



Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στην αρτηριακή υπέρταση

**Ε. Γκαλιαγκούση
Π. Ανυφαντή
Ν. Κολέτσος
Α. Τριανταφύλλου**

**Α. Λαζαρίδης
Β. Νικολαΐδου
Σ. Δούμα**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ενδοθήλιο είναι ένα ενεργό μεταβολικό όργανο υπεύθυνο για τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου μέσω της παραγωγής μιας πλειάδας αγγειοδραστικών ουσιών με κυριότερο εκπρόσωπο το μονοξείδιο του αζώτου, η ελαττωμένη βιοδιαθεσιμότητα του οποίου χαρακτηρίζει τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Η αξιολόγηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στηρίζεται σε μεθόδους βιοχημικές και αγγειακές που αναπτύσσονται διαρκώς, ωστόσο η εφαρμογή τους παραμένει σε ερευνητικό επίπεδο παρά τον μη επεμβατικό τους χαρακτήρα. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία θεωρείται πρωταρχική διεργασία στην παθογένεση της αρτηριακής υπέρτασης και των καρδιαγγειακών νοσημάτων, με καθοριστική συμβολή στην ανάπτυξη και εγκατάσταση των σχετιζόμενων μικρο- και μακροαγγειακών επιπλοκών. Η αξιολόγηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας σε υπερτασικούς ασθενείς έχει τεκμηριωμένη προγνωστική αξία για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα. Στους πλειοτροπικούς μηχανισμούς δράσης των αντιυπερτασικών και άλλων φαρμάκων με ευνοϊκή επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα συγκαταλέγεται η βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η ανίχνευσή της στα πρώιμα στάδια με σκοπό την ανάπτυξη ειδικών θεραπευτικών παρεμβάσεων θα μπορούσε να συμβάλει στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων, και παραμένει αντικείμενο μελέτης.

🔑 Λέξεις-κλειδιά: Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αρτηριακή υπέρταση, μονοξείδιο του αζώτου, βιοχημικοί δείκτες, αγγειακές μέθοδοι, μικροαγγειοπάθεια, μακροαγγειοπάθεια

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παλαιότερη άποψη, πως το ενδοθήλιο αποτελεί απλά μια στιβάδα κυττάρων που καλύπτει το εσωτερικό του αυλού των αγγείων δημιουργώντας έναν μηχανικό φραγμό, έχει αλλάξει σημαντικά. Πλέον, θεωρείται ένα μεταβολικό όργανο, που ρυθμίζει ενεργά τον αγγειακό τόνο, καθώς παράγει μια πλειάδα αγγειοδραστικών ουσιών ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιοστασίας του αγγειακού τοιχώματος¹⁻⁴. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, δηλαδή η απώλεια των αγγειοδιασταλτικών, αντιαθηροσκληρωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιθρομβωτικών ιδιοτήτων του και η υπεροχή

ενός φαινότυπου που προάγει την αγγειοσύσπαση, αθηροσκληρωση, θρόμβωση και φλεγμονή στο αρτηριακό τοίχωμα, θεωρείται μία πρώιμη παθοφυσιολογική διεργασία στην παθογένεση της αρτηριακής υπέρτασης (ΑΥ) και των καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ συντηρεί και επιταχύνει την εξέλιξη αυτών των νοσημάτων^{3,5}. Η αξιολόγηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας αποτελεί έναν υπό μελέτη διαγνωστικό και προγνωστικό δείκτη και θεραπευτικό στόχο, σε ασυμπτωματικά άτομα αλλά και σε ασθενείς με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Στην παρούσα ανασκόπηση θα παρουσιαστεί η φυσιολογία της λειτουργίας του ενδοθηλίου και οι μηχανισμοί που εντείνουν τη

Γ' Παθολογική Κλινική, ΑΠΘ, Νοσοκομείο Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη

✉ **Αλληλογραφία:** Ευγενία Γκαλιαγκούση, Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης Παπαγεωργίου, Περιφερειακή οδός Θεσσαλονίκης - Νέας Ευκαρπίας, Θεσσαλονίκη 564 29 • Τηλ: +30 2310 991 533 • Fax: +30 2310 991 534 • E-mail: egkaliaingkousi@auth.gr

δυσλειτουργία του, οι βιοχημικές και αγγειακές μέθοδοι αξιολόγησης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και η κλινική σημασία της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στην ΑΥ¹⁻³.

ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η κατανόηση του ρόλου της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στην ΑΥ στηρίζεται στη γνώση της βιοσύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric oxide, NO) από το αγγειακό σύστημα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, σαν ένας ενδοκρινής αδένας, συνθέτουν και εκκρίνουν μια ποικιλία αγγειοδραστικών (φλεγμονωδών, αγγειοπροστατευτικών, αγγειογενετικών, θρομβωτικών και αντιθρομβωτικών) ουσιών απαραίτητων για τη διατήρηση της ομοιοστασίας εντός των αγγείων, με κυριότερη το NO⁴. Μετά την απελευθέρωσή του από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, το NO διαχέεται ταχύτατα μέσα στις λείες μυϊκές ίνες και ενεργοποιεί τη γουανιλική κυκλάση με αποτέλεσμα την παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cyclic guanosine monophosphate, cGMP), η οποία προάγει την αγγειοδιαστολή. Παράλληλα, ασκεί επιδράσεις στα έμμορφα στοιχεία του αίματος, καθώς αναστέλλει τη συγκόλληση, τη συσώρευση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αναστέλλει τη μετανάστευση, την προσκόλληση και την ωρίμανση των μονοκυττάρων, ενώ αλληλοεπιδρώντας με την αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων αυξάνει την απόδοση του οξυγόνου στους ιστούς^{4,6,7}.

Η κύρια πηγή του NO που προέρχεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια είναι η ισομορφή 3 της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (endothelial nitric oxide synthase, eNOS, eNOS3), η οποία παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια⁸. Το NO παράγεται από την οξειδωση του αμινοξέος L-αργινίνη σε L-κιτρουλίνη, μία αντίδραση που λαμβάνει χώρα σε δύο βήματα, και είναι απαραίτητη η παρουσία ασβεστίου⁹. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλεγμα Ca²⁺/καλμοδουλίνης (Ca²⁺/Calmodulin, CaM) είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση του NO, ενώ οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το σύμπλεγμα αυτό παρεμποδίζουν την ενεργότητα της eNOS¹⁰. Επιπρόσθετα, το ένζυμο καθίσταται ενεργό ύστερα από φωσφορυλίωσή του, η οποία συμβαίνει με την επίδραση αυξημένης διατημηματικής τάσης (shear stress) στο τοίχωμα του

αγγείου, διαδικασία η οποία δεν απαιτεί την παρουσία του συμπλέγματος Ca²⁺/CaM¹¹⁻¹³. Η NOS3 λειτουργεί σαν ένα διμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μονομερή, καθένα από τα οποία μπορεί να διαχωριστεί λειτουργικά σε δύο βασικές περιοχές: την περιοχή της ρεδουκτάσης και αυτή της οξυγενάσης. Η πρώτη περιέχει περιοχές δέσμευσης για ένα μόριο ανηγμένου νικοτινιμιδο-αδενινο-φωσφορικού-δινουκλεοτιδίου (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (flavin adenine dinucleotide, FAD), και φλεβινο-μονονουκλεοτιδίου (flavin mononucleotide, FMN). Η δεύτερη περιοχή συνδέεται με την αίμη, την L-αργινίνη και την τετραϋδροβιοπτερίνη (tetrahydrobiopterin, BH4)¹⁴. Η BH4 προάγει τον σχηματισμό της NOS3 και αυξάνει τη σταθερότητά της¹⁵. Κάτω από συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες, η BH4 μπορεί να οξειδωθεί οδηγώντας σε ελάττωση των αποθεμάτων αυτού του βασικού συμπαραγόντα της NOS3. Έτσι, η NOS3 δεν μπορεί να συζευχθεί και οδηγεί στην παραγωγή του τοξικού υπεροξειδίου, αντί για NO.

