



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato in

**FISIOPATOLOGIA ED IMAGING
CARDIO-TORACO-VASCOLARE**

XXXI Ciclo

**RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI PER I
CANALI IONICI NEL DETERMINISMO DELLA
CARDIOPATIA ISCHEMICA**

Relatore
Chiar.mo Prof. Francesco Fedele

Candidato
Dott Paolo Severino
Matricola: 698081

Indice

• Abstract	pag.3
• Introduzione	pag.5
• 1 - Fisiologia della circolazione coronarica	pag.7
1.1- Riserva di flusso coronarico	pag.15
• 2 - Canali ionici	pag.17
• 3 - Fisiopatologia dell'ischemia miocardica	pag.21
3.1 - Placca aterosclerotica e fisiopatologia della stenosi coronarica.....	pag.22
3.2 - Disfunzione del microcircolo coronarico endotelio e non endotelio dipendente.....	pag.29
• 4 – Variabilità genetica e cardiopatia ischemica	pag.35
4.1 – Polimorfismi genetici e diabete mellito.....	pag.36
4.2 – Polimorfismi genetici e ipertensione arteriosa.....	pag.39
4.3 – Polimorfismi genetici e dislipidemia.....	pag.42
4.4 – Polimorfismi genetici e aterosclerosi.....	pag.43
4.5 – Polimorfismi genetici e disfunzione del microcircolo.....	pag.45
• 5 - Obiettivo dello studio	pag.50
• 6 - Materiali e metodi	pag.50
6.1 - Disegno dello studio.....	pag.52
6.2 - Analisi genetica.....	pag.53
6.3 – PCR.....	pag.54
6.4 - Analisi statistica.....	pag.54
• 7 - Risultati	pag.55
• 8 – Discussione	pag.64
• 9 - Conclusioni	pag.68
• 10 - Bibliografia	pag.68

ABSTRACT

Introduzione: La cardiopatia ischemica è classicamente associata alla presenza di aterosclerosi coronarica e dei suoi convenzionali fattori di rischio. Tuttavia, è ormai noto come l'ischemia miocardica si manifesti anche in assenza di placca epicardica, il che, decentralizzando l'attenzione dall'aterosclerosi, pone l'accento sulla necessità di una maggior comprensione non solo dei meccanismi di regolazione del flusso coronarico, tra cui alcuni canali ionici, che agiscono prevalentemente a livello del microcircolo, ma anche dei fattori fisiopatologici predisponenti alla loro disfunzione, tra cui diverse varianti geniche. Recentemente, abbiamo descritto una correlazione tra alcuni polimorfismi genetici codificanti per i canali ionici e la presenza di ischemia miocardica, al di là della presenza dei classici fattori di rischio.

Obiettivo dello studio: L'obiettivo di questo studio è quello di confermare la correlazione tra alcuni polimorfismi codificanti per i canali ionici coronarici e la suscettibilità per la cardiopatia ischemica nei suoi diversi quadri fisiopatologici.

Materiali e Metodi: Sono stati arruolati pazienti con sospetta cardiopatia ischemica ed indicazione ad essere sottoposti a coronarografia. I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: G1 con placche coronariche; G2 con disfunzione del microcircolo ai test funzionali intra-coronarici con acetilcolina e adenosina; G3 con coronarie esenti da stenosi e normale

microcircolo. Sulla base dei nostri risultati preliminari, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad analisi genetiche per i geni KCNE1 (MInK) e KCNJ11 (Kir6.2).

Risultati: Sono stati arruolati 603 pazienti (G1: 409; G2: 76; G3: 118). L'indagine genetica ha evidenziato tra i tre gruppi una differenza per i polimorfismi S38G del gene KCNE1 ($p=0.001$) e rs5215, rs5218 e rs5219 del gene KCNJ11 ($p<0.0001$), così come confrontando G1-G3 (S38G $p=0.006$; rs5215, rs5218 e rs5219 $p<0.0001$), mentre tra G1-G2 si confermano le differenze solo per rs5215 ($p<0.0001$), rs5218 ($p=0.005$) e rs5219 ($p=0.024$) e, infine, tra G2-G3 esistono differenze per S38G, rs5215 e rs5219 ($p<0.0001$). All'analisi multivariata, il polimorfismo rs5215_GG del gene KCJN11 appare come fattore protettivo indipendente per cardiopatia ischemica ($p<0.0001$; OR: 0.036; 95.0% CI: 0.018-0.069).

Conclusioni: Tali risultati confermano il ruolo che i polimorfismi genetici codificanti per i regolatori del cross-talk tra metabolismo miocardico e flusso coronarico, ed in particolare per i canali ionici del potassio, rivestono nel determinismo della cardiopatia ischemica, al di là dei fattori di rischio convenzionali. Essi, inoltre, alimentano la prospettiva futura di una terapia a target genico per la cardiopatia ischemica.

INTRODUZIONE

La cardiopatia ischemica rappresenta la principale causa di morte nei Paesi Occidentali¹. Classicamente la patogenesi della cardiopatia ischemica è studiata in correlazione alla malattia aterosclerotica coronarica, determinata dalla presenza nell'albero coronarico di una o più placche aterosclerotiche risultanti da una condizione infiammatoria sistemica² e da una progressiva disfunzione endoteliale³, con deposizione di cellule infiammatorie, lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate, colesterolo e cellule muscolari lisce nella tonaca intima delle arterie⁴. La presenza di un numero elevato di elementi infiammatori e delle cosiddette "foam cells", nonché l'assenza di un cappuccio fibroso di rivestimento spesso e resistente, rendono la placca strutturalmente instabile e vulnerabile, aumentando il rischio di rottura ed ulcerazione della superficie luminale e conducendo a fenomeni di trombosi acuta e conseguente sindrome coronarica acuta⁴⁻⁵.

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato, negli ultimi anni, il critico ruolo svolto dalla microcircolazione coronarica e dalle sue peculiari alterazioni nella fisiopatologia della cardiopatia ischemica, al di là della presenza di una malattia aterosclerotica dei vasi epicardici⁵⁻⁸.

In particolare, la regolazione del flusso coronarico, in condizioni fisiologiche, deriva dalla compartecipazione di più meccanismi (neurogeno, metabolico, neuro-umorale, autoregolazione)⁹⁻¹¹. Recentemente, oltre ai suddetti sistemi

di regolazione, è stato esaltato il ruolo cruciale svolto da alcuni canali ionici, tra cui i canali del potassio ATP-dipendenti (KATP), i canali del potassio voltaggio-dipendenti (Kv), i canali del sodio voltaggio-dipendenti (Nav) e molti altri¹², localizzati a livello delle cellule endoteliali e muscolari lisce dei vasi, nell'intermediare tra le richieste energetiche del tessuto miocardico e il flusso sanguigno coronarico, attraverso la regolazione della quantità di calcio intracellulare e, conseguentemente, influenzando il rilascio di ossido nitrico e modulando il tono muscolare vascolare^{10, 12-13}.

Il coinvolgimento e l'importanza di questi canali nel corretto funzionamento del microcircolo coronarico ha giustificato l'ipotesi secondo cui un'interferenza o una disfunzione dei meccanismi alla base del cross-talk tra tessuto miocardico e flusso coronarico, rappresentata ad esempio da polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) a carico dei geni codificanti per questi canali ionici, possa rappresentare il primum movens di una cascata di eventi che conduce, in ultimo, ai fenomeni ischemici cardiaci, indipendentemente dall'esistenza di placche aterosclerotiche dei vasi coronarici.

1. Fisiologia della circolazione coronarica

I vasi coronarici assolvono al compito di rifornire di ossigeno e nutrienti il tessuto miocardico dipendentemente dal suo fabbisogno energetico, che può variare in ogni momento. Sono necessari, pertanto, meccanismi di regolazione che possano rapidamente modulare il flusso ematico coronarico, adattandolo alle richieste metaboliche del muscolo cardiaco. Da un punto di vista anatomo-funzionale, è possibile distinguere l'albero coronarico in tre diversi compartimenti disposti in serie. Il compartimento prossimale è composto da vasi di capacitanza, le arterie epicardiche, che hanno un diametro compreso tra 5 mm e 500 μm e offrono una ridotta resistenza al passaggio di sangue, così che la pressione rimanga uguale lungo il loro decorso. Il compartimento intermedio è costituito dalle prearteriole, di diametro compreso tra 100 e 500 μm , che contribuiscono per il 20-30% alla resistenza coronarica totale ed hanno il compito di mantenere la pressione di perfusione all'origine delle arteriole entro uno stretto range, grazie a diversi meccanismi regolatori, quali l'autoregolazione miogena, la regolazione neuro-umorale e la vasodilatazione flusso-dipendente, che è funzione dello shear stress, cioè la forza tangenziale di scorrimento che agisce sulla parete del vaso in virtù del moto del sangue. Il compartimento distale, infine, è formato dalle arteriole con un diametro inferiore a 100 μm , le quali contribuiscono a circa il 40% della resistenza coronarica totale,

rappresentando il principale teatro della regolazione metabolica del flusso coronarico, che viene così modulato in ragione del rilascio di prodotti vasoattivi locali^{6, 14}. Il sistema coronarico riesce, dunque, nelle diverse condizioni di lavoro a cui il muscolo cardiaco è sottoposto, a garantire un flusso ematico costante, in grado di colmare le esigenze metaboliche e le richieste di ossigeno del cuore. I meccanismi di regolazione del flusso prevalenti cambiano, tuttavia, a seconda del distretto considerato.

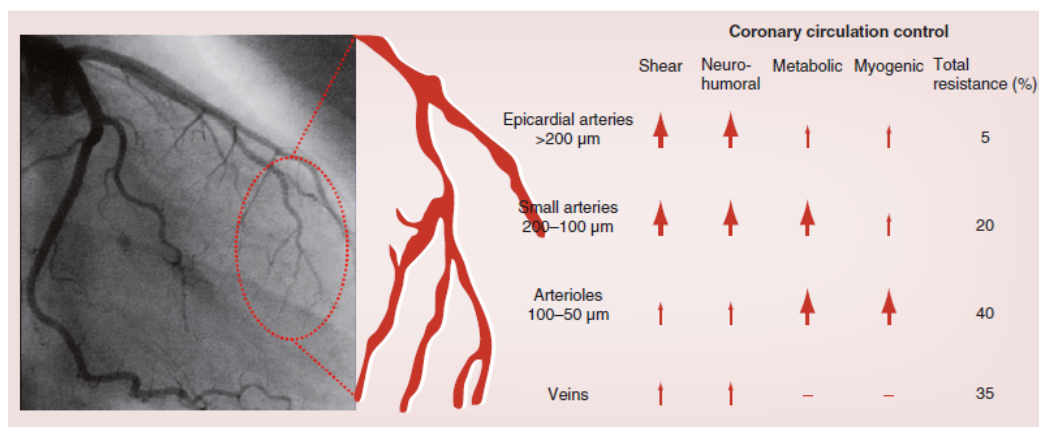


Figura 2. Meccanismi di regolazione della circolazione coronarica e contributo offerto alla resistenza totale da ciascun compartimento. Le dimensioni delle frecce indicano l'entità del contributo offerto da ciascun meccanismo regolatorio ai fini della vasodilatazione, in ognuno dei distretti del circolo coronarico.

[Fedele et al., 2013]

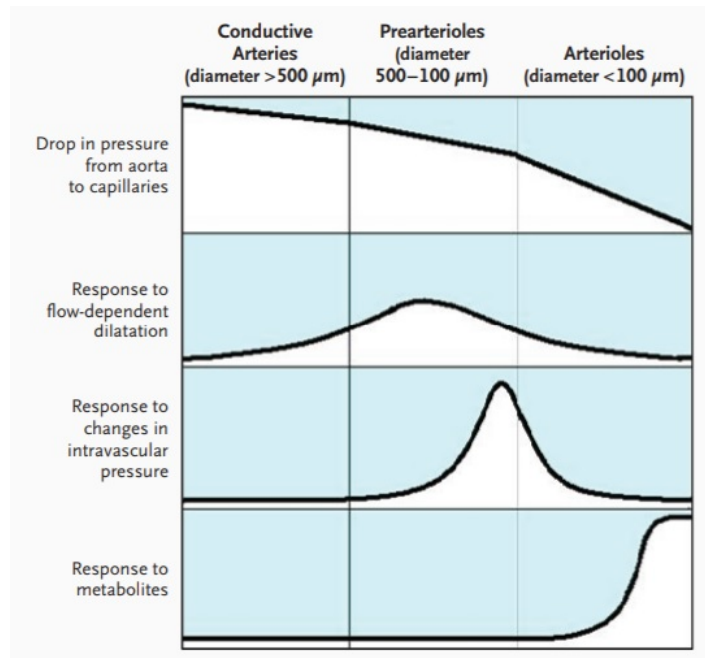


Figura 3. Anatomia funzionale del sistema arterioso coronarico. Le arterie epicardiche, le prearteriole e le arteriole costituiscono i tre compartimenti del sistema arterioso coronarico. Il calo della pressione lungo le arterie epicardiche è trascurabile, apprezzabile nelle prearteriole, e maggiore nelle arteriole. Le arterie epicardiche rispondono alla dilatazione flusso-dipendente, ma meno rispetto alle prearteriole nella loro porzione prossimale. Le prearteriole nella porzione distale sono più reattive rispetto agli altri compartimenti coronarici alla pressione intravascolare e sono le principali responsabili dell'autoregolazione del flusso sanguigno coronarico. Le arteriole, invece, sono sensibili ai cambiamenti nella concentrazione intramiocardica di metaboliti e sono le maggiori protagoniste della regolazione metabolica del flusso sanguigno coronarico. Le arterie epicardiche e le prearteriole, per definizione, non sono esposte ai metaboliti di origine miocardica a causa della loro posizione extramiocardica e dello spessore della loro parete.

[Camici et al., 2007]

Il flusso ematico coronarico, in condizioni di riposo, equivale in media a 60-80 ml/min/100 grammi di tessuto miocardico, ma può aumentare fino a 200-300 ml/min/100 grammi di tessuto in condizioni di attività fisica. Oltre alla pressione di perfusione e alle resistenze vascolari coronariche, anche lo stato di contrazione del miocardio riveste un ruolo rilevante nella definizione del flusso coronarico. Potremmo, infatti, definire il flusso coronarico "fasico", dal momento che la sistole ventricolare determina il raggiungimento di una pressione extravascolare tale da esercitare una forza compressiva sui vasi che contrasta lo scorrimento del sangue, al punto che, nei fatti, è essenzialmente durante la diastole che si realizza l'irrorazione del tessuto miocardico. Questo effetto di compressione si esplica soprattutto a livello del ventricolo sinistro, laddove a destra il flusso rispecchia abbastanza fedelmente l'andamento della pressione aortica, ed è esercitato in modo non uniforme alle varie profondità, aumentando progressivamente dagli strati subepicardici superficiali a quelli subendocardici.

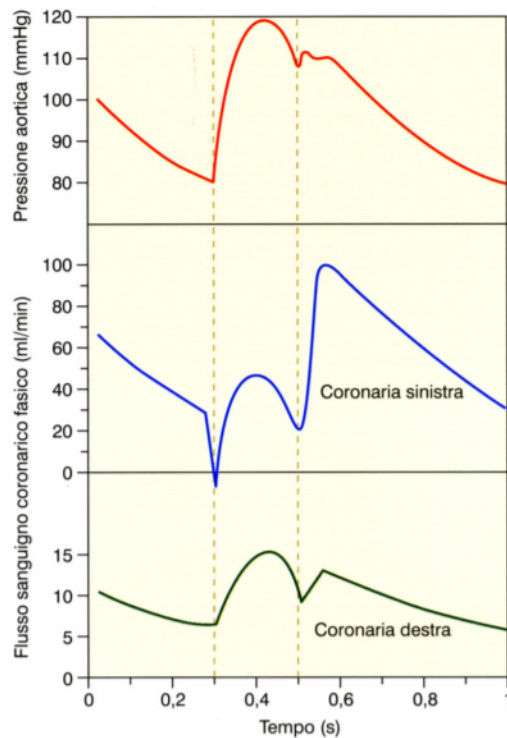


Figura 4. Variazioni della pressione aortica e del flusso ematico nella coronaria sinistra e destra in rapporto alle varie fasi del ciclo cardiaco. Il flusso ematico nella coronaria destra si riduce soltanto nella fase finale dell'eiezione ventricolare, mentre nella coronaria sinistra è ridotto anche nella fase iniziale di sistole isovolumetrica. In entrambi i casi il flusso aumenta durante la diastole.

