donne rispetto agli uomini, ma tale differenza scompare nell'età post-menopausale a causa dell'effetto facilitatore degli estrogeni sull'attività parasimpatica, dimostrato in numerosi altri studi [123, 131, 132, 134].

3.5.3 HRV e fumo

Alcuni studi hanno dimostrato mediante analisi dell'HRV, che i fumatori presentano un aumento dell'attività simpatica e una consensuale diminuzione dell'attività vagale. Infatti l'alterazione della normale funzionalità autonoma cardiaca, testimoniata dalla riduzione dei parametri HRV, sembrerebbe essere associata all'esposizione di fumo di tabacco [135] e potrebbe rappresentare uno dei meccanismi fisiopatologici attraverso il quale il fumo esercita un effetto dannoso a livello dell'apparato cardiovascolare [136]. Recentemente Zeskind e Gingras [137] hanno mostrato che i feti esposti a fumo di sigarette durante la vita intrauterina presentavano alla nascita e durante lo sviluppo una riduzione della maggior parte dei parametri HRV, con ripercussioni anche sulla regolazione autonoma.

Inoltre nei forti fumatori si è registrato un calo dell'attività vagale cardiaca anche durante manovre parasimpatiche [138].

3.5.4 HRV e alcool

Sia l'esposizione acuta che quella cronica all'alcool modificano l'HRV, riducendolo. Ciò è legato allo sviluppo, in questi pazienti, di una neuropatia autonoma che può determinare una disfunzione

vagale cardiovascolare con ipotensione posturale, ipotermia e sincopi. Questa alterazione del bilancio simpato-vagale, riscontrabile in oltre il 40 % degli etilisti, si associa ad iperattività adrenergica secondaria [139].

3.5.5 Altre variabili

L'HRV sembra modificarsi anche in conseguenza della presenza di altre condizioni patologiche, sebbene non sempre si sia individuato il momento fisiopatologico in grado di spiegare il differente livello di variabilità della frequenza cardiaca.

In ambito cardiovascolare nei soggetti ipertesi con danno d'organo si è osservata una riduzione dell'HRV [140]. Allo stesso modo nei soggetti affetti da scompenso cardiaco congestizio e nei soggetti con cardiopatia ischemica cronica sembra esservi una riduzione dell'HRV [141].

Secondo quanto riportato in una metanalisi del 2019 [142] che ha raccolto ed analizzato dati longitudinali di 28 studi per esaminare l'associazione tra HRV e il rischio di eventi cardiovascolari o di morte in pazienti con malattia cardiovascolare durante un follow-up di almeno un anno, i pazienti con HRV più basso hanno un rischio più alto del 112% e del 46% rispettivamente di morte da qualsiasi causa e di eventi cardiovascolari, evidenziando come HRV sia un utile predittore di mortalità in questo setting di pazienti ed un marker di disfunzione del bilancio simpato-vagale con relativo ipertono simpatico. L'HRV correla in maniera inversamente proporzionale anche con l'ispessimento medio-intimale carotideo [143] in pazienti con incrementato rischio cardiovascolare, risultando ridotto a causa di alterato controllo autonomico esplicito a livello barocettoriale, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio cardiovascolare.

In soggetti con insufficienza renale cronica sembra esserci altresì una variazione dell'HRV proporzionale al livello di compromissione renale, con una diminuzione di LF e di HF ma senza variazione significativa del rapporto LF/HF. [144]

Non fanno eccezione le patologie neurologiche e psichiatriche: in soggetti con severo danno ischemico cerebrale si osserva una riduzione dell'HRV [145] così come nei pazienti affetti da sindrome depressiva [146].

3.6 HRV ed ipertensione resistente

L'HRV nei soggetti con ipertensione arteriosa è stato ampiamente studiato: è stata osservata una correlazione tra riduzione dell'HRV e severità dell'ipertensione arteriosa [147], una riduzione di HRV nei pazienti non dipper rispetto ai pazienti normotesi ed extreme dipper [148, 149] e nei

pazienti con ipertrofia ventricolare sinistra [150]. Allo stesso modo studi effettuati su pazienti con ipertensione resistente hanno dimostrato un'aumentata attività del sistema nervoso simpatico (con conseguente riduzione di HRV) correlandolo, di volta in volta, con differenti parametri. E' stata descritta una correlazione tra riduzione di SDNN e SDANN con una minore riduzione della pressione arteriosa nelle ore notturne [148], considerando che tra i pazienti con ipertensione resistente vi è una maggiore prevalenza di pattern non dipper. Questa associazione risultava inoltre indipendente da altri fattori notoriamente correlati con il pattern non dipper come l'età, l'obesità, l'insufficienza renale cronica e la presenza di OSAS. Altro interessante studio ha voluto correlare l'HRV con la presenza o meno di ipertrofia ventricolare sinistra [151], uno tra i principali danni d'organo che si realizza nell'ipertensione resistente. I pazienti con ipertrofia ventricolare sinistra presentavano una riduzione di HRV rispetto ai pazienti senza ipertrofia ventricolare sinistra indipendentemente dai valori pressori, dimostrando quindi che l'iperattività simpatica gioca un ruolo fondamentale nell'instaurare il danno d'organo cardiaco ma non è la sola responsabile di tale fenomeno. Altri meccanismi verosimilmente coinvolti sono il sistema renina-angiotensina-aldosterone e l'insulino-resistenza nei soggetti diabetici.

Tali studi hanno avuto l'obiettivo di descrivere particolari caratteristiche del paziente con ipertensione resistente al fine di selezionare i sottogruppi di pazienti da candidare a strategie terapeutiche volte a ridurre il drive simpatico come la denervazione renale e la stimolazione barocettoriale.

CAPITOLO 4 - EMODINAMICA CEREBRALE

4.1 Cenni di anatomia dei vasi cerebrali

Il tessuto cerebrale costituisce circa il 2% della massa corporea e assorbe circa il 14% della gittata cardiaca. Il flusso cerebrale medio può essere quindi stimato in circa 50ml/min per 100 gr di tessuto. La funzione principale della circolazione cerebrale è quella di mantenere un apporto di ossigeno al cervello. La sostanza grigia è infatti estremamente sensibile all'ipossia: nell'uomo, pochi secondi di ipossia provocano perdita di coscienza e in pochi minuti si instaura un danno cerebrale permanente. Il circolo cerebrale deve inoltre essere in grado di modulare il flusso locoregionale per adeguarlo alle esigenze funzionali delle diverse aree cerebrali.

La perfusione cerebrale è garantita da due coppie di arterie, le arterie carotidi interne e le arterie vertebrali, che entrano nel cranio e si anastomizzano tra di loro, costituendo un anello vascolare denominato "circolo di Willis". Le due carotidi interne irrorano prevalentemente la porzione anteriore dell'encefalo, mentre l'arteria basilare, che si forma dalla confluenza delle due arterie vertebrali, vascolarizza la parte posteriore (tronco encefalico e cervelletto). In condizioni normali, nonostante la presenza del circolo anastomotico, non si verifica commistione di sangue proveniente dai due rami vascolari principali, né si osserva commistione attraverso la linea mediana. Il circolo anastomotico tra l'arteria basilare e la carotide di ciascun lato è realizzato da un ramo arterioso che prende il nome di arteria comunicante posteriore, mentre le due carotidi sono collegate tra di loro dall'arteria comunicante anteriore. Dal circolo di Willis nascono tre vasi pari e simmetrici: le arterie cerebrali anteriori, medie e posteriori. Le regioni corticali poste ai margini delle aree irrorate da questi vasi sono definite zone di confine, in quanto i letti vascolari contigui non si sovrappongono. Le zone di confine sono molto sensibili non solo all'ischemia, ma anche all'ipertensione. La presenza del circolo di Willis assicura una circolazione collaterale, in caso di occlusione di uno dei rami tributari. I rami dei vasi più grossi entrano nel parenchima cerebrale rivestiti da uno strato di leptomeninge e sono circondati da uno spazio che contiene fluido cerebrospinale. Lo spazio perivascolare scompare a livello arteriolare.

Il circolo venoso fa capo a due sistemi: il sangue refluo dalla corteccia cerebrale e da quella cerebellare è raccolto da vene superficiali tributarie dei seni venosi, mentre il sangue delle porzioni

basali del cervello è raccolto dal sistema venoso profondo, che include la vena di Galeno e il seno retto. Il sangue venoso lascia il cranio attraverso le vene giugulari.

4.2 Flusso ematico cerebrale: autoregolazione e vasoreattività

Il flusso ematico cerebrale (CBF, Cerebral Blood Flow) dipende, come in tutti gli altri organi, dalla pressione arteriosa, dalla resistenza arteriolare e dalla pressione di perfusione. La pressione di perfusione del circolo cerebrale (CPP) è data dalla differenza tra la pressione arteriosa media (MAP; circa 100 mmHg) e la pressione endocranica (ICP; circa 10 mmHg). Il normale valore della pressione di perfusione si aggira quindi tra 80 e 100 mmHg. La pressione di perfusione può modificarsi in seguito ad alterazioni della pressione arteriosa (shock oppure ipertensione) o in seguito a modificazioni della pressione endocranica. Il meccanismo di autoregolazione del circolo cerebrale è un processo omeostatico molto sofisticato, in parte ancora sconosciuto, che denota l'abilità dell'organo di mantenere costante la sua perfusione nonostante i cambiamenti della pressione arteriosa entro uno specifico range di valori, 60 - 150 mmHg [152]. Tale meccanismo è rappresentato principalmente da variazioni delle resistenze vascolari secondo la formula:

Flusso ematico regionale (rCBF) = Pressione di perfusione cerebrale (CPP) / Resistenze cerebrovascolari regionali (rCVR).

In questo modo incrementi o riduzioni della pressione arteriosa media o della pressione di perfusione cerebrale corrispondono rispettivamente ad incremento o riduzione delle resistenze arteriolari al fine di mantenere costante il CBF.

La concettualizzazione di tale meccanismo è stata originariamente proposta da Lassen [153] come una curva trifasica costituita da un limite inferiore, un plateau ed un limite superiore (Figura 1).

Quando la pressione arteriosa non si mantiene entro i limiti del range dell'autoregolazione o nel caso in cui vi sia un'alterazione dei processi di autoregolazione cerebrale, vi è un considerevole rischio di insulto cerebrale, in particolare di ipossia se la pressione di perfusione si riduce al di sotto del limite inferiore, di edema se invece aumenta oltre il limite superiore.

L'autoregolazione è ottenuta dalla sinergia di meccanismi neurogeni veicolati dalle fibre adrenergiche e colinergiche [154-156], miogeni e metabolici che agiscono modulando il calibro delle arteriole cerebrali [157].

Strettamente connesso al concetto di autoregolazione del flusso ematico cerebrale è la “vasoreattività cerebrale” (Cerebrovascular reactivity, CVR) ovvero la capacità del circolo ematico cerebrale di reagire a stimoli vasoattivi modificando le resistenze arteriolari e quindi il flusso ematico cerebrale.

Le arteriole cerebrali sono molto sensibili alla concentrazione di CO₂ nel sangue arterioso: in condizioni normali l'ipercapnia provoca vasodilatazione arteriolare con conseguente incremento del CBF [158], mentre l'ipocapnia induce vasocostrizione con conseguente riduzione del CBF. Questa risposta vasomotoria non sarebbe prodotta direttamente dall'attività della CO₂ sulla muscolatura liscia vasale, ma bensì dall'acidificazione degli spazi pericellulari. La CO₂, essendo molto diffusibile, riesce ad oltrepassare la barriera emato-encefalica e, attraverso l'azione dell'anidrasi carbonica, aumenta la concentrazione di acido carbonico e dunque la concentrazione idrogenionica locale con conseguente acidificazione del pH [159]. Il sistema di mediatori che viene attivato dall'acidificazione del pH è complesso e con numerose interconnessioni (comprende NO, GMPc, canali del potassio ATP dipendenti) e presenta come effetto finale la riduzione della concentrazione del calcio intracellulare con conseguente rilassamento della muscolatura liscia arteriolare e quindi vasodilatazione arteriolare. La presenza di CO₂ ematica, inoltre, attiva i chemorecettori a livello carotideo con effetto di aumento del tono simpatico con conseguente aumento pressorio sistemico (per aumento della contrattilità cardiaca e vasocostrizione periferica) e vasocostrizione delle arterie cerebrali di più grande calibro. Questo effetto sinergico porta ad un incremento del CBF.

Anche le variazioni parziali di O₂ inducono modificazioni del flusso cerebrale, ma di entità modesta rispetto a quelle prodotte dalla CO₂. Per indurre un aumento sostanziale del CBF, la pO₂ deve scendere al di sotto di 50 mmHg. Quindi, in condizioni di normalità, la sensibilità dei vasi cerebrali alle variazioni di pO₂ è molto bassa e lo stimolo ipossico diventa efficace solo in casi di estrema gravità. Si ricordi anche che una pO₂ bassa nel sangue arterioso stimola la ventilazione: l'ipocapnia che ne consegue induce vasocostrizione arteriolare e riduzione del CBF secondo il meccanismo che abbiamo descritto precedentemente [160].

4.3 Alterazioni del CBF e della vasoreattività cerebrale nell'ipertensione

L'impatto dell'ipertensione cronica sull'autoregolazione del CBF fu descritto per la prima volta da Strandgaard et al. nel 1973 in un gruppo di pazienti con ipertensione essenziale [161]. Questo studio

ha mostrato che sia il limite inferiore che il limite superiore del range della curva di autoregolazione erano shiftati verso destra, dunque verso livelli pressori più elevati rispetto ai soggetti normotesi (Figura 2) [153].

Sebbene lo spostamento verso destra del limite superiore del range verso livelli pressori più alti risulti protettivo nei confronti del parenchima cerebrale in caso di ipertensione cronica limitando il danno da ipertensione nei confronti della microcircolazione a valle, lo spostamento verso destra del limite inferiore del range risulta essere dannoso durante un'ipotensione acuta in cui l'abilità di mantenere costante l'autoregolazione del CBF è ridotta e questo aumenta la suscettibilità al danno ischemico. Oltre agli effetti "dinamici" sopra citati, è stato descritto anche l'effetto di rimodellamento vascolare esercitato dall'ipertensione cronica sulle arterie ed arteriole cerebrali che incrementa le resistenze vascolari e causa ipoperfusione e riduzione dell'estensione del territorio di "penombra" ischemica in corso di ictus [161]. L'innervazione simpatica perivascolare esercita un effetto tropico sulla parete vasale [162] determinando "inward hypertrophic remodeling" con conseguente riduzione del raggio del lume ed aumento dello spessore di parete, che, nelle fasi iniziali dell'ipertensione, funge da evento protettivo nei confronti dell'incremento della pressione intraluminale per mantenere costante la tensione di parete (secondo la Legge di LaPlace). Tuttavia l'ipertrofia concentrica delle arteriole cerebrali ne limita la loro riserva vasodilatatoria durante episodi ipotensivi, e ne aumenta la responsività a stimoli vasocostrittori (Angiotensina II ed Endotelina-1) a causa di un incremento della massa contrattile costituita da cellule muscolari lisce [163]. Infine l'ipertensione cronica causa un insulto endoteliale continuo con conseguente disfunzione endoteliale (produzione di ROS) ed alterazione della risposta vasodilatatoria endotelio-mediata: l'incremento del CBF indotto dall'applicazione neocorticale di sostanze vasodilatatore prodotte dall'endotelio (NO) è ridotto nei ratti SHR o nei ratti wild-type infusi con Angiotensina II [164-166]. Le alterazioni finora descritte sono responsabili di un'alterazione della vasoreattività cerebrale che risulta essere alla base degli insulti cerebrovascolari che caratterizzano i pazienti con ipertensione [167]. Lo studio delle variazioni della funzione vascolare cerebrale nei soggetti ipertesi assume una grande rilevanza clinica dal momento che l'ipertensione stessa ha una grande prevalenza nei soggetti che vanno incontro ad eventi ischemici cerebrali e costituisce il più importante fattore di rischio modificabile per ictus: l'incidenza di stroke aumenta in maniera direttamente proporzionale all'incremento della pressione sistolica e diastolica, incrementando il rischio relativo di 3,1 volte per gli uomini e 2,9 volte per le donne [168, 169].

La misurazione della vasoreattività cerebrale è possibile tramite metodiche ultrasonografiche per lo studio del CBF quali Transcranial Doppler (TCD) e Transcranial Color-Doppler (TCCD).

