



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento Struttura Clinica Medica – Patologia Speciale Medica

Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Medica  
XXI ciclo

Tesi finale di Dottorato

**Effetto del genotipo sulla massa ventricolare sinistra e  
sugli eventi cardiovascolari nell'ipertensione arteriosa  
essenziale**

Coordinatore:  
*Prof. Nicola Glorioso*

Relatore:  
*Prof. Nicola Glorioso*

Dottorando:  
*Dr.ssa Emanuela Bulla*

Anno Accademico 2007-2008

## **INDICE**

<b>Sommario</b>	<b>pg 1</b>
<b>Introduzione</b>	<b>pg 2</b>
Polimorfismo C-344T del gene CYP11B2	<b>pg 6</b>
Polimorfismo ACE I/D del gene ACE	<b>pg 6</b>
Polimorfismo AGT-6 dell' AGT	<b>pg 7</b>
Polimorfismo A1166C del recettore AT1R	<b>pg 7</b>
<b>Scopo dello studio</b>	<b>pg 8</b>
<b>Pazienti e Metodi</b>	<b>pg 9</b>
Prima visita e visite di controllo	<b>pg 10</b>
Fattori di rischio cardiovascolare valutati nella coorte	<b>pg 11</b>
Eventi cardiovascolari valutati nella coorte	<b>pg 11</b>
Ecocardiografia	<b>pg 12</b>
Genotipizzazione	<b>pg 12</b>
<b>Analisi statistica</b>	<b>pg 12</b>
<b>Risultati</b>	<b>pg 14</b>
<b>Discussione</b>	<b>pg 16</b>
<b>Tabelle</b>	<b>pg 19</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pg 22</b>

## SOMMARIO

L'aumento della massa ventricolare sinistra (MVS) è presente nel 20-25% degli ipertesi non trattati e influisce sulla morbilità e mortalità cardiovascolare. È influenzata dai mineralcorticoidi, dal bilancio del sodio, dall'angiotensina II, da fattori genetici ed emodinamici. L'associazione dei geni del sistema renina-angiotensina-aldosterone con la massa ventricolare sinistra è stata valutata da numerosi autori ma rimane controversa per scarsa numerosità nelle diverse coorti e per il disegno dello studio (metodologia e stratificazione; eterogeneità genetica). Nelle malattie poligeniche come l'ipertensione arteriosa essenziale, geni ad "effetto minore" interagiscono per determinare un comune fenotipo per mezzo di variazioni nei prodotti genici e/o nella regolazione post-trascrizionale: l'associazione fenotipo/genotipo può essere nascosta nella complessità della rete biologica benché funzionalmente presente.

Scopo dello studio: valutare gli eventi cardiovascolari e la massa ventricolare sinistra in funzione di polimorfismi del sistema renina-angiotensina-aldosterone in una coorte di pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale, mai trattati, geneticamente omogenei e con follow-up di 8 anni..

Metodi: abbiamo analizzato le schede ambulatoriali di 473 pazienti ipertesi mai trattati con farmaci antipertensivi (età:  $47.3 \pm 9.8$  anni; M/F: 257/172; PAS media alla prima visita: 156 mmHg; follow-up medio: 8 anni ). Tutti i dati sono stati riportati su file elettronico.

Risultati: l'analisi, sia come tratto continuo sia come tratto discreto, ha mostrato una associazione della MVSh<sup>2,7</sup> con il polimorfismo A1166C del gene AT1R ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , rispettivamente). Tutti gli altri polimorfismi non sono risultati associati con la massa ventricolare sinistra. I singoli polimorfismi genetici non hanno mostrato una associazione con gli eventi totali, anche analizzati in relazione alla massa cardiaca.

Conclusioni: i nostri dati confermano che la massa ventricolare sinistra è un determinante di danno cardiovascolare ed indicano che la regolazione genetica della massa cardiaca e degli eventi cardiovascolari non è svelabile con un semplice studio di associazione fenotipo-genotipo.

## INTRODUZIONE

L'ipertensione arteriosa essenziale è una malattia multifattoriale poligenica da interazione genetico-ambientale, che mostra una prevalenza media di circa il 20% fra la popolazione adulta al di sotto dei 65 anni nei paesi industrializzati (20% in Inghilterra<sup>1</sup>, 24% negli USA<sup>2</sup>). La sua prevalenza è maggiore nei soggetti anziani (oltre 35% fra la popolazione adulta al di sopra dei 65 anni) e nella razza nera<sup>2</sup>. A causa del graduale e costante incremento della vita media nel mondo occidentale, la prevalenza dell'ipertensione arteriosa è andata quindi crescendo nelle ultime decadi e tale trend appare stabile anche per il prossimo futuro. In base a questi dati, l'ipertensione arteriosa è definibile come una malattia di rilevante impatto sociale ed economico. Anche se nell'aggettivo "essenziale" è sottintesa una imperfetta conoscenza delle cause che provocano questa malattia vi è tuttavia accordo sulla sua origine primitivamente legata ad un difetto del trasporto renale del sodio di verosimile natura genetica<sup>34</sup>. E' ormai accertata la sua caratteristica familiare alla base della quale è probabile la natura poligenica: più precisamente, polimorfismi in molti geni a "piccolo effetto fenotipico individuale" attuerebbero una interazione epistatica realizzando così il fenotipo finale della alta pressione arteriosa<sup>3</sup>. Questi concetti sono emersi ormai da diversi anni sulla base di studi epidemiologici in cui la pressione dei genitori veniva messa a confronto con quella dei figli ed in gemelli mono e dizigotici<sup>4</sup> e, più recentemente, per mezzo di studi di associazione fra polimorfismi o mutazioni geniche e livelli di pressione arteriosa in coorti di pazienti di varie etnie<sup>5</sup>. Coerentemente con la teoria di una natura poligenica dell'ipertensione arteriosa essenziale, è stato anche riportato come le stesse varianti geniche che si associano all'ipertensione arteriosa essenziale sarebbero anche responsabili di alterazioni di fenotipi intermedi determinanti nello sviluppo della malattia<sup>3,6</sup>. In alcune etnie, in particolare, il polimorfismo G460W della catena  $\alpha$  della proteina citoscheletrica adducina ha mostrato una associazione positiva sia con i livelli di pressione arteriosa (fenotipo finale)<sup>7</sup> e/o con una maggiore attività dei sistemi cellulari di trasporto del sodio (fenotipo intermedio più vicino al gene)<sup>8</sup> sia con la sodio-sensibilità valutata per mezzo del test di infusione acuta di un carico salino<sup>7</sup> sia con la risposta alla terapia cronica con diuretici tiazidici (fenotipo intermedio più distante dal gene)<sup>9</sup>. La stessa variante ha mostrato una interazione con il marcatore del locus della NaK ATPasi sotto il profilo dello sviluppo di pressione arteriosa più elevata, di una attivazione selettiva della pompa NaK ATPasi e della risposta alla terapia diuretica cronica con tiazidi<sup>9</sup>. A sua volta il marcatore del locus della NaK ATPasi è stato visto interagire con

il marcatore del locus del cotrasportatore renale NaK2Cl<sup>10</sup>: questo insieme di dati fornisce un primo paradigma molecolare di interattività epistatica poligenica ed un robusto supporto di evidenza alla teoria che vede in un errore iniziale di handling renale del sodio la causa principale dello sviluppo di alti valori di pressione arteriosa nella razza umana.