Nonostante questo, il rapporto tra il valore del flusso ematico medio al livello subendocardico e a livello subepicardico è compreso tra 1,1:1 e 1,5:1, dimostrando come in realtà gli strati subendocardici ricevano, durante la diastole, un quantitativo di sangue aumentato rispetto agli strati più superficiali, in virtù di una più arborizzata rete capillare, un valore minore di resistenza arteriolare e una maggiore concentrazione di mioglobina. Questa proteina, grazie alla sua elevata affinità per l'ossigeno, si carica di molecole

di ossigeno durante la fase di diastole per poi rilasciarle durante la sistole, quando, a causa dell'interruzione del flusso ematico, i valori pressori di questo gas a livello locale si riducono. La distribuzione del flusso transmurale è, dunque, influenzata dalla durata della diastole e dalla pressione di perfusione¹⁵. A tal proposito, infatti, Guyton et al. hanno dimostrato che a riposo il flusso ematico subendocardico inizia a ridursi quando la pressione di perfusione è inferiore a 70 mmHg, mentre il flusso ematico epicardico si riduce quando la pressione di perfusione risulta inferiore a 40 mmHg¹⁶.

I principali meccanismi di regolazione del flusso ematico all'interno dell'albero coronarico sono rappresentati da: autoregolazione, regolazione metabolica, neurale, endotelio-dipendente e ormonale.

L'autoregolazione è il meccanismo attraverso il quale il tono muscolare dei vasi coronarici viene modulato in conseguenza alle variazioni della pressione di perfusione, in modo da garantire un flusso ematico costante: un aumento della pressione di perfusione coronarica determina un incremento delle resistenze vascolari attraverso un aumentato grado di contrazione della muscolatura liscia dei vasi coronarici e viceversa. Il meccanismo dell'autoregolazione è attivo in un ambito di valori di pressione di perfusione compresi tra 50 e 150 mmHg, oltre i quali il flusso diventa pressione-dipendente. Essa non interviene in modo uniforme lungo tutto l'albero coronarico, essendo maggiormente attiva nella circolazione

coronarica sinistra, rispetto a quella destra e rappresentando un meccanismo modulatorio fondamentale in particolare nei vasi di resistenza.

La regolazione metabolica rappresenta un fondamentale meccanismo di modulazione locale del flusso ematico, che garantisce in ogni momento un apporto di ossigeno adeguato al fabbisogno continuamente cangiante dei cardiomiociti. Alla base della regolazione metabolica vi è il consumo di ossigeno (MVO₂) miocardico definito dalla formula $MVO_2 = \text{flusso ematico coronarico} \times \text{differenza arterovenosa di ossigeno}$ e i suoi principali determinanti sono la frequenza cardiaca, la pressione sistolica e l' inotropismo cardiaco. In condizioni basali il consumo di ossigeno è pari a circa 10 ml/min/grammo di tessuto, ma in particolari condizioni, le amplificate richieste miocardiche possono essere soddisfatte da un aumentato flusso ematico. Infatti, il transitorio stimolo ipossico determinato dall'aumento del lavoro cardiaco induce il rilascio locale di sostanze ad azione vasodilatatrice, rivestendo un ruolo dominante nella regolazione della resistenza microvascolare coronarica¹¹. Le molecole principalmente implicate sono l'ossigeno, l'anidride carbonica, l'adenosina, i canali del potassio adenosina trifosfato-dipendenti (KATP), calcio-dipendenti (KCa) e voltaggio-dipendenti (Kv), i nucleotidi adenilici e le specie reattive dell'ossigeno.

A proposito della regolazione neurale, essa consiste nel controllo esercitato da parte del sistema nervoso simpatico e parasimpatico sui vasi coronarici.

La noradrenalina agisce preferenzialmente sui recettori α , con un effetto

vasocostrittore, mentre l'acetilcolina liberata dalle terminazioni vagali, interagendo con i recettori muscarinici, induce un effetto coronarodilatatore endotelio-dipendente che si esplica, in condizioni fisiologiche, attraverso l'NO¹⁰. I due sistemi presentano un'attività di scarica tonica, contribuendo alla determinazione del flusso ematico coronarico di base. Le variazioni di questa attività sono quasi sempre di origine riflessa.

Per regolazione endotelio-dipendente, invece, si intende un tipo di modulazione del tono e delle resistenze vascolari, e quindi del flusso ematico, garantita dal rilascio da parte dell'endotelio di sostanze ad azione paracrina, quali l'ossido nitrico, i metaboliti dell'acido arachidonico, il fattore depolarizzante endotelio-derivato (EDHF) e le endoteline. In particolare, l'ossido nitrico viene prodotto dalle cellule endoteliali e rilasciato nel lume vascolare, dal quale raggiunge le cellule muscolari lisce vasali dove attiva la guanilato ciclasi, amplificando la produzione di guanosin monofosfato ciclico (cGMP), che svolge attività di secondo messaggero, inducendo il rilasciamento della muscolatura liscia vasale coronarica attraverso l'attivazione di una proteinchinasi cGMP-dipendente che comporta una defosforilazione delle catene leggere di miosina¹⁷.

L'ultimo tipo di regolazione, quella ormonale, si basa sulla compartecipazione di diversi ormoni alla regolazione del tono vascolare coronarico: di questi, alcuni hanno un'azione di vasodilatazione, quali 17 β -estradiolo, il progesterone, il testosterone¹⁸, l'ormone antidiuretico¹⁹ e l'

istamina²⁰; altri hanno un effetto vasocostrittorio come l'ormone della crescita, la prolattina, l'ormone lattogeno placentare, la grelina e l'angiotensina II¹⁹. L'insulina, invece, esplica un duplice effetto: attivando la scarica efferente simpatica ha azione vasocostrittrice, mentre aumentando la produzione endoteliale di ossido nitrico determina vasodilatazione. A livello coronarico prevale nettamente l'azione vasocostrittrice.

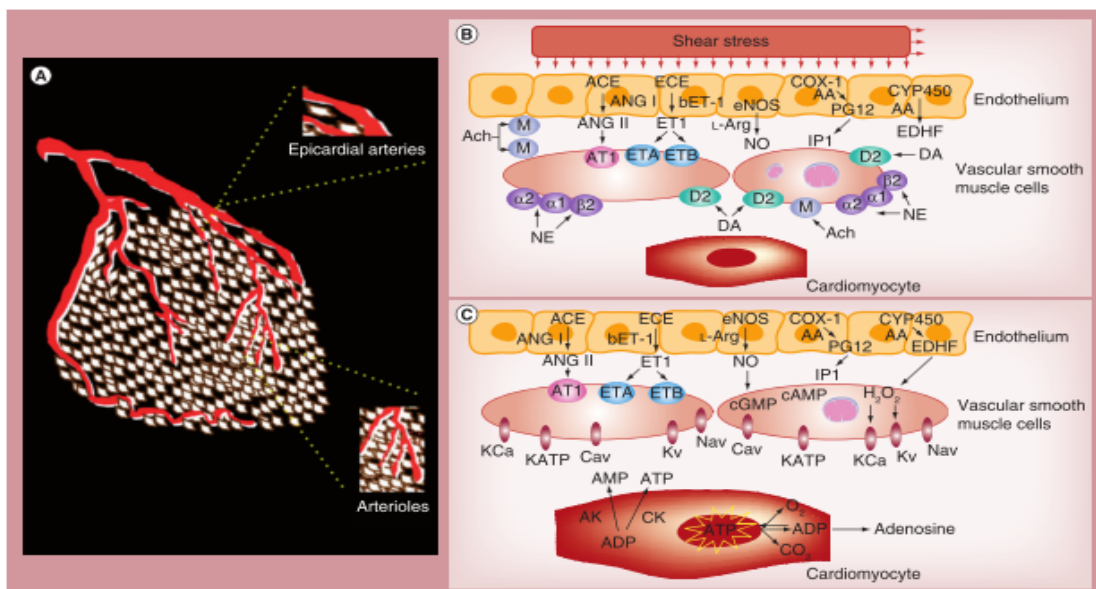


Figura 4. Differenza dei meccanismi regolatori tra il distretto epicardico ed il microcircolo.

[Fedele et al., 2013]

1.1 Riserva di flusso coronarico

Per riserva di flusso coronarico si intende il massimo incremento del flusso ematico coronarico, rispetto alle condizioni basali, conseguente ad una vasodilatazione coronarica massimale. Esso normalmente ammonta a circa 5 volte il flusso coronarico a riposo²¹. La riserva coronarica ha un diverso valore nei vari strati della parete ventricolare: infatti, mentre in condizioni di

riposo il flusso ematico medio per grammo di tessuto è superiore negli strati subendocardici rispetto a quelli subepicardici, in condizioni di massima dilatazione coronarica si registra una inversione della distribuzione del flusso ematico, che risulta essere superiore negli strati superficiali rispetto a quelli profondi. Una riduzione della riserva di flusso coronarico totale avrà, dunque, effetti più marcati sul subendocardio piuttosto che sul subepicardio. Tale differenza è riconducibile al maggior MVO₂ e al più intenso effetto compressivo della sistole ventricolare sulle arteriole degli strati subendocardici.

Una riduzione della perfusione massima e della riserva coronarica può essere causata da una riduzione del tempo di diastole, osservabile in caso di tachicardia¹⁵, dalla riduzione dell'apporto arterioso di ossigeno, come nel caso dell'anemia, dall'aumento del precarico e dei fattori responsabili dell'incremento del consumo miocardico di ossigeno. La riserva coronarica può essere, inoltre, compromessa da condizioni che alterano la normale modulazione delle resistenze del microcircolo coronarico, a prescindere dalla presenza di una stenosi epicardica, ovvero la vasodilatazione endotelio-dipendente, causata da una disfunzione del microcircolo, per la quale si riduce la produzione ed il rilascio di ossido nitrico endoteliale²², e l'ipertrofia ventricolare sinistra acquisita, che provoca una riduzione della riserva di flusso coronarico in ragione di due fenomeni riconducibili all'ipertrofia stessa: la maggiore compressione esercitata dal miocardio ipertrofico sui vasi

subendocardici e la mancanza di uno sviluppo del microcircolo coronarico proporzionale all'incremento della massa cardiaca²³.

2. Canali ionici

I canali ionici sono macromolecole ubiquitarie costituite da un numero variabile di subunità, ciascuna codificata da uno specifico gene, implicati nella regolazione del tono vascolare, svolto a livello dell'endotelio e del muscolo liscio vasale. Essi rappresentano gli effettori finali dei principali meccanismi coinvolti nella modulazione del flusso sanguigno coronarico.

Tra i più studiati, i canali del potassio (K^+) sono generalmente formati da un omotetramero α , nel quale quattro identiche subunità si associano a delimitare un poro centrale per il passaggio dello ione, e subunità β , con funzione regolatoria. L'apertura dei canali del potassio induce la fuoriuscita di ioni, con iperpolarizzazione della membrana e chiusura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti. Questo evento è responsabile del rilassamento delle cellule muscolari lisce vasali (CML) e della vasodilatazione. Viceversa, la chiusura di questi canali contribuisce alla depolarizzazione cellulare, all'ingresso di calcio ed alla contrazione delle CML con vasocostrizione. Questi canali sono, inoltre, implicati nella vasodilatazione H_2O_2 mediata¹². Nelle cellule endoteliali, invece, l'apertura dei canali del potassio produce vasodilatazione coronarica in due modi, ovvero l'iperpolarizzazione cellulare, che attiva una cascata di segnali che termina con l'ingresso di calcio

nella cellula e il rilascio di vasodilatatori, e la diffusione dell'iperpolarizzazione attraverso la giunzione mioendoteliale alle CML. Sulle CML e sulle cellule endoteliali sono espressi principalmente quattro tipi di canali del potassio: (a) canali del potassio voltaggio-dipendenti (Kv), (b) canali del potassio calcio-dipendenti (KCa), (c) canali del potassio ATP-dipendenti (KATP) ed infine (d) canali del potassio inward-rectifier (Kir).

(a) I canali del potassio voltaggio-dipendenti (Kv) si aprono con la depolarizzazione cellulare, alla soglia di -30 mV. Essi vengono classificati in 12 famiglie (Kv1-Kv12) e sono stati individuati circa 40 differenti subunità nelle diverse regioni del cuore. Questi canali possono presentare diverse subunità regolatorie β , tra cui MInK, codificata dal gene KCNE1, che è parte del canale del potassio voltaggio-dipendente a bassa conduttanza (IKs). A livello delle cellule muscolari lisce, questi canali svolgono un ruolo sia nella determinazione del potenziale di riposo che nell'aumento del consumo d'ossigeno indotto sia dall'esercizio fisico che dalle catecolamine. Rappresentano, inoltre, gli effettori finali della vasodilatazione endotelio-dipendente ed indipendente²⁴: gli agenti vasodilatatori aprono i canali Kv attraverso una via cAMP mediata, mentre le sostanze ad azione vasocostrittrice chiudono i canali Kv con un meccanismo regolato dall'aumento del calcio intracellulare. Recenti evidenze, inoltre, sottolineano il ruolo del canale Kv 1.5 nella

dilatazione coronarica indotta dalla produzione mitocondriale di H_2O_2 , dal momento che la molecola è responsabile di reazioni redox alle quali il canale risulta sensibile²⁵, accoppiando, dunque, in modo diretto, il metabolismo cellulare ed il flusso ematico coronarico. Gli elevati livelli di glucosio, di colesterolo e di ROS circolanti, attraverso la down-regulation del fattore di trascrizione Sp1²⁶, riducono l'espressione di questi canali e, di conseguenza, anche la risposta vasodilatatoria.

(b) All'interno dell'albero coronarico sono stati identificati tre tipi di canali del potassio calcio-dipendenti (KCa), distinti in elevata (B), intermedia (I) e bassa (S) conduttanza. I canali BKCa predominano nelle CML, mentre quelli IKCa e SKCa si localizzano soprattutto a livello endoteliale²⁷. I canali KCa espressi sulle cellule muscolari lisce ed endoteliali sono attivati sia da un'aumentata concentrazione intracellulare di calcio, che dalla depolarizzazione della membrana. I canali BKCa contribuiscono al potenziale di riposo di membrana: se questi canali vengono bloccati si determina depolarizzazione e quindi vasocostrizione. Essi, infatti, assumono un ruolo centrale nella regolazione del tono vascolare grazie al rilascio di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico, per la presenza del recettore della rianodina²⁸. A livello del microcircolo, invece, in condizioni fisiologiche, sono prevalentemente silenti, necessitando per la loro attivazione di una

soglia elevata di calcio e non contribuendo così al mantenimento del tono vascolare basale. Questi canali, inoltre, sono implicati nella vasodilatazione endotelio-dipendente ed H₂O₂-dipendente mediata dai metaboliti della fosfolipasi A2 e della lipossigenasi²⁹⁻³¹. I canali BKCa svolgono una funzione importante nel contrastare la vasocostrizione: diversi agenti vasocostrittori, come l'angiotensina II e l'endotelina li inibiscono. Infine, essi sono implicati nel preconditionamento, meccanismo alla base della cardioprotezione¹². L'aterosclerosi e l'ipertensione incrementano l'attività di questi canali, facendo supporre un'implicazione nella prevenzione della vasocostrizione e del vasospasmo attraverso un meccanismo a feedback negativo³².