Η ΑΥ χαρακτηρίζεται από βλάβη στο μονοπάτι L-αργινίνης/NO, ελαττωματική απόκριση σε εξωγενώς παραγόμενο NO, και ελαττωμένη παραγωγή και διαθεσιμότητα του αιμοπεταλιακού NO¹³. Παρόλο που η αιτιώδης σχέση μεταξύ της ελαττωμένης βιοδιαθεσιμότητας NO και της παθολογίας της ΑΥ δεν έχει ακόμα αποδειχθεί πέρα από κάθε αμφιβολία, αποτελεί γενική παραδοχή ότι η βιοδιαθεσιμότητα του NO ελαττώνεται στο αγγειακό σύστημα των ασθενών με ΑΥ ως αποτέλεσμα τόσο της μειωμένης παραγωγής, όσο και της αυξημένης αποδόμησης του NO σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες¹³. Η ελαττωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO οδηγεί σε απώλεια των προστατευτικών ιδιοτήτων του ενδοθηλίου και συνεπώς σε υπεροχή της έκφρασης ενός αγγειακού φαινοτύπου που προάγει τη φλεγμονή, την αθηροσκλήρωση και τη θρόμβωση. Αυτές οι επιπτώσεις συνδέονται άμεσα με τις επιπλοκές της ΑΥ, όπως η αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και ο αυξημένος θρομβωτικός κίνδυνος¹⁶. Για παράδειγμα, τα συσσωματώματα μονοκυττάρων-αιμοπεταλίων (monocyte-platelet aggregates, MPAs), ένας αξιόπιστος δείκτης αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης, εμφανίζονται αυξημένα ακόμα και στα πολύ πρώιμα στάδια της ΑΥ¹⁷. Επιπλέον, η από-

τομη αύξηση στην αρτηριακή πίεση που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας κόπωσης σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένη ΑΥ σχετίζεται με έντονη και παρατεταμένη αύξηση στα κυκλοφορούντα MPAs, τα οποία επάγονται από ελαττωμένη σύνθεση αιμοπεταλιακού NO¹⁸. Εάν και σε ποιο βαθμό η αυξημένη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση που επάγεται από την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβάλλει στον θρομβωτικό κίνδυνο των υπερτασικών ασθενών, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Ωστόσο, η αντιυπερτασική θεραπεία και ο επιτυχής έλεγχος της ΑΥ έχει φανεί να αποκαθιστούν τα επίπεδα των MPAs¹⁸.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Ιδανικά, οι μέθοδοι αξιολόγησης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας θα έπρεπε να συγκεντρώνουν μια σειρά χαρακτηριστικών που θα επιτρέπουν την εφαρμογή τους σε ευρεία κλίμακα, όπως αναπαραγωγιμότητα, εύκολη εφαρμογή, χαμηλό κόστος, αξιοπιστία και τεκμηριωμένη προγνωστική αξία³. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι αξιολόγησης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, ωστόσο η εφαρμογή τους παραμένει σε ερευνητικό επίπεδο. Οι μέθοδοι εκτίμησης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας διακρίνονται σε βιοχημικές και αγγειακές.

— Βιοχημικοί δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας

Οι κυριότεροι βιοχημικοί δείκτες οι οποίοι προτείνονται για την αξιολόγηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας είναι η ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη (asymmetric dimethylarginine, ADMA), η οξειδωμένη LDL (oxidized LDL, oxLDL), τα ενδοθηλιακά μικροσωματίδια (endothelial microvesicles, EMVs), τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα και ο ενδοθηλιακός γλυκοκάλυκας¹⁹.

Η ADMA αποτελεί προϊόν μεθυλίωσης της αργινίνης και δρα ως ενδογενής αναστολέας της eNOS^{3,19}. Σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη βιοδιαθεσιμότητα του NO και ανάλογα με την παραγωγή ROS, δηλαδή τα επίπεδα οξειδωτικού στρες²⁰. Πιο συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες αυξάνει τα επίπεδα ADMA μέσω αύξησης της δραστηριότητας των ενζύμων που συμμετέχουν στην παραγωγή της και ελάττωσης της δραστηριότητας των ενζύμων που συμμετέχουν στον καταβο-

λισμό της. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ADMA ελαττώνουν την απελευθέρωση του NO μέσω αναστολής της eNOS. Η μέθοδος με τη μεγαλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευσή της παραμένει η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC - High pressure liquid chromatography). Ωστόσο, τα επίπεδά της μπορούν, πλέον, να προσδιοριστούν εύκολα με ανοσοενζυμικές μεθόδους (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Αυξημένα επίπεδα ADMA έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ιδιοπαθή ΑΥ χωρίς αγωγή, ήδη από τα πρώιμα στάδια (grade I)¹⁷. Επιπλέον, σε υπερτασικούς ασθενείς, η ADMA εμφανίζει συσχέτιση με αγγειακούς δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, αλλά και με δείκτες αρτηριακής σκληρίας και υποκλινικής αθηροσκλήρωσης²¹⁻²⁴. Τα υψηλά επίπεδα συνδυάζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε ασθενείς με νεφρική νόσο, διαβήτη, ΑΥ και στεφανιαία νόσο. Επιπλέον, υψηλά επίπεδα συνδυάζονται με αυξημένη ολική θνητότητα^{25,26}.

Η οξειδωμένη LDL έχει αθηρογόνο δράση και συμμετέχει στη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα^{19,27}. Παράλληλα, προκαλεί δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων (κυρίως μέσω του όμοιου με τη λεκτίνη υποδοχέα της LDL, lectin-like oxidized LDL receptor), ενώ επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών ινών και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων^{19,27}. Παρά το ενδιαφέρον που υπάρχει για τη μέτρηση της oxLDL, τα επίπεδά της στο πλάσμα δεν είναι εύκολο να προσδιοριστούν. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα για τον προσδιορισμό τους με τη χρήση ELISA για ερευνητικούς σκοπούς. Υψηλότερα επίπεδα oxLDL έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΑΥ, αλλά και σε ασθενείς με προϋπέρταση σε σχέση με νορμοτασικά άτομα²⁷⁻²⁹. Επιπλέον, σε ασθενείς με πρωτοπαθή αλδοστερονισμό διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα oxLDL σε σχέση με ασθενείς με ιδιοπαθή ΑΥ, και μάλιστα τα επίπεδα της oxLDL συσχετίστηκαν με υπερτροφία αριστεράς κοιλίας³⁰.