Il fatto che il polimorfismo G460W dell'  $\alpha$ -adducina non abbia mostrato in alcune etnie le stesse associazioni con i fenotipi intermedi (variazioni nella attività dei trasportatori del sodio, sodio-sensibilità acuta e risposta alla terapia diuretica cronica con tiazidi) e/o con il fenotipo finale (ipertensione arteriosa) supporta il concetto secondo cui alla base dello sviluppo dei valori elevati di pressione arteriosa esistano diverse alterazioni geniche che condizionano diverse alterazioni fisiopatologiche tutte in grado di concorrere allo sviluppo dello stesso fenotipo finale. Fra le alterazioni geniche principali alla base di variazioni fisiopatologiche rilevanti citiamo le mutazioni a carico del gene dell'angiotensinogeno<sup>6</sup>, dei recettori  $\beta$  adrenergici<sup>11</sup> e delle G proteine ad essi accoppiate<sup>12,13</sup>.

Qualunque possa essere la conclusione di questa complessa ed affascinante "storia fisiopatogenetica" dell'ipertensione arteriosa essenziale, va comunque sottolineato come una importanza determinante per il suo manifestarsi sia svolta da "fattori ambientali". Questi ultimi sono identificabili in tutte quelle componenti della nostra esistenza che per la loro natura possano interagire con le varianti genetiche e concorrere con esse allo sviluppo del fenotipo finale. Fra i più importanti citiamo il sale alimentare, l'eccesso ponderale, il fumo di sigaretta etc. Da molto tempo sappiamo, inoltre, che un buon controllo di questi ultimi è da solo in grado di arrivare al controllo completo della pressione arteriosa in circa il 35% dei pazienti ipertesi<sup>14</sup>. Un approccio moderno e clinicamente plausibile, quindi, comporta l'uso di terapia antiipertensiva soltanto dopo che il semplice approccio iniziale conservativo, vale a dire basato sulla correzione dei fattori ambientali, si sia rivelato non sufficiente per una normalizzazione della pressione arteriosa. Questo approccio "conservativo" verso i pazienti portatori di ipertensione arteriosa essenziale è supportato dai dati rilevanti emersi verso la fine degli anni '80 nel contesto dello INTERSALT Study: una coorte di circa 10000 pazienti con ipertensione arteriosa essenziale con profilo di basso rischio veniva avviata a modifiche alimentari (riduzione del sodio ed incremento del potassio, riduzione calorica): alla fine del follow-up di circa tre anni veniva dimostrato che alle modifiche alimentari praticate si associava nell'intera coorte una riduzione del peso corporeo di circa 2 Kg, di circa 3 mmHg nella pressione sistolica e di circa 2 mmHg nella pressione diastolica, statisticamente fortemente significative. Queste variazioni a loro volta si associavano ad una riduzione

statisticamente significativa degli eventi cerebrovascolari ma, ancora più rilevante, anche degli eventi coronarici. E' importante ricordare, a questo proposito, come dalle metanalisi dei trials controllati sull'ipertensione arteriosa sia emerso come il guadagno sulla prevenzione degli eventi coronarici ottenibile con mezzi unicamente farmacologici sia stato fin'ora deludente: i farmaci antiipertensivi sia di vecchia che di nuova generazione, infatti, non portano ad una riduzione statisticamente significativa degli eventi coronarici nei pazienti con età inferiore ai 65 anni. Questo fa immaginare facilmente come sia l'effetto farmacologico sia l'effetto della modifica "ambientale" prodotta dall'alimentazione agiscano in definitiva su patterns genetici di suscettibilità al danno d'organo che possono essere disgiunti almeno in parte dai patterns genetici che modificano unicamente la pressione arteriosa.

Sia le varianti geniche, per lo meno alcune di esse, sia i fattori ambientali esplicano inoltre un effetto di attivazione delle proteine di adesione cellulari innescando così una catena di eventi che risulta determinante nello sviluppo del danno d'organo<sup>3</sup>. Il controllo dell'ipertensione arteriosa, e con esso la disattivazione dei processi di attivazione delle molecole di adesione, risulta quindi determinante nella riduzione degli eventi cerebrovascolari, cardiaci e renali associati con l'ipertensione arteriosa stessa<sup>3</sup>. Riteniamo utile sottolineare, a questo proposito, come nell'ultimo decennio si siano resi disponibili i dati di diversi trials controllati e randomizzati relativi all'efficacia dei farmaci antiipertensivi nella terapia dell'ipertensione arteriosa dell'anziano sia verso placebo sia verso altro farmaco: da questo corpo di evidenza emerge la conclusione assolutamente concorde che in particolare nell'anziano una corretta riduzione della pressione arteriosa si accompagna ad una netta riduzione degli eventi cardiaci, cerebrali e renali<sup>15.20.23</sup>. La riduzione dei valori pressori è significativamente associata ad una minore incidenza di eventi cardiovascolari<sup>18</sup>. Diversi trials randomizzati hanno dimostrato gli effetti del trattamento antipertensivo nella prevenzione primaria del danno d'organo, anche se in misura diversa nei vari distretti (riduzione del 38% degli stroke fatali e non fatali, 16% degli eventi coronarici fatali e non fatali, 21% della morte per malattia coronarica, 52% dello scompenso cardiaco congestizio)<sup>19.20</sup>, e quindi la sua efficacia nel ridurre la mortalità e morbilità cardiovascolare<sup>21</sup>.

Il beneficio del trattamento antipertensivo inoltre risulta maggiore se si tiene conto della stratificazione del rischio menzionata nel VI report del Joint National Committee, ripreso poi nel VII Report<sup>22</sup>: si è resa possibile, ormai da molto tempo, una analisi composita della rilevanza della pressione arteriosa sistolica e diastolica, così come della presenza o assenza di fattori di rischio cardiovascolare aggiuntivi e dalla presenza o assenza di pregressi eventi e/o