CAPITOLO 5 - TRANSCRANIAL DOPPLER (TCD) E TRANSCRANIAL COLOR-DOPPLER (TCCD)

5.1 Descrizione della metodica

Il Doppler transcranico (Transcranial Doppler, TCD), introdotto nella pratica clinica a partire dal 1982, è una metodica non invasiva, economica e ripetibile, che utilizza gli ultrasuoni per la valutazione in tempo reale delle velocità di flusso delle arterie intracraniche [170]. Tale indagine prevede l'utilizzo di una sonda trasduttore a bassa frequenza (≤ 2 MHz) per insonare le arterie basali cerebrali del poligono di Willis attraverso specifiche finestre acustiche ossee (temporale, occipitale e orbitale) che, per le loro caratteristiche, consentono, nel 90% dei casi, il passaggio del fascio ultrasonoro [171, 172]. Il Transcranial color-coded duplex ultrasonography (TCCS) o Transcranial color-Doppler (TCCD) si presenta come un avanzamento rispetto al TCD dal momento che ci consente, attraverso l'aggiunta del colore, di comprendere la direzione (rosso - in avvicinamento o blu - in allontanamento rispetto alla sonda trasduttore) del flusso sanguigno dei vasi presi in considerazione. Il TCCD è stato applicato in origine in studi condotti su bambini [173]. Lo sviluppo di sistemi ultrasografici ad alta risoluzione e di sonde settoriali performanti, ha consentito successivamente una sua applicazione anche negli adulti [174] ed è la metodica che abbiamo utilizzato nel nostro studio.

Una corretta esecuzione dell'esame prevede che il paziente sia sdraiato in posizione supina, con la testa e le spalle su un cuscino. Attraverso la finestra acustica temporale (situata al di sopra dell'arco zigomatico, anteriormente al trago), lo studio transcranico può essere eseguito utilizzando due piani di scansione principali, assiale e coronale, a una profondità tale permette di visualizzare anche i vasi controlaterali.

La scansione assiale è quella più comunemente utilizzata e si snoda su due diversi piani di imaging: il mesencefalico e il diencefalico. Nella pratica clinica, il piano di scansione più rilevante per lo studio dei vasi arteriosi cerebrali è il piano mesencefalico, che si ottiene posizionando la sonda parallelamente all'arco zigomatico. A questo livello si può identificare il mesencefalo che appare ipoecogeno con aspetto "a forma di farfalla", che di solito si trova al centro dello schermo. Questa scansione serve ad identificare l'arteria cerebrale media (Middle Cerebral Artery, MCA) ed in particolare i tratti M1 ed M2. E' possibile inoltre visualizzare il segmento A1 dell'arteria cerebrale anteriore (Anterior Cerebral Artery, ACA), i segmenti P1 e P2 dell'arteria cerebrale posteriore (Posterior Cerebral Artery, PCA) ed il segmento C1 del sifone carotideo (Carotid Siphon, CS). In

questa scansione si possono anche vedere le arterie comunicanti anteriori e posteriori e la parte distale dell'arteria basilare (Basilar Artery, BA). Dobbiamo comunque ricordare che circa il 10-20% di soggetti presentano una scadente finestra acustica trans-temporale a seconda dell'età del paziente, sesso femminile ed in altre condizioni che aumentano lo spessore dell'osso temporale [175]. Inclinando la sonda di 10° verso l'alto si ottiene la scansione sul piano diencefalico, sul quale si può vedere il III ventricolo: posteriormente ad esso la ghiandola pineale appare iperecogena, anteriormente ad esso si possono osservare talamo e capsula interna. La scansione coronale è ottenuta ruotando la sonda di 90° in senso antiorario dalla posizione assiale. In questo piano è possibile riconoscere il III ventricolo, i ventricoli laterali, il talamo e la capsula interna.

La finestra occipitale può essere esplorata posizionando la sonda sulla linea sub-occipitale mediana ed invitando il paziente a ruotare la testa nella direzione opposta rispetto all'operatore, con il mento abbassato verso la spalla. Il fascio ultrasonoro attraversa così il frame magno e consente la visualizzazione del tratto V4 delle arterie vertebrali (Vertebral Arteries, VAs), e la BA disposte come una "Y rovesciata". E' possibile inoltre identificare le arterie cerebellari posteriori ed anteriori.

La finestra orbitale viene esplorata ponendo il trasduttore perpendicolarmente al bulbo oculare, con paziente ad occhi chiusi. Questo approccio consente di intonare l'arteria oftalmica ed i segmenti C2, C3 e C4 del CS. I limiti di questo approccio sono legati al potenziale danno retinico causato dal fascio ultrasonoro e per cui si consiglia di ridurre la potenza della sonda di circa il 10-15% rispetto alla finestra transtemporale.

Il vaso intracranico più frequentemente esaminato nella pratica clinica è la MCA, esplorabile facilmente attraverso la finestra trans-temporale. Dal momento che il 60-70% del flusso ematico dell'arteria carotide interna è diretto alla MCA, la sua valutazione mediante TCCD può considerarsi rappresentativa di quasi la totalità del flusso ematico verso l'emisfero omolaterale. MCA è esplorabile ad una profondità di 45-60 mm e il flusso sanguigno è sempre diretto verso la sonda [175].

5.2 Principi fisici

In termini fisici il fascio di ultrasuoni (US) emanato dalla sonda attraversa il cranio e viene riflesso dagli eritrociti che fluiscono all'interno dei vasi sanguigni. Quando un'onda sonora colpisce un oggetto in movimento, l'onda riflessa mostra una variazione della frequenza (spostamento Doppler

f) proporzionale alla velocità (V) dell'oggetto stesso. Nei vasi intracranici, così come in altri organi vitali quali fegato, rene e cuore, il segnale Doppler mostra una prominente componente diastolica.

L'equazione utilizzata per la stima della velocità del CBF (CBFV) derivata dai principi Doppler sopra descritti, è la seguente:

$$V = \frac{c \times f}{2 \times f_0 \times \cos\theta}$$

Dove c è la velocità dell'onda US emessa dalla sonda, f_0 è la frequenza dell'impulso dell'onda US e θ è l'angolo formato tra l'onda emessa e quella riflessa.

Il CBFV medio (MCBFV; Mean CBF velocity) deriva dall'intero spettro disegnato dal segnale Doppler, e tiene conto della velocità di picco sistolico (PSV, Peak Systolic Velocity) e della velocità telediastolica (EDV, End-Diastolic Velocity). Viene indicato dalla formula: $MCBFV = (PSV + [EDV \times 2])/3$.

Va ricordato che la CBFV in una data arteria è inversamente proporzionale al diametro dell'arteria stessa, risultando dunque aumentato per riduzione del diametro dell'arteria (aterosclerosi, vasospasmo: determinano un incremento della MCBFV di più di 30 cm/s in un tratto di circa 5-10 mm rispetto alla MCBFV dell'arteria controlaterale). La MCBFV può essere aumentata anche in condizioni di circolazione iperdinamica. Una riduzione della MCBFV, d'altra parte, può essere suggestiva di una ridotta pressione di perfusione intracranica, di un'aumentata pressione endocranica o di morte troncoencefalica [175]. Diversi fattori influenzano la CBFV: età (si riduce con l'aumentare dell'età), sesso (donne > uomini), gravidanza (riduzione nel III trimestre), ematocrito (incrementa al ridursi di Hct), pCO_2 (aumenta con l'aumentare della pCO_2), pressione arteriosa media (aumenta con l'aumentare della MAP).

Altri parametri clinicamente significativi oltre alla MCBFV sono: (1) l'indice di pulsilità di Gosling (PI, Pulsatility Index), calcolato come $(PSV - EDV)/MCBFV$, con valori tra 0,5 e 1,19. In presenza di stenosi o occlusione prossimale il PI può essere inferiore a 0,5 a causa di una vasodilatazione arteriolare a valle. Viceversa una stenosi o occlusione distale aumenterà il PI sopra 1,19 a causa della maggiore resistenza arteriolare. Un PI inferiore a 0,5 può anche indicare una malformazione itero-venosa in cui la resistenza nei vasi prossimali è ridotta a causa del continuo

flusso venoso distale. (2) l'indice di resistività di Pourcelot (RI, Resistivity Index), calcolato come $(PSV - EDV)/PSV$. Un valore di RI superiore a 0,8 indica una maggiore resistenza a valle [175].

5.3 Maggiori applicazioni

Nella pratica clinica il TCCD presenta differenti applicazioni:

- Monitoraggio continuo di emboli (MES, Micro-Embolic Signals) in caso di placche stenotocclusive carotidee per identificare i pazienti ad elevato rischio di ictus [176].
- Studio shunt destro-sinistro nei pazienti con sospetta pervietà del frame ovale mediante l'utilizzo di un mezzo di contrasto ecografico formato da aria e soluzione fisiologica agitata in modo da formare microbolle [177].
- Studio della vasoreattività cerebrale (VMR, VasoMotor Reactivity) real-time in risposta a differenti stimoli vasomotori (ipercapnia, somministrazione di acetazolamide).
- Test supplementare nella conferma di morte cerebrale.
- Monitoraggio del vasospasmo nell'emorragia subaracnoidea

5.4 Breath Holding Index (BHI) e vasoreattività cerebrale

Il TCCD, quindi, ci consente in maniera semplice, economica e ripetibile, di studiare l'emodinamica cerebrale ed in particolare la vasoreattività cerebrale real-time durante condizioni che richiederebbero delle modificazioni adattive del CBF stesso come per esempio l'ipercapnia. Come abbiamo descritto precedentemente, l'ipercapnia in un soggetto sano è in grado di determinare, a seguito di vasodilatazione arteriolare e caduta delle resistenze, un aumento del CBF che può essere facilmente documentato con il TCCD mediante l'analisi della MFV (Mean Flow Velocity) dell'ACM [178, 179]. L'ipercapnia può essere ottenuta attraverso il metodo del "breath holding", ovvero tramite un'apnea: dopo un periodo di normoventilazione si invita il paziente a trattenere il respiro per 30 secondi. E' importante che l'apnea inizi con un normale respiro per evitare il fenomeno di Valsalva con conseguente aumento della pressione endocranica. Questo tipo di misurazione prende il nome di Breath Holding Test (BHT) e si basa sulla misurazione mediante TCCD di tre variabili: MFV di ACM in condizioni di base; MFV di ACM negli ultimi 3 secondi della manovra di apnea; durata in secondi dell'apnea (30 sec). Ottenuti questi valori è possibile calcolare il breath-holding index (BHI) secondo questa formula [177]:

$$BHI = \frac{MFV_{end} - MFV_{baseline}}{MFV_{baseline}} \times \frac{100}{\text{seconds of breath holding}}$$

dove MFV end costituisce la velocità media di flusso calcolata negli ultimi 3 secondi della manovra di apnea, MFV baseline costituisce la velocità media di flusso calcolata a riposo. Secondo questa formula l'incremento percentuale della velocità di flusso che avviene durante la manovra di breath holding per il periodo di tempo in cui il soggetto riesce a trattenere il respiro sarà indicativo della reattività vasomotoria cerebrale all'ipercapnia.

Per quanto riguarda il range di normalità del BHI, in letteratura si trovano molti studi condotti su piccoli gruppi di pazienti con aterosclerosi carotidea sintomatica ed asintomatica [180, 181]. L'unico studio presente in letteratura che si è posto lo scopo di stabilire i normali valori del BHI (calcolato sulla ACM) in soggetti sani è quello di Zavoreo et al. [182] condotto su 360 individui (180 uomini e 180 donne), suddivisi in 6 gruppi d'età per ogni sesso. Tale studio ha evidenziato una significativa riduzione della MBFV dipendente dall'età (probabilmente correlata a fisiologiche modifiche dell'invecchiamento vascolare come riduzione della pressione arteriosa e del CBF, ridotta sensibilità dei barocettori cardiaci e anche un rimodellamento vascolare), ma non nel BHI, come mostrato nella tabella sottostante, seppure con una lieve tendenza alla riduzione col progredire dell'età. Non è stata inoltre riscontrata differenza significativa di BHI tra i due sessi (Figura 3) [182].

In generale un BHI < 0,69 è indicativo di un'alterazione della vasoreattività cerebrale [177] da riduzione della riserva vasodilatatoria cerebrale.

L'utilità del BHI come stima indiretta della reattività cerebrovascolare è ormai ampiamente riconosciuta in ambito clinico: diversi studi ne hanno descritto una riduzione in pazienti con malattia di Alzheimer e demenza [183, 184], nei pazienti con emicrania [185], nei pazienti con OSAS [186], nei pazienti cirrotici con encefalopatia epatica [187], nei pazienti con stenosi sintomatica della carotide interna o occlusione asintomatica della stessa [188] e, infine, anche nei soggetti con ipertensione arteriosa [189] esprimendo in ogni caso un danneggiamento vascolare cerebrale ed una maggiore predisposizione al manifestarsi di eventi cerebrovascolari.

Ad oggi in letteratura non esistono studi che descrivano come si modifichi la vasoreattività cerebrale e dunque il BHI nei soggetti con ipertensione resistente, sebbene non possiamo escludere che in alcune coorti di studio comprendenti pazienti con diversi stadi di ipertensione ci fossero pazienti che soddisfacevano la definizione di “ipertensione resistente”. Dobbiamo inoltre precisare che nessun altro studio ha impiegato il TCCD per l’esecuzione del BHT ed il calcolo del BHI. In un nostro recente lavoro abbiamo voluto descrivere eventuali associazioni tra iperattività del SNS (valutata mediante BHI) e modificazioni della reattività cerebrovascolare (valutata mediante BHI) nei pazienti ipertesi (divisi in due sottogruppi: pazienti con ipertensione resistente e pazienti con ipertensione non resistente), confrontando i dati con il gruppo di soggetti sani aventi le medesime caratteristiche epidemiologiche e comorbidità. Da questo studio è emerso che SDANN e SDNN, i parametri HRV delle 24h che meglio rappresentano il bilancio simpato-vagale, ed il BHI risultano significativamente ridotti nei pazienti ipertesi rispetto ai soggetti sani e nei pazienti con ipertensione resistente rispetto ai pazienti con ipertensione non resistente. Questi dati sarebbero indicativi di un’alterazione del bilancio simpato-vagale da iperattivazione del SNS che si esplica in una riduzione di HRV e che comporterebbe una disregolazione della vasoreattività cerebrale con conseguente riduzione del BHI in risposta a stimoli fortemente vasoattivi quali l’ipercapnia [190].

CAPITOLO 6 - IL BILANCIO SIMPATO-VAGALE NELL'IPERTENSIONE RESISTENTE: RELAZIONE CON LA VASOREATTIVITA' CEREBRALE E CON BIOMARKERS DI REGOLAZIONE DEL TONO VASALE.

6.1 Introduzione

L'ipertensione arteriosa, come già noto, costituisce di per sé uno dei principali fattori di rischio per il verificarsi di eventi cardio e cerebrovascolari acuti. La probabilità che questi eventi si verifichino è maggiore con l'aumentare della pressione sistolica e diastolica e col mancato controllo dei valori tensivi [3]. Risulta quindi fondamentale, nell'iter diagnostico-terapeutico, ottenere un controllo pressorio ottimale al fine di prevenire l'instaurarsi di complicanze. Nel caso in cui la pressione arteriosa rimanga non controllata nonostante l'utilizzo di tre agenti antipertensivi (compreso un diuretico) al massimo dosaggio tollerato, si parla di ipertensione resistente [4]. Nonostante siano note le caratteristiche cliniche dei pazienti con ipertensione resistente rispetto ai pazienti con ipertensione non resistente (più anziani, più obesi, con maggiore durata di malattia, più frequentemente afroamericani e più frequentemente affetti da OSAS, diabete, dislipidemia, ridotta funzionalità renale, microalbuminuria, ipertrofia del ventricolo sinistro e storia di eventi cardiovascolari) [7], risultano ancora in parte sconosciuti i meccanismi fisiopatologici in grado di generare una "resistenza" alla terapia medica. Diversi studi hanno tentato di investigare tali meccanismi descrivendo una genesi multifattoriale dell'ipertensione resistente data da livelli più elevati di aldosterone (in assenza tuttavia di una condizione di iperaldosteronismo primitivo) ed espansione del volume intravascolare [8] ed un'aumentata attività del sistema nervoso simpatico [9]. Quest'ultima è stata ampiamente indagata dagli studi di Grassi et al. che, selezionando gruppi di pazienti ipertesi resistenti non affetti da altre condizioni (quali scompenso cardiaco, elevato BMI, OSA di grado moderato-severo ed insufficienza renale cronica) che potessero giustificare la presenza di un'iperattivazione adrenergica, hanno dimostrato, con metodica microneurografica al nervo peroneale, un'attività muscolare nervosa simpatica (MSNA, muscle sympathetic nerve activity) nettamente maggiore (circa il 50% in più) nei soggetti con ipertensione resistente rispetto ai soggetti con ipertensione non resistente ed ai soggetti non ipertesi. Tale dimostrazione consente di affermare con ragionevole certezza che l'iperattività del simpatico costituisce una caratteristica della "resistenza" alla terapia medica indipendentemente dalla presenza di altre comorbidità.