Τα μικροσωματίδια (microvesicles, MVs) είναι απύρηνες, κυστικές δομές (διαμέτρου 0,1-1 μm), τα οποία σχηματίζονται από τμήματα κυτταρικής μεμβράνης, έπειτα από ενεργοποίηση ή απόπτωση των κυττάρων¹⁹. Διατηρούν τις ιδιότητες των κυττάρων από τα οποία προέρχονται και μεταφέρουν βιολογικά μηνύματα των γονεϊκών κυττάρων. Το όνομά

τους προέρχεται από τα γονεϊκά τους κύτταρα δηλαδή ενδοθηλιακά (EMVs), ερυθροκυτταρικά (ErMV), αιμοπεταλιακά (PMVs) και λευκοκυτταρικά (LMVs). Η ανίχνευσή τους γίνεται με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής^{19,31,32}. Μικρός αριθμός μικροσωματιδίων μπορεί να ανιχνευθεί και σε υγιείς, όμως τα επίπεδά τους αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα^{31,33}. Τα EMVs αποπύπτουν από τα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν αυτά δυσπραγούν, ύστερα από επίδραση βλαπτικών παραγόντων στην επιφάνεια του ενδοθηλιακού κυττάρου, και εισέρχονται σε έναν φαύλο κύκλο επιδεινώνοντας περαιτέρω την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία^{31,33}. Τα δεδομένα για τα EMVs σε υπερτασικούς ασθενείς παραμένουν σχετικά λίγα, ωστόσο υποστηρίζουν τη χρήση τους ως δείκτη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και αγγειακής βλάβης. Ασθενείς με σοβαρή, μη θεραπευόμενη ΑΥ είχαν υψηλότερα επίπεδα EMVs σε σχέση με νορμοτασικά άτομα, και τα επίπεδα των EMVs εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με τη συστολική και τη διαστολική αρτηριακή πίεση³⁴. Επιπλέον, σε υπερτασικούς ασθενείς με μικρο- ή μακρολευκωματινουρία διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα EMVs, συγκριτικά με υπερτασικούς χωρίς μικρο- ή μακρολευκωματινουρία. Ακόμη, τα επίπεδα των EMVs αποτέλεσαν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της απέκκρισης αλβουμίνης στα ούρα³⁵.

Μετά την ανακάλυψή τους το 1997 τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) αποτελούν πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Πρόκειται για κύτταρα που προέρχονται, στην πλειονότητά τους, από τον μυελό, κυκλοφορούν στην περιφέρεια και αποτελούν έναν μηχανισμό επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου^{19,36,37}. Μπορούν να απομονωθούν, είτε απευθείας από το περιφερικό αίμα με κυτταρομετρία ροής, είτε έπειτα από καλλιέργεια μονοκύτταρων¹⁹. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν συσχέτιση των EPCs με τη βαρύτητα της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, ωστόσο δεν έχει τεκμηριωθεί αιτιολογική συσχέτιση¹⁹. Τα δεδομένα για την ΑΥ είναι αντικρουόμενα. Ο αριθμός των EPCs έχει βρεθεί μειωμένος σε ασθενείς με ανθεκτική αλλά και ήπια ΑΥ³⁸, ενώ η αντιυπερτασική αγωγή μπορεί να αυξήσει τον αριθμό τους³⁹. Επιπλέον, το ιστορικό ΑΥ βρέθηκε ως ο ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας διαταραχής της μετανάστευσης των EPCs⁴⁰⁻⁴². Άλλες μελέτες, ωστόσο, απέτυχαν να δείξουν ανάλογα αποτελέσματα^{43,44}.

Ο ενδοθηλιακός γλυκοκάλυκας αποτελεί μια αρνητικά φορτισμένη στιβάδα πρωτεογλυκανών και γλυκοπρωτεϊνών, η οποία καλύπτει την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ρυθμίζει τη διαπερατότητα του τοιχώματος και την αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα έμμορφα συστατικά του αίματος^{19,45,46}. Η εκτίμηση του πάχους του ενδοθηλιακού γλυκοκάλυκα μπορεί να γίνει με επεμβατικές ή μη επεμβατικές τεχνικές¹⁹. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι ασθενείς με ΑΥ χωρίς θεραπεία έχουν μικρότερο πάχος ενδοθηλιακού γλυκοκάλυκα, το οποίο σχετίστηκε με δείκτες αρτηριακής σκληρίας και με μειωμένη στεφανιαία εφεδρεία ροής⁴⁷.

— Αγγειακές μέθοδοι αξιολόγησης ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας

Οι αγγειακές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την αξιολόγηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας βασίζονται στη διέγερση της παραγωγής του NO ύστερα από μηχανικά (ίσχαμια περιέδραση) ή αγγειοδραστικά ερεθίσματα (ενδαρτηριακή χορηγία ακετυλοχολίνης) και στη μέτρηση της προκαλούμενης από το NO μεταβολής της αιματικής ροής ή της διαμέτρου του μελετούμενου αγγείου⁴⁸. Ορισμένες εφαρμόζονται στα στεφανιαία αγγεία, όπως ο προσδιορισμός της μεταβολής της διαμέτρου των στεφανιαίων αγγείων με ποσοτική στεφανιογραφία, ύστερα από ενδοστεφανιαία έγχυση ακετυλοχολίνης, ωστόσο για ευνόητους λόγους έχει επικρατήσει η μελέτη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας να εφαρμόζεται με μη επεμβατικές τεχνικές στα αγγεία των άκρων^{4,19}.

Η καλύτερα μελετημένη αγγειακή, μη επεμβατική μέθοδος εκτίμησης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας είναι η εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή (flow-mediated dilation, FMD) στη βραχιόνια αρτηρία, η οποία βασίζεται στην υπερηχογραφική μελέτη της διαμέτρου της βραχιόνιας αρτηρίας έπειτα από πρόκληση αντιδραστικής υπεραιμίας στο αντιβράχιο, ύστερα από πεντάλεπτη εφαρμογή ίσχαμιας περιέδρασης στο αντιβράχιο. Η προκλητή ίσχαμία έχει ως αποτέλεσμα την αντισταθμιστική αγγειοδιαστολή περιφερικότερα στην άκρη χείρα με σκοπό την εξισορρόπηση της μειωμένης ροής αίματος. Η άρση της απόφραξης προκαλεί αύξηση της ροής αίματος, και επομένως και της διατημητικής τάσης, στο τοίχωμα της βραχιόνιας αρτηρίας, ώστε να αποκατασταθεί τάχιστα η κυ-