di danno d'organo nello sviluppo di futuri eventi. I benefici del trattamento antipertensivo nel ridurre la pressione arteriosa sono ben definiti specialmente nei pazienti ad alto rischio<sup>23</sup>. I pazienti ipertesi trattati hanno una maggior frequenza di complicanze cardiovascolari rispetto ai pazienti non ipertesi: questo potrebbe essere dovuto al fatto che non si è raggiunto un perfetto controllo pressorio oppure ad un residuo danno d'organo come l'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS) o ad entrambi. La IVS è una manifestazione cardinale di malattia cardiovascolare pre-clinica e fattore di rischio indipendente per tutte le complicanze cardiovascolari nell'ipertensione arteriosa<sup>24</sup>. È presente nel 20-25% dei pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale, ma solo in parte è correlata con i valori di pressione e predice gli eventi.<sup>25-26</sup> La massa ventricolare può essere considerata come un marker tempo-integrato di esposizione ad alti valori di pressione arteriosa ed un indicatore sensitivo di danno d'organo cardiaco. Nonostante l'attuale evidenza suggerisca che il carico emodinamico sia lo stimolo iniziale alla sequenza di eventi biologici che portano allo sviluppo di IVS, tuttavia la pressione arteriosa non spiega parte della variabilità della massa cardiaca; è più plausibile che la massa ventricolare sinistra sia il risultato della complessa relazione tra fattori ambientali e fattori genetici. Determinanti conosciuti e postulati dell'ipertrofia ventricolare sinistra includono la razza, il sesso, l'età, la pressione arteriosa, la massa corporea, il trattamento anti-ipertensivo, l'attività fisica, il consumo alcolico, il fumo, l'introito di sale. È ben stabilito che la massa ventricolare incrementa il consumo miocardico di ossigeno<sup>27</sup>, ed è associata con un incremento delle lesioni aterosclerotiche cardiache ed extracardiache. Mentre nella malattia cardiaca ipertensiva la crescita dei cardiomiociti sembra essere correlata con il carico ventricolare, nell'ipertensione sperimentale il processo fibrotico è sotto il controllo del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) ed in particolare dell'aldosterone e dell'angiotensina II.<sup>28</sup> Nell'ipertensione arteriosa essenziale l'evidenza di un ruolo di supporto dell'aldosterone nella regolazione della massa ventricolare sinistra è meno forte<sup>29</sup>. È stato ipotizzato che altri ligandi oltre all'aldosterone, come il cortisolo, attivano i recettori mineralcorticoidei (MR) nei pazienti ipertesi con ridotta attività dell'11 $\beta$ -HSD2, i quali esercitano effetto mineralcorticoideo sulla massa cardiaca. La coesistenza di entrambi gli MR e dell'11 $\beta$ -HSD2 a livello cardiaco supporta questa ipotesi<sup>30-31</sup>. È stato dimostrato che i glucocorticoidi possono prendere parte nella regolazione della massa ventricolare sinistra attraverso i MR; l'attivazione di quest'ultimo regolato dall'11 $\beta$ -HSD2 potrebbe contribuire al danno d'organo associato all'ipertensione arteriosa essenziale<sup>32</sup>.

Diversi studi hanno suggerito un effetto diretto dell' angiotensina II sulle proteine di sintesi miocardiche e suggeriscono che questo potrebbe essere indipendente dall'influenza adrenergica. Una significativa riduzione della massa ventricolare sinistra si ha in 13 di 16 trials con ACE-i o Beta-bloc contro 2 di 10 trials con diuretici o vasodilatatori<sup>33</sup>. Considerando il ruolo fisiopatologico che riveste il RAAS , sia circolante che tissutale, nell'influenzare la struttura ventricolare , i polimorfismi genetici di questo sistema sono dei logici candidati per ulteriore studi sulla possibile relazione con l'IVS. In particolare polimorfismi di geni che codificano per l'aldosterone sintasi (CYP11B2), per l'enzima convertente l'angiotensina II (ACE), per l'angiotensinogeno sintetasi (AGT) e per il recettore dell'angiotensina II (AGTR1) possono avere un ruolo rilevante nello studio di fenotipi cardiovascolari come la massa ventricolare sinistra.

#### *Polimorfismo C-344T del gene CYP11B2:*

Particolare attenzione è stata posta sull'aldosterone in quanto dimostrato che la fibrosi vascolare e miocardica può essere indotta da questo ormone<sup>36</sup>Lo studio RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study) ha dimostrato che l'associazione tra farmaci antagonisti dell'aldosterone ed ACE-inibitori possono ridurre la mortalità e la morbilità per scompenso cardiaco; questo risultato non sembra essere dovuto all'azione dello spironolattone sul bilancio renale del sodio e del potassio , ma sembrerebbe implicata un'azione cardioprotettiva diretta di questo farmaco<sup>37</sup> È stata inoltre dimostrata una aumentata produzione di aldosterone nel ventricolo sinistro di pazienti ipertesi, rispetto ai soggetti normotesi<sup>38</sup> Sono diversi i polimorfismi del CYP11B2, ma quello maggiormente studiato è la variante C-344T. Il polimorfismo C- 344T è localizzato nel promotore del gene del CYP11B2 ed è stato associato con una incrementata produzione di aldosterone : in particolare, l'allele T si associa con incrementati livelli plasmatici di aldosterone<sup>39</sup>

#### *Polimorfismo ACE I/D del gene ACE.*

Il polimorfismo I/D, una inserzione o delezione di 287 paia di basi nell'introne 16 del gene dell'ACE sul cromosoma 17 è il polimorfismo di gran lunga più studiato in relazione alla massa ventricolare sinistra. Studi precedenti hanno evidenziato una correlazione positiva tra l'allele D ed i livelli di enzima convertente l'angiotensina II sia a livello plasmatici che intralinfocitario. D'altro canto una maggiore attività dell'ACE potrebbe portare ad una maggiore sintesi di angiotensina II, la quale è un potente vasocostrittore ed un attivatore sia del



riassorbimento del sodio che della crescita cellulare. Questi effetti patofisiologici e la disponibilità sia di ACE-inibitori che di bloccanti del recettore AT1 probabilmente spiega il così ampio interesse per il polimorfismo ACE I/D. Nonostante ciò i risultati sull'associazione tra questo polimorfismo e la massa ventricolare sinistra è alquanto controversa.

#### *Polimorfismo AGT-6 dell' AGT.*

Il clivaggio dell'angiotensinogeno da parte della renina è il passaggio chiave della cascata enzimatica che porta alla formazione di angiotensina II. Di conseguenza vi è una relazione positiva tra i livelli plasmatici di angiotensinogeno e di angiotensina II, per cui il gene AGT è un buon candidato per la determinazione genetica della massa ventricolare sinistra. Il polimorfismo AGT G-6A rappresenta la sostituzione di una guanina con una adenina 6 paia di basi prima dell'inizio del sito di trascrizione. Questa sostituzione nucleotidica si traduce in una incrementata trascrizione del gene, la quale, a sua volta, potrebbe spiegare l'incrementata concentrazione plasmatica dell'angiotensinogeno nei portatori di tale variante genetica.

#### *Polimorfismo A1166C del recettore AT1R.*

Poiché l'angiotensina II stimola il riassorbimento del sodio e la crescita cellulare attraverso il legame con il recettore AT1, è del tutto plausibile ipotizzare che varianti genetiche del rispettivo gene (AGTR1) possano essere associate alla massa ventricolare sinistra. L'AGTR1 è localizzato nel braccio lungo del cromosoma 3 ed è composto da 5 esoni e 4 introni. Sono stati identificati diversi polimorfismi di questo gene, ma la variante A1166C è stata la più studiata in relazione alla pressione arteriosa ed alla massa ventricolare sinistra<sup>40,41</sup>

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Obiettivo di questa tesi è stato valutare l'associazione di polimorfismi genetici del RAAS con la massa ventricolare sinistra e con gli eventi cardiovascolari in una coorte di pazienti ipertesi mai trattati precedentemente e provenienti da zone del Centro Nord Sardegna, ritenute a genoma omogeneo, integrando questa possibile associazione con lo studio di fenotipi intermedi pertinenti <sup>35</sup>.