L'iperattività del sistema nervoso simpatico risulta probabilmente correlata ad una incapacità del riflesso barocettoriale di esplicare il suo ruolo di inibizione della stimolazione adrenergica.

Un aspetto fondamentale nella patologia ipertensiva risiede nell'incremento delle resistenze vascolari periferiche legato a cambiamenti permanenti strutturali e funzionali a livello delle arterie di grosso calibro (arterie di conduttanza) e di piccolo calibro (arterie di resistenza). Nelle arterie sane, cambiamenti umorali e meccanici locali inducono adattamenti strutturali e funzionali a livello delle varie cellule presenti nei differenti strati della parete vascolare al fine di mantenere una corretta omeostasi della pressione arteriosa. Negli stati patologici questi cambiamenti adattativi tendono a non ritornare alla condizione di base, instaurando delle alterazioni permanenti che vengono appunto definite oggi come "rimodellamento vascolare" [54]. Il rimodellamento vascolare è un processo attivo di modificazioni strutturali che coinvolge diversi tipi di pathways: crescita cellulare, apoptosi, migrazione cellulare, sintesi e degradazione di matrice extracellulare. Tali processi derivano non solo da stimoli meccanici emodinamici, ma anche da interazioni tra fattori di crescita locali, mediatori d'infiammazione, stimolazione nervosa adrenergica e sostanze vasoattive con effetto vasodilatatore o vasocostrittore.

Studi della scorsa decade condotti su ratti e umani hanno suggerito che l'attività del sistema nervoso simpatico e la funzione vascolare, entrambi fattori chiave nell'instaurarsi della patologia ipertensiva e delle patologie cardiovascolari e nella loro progressione, sono interconnesse su più livelli. In particolare, gli stessi pathways attivi nella regolazione autonoma centrale e periferica sono coinvolti anche nella regolazione della funzione vascolare, indicando che l'omeostasi vascolare è mantenuta da vie di segnale attivate sia a livello nervoso autonomo che a livello vascolare vero e proprio, conducendo ad una risposta multidistrettuale integrata [62, 63]. In particolare studi condotti su umani hanno dimostrato che markers di disfunzione vascolare sono correlati ad un'alterata stimolazione adrenergica e che la disfunzione endoteliale nelle malattie cardiovascolari è presente tanto quanto l'iperattività simpatica. Nell'ipertensione, come già accennato precedentemente facendo riferimento agli studi di Grassi et al., l'iperattivazione simpatica in un contesto di alterazione del bilancio simpato-vagale, è una caratteristica peculiare a tutti i livelli di patologia, dalle forme lievi a quelle più severe e resistenti, e si realizza sia a livello del sistema nervoso centrale, sia a livello periferico tramite una down-regulation dei recettori alfa-adrenergici, ridotta ricaptazione della noradrenalina dalle terminazioni nervose simpatiche ed alterata interazione tra adrenalina, noradrenalina, angiotensina II e peptidi attivi metabolicamente come insulina e leptina a livello della parete vasale [65].

Uno strumento molto utilizzato nella ricerca come stima indiretta del bilancio simpato-vagale in condizioni fisiologiche e patologiche è l'HRV, che valuta la variabilità degli intervalli tra due battiti cardiaci consecutivi (RR). Nei casi in cui il sistema nervoso autonomo sia normofunzionante, e quindi con un bilancio simpato-vagale equilibrato, si registreranno continue fisiologiche variazioni del ciclo sinusale (intervallo RR); nei casi in cui invece questo equilibrio venga meno a causa di un'iperattività del simpatico o di una riduzione del tono vagale o di entrambe le condizioni, si registreranno minori variazioni degli intervalli e quindi una ridotta HRV. L'HRV nei soggetti con ipertensione arteriosa è stato ampiamente studiato: è stata osservata una correlazione tra riduzione dell'HRV e severità dell'ipertensione arteriosa [147], una riduzione di HRV nei pazienti non dipper rispetto ai pazienti normotesi ed extreme dipper [148, 149] e nei pazienti con ipertrofia ventricolare sinistra [150]. Allo stesso modo studi effettuati su pazienti con ipertensione resistente hanno dimostrato un'aumentata attività del sistema nervoso simpatico (con conseguente riduzione di HRV) correlandolo, di volta in volta, con differenti parametri, per esempio: con una minore riduzione della pressione arteriosa nelle ore notturne o con la presenza di ipertrofia ventricolare sinistra [151]. Al meglio delle nostre conoscenze, nessuno studio ha mai correlato l'HRV con eventuali variazioni dell'emodinamica cerebrale nei pazienti con ipertensione resistente. L'impatto dell'ipertensione cronica sull'autoregolazione del CBF fu descritto per la prima volta da Strandgaard et al. nel 1973 in un gruppo di pazienti con ipertensione essenziale [161]. Questo studio ha mostrato che sia il limite inferiore che il limite superiore del range della curva di autoregolazione erano shiftati verso destra, dunque verso livelli pressori più elevati rispetto ai soggetti normotesi. Questo predispone più facilmente all'ipoperfusione ed al danno ischemico cerebrale. Inoltre, oltre agli effetti "dinamici" descritti finora, è stato descritto l'effetto di rimodellamento vascolare esercitato dall'ipertensione cronica sulle arterie ed arteriole cerebrali che incrementa le resistenze vascolari e causa ipoperfusione e riduzione dell'estensione del territorio "penombra" ischemica in corso di ictus [161]. Risulta quindi interessante scoprire se e come si modifica nei soggetti con ipertensione resistente l'emodinamica cerebrale ed in particolare la vasoreattività cerebrale, intesa come la capacità del circolo cerebrale di reagire, riducendo le proprie resistenze, ad uno stimolo vasodilatatorio noto. Il TCCD è una metodica che ci consente di studiare la reattività cerebrovascolare durante condizioni che richiederebbero delle modificazioni del CBF come per esempio l'ipercapnia. Come abbiamo descritto precedentemente, l'ipercapnia in un soggetto sano è in grado di determinare, a seguito di vasodilatazione arteriolare e caduta delle resistenze, un aumento del CBF che può essere facilmente documentato con il TCCD mediante l'analisi della MFV (Mean Flow Velocity) dell'ACM [178, 179]. L'ipercapnia può essere ottenuta attraverso il

metodo del “breath holding”, ovvero tramite un’apnea. Questo tipo di misurazione prende il nome di Breath Holding Test (BHT) e si basa sulla misurazione di tre variabili: MFV di ACM in condizioni di base; MFV di ACM negli ultimi 3 secondi della manovra di apnea; durata in secondi dell’apnea (30 sec). Ottenuti questi valori è possibile calcolare il breath-holding index (BHI). L’utilità del BHI come stima indiretta della reattività cerebrovascolare è ormai ampiamente riconosciuta in ambito clinico: diversi studi ne hanno descritto una riduzione in pazienti con malattia di Alzheimer e demenza [183, 184], nei pazienti con emicrania [185], nei pazienti con OSAS [186], nei pazienti cirrotici con encefalopatia epatica [187], nei pazienti con stenosi sintomatica della carotide interna o occlusione asintomatica della stessa [188] e, infine, anche nei soggetti con ipertensione arteriosa [189] esprimendo in ogni caso un danneggiamento vascolare cerebrale ed una maggiore predisposizione al manifestarsi di eventi cerebrovascolari.

In questa ampia e complessa rete di interazione tra SNS e funzione vascolare, il nostro studio si propone inoltre di esplorare i livelli di tre citochine, osteopontina (OPN), adrenomedullina (ADM) ed urotensina II (UT-II), già studiate in altre condizioni patologiche quali insufficienza renale cronica, scompenso cardiaco, cardiopatia ischemica, in un setting di iperattivazione del SNS tipica dei soggetti ipertesi, confrontandoli con soggetti sani e utilizzando tali citochine come markers indiretti di rimodellamento vascolare. L’osteopontina (OPN) è stata descritta per la prima volta nel 1985 da Franzen et al. ed è una fosfoproteina secreta da differenti tipi di cellule quali osteoblasti, linfociti, macrofagi, cellule epiteliali e VSMCs [66] che si comporta come proteina della matrice extracellulare e come citochina proinfiammatoria. Gioca un ruolo importante nella risposta ad insulti vascolari andando a stimolare la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali, la sintesi di ECM ed il processo di aterogenesi [68, 69]. Diversi studi ne hanno descritto livelli plasmatici aumentati in caso di ipertensione essenziale, aterosclerosi carotidea [72, 73], obesità e diabete mellito [67], scompenso cardiaco [74]. L’adrenomedullina (ADM) è un peptide strutturalmente simile al CGRP (Calcitonin-gene related peptide) che fu isolato e caratterizzato per la prima volta nel 1993 da tessuto umano di feocromocitoma [75]. Studi successivi hanno messo in luce la presenza di ADM anche in altri tessuti come rene, apparato gastro-intestinale e sistema nervoso centrale [76, 77]. ADM è presente inoltre nel sistema cardiovascolare dove viene sintetizzata dalle cellule endoteliali e dalle VSMCs ed è in grado di attivare pathways di proliferazione cellulare, migrazione cellulare ed interazione con fattori neuro-ormonali (peptidi natriuretici) con azione vasodilatatoria e natriuretica [76, 78, 79]. Sono stati descritti valori plasmatici aumentati di ADM in corso di scompenso cardiaco [82, 83], sepsi, insufficienza renale, ipertensione arteriosa [85, 86]. ADM è stata inoltre correlata alla presenza di aterosclerosi

indipendentemente dai valori di pressione arteriosa [88], è stata riscontrata una iperespressione del gene per ADM nei pazienti con ictus ischemico associata con la severità dell'ictus stesso [89] ed infine è stata descritta una correlazione lineare tra concentrazioni plasmatiche di ADM e severità delle lesioni cerebrovascolari [90] suggerendo un ruolo di ADM nella patogenesi delle vasculopatie cerebrali.

L'Urotensina II (UT-II) è un neuropeptide ciclico isolato per la prima volta nel 1985 a livello del sistema neurosecretorio dei pesci teleostei [91]. Isoforme di UT-II sono state isolate in diversi mammiferi (topi, cani, maiali, macachi) e nell'uomo in cui risulta espressa in diversi tessuti tra cui SNC, rene, surrene e anche nel sistema cardiovascolare e nelle placche aterosclerotiche suggerendone un ruolo nell'omeostasi del tono vasale e nelle patologie cardiovascolari. Sono stati descritti dei livelli di UT-II più elevati in soggetti con scompenso cardiaco [97, 98], diabete mellito di tipo 2 [99], rispetto ai controlli sani. I dati in letteratura in merito ai livelli di UT-II nei pazienti ipertesi sono invece contrastanti.

Considerati gli indiscutibili effetti vasoattivi di queste tre molecole descritte, risulta interessante valutare in che modo la loro concentrazione plasmatica possa correlare con le alterazioni del bilancio simpato-vagale (valutato mediante HRV) e conseguentemente con le alterazioni della vasoreattività cerebrale (valutata mediante BHI) ricercate nei soggetti con ipertensione resistente.

6.2 Scopo dello studio

Il nostro studio si propone di valutare :

- L'eventuale alterazione dei markers di attivazione autonoma (HRV e BHI) e di regolazione del tono vasale (OPN, ADM, UT-II) nei pazienti con ipertensione arteriosa rispetto ai soggetti sani.
- L'eventuale alterazione dei markers di attivazione autonoma (HRV e BHI) e di regolazione del tono vasale (OPN, ADM, UT-II) nel sottogruppo di pazienti con ipertensione resistente rispetto al sottogruppo di pazienti con ipertensione non resistente.
- L'eventuale alterazione dei parametri HRV e delle concentrazioni di OPN, ADM e UT-II all'interno del sottogruppo di pazienti con ipertensione resistente suddivisi in base alla presenza o meno di disfunzione grave dell'emodinamica cerebrale ($BHI < 0,69$).
- L'eventuale associazione tra iperattività del sistema simpatico (valutata mediante parametri HRV), modificazione della vasoreattività cerebrovascolare (valutata mediante BHI) e livelli plasmatici di OPN, ADM e UT-II nel sottogruppo di pazienti con ipertensione resistente.

6.3 Materiali e metodi

Da Novembre 2020 a Giugno 2023 è stato condotto il reclutamento dei pazienti presso la UOC di Medicina Interna con Stroke Care dell'AOUP Paolo Giaccone. Sono stati arruolati in maniera continuativa 33 pazienti con diagnosi di ipertensione in trattamento farmacologico. All'atto dell'arruolamento tutti i pazienti sono stati sottoposti ad anamnesi completa, esame obiettivo completo, esami ematochimici di routine (dosaggio di colesterolo totale, HDL, trigliceridi, glicemia a digiuno, creatinina, azoto, sodio, potassio, proteinuria, esame emocromocitometrico) ed ai seguenti esami strumentali:

- monitoraggio ECG-Holter delle 24h;
- ECD-TSA;
- TCCD in condizioni basali e durante manovra di breath-holding;
- Ecocardiogramma.

Sono stati esclusi dallo studio:

- pazienti affetti da disturbi del ritmo cardiaco;
- pazienti affetti da insufficienza respiratoria in O₂ terapia;
- pazienti affetti da scompenso cardiaco in corso di riacutizzazione;
- pazienti affetti da IRC in trattamento dialitico;
- pazienti affetti da diabete mellito;
- pazienti con ictus ischemico/emorragico acuto;
- pazienti con occlusione di carotide o stenosi carotidea subocclusiva.

In tutti i pazienti è stato inoltre effettuato prelievo ematico per dosaggio concentrazioni sieriche di OPN, ADM, UT-II. I campioni di sangue ottenuti al mattino dopo almeno dieci ore di digiuno, sono stati sottoposti a centrifugazione e i sieri ottenuti sono stati conservati mediante crioconservazione a -80°C. A Luglio 2023 è stato effettuato il dosaggio delle concentrazioni citochiniche mediante tecnica ELISA presso il laboratorio di "Biochimica clinica e Biologia Molecolare Clinica"

dell'AOUP P. Giaccone di Palermo in accordo con le istruzioni specifiche indicate dal produttore dei kit di OPN (R&D System, USA) e di ADM e UT-II (PANTEC, Torino)

Sono stati reclutati 33 pazienti ipertesi in trattamento farmacologico in totale, 19 uomini e 14 donne, con età compresa tra i 48 e gli 80 anni (età media 64 anni).

Sulla scorta della terapia farmacologica praticata ed in accordo con la definizione ESC/ESH 2018 di "ipertensione resistente", i pazienti arruolati sono stati suddivisi in due gruppi: pazienti con ipertensione non resistente (TOT 17) e pazienti con ipertensione resistente (TOT 16) indipendentemente dall'adeguato controllo della pressione arteriosa.

Sono stati inoltre reclutati 16 soggetti sani che hanno costituito il gruppo controllo.

Per l'esecuzione dell'ECG Holter delle 24 ore sono stati utilizzati degli apparecchi Sorin Spiderview Digital Holter Recorder e l'analisi dei dati raccolti effettuata tramite il programma ELA Medical SyneScope versione 3.10.

L'apparecchio veniva posizionato tra le 08.30 e le 09.30 del mattino e portato dal paziente per 24 ore. Il registratore Holter prevede il posizionamento di dieci elettrodi in regione precordiale. Durante il monitoraggio il paziente era invitato a svolgere la normale attività quotidiana evitando l'esercizio fisico intenso. Il tracciato veniva registrato in un apposita card contenuta nell'apparecchio e analizzato successivamente al computer tramite 3 canali di registrazione. L'analisi, effettuata da un singolo operatore addestrato all'uso del software, prevedeva inizialmente la distinzione tra artefatti, battiti normali e battiti ventricolari e successivamente la valutazione da parte dell'operatore degli eventi selezionati dal computer.

Per evento si intende:

- RR minimo e massimo
- FC minima e massima
- Tachicardie Sopraventricolari (TSV) ($FC > 150$ bpm)
- Tachicardie Ventricolari (TV) ($FC > 50$ bpm)
- Bradicardie ($FC < 45$ bpm)
- Pause (NN maggiore di 2500 msec)

- Battiti mancanti
- Battiti ectopici sopraventricolari (BESV) e ventricolari (BEV), singoli, in coppia e in run breve (da tre a quindici battiti)
- BESV e BEV a cadenza bigemina o trigemina
- Instabilità NN
- Accelerazione e/o rallentamento NN

L'operatore si riservava di rivalutare la restante parte della traccia, anche ove non venissero automaticamente rilevati uno o più eventi, per il corretto inquadramento degli stessi.

Il monitoraggio dell'ECG Holter è stato considerato non valido nei seguenti casi:

- Durata della registrazione < 22 ore;
- Numero di artefatti e battiti ectopici > 20 % del numero totale di battiti (in presenza di battiti ectopici, venivano esclusi dall'analisi finale sia l'intervallo NN rappresentato dalla copula che quello rappresentato dalla pausa post-extrasistolica).