κλοφορία στα διεσταλμένα αγγεία^{3,49}. Στο υγιές ενδοθήλιο, η παραγωγή NO διεγείρεται από τη διατημητική τάση που ασκείται στο τοίχωμα της βραχιόνιας αρτηρίας και οδηγεί σε διαστολή της. Έτσι, με τη μέθοδο αυτή η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία δύναται να εκφραστεί ποσοτικά με τη μέτρηση της ποσοστιαίας μεταβολής της διαμέτρου της βραχιόνιας αρτηρίας πριν και μετά την εφαρμογή ίσχυαιμης περιίδεσης^{3,19,50}. Ασθενείς με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου και εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο εμφανίζουν επηρεασμένη FMD, ενώ η προγνωστική της αξία ως προς τη μελλοντική καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα είναι καλά τεκμηριωμένη. Πράγματι, η μέθοδος εμφανίζει πολύ καλή συσχέτιση με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία των στεφανιαίων αρτηριών και με άλλους ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες αθηροσκλήρωσης και βλάβης οργάνων-στόχων, όπως το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα καρωτίδων και η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας σε υπερτασικούς ασθενείς⁵¹⁻⁵³. Η βελτίωση της FMD συνδυάζεται με βελτίωση της επιβίωσης στους ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα, ενώ η μέθοδος συμβάλλει σημαντικά στην επανασταδιοποίηση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ενδιάμεσου κινδύνου ασθενείς⁵⁴⁻⁵⁶. Αυτό το γεγονός την καθιστά ιδιαίτερα σημαντική διαγνωστική μέθοδο στην έρευνα των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Εκτός από την τεκμηριωμένη προγνωστική της αξία, στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται η καλή αναπαραγωγιμότητα, όταν πραγματοποιείται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, και ο μη επεμβατικός της χαρακτήρας, που επιτρέπουν την εφαρμογή της μεθόδου με επανειλημμένες μετρήσεις στο ίδιο άτομο, αλλά και σε μεγάλο αριθμό ασθενών και ασυμπτωματικών ατόμων¹⁹. Ωστόσο, η υποκειμενικότητα των υπερηχογραφικών μετρήσεων, η εμπειρία που απαιτείται για την εξάσκηση της μεθόδου και οι μεθοδολογικές διαφορές στα διάφορα κέντρα αποτελούν μειονεκτήματα που περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή της μεθόδου.

— Νεότερες αγγειακές μέθοδοι εκτίμησης της ενδοθηλιακής λειτουργίας στη μικροκυκλοφορία

Η μικροκυκλοφορία του δέρματος έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο κυκλοφορίας για τη μελέτη αγγειακών μηχανισμών σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα όπως η ΑΥ, ο σακχαρώδης δια-

βήτης και η στεφανιαία νόσος, με πολλές μελέτες να συγκλίνουν ότι η μικροαγγειοπάθεια σε επίπεδο δερματικών αγγείων προσομοιάζει τη βλάβη άλλων αγγειακών πεδίων⁵⁷⁻⁵⁹. Μια νεότερη και πολλά υποσχόμενη αναίμακτη τεχνική για τη μελέτη της δερματικής μικροκυκλοφορίας είναι η ανάλυση κοκκιώδους αντίθεσης με λέιζερ (Laser Speckle Contrast Analysis, LASCA). Η μέθοδος LASCA είναι μία μη επεμβατική, ανέπαφη και ταχεία μέθοδος λέιζερ, που επιτρέπει την εκτίμηση in vivo και σε αληθινό χρόνο της ιστικής άρδευσης. Αποτελεί εξέλιξη άλλων τεχνικών λέιζερ που είχαν αναπτυχθεί ως εργαλεία μελέτης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, όπως η απεικόνιση με λέιζερ doppler (Laser Doppler Imaging, LDI) και η ροομετρία με χρήση λέιζερ doppler σε ένα σημείο (single point Laser Doppler Flowmetry, LDF)^{60,61}. Και αυτή η μέθοδος προϋποθέτει την εφαρμογή ερεθισμάτων για την αξιολόγηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, όπως είναι η ιοντοφόρηση με ακετυλοχολίνη, η τοπική θερμική υπεραίμια (Local Thermal Hyperemia, LTH) και η μετα-αποφρακτική αντιδραστική υπεραίμια (POst-occlusive Reactive Hyperemia, PORH), που αποτελεί και την πιο διαδεδομένη δοκιμασία⁶². Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στον φωτισμό μιας καθορισμένης επιφάνειας δέρματος με μια συνεκτική δέσμη φωτός λέιζερ και στην αντανάκλαση των ακτίνων από τα μετακινούμενα σωματίδια του ιστού που ακτινοβολείται (τα ερυθρά αιμοσφαίρια στην περίπτωση του δέρματος). Λόγω της συνεχούς κίνησης των φωτιζόμενων σωματιδίων, δημιουργείται ένα δυναμικό μοτίβο με σκοτεινές και φωτεινές περιοχές με συνεχή καταγραφή. Ο βαθμός θολερότητας αυτού του μοτίβου ποσοτικοποιείται και μετατρέπεται από την κάμερα σε έγχρωμη εικόνα βασισμένη σε pixels, ώστε να παραχθεί μία δυναμική, δυσδιάστατη απεικόνιση της άρδευσης της μικροκυκλοφορίας του δέρματος^{60,63}. Η μέθοδος LASCA, ως νεότερη τεχνική λέιζερ, έχει αρχίζει να εφαρμόζεται μόλις τα τελευταία χρόνια στο πεδίο έρευνας των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα πρόκλησης αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ σημαντική ελάττωση της ενδοθηλιο-εξαρτώμενης αγγειοδιασταλτικής απάντησης της μικροαγγειακής κυκλοφορίας του δέρματος, μετά την εφαρμογή PORH και ιοντοφόρησης με ακετυλοχολίνη, έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με πρώιμη στε-

φαναία νόσο, ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και υπερτασικούς ασθενείς, ευρήματα συμβατά με την ύπαρξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας⁶⁴⁻⁶⁶.