## PAZIENTI E METODI

In un periodo di tempo che va dal 1996 sino al 2000 sono stati arruolati quattrocentosettantatre pazienti con diagnosi di ipertensione arteriosa essenziale presso il Centro Ipertensione e Prevenzione delle complicanze cardiovascolari, ASL n°1/Università degli Studi di Sassari, dopo aver approvato e firmato il consenso informato. I pazienti sono tutti originari del Nord Sardegna, non imparentati e di entrambi i sessi.

I criteri di inclusione sono stati: pressione arteriosa misurata da seduto  $> 140/90$  mmHg (media di tre misurazioni) sia alla prima visita che anche alla fine di otto settimane di periodo osservazionale; nessuna terapia farmacologica antiipertensiva; diagnosi di ipertensione arteriosa ad una età inferiore ai 60 anni per escludere casi di ipertensione sistolica isolata.

I criteri di esclusione sono stati: ipertensione arteriosa sintomatica da richiedere un immediato trattamento farmacologico, in accordo con le linee guida internazionali; evidenza clinica, laboratoristica o strumentale di comorbidità maggiori, patologie cardiache, renali ed epatiche; ipertensione arteriosa secondaria.

Dopo la prima visita, è stato portato avanti un periodo osservazionale di 8 settimane per due motivi: in primo luogo per espletare un percorso diagnostico atto ad escludere le maggiori forme di ipertensione arteriosa secondaria; in secondo luogo per non includere nello studio pazienti non realmente ipertesi, infatti, come riportato in letteratura, la probabilità di sovrastimare la pressione arteriosa alla prima visita è di circa il 40%.

Durante il periodo di osservazione ogni 2 settimane è stato misurato il sodio urinario dalla raccolta delle urine delle 24 ore, la pressione arteriosa (misurata con il paziente seduto da almeno 5 minuti, ottenuta calcolando la media di tre misurazioni effettuate con 1 minuto di intervallo l'una dall'altra, dalla stessa infermiera, usando un apparecchio elettronico validato), il peso corporeo; l'altezza è stata rilevata alla prima visita. In tutto questo periodo è stato chiesto al paziente di continuare con la propria dieta alimentare usuale.

Al termine del periodo osservazionale è stata valutata con l'ecocardiografia la massa ventricolare sinistra, è stato effettuato un prelievo di sangue venoso per il dosaggio dell'aldosterone e della attività reninica plasmatica (PRA) - quest'ultima ottenuta dopo che il paziente è rimasto sdraiato per almeno un'ora -. E' stato inoltre chiesto il consenso informato per il prelievo di sangue finalizzato alla genotipizzazione (vedi dopo). Per ogni paziente è stato valutato il rischio cardiovascolare applicando la formula

dell'ATP III e che prende in considerazione il sesso, l'età, la pressione arteriosa sistolica, terapia farmacologica antiipertensiva, fumo, colesterolo totale ed HDL.

Dopo il periodo di 8 settimane veniva prescritta la terapia farmacologica secondo le linee Guida Internazionali<sup>22</sup> ed ugualmente nei successivi controlli ambulatoriali le eventuali associazioni dei farmaci antiipertensivi venivano scelte sempre in base alle medesime linee guida già citate.

L'arruolamento dei pazienti è stato terminato nel 2000 ed il follow-up è proseguito sino al Giugno 2008, momento in cui sono stati completati i dati, assemblato il data-set che è stato in seguito analizzato.

#### *Prima visita e visite di controllo*

Le prime visite prevedevano: anamnesi completa, esame obiettivo, ECG, misurazioni della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca (Fc).

La diagnosi di ipertensione arteriosa essenziale si basava sul riscontro di valori pressori  $\geq 140/90$ mmHg in diverse occasioni a distanza di circa 2 settimane una dall'altra, sempre nelle condizioni ottimali.

Queste ultime venivano eseguite al termine della visita clinica dall'infermiera, per mezzo di un misuratore elettronico (OMRON, validato secondo le specifiche della British Society of Hypertension e dall'Association for Advancement of Medical Instrumentation), la cui precisione veniva controllata mensilmente per mezzo di sfigmomanometro a mercurio: 1 misurazione in clino e ortostatismo sul braccio sinistro, 3 misurazioni sul braccio sinistro in posizione seduta, una sul braccio destro.

Le misurazioni si effettuavano dopo almeno cinque-dieci minuti di riposo con il paziente in posizione seduta e lontano dall'assunzione di sostanze eccitanti (caffè, tè, coca-cola), alcolici e dal fumo di sigaretta.

Veniva richiesta al paziente per le successive visite la misurazione della pressione arteriosa a domicilio, con valori scritti su un diario.

Erano inoltre richiesti esami ematochimici di screening come raccomandato dalle linee guida del JNC VI (confermata dal JNC VII).

I dati forniti dai pazienti erano riportati su schede individuali, permettendo così una traccia completa dei dati del paziente e del profilo di rischio cardiovascolare (pressione arteriosa, BMI, fumo, familiarità per malattie cardiovascolari, stile di vita, altre patologie in atto in trattamento).

Le visite successive venivano programmate al termine di ogni visita a discrezione del medico. Tali visite consistevano nella rilevazione della pressione arteriosa (3 misurazioni), esame obiettivo, raccolta delle note anamnestiche relative al periodo intercorrente tra la prima visita e le successive, inoltre veniva valutata la compliance del paziente alla dieta iposodica e ad eventuali farmaci.

Tutti i dati relativi ai pazienti in studio venivano periodicamente trasferiti su un file di excel in formato elettronico.

Il follow up dei pazienti è terminato nel Giugno del 2008 ed in caso di mancanza di visita ambulatoriale a fine studio, si è proceduto a completare il follow-up mediante questionario telefonico accurato e revisionando i documenti sanitari in caso di dati dubbi.

#### *Fattori di rischio cardiovascolare valutati nella coorte*

1. fumo di sigaretta. Abbiamo considerato 2 categorie: fumatori e non fumatori (assimilando a questa categoria anche coloro i quali avessero smesso di fumare da oltre un anno).
2. profilo lipidico , età, sesso e BMI.
3. diabete mellito.
4. presenza di danno d'organo.

#### *Eventi cardiovascolari valutati nella coorte*

Durante il follow-up sono stati valutati i seguenti eventi cardiovascolari:

1. IMA fatale e non fatale;
2. morte improvvisa;
3. angina stabile ed angina instabile;
4. procedure di rivascolarizzazione coronarica;
5. insufficienza cardiaca acuta e cronica;
6. aritmie maggiori (iper e ipocinetiche: fibrillazione atriale e flutter, tachicardia ventricolare, fibrillazione ventricolare, blocchi atrio-ventricolari di II e III grado, blocchi senoatriali);
7. stenosi carotidea >70%, stenosi del tratto aorto-iliaco-femorale >70%, ectasia aortica >4.5cm;
8. stroke fatale e non fatale;
9. ospedalizzazioni per cause cardiovascolari o cerebrovascolari
10. Aneurismi
11. Emorragie retiniche

### *Ecocardiografia*

Tutti gli esami ecocardiografici sono stati eseguiti da un unico ecocardiografista con apparecchio Toshiba, Sonolayer SSH-160A.