Di ogni monitoraggio sono stati presi in considerazione le misure di HRV del dominio del tempo nelle ore diurne (ore 8-21), notturne (ore 23-6) e delle 24 ore. Abbiamo scelto di non prendere in considerazione le misure del dominio della frequenza perché queste ultime sono preferibili per riprodurre il bilancio simpato-vagale dei monitoraggi di breve durata poiché la minore stabilità delle modulazioni della frequenza cardiaca nelle registrazioni di lunga durata rende le misure del dominio della frequenza meno facilmente interpretabili [54]. Sono state invece preferite le misure del dominio del tempo, considerate ideali per le analisi di registrazioni di lunga durata. Sono state analizzate le seguenti misure HRV del dominio del tempo:

- Frequenza cardiaca media
- Differenza percentuale tra due intervalli NN consecutivi superiori a 50 ms (pNN50)
- Radice quadrata della media delle differenze successive di NN (RMSSD)
- Media delle deviazioni standard calcolate su un periodo di cinque minuti (ASDNN)

- Deviazione standard delle medie degli intervalli NN calcolati su un periodo di cinque minuti (SDANN).

Per l'esecuzione del TCCS è stato utilizzato un ecografo Philips I U 22 con sonda settoriale da 2-3 Mhz. Un singolo operatore esperto ha eseguito tutti gli esami. Tutti i pazienti dopo 30 minuti di riposo in posizione supina sono stati sottoposti prima a ECD-TSA (con valutazione di IMT e eventuale presenza di placche ateromasiche classificate secondo classificazione di Gray-Weale) e successivamente a TCCS. Sono stati eliminati dallo studio altresì i pazienti in cui sono state riscontrate le seguenti condizioni:

- stenosi o occlusioni a carico dei tronchi sovraortici
- stenosi o occlusioni a carico dei vasi intracerebrali

La sonda veniva posizionata a livello della finestra temporale anteriormente all'elice, tra il trago e la parete laterale dell'orbita, fino ad una buona e corretta visualizzazione del mesencefalo e delle principali arterie della base cranica. Venivano dunque campionate le velocità di flusso del tratto M1 dell'arteria cerebrale media (ACM) (profondità 4,5-7 cm), del tratto A1 dell'arteria cerebrale anteriore (ACA) (profondità 6-8 cm) e tratto P1 dell'arteria cerebrale posteriore (ACP) (profondità 6-8,5 cm); ed a livello della finestra occipitale fino ad una corretta visualizzazione del forame magno per il campionamento corretto delle velocità di flusso del tratto V4 delle arterie vertebrali (AV) e dell'arteria basilare (AB) (profondità 8,5-11 cm). Durante l'insonazione dei suddetti vasi sono stati registrati i seguenti parametri:

- Velocità di picco sistolico (VPS)
- Velocità di fine diastole (EDV)
- Velocità media (Vm)
- Indice di pulsatilità (IP): calcolato secondo la seguente formula: $VPS - EDV/Vm$
- Indice di resistenza (IR) calcolato secondo la seguente formula: $VPS - EDV/VPS$

La finestra temporale veniva considerata insufficiente se non era possibile visualizzare correttamente il mesencefalo e se non era possibile distinguere chiaramente il tratto M1 dell'ACM.

Per la valutazione dell'autoregolazione cerebrale è stato utilizzato il breath holding test (BHT) mediante insonazione dell'ACM meglio visualizzata per almeno un minuto. In seguito veniva

chiesto al paziente di trattenere il respiro senza effettuare manovra di Valsalva per 30 secondi durante insonazione della suddetta arteria. Il BHI veniva calcolato come percentuale di incremento della Vm occorso durante l'apnea diviso per il tempo in cui il paziente era in grado di trattenere il respiro espresso in secondi, secondo la formula: $[(V_m \text{ max} - V_m)/V_m] \times 100/\text{sec}$ in accordo con la descrizione della metodica secondo Harrison e Markus [179].

6.4 Analisi statistica

Tutte le variabili discrete e continue sono state riportate in termini di frequenze (%) e medie ($\pm$ DS). Le differenze nelle frequenze sono state analizzate mediante l'impiego dell'analisi univariata della varianza (ANOVA) per le variabili continue e la post hoc analisi per i confronti intragruppo. Le analisi di frequenza sono stati eseguiti mediante il test del chi-quadro di Pearson per confrontare le variabili categoriche. L'analisi dei dati è stata condotta mediante l'utilizzo del software IBM SPSS versione 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, III, US). Tutti i valori con $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

6.5 Risultati

Le caratteristiche demografiche, cliniche ed ecografiche dei pazienti arruolati sono riassunte nella Tabella 2.

Il gruppo degli ipertesi, rispetto al gruppo di controllo di soggetti sani, ha presentato più frequentemente complicanze d'organo quali scompenso cardiaco, insufficienza renale, aterosclerosi, ipertrofia ventricolare sinistra ed alterato rilasciamento diastolico.

Nel gruppo dei pazienti ipertesi, il 39% (N=13) ha presentato una deregolazione grave dell'emodinamica cerebrale testimoniata da valori di BHI $< 0,69$.

6.5.1 Confronto tra soggetti sani e soggetti ipertesi

I valori medi del BHI e dei parametri HRV calcolati nel dominio del tempo (SDNN e SDANN) hanno mostrato differenze statisticamente significative nel confronto dei gruppi tra soggetti sani e soggetti ipertesi (BHI soggetti sani $1,33 \pm 0,27$ VS BHI soggetti ipertesi $0,78 \pm 0,32$; $p = 0,000$; SDNN soggetti sani $118,67 \pm 26,9$ VS SDNN soggetti ipertesi $90,64 \pm 27,21$; $p = 0,0001$; SDANN

soggetti sani $110,91 \pm 27,7$ VS SDANN soggetti ipertesi $70,54 \pm 22,31$; $p 0,0000$) come riportato nella Tabella 3.

Differenze statisticamente significative sono emerse anche per alcuni parametri ecocardiografici ovvero valori medi del volume atriale sinistro, indice di volume atrio sinistro e l'indice di massa ventricolare sinistra nel confronto dei gruppi tra soggetti sani e soggetti ipertesi (Left Atrial volume soggetti sani $46,43 \pm 10,78$ VS Left atrial volume soggetti ipertesi $55,64 \pm 10,12$; $p 0,005$; Left atrial volume index soggetti sani $26,55 \pm 4,60$ VS Left atrial volume index soggetti ipertesi $31,53 \pm 6,80$; $p 0,011$; Left ventricular mass index soggetti sani $82,31 \pm 19,52$ VS Left ventricular mass index soggetti ipertesi $107,03 \pm 26,82$; $p 0,002$).

Non sono emerse invece differenze statisticamente significative per quanto riguarda i valori medi delle concentrazioni plasmatiche di OPN, ADM e UT-II nel confronto tra soggetti sani e soggetti ipertesi (Tabella 4).

6.5.2 Confronto tra ipertesi resistenti ed ipertesi non resistenti

Gli ipertesi sono stati ulteriormente suddivisi in due sottogruppi: pazienti con ipertensione non resistente (NRH - Non Resistent Hypertension) ($N=17$; 52%) e pazienti con ipertensione resistente (RH - Resistent Hypertension) ($N=16$; 48%). Nel confronto tra questi due sottogruppi i valori medi del BHI (BHI ipertesi non resistenti $0,91 \pm 0,27$ VS BHI ipertesi resistenti $0,64 \pm 0,30$; $p 0,011$) hanno mostrato differenze statisticamente significative, al contrario invece dei parametri HRV calcolati nel dominio del tempo (SDNN e SDANN) (Tabella 5).

Per quanto riguarda i valori medi delle citochine prese in esame, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due sottogruppi (Tabella 6).

6.5.3 Confronto tra $BHI < 0,69$ e $BHI > 0,69$

Considerando invece la gravità della disfunzione della vasoreattività cerebrale e suddividendo i pazienti ipertesi in base a $BHI < 0,69$ o $BHI > 0,69$, non sono emerse differenze statisticamente significative nel confronto dei parametri HRV come riportato nella Tabella 7 (SDNN no disfunzione grave $91,29 \pm 28,79$; SDNN disfunzione grave $89,65 \pm 25,70$; $p 0,869$; SDANN no disfunzione grave $73,53 \pm 23,36$ VS SDANN disfunzione grave $65,94 \pm 20,64$; $p 0,348$; PNN50% no disfunzione grave $12,40 \pm 18,54$ VS PNN50% disfunzione grave $17,46 \pm 18,53$; $p 0,449$; ASDNN no disfunzione grave $49 \pm$

24,76 VS ASDNN disfunzione grave $60,41 \pm 25,61$; $p\ 0,211$; RMSSD no disfunzione grave $41,15 \pm 38,41$ VS RMSSD disfunzione grave $60,79 \pm 43,86$; $p\ 0,185$).

Per quanto riguarda le concentrazioni plasmatiche delle citochine nel confronto tra i due sottogruppi, è emersa una differenza statisticamente significativa soltanto per UT-II (UT-II disfunzione grave $247,19 \pm 37,43$ VS UT-II no disfunzione grave $219,82 \pm 36,9$; $p\ 0,047$) come riportato in Tabella 8.

6.5.4 Correlazione tra parametri HRV e caratteristiche cliniche nel gruppo RH

Nel valutare l'eventuale correlazione tra parametri HRV e caratteristiche cliniche dei pazienti **ipertesi resistenti** (BPCO, cardiopatia ischemica cronica, scompenso cardiaco, pregresso ictus, insufficienza renale, aterosclerosi) è stata riscontrata una significatività statistica esclusivamente nella correlazione inversa tra SDANN e cardiopatia ischemica ($p\ 0,032$; $R\ -0,536$) (Tabella 9).

6.5.5 Correlazione tra dosaggi plasmatici citochine e caratteristiche cliniche nel gruppo RH

Nel valutare l'eventuale correlazione tra dosaggi plasmatici delle citochine e caratteristiche cliniche suddette dei pazienti **ipertesi resistenti**, è stata riscontrata una significatività statistica nella correlazione tra UT-II e scompenso cardiaco ($p\ 0,021$; $R\ 0,570$) e nella correlazione inversa tra ADM e presenza di aterosclerosi ($p\ 0,002$; $R\ -0,717$) (Tabella 10).

6.5.6 Correlazione tra parametri HRV, BHI e dosaggi plasmatici citochine nel gruppo RH

Infine abbiamo voluto correlare i parametri HRV ed il BHI con i dosaggi plasmatici delle citochine nei pazienti con ipertensione resistente. Da questo confronto sono emerse correlazioni statisticamente significative tra ADM e BHI ($p\ 0,027$; $R\ 0,551$); tra UT-II e ASDNN ($p\ 0,003$; $R\ 0,694$); correlazione inversa tra UTII e PNN50 ($p\ 0,038$; $R\ 0,523$); (Tabella 11).

6.6 Discussione

6.6.1 Confronto tra soggetti sani e soggetti ipertesi

Il presente studio ha mostrato come SDANN e SDNN, ovvero i parametri HRV delle 24 ore che meglio rappresentano il bilancio simpato-vagale nella sua totalità, si sono presentati ridotti nei pazienti ipertesi rispetto ai soggetti non ipertesi (tabella 3). Questi dati, in accordo con la letteratura [148-150], sarebbero indicativi di un'alterazione del bilancio simpatovagale da iperattivazione del sistema nervoso simpatico che si esplica in una riduzione dell'HRV. Anche il BHI si è presentato ridotto nei pazienti ipertesi rispetto ai non ipertesi (tabella 3), evidenziando come in questi pazienti sia presente una deregolazione della vasoreattività cerebrale in risposta a stimoli fortemente vasoattivi quali l'ipercapnia nell'esecuzione del BHT. Quest'ultimo dato può essere spiegato facendo riferimento allo spostamento verso destra della curva di autoregolazione dell'emodinamica cerebrale nei soggetti cronicamente ipertesi che riescono a mantenere un CBF costante a pressioni maggiori rispetto ai soggetti non ipertesi: sebbene lo spostamento verso destra del limite superiore del range verso livelli pressori più alti risulti protettivo nei confronti del parenchima cerebrale in caso di ipertensione cronica (limitando quindi il danno da ipertensione nei confronti della microcircolazione a valle), lo spostamento verso destra del limite inferiore del range risulta invece essere dannoso durante una riduzione acuta della pressione di perfusione (secondaria a vasodilatazione) in cui l'abilità di mantenere costante l'autoregolazione del CBF è ridotta. Questo meccanismo aumenta quindi la suscettibilità al danno ischemico [188].

6.6.2 Confronto tra ipertesi resistenti (RH) ed ipertesi non resistenti (NRH)

Nel confronto tra il gruppo RH e NRH, il BHI ha mostrato una significativa riduzione dei valori nei pazienti RH e, sebbene non in maniera statisticamente significativa, si è registrata anche una tendenza alla riduzione di SDNN e SDANN nel gruppo RH rispetto al gruppo NRH (Tabella 5). La significatività statistica in merito a questi due parametri potrebbe non essere stata raggiunta a causa dell'esiguo campione preso in esame. Questi risultati lascerebbero presupporre che alla base della deregolazione della risposta vasomotoria reattiva cerebrale presente negli RH (testimoniata da una riduzione di BHI significativa rispetto ai NRH), ci sarebbe un'iperattività del SNS data la tendenza alla riduzione di SDNN e SDANN. In ogni caso la riduzione isolata del BHI e quindi il peggioramento della vasoreattività cerebrale nei pazienti RH potrebbe essere attribuibile anche a modifiche anatomiche delle arteriole cerebrali date dal rimodellamento ipertrofico vascolare con conseguente "arterial stiffness" e dalla disfunzione della vasodilatazione endotelio-mediata

determinati dall'ipertensione stessa [191]. A favore di queste ipotesi, in letteratura è presente uno studio trasversale condotto su pazienti sani e pazienti ipertesi classificati in base al grado di ipertensione ed al numero di farmaci antipertensivi praticati, che dimostra come il BHI e l'arterial stiffness peggiorino con l'aumentare della severità dell'ipertensione in particolare nel sottogruppo che praticava almeno 3 farmaci per l'ipertensione e dunque il sottogruppo che potremmo definire come RH [192]. Inoltre è stato dimostrato che la vasoreattività cerebrale in risposta a stimoli vasoattivi quali l'ipercapnia è alterata in pazienti con disfunzione endoteliale rispetto a soggetti sani [193], verosimilmente per la presenza maggiore di ROS e tendenza alla vasocostrizione. L'alterata vasoreattività cerebrale studiata mediante BHI è considerata un fattore predittivo più affidabile della % di stenosi carotidea per il verificarsi di eventi ischemici cerebrali nei pazienti con stenosi carotidea monolaterale emodinamicamente significativa ma asintomatica [194], è stata inoltre correlata col rischio di mortalità per cause cardiovascolari (scompenso cardiaco, arresto cardiaco, morte improvvisa e infarto del miocardio) indipendenti dall'ictus nel Rotterdam Study, suggerendo che l'alterazione della vasoreattività cerebrale possa essere indice di danno vascolare a diversi livelli [195].

Nel confronto tra controlli sani e pazienti ipertesi (Tabella 4) e nel confronto tra pazienti NRH e pazienti RH (Tabella 6), non sono invece emerse differenze statisticamente significative per i dosaggi plasmatici di OPN, ADM e UT-II, sebbene vi sia una tendenza a riscontrare valori medi aumentati nei pazienti ipertesi rispetto ai non ipertesi, in accordo coi dati già presenti in letteratura [72, 85, 86, 100]. Anche in questo caso la mancata significatività statistica è verosimilmente attribuibile all'esiguo campione preso in esame.