Η μέθοδος της εγγύς υπέρυθρης φασματοσκοπίας (near infrared spectroscopy-NIRS) είναι μία αναίμακτη, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος για την εκτίμηση της πρώιμης βλάβης των μικρών αγγείων, καθώς επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της οξειδωμένης, ανηγμένης, αλλά και ολικής αιμοσφαιρίνης στα μικρά αιμοφόρα αγγεία (τριχοειδή αγγεία και αρτηρίδια), οι οποίες αντικατοπτρίζουν την ενεργοποίηση των εν λόγω περιοχών. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην εξασθένηση του φωτός μήκους κύματος 700-1.000 nm από τη διόδου του στους ιστούς με βάση την απορρόφησή του. Οι φωτοανιχνευτές τοποθετούνται στο δέρμα πάνω από τον ιστό του οποίου η οξυγόνωση προσδιορίζεται, όπως για παράδειγμα πάνω από τον εγκέφαλο ή τον σκελετικό μυ^{67,68}. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από πολύ καλή επαναληψιμότητα, ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο στην ηρεμία όσο και στην άσκηση⁶⁹. Με τη μέθοδο αυτή έχει διαπιστωθεί διαταραχή στην οξυγόνωση του εγκεφάλου σε άτομα με εγκεφαλικό έμφρακτο, δείχνοντας έτσι επηρεασμένη ρύθμιση στη μικροκυκλοφορία που μπορεί να οφείλεται σε αιμοδυναμικούς παράγοντες, επηρεασμένη μεταβολική ρύθμιση του αγγειακού τόνου ή αυξημένη απάντηση των λείων μυϊκών κυττάρων⁷⁰. Σε πρόσφατη μελέτη μας, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο NIRS, δείξαμε ότι νεοδιαγνωσμένοι υπερτασικοί ασθενείς παρουσιάζουν επηρεασμένη αντιδραστικότητα στα μικρά αγγεία των σκελετικών μυών και διαταγμένη προσφορά/κατανάλωση οξυγόνου των σκελετικών μυών, τα οποία συσχετίστηκαν με αυξημένη αορτική σκληρία και κεντρική αορτική πίεση⁷¹.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, το ερευνητικό επίκεντρο στον τομέα της ΑΥ έχει εστιαστεί στη «συνομιλία» της μικρής και μεγάλης κυκλοφορίας, η οποία υπό την επίδραση των αυξημένων επιπέδων αρτηριακής πίεσης οδηγεί σε δομικές και λειτουργικές αλλοιώσεις μικρο- και μακροαγγειοπάθειας και στην επακόλουθη εγκατάσταση βλαβών στα όργανα-στόχους. Οι υπάρχουσες μελέτες είναι περιορισμένες και έχουν επικεντρωθεί στον ρόλο της ενδοθη-

λιακής δυσλειτουργίας στη διαμόρφωση αυτών των βλαβών, ενώ συγκριτικά λιγότερα δεδομένα υπάρχουν για την πιθανή αξία της ως πρώιμου θεραπευτικού στόχου.

Έτσι, αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την FMD με δείκτες μακροαγγειοπάθειας, όπως η ταχύτητα σφυγμικού κύματος (pulse wave velocity, PWV), σε ασθενείς με αθηροσκληρωτική νόσο⁷², τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια⁷³, σε νεότερα⁷⁴ και ηλικιωμένα άτομα⁷⁵ και σε υπερτασικούς ασθενείς⁷⁶. Επιπλέον, η FMD έχει συσχετιστεί με κεντρικές αιμοδυναμικές παραμέτρους εκτιμώμενες με τη μέθοδο της τονομετρίας σε ασθενείς με ή χωρίς στεφανιαία νόσο και με το πάχος έσω-μέσου χιτώνα καρωτίδων σε ασθενείς με ΑΥ^{52,77}. Σε πρόσφατη μελέτη μας 311 νεοδιαγνωσμένων υπερτασικών και νορμοτασικών ατόμων, παρατηρήθηκε ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ADMA και του κεντρικού αυξητικού δείκτη²². Πρόσφατη μετα-ανάλυση σε περισσότερα από 6.000 άτομα έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ADMA και του πάχους έσω-μέσου χιτώνα καρωτίδων, ιδίως στους ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο⁷⁸. Η τοπική ενδοαρτηριακή έγχυση μονομεθυλαργινίνης (NG-monomethyl L-arginine, L-NMMA) σε πειραματικά μοντέλα αλλά και σε ανθρώπους οδήγησε σε αύξηση της ταχύτητας σφυγμικού κύματος, παρότι από άλλους ερευνητές η αύξηση αυτή φαίνεται να διαμεσολαβείται από την αύξηση της μέσης αρτηριακής πίεσης⁷⁹.

Δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας έχουν συσχετιστεί με αλλοιώσεις μικροαγγειοπάθειας σε ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου, υποδηλώνοντας μία αιτιοπαθογενετική σχέση στην ανάπτυξη και εγκατάσταση των αντίστοιχων βλαβών μέσω της μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας του NO και του αυξημένου shear stress. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία θεωρείται ότι συμβάλλει καθοριστικά στην ανάπτυξη λειτουργικών διαταραχών στη μικρή κυκλοφορία μέσω επίτασης του αγγειακού τόνου και αύξησης των συστηματικών περιφερικών αγγειακών αντιστάσεων. Πράγματι, η έγχυση αναστολέα της NOS σε υπερτασικούς ασθενείς οδήγησε σε διαταραχή της ροής στα μικρά αγγεία του αμφιβληστροειδούς⁸⁰, ενώ η στένωση των αρτηριών του αμφιβληστροειδούς παρουσίασε ανεξάρτητη συσχέτιση με τα επίπεδα ADMA σε μεσήλικες άνδρες⁸¹. Σε υπερτασικούς ασθενείς, τα επίπεδα ADMA συσχετίστηκαν με

την παρουσία μικρολευκωματινουρίας⁸². Από την άλλη, και η ίδια η επίμονη αύξηση της συστηματικής αρτηριακής πίεσης στα μικρά αγγεία οδηγεί σε πρόωρη γήρανση των ενδοθηλιακών κυττάρων και απώλεια της ικανότητάς τους να απελευθερώνουν αγγειοδιασταλτικές ουσίες, με αποτέλεσμα την εγκατάσταση δομικών διαταραχών όπως η αναδιαμόρφωση (remodeling) και η αγγειακή ερήμωση⁸³. Πρόσφατη μελέτη σε πειραματόζωα έδειξε ότι αυξημένα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης επάγουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στα μικρά αγγεία του εγκεφάλου και οδηγούν στην εγκατάσταση σοβαρών αγγειακών βλαβών, αποδόμηση της νευροαγγειακής μονάδας και έκπτωση των νοητικών λειτουργιών⁸⁴.

Είναι επόμενο ότι μελέτες σαν τις προηγούμενες έχουν θέσει το ερώτημα εάν η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για την πρόληψη των καρδιαγγειακών επιπλοκών. Ήδη, η βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου συγκαταλέγεται στις πλειοτροπικές δράσεις ευρέως χρησιμοποιούμενων φαρμάκων με ευνοϊκή επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα, όπως οι αναστολείς του άξονα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, η αμιλοδιπίνη, η νεπιβολόλη και οι στατίνες. Παρότι δεν είναι πάντα εύκολο να διευκρινιστεί εάν η βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που παρατηρείται με ορισμένα αντιυπερτασικά φάρμακα οφείλεται σε άμεσες επιδράσεις ή διαμεσολαβείται από την ελάττωση των επιπέδων αρτηριακής πίεσης, ορισμένες κατηγορίες αντιυπερτασικών φαίνεται ότι υπερέχουν. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση αναστολέων του μεταρρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (αΜΕΑ) και ανταγωνιστών των υποδοχέων αγγειοτενσίνης έχει βρεθεί ότι βελτιώνει τη δυσλειτουργία των EPCs σε ασθενείς με ΑΥ και οξεία στεφανιαία σύνδρομα^{85,86}. Το εύρημα αυτό ήταν συμβατό με τα αποτελέσματα μετα-ανάλυσης που έδειξε ότι η χορήγηση των φαρμάκων αυτών βελτίωσε την FMD σε ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου⁸⁷. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί με τους οποίους οι αΜΕΑ βελτιώνουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία περιλαμβάνουν την ελάττωση της σύνθεσης της αγγειοτενσίνης, την αύξηση των επιπέδων της αγγειοδιασταλτικής βραδυκινίνης, μέσω ελαττωμένης αποδόμησης της τελευταίας, και την αύξηση της δραστηριότητας του ενδοθηλιακού υπερπολωτικού παράγοντα (endothelium-derived hyperpolarizing