La LVM è stata calcolata tramite la formula al cubo e indicizzata per l'altezza elevata alla potenza di 2.7 ( $LVMh^{2.7}$ )

### *Genotipizzazione*

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue venoso per l'estrazione del DNA. In particolare il DNA è stato estratto dai globuli bianchi ( Genomix Kit, Talent, Trieste, Italia) e dissolto in acqua distillata e conservato in frigo a +4°C.

I polimorfismi genetici analizzati sono stati : A1166C (AT1R)<sup>50</sup>, G-6A (AGT-6)<sup>48</sup>, ACE in-del<sup>49</sup>, e C-344T ( CYP11B2)<sup>51</sup>

La genotipizzazione è stata attuata attraverso l'amplificazione con la polymerase chain reaction (PCR) utilizzando specifici primers (senso/antisenso) per ciascun polimorfismo e successiva digestione degli stessi con specifici enzimi di restrizione.

Le singole forme alleliche sono state individuate tramite elettroforesi su gel di agarosio e visualizzazione al transilluminatore con bromuro di etidio.

### *Analisi statistica*

Solo l'età è risultata essere distribuita normalmente (Shapiro-Wilk). Le altre variabili, con l'eccezione della durata dell'ipertensione, della PAD, della frequenza cardiaca, del sodio e del potassio urinario, della PRA, sono state normalizzate attraverso il calcolo del reciproco, del reciproco del quadrato, del reciproco della radice quadrata, del logaritmo, della radice quadrata. Le variabili continue sono state analizzate con il t-test a due code e con la correlazione di Pearson o Spearman sulla base della loro distribuzione. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate attraverso il two-sample t-test o l'analisi della varianza. Per la correzione per fattori confondenti è stata eseguita l'analisi della co-varianza.

La massa cardiaca è stata analizzata sia come tratto continuo che come variabile dicotomica, utilizzando il cutt-of di 51 g/m<sup>2</sup>, che è il limite al di sopra del quale si configura una ipertrofia del ventricolo sinistro. Gli eterozigoti e gli omozigoti del polimorfismo A1166C del AGTR1 e I/D dell'ACE sono stati analizzati raggruppando gli omozigoti mutati con gli eterozigoti in

base alla numerosità e/o al background scientifico. Gli eventi totali analizzati sono stati il frutto della somma algebrica tra gli eventi cardiovascolari e la diagnosi di diabete mellito (essendo quest'ultimo evento considerato alla stregua di un evento cardiovascolare dal momento che il paziente diabetico ha un rischio di incorrere in un evento cardiovascolare simile al rischio che un paziente con pregresso evento cardiovascolare ha di incorrere in un secondo evento).L'analisi degli eventi in base alla massa cardiaca o ai polimorfismi genetici è stata effettuata attraverso l'utilizzo della regressione logistica. Sono stati utilizzati tests di significatività a due code e una  $P < 0.05$  è stata considerata come significativa. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software per windows Intercooled Stata 9.0.

## RISULTATI

Si è ottenuto il follow-up completo in 429 pazienti, mentre dei 44 pazienti non completati, 25 (5,3%) non avevano firmato il consenso riguardante la genotipizzazione e 19 (4%) non sono stati più seguiti presso il nostro centro. Dei 429 analizzati, 49 (11,4%) sono andati incontro ad eventi cardiovascolari (17 femmine e 32 maschi) e a 12 (2,8%) pazienti è stata posta diagnosi di diabete mellito.

Le caratteristiche di base della coorte analizzate sono riportate in tabella 1.

Le frequenze geniche del CYP11B2, dell'AGTR1, dell'ACE e dell'AGT sono riportate in tabella 2. L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato rispettato per tutti i genotipi analizzati.

L'ipertrofia concentrica ed eccentrica del ventricolo sinistro erano presenti rispettivamente in 28 (6,5%) ed in 84 (19,6%) pazienti; 29 pazienti (6,3%) hanno mostrato invece un rimodellamento concentrico. Una normale geometria è stata rilevata in 288 pazienti (67,6%).

Il rischio cardiovascolare era distribuito nel seguente modo: il 73,8% dei pazienti aveva un rischio inferiore al 10%, mentre nel 20,7% di essi il rischio era tra il 10 ed il 20%; il 5,5% dei pazienti era al di sopra del 20%. Per quanto riguarda la differenza di rischio in base al sesso, abbiamo ottenuto che il sesso maschile aveva un rischio maggiore rispetto alle donne. In particolare gli uomini con rischio superiore al 20% erano l'8%, mentre solo l'1,4% delle donne stavano al di sopra di tale fascia.

La massa ventricolare sinistra indicizzata per  $h^{2,7}$  correlava con l'età ( $r=0.16$ ,  $p<0.001$ ), con la pressione arteriosa sistolica basale ( $r: 0.11$ ,  $p=0.019$ ) e con gli eventi totali. ( $p<0.01$ ) (Fig. 1). Al contrario, non sono risultate correlate con la massa ventricolare sinistra la durata dell'ipertensione, il rischio cardiovascolare, l'aldosterone plasmatico, il sodio urinario e la pressione arteriosa diastolica basale ( $p>0.05$ , per tutti). L'analisi tra la  $MVSh^{2,7}$  come tratto continuo ed i polimorfismi genetici considerati ha mostrato una associazione col A1166C del gene AGTR1 ( $p<0.05$ ). In particolare, i pazienti portatori dell'allele C del gene codificante il recettore tipi 1 dell'angiotensina II avevano una massa cardiaca significativamente maggiore rispetto a coloro che erano omozigoti per l'allele A; tutti gli altri polimorfismi non sono risultati associati con la massa ventricolare sinistra. Per valutare la possibile interferenza dei fattori confondenti, l'associazione del polimorfismo A1166C con la massa cardiaca è stata ulteriormente valutata eseguendo un'analisi multivariata in due tempi diversi ed utilizzando come variabile dipendente la  $MVSh^{2,7}$ . Nel primo modello sono state inserite come variabili indipendenti l'età, il sesso, la PAS basale e la durata dell'ipertensione arteriosa; nel secondo



modello è stato inserito il genotipo dell'AGTR1, mantenendo tutte le variabili del primo modello. Entrambi i modelli sono risultati essere statisticamente significativi con una  $p < 0.001$  per il primo e  $p < 0.006$  per il secondo. L'analisi multivariata ha mostrato che il polimorfismo A1166C e l'età si associano in maniera indipendente alla massa ventricolare sinistra, anche se il genotipo aveva una  $p$  ai limiti della significatività ( $p = 0.052$ ). Inoltre il modello che conteneva il genotipo spiegava il 2,8% della variazione della massa cardiaca, mentre il modello senza il genotipo spiegava il 2,4%.

Quando si è analizzata la  $MVSh^{2,7}$  come tratto discreto si è confermata l'associazione con lo stesso polimorfismo dell'AGTR1 ( $p < 0.001$ ). Tale associazione stavolta si è mantenuta anche dopo correzione per fattori confondenti ed in maniera indipendente dall'età (modello col genotipo con  $p < 0.001$ ,  $p = 0.012$  per la massa e  $p = 0.011$  per l'età).