6.6.3 Confronto tra $BHI < 0,69$ e $BHI > 0,69$

Abbiamo inoltre voluto confrontare, all'interno della popolazione di ipertesi, i valori dei parametri HRV e i valori medi di OPN, ADM e UT-II in due sottogruppi a seconda della presenza o meno di deregolazione "grave" della vasoreattività cerebrale se $BHI < 0,69$ [177]. Questo confronto deriva dalla necessità di comprendere meglio la funzione vascolare generale data da interazione tra SNS e citochine di regolazione del tono vasale nei pazienti con severa alterazione della vasoreattività cerebrale e quindi maggiormente predisposti ad eventi cerebrovascolari. Tuttavia non sono emerse differenze statisticamente significative per i singoli parametri HRV (SDNN, SDANN, PNN50 e RMSSD) (Tabella 7) e per i valori medi di OPN e ADM tra i due sottogruppi (Tabella 8), probabilmente a causa dell'esiguo campione considerato. UT-II è risultata invece significativamente

aumentata nei pazienti con $BHI < 0,69$ ovvero con deregolazione grave della vasoreattività cerebrale (Tabella 8). Stando agli effetti pleiotropici di UT-II nei vari distretti vascolari, posto che non è noto l'effetto di UT-II sulla vasoreattività cerebrale e assumendo che la disfunzione endoteliale sia un elemento chiave dell'ipertensione, risulta difficile attribuire un significato univoco al dato emerso dal nostro studio. L'unico studio presente in letteratura che correli UT-II con il concetto di "reattività vascolare", sebbene non in riferimento a quella cerebrale, è uno studio condotto su ratti in cui è stata valutata la risposta vascolare ad un sovraccarico di volume ottenuto mediante creazione di fistola aorta-cavale, simulando uno scompenso cardiaco congestizio [196]. Una delle evidenze emerse da questo studio è che il sovraccarico di volume altera la reattività vascolare e porta ad un'up-regolazione della produzione di UT-II, al fine di mantenere costante la pressione sanguigna. In quest'ottica potremmo supporre che, nel caso di una deregolazione grave della vasoreattività cerebrale, UT-II possa rientrare nei meccanismi di compenso con effetto vasomodulatore per mantenere costante il CBF. Come già accennato in precedenza, UT-II risulta avere un ruolo controverso nei pazienti con ipertensione arteriosa. Le differenti risposte vasomotorie legate a UT-II potrebbero essere determinate da funzionalità endoteliale differente in vivo. Lim et al, per esempio, hanno dimostrato come la somministrazione tramite iontoforesi di UT-II nei microvasi dell'avambraccio causi un effetto vasodilatatore con incremento del flusso ematico nei soggetti sani mentre, in pazienti con scompenso cardiaco, causi vasocostrizione con conseguente riduzione del flusso ematico verosimilmente correlata alla disfunzione endoteliale riscontrabile nei pazienti con scompenso cardiaco con minore produzione di NO [197]. Uno studio simile è stato condotto su pazienti sani confrontati con pazienti ipertesi in cui veniva descritta una risposta vasocostrittoria cutanea anche questa attribuibile a disfunzione endoteliale [198]. Nel nostro studio, quindi, i pazienti con $BHI < 0,69$ e con disfunzione endoteliale più severa rispetto all'altro sottogruppo, presenterebbero una tendenza alla vasocostrizione di cui UT-II potrebbe essere responsabile. Un'altra chiave di lettura degli aumentati livelli di UT-II nei pazienti con $BHI < 0,69$ potrebbe essere data dalla correlazione di UT-II con i processi di aterosclerosi: è noto come i livelli di UT-II siano correlati con la presenza e la progressione di aterosclerosi carotidea [199], che siano significativamente aumentati nei pazienti con aterosclerosi coronarica [200] ed aortica [201], e che l'espressione di UT-II e del suo recettore sia aumentata in differenti tipi di cellule coinvolte nelle lesioni arteriosclerotiche instabili e stabili, con una espressione maggiore nelle prime, suggerendo una up-regulation della sintesi di UT-II da parte di citochine proinfiammatorie [199]. L'incremento dei valori di UT-II si inquadrirebbe quindi in un setting pro-infiammatorio dei

pazienti con disfunzione grave della vasoreattività cerebrale che correlerebbe con l'inizio e la progressione del processo di aterosclerosi.

6.6.4 Correlazione tra parametri HRV e caratteristiche cliniche nel gruppo RH

Nel sottogruppo RH è emersa una tendenza alla riduzione dei valori di SDANN nei pazienti che presentassero anche una cardiopatia ischemica cronica (p 0,032; R -0,536) (Tabella 9). La correlazione inversa tra queste due variabili è stata già descritta in diverse condizioni patologiche: Liu et al. hanno riscontrato una tendenza alla riduzione di SDANN con l'aumentare del Gensini score (score per quantificare la stenosi determinata da lesioni arteriosclerotiche indagate mediante angiografia) nei pazienti con coronaropatia e diabete mellito di tipo 2 [202]; Longenecker et al. hanno anch'essi descritto una correlazione inversa tra SDANN e ASCD (atherosclerotic cardiovascular disease) questa volta in pazienti in emodialisi [203]. In letteratura non esistono studi che correlino specificamente HRV con la cardiopatia ischemica nei pazienti RH, essendo questa una particolare sottopopolazione di pazienti, ma possiamo ragionevolmente supporre che negli RH che presentino anche una cardiopatia ischemica, l'alterazione del bilancio simpato-vagale sia più marcata a causa di un'iperattivazione del sistema nervoso simpatico caratteristica di entrambe le condizioni.

6.6.5 Correlazione tra dosaggi plasmatici delle citochine e caratteristiche cliniche nel gruppo RH

In merito al dosaggio delle concentrazioni plasmatiche delle citochine abbiamo riscontrato un incremento di UT-II negli RH che presentassero anche uno scompenso cardiaco (p 0,021; R 0,570) (Tabella 10). L'evidenza di un'associazione tra valori di UT-II e scompenso cardiaco è già presente in letteratura. Studi in vivo ed in vitro hanno dimostrato che UT-II presenta un ruolo nel rimodellamento cardiaco; questi studi si sono basati sulla somministrazione di UT-II esogena in animali per osservare cambiamenti nella struttura e funzionalità cardiaca o vascolare: Tzanidis et al. hanno descritto una risposta profibrogenica, con aumentata espressione di fibronectina e collagene, in colture di fibroblasti cardiaci murini stimolati da UT-II [204]; Zhang et al. hanno invece dimostrato un maggiore incremento del peso cardiaco legato a ipertrofia miocardica nei ratti trattati

con infusione di UT-II e isoprotenerolo rispetto a quelli trattati soltanto con isoprotenerolo [205]. Nell'uomo la prima osservazione clinica che ha correlato UT-II con lo scompenso cardiaco risale agli studi di Douglas et al. [206] che hanno mostrato elevati livelli di espressione di UT-II nei cardiomiociti, nelle VSMCs e nelle cellule endoteliali di pazienti con scompenso cardiaco congestizio rispetto a soggetti controllo. Negli anni successivi anche altri studi condotti sull'uomo hanno confermato questa correlazione [207-209]. Anche in questo caso non esistono studi in letteratura che prendano in considerazione i livelli plasmatici di UT-II negli ipertesi resistenti affetti anche da scompenso cardiaco, ma poiché ipertensione e scompenso cardiaco condividono gran parte dei meccanismi patogenetici e di compenso, l'incremento dei valori di UT-II in questo setting di pazienti è certamente un risultato atteso.

I pazienti con ipertensione resistente ed aterosclerosi, invece, sembrerebbero avere una concentrazione ridotta di ADM (p 0,002; R -0,717) (Tabella 10). Questo dato sembrerebbe in contrasto con quanto già presente in letteratura dove sono invece riportati livelli plasmatici elevati di ADM nei pazienti con aterosclerosi. Uno studio trasversale svedese coinvolgente circa 4924 pazienti di cui 3169 ipertesi ha descritto una correlazione positiva tra ADM e presenza di aterosclerosi carotidea ipotizzando un ruolo di ADM nei meccanismi di compenso della patologia cardiovascolare [210]. Un altro studio trasversale che ha confrontato i livelli di ADM di pazienti con aterosclerosi ed ictus ischemico pregresso con i livelli di tale citochina di pazienti con aterosclerosi ma senza malattia cerebrovascolare, ha descritto dei livelli di ADM più elevati nei pazienti che avessero avuto anche l'evento cerebrovascolare [211]. Nessuno studio tuttavia ha mai descritto il comportamento di ADM nei pazienti con ipertensione resistente. Dobbiamo quindi supporre che, tra gli effetti pleiotropici di ADM, ve ne sia qualcuno interconnesso con la patogenesi della "resistenza" nei pazienti ipertesi tale da giustificare una riduzione dei livelli plasmatici in questo setting di pazienti.

6.6.6 Correlazione tra parametri HRV, BHI e dosaggi plasmatici delle citochine nel gruppo RH

Negli ipertesi resistenti è emersa una correlazione diretta tra ADM e BHI (p 0,027; R 0,551) (Tabella 11). Questo dato risulta interessante poiché potrebbe indicare che aumenti della concentrazione plasmatica di ADM siano direttamente correlati con incrementi della vasoreattività cerebrale misurata tramite BHI. ADM ha un potente effetto vasodilatatore sull'emodinamica

cerebrale, lo hanno dimostrato studi condotti su cani [212], ratti [213] e umani [214]. L'effetto vasoattivo di ADM, come già accennato precedentemente, si esplica attraverso il recettore RAMP (Receptor activity-modifying proteins), espresso sulle VSMCs, che risulta accoppiato all'enzima Adenilato Ciclasi e determina accumulo intracellulare di cAMP, con conseguente fosforilazione e dunque attivazione di eNOS ed effetto finale di rilascio di NO e vasodilatazione [78]. Studi animali hanno dimostrato come livelli plasmatici elevati di ADM siano in grado di aumentare il flusso ematico renale nei cani [215] e, a livello cerebrale, anche nei ratti [216]. Questi dati lascerebbero presupporre che ADM possa svolgere un ruolo importante anche nella fisiologia e nella patologia cerebrovascolare dell'uomo [217]. Spunti di riflessione interessanti vengono dagli studi delle concentrazioni plasmatiche di ADM nei pazienti con emorragia subaracnoidea (Subarachnoid Hemorrhage, SAH): i livelli di ADM erano aumentati nei pazienti con SAH [218, 219] e incrementavano nei pazienti con vasospasmo. Proprio questo ultimo dato ha portato a pensare che l'incremento dei livelli di ADM sia una conseguenza dell'iperattività simpatica che si realizza dopo SAH, come meccanismo di compenso [220]. In merito al nostro riscontro, quindi, la correlazione diretta tra ADM e BHI negli ipertesi resistenti potrebbe essere spiegata facendo riferimento all'iperattivazione del sistema simpatico che abbiamo visto essere uno dei meccanismi alla base dell'ipertensione resistente: l'overdrive del SNS porterebbe ad una maggiore produzione di ADM che, con il suo effetto vasodilatatorio, garantirebbe il mantenimento di una corretta vasoreattività cerebrale e quindi correlerebbe con il BHI.

Altri dati interessanti emersi dalla nostra analisi sono la correlazione inversa tra UT-II e PNN50 (p 0,038; R -0,523) e la correlazione diretta tra UT-II e ASDNN (p 0,003; R 0,694) (Tabella 11). Entrambi questi dati potrebbero essere indicativi del fatto che livelli plasmatici aumentati di UT-II correlerebbero con un'alterazione del bilancio simpato-vagale della regolazione cardiovascolare data da un'alterata attività del parasimpatico. Come già discusso precedentemente, UT-II gioca certamente un ruolo nella regolazione cardiovascolare sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche. Non sono presenti studi specifici in letteratura che abbiano valutato le modificazioni della frequenza cardiaca in termini di HRV secondarie a variazioni dei livelli plasmatici di UT-II, inoltre gli studi degli effetti di tale molecola sono stati eseguiti soltanto su modelli animali. E' stato riportato un incremento significativo della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca a seguito di infusione intratecale di UT-II sia in ratti spontaneamente ipertesi (Spontaneously Hypertensive Rats, SHR) confrontati con ratti normotesi Wistar-Kyoto (Wistar Kyoto Rats, WKY) [221], sia in ratti coscienti non ipertesi [222]. In entrambi i casi tale risposta

cronotropa positiva sarebbe da correlare ad un'aumentata attività del sistema nervoso simpatico. Possiamo supporre che nell'uomo vengano coinvolti gli stessi meccanismi e che, in un contesto di alterazione del bilancio simpato-vagale caratteristico dell'ipertensione resistente, UT-II possa influenzare la funzione cardiovascolare modificando l'HRV.

6.7 Limiti dello studio

Questo studio trasversale ha certamente dei limiti. Il limite principale consiste nell'esiguità del campione preso in esame e nell'assenza di una visione prospettica. Tuttavia in questo studio abbiamo deciso di utilizzare criteri di esclusione molto restrittivi al fine di ottenere un campione omogeneo ed escludere pazienti con condizioni predisponenti a neuropatia autonoma (es. diabete mellito) o pazienti con aritmie cardiache che avrebbero potuto alterare i parametri HRV, pazienti con condizioni predisponenti ad alterazioni dell'emodinamica cerebrale (es. stenosi completa o sub-totale della carotide interna o di vasi intracranici, eventi cerebrovascolari acuti, scompenso cardiaco acuto, insufficienza renale cronica in corso di emodialisi) e pazienti che non avrebbero potuto performare la manovra di breath holding (es. insufficienza respiratoria). Inoltre, poiché abbiamo scelto di eseguire uno studio trasversale, le eventuali associazioni riscontrate non possono implicare un concetto di "causalità". Un'altra possibile limitazione sta nel fatto che la misurazione di HRV, BHI, OPN, ADM e UT-II è stata eseguita nei pazienti ipertesi presi in esame in corso di trattamento farmacologico, ma abbiamo scelto questo approccio primariamente per ragioni etiche.

6.8 Conclusioni

Quanto emerge dal nostro studio è che l'attività del sistema nervoso autonomo e la regolazione della funzione vascolare, entrambi fattori chiave nell'instaurarsi della patologia cardio e cerebrovascolare e nella loro progressione, sono estremamente interconnesse tra loro su più livelli e spesso con interazioni non del tutto chiarite. Il nostro studio si è proposto di descrivere il comportamento del bilancio simpato-vagale ed i valori plasmatici di tre citochine vasoattive (OPN, ADM, UT-II) negli ipertesi resistenti, esplorandone eventuali correlazioni e provando a stilare una più accurata profilazione autonoma e citochinica di questi pazienti che presentano un rischio maggiore di eventi cardio e cerebrovascolari [5; 6]. Abbiamo quindi dimostrato una maggiore alterazione del bilancio simpato-vagale negli ipertesi rispetto ai controlli non ipertesi, testimoniata

da un'alterazione della vasoreattività cerebrale (riduzione di BHI) e da riduzione della HRV (riduzione di SDNN e SDANN); una peggiore vasoreattività cerebrale (riduzione di BHI) negli ipertesi resistenti rispetto agli ipertesi non resistenti; valori significativamente aumentati di UT-II nei pazienti con deregolazione grave dell'emodinamica cerebrale ($BHI < 0,69$). Infine abbiamo dimostrato che la vasoreattività cerebrale dei pazienti ipertesi resistenti correla in maniera lineare con i livelli plasmatici di ADM.

Da queste evidenze tuttavia scaturiscono diversi interrogativi: perché gli ipertesi resistenti presentano una maggiore attività del sistema nervoso simpatico rispetto agli ipertesi non resistenti? Le citochine vasoattive da noi esplorate influenzano la “resistenza” alla terapia medica? UT-II e ADM potrebbero avere delle applicazioni terapeutiche negli ipertesi resistenti che presentino una spiccata alterazione della vasoreattività cerebrale? Questi quesiti rimangono ad oggi senza risposta e sicuramente meritevoli di ulteriori approfondimenti.

Diversi studi presenti in letteratura hanno già tentato di indagare questo complesso cross-talking tra sistema nervoso simpatico e pool citochinico per la regolazione della funzione vascolare: alcuni hanno dimostrato che l'omeostasi vascolare è mantenuta da vie di segnale attivate sia a livello nervoso autonomico che a livello vascolare vero e proprio, conducendo ad una risposta multidistrettuale integrata [nn, oo], altri hanno invece parlato di “riflesso infiammatorio” attribuendo al sistema nervoso autonomo un ruolo nella modulazione della sintesi e rilascio di citochine pro-infiammatorie con effetti sulla funzione vascolare [223]. Al meglio delle nostre conoscenze, questo è il primo studio che si propone di indagare questa complessa interazione tra SNS e milieu citochinico per la regolazione della funzione vascolare e, in particolare, per la regolazione della vasoreattività cerebrale nei soggetti ipertesi resistenti e non resistenti a terapia farmacologica.