- (c) I canali del potassio ATP-dipendenti (KATP) sono costituiti dall'associazione di due subunità: l'ATP binding cassette protein (SUR) e il canale del K⁺ inward rectifier (Kir subunit). Questi canali sono espressi, a livello coronarico, sia dalle cellule endoteliali che dalle cellule muscolari lisce (quelli più comuni in questa sede sono il Kir6.1/SUR2B e Kir6.2/SUR2A), dove svolgono un ruolo essenziale nel mediare l'accoppiamento tra lo stato metabolico cellulare e il passaggio di ioni K⁺. In seguito alla riduzione intracellulare di ATP, questi canali si aprono, causando sequenzialmente la fuoriuscita di ioni K⁺, l'iperpolarizzazione cellulare e la chiusura dei canali del calcio

voltaggio-dipendenti, con conseguente vasodilatazione. Essi, inoltre, mediano anche la vasodilatazione innescata da altri segnali metabolici, quali la prostaciclina e l'adenosina. Anche una condizione acuta di ipossia può rappresentare un trigger per l'apertura di questi canali e la relativa risposta vasodilatatoria³³. Al contrario, alcune condizioni dismetaboliche, come l'ipercolesterolemia, si associano ad una deficitaria risposta vasodilatatoria del microcircolo ai test funzionali coronarici, poiché riducono l'espressione dei canali KATP¹⁰.

(d) I canali del potassio K⁺ inward rectifier (Kir) costituiscono una delle subunità che formano il canale del potassio ATP-dipendente. Si annoverano 15 geni codificanti per tali subunità distinti in sette famiglie (Kir 1.x – 7.x). Le subunità più presenti a livello coronarico sono Kir 6.1 e Kir 6.2. Questi canali sono importanti nella determinazione del potenziale di riposo, favorendo il passaggio del potassio dall'esterno all'interno della cellula più velocemente del movimento opposto: si aprono quando la membrana è iperpolarizzata e si chiudono in condizioni di depolarizzazione.

3. Fisiopatologia dell'ischemica miocardica

L'ischemia miocardica rappresenta una condizione di sofferenza che conduce a danno a carico dei cardiomiociti, dovuta ad un insufficiente apporto di ossigeno e nutrienti rispetto alle richieste metaboliche del tessuto miocardico

e conduce a diversi quadri clinici. L'aterosclerosi viene usualmente riconosciuta come causa principale della cardiopatia ischemica, ma si è provato a dare una spiegazione anche a quei casi in cui la patologia non si sviluppa nonostante la presenza di una placca aterosclerotica coronarica e a quelli in cui, al contrario, l'ischemia non si correla alla presenza di una lesione stenotante angiograficamente individuabile. Ampliando il punto di vista con il quale ad oggi ci si appropria al problema, e andando oltre ciò che è angiograficamente visualizzabile, è stato valorizzato il microcircolo coronarico, interpretando la sua disfunzione come causa, da un lato, della riduzione della capacità di adattamento alle variazioni della domanda metabolica del miocardio, con riduzione della riserva di flusso coronarico e, dunque, della soglia ischemica, e dall'altro, dell'alterazione delle caratteristiche fisiche del flusso ematico, favorendo l'inizio e la progressione dell'aterogenesi. Un altro passo importante è stato compiuto esaltando il ruolo della predisposizione genetica nel determinismo della patologia aterosclerotica e del microcircolo, indipendentemente o in associazione agli altri noti fattori di rischio.

3.1 Placca aterosclerotica e fisiopatologia della stenosi coronarica

L'aterosclerosi è un processo degenerativo-infiammatorio sistemico che interessa la parete delle arterie di grosso e medio calibro, la cui lesione caratteristica è rappresentata dall'ateroma, o placca aterosclerotica,

ispessimento focale della tonaca intima dell'arteria costituito da un core centrale, infarcito di lipidi, detriti cellulari e cellule schiumose, ed un cappuccio fibroso di rivestimento, formato da cellule muscolari lisce (CLM) e collagene. Le caratteristiche fisiche dell'ateroma, in particolare il rapporto tra cappuccio fibroso e core della placca, sono fondamentali nella previsione del destino della placca stessa: infatti, un rapporto elevato predice una minore possibilità che la placca vada incontro a fenomeni acuti di rottura e/o erosione.

L'aterosclerosi è causata dal concorso di molteplici fattori di rischio, di cui alcuni non modificabili, quali l'età, il sesso e la suscettibilità genetica, ed altri, invece, modificabili, quali il fumo, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito di tipo 1 e 2, la sedentarietà, una dieta ricca di colesterolo, grassi saturi e glucidi e le dislipidemie. Dal punto di vista patogenetico, le lesioni aterosclerotiche sono il prodotto di una infiammazione cronica dell'intima vasale. L'esposizione ad elevati valori circolanti di colesterolo e grassi saturi determina un accumulo in circolo di lipoproteine ad alta densità (LDL), che legano i proteoglicani dell'intima vasale accumulandosi nel contesto della stessa ove, stanziandovi a lungo, vanno più facilmente incontro ad ossidazione. Durante le fasi precoci del processo, l'endotelio inizia ad esprimere una serie di molecole che favoriscono l'adesione di monociti e linfociti T, e quindi il transito degli stessi, grazie a segnali chemiotattici³⁴, verso il subendotelio. Raggiunto il subendotelio, i monociti divengono

macrofagi, legano, tramite il recettore scavenger, le LDL ossidate e le internalizzano, trasformandosi in cellule schiumose, che proliferano producendo citochine e fattori di crescita, come il fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF), che sostengono e amplificano i segnali pro-infiammatori e mitogeni. Le lesioni precoci sono generalmente focali e localizzate soprattutto in corrispondenza delle biforcazioni arteriose, dove il flusso ematico tende ad essere turbolento. Un flusso laminare, al contrario, contrasta l'aterosclerosi, stimolando l'aumento dell'espressione di enzimi ateroprotettivi, come la superossido dismutasi e l'ossido nitrico sintetasi. Successivamente, nella fase di formazione del vero e proprio ateroma e nello sviluppo delle complicanze dell'aterosclerosi, un ruolo sempre più centrale è svolto dall'infiammazione. I mediatori pro-infiammatori prodotti dalle cellule schiumose, come citochine, chemochine e specie reattive dell'ossigeno richiamano a livello della placca altre cellule dell'immunità sia innata sia acquisita, sostenendo la progressione della lesione, con proliferazione, migrazione e successiva apoptosi delle CML della tonaca media, e l'esposizione della stessa a fenomeni quali l'erosione o la rottura. Le CML accrescono la placca attraverso la produzione di molecole della matrice extracellulare, come collagene di tipo 1 e 3, proteoglicani ed elastina, e la calcificazione della stessa, tramite la sintesi di proteine morfogenetiche dell'osso e l'attivazione di vie di trasduzione del segnale, come la via del recettore attivatore del fattore nucleare kappa B (RANK) e della protein-

chinasi B (AKT)³⁵. Quando la placca acquisisce uno spessore superiore al 40% dell'area di sezione trasversa dell'arteria, inizia il processo di rimodellamento negativo della parete vasale, a causa del quale la placca invade il lume dell'arteria causando la stenosi. Inoltre, la placca sviluppa nel tempo una vascolarizzazione propria, grazie a fenomeni angiogenetici, promossi dal fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), prodotto dai macrofagi. L'angiogenesi ha due ruoli principali: potenzia l'accrescimento della placca, apportandovi ossigeno e nutrienti, e amplifica l'infiammazione, favorendo l'accesso dei leucociti³⁶. Tuttavia, questi vasi neoformati sono fragili e vanno facilmente incontro a rottura provocando delle microemorragie intrapacca, che partecipano all'ulteriore evoluzione dell'ateroma.

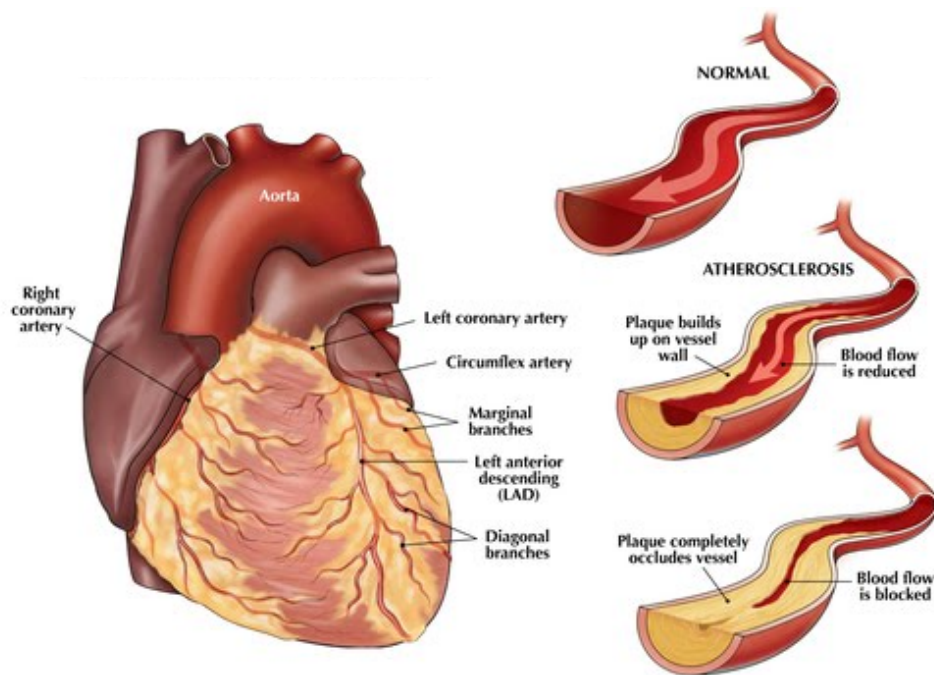


Figura 5. Evoluzione del processo aterosclerotico e variazioni del lume arterioso nelle diverse fasi.

Il principale pericolo connesso all' aterosclerosi è rappresentato dalle complicanze, tra le quali vi sono (I) la stenosi arteriosa (II) la rottura e (III) l'erosione del cappuccio fibroso della placca e (IV) la formazione di aneurismi.

- I) Lo sviluppo della placca, con progressiva stenotizzazione del vaso ed ostacolo al flusso ematico, si verifica tramite un meccanismo a gradini, che vede l'alternanza di fasi di crescita, innescate da eventi circoscritti come l'erosione o l'emorragia intrapacca, e fasi di quiescenza. La placca, crescendo lentamente, consente al circolo coronarico di adattarsi alla cronica limitazione del flusso ematico. In tale condizione, l'ischemia si verifica allorché il miocardio incrementa in modo repentino il suo metabolismo. Questo meccanismo fisiopatologico è alla base dell'angina stabile.
- II) La rottura del cappuccio fibroso è dovuta all'assottigliamento dello stesso ed alla conseguente maggiore vulnerabilità della placca, causate da uno squilibrio nella produzione del collagene o di altre molecole della matrice interstiziale ad opera delle CML. A seguito della rottura, infatti, le proteine della matrice interagiscono con le piastrine circolanti, dando luogo a fenomeni di trombosi arteriosa massiva e, dunque, ischemia dei territori irrorati dal vaso. A questo evento può aggiungersi il distacco di frammenti del trombo

e la loro embolizzazione, con occlusione di rami arteriosi più piccoli localizzati a valle e interruzione dell'apporto ematico. Questi fenomeni, che si realizzano generalmente, in tempi brevi, sono i principali responsabili delle forme acute di ischemia e, dunque, della maggior parte dei casi di sindromi coronariche acute (SCA)³⁷.

III) L'erosione superficiale del cappuccio fibroso della placca e i conseguenti fenomeni di trombosi murale circoscritta e cicatrizzazione si ripetono rapidamente e ciclicamente rendendo quest'ultima vulnerabile. L'erosione è causata sia da fenomeni apoptotici delle cellule endoteliali dell'intima che riveste la placca, sia dalla perdita delle giunzioni tra le cellule endoteliali e la lamina basale. Questo meccanismo è responsabile di circa un terzo delle forme di SCA, prevalentemente associate a morte cardiaca improvvisa e quindi non precedute da alcun tipo di sintomatologia³⁸.

IV) La formazione dell'aneurisma si realizza attraverso meccanismi opposti a quelli della stenosi arteriosa ed è la meno frequente tra le complicanze dell'aterosclerosi. A livello coronarico le sedi più frequentemente interessate sono la porzione prossimale e media della coronaria destra³⁹.

A livello coronarico il processo aterosclerotico interessa il lume delle arterie epicardiche e viene definito dagli inglesi *coronary artery disease* (CAD). Da un punto di vista fisiopatologico, la presenza di una placca aterosclerotica nel lume di un vaso coronarico causa una stenosi del lume dell'arteria che aumenta la resistenza al flusso ematico, riducendo l'apporto di sangue nei territori irrorati localizzati a valle. Tuttavia, fino a quando la stenosi rimane inferiore al 50%, non si osservano importanti variazioni pressorie e significative alterazioni emodinamiche, grazie alla capacità di adattamento delle arterie epicardiche. Superato questo valore, invece, la stenosi viene considerata significativa e il tratto di arteria a valle del restringimento attua una vasodilatazione compensatoria che compromette la riserva coronarica. Quando la stenosi diventa tale da occupare più del 70% del lume del vaso viene definita critica: in questa situazione il meccanismo di autoregolazione risulta efficace nel garantire un apporto ematico adeguato al fabbisogno energetico miocardico in condizioni di riposo, ma all'aumento della domanda metabolica miocardica si assiste ad un esaurimento della risposta vasodilatatoria, al crollo della pressione di perfusione e, quindi, all'ischemia del territorio a valle normalmente perfuso dall'arteria stenotica. Si definisce, invece, occlusa l'arteria il cui lume è completamente occupato da un ateroma con assoluta interruzione del flusso ematico, al punto che l'irrorazione dei distretti a valle dell'ostacolo può avvenire esclusivamente grazie

all'eventuale presenza di circoli collaterali, adeguatamente perfusi, oppure con interventi di rivascularizzazione coronarica.

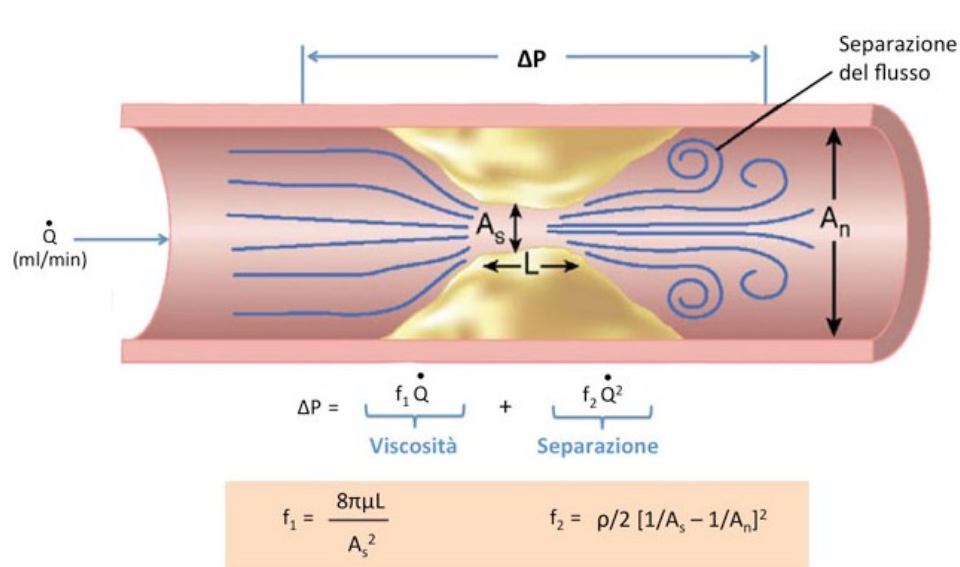


Figura 6. Modificazione del flusso in presenza di una stenosi coronarica illustrata secondo l'equazione di Bernoulli. Il principale determinante della caduta pressoria attraverso un vaso è l'area minima di sezione trasversa in corrispondenza della stenosi.