factor, EDHF) υπό συγκεκριμένες συνθήκες⁸⁸. Από την άλλη, υπερτασικοί ασθενείς που ελάμβαναν αΜΕΑ παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα oxLDL και φωσφολιπάσης A2, σε σύγκριση με ασθενείς που δεν ελάμβαναν την αντίστοιχη αγωγή⁸⁹.

Ορισμένοι β-αποκλειστές χαρακτηρίζονται από προστατευτικές δράσεις για το ενδοθήλιο. Οι ευνοϊκές επιδράσεις της αγγειοδιασταλτικής νεπιβολόλης, σε σύγκριση με άλλους β-αποκλειστές, αποδίδονται στην ιδιότητα του μορίου να είναι εκτός από β1 εκλεκτικός αποκλειστής ένας ισχυρός αγωνιστής των β3 υποδοχέων προάγοντας την παραγωγή του NO στο αγγειακό δίκτυο, στο μυοκάρδιο και στους νεφρούς^{90,91}. Προάγει επίσης την αιμοπεταλιακή παραγωγή NO μέσω φωσφοριλίων της συνθάσης του NO και την ελάττωση παραγόντων που προάγουν τη φλεγμονή, όπως το ινωδογόνο, η ομοκυστεΐνη και ο αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1^{92,93}. Η καρβεδιλόλη, ένας μη εκλεκτικός β1 και β2 αποκλειστής με α-ανταγωνιστικές ιδιότητες, συνοδεύεται από αντιοξειδωτικές ιδιότητες⁹⁴. Παρομοίως, οι διυδροπυρινικοί αναστολείς διαύλων ασβεστίου προστατεύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες⁹⁵.

Αντίστοιχα, οι στατίνες βελτιώνουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου, όπως βρέθηκε και στα αποτελέσματα σχετικής μετα-ανάλυσης⁹⁶, μέσω αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας NO και ελάττωσης του φλεγμονώδους φορτίου και του οξειδωτικού στρες. Με αυτά τα ευρήματα είναι συμβατή και άλλη πρόσφατη μετα-ανάλυση που έδειξε ότι η θεραπεία με στατίνες ελαττώνει τα επίπεδα ADMA στο πλάσμα των ασθενών⁹⁷. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ευεργετική επίδραση στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία των υγιεινοδιαιτητικών μέτρων που συνιστώνται για την αντιμετώπιση της ΑΥ, όπως η μεσογειακή διατροφή, η αερόβια άσκηση και η απώλεια βάρους, είναι καλά τεκμηριωμένη σε αντίστοιχες μελέτες⁹⁸.

Από την άλλη, παραμένουν υπό μελέτη άλλες φαρμακευτικές ουσίες των οποίων η κυρίαρχη δράση στο καρδιαγγειακό σύστημα ασκείται μέσω βελτίωσης της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ως πιθανός θεραπευτικός στόχος ο συμπαράγοντας BH4 της NOS, ο οποίος ενισχύει την κάθαρση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου⁹⁹. Παρότι η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων

BH4 σε υπερτασικούς ασθενείς συνοδεύτηκε από βελτίωση της ενδοθηλιακής τους λειτουργίας¹⁰⁰, οι μελέτες βρίσκονται καθαρά σε ερευνητικό επίπεδο, και παραμένει αμφιλεγόμενη η χορήγηση αντίστοιχων ουσιών σε ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου. Καλύτερα μελετημένοι είναι οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της ενδοθηλίνης, με κύριο εκπρόσωπο την μοσεντάνη, η οποία έχει βρεθεί από καιρό ότι ελαττώνει την αρτηριακή πίεση σε ασθενείς με ΑΥ μετρίου βαθμού¹⁰¹. Ωστόσο, η πιθανή χρήση της ως αντιυπερτασικού έχει εγκαταλειφθεί λόγω τοξικότητας (τερατογένεση, ατροφία όρχεων, ηπατοτοξικότητα)^{102,103} και έχει πάρει έγκριση μέχρι στιγμής μόνο για τη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης¹⁰⁴.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ενδοθήλιο αποτελεί ένα δυναμικό σύστημα που συμβάλλει καθοριστικά στη διατήρηση της ομοιοστασίας του αγγειακού τοιχώματος μέσω της παραγωγής μιας πλειάδας αγγειοδραστικών ουσιών με κυριότερο εκπρόσωπο το NO. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, δηλαδή η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ αγγειοσυσπαστικών και αγγειοδιασταλτικών ουσιών, θεωρείται το έναυσμα για την παθογένεση της ΑΥ και των καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ συμβάλλει στην εγκατάσταση και την εξέλιξη των μικρο- και μακροαγγειοπαθητικών επιπλοκών από τα όργανα-στόχους. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία δύναται να αξιολογηθεί με μεθόδους μη επεμβατικές που εξελίσσονται διαρκώς και διακρίνονται αδρά σε βιοχημικές και αγγειακές. Η αξιολόγηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας με τις μεθόδους αυτές έχει προγνωστική αξία ως προς τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, ωστόσο η εφαρμογή τους παραμένει σε ερευνητικό επίπεδο. Στους μηχανισμούς δράσης των αντιυπερτασικών και άλλων φαρμάκων με ευνοϊκή επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα συμπεριλαμβάνεται η βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, ενώ εξετάζεται η ανάπτυξη ειδικών θεραπευτικών παρεμβάσεων που αποσκοπούν στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Περισσότερες μελέτες απαιτούνται ώστε να καθοριστεί εάν η ευρεία εφαρμογή των μεθόδων αξιολόγησης ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας θα επιφέρει οφέλη στην κλινική πράξη και σε ποιες ομάδες ασθενών.

SUMMARY

Gkaliagkousi E, Anyfanti P, Koletsos N, Triantafyllou A, Lazaridis A, Nikolaidou B, Douma S

Endothelial dysfunction in essential Hypertension

Arterial Hypertension 2019; 28: 19-30.