ICONOGRAFIA E TABELLE

Figura 1. Curva trifasica dell'autoregolazione del CBF [153]

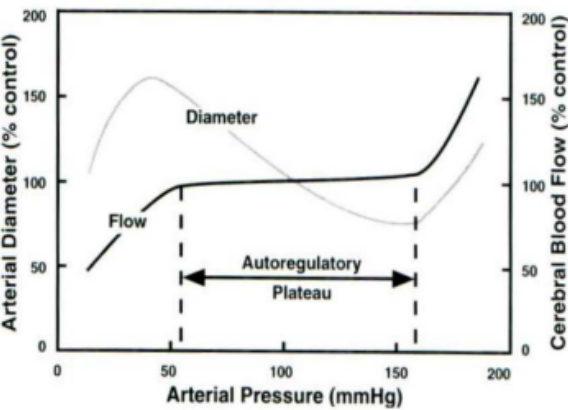


Figura 2. Shift verso destra della curva trifasica di autoregolazione del CBF negli ipertesi [153]

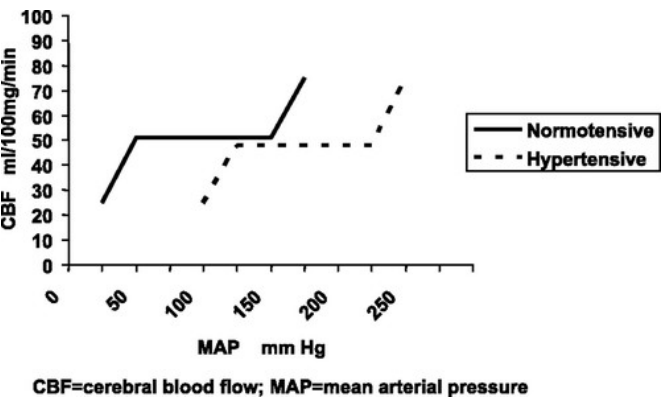


Figura 3. Variazioni del BHI per età e sesso [182]

Age group (yrs)	Pooled value	Male	Female
20-29	1.46 ± 0.35	1.46 ± 0.34	1.45 ± 0.29
30-39	1.41 ± 0.25	1.44 ± 0.29	1.43 ± 0.25
40-49	1.32 ± 0.29	1.32 ± 0.31	1.32 ± 0.29
50-59	1.31 ± 0.32	1.31 ± 0.30	1.31 ± 0.32
60-69	1.29 ± 0.31	1.28 ± 0.22	1.27 ± 0.21
>70	1.13 ± 0.33	1.15 ± 0.35	1.13 ± 0.32

Tabella 1. Significato delle principali variabili HRV del dominio del tempo

PARAMETRI	DEFINIZIONE	SIGNIFICATO
SDNN (ms)	Deviazione standard	HRV totale
SDANN (ms)	Deviazione standard delle medie degli intervalli NN calcolati in un periodo di 5 minuti	Bilancio simpato-vagale nel lungo periodo
ASDNN (ms)	Media delle deviazioni standard calcolate su un periodo di 5 minuti.	Bilancio simpato-vagale nel lungo periodo
PNN50 (%)	Percentuale di intervalli NN successivi che differiscono per più di 50 msec.	Attività parasimpatica
RMSSD (ms)	Radice quadrata della media delle differenze di NN successive	Attività parasimpatica

Tabella 2. Caratteristiche generali dei pazienti arruolati

	CONTROLLI SANI (TOT 16)		SOGGETTI IPERTESI (TOT 33)	
ETÀ (media ± DS)	62,56 ± 12,53		66,45 ± 7,77	
	N	%	N	%
SESSO	M 9	56%	M 19	58%
	F 7	44%	F 14	42%
BPCO	5	31%	7	21%
CARDIOPATIA ISCHEMICA CRONICA	0	0	14	42%
SCOMPENSO CARDIACO	0	0	8	24%
PREGRESSO ICTUS	2	12,5%	4	12%
INSUFFICIENZA RENALE	0	0	19	57%
EPATOPATIA	0	0	0	0
ATEROSCLEROSI	3	19%	25	75%
STENOSI EMODINAMICAMENTE SIGNIFICATIVE DI ICA	0	0	0	0
BHI < 0,69	0	0	13	39%
IPERTROFIA VENTRICOLARE SINISTRA	2	12,5%	16	48,5%
ALTERATO RILASCIAMENTO DIASTOLICO	5	31%	17	51,5%

Tabella 3. Confronto della media di BHI, SDNN e SDANN tra soggetti sani e soggetti ipertesi (media $\pm$ DS)

	SOGGETTI SANI (TOT 16)	SOGGETTI IPERTESI (TOT 33)	p
BHI	1,33 $\pm$ 0,27	0,78 $\pm$ 0,32	0,0001
SDNN ms	118,67 $\pm$ 26,9	90,64 $\pm$ 27,21	0,001
SDANN ms	110,91 $\pm$ 27,7	70,54 $\pm$ 22,31	0,0001
PNN50%	7,64 $\pm$ 7,94	14,39 $\pm$ 18,41	0,168
ASDNN ms	53,35 $\pm$ 18,52	53,49 $\pm$ 25,34	0,984
RMSSD ms	34,95 $\pm$ 25,86	48,89 $\pm$ 41,14	0,222

Tabella 4. Confronto della media delle concentrazioni plasmatiche di OPN, ADM e UT-II tra soggetti sani e soggetti ipertesi (media $\pm$ DS)

	SOGGETTI SANI (TOT 16)	SOGGETTI IPERTESI (TOT 33)	p
OPN (ng/mL)	86,80 $\pm$ 69,75	87,65 $\pm$ 69,20	0,968
ADM (pg/mL)	18,85 $\pm$ 17,09	40,83 $\pm$ 99,38	0,387
UT-II (pg/mL)	224,91 $\pm$ 59,52	230,60 $\pm$ 38,98	0,690

Tabella 5. Confronto della media di BHI e parametri HRV tra pazienti con NRH e pazienti con RH (media $\pm$ DS)

	NRH (TOT 17)	RH (TOT 16)	p
BHI	0,91 $\pm$ 0,27	0,64 $\pm$ 0,30	0,011
SDNN ms	92,07 $\pm$ 32,24	89,13 $\pm$ 21,59	0,762
SDANN ms	73,72 $\pm$ 26,46	67,16 $\pm$ 17,09	0,407
PNN50%	13,30 $\pm$ 19,92	15,55 $\pm$ 17,24	0,732
ASDNN ms	51,09 $\pm$ 25,97	56,05 $\pm$ 25,24	0,582
RMSSD ms	43,39 $\pm$ 41,22	54,73 $\pm$ 41,57	0,437

Tabella 6. Confronto della media delle concentrazioni plasmatiche di OPN, ADM e UT-II tra pazienti con ipertensione non resistente e pazienti con ipertensione resistente (media $\pm$ DS)

	NRH (TOT 17)	RH (TOT 16)	p
OPN (ng/mL)	69,93 $\pm$ 39,06	39,06 $\pm$ 9,76	0,150
ADM (pg/mL)	58,72 $\pm$ 131,57	21,83 $\pm$ 43,10	0,294
UT-II (pg/mL)	224,15 $\pm$ 34,60	237,45 $\pm$ 43,21	0,335

Tabella 7. Confronto dei parametri HRV tra pazienti con BHI < 0,69 e BHI > 0,69 (media $\pm$ DS)

	BHI > 0,69 (TOT 20)	BHI < 0,69 (TOT 13)	p
SDNN ms	91,29 $\pm$ 28,79	89,65 $\pm$ 25,70	0,869
SDANN ms	73,53 $\pm$ 23,36	65,94 $\pm$ 20,64	0,348
PNN50%	12,40 $\pm$ 18,54	17,46 $\pm$ 18,53	0,449
ASDNN ms	49 $\pm$ 24,76	60,41 $\pm$ 25,61	0,211
RMSSD ms	41,15 $\pm$ 38,41	60,79 $\pm$ 43,86	0,185

Tabella 8. Confronto dei livelli di citochine (OPN, ADM e UT-II) tra pazienti con BHI <0,69 e BHI >0,69 (media $\pm$ DS)

	BHI > 0,69 (TOT 20)	BHI < 0,69 (TOT 13)	p
OPN (ng/mL)	87,42 $\pm$ 47,22	88,02 $\pm$ 98,21	0,982
ADM (pg/mL)	35,77 $\pm$ 66,59	48,62 $\pm$ 138,59	0,723
UT-II (pg/mL)	219,82 $\pm$ 36,9	247,19 $\pm$ 37,43	0,047

Tabella 9. Correlazione tra caratteristiche cliniche del gruppo RH e parametri HRV (p e R)

		SDNN ms	SDANN ms	PNN50%	ASDNN ms	RMSSD ms
BPCO	p	0,325	0,101	0,960	0,984	0,771
	R	-0,263	-0,425	0,014	0,006	-0,079
CARDIOPATIA ISCHEMICA CRONICA	p	0,402	0,032	0,905	0,849	0,697
	R	-0,225	-0,536	-0,032	-0,052	-0,106
SCOMPENSO CARDIACO	p	0,934	0,671	0,699	0,331	0,969
	R	-0,023	-0,115	0,105	0,260	0,011
PREGRESSO ICTUS	p	0,934	0,978	0,896	0,796	0,993
	R	-0,023	0,007	0,035	0,070	-0,003
INSUFFICIENZA RENALE	p	0,102	0,296	0,210	0,147	0,199
	R	0,432	0,279	0,331	0,380	0,339
ATEROSCLEROSI CAROTIDEA	p	0,764	0,927	0,908	0,674	0,969
	R	-0,082	0,025	-0,031	-0,114	0,010

Tabella 10. Correlazione tra caratteristiche cliniche del gruppo RH e dosaggi plasmatici citochine (p e R)

		OPN (ng/mL)	ADM (pg/mL)	UT-II (pg/mL)
BPCO	p	0,177	0,481	0,187
	R	-0,355	-0,190	0,347
CARDIOPATIA ISCHEMICA CRONICA	p	0,518	0,275	0,821
	R	-0,175	-0,291	0,061
SCOMPENSO CARDIACO	p	0,302	0,398	0,021
	R	0,275	-0,227	0,570
PREGRESSO ICTUS	p	0,526	0,806	0,831
	R	0,171	-0,067	-0,058
INSUFFICIENZA RENALE	p	0,868	0,079	0,516
	R	0,045	-0,452	0,175
ATEROSCLEROSI CAROTIDEA	p	0,966	0,002	0,352
	R	-0,012	-0,717	0,249

Tabella 11. Correlazione tra parametri HRV e BHI con dosaggi plasmatici delle citochine nel gruppo RH (p e R).

		OPN (ng/mL)	ADM (pg/mL)	UT-II (pg/mL)
SDNN ms	p	0,467	0,434	0,261
	R	-0,196	-0,210	0,299
SDANN ms	p	0,053	0,958	0,562
	R	0,492	0,014	-0,157
PNN50 %	p	0,093	0,343	0,038
	R	-0,434	-0,254	-0,523
ASDNN ms	p	0,371	0,214	0,003
	R	-0,240	-0,328	0,694
RMSSD ma	p	0,083	0,332	0,067
	R	-0,447	-0,259	0,469
BHI	p	0,883	0,027	0,534
	R	0,040	0,551	-0,168

BIBLIOGRAFIA

1. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, Bahonar A, Chifamba J, Dagenais G, Diaz R, Kazmi K, Lanas F, Wei L, Lopez-Jaramillo P, Fanghong L, Ismail NH, Puoane T, Rosengren A, Szuba A, Temizhan A, Wielgosz. A, Yusuf R, Yusufali A, McKee M, Liu L, Mony P, Yusuf S, PURE Study . Investigators. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA* 2013;310:959–968.
2. NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet* 2017;389:37–55.
3. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbiagele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr . 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018;71(6):e13. Epub 2017 Nov 13.
4. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I, ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021.
5. Daugherty SL, Powers JD, Magid DJ, Tavel HM, Masoudi FA, Margolis KL, . O'Connor PJ, Selby JV, Ho PM. Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients. *Circulation* 2012;125:1635–1642.
6. Muntner P, Davis BR, Cushman WC, et al. Treatment-resistant hypertension and the incidence of cardiovascular disease and endstage renal disease: results from the Antihypertensive and LipidLowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Hypertension* 2014; 64: 1012–21.
7. De la Sierra A, Banegas JR, Oliveras A, Gorostidi M, Segura J, de la Cruz JJ, Armario P, Ruilope LM. Clinical differences between resistant hypertensives and patients treated and controlled with three or less drugs. *J Hypertens*. 2012 Jun;30(6):1211-6.
8. Gaddam KK, Nishizaka MK, Pratt-Ubunama MN, Pimenta E, Aban I, Oparil S, Calhoun DA. Characterization of resistant hypertension: association between resistant hypertension, aldosterone, and persistent intravascular volume expansion. *Arch Intern Med*. 2008 Jun 9; 168(11):1159-64.

9. Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hypertens*. 1998; 16: 1979-1987.
10. Esler M. Sympathetic activity in experimental and human hypertension. In: Zanchetti A, Mancia G, editors. *Handbook of hypertension, Vol 17, pathophysiology of hypertension*. Amsterdam: Elsevier; 1997. p. 628–73.
11. Lohmeier TE. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am J Hypertens* 2001;14:147S–54S.
12. Victor RG. Sympathetic neural mechanisms in human hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2008;10:241–7.
13. Grassi G. Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives. *Hypertension* 2009;54:690–7.
14. DiBona GF. Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension* 2013;61: 556–60.
15. Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, Mark AL. Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans: evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension* 1989;14:177–83.
16. Floras JS, Hara K. Sympathoneural and hemodynamic characteristics of young subjects with mild essential hypertension. *J Hypertens* 1993;11:647–55.
17. Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension* 1998;31:68–72.
18. Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, et al. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. *Am J Hypertens* 2004;17: 217–22.
19. Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, et al. Excessive sympathetic activation in heart failure with obesity and metabolic syndrome: characteristics and mechanisms. *Hypertension* 2007;49:535–41.
20. Leimbach Jr WN, Wallin BG, Victor RG, et al. Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation* 1986;73:913–9.
21. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, et al. Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. *Circulation* 1995;92: 3206–11.
22. Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, et al. Early sympathetic activation in the initial clinical stages of chronic renal failure. *Hypertension* 2011;57: 846–51.
23. Hausberg M, Kpsh M, Harmelink P, et al. Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease. *Circulation* 2002;106:1974–9.
24. Grassi G, Serravalle G, Quarti-Trevano F, et al. The neuroadrenergic Hypothesis in hypertension: current evidence. *Exp Fisiol*. 2010; 95: 581-596.

25. Oparil S, Zaman MA & Calhoun DA . Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med.* 2003; 139: 761-776.
26. Judy WJ, Watanabe AM, Murphy WR, et al. Sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive backcross rats genetically related to the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1979; 1: 598-604.
27. Winternitz SR, Katholi RE & Oparil S. Role of sympathetic nerves in the development and maintenance of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest.* 1980; 66: 971-978.
28. Abboud FM. Integration of reflex responses in the control of blood pressure and vascular resistance. *Am J Cardiol.* 1979; 44: 903-911.
29. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* 1982; 62: 347-504.
30. Korner P. Essential Hypertension and its Causes. Oxford University Press, New York. 2011.
31. Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF, et al. Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol.* 2009; 94: 972-983.
32. Zoccal DB, Paton JF, Machado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009; 36: 1188-1196.
33. Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D & Paton JF . A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol.* 2006; 576: 569-583.
34. Paton JF & Waki H. Is neurogenic hypertension related to vascular inflammation of the brainstem? *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33: 89-94.
35. Veerasingham SJ & Raizada MK . Brain renin–angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol.* 2003; 139: 191-202.
36. Fink GD .Sympathetic activity, vascular capacitance and long-term regulation of arterial pressure. *Hypertension.* 2008; 53: 307-312.
37. Goldstein DS . Plasma catecholamines and essential hypertension. An analytical review. *Hypertension.* 1983; 5: 86-99.
38. Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, et al. Neurogenic abnormalities in masked hypertension. *Hypertension.* 2007; 50: 537-542.
39. Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, et al. Adrenergic, metabolic, and reflex abnormalities in reverse and extreme dipper hypertensives. *Hypertension.* 2007; 52: 925-931.

- 40.Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, et al. Excessive sympathetic activation in heart failure with obesity and metabolic syndrome: characteristics and mechanisms. *Hypertension*. 2007; 49: 535-541.
- 41.Grassi G. Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives. *Hypertension*. 2009; 54:690-697.
- 42.Julius S. Tachycardia in hypertension: a saga of progress despite prejudice, confusion, and inertia. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009; 52: 26-30.
- 43.Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, et al. Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev*. 1990; 70: 963-985.
- 44.Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ & Mark AL . Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans: evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension*. 1989; 14: 177-183.
- 45.Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, et al. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension*. 1998; 31: 68-72.
- 46.Grassi G, Colombo M, Seravalle G, et al. Dissociation between muscle and skin sympathetic nerve activity in essential hypertension, obesity, and congestive heart failure. *Hypertension*. 1998; 31: 64-67.
- 47.Esler MD, Lambert GW, Ferrier C, et al. Central nervous system noradrenergic control of sympathetic outflow in normotensive and hypertensive humans. *Clin Exp Hypertens*. 1995; 17: 409-423.
- 48.Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, et al. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003; 108: 560-565.
- 49.Grassi G, Seravalle G, Brambilla G, et al. Marked sympathetic activation and baroreflex dysfunction in true resistant hypertension. *Int J of Cardiology* (2014); 177: 1020–1025.
- 50.Esler MD, Krum H, Sobotka PA, Schlaich MP, Schmieder RE, Bohm M. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 1903–1909.
- 51.Van Ravenswaaij-Arts CMA, Kollée LAA, Hopman JCW, Stoeltinga GBA, van Geijn HP. Heart rate variability. *Ann Intern Med* 1993;118:436–47.
- 52.Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *The New England Journal of Medicine*. 1987;316(22):1371–1375.
- 53.Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens*. 2013;2013:808353. doi: 10.1155/2013/808353. Epub 2013 Jul 22. PMID: 23970958; PMCID: PMC3736482.

54. Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, Hall JL, Le TH, Isakson BE. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Sep;38(9):1969-1985. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311229. PMID: 30354262; PMCID: PMC6205219.
55. B Laurent S, Boutouyrie P. The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circ Res.* 2015;116:1007–1021. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303596. [PubMed: 25767286]
56. Porteri, E., et al., Adrenergic mechanisms and remodeling of subcutaneous small resistance arteries in humans. *J Hypertens*, 2003. 21(12): p. 2345-52.
57. Bakker ENTP, Van der Meulen ET, Van den Berg BM, Everts V, Spaan JAE, VanBavel E. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res.* 2002; 39: 12–20.
58. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Agabiti Rosei E. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 2001; 103: 1238–1244.
59. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, Giulini SM, Agabiti-Rosei E. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension.* 1996; 28: 785–790
60. Chillon JM, Baumbach GL . Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a beta-blocker on cerebral arterioles in rats. *Hypertension.* 1999 Mar; 33(3):856-61.
61. Chan SL, Baumbach GL .Deficiency of Nox2 prevents angiotensin II-induced inward remodeling in cerebral arterioles. *Front Physiol.* 2013; 4:133.
62. Patel, K. P., Li, Y. F., and Hirooka, Y. (2001). Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 226, 814–824.
63. Bruno, R. M., Sudano, I., Ghiadoni, L., Masi, L., and Taddei, S. (2011). Interactions between sympathetic nervous system and endogenous endothelin in patients with essential hypertension. *Hypertension* 57, 79–84
64. Rosa M. Bruno, Lorenzo Ghiadoni, Gino Seravalle,³ Raffaella Dell'Oro,⁴ Stefano Taddei, and Guido Grassi Sympathetic regulation of vascular function in health and disease. *Front Physiol.* 2012; 3: 284. Published online 2012 Jul 24. Prepublished online 2012 Apr 10. doi: 10.3389/fphys.2012.00284
65. Grassi G. Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives. *Hypertension.* 2009; 54:690-697
66. Butler, W. T. (1989) The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res.* 23, 123–136.
67. Kahles F, Findeisen HM and Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* 2014;3:384–93. [PubMed: 24944898]

68. Osteopontin: a major player on hypertension-induced vascular remodeling. Editorial; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 85 (2015) 151-152
69. Giachelli CM, Base N, Almeida MM, et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993;92:1686–96.
70. Seo KW, Lee SJ, Ye BH, Kim YW, Bae SS, Kim CD. Mechanical stretch enhances the expression and activity of osteopontin and MMP-2 via the Akt1/AP-1 pathways in VSMC. *J Mol Cell Cardiol* 2015;85:13–24.
71. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res*. 2002;91:77–82.
72. Kurata M, Okura T, Watanabe S, Fukuoka T, Higaki J. Osteopontin and carotid atherosclerosis in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2006;111(November (5)):319–24.
73. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, et al. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003;170:333–7.
74. Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, Juenger C, Frank D, Remppis A, et al. Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2008;1:43e9.
75. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al: Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560, 1993.
76. Ichiki Y, Kitamura K., et al. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma, *FEBS Lett*. 338 (1994) 6-10.
77. Kis B., Kaiya H., Nishi R., Deli M.A., Ábrahám C.S., Yanagita T., et al. Cerebral endothelial cells are a major source of adrenomedullin. *J. Neuroendocrinol*. 2002;14:283–293.
78. Iring A, Jin YJ, Albarrán-Juárez J, et al. Shear stress-induced endothelial adrenomedullin signaling regulates vascular tone and blood pressure. *J Clin Invest*. 2019;129(7):2775-2791. Published 2019 Jun 17. doi:10.1172/JCI123825
79. Eto T., Kato j., et al. Regulation of production and secretion of adrenomedullin in the cardiovascular system. *Regul. Pept*. 112 (2003) 61-69. *Eur J Heart Fail*. 2019 Feb; 21(2): 163–171. Published online 2018 Dec 28. doi: 10.1002/ejhf.1366
80. Tanaka M, Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa–Shindo Y, Kawate H, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Owa S, Yamauchi A, Igarashi K, Taniguchi S, Shindo T. The endothelial adrenomedullin–RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumor metastasis. *Cardiovasc Res* 2016;111:398–409

81. Ishimitsu T, Minami J, Nishikimi T, et al. Changes in plasma adrenomedullin in physiological and pathological conditions in human subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34(suppl 4):S47-51.
82. Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC Jr. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation* 1995;92:286–289.
83. Adriaan A. Voors, 1 Daan Kremer, 1 Christopher Geven, 2 Jozine M. ter Maaten, 1 Joachim Struck, 3 , 4 Andreas Bergmann, 3 , 4 Peter Pickkers, 2 Marco Metra, 5 Alexandre Mebazaa, 6 Hans-Dirk Düngen, 7 and Javed Butler 8 Adrenomedullin in heart failure: pathophysiology and therapeutic application *Eur J Heart Fail.* 2019 Feb; 21(2): 163–171. Published online 2018 Dec 28. doi: 10.1002/ejhf.1366
84. Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Ishimitsu T, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, and Matsuoka H. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 26: 1424–1431, 1995
85. Kato J, Kitamura K, Matsui E, et al: Plasma adrenomedullin and natriuretic peptides in patients with essential or malignant hypertension. *Hypertens Res* 22: 61-65, 1999.
86. Wei Hu, Pang-HU Zhou, et al; Plasma concentrations of adrenomedullin and natriuretic peptides in patient with essential hypertension. *Experimental and Therapeutic Medicine* 9: 1901-1908, 2015.
87. Kohno M, Hanehira T, Kano H, Horio T, Yokokawa K, Ikeda M, Minami M, Yasunari K, and Yoshikawa J. Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 27: 102–107, 1996.
88. Shinomiya K, Ohmori K, Ohyama H, Hosomi N, Takahashi T, Osaka K, et al. Association of plasma adrenomedullin with carotid atherosclerosis in chronic ischemic stroke. *Peptides* 2001; 22:1873–1880
89. Liu J., Yan J., Greer J.M., Read S.J., Henderson R.D., Rose S.E., et al. Correlation of Adrenomedullin gene expression in peripheral blood leukocytes with severity of ischemic stroke. *Int. J. Neurosci.* 2014;124:271–280. doi: 10.3109/00207454.2013.837462.
90. Serrano-Ponz M., Rodrigo-Gasqué C., Siles E., Martínez-Lara E., Ochoa-Callejero L., Martínez A. Temporal profiles of blood pressure, circulating nitric oxide, and adrenomedullin as predictors of clinical outcome in acute ischemic stroke patients. *Mol. Med. Rep.* 2016;13:3724–3734. doi: 10.3892/mmr.2016.5001.
91. H.A. Bern, D. Pearson, B.A. Larson, R.S. Nishioka, Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. “Urophysiology” and the caudal neurosecretory system of fishes, *Recent Prog. Horm. Res.* 41 (1985) 533–552.
92. Janet J. Maguire & 1Anthony P. Davenport. Is urotensin-II the new endothelin? *British Journal of Pharmacology* (2002) 137, 579 ± 588

93. DOUGLAS, S.A., ASHTON, D.J., SAUERMECH, C.F., COATNEY, (2000a). Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in rat, mouse, dog and primate. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 36(Suppl. 1): S163 ± S166.
94. PERNOW, J., HEMSEN, A., LUNDBERG, J.M., NOWAK, J. & KAIJSER, L. (1991). Potent vasoconstrictor effects and clearance of endothelin in the human forearm. *Acta Physiol. Scand.*, 141, 319 ± 324.
95. A. Stirrat, M. Gallagher, S.A. Douglas, et al. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 (2001) H925–H928.
96. WILKINSON, I.B., AFFOLTER, J.T., DE HAAS, S.L., PELLEGRINI, M.P., BOYD, J., WINTER, M.J., BALMENT, R.J. & WEBB, D.J. (2002). High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. *Cardiovasc. Res.*, 53, 341 ± 347.
97. A Mark Richards, M Gary Nicholls, John G Lainchbury, Stephen Fisher, Timothy G Yandle. Plasma urotensin II in heart failure; *Lancet* 2002; 360: 545–46
98. Bousette N and Giaid A (2006) Urotensin-II and cardiovascular diseases. *Curr Hypertens Rep* 8:479–483.
99. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, and Murakami O (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 104:1–5.
100. Bernard M.Y. Cheung, Raymond Leung, Yu Bun Man and Louisa Y.F. Wong, Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension, *Journal of Hypertension* 2004, 22:1341 – 1344
101. Peng H, Zhang M, Cai X, Olofindayo J, Tan A, et al. (2013) Association between Human Urotensin II and Essential Hypertension—A 1:1 Matched CaseControl Study. *PLoS ONE* 8(12): e81764. doi:10.1371/journal.pone.0081764
102. Huijian Xie, Xinya Wang, Yan He. Association between Plasma Urotensin II and Risk of Hypertension: Findings from a Prospective Study, *International Journal of Hypertension* Volume 2020, Article ID 3284769, 6 pages <https://doi.org/10.1155/2020/3284769>
103. Sztajzel J. heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system. *Swiss Med Wkly.* 2004; 134: 514-522
104. Bonnemeier H, Wiegand UKH, Brandes A, Kluge N, Katus HA, Richardt G, et al. Circadian profile of cardiac autonomic nervous system modulation in healthy subjects. *J Cardiovasc Electrophys* 2003;14:791–9.
105. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J.* 1996; 17: 354-381.

- 106.Stein PK, Pu Y. Heart rate variability, sleep and sleep disorder. *Sleep Med Rev.* 2012; 16: 47-66.
- 107.Salles GF, Ribeiro FM, Guimarães GM, Muxfeldt ES, Cardoso CR. A reduced heart rate variability is independently associated with blunted nocturnal blood pressure fall in patient with resistant hypertension. *J Hypertens.* 2014; 32:644-651.
- 108.Lombardi F, Sandrone G, Pemprumer S, et al. Heart rate variability as an index of sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1987; 60: 1239-1245.
- 109.Acharya UR, Joseph KP, Choo Min Lim et al. Heart rate variability: a review. *International Federation for Medical and Biological Engineering.* 2006; 44: 1031-1041.
- 110.Bekheit S, Tangella M, el-SAk A et al. Use of heart rate spectral analysis to study the effects of calcium channel blockers on sympathetic activity after myocardial infarction. *Am Heart J.* 1990; 119: 79-85.
- 111.Carney RM, Blumenthal JA, Stein PK et al. Depression, heart rate variability, and acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 104: 2024-2028.
- 112.A Angelink MW, Malessa, Baumann B et al. Standardized tests of heart rate variability: normal ranges obtained from 309 healthy humans, and effects of age, gender, and heart rate. *Clinical Autonomic Research.* 2001; 11: 99-108.
- 113.B Ziegler D, Laux G, Dannelhi K, et al. Assessment of cardiovascular autonomic function: age-related normal ranges and reproducibility of spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses. *Diabet Med.* 1992; 9: 166-175.
- 114.C Cowan MJ, Pike K, Burr RL. Effects of gender and age on heart rate variability in healthy individuals and in persons after sudden cardiac arrest. *J Electrocardiol.* 1994; 27: 1-9.
- 115.D Piha SJ. Cardiovascular responses to various autonomic tests in males and females. *Clin Auton Res.* 1993; 3: 15-20.
- 116.E Braune S, Auer A, Schulte-Monting J et al. Cardiovascular parameters: sensitivity to detect autonomic dysfunction and influence of age and sex in normal subjects. *Clin Auton Res.* 1996; 6: 3-15.
- 117.F Jensen-Urstand K, Storck N, Bouvier F et al. Heart rate variability in healthy subjects is related to age and gender. *Acta Physiol Scand.* 1997; 160: 235-241.
- 118.G Low PA, Opfer-Gehking TL, Proper CJ et al. The effect of aging on cardiac autonomic and postganglionic sudomotor function. *Muscle Nerve.* 1990; 13: 152-157.
- 119.S Sundlöf G, Wallin BG. Human muscle nerve sympathetic activity at rest. Relationship to blood pressure and age. *J Physiol.* 1978; 274: 621-637.

- 120.H Ziegler MG, Lake CR, Kopin IJ. Plasma noradrenaline increases with age. *Nature*. 1976; 261: 333-335.
- 121.I Pfeiffer MA, Weinberg CR, Cook D et al. Differential changes of autonomic nervous system function with age in man. *Am J Med*: 1983; 75: 249-258.
- 122.J Segal S, Jager F, Kiauta T. A comparison of cardiovascular reflex tests and spectral analysis of heart rate variability in healthy subjects. *Clin Auton Res*. 1993; 3: 175-182.
- 123.K Stein PK, Kleiger RE, Rottman JN. Differing effects on heart rate variability in men and women. *Am J Cardiol*. 1997; 80: 302-305.
- 124.L Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, et al. Correlation among time and frequency domain measures of heart period variability two weeks after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1992; 69: 891-898.
- 125.M Umetani K, Singer DH, McCraty R, et al. Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: relations to age and gender over nine decades. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31: 593- 601.
- 126.N Shannon DC, Carley DW, Benson H. Aging of modulation of heart rate. *Am J Physiol*. 1987; 253: H874-H877.
- 127.O Korkushko OV, Shatilo VB, Planchinda YI, et al. Autonomic control of cardiac chronotropic in man as a function of age: assessment by power spectral analysis of heart variability. *J Auton Nerv Syst*. 1991; 32: 191-198.
- 128.P Bonnemeier H, Wiengand UKH, Brandes A et al. Circadian Profile of Cardiac Autonomic Nervous Modulation in Healthy Subjects: Differing Effects of Aging and Gender on Heart Rate Variability. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2003; 14: 791-799.
- 129.Q Crasset V, Mezzetti S, Antoine M, et al. Effects of aging and cardiac denervation on heart rate variability during sleep. *Circulation*. 2001; 103: 84-88.
- 130.R Somers VK, Dyken ME, Mark AL, et al. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *New England Journal*. 1993; 328: 303-307
- 131.T Umetani K, Singer DH, McCraty R, et al. Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: relations to age and gender over nine decades. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31: 593- 601.
- 132.U Ramaekers D, Ector H, Aubert AE, et al. Heart rate variability and heart rate in healthy volunteers. Is the female autonomic nervous system cardioprotective? *Eur Heart Journal*. 1998; 19: 1334-1341.
- 133.W Liao D, Barnes RW, Chambless LE, et al. Age, race and sex differences in autonomic cardiac function measured by spectral analysis of heart rate variability-The ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities*. *Am J Cardiol*. 1995; 76: 906-912.

- 134.X Sinnreich R, Kark JD, Friedlander Y, et al. Five minute recordings of heart rate variability for population studies: repeatability and age-sex characteristics. *Heart*. 1998; 80: 156-162.
- 135.Acharya UR, Joseph KP, Choo Min Lim et al. Heart rate variability: a review. *International Federation for Medical and Biological Engineering*. 2006; 44: 1031-1041
- 136.Hayano J, Yamada M, Sakakibara Y, et al. Short, longterm effects of cigarette smoking on heart rate variability . *American Journal of Cardiology*. 1990; 65: 84-88.
- 137.Zeskind PS, Gingras JL. Maternal cigarette-smoking during pregnancy disrupts rhythms in fetal heart rate. *Journal of Pediatric Psychology*. 2006; 31: 5-14.
- 138.Baructu I, Esen AM, Kaya D, et al. Cigarette smoking and heart variability: dynamic influence of parasympathetic and sympathetic maneuvers. *Ann Noninvas Electrocardiol*. 2005; 10: 324-329.
- 139.Hund E . Neurologic sequelae of chronic alcoholis. *Anaesthesiol Reanim*. 2003; 28:4-7.
- 140.Casolo G, Balli E, Taddei T, et al. Decreased spontaneous heart rate variability on congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1989; 64: 1162-1167.
- 141.Nolan J, Flapan AD, Capewell S et al. Decreased cardiac parasympathetic activity in chronic heart failure and its relation to left ventricular function. *Br Heart J*. 1992; 67: 482-485
- 142.Su-Chen Fang, PhD1 , Yu-Lin Wu, PhD2 , and Pei-Shan Tsai, PhD1,3,4. Heart Rate Variability and Risk of All-Cause Death and Cardiovascular Events in Patients With Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Biological research for nursing*, Sep 2019.
- 143.Pereira VL Jr., Dobre M, dos Santos SG, Fuzatti JS, Oliveira CR, Campos LA, Brateanu A and Baltatu OC (2017) Association between Carotid Intima Media Thickness and Heart Rate Variability in Adults at Increased Cardiovascular Risk. *Front. Physiol*. 8:248. doi: 10.3389/fphys.2017.00248
- 144.Strozecki P, Polak G, Manitius J. HRV in kidney failure: measurement and consequences of reduced HRV. 2008; 23: 444-4449
- 145.Chen CF, Lai CL, Lin HF, et al. Reappraisal of heart rate variability in acute ischemic stroke. *Kaohsiung J Med Sci*. 2011; 27: 215-221.
- 146.Lo Turco G, Grimaldi D, Terresana L. Spectral analysis of Heart Rate Variability in psychiatric patients: autonomic nervous system evaluation in psychotic, anxiety and depressive disorders. *Riv Psichiatri*. 2012; 47: 139-148
- 147.Mussalo H, Vanninen E, Ikäheimo R, Laitinen T, Laakso M, Länsiemies E, et al. Heart rate variability and its determinants in patients with severe or mild essential hypertension. *Clin Physiol*. 2001; 21: 594-604.