3.2 Disfunzione del microcircolo coronarico endotelio e non endotelio dipendente

Negli ultimi decenni, l'attenzione si è spostata dal distretto epicardico alla microcircolazione coronarica. Il microcircolo coronarico funge da anello di congiunzione tra il flusso ematico e la domanda metabolica miocardica, rappresentando il sito primario di modulazione del tono vascolare e delle resistenze coronariche e, dunque, della regolazione del flusso coronarico. La disfunzione del microcircolo coronarico (DMC) è ritenuta come possibile primum movens della cardiopatia ischemica, indipendentemente dalla

presenza della patologia aterosclerotica ed è alla base di diverse condizioni clinicamente rilevanti tra cui, ad esempio, l'angina microvascolare, caratterizzata dalla presenza di segni clinici ed elettrocardiografici suggestivi di ischemia in assenza di malattia dei vasi epicardici; può essere causa, nel paziente anziano, con un tipico stato infiammatorio cronico, di uno scompenso cardiaco a frazione d'eiezione conservata⁴⁰; infine, alterando le caratteristiche del flusso ematico coronarico, può promuovere l'inizio e l'evoluzione dell'aterosclerosi nei vasi epicardici, in un rapporto di reciproca influenza, come dimostra una serie di studi che evidenziano come, al tempo stesso, l'aterosclerosi o anche la sola esposizione ai fattori di rischio, possa favorire una disfunzione del microcircolo²².

Dal punto di vista fisiopatologico, la disfunzione del microcircolo è causata da alterazioni strutturali e/o funzionali delle arteriole intramurali. Tra le alterazioni strutturali annoveriamo soprattutto l'ispessimento della tonaca media ed intima, sostenuto dall'ipertrofia della muscolatura liscia e dalla deposizione di collagene⁶. Le alterazioni funzionali, invece, sono riconducibili essenzialmente alla compromissione dei meccanismi regolatori, endotelio dipendenti ed indipendenti⁶, del tono vascolare coronarico, determinando una ridotta vasodilatazione e/o un'eccessiva vasocostrizione.

Nella regolazione endotelio-indipendente, un ruolo chiave è rivestito dall'adenosina, prodotto del metabolismo miocardico, che, legando i recettori A2 del muscolo liscio dei vasi induce la produzione intracellulare di

adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e la fosforilazione della miosinchinasi, determinando il rilasciamento e la vasodilatazione. Inoltre, legando i propri recettori sulle cellule endoteliali, l'adenosina promuove la produzione e il rilascio di l'ossido nitrico (NO).

Nella regolazione endotelio-dipendente, è l'endotelio a rilasciare direttamente sostanze ad azione vasodilatatrice, come l'ossido nitrico, e vasocostrittrice, come le endoteline¹⁰. Oltre all'effetto sul tono vascolare, l'ossido nitrico riduce l'aggregazione piastrinica e l'adesione leucocitaria nelle fasi precoci dell'aterogenesi. Il declino della funzione o dell'attività dell'NO correlano con la disfunzione del microcircolo. Da alcuni studi, infatti, è emerso che a seguito dell' incubazione delle arterie coronarie, ottenute da maiali con aterosclerosi, in L-arginina, precursore dell'ossido nitrico, si ottiene un ripristino della vasodilatazione flusso-mediata. Questo effetto, al contrario, non si manifesta nei controlli sani, oppure in arterie coronarie isolate a cui successivamente si asporta l'endotelio²². Le LDL, soprattutto quelle ossidate, incrementano la produzione di ROS e citochine pro-infiammatorie, riducendo l'espressione endoteliale di eNOS e l'emivita dell'ossido nitrico⁴¹.

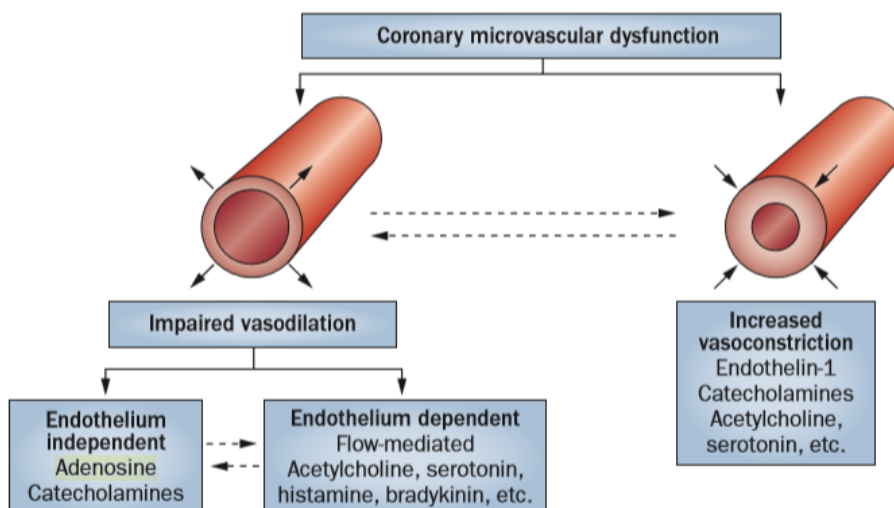


Figura 8. La disfunzione del microcircolo coronarico può derivare da una variabile combinazione tra anomala vasodilatazione e aumentata vasocostrizione.

[Springer, 2014]

Da un punto di vista patogenetico possiamo individuare quattro possibilità riassunte in tabella. (Tabella 1)

DMC	CONDIZIONE CLINICA	MECCANISMI PATOGENETICI
Tipo 1: assenza di patologie del miocardio e di CAD	Angina microvascolare MINOCA	Disfunzione endoteliale Disfunzione delle cellule muscolari lisce Rimodellamento vascolare
Tipo 2: presenza di patologie del miocardio	Cardiomiopatia dilatativa Amiloidosi Miocardite Insufficienza aortica Malattia di Anderson-Fabry	Rimodellamento vascolare Ostruzione del lume del vaso Disfunzione delle cellule muscolari lisce
Tipo 3: presenza di CAD	Angina stabile Sindromi coronariche acute	Ostruzione del lume del vaso Disfunzione delle cellule muscolari lisce
Tipo 4: cause iatrogene	By pass aorto-coronarico Angioplastica coronarica	Disfunzione autonoma Ostruzione del lume del vaso

Tabella 1. Possibili quadri di presentazione della disfunzione microcircolatoria coronarica.

Ad oggi è possibile studiare il microcircolo soltanto utilizzando parametri che sono espressione indiretta della sua funzionalità⁶.

La più accurata tra le tecniche invasive è la flussimetria Doppler intracoronarica, che permette la misurazione della riserva di flusso coronarico (*coronary flow reserve* - CFR), il parametro più utilizzato per lo studio funzionale del microcircolo. La CFR è una misura della capacità del microcircolo di rispondere agli stimoli che determinano una variazione del calibro dei piccoli vasi e si valuta misurando il flusso ematico a riposo ed in condizioni di iperemia massimale, ottenute mediante l'infusione di acetilcolina e adenosina. L'infusione di acetilcolina permette di studiare la vasodilatazione endotelio-dipendente del microcircolo: l'acetilcolina infatti promuove la vasodilatazione stimolando la liberazione endoteliale di ossido nitrico tramite l'enzima eNOS. Negli individui con danno endoteliale tale fenomeno di vasodilatazione del microcircolo è attenuato o, addirittura, può verificarsi una vasocostrizione paradossa delle arterie eventualmente interessate dal processo patologico.

L'infusione di adenosina, invece, garantisce lo studio della vasodilatazione endotelio-indipendente, poiché agisce direttamente sulle miocellule delle arteriole. Nel caso in cui ci fosse una stenosi, l'adenosina causerebbe una riduzione della pressione di perfusione distalmente ad essa e, quindi, una riduzione flussimetrica tanto maggiore quanto più grave è la stenosi. Questa alterata risposta al test si verificherebbe perché il microcircolo a valle del

vaso stenotico si trova già in condizioni basali in uno stato di vasodilatazione massimale e, dunque, non è ulteriormente in grado di aumentare la sua portata, in seguito alla somministrazione di adenosina.

La CFR identifica il rapporto tra il flusso ematico in condizioni di iperemia massimale e il flusso ematico a riposo e normalmente equivale a 5. Un valore inferiore o uguale a 2 è definito patologico. Per migliorare la precisione del parametro, esso dovrebbe essere corretto per il prodotto della pressione sistolica e la frequenza cardiaca⁴⁰.

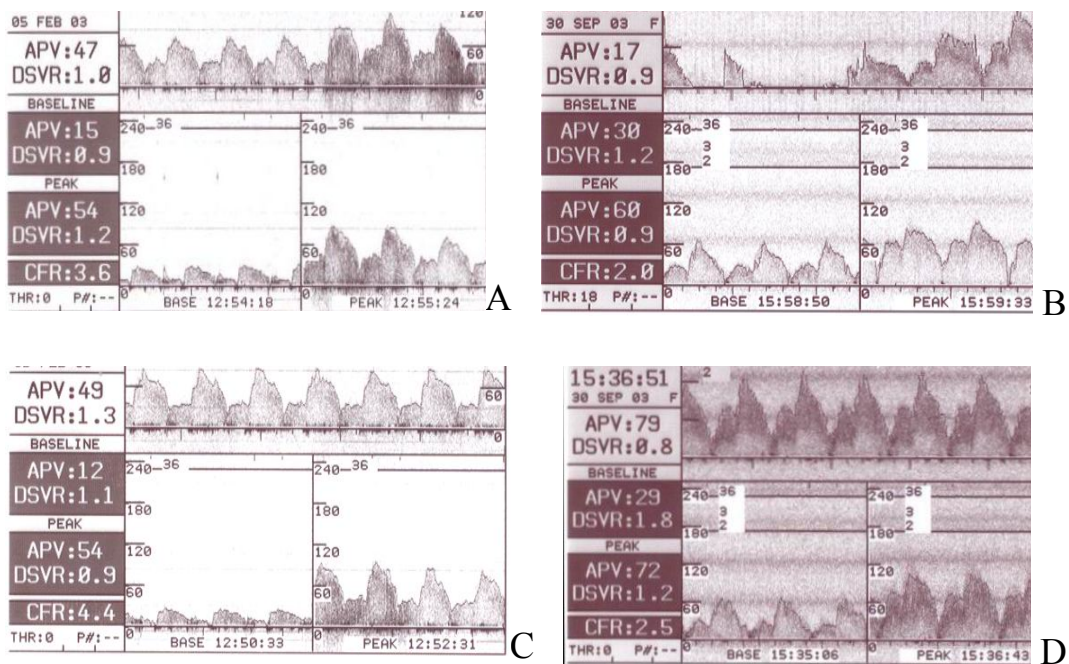


Figura 9. Test con acetilcolina (A-B) e all'adenosina (C-D) in pazienti con coronarie angiograficamente indenni. In A e C riserva coronarica normale. In B e D riserva coronarica alterata .

Valori normali di CFR esprimono l'integrità dei distretti coronarici prossimale e distale, mentre una CFR alterata non consente, solo in quanto tale, di individuare i vasi coinvolti, a meno che non sia già stata angiograficamente esclusa una stenosi epicardica. In quest'ultimo caso, la CFR rappresenta un marker sensibile della disfunzione del microcircolo. Quello che, però, succede nella realtà è che, nella maggior parte dei casi, tale condizione non è isolata, bensì sovrapposta alla patologia ostruttiva epicardica⁶. Oltre al valore assoluto di riserva in un determinato distretto, è sempre necessario misurare la CFR in un vaso di riferimento sano. Il rapporto dei valori del territorio testato e di quello di riferimento è detto CFR relativa (rCFR), il cui valore normale è compreso tra 0.8 e 1.0.

4. Variabilità genetica e cardiopatia ischemica

Come enunciato in precedenza, negli ultimi anni si è realizzato un ribaltamento del punto di vista sull'interpretazione delle basi fisiopatologiche della cardiopatia ischemica, attribuendo una nuova luce al ruolo rivestito dalla suscettibilità genetica. Come è emerso da studi di genome-wide association analysis (GWAS), esistono dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) a carico di alcuni geni, associati alla cardiopatia ischemica, che potrebbero apportare delle informazioni aggiuntive a quelle fornite dai classici fattori di rischio cardiovascolari nella stima del rischio cardiovascolare globale⁴³.

Gli SNPs che predispongono alla CAD interessano delle regioni del genoma le cui alterazioni sono correlate, prevalentemente, con il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia e l'aterosclerosi. La maggior parte degli SNPs predisponenti alla disfunzione del microcircolo, invece, riguarda loci genici che codificano per proteine implicate nella regolazione del flusso ematico coronarico.

4.1 – Polimorfismi genetici e diabete mellito

La presenza di polimorfismi a carico di loci genici implicati nella regolazione del metabolismo glucidico rappresenta un fattore di rischio per la cardiopatia ischemica; tale ruolo è significativamente più rilevante nel determinismo del diabete di tipo 2 (DM2), piuttosto che in quello di tipo 1 (DM1).

Il *growth arrest-specific gene 6 (Gas6)*, mappato sul cromosoma 13q34, codifica per GAS6 che è una proteina vitK-dipendente che interagisce con i recettori tirosin-chinasici della famiglia TAM. È implicata nella regolazione della migrazione, della sopravvivenza e della morte cellulare. In uno studio di Kazakova et al. è emerso che la presenza dell'allele T nel polimorfismo rs8191974 a carico del GAS6 predispone al diabete di tipo 2, verosimilmente alterando le funzioni delle cellule beta pancreatiche, ed alle relative complicanze cardiovascolari⁴⁴.

Lo stesso studio ha dimostrato che il polimorfismo rs2028299 nel gene per l'*adapter-related protein complex 3 subunit sigma-2gene (Ap3s2)*, mappato sul

cromosoma 16q26, che codifica per una proteina di trasporto, è correlato con il diabete mellito poiché associato all'alterata distribuzione intracellulare del recettore insulinico o all'alterata espressione dei micro-RNA, con riduzione della secrezione insulinica⁴⁴.

CDH13 (T-caderina), recettore dell'adiponectina espresso dalle cellule endoteliali e muscolari lisce, modula l'azione dell'adiponectina e regola la secrezione insulinica. Li et al. hanno evidenziato che i polimorfismi rs12596316 (AG), rs11646213, rs3865188, rs12444338, rs12051272 e rs7195409 rappresentano, in diverse popolazioni, dei fattori di rischio per lo sviluppo di sindrome metabolica ed ipertensione. Tuttavia, solo il primo SNP costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo di diabete mellito nella popolazione cinese Han⁴⁵.

Momin et al. hanno identificato due SNPs, +45T/G e +276G/T, situati rispettivamente in corrispondenza del secondo esone e del primo introne del gene AdipoQ, codificante per l'adiponectina, ormone prodotto dal tessuto adiposo, che sono correlati con il diabete di tipo 2 e con la cardiopatia ischemica; solo +45T/G è associato allo sviluppo dell'insulino-resistenza. L'effetto combinato determinato dalla presenza di entrambe le varianti polimorfiche è maggiore rispetto alla presenza del singolo polimorfismo ai fini dello sviluppo del DM2⁴⁶.

Uno studio di Wang et al. ha dimostrato che la presenza dei polimorfismi rs5742612 e rs2288377 del gene codificante per l'*insulin growth factor 1 (IGF1)*

sono correlati con un'alterazione della sensibilità e della secrezione insulinica. Il genotipo TT mostra una maggiore sensibilità insulinica associata ad una ridotta secrezione della stessa rispetto agli alleli C ed A del primo e secondo polimorfismo, rispettivamente, che mostrano una minore sensibilità insulinica correlata ad una maggiore secrezione della stessa⁴⁷.

Il gene PSD3, localizzato sul cromosoma 8p22 ed espresso in vari tipi di tessuti, tra cui il cuore e il pancreas, secondo uno studio di Gong et al. svolgerebbe un ruolo rilevante nella risposta immunitaria in qualità di oncosoppressore. Anche a carico di questo gene esistono polimorfismi correlati con lo sviluppo del diabete di tipo 2 che sono: rs12156368, rs6983992, rs7843239, rs17127410, rs6993670 e rs7009615⁴⁸.