I singoli polimorfismi genetici non hanno mostrato una associazione con gli eventi totali, anche analizzati in relazione alla massa cardiaca.

## DISCUSSIONE

Il nostro studio ha dimostrato una associazione positiva tra il polimorfismo del gene che codifica per il recettore dell'angiotensina II, di tipo I e la massa ventricolare sinistra.

Dall'analisi univariata è emerso che la presenza dell'allele C si associa a valori maggiori di massa ventricolare sinistra, rispetto al genotipo omozigote per l'allele A. L'analisi multivariata mostra inoltre come questa associazione sia indipendente da altre variabili sia di tipo antropometrico che di tipo clinico.

E' comunemente ritenuto che l'incremento della massa cardiaca faccia parte di un adattamento cronico del ventricolo sinistro all'aumentato carico pressorio o di volume del cuore. L'incrementato stress di parete fungerebbe da stimolo all'incremento di produzione di tutta una serie di proteine muscolari e di collagene. Questo processo sarebbe finalizzato alla protezione del miocardio dall'eccessiva tensione di parete, attraverso la riduzione del consumo di ossigeno, mantenendo comunque una sufficiente gittata cardiaca.

Nonostante l'opinione abbastanza diffusa che l'aumentato carico emodinamico costituisca lo stimolo iniziale allo sviluppo di ipertrofia del ventricolo sinistro, persiste, in ogni caso, la difficoltà di capire la maggior parte della variabilità dell'incremento della massa cardiaca.

Infatti soltanto il 25-30% dei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale sviluppa incremento della massa ventricolare sinistra, se l'incremento di massa cardiaca nell'ipertensione arteriosa essenziale fosse una pura funzione dell'aumentato carico emodinamico ne deriverebbe che tutti gli ipertesi, in misura maggiore o minore, dovrebbero presentare questo fenotipo cardiaco. Ad ulteriore supporto di questo concetto è il dato secondo cui la massa ventricolare sinistra non è correlata con la quantità di incremento della pressione arteriosa sistolica<sup>42</sup>. E' plausibile supporre che l'ipertrofia del ventricolo sinistro faccia parte di quelle patologie complesse, come l'ipertensione arteriosa, la cardiopatia ischemica, ecc.. e che la massa ventricolare sinistra sia il risultato dell'interazione tra fattori ambientali, fattori genetici e di stile di vita. Devono, quindi, essere presi in considerazione come possibili determinanti di aumentata massa cardiaca il sesso, l'età, l'indice di massa corporea, la razza, l'introito sodico con l'alimentazione e l'attività fisica.

Per quanto riguarda il genotipo, il sistema renina-angiotensina-aldosterone è senza dubbio quello che maggiormente è stato studiato in relazione allo sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra, poiché sia i suoi costituenti come la PRA, l'angiotensina II, l'aldosterone, sia i polimorfismi dei gene codificanti proteine di tale sistema, sono stati associati all'incremento

della massa cardiaca. In particolar modo sia l'angiotensina II che l'aldosterone sono implicati nei processi generanti fibrosi a livello vascolare e miocardico. E' altresì documentato in letteratura che le terapie farmacologiche con ACE-inibitori ed inibitori recettoriali dell'angiotensina II, a parità di riduzione di pressione arteriosa, rispetto alle altre classi di farmaci, riducono maggiormente la massa ventricolare<sup>43</sup>. Polimorfismi del gene dell'aldosterone sintetasi (-344C/T), del recettore dell'angiotensina II, tipo 1 (A1166C), dell'ACE e dell'AGT -6 sono stati studiati da diversi gruppi in relazione alla massa ventricolare sinistra, ma con risultati contrastanti. Per quanto riguarda la variante -344C/T alcuni autori hanno associato alti livelli di aldosterone plasmatici con l'allele C<sup>44</sup> altri con l'allele T. In un recente lavoro l'allele T è stato associato alla massa ventricolare sinistra<sup>45</sup>, mentre in un precedente lavoro Kupari e collaboratori pubblicavano risultati opposti e cioè che i pazienti con genotipo CC mostravano una massa ventricolare sinistra maggiore<sup>46</sup>. Lo stesso discorso può essere fatto per la variante A1166C del CYP11B2: infatti Castellano e collaboratori hanno riportato la mancanza di associazione tra il polimorfismo A1166C e la massa ventricolare sinistra in pazienti selezionati random dalla popolazione generale, mentre in uno studio giapponese lo stesso polimorfismo si associava alla massa ventricolare sinistra in soggetti normotesi<sup>47</sup>.

La mancanza di dati univoci stanno ad indicare l'estrema difficoltà che si incontra in studi di associazione, in particolare modo quando vengono utilizzate popolazioni a genoma eterogeneo, di ridotta numerosità oppure pazienti sotto trattamento farmacologico o con wash-out insufficiente. Inoltre i vari studi sono difficilmente confrontabili poiché analizzano soggetti di razza diversa che potrebbero differire in termini di frequenze alleliche del polimorfismo genetico studiato.

Per queste ragioni, i criteri restrittivi di inclusione utilizzati nella selezione dei pazienti di questo studio, come per esempio: 1. l'arruolamento di pazienti mai trattati in precedenza, 2. la numerosità della coorte, 3. l'omogeneità genetica, potrebbero rappresentare dei punti di forza nel spiegare l'associazione tra il polimorfismo dell'A1166C del CYP11B2 riscontrato nel nostro studio.

Inoltre anche nel nostro studio si conferma che l'aumentata massa cardiaca correla con gli eventi come ben documentato in letteratura mentre non abbiamo dimostrato correlazione tra gli eventi e i polimorfismi genetici. Questo dato apparentemente negativo non esclude tuttavia una possibile compartecipazione del genotipo nel regolare la massa cardiaca. Questo può essere supportato anche dal fatto che soltanto il 20-25% degli ipertesi sviluppa IVS e che,

sostanzialmente, la relazione fra pressione arteriosa e massa cardiaca è debole. Se, infatti, lo sviluppo di IVS fosse prevalentemente dovuto al “carico di pressione” dovuto all’ipertensione arteriosa allora la stragrande maggioranza dei pazienti ipertesi presenterebbe massa cardiaca aumentata. Inoltre, lo sviluppo della IVS sarebbe anche strettamente correlato alla durata dell’ipertensione arteriosa, cosa che nella nostra coorte di studio non è stata osservata.