148. Salles GF, Ribeiro FM, Guimarães GM, Muxfeldt ES, Cardoso CR. A reduced heart rate variability is independently associated with blunted nocturnal blood pressure fall in patient with resistant hypertension. *J Hypertens*. 2014; 32:644-651.
149. Di Raimondo D, Miceli G, Casuccio A, Tuttolomondo A, Buttà C, Zappulla V. Does Overactivation feature all hypertensives? Differences of sympathovagal balance according to night/day blood pressure ratio in patients with essential hypertension. *Hypertens Res*. 2016; 39: 440-448.
150. M. K. Mandawat, D. R. Wallbridge, S. D. Pringle, A. A. Riyami, S. Latif, P. W. Macfarlane, A. R. Lorimer, and S. M. Cobbe. Heart rate variability in left ventricular hypertrophy. *Br Heart J*. 1995 Feb; 73(2): 139–144.
151. Erdem Özel, Ahmet Taştan, Ali Öztürk, Emin Evren Özcan. Relationship between Sympathetic Overactivity and Left Ventricular Hypertrophy in Resistant Hypertension. *Hellenic J Cardiol* 2015; 56: 501-506.
152. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1990 Summer; 2(2):161-92.
153. Lassen LA. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev*. 1959; 39:183–238.
154. Mayhan WG, Werber AH, Heistad DD . Protection of cerebral vessels by sympathetic nerves and vascular hypertrophy. *Circulation*. 1987 Jan; 75(1 Pt 2):1107-12.
155. Zhang R, Crandall CG, Levine BD . Cerebral hemodynamics during the Valsalva maneuver: insights from ganglionic blockade. *Stroke*. 2004 Apr; 35(4):843-7.
156. Kimmerly DS, Tutungi E, Wilson TD, Serrador JM, Gelb AW, Hughson RL, Shoemaker JK. Circulating norepinephrine and cerebrovascular control in conscious humans. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2003 Nov; 23(6):314-9.
157. William M. Armstead. Cerebral Blood Flow Autoregulation and Dysautoregulation. *Anesthesiol Clin*. 2016 September ; 34(3): 465–477.
158. Aaslid R, Lindegaard KF, Sorteberg W, Nornes H. Cerebral autoregulation dynamics in humans. *Stroke* 1989; 20:45-52.
159. Kontos HA, Raper J, Patterson JL Jr: Analysis of vasoactivity of local pH, PCO₂ and bicarbonate on pial vessels. *Stroke* 1977; 8:358-60.
160. Christopher K Willie,^{1,*} Yu-Chieh Tzeng,² Joseph A Fisher,³ and Philip N Ainslie *J Physiol*. Integrative regulation of human brain blood flow; *The Journal of physiology*; 2014 Mar 1; 592(Pt 5): 841–859.
161. Strandgaard S, Olesen J, Skinhoj E, Lassen NA. Autoregulation of brain circulation in severe arterial hypertension. *Br Med J*. 1973 Mar 3; 1(5852):507-10.

162. Baumbach et al., 1989; Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension; *Hypertension* 1989; 13:968-972
163. Baumbach GL, Heistad DD. Adaptive changes in cerebral blood vessels during chronic hypertension. *J Hypertens*. 1991 Nov; 9(11):987-91.
164. Kazama K, Wang G, Frys K, Anrather J, Iadecola C. Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1890–H1899.
165. Yang ST, Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD. Endothelium-dependent responses of cerebral blood vessels during chronic hypertension. *Hypertension*. 1991;17:612–618.
166. Iadecola C, Davisson RL. (2008) Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab*; 7:476-484 DOI: 10.1016/j.cmet.2008.03.010
167. Hiroaki Maeda, Masayasu Matsumoto. Reactivity of cerebral blood flow to carbon dioxide in hypertensive patients: evaluation by trans cranial Doppler method. *Journal of Hypertension* 1994 12:191-197
168. Kannel WB, Wolf PA, Verter J, McNamara PM. Epidemiologic assessment of the role of blood pressure in stroke. The Framingham study. *JAMA*. 1970 Oct 12; 214(2):301-10.
169. Kannel WB, Wolf PA, McGee DL, Dawber TR, McNamara P, Castelli WP Systolic blood pressure, arterial rigidity, and risk of stroke. The Framingham study. *JAMA*. 1981 Mar 27; 245(12):1225-9.
170. R. Aaslid, T. M. Markwalder, and H. Nornes, “Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries,” *Journal of Neurosurgery*, 1982, vol. 57, no. 6, pp. 769–774.
171. G. Tsivgoulis, A. V. Alexandrov, and M. A. Sloan, “Advances in transcranial Doppler ultrasonography” ,*Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2009; vol. 9, no. 1, pp. 46–54.
172. M. Marinoni, A. Ginanneschi, P. Forleo, and L. Amaducci, “Technical limits in transcranial Doppler recording: inadequate acoustic windows” *Ultrasound in Medicine and Biology*; 1997 vol. 23, no. 8, pp. 1275–1277.
173. M. Schöning, D. Grunert, B. Stier. Transkranielle Duplexsonographie durch den intakten Knochen: Ein neues diagnostisches Verfahren. *Ultraschall in der Medizin*, 10 (1989), pp. 66-71
174. Eva Bartels, Transcranial color-coded duplex ultrasonography in routine cerebrovascular diagnostics. *Perspectives in Medicine*. Volume 1, Issues 1–12, 2012, Pages 325-330.
175. Antonello D’Andrea, Raffaele Calabrò, Marianna Conte. «Transcranial Doppler Ultrasound: Physical Principles and Principal Applications in Neurocritical Care Unit», 2016.

176. Markus HS, Droste DW, Kaps M, Larrue V, Lees KR, Siebler M, et al., authors. Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: The Clopidogrel and Aspirin for Reduction of Emboli in Symptomatic Carotid Stenosis (CARESS) trial. *Circulation*. 2005;111:2233–40.
177. Arvind K. Sharma, Lokesh Bathala, Amit Batra, Man Mohan Mehndiratta, Vijay K. Sharma. “Transcranial Doppler: Techniques and advanced applications: Part 2”. *Ann Indian Acad Neurol*. 19 (1): 102-107.
178. Kontos HA, Raper J, Patterson JL Jr: Analysis of vasoactivity of local pH, PCO₂ and bicarbonate on pial vessels. *Stroke* 1977 8:358-60.
179. Markus HS, Harrison MJ. Estimation of cerebrovascular reactivity using transcranial Doppler, including the use of breath-holding as the vasodilatory stimulus. *Stroke* 1992;23:668-73.
180. PACIARONI M, CASO V, CARDAIOLI G, COREA F, MILIA P, VENTI M, HAMAM M, PELLICCIOLI GP, PARNETTI L, GAL- LAI V. Is ultrasound examination sufficient in the evaluation of patients with internal carotid artery severe stenosis or occlusion? *Cerebrovasc Dis* 2003;15:173-6.
181. LINDEGAARD KF, BAKKE SJ, GROLIMUND P, AASLID R, HUBER P, NORNES H. Assessment of intracranial hemodynamics in carotid artery disease by transcranial Doppler ultrasound. *J Neurosurg* 1985;63:890-3.
182. Zavoreo I, Demarin V. BREATH HOLDING INDEX IN THE EVALUATION OF CEREBRAL VASOREACTIVITY; *Acta Clin Croat*. 2004; 43:15-19
183. Wolters FJ, de Bruijn RF, Hofman A, Koudstaal PJ, Ikram MA. Cerebral vasoreactivity, apolipoprotein E, and the risk of dementia: a population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:204-10.
184. Stefani A, Sancesario G, Pierantozzi M, et al. CSF biomarkers, impairment of cerebral hemodynamics and degree of cognitive decline in Alzheimer’s and mixed dementia. *J Neurol Sci* 2009;283:109-15.
185. Akgün H, Taşdemir S, Ulaş ÜH, Alay S, Çetiz A, Yücel M, Öz O, Odabaşı Z, Demirkaya Ş. Reduced breath holding index in patients with chronic migraine. *Acta Neurol Belg*. 2015 Sep;115(3):323-7.
186. Oz O, Tasdemir S, Akgun H, Erdem M, Balikci A, Cetiz A, Yucel M, Ulas UH, Demirkaya S, Kutukcu Y, Özgen F. Decreased cerebral vasomotor reactivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med*. 2017 Feb;30:88-92.
187. Macías-Rodríguez RU, Duarte-Rojo A, Cantú-Brito C, Sauerbruch T, Ruiz-Margáin A, Trebicka J, Green-Gómez M, Díaz Ramírez JB, Sierra Beltrán M, Uribe-Esquivel M, Torre A. Cerebral haemodynamics in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Liver Int*. 2015 Feb;35(2):344-52.

- 188.Silvestrini M, Vernieri F, Pasqualetti P, Matteis M, Passarelli F, Troisi E, Caltagirone C . Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. JAMA. 2000 Apr 26; 283(16):2122-7.
- 189.Troisi E, Attanasio A, Matteis M, Bragoni M, Monaldo B, Caltagirone C, Silvestrini M. Cerebral hemodynamics in young hypertensive subjects and effects of atenolol treatment. J Neurological Sciences 1998; 159: 115-119.
- 190.Giuseppe Miceli, Mariachiara Velardo, Alessandra Casuccio, Maria Grazia Basso, Antonino Tuttolomondo AND Antonio Pinto . Cerebral Vasomotor Reactivity Impairment in Resistant And Non-Resistant Hypertension: The Role Of The Autonomic Nervous System Unpublished data. 2020
- 191.Iadecola C, Davisson RL. (2008) Hypertension and cerebrovascular dysfunction. Cell Metab; 7:476-484 DOI: 10.1016/j.cmet.2008.03.010]
- 192.Henrique Cotchi Simbo Muela, Valeria A. Costa-Hong, Impact of hypertension severity on arterial stiffness, cerebral vasoreactivity, and cognitive performance, Dement Neuropsychol 2017 December; 11(4): 389-397]
- 193.Lavi S, Gaitini D, Milloul V, Jacob G. Impaired cerebral CO2 vasoreactivity: association with endothelial dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Oct;291(4):H1856-61. doi: 10.1152/ajpheart.00014.2006. Epub 2006 Jun 9. PMID: 16766649.
- 194.M Silvestrini; F Vernieri; P Pasqualetti. Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. JAMA, April 26, 2000 - Vol 283 n.6
- 195.Marileen L.P. Portegies, Renée F. A. G. de Bruijn; Cerebral vasomotor reactivity and Risk of mortality; Stroke; 2014; 45:42-47
- 196.Gregory S Harris, Robert Lust. Urotensin II alters vascular reactivity in animals subjected to volume overload. Peptides. 2010 Nov; 31(11): 2075-2082
- 197.Lim M, Honisett S, Sparkes CD, et al. Differential effect of urotensin II on vascular tone in normal subjects and patients with chronic heart failure. Circulation. 2004;109:1212–4
- 198.Sondermeijer B, Kompa A, Komesaroff P, et al. Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension.
- 199.Albanese I, Daskalopoulou SS, Yu B, You Z, Genest J, Alsheikh-Ali A, Schwertani AG. The Urotensin II System and Carotid Atherosclerosis: A Role in Vascular Calcification. Front Pharmacol. 2016 Jun 7;7:149. doi: 10.3389/fphar.2016.00149. PMID: 27375483; PMCID: PMC4894881
- 200.Ghada S. Hassan, Stephen A. Douglas, Eliot H. Ohlstein, Adel Giaid,Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis, Peptides, Volume 26, Issue 12,2005, Pages 2464-2472,

201. Bousette N., Patel L., Douglas S. A., Ohlstein E. H., Giaid A. (2004). Increased expression of urotensin ii and its cognate receptor gpr14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 176, 117–123. 10.1016/j.atherosclerosis.2004.03.023
202. Liu L, Wu Q, Yan H, Chen B, Zheng X, Zhou Q. Association between Cardiac Autonomic Neuropathy and Coronary Artery Lesions in Patients with Type 2 Diabetes. *Dis Markers*. 2020 Dec 30;2020:6659166
203. Longenecker JC, Zubaid M, Johny KV, Attia AI, Ali J, Rashed W, Suresh CG, Omar M. Association of low heart rate variability with atherosclerotic cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Med Princ Pract*. 2009;18(2):85-92.
204. Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, et al. Direct actions of urotensin II on the heart. Implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res*. 2003;93:246–53
205. Zhang Y-G, Li Y-G, Liu B-G, et al. Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28:36–43
206. DOUGLAS S.A., TAYARA L., OHLSTEIN E.H., HALAWA N., GIAID A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet*. 2002;359:1990–1997.
207. NG L.L., LOKE I., O'BRIEN R.J., SQUIRE I.B., DAVIES J.E. Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation*. 2002;106:2877–2880.
208. RICHARDS A.M., NICHOLLS M.G., LAINCHBURY J.G., FISHER S., YANDLE T.G. Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet*. 2002;360:545–546.
209. RUSSELL F.D., MEYERS D., GALBRAITH A.J., BETT N., TOTH I., KEARNS P., MOLENAAR P. Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2003;285:1576–1581
210. Mikael Gottsaˆ ter, Lisa Bellineto Ford, Adrenomedullin is a marker of carotid plaques and intima - media thickness as well as brachial pulse pressure, *Journal of Hypertension* 2013, 31:1959–1965
211. Naohisa Hosomia, Hideo Ohyamab. Plasma adrenomedullin and carotid atherosclerosis in atherothrombotic ischemic stroke, *Journal of Hypertension* 2004, 22:1945–1951
212. Baskaya MK, Suzuki Y, Anzai M, Seki Y, Saito K, Takayasu M, Shibuya M, Sugita K. Effects of adrenomedullin, calcitonin gene- related peptide, and amylin on cerebral circulation in dogs. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:827–34.
213. Nishimura Y, Suzuki A. Relaxant effects of vasodilator peptides on isolated basilar arteries from stroke-prone spontaneously hyperten- sive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997;24:157–61

- 214.Sams A, Knyihá R, Csillik E, Engberg J,Szok D, Tajti J, Bo´di I, Edvinsson L, Vecsei L, Jansen-Olesen I. CGRP and adrenomedullin receptor populations in human cerebral arteries: in vitro pharmaco- logical and molecular investigations in different artery sizes. *Eur J Pharmacol* 2000;408:183–93
- 215.Ebara T, Miura K, Okumura M, Matsuura T, Kim S, Yukimura T, Iwao H. Effect of adrenomedullin on renal hemodynamics and func- tions in dogs. *Eur J Pharmacol* 1994;263:69–73
- 216.Kis B, Kaiya H, Nishi R, Deli M, Niwa M, Kangawa K, Ueta Y, Yamashita H. Adrenomedullin production in the cells of the blood- brain barrier. Second International Symposium on Adrenomedullin and PAMP, Miyazaki, Japan, 2000; 60
- 217.Béla Kis, Csongor S. Ábrahám, Mária A. Deli, Hideyuki Kobayashi, Akihiko Wada, Masami Niwa, Hiroshi Yamashita, Yoichi Ueta, Adrenomedullin in the cerebral circulation, *Peptides*, Volume 22, Issue 11, 2001, Pages 1825-1834
- 218.Fujioka M, Nishio K, Sakaki T, Minamino N, Kitamura K. Ad- renomedullin in patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2000;31:3079 – 83
- 219.Kikumoto K, Kubo A, Hayashi Y, Minamino N, Inoue S, Dohi K, Kitamura K, Kangawa K, Matsuo H, Furuya H. Increased plasma concentration of adrenomedullin in patients with subarachnoid hem- orrhage. *Anesth Analg* 1998;87:859 – 63
- 220.Benedict CR, Loach AB. Sympathetic nervous system activity in patients with subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1978;9:237–44
- 221.Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, Iida M. Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2003 Oct;26(10):839-45.
- 222.Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Abe I, Iida M. Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J Hypertens.* 2003 Jan;21(1):159-65.
- 223.Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):853-9