La presenza di varianti alleliche a carico del gene TCF7L2, che codifica per un fattore di trascrizione implicato nella regolazione del *pathway* di WNT, si associa a disfunzione delle cellule beta e conseguente riduzione della secrezione insulinica. Secondo Haddad et al. il polimorfismo rs7903146 di questo gene costituisce la variante allelica maggiormente correlata al diabete di tipo 2, in diverse popolazioni; lo SNP rs2178403 rappresenta, invece, la variante genica più significativa, ai fini della predisposizione al diabete di tipo 2, tra quelle localizzate nella regione del gene PSMD2. Essa interessa, precisamente, il gene EIF4G1, il quale codifica per un complesso enzimatico implicato nel processamento della proinsulina⁴⁹.

Come evidenziato da una review realizzata da Severino et al., esistono polimorfismi a carico di geni codificanti per canali ionici, espressi sia a livello miocardico che nelle isole pancreatiche, che influenzano la regolazione del flusso coronarico e il rischio di sviluppare la cardiopatia ischemica o il diabete. In particolare, la presenza dell'allele A in posizione 1009 del gene KCNJ11 è stata associata allo sviluppo del DM2 e della cardiopatia ischemica dovuta a CAD, mentre lo SNP rs5215_GG è stato più frequentemente osservato in pazienti non diabetici con coronarie esenti da stenosi⁵⁰.

4.2 – Polimorfismi genetici e ipertensione arteriosa

L'ipertensione arteriosa rappresenta uno dei principali e più comuni fattori di rischio sia per la CAD che per la disfunzione del microcircolo. Polimorfismi a carico di diversi geni sono stati chiamati in causa nel definire un quadro di suscettibilità genetica.

AL Refai et al. hanno dimostrato, soprattutto nei soggetti anziani e dislipidemici, come l'allele T nel polimorfismo G894T dell' eNOS sia predisponente per l'ipertensione arteriosa e alla CAD⁵¹.

L'allele A dei polimorfismi rs2779249 e rs2297518 del gene dell'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS), è stato correlato da Wang et al. all'ipertensione arteriosa⁵².

Il gene PHACTR1, invece, modula l'espressione del gene dell'endotelina 1; il suo polimorfismo rs9349379 è associato sia all'ipertensione arteriosa che direttamente alla CAD⁵³.

Risulta correlato all'ipertensione arteriosa essenziale e all'infarto miocardico il gene C4BPA, codificante per la catena alfa di C4BP, proteina della fase acuta, i cui livelli plasmatici sono associati alle due condizioni citate. Il polimorfismo rs73079108, come evidenziato dallo studio di Liu et al., determina l'aumentata espressione del gene e, dunque, l'incremento del rischio di sviluppare l'ipertensione e l'infarto miocardico, soprattutto nelle donne obese. Tuttavia, la presenza dell'allele A nel medesimo polimorfismo rappresenta un fattore protettivo nei confronti delle stesse⁵⁴.

La relazione tra la regione 9.p21.3 e l'ipertensione è stata, invece, analizzata da Bayoglu et al. In questo sito c'è l'RNA non codificante CDKN2B-AS1, implicato nella regolazione epigenetica di altri loci. In particolare, il genotipo AA dei polimorfismi rs10757274 e rs2383207 e il genotipo GG del polimorfismo rs1333049 sono correlati a valori pressori elevati, nonostante la terapia antipertensiva⁵⁵.

Polonikov et al. hanno invece indagato il gene del CYP2C8, membro della famiglia dei citocromi P-450, il cui polimorfismo rs7909236 è stato fortemente associato al rischio di ipertensione arteriosa; inoltre, l'associazione del genotipo TT di quest'ultimo con il genotipo GG del polimorfismo rs4244285

del gene CYP2C19 determina un rischio incrementato rispetto alla presenza isolata di quest'ultimo SNP⁵⁶.

Xia et al. hanno messo in evidenza le varianti ADRA2B (D/I) e ADRB1 (Ser49Arg), a carico del locus che codifica per i recettori adrenergici, che influenzano sia i valori pressori che il metabolismo lipidico, predisponendo alla cardiopatia ischemica⁵⁷.

Recentemente, Li et al. hanno esaltato la significativa associazione tra il polimorfismo Trp64Arg (rs4994) del gene ADRB3 e l'aumentato rischio di ipertensione essenziale, specialmente nella popolazione cinese e caucasica⁵⁸.

Un grosso studio di GWAS ha consentito di individuare nove loci in grado di influenzare i valori di pressione arteriosa: TARID/TCF21 (rs76987554), FRMD3 (rs115795127), LLPH, TMBIM4 (rs113866309), GPR20, CDH17, TCF21, ULK4 ed EVX1/HOXA⁵⁹.

I valori pressori sono stati, inoltre, correlati da Scurrah et al. ad alcuni SNPs a carico dei geni codificanti per le proteine implicate nel sistema renina-angiotensina-aldosterone. Nello specifico, i polimorfismi rs8075924 e rs4277404 del gene dell'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE), e il polimorfismo rs12721297 a carico del gene del recettore 1 dell'angiotensina (AGTR1), correlano con la pressione arteriosa nei maschi; gli SNPs rs11658531 e rs12451328, a carico del gene ACE, invece, sono associati all'ipertensione, rispettivamente nel sesso maschile e femminile⁶⁰.

4.3 – Polimorfismi genetici e dislipidemia

La dislipidemia rappresenta un altro importante fattore di rischio per la CAD e per la disfunzione del microcircolo e, dunque, per la cardiopatia ischemica.

PCSK9 è una proteina implicata nel metabolismo del colesterolo, che lega il recettore per le LDL e lo indirizza alla degradazione. Ci sono due SNPs a carico del corrispettivo gene, rs12067569 e rs505151 (E670G) associati a livelli ematici più elevati di LDL⁶¹.

Olza et al. hanno confermato l'associazione con quattro polimorfismi a carico del gene FTO associato alla massa grassa ed all'obesità, sia nell'adulto che nel bambino: rs9928094, rs9939609, rs930333 e rs9935401⁶².

Hubacek et al. hanno studiato i polimorfismi dei loci SORT1 (rs646776), APOE (rs4420638), CILP2 (rs16996148), APOB (rs693) e LDL-R (rs6511720), confermando, in entrambi i sessi, la loro correlazione con i livelli plasmatici di LDL⁶³.

Guay et al. hanno dimostrato che il polimorfismo c.-20G>A, a carico del locus 19q13.42, favorisce la metilazione del DNA del gene di TNNT1 nei pazienti maschi, affetti o meno da ipercolesterolemia familiare, determinando una calo dei livelli plasmatici di HDL. Gli stessi autori avevano precedentemente dimostrato l'associazione tra la metilazione del DNA del medesimo gene e i livelli circolanti di HDL, indipendentemente dalla presenza del polimorfismo: l'alterazione epigenetica e quella genetica, a carico del

medesimo gene, hanno, dunque, un impatto analogo sui valori di HDL e sul rischio di CAD⁶⁴.

Nella regolazione dell'adipogenesi un ruolo cruciale è rivestito dal coattivatore-3 del recettore nucleare (NCOA3) che controlla il differenziamento e lo sviluppo degli adipociti. Yu et al. hanno dimostrato una forte associazione tra il polimorfismo rs2425955, a carico del gene NCOA3, e l'ipertrigliceridemia⁶⁵.

4.4 – Polimorfismi genetici e aterosclerosi

Il crescente impegno della ricerca internazionale riposto nell'identificazione degli SNPs predisponenti all'aterosclerosi è secondario al nuovo ruolo riconosciuto alla suscettibilità genetica, quale fattore determinante non solo per la patogenesi della malattia, ma anche per la sua evoluzione verso la cardiopatia ischemica.

Wang et al. hanno dimostrato che il polimorfismo 463G/A del gene MPO per la mieloperossidasi, enzima promotore del processo infiammatorio, predispone all'aterosclerosi e, dunque, alla CAD negli asiatici⁶⁶.

Larsson et al., invece, hanno ricercato l'eventuale associazione delle varianti alleliche a carico dei geni implicati nella regolazione dei livelli plasmatici di calcio con la CAD e l'infarto del miocardio. Il loro contributo ha mostrato che complessivamente i loci CYP24A1 (rs1570669), DGKH/KIAA0564 (rs7336933), CASR (s1801725), GATA3 (rs10491003), DGKD (rs1550532),

CARS (s7481584) predispongono ad aumentati valori plasmatici di calcio e, pertanto, possono aumentare il rischio di sviluppare la CAD⁶⁷.

Paquette et al. hanno studiato il locus 9p21.3 nei soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare. Quest'ultimo è il locus maggiormente associato al rischio di sviluppare l'aterosclerosi, e le relative complicanze, nella popolazione normale. Tale rischio risulta ulteriormente amplificato nei soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare e lo SNP rs1333047⁶⁸.

Hansari et al. hanno dimostrato che i polimorfismi a carico di alcuni loci, alterando in modo patologico i livelli plasmatici di alcune citochine, IL-10 e 18 e TNF- α in particolare, sono in grado di predisporre ad una forma precoce di cardiopatia ischemica. APOE (rs7412 e rs429358), CXCL12 rs1746048, SORT1 rs646776, MIA3 rs17465637 sono tutti associati alla CAD e, tra questi, APOE rs429358 è quello che altera maggiormente la concentrazione plasmatica delle citochine⁶⁹.

In uno studio eseguito sulle popolazioni europea, asiatica ed afro-americana, Howson et al. hanno identificato 15 regioni genomiche strettamente correlate alla CAD, all'interno delle quali si trovano geni implicati nella regolazione della risposta infiammatoria, del differenziamento delle cellule muscolari lisce vascolari e della coagulazione, quali DDX59-CAMSAP2, ARHGAP26, PCNX3, LMOD1, ATP1B1, TNS1, PARP12, SERPINH1, SCARB1, DHX38, PECAM1, GOSR2, OAZ2, RBPMS2, C12orf43-HNF1A, PROCR⁷⁰.

Lo studio di Masud et al. ha messo in evidenza la correlazione tra i polimorfismi rs1801133 (C>T) di MTHFR e rs1805087 di MTR, ed i livelli plasmatici di omocisteina, amminoacido coinvolto nella patogenesi dell'aterosclerosi⁷¹.

Li et al. hanno indagato la relazione tra gli SNPs a carico del gene del peptide natriuretico atriale e la CAD, con attenzione al diverso impatto nei due sessi; il genotipo AA del polimorfismo rs198389 a carico del gene NPPB, che codifica per il peptide natriuretico di tipo B, espone solo il sesso femminile ad un maggior rischio di sviluppare la CAD e di andare incontro alla rottura della placca⁷².

Attraverso una meticolosa meta-analisi, Webb et.al hanno identificato 6 nuovi loci correlati con la CAD. La particolarità di questo studio è rappresentata dal fatto che diversi loci sono pleiotropici. Questo aspetto può, dunque, essere utile al fine di facilitare la definizione delle modalità, attraverso le quali, essi possano predisporre alla CAD. I 6 loci identificati sono: 16q13 (CETP), 12q13 (LRP1), 2q37 (KCNJ13-GIGYF2), 12q24 (SCARB1), 11p15 (MRV11-CTR9), 6p21 (C2)⁷³.

4.5 – Polimorfismi genetici e disfunzione del microcircolo

La ridotta biodisponibilità di ossido nitrico è associata ad una riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente, ma anche ad un aumento dello *shear*

stress in sede epicardica, condizione che predispone alla formazione ed all'evoluzione della placca.

Ekmekci et al. hanno dimostrato che la presenza dell'allele "a" del polimorfismo dell'introne 4a/b del gene dell'eNOS, rispetto all'allele *wild-type* "b", è associata ad un'aumentata espressione dell'eNOS, ma ad una compromissione della sua attività, con conseguente ridotto rilascio di ossido nitrico⁷⁴. A quest'ultima condizione predispone anche il polimorfismo T-786C del gene dell' eNOS⁷⁵. Secondo Fedele et al. il polimorfismo rs1799983 (GT) dell'esone 7 (Glu298Asp, CAG-GAT) del gene eNOS/NOS3 è un fattore di rischio indipendente ai fini della disfunzione del microcircolo⁷⁶.

Il fattore di crescita vascolare endoteliale A (VEGFA) ed il relativo recettore sono implicati nei meccanismi di angiogenesi e la loro ridotta funzione può contribuire a determinare la disfunzione del microcircolo. Li et al. hanno osservato la correlazione tra il polimorfismo rs3025039 e la disfunzione del microcircolo in entrambi i sessi, mentre del polimorfismo rs3025028 solo nel sesso maschile⁷⁷.

Il gene ABCG2 codifica per un'*ATP-binding cassette* che trasporta gli steroli ed è espresso anche sulle cellule endoteliali del circolo coronarico. Il polimorfismo Val12Met (rs2231137) è associato a disfunzione endoteliale e ad un aumento del rischio cardiovascolare in individui di razza sia bianca che nera⁷⁸.

Il citocromo CYP2C19, espresso nelle cellule endoteliali, produce gli acidi epossieicosatrienoici (EETs), molecole con esaltata attività anti-infiammatoria, in grado di inibire il fattore di trascrizione pro-infiammatorio NF- κ B, e vasodilatatoria, in quanto promotrici dell'apertura dei canali del potassio calcio-dipendenti⁷⁹. Individui che hanno una duplice perdita allelica del gene CYP2C19 sono considerati metabolizzatori lenti, avendo un'attività enzimatica ridotta e, producendo una minore quantità di EETs, sono predisposti, indipendentemente dai fattori di rischio convenzionali, a sviluppare la disfunzione del microcircolo a causa dell'infiammazione cronica⁸⁰.

Uno studio di Dou et al. ha dimostrato che la disfunzione del microcircolo coronarico è molto più frequente nel paziente anziano, soprattutto se obeso, rispetto al giovane. Il principale meccanismo che causa la DMC in questi pazienti è l'aumento dell'espressione e dell'attività di ADAM17 a livello delle cellule endoteliali dei vasi del tessuto adiposo, conseguenza della riduzione della sua proteina regolatoria, la caveolina 1⁸¹. ADAM17 regola la produzione della frazione solubile del TNF⁸². Un incremento della sua attività, quindi, si associa a livelli ematici elevati di TNF che contribuiscono a sostenere uno stato infiammatorio cronico alla base della disfunzione del microcircolo e della CAD⁸³.

Tra le diverse isoforme di NADPH ossidasi, NOX1 è espresso prevalentemente a livello delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari

lisce dei vasi e rappresenta la principale fonte di anioni superossido in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Nei pazienti con sindrome metabolica, NOX1 è iperespresso sulle cellule endoteliali di vasi del microcircolo in presenza di elevati valori di glucosio e contribuisce a causare il danno endoteliale precoce prima dello sviluppo dell'ipertensione⁸⁴. Uno studio di Thompson et al. ha dimostrato che la somministrazione di un inibitore di NOX1/4 in cavie di laboratorio potenzia la vasodilatazione endotelio-dipendente⁸⁴, normalizzando i livelli di anione superossido e, quindi, ripristinando la produzione di ossido nitrico.

Nei pazienti con cardiomiopatia ipertrofica, invece, la disfunzione del microcircolo coronarico è costantemente presente e correla con una prognosi infausta⁸⁵⁻⁸⁶. Questa condizione è dovuta al fatto che le mutazioni a carico dei geni che codificano per le proteine dei miofilamenti sarcomerici si associano ad una forma di malattia ad evoluzione più rapida⁸⁷ e sono responsabili della fibrosi e del rimodellamento, cause, queste, della severa disfunzione del microcircolo⁸⁸. Le mutazioni di più frequente riscontro nella popolazione analizzata da Olivotto et al. sono quelle a carico di MYBPC3 e MYH7, seguono quelle a carico di MYL2, TNNT2, TNNT3 e TPM1⁸⁶.