The endothelium is a metabolically active organ responsible for the regulation of vascular tone through the production of several vasoreactive substances, the most important of which is nitric oxide (NO). Decreased NO bioavailability is characteristic of endothelial dysfunction. Evaluation of endothelial dysfunction is based on constantly evolving biochemical and vascular methods, yet their applicability is limited on the research field in spite of their non-invasive nature. Endothelial dysfunction is regarded as a primary process in the pathogenesis of arterial hypertension and cardiovascular diseases, with a critical role in the development and establishment of micro- and macrovascular complications. Evaluation of endothelial dysfunction in hypertensive patients has an established prognostic value for future cardiovascular events. Improvement of endothelial dysfunction is included in the pleiotropic mechanisms of action of antihypertensive regimens and other drugs targeting at the cardiovascular system. Detection of endothelial dysfunction in early stages aiming at the development of specific therapeutic targets could contribute to the prevention of cardiovascular diseases and remains under investigation.

Key-words: Endothelial dysfunction, essential hypertension, nitric oxide, biochemical markers, vascular methods, microangiopathy, macroangiopathy.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2010; 459(6): 1015-23.
2. Gutierrez E, Flammer AJ, Lerman LO, Elizaga J, Lerman A, Fernandez-Aviles F. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *Eur Heart J* 2013; 34(41): 3175-81.
3. Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Triantafyllou A, Douma S. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2015; 17(11): 85.
4. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation* 2003; 108(17): 2054-9.
5. Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12(6): 448-55.
6. Gkaliagkousi E, Ferro A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci* 2011; 16: 1873-97.

7. Gimbrone MA, García-Cardeña G, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118(4): 620-36.
8. Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-Derived Nitric Oxide Signaling and Regulation. *Circ Res* 2007; 101(7): 654-62.
9. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153(3): 1251-6.
10. Piazza M, Futrega K, Spratt DE, Dieckmann T, Guillemette JG. Structure and Dynamics of Calmodulin (CaM) Bound to Nitric Oxide Synthase Peptides: Effects of a Phosphomimetic CaM Mutation. *Biochemistry* 2012; 51(17): 3651-61.
11. Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Calcium-Dependent and Calcium-Independent Activation of the Endothelial NO Synthase. *J Vasc Res* 1997; 34(3): 165-74.
12. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001; 88(11): E68-75.
13. Gkaliagkousi E, Douma S, Zamboulis C, Ferro A. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension. *J Hypertens* 2009; 27(12): 2310-20.
14. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 1999; 43(3): 532-41.
15. List BM, Klösch B, Völker C, et al. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J* 1997; 323 (Pt 1): 159-65.
16. Gkaliagkousi E, Passacquale G, Douma S, Zamboulis C, Ferro A. Platelet Activation in Essential Hypertension: Implications for Antiplatelet Treatment. *Am J Hypertens* 2010; 23(3): 229-36.
17. Gkaliagkousi E, Corrigall V, Becker S, et al. Decreased platelet nitric oxide contributes to increased circulating monocyte-platelet aggregates in hypertension. *Eur Heart J* 2009; 30(24): 3048-54.
18. Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Yiannaki E, et al. Platelet Activation in Essential Hypertension During Exercise: Pre- and Post-Treatment Changes With an Angiotensin II Receptor Blocker. *Am J Hypertens* 2014; 27(4): 571-8.
19. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011; 18(6): 775-89.
20. Antoniadis C, Shirodaria C, Leeson P, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 2009; 30(9): 1142-50.
21. Çakar M, Bulucu F, Karaman M, et al. Asymmetric Dimethylarginine and Augmentation Index in Newly Diagnosed Patients With Hypertension. *Angiology* 2015; 66(1): 43-8.
22. Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Triantafyllou A, et al. Asymmetric dimethylarginine levels are associated with augmentation index across naïve untreated patients with different hypertension phenotypes. *J Clin Hypertens* 2018; 20(4): 680-5.
23. Serg M, Kampus P, Kals J, et al. Association between asymmetric dimethylarginine and indices of vascular function in patients with essential hypertension. *Blood Press* 2011; 20(2): 111-6.
24. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, et al. Asymmetric Dimethylarginine, L-Arginine, and Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(3): 518-23.
25. Boger RH, Sullivan LM, Schwedhelm E, et al. Plasma Asymmetric Dimethylarginine and Incidence of Cardiovascular Disease and Death in the Community. *Circulation* 2009; 119(12): 1592-600.
26. Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality – An update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 2009; 60(6): 481-7.
27. Trpkovic A, Resanovic I, Stanimirovic J, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015; 52(2): 70-85.
28. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. The association between pre-hypertension status and oxidative stress markers related to atherosclerotic disease: The ATTICA study. *Atherosclerosis* 2007; 192(1): 169-76.
29. Frostegård J, Wu R, Lemne C, Thulin T, Witztum JL, de Faire U. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clin Sci* 2003; 105(5): 615-20.
30. Liu G, Yin G-S, Tang J, Ma D-J, RU J, Huang X-H. Endothelial dysfunction in patients with primary aldosteronism: a biomarker of target organ damage. *J Hum Hypertens* 2014; 28(12): 711-5.
31. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating Microparticles. *Hypertension* 2006; 48(2): 180-6.
32. Blann A, Shantsila E, Shantsila A. Microparticles and Arterial Disease. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35(05): 488-96.
33. Amabile N, Rautou P-E, Tedgui A, Boulanger C. Microparticles: Key Protagonists in Cardiovascular Disorders. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36(08): 907-16.
34. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles. *Hypertension* 2003; 41(2): 211-7.
35. Huang P-H, Huang S-S, Chen Y-H, et al. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J Hypertens* 2010 Aug; 28(8): 1655-65.
36. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation* 2007; 115(10): 1285-95.
37. Luo S, Xia W, Chen C, Robinson EA, Tao J. Endothelial progenitor cells and hypertension: current concepts and future implications. *Clin Sci* 2016; 130(22): 2029-42.
38. Budzyń M, Gryszczyńska B, Boruckowski M, et al. The endothelial status reflected by circulating endothelial cells, circulating endothelial progenitor cells and soluble thrombomodulin in patients with mild and resistant hypertension. *Vascul Pharmacol* 2018 Dec 24.