**Tabella 1. Caratteristiche di base della coorte.**

N :	429
Età(anni) <sup>a</sup> :	47.3 9.8
genere (M/F):	257/172
IMC(kg/m <sup>2</sup> ) <sup>c</sup> :	27.8 (95% IC 26.5 - 29.1)
PAS(mmHg) <sup>b</sup> :	156 (148 a 170)
PAD(mmHg) <sup>b</sup> :	104 (100 a 110)
Durata ipert (anni) <sup>c</sup> :	4.2 (95% IC 3.8 – 4.7)
Massa h(g/m) <sup>b</sup> :	44.7 (39.3 a 50.3)
PRAor <sup>c</sup> :	1.9 (95% IC 1.8 – 2.1)
Aldosterone pl <sup>b</sup> :	13.2 (10.5 a 17.2)
Na ur. (mmol/24h) <sup>c</sup> :	150.1 (95% IC 145.2 – 155.1)

<sup>a</sup> media ±DS

<sup>b</sup> media e range interquartile

<sup>c</sup> media e 95% intervallo di confidenza

Legenda: IMC:indice di massa corporea, PAS: pressione arteriosa sistolica, PAD:pressione arteriosa diastolica, Na ur: sodio urinario, PRA : attività reninica plasmatici in ortostatismo, Massa h: massa cardiaca indicizzata per h

**Tabella 2: Frequenze genotipiche del CYP11B2 (aldosterone sintasi) , dell'AGTR1 (recettore dell'angiotensina II, tipo 1), dell'ACE (enzima convertente l'angiotensina II) e dell'AGT (angiotensinogeno sintetasi).**

**ACE I/D**

I/I	36	8.63 %
I/D	186	44.60 %
D/D	195	46.76 %

**AGT -6**

A/A	85	20.94 %
A/G	183	45.07 %
G/G	138	33.99 %

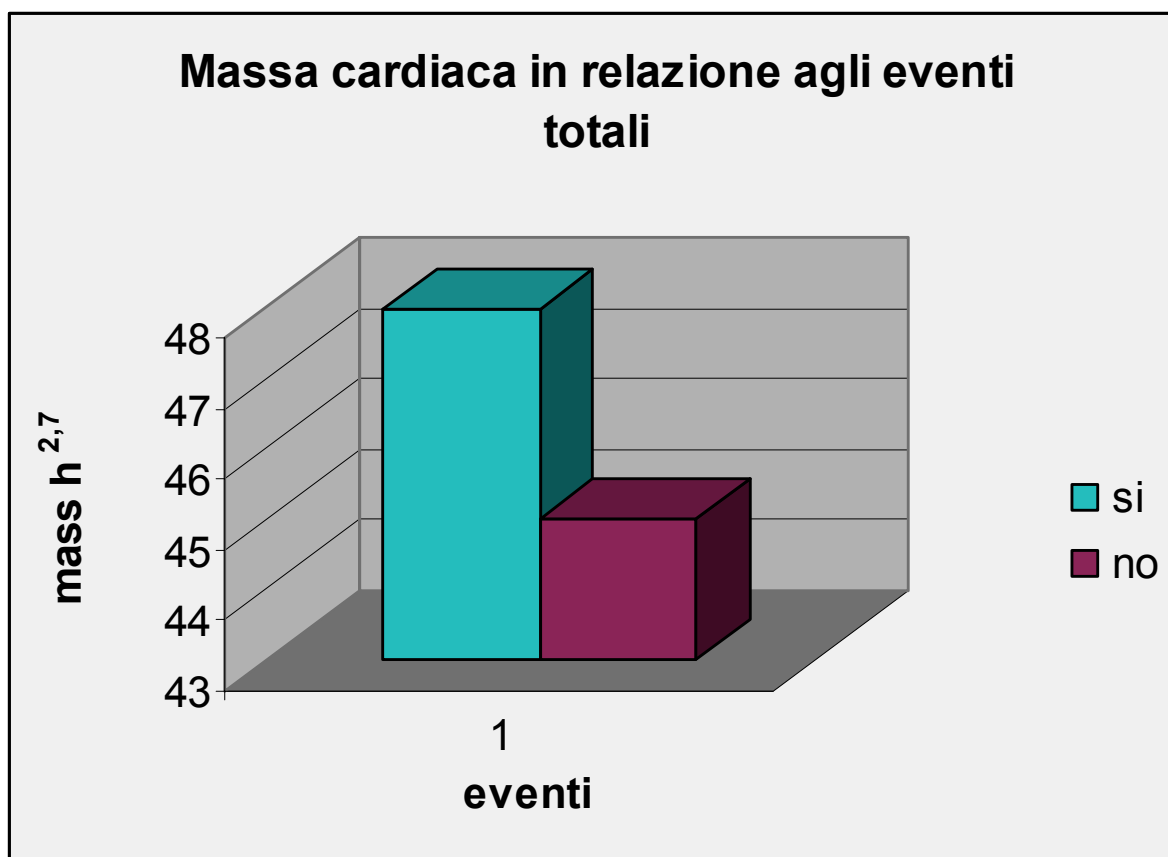
**CYP**

C/C	79	19.36 %
C/T	208	50.98 %
T/T	121	29.66 %

**AT1r**

A/A	201	48.91 %
A/C	175	42.58 %
C/C	35	8.52 %

Figura 1.



**Legenda:** la colonna verde indica i pazienti che hanno presentato eventi cardiovascolari mentre la colonna porpora indica i pazienti senza eventi cardiovascolari. Appare chiara la relazione con la massa cardiaca ventricolare sinistra (vedi Risultati).

## BIBLIOGRAFIA

1. Paolo Primatesa, Marion Brookes, Neil R: Poulter. Improved Hypertension Management and Control. Result from the Health Survey for England 1998. *Hypertension* 2001; 38:827-832.
2. Burt VI, Whelton P, Roccella EJ, et al. Prevalence of hypertension in the US population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995; 25:305-313.
3. Camussi A, Bianchi G. Genetics of essential hypertension. From the unimodal-bimodal controversy to molecular technology. *Hypertension* 1988 Dec;12(6):620-8.
4. Ward F. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh JK, Brenner BM, eds. *Hypertension, Diagnosis and Management*, 2nd ed. New York, NY: Raven Press Ltd; 1995: 67-88.
5. Bianchi G, Cusi D. Association and linkage analysis of alpha-adducin polymorphism: is the glass half full or half empty? *Am J Hypertens*. 2000 Jun;13 (6 Pt 1): 739-43. Review.
6. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992 Oct 2;71(1):169-80.
7. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, Glorioso N, Lanzani C, Manunta P, Righetti M, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 1997 May 10; 349 (9062):1353-7.
8. Glorioso N, Filigheddu F, Cusi D, Troffa C, Conti M, Natalizio M, Argiolas G, Barlassina C, Bianchi G. alpha-Adducin 460Trp allele is associated with erythrocyte Na transport rate in North Sardinian primary hypertensives. *Hypertension*. 2002 Feb; 39 (2 Pt 2): 357-62.
9. Glorioso N, Manunta P, Filigheddu F, Troffa C, Stella P, Barlassina C, Lombardi C, Soro A, Dettori F, Parpaglia PP, Alibrandi MT, Cusi D, Bianchi G. The role of alpha-adducin polymorphism in blood pressure and sodium handling regulation may not be excluded by a negative association study. *Hypertension*. 1999 Oct; 34 (4 Pt 1): 649-54.
10. Glorioso N, Filigheddu F, Troffa C, Soro A, Parpaglia PP, Tsikoudakis A, Myers RH, Herrera VL, Ruiz-Opazo N. Interaction of alpha(1)-Na,K-ATPase and Na,K,2Cl-cotransporter genes in human essential hypertension. *Hypertension*. 2001 Aug;38 (2): 204-9.



11. Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Rastam L, Groop L. Polymorphism in the beta(1)-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation* 2001 Jul 10;104(2): 187-90.
12. Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet.* 1998 Jan;18(1): 45-8.
13. Jia H, Hingorani AD, Sharma P, Hopper R, Dickerson C, Trutwein D, Lloyd DD, Brown MJ. Association of the G(s)  $\alpha$  gene with essential hypertension and response to beta-blockade. *Hypertension.* 1999 Jul;34(1):8-14.
14. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med.* 1997;157: 2413-2446.
15. SHEP Cooperative research Group. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly program. *Jama* 1991; 265: 3255-64.
16. Kannel WB, Belanger AJ. Epidemiology of heart failure. *Am Heart J.* 1991; 121: 951-957.
17. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB, Stamler J. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med.* 1996; 334:13-18
18. Robert J. Glynn, Gilbert J. L'Italien, Howard D. Sesso, Elizabeth A. Jackson, Julie E. Buring. Development of predictive Models for long term Cardiovascular Risk associated with systolic and diastolic blood pressure. *Hypertension* 2002; 39: 105-110.
19. Hebert PR, Moser M, Mayer J, Glynn RJ, Hennekens CH. Recent evidence on drug therapy of mild to moderate hypertension and decreased risk of coronary heart disease. *Arch Intern Med.* 1993;153:578-581.
20. Moser M, Hebert P. Prevention of disease progression, left ventricular hypertrophy and congestive heart failure in hypertension treatment trials. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1214-1218.
21. Collins R, Peto R, MacMahon S. Blood pressure, stroke and coronary disease, part II: short-term reduction in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990: 335:827-838.
22. Lorraine G. Ogden, Jiang He, Eva Lydick, Paul K. Whelton. Long-Term absolute benefit of lowering blood pressure in hypertensive patients according to the JNC VI risk stratification. *Hypertension* 2002; 35:539-543.

- 23 . Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Lancet 2000; 356: 1995-64.
- 24 . Mathew J, Sleight P, Lonn E, et al. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. Circulation 2001; 104: 1615-21)
- 25 . Verdecchia P, Porcellati C ,Reboldi G.  
Et al. Left ventricular hypertrophy as an independent predictor of acute cerebrovascular events in essential hypertension. Circulation 2001; 104:2039-2044.
- 26 .Levy D, Garrison RJ, Savane DD et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. N Engl J Med 1990; 322:1561-1566
- 27 . Casale PN, Devereaux RB, Milner M, Zullo G, Harshfield GA, Pickering TG, Laragh JH. Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. Ann Intern Med. 1986; 105:173-178
- 28 . Weber KT , Brilla CG. Phathological hypertrophy and cardiac interstium :Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. Circulation 1991;83:1849-1865.
- 29 . EL-Gharbawy AH, Nadig VS, K otchen JM et al. Arterial pressare, left ventricular mass and aldosterone in essential hypertension. Hypertension 2001; 37:845-850.
- 30 . Lombes M, Alfaidy N, Eugene E et al. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralcorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. Circulation 1995; 92:175-182.
- 31 . Slight SH, Ganjam VK, Gomez-Sanchez CE at all. High affinità NAD(+)-dependent 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. J Mol Cell Cardiol 1996; 28:781-787
- 32 . Glorioso N, Filigheddu F, PinnaParpaglia P, Soro A, Troffa C,Argiolas G, and Mulatero P. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity is associated with left ventricular mass in essential hypertension- European Heart Journal 2005; 26: 498-504
33. Richard B. Devereaux , Thomas G. Pickering, Robert J. Cody, and John H. Laragh Relation of Renin-Angiotensin System Activity to Left Ventricular Hypertrophy and Function in Experimental and Human Hypertension J Clin Hypertension 1987; 3:87-103
- 34 . Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhager WH. Essential Hypertension. Lancet. 2003 May 10;361(9369):1629-41.

35. Levy D, Garrison RJ, Savage DD et al.  
Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.  
N Engl J Med 1990; 322: 1561-6.
36. Robert V, Nguyen VT, Cheav SL, et al.-Increased cardiac types and III collagen m RNAs in aldosterone-salt hypertension. Hypertension 1994; 24:30-6).
37. Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. N Engl J Med 1999; 341:709-17)
38. Yamamoto N, Yasue H, Mizuno Y et al. Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension. Hypertension 2002; 39: 958-62.)
39. Brand E, Schorr u, Ringel J et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism in Caucasians from the Berlin Salt-Sensitivity Trial BeSST). J hypertension 1999; 17:1563-7).
40. Ducan JA , Scholey JW, Miller JA et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in humans: physiology and pathophysiology of the genotypes.
41. Curr Opin Nephrol Hypertens 2001; 10:111-16  
Castellano M, Muiesan ML, Beschi M et al. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. Hypertension 1996, 28: 1076-80.
42. Glorioso N, Filigheddu F, PinnaParpaglia P e al. 11Beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity is associated with left ventricular mass in essential hypertension. E Heart J 2005; 26: 498-504.
43. van Zwieten PA. The influence of antihypertensive drug treatment on the prevention and regression of left ventricular hypertrophy.  
Cardiov Research 2000; 45:82-91.
44. Pojoga I, Gautier s, Blanc H et al.  
Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension.  
Am JHypertension 1998; 11: 856-60.
45. Stella P, Bigatti G, Tizzoni L et al.  
Association between aldosterone synthase ( CYP 11b2) polymorphism  
And left ventricular mass in Human Essential Hypertension.  
J Am Coll Card 2004; 43.265-70.

46. Kupari M, Hautanena A, Lankinen L et al.  
Association between the human aldosterone synthase (CYP11B2) Gene polymorphism and left ventricular size, mass, and function. *Circulation* 1998; 97:569-75.
47. Takami S, Katsuya T, Rakugi H et al.  
Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11:316-21.
48. AGT-6 G-6A  
Steven C. Hunt, Nancy R. Cook, Albert Oberman, Jeffrey A. Cutler, Charles H. Hennekens, P. Scott Allender, W. Gordon Walker, Paul K. Whelton, Roger R. Williams  
Angiotensinogen Genotype, Sodium Reduction, Weight Loss, and Prevention of Hypertension  
Trials of Hypertension Prevention, Phase II  
*Hypertension*. 1998;32:393-401.
49. ACE in-del  
Sung Kee Ryu, Eun Young Cho, Hyun-Young Park, Eun Kyoung Im, Yangsoo Jang, Gil Ja Shin, Won-Heum Shim, and Seung-Yun Cho  
Renin- Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) Gene Polymorphism as a Risk Factor of Coronary In-Stent Restenosis. *Yonsei Medical Journal*. 2002; Vol. 43, No. 4, pp. 461-472.
50. AT1R A1166C  
Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet*. 1995 Jun 24 ; 345 (8965) : 1600-3
51. CYP11B2 C-344T  
Markku Kupari, Aarno Hautanen, Laura Lankinen, Pekka Koskinen, Juha Virolainen, Heli Nikkila, Perrin C. White. Associations Between Human Aldosterone Synthase (CYP11B2) Gene Polymorphisms and Left Ventricular Size, Mass, and Function. *Circulation*. 1998; 97: 569-575.