Uno studio di Priestley et al. ha evidenziato come la delezione del gene per il fattore nucleare eritroide derivato 2 (NRF2), fattore di trascrizione che regola l'espressione di geni codificanti per complessi enzimatici intracellulari a funzione antiossidante, nelle cavie di laboratorio, giochi un ruolo cruciale nel

danno da stress ossidativo, nella rarefazione dei vasi del microcircolo e nella disfunzione endoteliale⁸⁹.

Il canale del potassio voltaggio-dipendente Kv1.3 ha un ruolo cruciale nel modulare il tono vascolare a livello del microcircolo, in quanto mediatore della relazione tra il flusso ematico coronarico e il metabolismo miocardico. L'attivazione di questo canale è indotta dal perossido di idrogeno. L'esposizione a quest'ultimo di vasi isolati da cavie trattate con un inibitore dei canali del potassio (correolide) o in cui il gene di Kv1.3 è stato deletato, non attivando questi canali, compromette la risposta vasodilatatoria⁹⁰. In questo meccanismo, la perdita di funzione del canale del potassio voltaggio-dipendente Kv1.5 è responsabile della ridotta vasodilatazione H₂O₂-indotta ed ha, quindi, anch'essa un ruolo cruciale nella disfunzione del microcircolo e nella CAD⁹¹.

L'H₂O₂, infatti, se prodotto entro un certo range, regola il flusso ematico coronarico, ma se prodotto in quantità eccessiva è responsabile del danno endoteliale. A tal riguardo, anche il canale TRPV1 media la vasodilatazione H₂O₂-dipendente; quest'ultima risulta ridotta in cavie knock out per il gene TRPV1 e in quelle diabetiche, in cui l'eccessiva produzione di ROS, determina la disfunzione del microcircolo⁹².

5. Obiettivo dello studio

Il presente studio, monocentrico, prospettico, ha come obiettivo la valutazione del ruolo fisiopatologico svolto dai diversi regolatori della riserva di flusso coronarico, tra cui i canali ionici coronarici del potassio, localizzati sulle cellule muscolari lisce e sull'endotelio delle arterie coronarie, nel determinismo di questa patologia. In particolare, lo scopo è quello di evidenziare e confermare la correlazione tra la presenza di specifici polimorfismi a singolo nucleotide nei loci genici che codificano per i canali ionici coronarici del potassio e la suscettibilità per cardiopatia ischemica nei suoi diversi quadri fisiopatologici.

6. Materiali e metodi

In questo studio prospettico, osservazionale, monocentrico, sono stati arruolati pazienti, ammessi nel nostro Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Respiratorie, Nefrologiche, Anestesiologiche e Geriatriche con sospetta cardiopatia ischemica e con l'indicazione a essere sottoposti ad uno studio coronarografico in urgenza o in elezione, secondo le disposizioni delle vigenti linee guida⁹³. Tutti i pazienti rispettavano i criteri di inclusione: età maggiore di 18 anni, origine etno-geografica caucasica, sospetta o documentata diagnosi di cardiopatia ischemica. I criteri di esclusione erano:

patologie cardiache concomitanti su base genetica. Prima di sottoporsi allo studio, tutti i pazienti hanno accettato di partecipare e hanno firmato un consenso informato che includeva gli obiettivi dello studio e i dettagli riguardanti le procedure previste alle quali hanno accettato di sottoporsi (coronarografia, test intracoronarici, analisi genetiche e trattamento dei dati personali). Tutti i dati clinici e strumentali sono stati raccolti in un database dedicato Microsoft Excel. Il protocollo di studio è stato preventivamente approvato dal Comitato Etico.

I pazienti sono stati classificati come affetti da diabete mellito per livelli di glicemia a digiuno superiori a 126 mg/dl in due diverse misurazioni o per l'assunzione di farmaci ipoglicemizzanti. L'ipertensione arteriosa sistemica è stata definita come una pressione sistolica superiore a 140 mmHg e/o una pressione diastolica superiore a 90 mmHg in due diverse misurazioni, o se il paziente assumeva, al momento della nostra valutazione, farmaci antipertensivi. La dislipidemia è stata considerata per valori sierici di colesterolo totale superiori a 200 mg/dl o se il paziente assumeva farmaci per ridurre i livelli di colesterolo. La familiarità per infarto del miocardio è stata definita come l'insorgenza di infarto del miocardio in parenti di primo grado prima dei 60 anni.

6.1 Disegno dello studio

- a) Ogni paziente arruolato ha seguito il normale iter diagnostico-terapeutico in accordo con le linee guida in vigore al momento del ricovero⁹³.
- b) Una valutazione elettrocardiografica ed ecocardiografica è stata effettuata a tutti i pazienti, prima e dopo la coronarografia.
- c) L'angiografia coronarica è stata eseguita utilizzando un accesso arterioso radiale o femorale, mediante l'approccio di Judkins, attraverso l'introduzione di un catetere.
- d) I pazienti che mostravano arterie epicardiche angiograficamente esenti da stenosi, sono stati sottoposti a test funzionali intracoronarici, attraverso una guida angiografica tipo Doppler-flow, al fine di valutare, attraverso la misurazione della CFR, la funzione del microcircolo, sia endotelio-dipendente (con l'infusione intracoronarica di 2.5-10 µg di acetilcolina), sia non-endotelio-dipendente (con l'infusione intracoronarica di 5 µg di adenosina), secondo gli standard internazionali⁹⁴.
- e) Un campione di sangue periferico è stato prelevato, al fine di eseguire le analisi genetiche, a tutti i pazienti arruolati.

Sulla base dei risultati ottenuti mediante coronarografia e test funzionali intracoronarici, i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi.

- Gruppo 1: coronaropatia (CAD), in presenza di almeno una stenosi coronarica maggiore del 50%;
- Gruppo 2: Disfunzione microvascolare coronarica (DMC), con coronarie angiograficamente esenti da stenosi significative (<50%) e in presenza di valori di CFR inferiori a 2.5;
- Gruppo 3: arterie coronariche sia anatomicamente che funzionalmente normali, con valori di CFR maggiori di 2.5.

6.2 Analisi genetica

Conformemente al protocollo di studio, i campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti acido etilendiamminotetracetico (EDTA), secondo le linee guida internazionali riportate in letteratura. I campioni sono stati trasportati presso la BioBanca dell'IRCCS San Raffaele Pisana di Roma o all'Università di Bari e conservati alla temperatura di -80° fino all'estrazione del DNA.

È stata eseguita una vasta ricerca bibliografica, utilizzando PubMed, OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), Entrez SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) al fine di selezionare le varianti geniche implicate nelle vie di trasduzione del segnale, correlate all'attivazione dei canali ionici e/o alla disfunzione del microcircolo e/o ad ischemia miocardica e/o ai diversi fattori di rischio, come il diabete mellito).

I polimorfismi analizzati riguardano i geni KCNJ11 (canale del K⁺ ATP-dipendente, subunità Kir6.2) e KCNE1 (canale del potassio voltaggio-dipendente IKs, subunità β MinK).

I campioni di sangue sono stati estratti mediante l'ISOLATE II genomic DNA kit (Bioline), un kit commerciale basato sull'utilizzo di colonnine a scambio ionico che consentono la purificazione del DNA a partire da 200 μ l di sangue intero secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

6.3 PCR

Le reazioni PCR sono state eseguite mediante l'utilizzo della HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), all'interno di un termociclatore GeneAmp PCR system 9700 (life technologies). Il programma di amplificazione impostato comprende: uno step iniziale di denaturazione a 95°C per 15 minuti, seguito da 32 cicli comprendenti 30 secondi di denaturazione a 94°C, 30 secondi di annealing ad una temperatura specifica per ciascuna coppia di oligonucleotidi, 1 minuto di estensione a 72°C ed uno step finale di estensione di 10 minuti a 72°C.

6.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, versione 21.0.V.20). È stata testata la distribuzione di normalità per tutte le variabili. Se normalmente distribuite, sono state presentate come media +/- deviazione standard (SD). È stata calcolata la

correlazione di Pearson per le variabili selezionate. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0.05$.

Il confronto tra i tre gruppi (G1, G2 e G3) è stato effettuato utilizzando, per le variabili continue, l'analisi della Varianza (ANOVA), per le variabili categoriche, il χ^2 e per l'analisi post-hoc il test di Bonferroni.

Per valutare l'impatto indipendente dei polimorfismi genetici sulla malattia coronarica e sulla disfunzione microvascolare, sono state effettuate l'analisi di regressione logistica univariata e multivariata, correggendo per altre variabili confondenti. Sono stati inseriti i seguenti parametri: età, genere maschile, diabete mellito di tipo 2, ipertensione arteriosa sistemica, dislipidemia, fumo e familiarità per infarto miocardico e i diversi polimorfismi oggetto di studio. Solo le variabili che evidenziavano all'analisi univariata una $p < 0.10$ sono state inserite nell'analisi multivariata come covarianti. Una p bidirezionale < 0.05 è stata considerata come statisticamente significativa.

7. Risultati

In questo studio è stata arruolata una popolazione complessiva di 603 pazienti con sospetta cardiopatia ischemica (Gruppo 1: 409; Gruppo 2: 76; Gruppo 3: 118). Le popolazioni di pazienti sono state confrontate per i fattori

di rischio cardiovascolari, mostrando differenze statisticamente significative per tutti i fattori considerati, ad eccezione dell'obesità ($p=0.528$) (Tabella 2).

I nostri risultati preliminari si riferiscono all'analisi genetica dei polimorfismi rs5215, rs5216, rs5218 e rs5219 del gene KCNJ11 per la subunità Kir6.2 del canale del potassio ATP-dipendente e del polimorfismo S38G del gene KCNE1 per la subunità MInK del canale del potassio IKs (Tabella 3).

Fattori di rischio	Patologia delle arterie epicardiche (G1) n = 409	Disfunzione del microcircolo (G2) n = 76	Arterie coronarie normali (G3) n = 118	p value
Età	68,47 +/- 12,03	62,67 +/- 11,81	59,58 +/- 13,90	< 0.0001
Genere maschile	78.2% (320/409)	42.1% (32/76)	51.7% (61/118)	< 0.0001
Iperensione arteriosa	69.7% (285/409)	93.4% (71/76)	56.8% (67/118)	< 0.0001
Diabete mellito tipo II	33.3% (136/409)	16.0% (12/76)	16.1% (19/118)	< 0.0001
Dislipidemia	58.9% (241/409)	44.0% (33/76)	39.0% (46/118)	< 0.0001
Obesità	11.0% (45/409)	10.5% (8/76)	14.7% (17/118)	0.528
Fumo	49.6% (203/409)	26.7% (20/76)	32.2% (38/118)	< 0.0001
Familiarità	40.8% (167/409)	34.2% (26/76)	28.0% (33/118)	0.032

Tabella 2.

Gene	Subunità	SNP
KCNE1	MInK	S38G_A/A
KCNE1	MInK	S38G_G/A
KCNE1	MInK	S38G_G/G
KCNJ11	Kir6.2	rs5219_A/A
KCNJ11	Kir6.2	rs5219_A/G
KCNJ11	Kir6.2	rs5219_G/G
KCNJ11	Kir6.2	rs5218_C/C
KCNJ11	Kir6.2	rs5218_C/T
KCNJ11	Kir6.2	rs5218_T/T
KCNJ11	Kir6.2	rs5216_C/C
KCNJ11	Kir6.2	rs5216_C/G
KCNJ11	Kir6.2	rs5216_G/G
KCNJ11	Kir6.2	rs5215_A/A
KCNJ11	Kir6.2	rs5215_G/A
KCNJ11	Kir6.2	rs5215_G/G

Tabella 3.

Per ciò che concerne il polimorfismo S38G del KCNE1 e gli SNPs rs5215, rs5218 e rs5219 del KCNJ11, l'analisi genetica, eseguita mediante un'analisi ANOVA, ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi, con dei valori di p value pari a 0.001 per l'S38G e < 0.0001 per rs5215, rs5218 e rs5219 del KCNJ11; per il polimorfismo rs5216 del KCNJ11 non è emersa significatività statistica (p=0.97) (**Tabella 4**).

Subunità/Gene: SNP	Patologia delle arterie epicardiche (G1) n = 409	Disfunzione del microcircolo (G2) n = 76	Arterie coronarie normali (G3) n = 118	p value
MinK/KCNE1: S38G_A/A	10.3% (42/409)	11.8% (9/76)	6.8% (8/118)	0,001
MinK/KCNE1: S38G_G/A	57.7% (236/409)	44.7% (34/76)	73.7% (87/118)	
MinK/KCNE1: S38G_G/G	32.0% (131/409)	43.4% (33/76)	19.5% (23/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_A/A	51.1% (209/409)	36.8% (28/76)	1.7% (2/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/A	43.0% (176/409)	63.2% (48/76)	3.4% (4/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/G	5.9% (24/409)	0.0% (0/76)	94.9% (112/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/C	93.4% (382/409)	94.7% (72/76)	97.5% (115/118)	0,97
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/G	6.6% (27/409)	3.9% (3/76)	2.5% (3/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_G/G	0.0% (0/409)	1.3% (1/76)	0.0% (0/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/C	67.7% (277/409)	48.7% (37/76)	46.6% (55/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/T	29.3% (120/409)	42.1% (32/76)	47.5% (56/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_T/T	2.7% (11/409)	9.2% (7/76)	5.1% (6/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_A/A	11.5% (47/409)	10.5% (8/76)	49.2% (58/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/A	56.2% (230/409)	39.5% (30/76)	25.4% (30/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/G	32.0% (131/409)	50.0% (38/76)	24.6% (29/118)	

Tabella 4.

Successivamente sono stati eseguiti confronti a due gruppi:

- Nel confronto tra G1-G2, sono risultati statisticamente significativi i polimorfismi rs5215 ($p < 0.0001$), rs5218 ($p = 0.005$) e rs5219 ($p = 0.024$) (**Tabella 5**);
- Il confronto tra G1-G3 ha fornito dati sovrapponibili all'analisi a tre gruppi in termini di significatività statistica: S38G $p = 0.006$, rs5215 $p < 0.0001$, rs5218 $p < 0.0001$, rs5219 $p < 0.0001$ (**Tabella 6**);
- Nel confronto G2-G3, sono risultati statisticamente significativi i polimorfismi S38G ($p < 0.0001$), rs5215 ($p < 0.0001$), e rs5219 ($p < 0.0001$) (**Tabella 7**).

Subunità/Gene: SNP	Patologia delle arterie epicardiche (G1) n = 409	Disfunzione del microcircolo (G2) n = 76	p value
MInK/KCNE1: S38G_A/A	10.3% (42/409)	11.8% (9/76)	0,106
MInK/KCNE1: S38G_G/A	57.7% (236/409)	44.7% (34/76)	
MInK/KCNE1: S38G_G/G	32.0% (131/409)	43.4% (33/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_A/A	51.1% (209/409)	36.8% (28/76)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/A	43.0% (176/409)	63.2% (48/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/G	5.9% (24/409)	0.0% (0/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/C	93.4% (382/409)	94.7% (72/76)	0,103
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/G	6.6% (27/409)	3.9% (3/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_G/G	0.0% (0/409)	1.3% (1/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/C	67.7% (277/409)	48.7% (37/76)	0,005
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/T	29.3% (120/409)	42.1% (32/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_T/T	2.7% (11/409)	9.2% (7/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_A/A	11.5% (47/409)	10.5% (8/76)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/A	56.2% (230/409)	39.5% (30/76)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/G	32.0% (131/409)	50.0% (38/76)	

Tabella 5.

Subunità/Gene: SNP	Patologia delle arterie epicardiche (G1) n = 409	Arterie coronarie normali (G3) n = 118	p value
MlnK/KCNE1: S38G_A/A	10.3% (42/409)	6.8% (8/118)	0,006
MlnK/KCNE1: S38G_G/A	57.7% (236/409)	73.7% (87/118)	
MlnK/KCNE1: S38G_G/G	32.0% (131/409)	19.5% (23/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_A/A	51.1% (209/409)	1.7% (2/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/A	43.0% (176/409)	3.4% (4/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/G	5.9% (24/409)	94.9% (112/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/C	93.4% (382/409)	97.5% (115/118)	0,68
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/G	6.6% (27/409)	2.5% (3/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_G/G	0.0% (0/409)	0.0% (0/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/C	67.7% (277/409)	46.6% (55/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/T	29.3% (120/409)	47.5% (56/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_T/T	2.7% (11/409)	5.1% (6/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_A/A	11.5% (47/409)	49.2% (58/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/A	56.2% (230/409)	25.4% (30/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/G	32.0% (131/409)	24.6% (29/118)	

Tabella 6.

Subunità/Gene: SNP	Disfunzione del microcircolo (G2) n = 76	Arterie coronarie normali (G3) n = 118	p value
MinK/KCNE1: S38G_A/A	11.8% (9/76)	6.8% (8/118)	0,001
MinK/KCNE1: S38G_G/A	44.7% (34/76)	73.7% (87/118)	
MinK/KCNE1: S38G_G/G	43.4% (33/76)	19.5% (23/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_A/A	36.8% (28/76)	1.7% (2/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/A	63.2% (48/76)	3.4% (4/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5215_G/G	0.0% (0/76)	94.9% (112/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/C	94.7% (72/76)	97.5% (115/118)	0,97
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_C/G	3.9% (3/76)	2.5% (3/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5216_G/G	1.3% (1/76)	0.0% (0/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/C	48.7% (37/76)	46.6% (55/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_C/T	42.1% (32/76)	47.5% (56/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5218_T/T	9.2% (7/76)	5.1% (6/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_A/A	10.5% (8/76)	49.2% (58/118)	< 0.0001
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/A	39.5% (30/76)	25.4% (30/118)	
Kir6.2/KCNJ11: rs5219_G/G	50.0% (38/76)	24.6% (29/118)	

Tabella 7.

Sono state eseguite l'analisi univariata (**Tabella 8**) e l'analisi multivariata (**Tabella 9**).

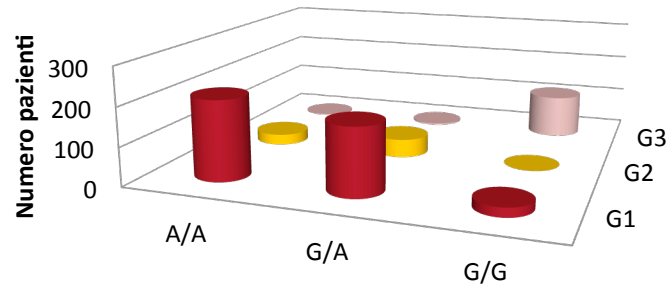
Parametro	OR (IC 95%)	p value
Età	1.049 (1.034-1.064)	<0.001
Genere Maschile	3.9 (2.7-5.6)	<0.001
Iperensione arteriosa		NS
Diabete Mellito	2.6 (1.7-4)	<0.001
Dislipidemia	2 (1.4-2.9)	<0.001
Fumo	2.2 (1.6-3.3)	<0.001
Familiarità	1.57 (1.09-2.17)	0.014
RS 5215 G/A	0.486 (0.29-0.75)	0.014
RS 5215 G/G	0.031 (0.017-0.055)	<0.001

Tabella 8. Analisi univariata

Parametro	OR (IC 95%)	p value
Età	1.051 (1.030-1.073)	<0.001
Genere Maschile	5 (3-8.4)	<0.001
Iperensione arteriosa		NS
Diabete Mellito		NS
Dislipidemia		NS
Fumo	2.7 (2.6-4.5)	<0.001
Familiarità	1.7 (1.07-2.8)	0.026
rs5215_G/A		NS
rs5215_G/G	0.036 (0.018-0.069)	<0.001

Tabella 9. Analisi multivariata

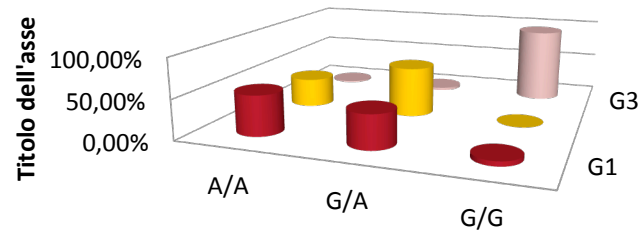
rs5215 (Kir6.2/KCNJ11) = N



	A/A	G/A	G/G
■ G1	209	176	24
■ G2	28	48	0
■ G3	2	4	112

Grafico 1.

rs5215 (Kir6.2/KCNJ11) = %



	A/A	G/A	G/G
■ G1	51,10%	43,00%	5,90%
■ G2	36,80%	63,20%	0,00%
■ G3	1,70%	3,40%	94,90%

Grafico 2.

8. Discussione

La cardiopatia ischemica rappresenta, tra le patologie cardiovascolari, la più frequente causa di morte nei Paesi occidentali¹ ed ha per questo sollecitato la ricerca scientifica a scavare a fondo nei meccanismi fisiopatologici che ne sono alla base. Secondo il convenzionale punto di vista fisiopatologico alla base della cardiopatia ischemica, una placca aterosclerotica, con caratteristiche ostruttive, che ostacola il flusso di sangue attraverso un'arteria coronarica epicardica è la principale responsabile dell'ischemia miocardica. Tuttavia, non sempre è presente una correlazione tra il trattamento delle placche aterosclerotiche coronariche e la risoluzione del quadro clinico, suggerendo che la lesione epicardica può non essere causa esclusiva di ischemia. La presenza di una placca stenotante non implica necessariamente che il paziente andrà incontro ad una patologia cardiaca di tipo ischemico, né è indubbio che eventi ischemici cardiaci siano da imputare in modo certo e prevedibile alla presenza di una placca aterosclerotica coronarica. L'assenza di questa correlazione biunivoca ha condotto alla decentralizzazione dell'attenzione dall'aterosclerosi coronarica e, spingendosi oltre i vasi epicardici, si è iniziato ad esaltare il ruolo svolto dalla microcircolazione coronarica nella patogenesi della cardiopatia ischemica⁶⁻⁷. Infatti, i pazienti senza CAD, ma con compromessa riserva vasodilatatrice coronarica, cioè con DMC, presentano tassi di mortalità equivalenti a quelli con malattia dei vasi

di maggiore calibro. Ciò è emerso, ad esempio, nei risultati dello studio clinico WISE (Women's Ischemia Syndrome Evaluation), che suggeriscono che quasi il 30% dei pazienti che presentano sintomi/segni di cardiopatia ischemica hanno DMC e non CAD⁹⁵. I due fenomeni potrebbero porsi reciprocamente in un rapporto di intercorrelazione per cui la disfunzione del microcircolo coronarico, alterando la distribuzione del flusso sanguigno, può avere un impatto anche a livello delle grandi arterie coronarie, creando condizioni favorevoli per la possibile evoluzione dell'aterosclerosi coronarica; oppure, viceversa, una stenosi aterosclerotica epicardica può favorire la disfunzione del microcircolo a valle. Oltre al passaggio dal macro al microcircolo, si è realizzato un ulteriore salto dal fenotipo al genotipo, considerando la possibilità dell'esistenza di una predisposizione genetica non solo per i convenzionali fattori di rischio per la cardiopatia ischemica, ma anche per la disfunzione del microcircolo¹⁰⁻¹¹. In particolare, l'attenzione è stata rivolta ai polimorfismi dei geni codificanti per i canali ionici, i quali svolgono un ruolo primario nella rapida risposta dell'endotelio e delle cellule muscolari lisce vascolari delle arteriole coronariche alle richieste continuamente fluttuanti del miocardio relativamente al flusso ematico, rappresentando gli effettori finali di tale cross-talk¹²⁻¹³.

Diventa, quindi, intuibile come le varianti alleliche a carico dei geni per questi canali possano costituire uno spunto per un nuovo modello interpretativo della fisiopatologia della cardiopatia ischemica, che attribuisca

un'importanza nuova alla suscettibilità genetica. Il nostro gruppo di ricerca ha già dimostrato, mediante un articolo del 2013, pubblicato sulla rivista scientifica "Basic Research in Cardiology" la correlazione tra i polimorfismi a carico dei loci eNOS/NOS3, Kir6.2/KCNJ11 e Nav1.5/SCN5A e la cardiopatia ischemica⁷⁶.

In continuità con suddetto studio, ampliando la popolazione indagata, è stato possibile confermare la correlazione tra alcuni polimorfismi di geni codificanti per subunità di canali ionici e la suscettibilità per cardiopatia ischemica. In particolare, l'analisi genetica dei geni KCNE1, che codifica per MinK, subunità β del canale del potassio voltaggio-dipendente IKs, e KCNJ11, codificante per la subunità Kir6.2 del canale del potassio ATP-dipendente, ha fatto emergere tra i gruppi studiati (G1: pazienti con placche coronariche; G2: pazienti con coronarie esenti da stenosi e con disfunzione del microcircolo; G3: pazienti con coronarie esenti da stenosi e con normale microcircolo) differenze statisticamente significative per quattro polimorfismi: il polimorfismo S38G del KCNE1, e i polimorfismi rs5215, rs5218 e rs5219 a carico del gene KCNJ11. Nei confronti a due gruppi, tra la popolazione affetta da CAD e quella di soggetti con coronarie anatomicamente e funzionalmente sane sono confermati i precedenti risultati; tra i gruppi G1-G2 si riscontra la significatività per i polimorfismi rs5215, rs5218 e rs5219 del gene KCNJ11; tra i gruppi G2-G3 risultano statisticamente significativi gli SNPs S38G, rs5215 e rs5219 .

In particolare, all'analisi multivariata è emerso che ipertensione arteriosa, diabete mellito e dislipidemia non sono risultati significativi nel determinismo della cardiopatia ischemica nella nostra popolazione e, dunque, nell'appartenenza ai diversi gruppi, rafforzando il dato riguardante la suscettibilità genetica. In modo più interessante, lo SNP rs5215_GG per il KCNJ11 è l'unico polimorfismo che ha rivelato, all'analisi multivariata, una significatività statistica e che si è dimostrato essere un fattore protettivo indipendente per la cardiopatia ischemica, confermando i risultati ottenuti nello studio precedente effettuato su un campione più piccolo di 242 pazienti¹⁰³. Il polimorfismo rs5215_GG del gene KCNJ11 determina la sostituzione di un residuo di isoleucina con la valina all'interno dell'esone 1009 (ATC-GTC)⁹⁶.

9. Conclusioni

Questi risultati confermano il ruolo che i polimorfismi genetici a carico di geni codificanti per i regolatori del cross-talk tra metabolismo miocardico e flusso coronarico, ed in particolare per i canali ionici del potassio voltaggio e ATP-dipendenti, rivestono nel determinismo della cardiopatia ischemica, sommando ai fattori di rischio convenzionali l'impatto degli aspetti genetici. Tali risultati sono ancora preliminari, ma, una volta definitivi, potranno essere utilizzati per la messa a punto di nuovi strumenti finalizzati alla prevenzione della cardiopatia ischemica, alimentando, inoltre, la prospettiva futura di una terapia a target genico per la cardiopatia ischemica con farmaci che agiscono sul canale del potassio KATP.

10. Bibliografia

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146–603.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000485>.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868–74. doi: 10.1038/nature01323.

3. Landmesser U. Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109(21_suppl_1):II-27-II-33. doi: 10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f.
4. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary Plaque Disruption. *Circulation*. 1995;92(3):657–71. doi:10.1161/01.CIR.92.3.657.
5. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(7):1149–60. doi:10.1016/S0735-1097(03)00994-X.
6. Camici PG, d'Amati G, Rimoldi O. Coronary microvascular dysfunction: mechanisms and functional assessment. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12(1):48–62. doi:10.1038/nrcardio.2014.160.
7. Camici PG, Crea F. Coronary Microvascular Dysfunction. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(8):830–40. doi: 10.1056/NEJMra061889.
8. Dean J, Cruz SD, Mehta PK, et al. Coronary microvascular dysfunction: sex-specific risk, diagnosis and therapy. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12(7):406–14. doi: 10.1038/nrcardio.2015.72.
9. Tiefenbacher CP, Chilian WM. Heterogeneity of coronary vasomotion. *Basic Res Cardiol*. 1998;93(6):446–54. PMID: 9879450
10. Goodwill AG, Dick GM, Kiel AM, et al. Regulation of Coronary Blood Flow. *Comprehensive Physiology*; 2017;7(April):321-382. doi:10.1002/cphy.c160016.
11. Tune JD, Gorman MW, Feigl EO. Matching coronary blood flow to

- myocardial oxygen consumption. *Journal of Applied Physiology*. 2004;97(1):404–15. doi:10.1152/japplphysiol.01345.2003.
12. Fedele F, Severino P, Bruno N, et al. Role of ion channels in coronary microcirculation: a review of the literature. *Future Cardiology*. 2013;9(6):897–905. doi:10.2217/fca.13.65.
13. Roden DM, Balser JR, George Jr AL, et al. Cardiac Ion Channels. *Annual Review of Physiology*. 2002;64(1):431–75. doi:10.1146/annurev.physiol.64.083101.145105.
14. Camici PG, Olivotto I, Rimoldi OE. The coronary circulation and blood flow in left ventricular hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012;52(4):857–64. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.028.
15. Bache RJ, Cobb FR. Effect of maximal coronary vasodilation on transmural myocardial perfusion during tachycardia in the awake dog. *Circ Res*. 1977;41(5):648–53. PMID: 332406.
16. Guyton RA, McClenathan JH, Newman GE, et al. Significance of subendocardial S-T segment elevation caused by coronary stenosis in the dog. Epicardial S-T segment depression, local ischemia and subsequent necrosis. *Am J Cardiol*. 1977;40(3):373–80. PMID: 900035.
17. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109–42. PMID: 1852778.

18. Kao CC, Chang LW, Bloodworth JM. The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. Part 2. Electron microscopic observations. *J Neurosurg.*1977;46(6):745–56. doi:67203.
19. Lamping KG, Kanatsuka H, Eastham CL, et al. Nonuniform vasomotor responses of the coronary microcirculation to serotonin and vasopressin. *Circ Res.* 1989;65(2):343–51. PMID: 2752544.
20. Kern MJ. Histaminergic modulation of coronary vascular resistance: are we missing a therapeutic adjunct for the treatment of myocardial ischemia? *J Am Coll Cardiol.* 1991;17(2):346–7. PMID: 1671398.
21. Klocke FJ. Coronary blood flow in man. *Prog Cardiovasc Dis.* 1976;19(2):117–66. PMID: 790459.
22. Kuo L, Davis MJ, Cannon MS, et al. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. Restoration of endothelium-dependent responses by L-arginine. *Circulation Research.* 1992;70(3):465–76. doi:10.1161/01.RES.70.3.465.
23. Brush JE, Cannon RO, Schenke WH, Bonow RO, Leon MB, Maron BJ, et al. Angina Due to Coronary Microvascular Disease in Hypertensive Patients without Left Ventricular Hypertrophy. *New England Journal of Medicine.* 1988;319(20):1302–7. doi: 10.1056/NEJM198811173192002.
24. Dick GM, Bratz IN, Borbouse L, et al. Voltage-dependent K⁺ channels regulate the duration of reactive hyperemia in the canine coronary

- circulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;294(5):H2371–81. doi: 10.1152/ajpheart.01279.2007
25. Saitoh S, Kiyooka T, Rocic P, et al. Redox-dependent coronary metabolic dilation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(6):H3720–5. doi: 10.1152/ajpheart.00436.2007.
26. Fountain SJ, Cheong A, Li J, et al. Kv 1.5 potassium channel gene regulation by Sp1 transcription factor and oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(5):H2719–25. doi:10.1152/ajpheart.00637.2007.
27. Feng J, Liu Y, Clements RT, et al. Calcium-Activated Potassium Channels Contribute to Human Coronary Microvascular Dysfunction After Cardioplegic Arrest. *Circulation*. 2008;118(14_suppl_1):S46–51. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.755827.
28. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Comprehensive Physiology*; 2017;485–581. doi: 10.1002/cphy.c160011.
29. Han G, Kryman JP, McMillin PJ, et al. A novel transduction mechanism mediating dopamine-induced vascular relaxation: opening of BKCa channels by cyclic AMP-induced stimulation of the cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34(5):619–27. PMID:10547076.

30. Barlow RS, El-Mowafy AM, White RE. H₂O₂ opens BK Ca channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2000;279(2):H475–83.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.2.H475>.
31. Thengchaisri N, Kuo L. Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;285(6):H2255–63.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00487.2003>.
32. Gutterman DD, Chabowski DS, Kadlec AO, et al. The Human Microcirculation: Regulation of Flow and Beyond. *Circulation Research*. 2016;118(1):157–72. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305364.
33. Park WS, Son YK, Kim N, et al. Acute hypoxia induces vasodilation and increases coronary blood flow by activating inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2007;454(6):1023–30. doi: 10.1007/s00424-007-0269-4.
34. Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(6):610–21. doi:10.1056/NEJMra052723.
35. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo J-L, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis Associates With Inflammation in Early-

Stage Atherosclerosis Evaluated by Molecular Imaging In Vivo.

Circulation. 2007;116(24):2841–50.

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.732867.

36. Moulton KS. Angiogenesis in atherosclerosis: gathering evidence beyond speculation: *Current Opinion in Lipidology*. ottobre 2006;17(5):548–55. doi:10.1097/01.mol.0000245261.71129.f0.
37. Libby P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2005;111(25):3481–8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878.
38. Kramer MCA, Rittersma SZH, de Winter RJ, et al. Relationship of Thrombus Healing to Underlying Plaque Morphology in Sudden Coronary Death. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(2):122–32. doi:10.1016/j.jacc.2009.09.007.
39. Maintinguer Norde M, Oki E, Ferreira Carioca AA, et al. Influence of IL1B , IL6 and IL10 gene variants and plasma fatty acid interaction on metabolic syndrome risk in a cross-sectional population-based study. *Clinical Nutrition*. aprile 2018;37(2):659–66. doi:10.1016/j.clnu.2017.02.009
40. Rosen SD, Uren NG, Kaski JC, et al. Coronary vasodilator reserve, pain perception, and sex in patients with syndrome X. *Circulation*. 1994;90(1):50–60. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.1.50>
41. Stapleton PA, Goodwill AG, James ME, et al. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *Journal of*

- Inflammation*. 2010;7(1):54. doi: 10.1186/1476-9255-7-54.
42. Chesebro JH, Knatterud G, Roberts R, et al. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge. *Circulation*. 1987;76(1):142–54. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.76.1.142>
43. Kullo IJ, Jouni H, Olson JE, et al. Design of a randomized controlled trial of disclosing genomic risk of coronary heart disease: the Myocardial Infarction Genes (MI-GENES) study. *BMC Medical Genomics*. dicembre;8(1). doi:10.1186/s12920-015-0122-0.
44. Kazakova EV, Zghuang T, Li T, Fang Q, Han J, Qiao H. The Gas6 gene rs8191974 and Ap3s2 gene rs2028299 are associated with type 2 diabetes in the northern Chinese Han population. *Acta Biochimica Polonica*. 2017;64(2):227–31. doi:10.18388/abp.2016_1299.
45. Li Y, Li C, Yang Y, et al. The association of six single nucleotide polymorphisms and their haplotypes in CDH13 with T2DM in a Han Chinese population. *Medicine*. 2017;96(22):e7063. doi:10.1097/MD.0000000000007063.
46. Momin AA, Bankar MP, Bhoite GM. Association of Single Nucleotide Polymorphisms of Adiponectin Gene with Type 2 Diabetes Mellitus, and Their Influence on Cardiovascular Risk Markers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2017;32(1):53–60. doi:10.1007/s12291-016-0573-x.

47. Wang R, Xu D, Liu R, et al. Microsatellite and Single Nucleotide Polymorphisms in the Insulin-Like Growth Factor 1 Promoter with Insulin Sensitivity and Insulin Secretion. *Medical Science Monitor*. 2017;23:3722–36. doi:10.12659/MSM.902956.
48. Gong S, Xu C, Wang L, et al. Genetic association analysis of polymorphisms in PSD3 gene with obesity, type 2 diabetes, and HDL cholesterol. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017;126:105–14. doi:10.1016/j.diabres.2017.02.006.
49. Haddad SA, Palmer JR, Lunetta KL, et al. A novel TCF7L2 type 2 diabetes SNP identified from fine mapping in African American women. Devaney J, curatore. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0172577. doi:10.1371/journal.pone.0172577.
50. Severino P, D'Amato A, Netti L, et al. Diabetes Mellitus and Ischemic Heart Disease: The Role of Ion Channels. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3):802. doi: 10.3390/ijms19030802.
51. ALrefai AA, Habib MSE, Yaseen RI, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene G894T polymorphism with hypertension risk and complications. *Mol Cell Biochem*. 2016;421(1-2):103-110. doi:10.1007/s11010-016-2790-2.
52. Zhai Z, Wang Z, Wang L, et al. Relationship between inducible NOS single-nucleotide polymorphisms and hypertension in Han Chinese. *Herz*. 2017. doi:10.1007/s00059-017-4591-0.

53. Momin AA, Bankar MP, Bhoite GM. Association of Single Nucleotide Polymorphisms of Adiponectin Gene with Type 2 Diabetes Mellitus, and Their Influence on Cardiovascular Risk Markers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2017;32(1):53–60. doi:10.1016/j.cell.2017.06.049.
54. Liu X, Jiang C, Yang P. Association of single nucleotide polymorphisms in the 5' upstream region of the C4BPA gene with essential hypertension in a northeastern Han Chinese population. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(2):1289–97. doi:10.3892/mmr.2017.6736.
55. Bayoglu B, Yuksel H, Cakmak HA, et al. Polymorphisms in the long non-coding RNA CDKN2B-AS1 may contribute to higher systolic blood pressure levels in hypertensive patients. *Clinical Biochemistry*. 2016;49(10–11):821–7. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.02.012.
56. Polonikov A, Bykanova M, Ponomarenko I, et al. The contribution of CYP2C gene subfamily involved in epoxygenase pathway of arachidonic acids metabolism to hypertension susceptibility in Russian population. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2017;39(4):306–11. doi:10.1080/10641963.2016.1246562.
57. Xia K, Ding R, Zhang Z, et al. The association of eight potentially functional polymorphisms in five adrenergic receptor-encoding genes with myocardial infarction risk in Han Chinese. *Gene*. 2017;624:43–9. doi:10.1016/j.gene.2017.04.045.

58. Li Y, Lu X, Wang H, et al. ADRB3 Gene Trp64Arg Polymorphism and Essential Hypertension: A Meta-Analysis Including 9,555 Subjects. *Frontiers in Genetics*. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00106>.
59. Liang J, Le TH, Edwards DRV, et al. Single-trait and multi-trait genome-wide association analyses identify novel loci for blood pressure in African-ancestry populations. *PLOS Genetics*. 2017;13(5):e1006728. doi:10.1371/journal.pgen.1006728.
60. Scurrah KJ, Lamantia A, Ellis JA, et al. Familial Analysis of Epistatic and Sex-Dependent Association of Genes of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System and Blood Pressure. *CLINICAL PERSPECTIVE. Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2017;10(3):e001595. doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001595.
61. Tsai C-W, North KE, Tin A, et al. Both Rare and Common Variants in PCSK9 Influence Plasma Low-Density Lipoprotein Cholesterol Level in American Indians. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;100(2):E345–9. doi:10.1210/jc.2014-3340.
62. Olza J, Ruperez AI, Gil-Campos M, et al. Influence of FTO variants on obesity, inflammation and cardiovascular disease risk biomarkers in Spanish children: a case–control multicentre study. *BMC Medical Genetics*. 2013;14(1). doi:10.1186/1471-2350-14-123.
63. Hubacek JA, Adamkova V, Lanska V, et al. Polygenic hypercholesterolemia: examples of GWAS results and their replication

- in the Czech-Slavonic population. *Physiol Res.* 2017;66(Supplementum 1):S101–11. PMID: 28379035
64. Guay S-P, Légaré C, Brisson D, et al. Epigenetic and genetic variations at the TNNT1 gene locus are associated with HDL-C levels and coronary artery disease. *Epigenomics.* 2016;8(3):359–71. doi:10.2217/epi.15.120.
65. Yu M, Gilbert S, Li Y, et al. Association of NCOA3 polymorphisms with Dyslipidemia in the Chinese Han population. *Lipids in Health and Disease.* 2015;14(1). doi:10.1186/s12944-015-0126-y.
66. Wang Y, Chen X-Y, Wang K, et al. Myeloperoxidase polymorphism and coronary artery disease risk: A meta-analysis. *Medicine.* 2017;96(27):e7280. doi:10.1097/MD.00000000000007280.
67. Larsson SC, Burgess S, Michaëlsson K. Association of Genetic Variants Related to Serum Calcium Levels With Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. *JAMA.* 2017;318(4):371. doi:10.1001/jama.2017.8981.
68. Paquette M, Chong M, Saavedra YGL, et al. The 9p21.3 locus and cardiovascular risk in familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology.* 2017;11(2):406–12. doi:10.1016/j.jacl.2017.01.012.
69. Ansari WM, Humphries SE, Naveed AK, et al. Effect of Coronary Artery Disease risk SNPs on serum cytokine levels and cytokine imbalance in Premature Coronary Artery Disease. *Cytokine.* 2017;

doi:10.1016/j.cyto.2017.05.013.

70. Howson JMM, Zhao W, Barnes DR, et al. Fifteen new risk loci for coronary artery disease highlight arterial-wall-specific mechanisms. *Nat Genet.* 2017;49(7):1113-1119. doi:10.1038/ng.3874.
71. Masud R, Baqai HZ. The communal relation of MTHFR , MTR , ACE gene polymorphisms and hyperhomocysteinemia as conceivable risk of coronary artery disease. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism.* 2017;42(10):1009–14. doi:10.1139/apnm-2017-0030.
72. Li TY, Tse MY, Pang SC, et al. Sex Differences of the Natriuretic Peptide Polymorphism Associated With Angiographic Coronary Atherosclerosis. *Cardiology Research.* 2017;8(1):1–6. doi:10.14740/cr523w.
73. Webb TR, Erdmann J, Stirrups KE, et al. Systematic Evaluation of Pleiotropy Identifies 6 Further Loci Associated With Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology.* 2017;69(7):823–36. doi:10.1016/j.jacc.2016.11.056.
74. Ekmekci A, Güngör B, Özcan KS, et al. Evaluation of coronary microvascular function and nitric oxide synthase intron 4a/b polymorphism in patients with coronary slow flow. *Coronary Artery Disease.* 2013;24(6):461–7. doi:10.1097/MCA.0b013e328363258c.
75. Nurkalem Z, Tangurek B, Zencirci E, Alper AT, Aksu H, Erer B, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene (T-786C) polymorphism in

- patients with slow coronary flow. *Coronary Artery Disease*. 2008;19(2):85–8. doi:10.1097/MCA.0b013e3282f52940.
76. Fedele F, Mancone M, Chilian WM, et al. Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease. *Basic Research in Cardiology*. 2013;108(6). doi:10.1007/s00395-013-0387-4.
77. Li L, Pan Y, Dai L, et al. Association of Genetic Polymorphisms on Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptor Genes with Susceptibility to Coronary Heart Disease. *Medical Science Monitor*. 2016;22:31–40. doi: 10.12659/MSM.895163
78. Dzeja PP, Bast P, Pucar D, et al. Defective Metabolic Signaling in Adenylate Kinase AK1 Gene Knock-out Hearts Compromises Post-ischemic Coronary Reflow. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(43):31366–72. doi:10.1074/jbc.M705268200.
79. Node K, Huo Y, Ruan X, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285(5431):1276-1279.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10455056>. Accessed August 20, 2017.
80. Akasaka T, Sueta D, Arima Y, Tabata N, Takashio S, Izumiya Y, et al. CYP2C19 variants and epoxyeicosatrienoic acids in patients with microvascular angina. *IJC Heart & Vasculature*. 2017;15:15–20.

doi:10.1016/j.ijcha.2017.03.001.

81. Dou H, Feher A, Davila AC, Romero MJ, Patel VS, Kamath VM, et al.

Role of Adipose Tissue Endothelial ADAM17 in Age-Related

Coronary Microvascular Dysfunction Highlights. *Arteriosclerosis,*

Thrombosis, and Vascular Biology. 2017;37(6):1180–93.

doi:10.1161/ATVBAHA.117.309430.

82. Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical Reviews in*

Biochemistry and Molecular Biology. 2010;45(2):146–69.

doi:10.3109/10409231003628015.

83. Voros G, Maquoi E, Collen D, et al. Differential expression of

plasminogen activator inhibitor-1, tumor necrosis factor-alpha, TNF-

alpha converting enzyme and ADAMTS family members in murine

fat territories. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1625(1):36–42. PMID:

12527424.

84. Thompson JA, Larion S, Mintz JD, et al. Genetic Deletion of NADPH

Oxidase 1 Rescues Microvascular Function in Mice With Metabolic

Disease Novelty and Significance. *Circulation Research.* 2017;121(5):502–

11. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309965.

85. Olivotto I, Girolami F, Sciagrà R, et al. Microvascular Function Is

Selectively Impaired in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy

and Sarcomere Myofilament Gene Mutations. *Journal of the American*

College of Cardiology. 2011;58(8):839–48. doi:10.1016/j.jacc.2011.05.018.

86. Olivotto I, Girolami F, Ackerman MJ, et al. Myofilament Protein Gene Mutation Screening and Outcome of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008;83(6):630–8. doi:10.4065/83.6.630.
87. Olivotto I, Cecchi F, Poggesi C, et al. Developmental origins of hypertrophic cardiomyopathy phenotypes: a unifying hypothesis. *Nature Reviews Cardiology*. 2009;6(4):317–21. doi:10.1038/nrcardio.2009.9.
88. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*. 2011;32(4–6):234–46. doi:10.1016/j.mam.2011.10.006.
89. Priestley JRC, Kautenburg KE, Casati MC, et al. The NRF2 knockout rat: a new animal model to study endothelial dysfunction, oxidant stress, and microvascular rarefaction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2016;310(4):H478–87. doi:10.1152/ajpheart.00586.2015.
90. Ohanyan V, Yin L, Bardakjian R, et al. Kv1.3 channels facilitate the connection between metabolism and blood flow in the heart. *Microcirculation*. 2017;24(4):e12334. doi:10.1111/micc.12334.
91. Nishijima Y, Cao S, Chabowski DS, et al. Contribution of K V 1.5 Channel to Hydrogen Peroxide–Induced Human Arteriolar Dilation and Its Modulation by Coronary Artery Disease Novelty and

Significance. *Circulation Research*. 2017;120(4):658–69.

doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309491.

92. DelloStritto DJ, Connell PJ, Dick GM, et al. Differential regulation of TRPV1 channels by H₂O₂: implications for diabetic microvascular dysfunction. *Basic Research in Cardiology*. 2016;111(2).

doi:10.1007/s00395-016-0539-4.

93. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Circulation*.

2011;124(23):574-651. doi:10.1161/CIR.0b013e31823ba622.

94. Kern MJ, Lerman A, Bech J-W, et al. Physiological assessment of coronary artery disease in the cardiac catheterization laboratory: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Diagnostic and Interventional Cardiac Catheterization, Council on Clinical Cardiology. *Circulation*. 2006;114(12):1321-1341.

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.177276.

95. Gulati M, Shaw LJ, Bairey Merz CN. Myocardial Ischemia in Women: Lessons From the NHLBI WISE Study. *Clinical Cardiology*.

2012;35(3):141–8. doi: 10.1002/clc.21966.

96. Hansen L, Echwald SM, Hansen T, et al. Amino Acid Polymorphisms

in the ATP-Regulatable Inward Rectifier Kir6.2 and Their Relationships to Glucose- and Tolbutamide-Induced Insulin Secretion, the Insulin Sensitivity Index, and NIDDM. *Diabetes*. 1997;46(3):508–12.
doi:10.2337/diab.46.3.508.