39. de Ciuceis C, Pilu A, Rizzoni D, et al. Effect of antihypertensive treatment on circulating endothelial progenitor cells in patients with mild essential hypertension. *Blood Press* 2011; 20(2): 77-83.
40. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* 2003; 348(7): 593-600.
41. Pirro M, Schillaci G, Menecali C, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *J Hypertens* 2007; 25(10): 2093-9.
42. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89(1): E1-7.
43. Delva P, Degan M, Vallerio P, et al. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2007; 25(1): 127-32.
44. Farinacci M, Krahn T, Dinh W, et al. Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3(1): 49-58.
45. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454(3): 345-59.
46. Gouverneur M, Berg B, Nieuwdorp M, Stroes E, Vink H. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J Intern Med* 2006; 259(4): 393-400.
47. Ikonomidis I, Voumvourakis A, Makavos G, et al. Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives. *J Clin Hypertens* 2018; 20(4): 672-9.
48. Farouque HM, Meredith IT. The assessment of endothelial function in humans. *Coron Artery Dis* 2001; 12(6): 445-54.
49. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, et al. The Assessment of Endothelial Function. *Circulation* 2012; 126(6): 753-67.
50. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340(8828): 1111-5.
51. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(5): 1235-41.
52. Halcox JPJ, Donald AE, Ellins E, et al. Endothelial Function Predicts Progression of Carotid Intima-Media Thickness. *Circulation* 2009; 119(7): 1005-12.
53. Yeboah J, Crouse JR, Bluemke DA, et al. Endothelial dysfunction is associated with left ventricular mass (assessed using MRI) in an adult population (MESA). *J Hum Hypertens* 2011; 25(1): 25-31.
54. Huang AL, Silver AE, Shvenke E, et al. Predictive Value of Reactive Hyperemia for Cardiovascular Events in Patients With Peripheral Arterial Disease Undergoing Vascular Surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(10): 2113-9.
55. Takishima I, Nakamura T, Hirano M, et al. Predictive value of serial assessment of endothelial function in chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2012; 158(3): 417-22.
56. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, et al. Predictive Value of Brachial Flow-Mediated Dilation for Incident Cardiovascular Events in a Population-Based Study. *Circulation* 2009; 120(6): 502-9.
57. Lerman A, Holmes DR, Herrmann J, Gersh BJ. Microcirculatory dysfunction in ST-elevation myocardial infarction: cause, consequence, or both? *Eur Heart J* 2007; 28(7): 788-97.
58. Panza JA, García CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 1995; 91(6): 1732-8.
59. Roustit M, Cracowski J-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34(7): 373-84.
60. Briers JD, Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. *J Biomed Opt* 1996; 1(2): 174.
61. Tew GA, Klonizakis M, Crank H, Briers JD, Hodges GJ. Comparison of laser speckle contrast imaging with laser Doppler for assessing microvascular function. *Microvasc Res* 2011; 82(3): 326-32.
62. Iredahl F, Löfberg A, Sjöberg F, Farnebo S, Tesselaar E. Non-Invasive Measurement of Skin Microvascular Response during Pharmacological and Physiological Provocations. *PLoS One* 2015; 10(8): e0133760.
63. Draijer M, Hondebrink E, van Leeuwen T, Steenbergen W. Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. *Lasers Med Sci* 2009; 24(4): 639-51.
64. Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GMM, Tibiriçá E. Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2014; 25(1): 23-8.
65. Matheus ASM, Clemente ELS, Rodrigues MLG, Valença DCT, Gomes MB. Assessment of microvascular endothelial function in type 1 diabetes using laser speckle contrast imaging. *J Diabetes Complications* 2017; 31(4): 753-7.
66. Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res* 2012; 83(3): 376-9.
67. McLay KM, Fontana FY, Nederveen JP, et al. Vascular responsiveness determined by near-infrared spectroscopy measures of oxygen saturation. *Exp Physiol* 2016; 101(1): 34-40.
68. Gayda M, Gremeaux V, Drigny J, Juneau M, Nigam A. Muscle VO₂ and forearm blood flow repeatability during venous and arterial occlusions in healthy and coronary heart disease subjects. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 59(2): 177-83.
69. McLay KM, Nederveen JP, Pogliaghi S, Paterson DH, Murias JM. Repeatability of vascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy. *Physiol Rep* 2016; 4(9): e12772.
70. Su H, Huo C, Wang B, et al. Alterations in the coupling

- functions between cerebral oxyhaemoglobin and arterial blood pressure signals in post-stroke subjects. *PLoS One* 2018; 13(4): e0195936.
71. Dipla K, Triantafyllou A, Koletsos N, et al. Impaired Muscle Oxygenation and Elevated Exercise Blood Pressure in Hypertensive Patients: Links With Vascular Stiffness. *Hypertension* 2017; 70(2): 444-51.
 72. Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K. Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis: flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis* 2004; 173(1): 13-8.
 73. Dubin R, Owens C, Gasper W, Ganz P, Johansen K. Associations of endothelial dysfunction and arterial stiffness with intradialytic hypotension and hypertension. *Hemodial Int* 2011; 15(3): 350-8.
 74. Horvath T, Pinter A, Kollai M. Carotid artery stiffness is not related to endothelial function in young healthy subjects. *Auton Neurosci* 2012; 166(1-2): 85-8.
 75. Koivistoinen T, Virtanen M, Hutri-Kähönen N, et al. Arterial pulse wave velocity in relation to carotid intima-media thickness, brachial flow-mediated dilation and carotid artery distensibility: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study and the Health 2000 Survey. *Atherosclerosis* 2012; 220(2): 387-93.
 76. Yang Y, Xu J, Wang Y, Tang X, Gao P. Brachial flow-mediated dilation predicts subclinical target organ damage progression in essential hypertensive patients: a 3-year follow-up study. *J Hypertens* 2014; 32(12): 2393-400.
 77. Nigam A, Mitchell GF, Lambert J, Tardif J-C. Relation between conduit vessel stiffness (assessed by tonometry) and endothelial function (assessed by flow-mediated dilatation) in patients with and without coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2003; 92(4): 395-9.
 78. Bai Y, Sun L, Du L, et al. Association of circulating levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) with carotid intima-media thickness: Evidence from 6168 participants. *Ageing Res Rev* 2013; 12(2): 699-707.
 79. Stewart AD, Millasseau SC, Kearney MT, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Effects of Inhibition of Basal Nitric Oxide Synthesis on Carotid-Femoral Pulse Wave Velocity and Augmentation Index in Humans. *Hypertension* 2003; 42(5): 915-8.
 80. Michelson G, Wärtges S, Harazny J, Oehmer S, Delles C, Schmieder RE. Effect of NOS inhibition on retinal arterial and capillary circulation in early arterial hypertension. *Retina* 2006; 26(4): 437-44.
 81. Hemminki V, Laakso J, Kähönen M, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine and retinal vessel diameters in middle-aged men. *Metabolism* 2007; 56(10): 1305-10.
 82. Tsioufis C, Dimitriadis K, Andrikou E, et al. ADMA, C-Reactive Protein, and Albuminuria in Untreated Essential Hypertension: A Cross-sectional Study. *Am J Kidney Dis* 2010; 55(6): 1050-9.
 83. Mulvany MJ. Small Artery Remodelling in Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 110(1): 49-55.
 84. de Montgolfier O, Pinçon A, Pouliot P, et al. High Systolic Blood Pressure Induces Cerebral Microvascular Endothelial Dysfunction, Neurovascular Unit Damage, and Cognitive Decline in Mice. *Hypertension* 2019; 73(1): 217-28.
 85. Cangiano E, Marchesini J, Campo G, et al. ACE Inhibition Modulates Endothelial Apoptosis and Renewal via Endothelial Progenitor Cells in Patients with Acute Coronary Syndromes. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011; 11(3): 189-98.
 86. Suzuki R, Fukuda N, Katakawa M, et al. Effects of an Angiotensin II Receptor Blocker on the Impaired Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Essential Hypertension. *Am J Hypertens* 2014; 27(5): 695-701.
 87. Shahin Y, Khan JA, Samuel N, Chetter I. Angiotensin converting enzyme inhibitors effect on endothelial dysfunction: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis* 2011; 216(1): 7-16.
 88. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol* 2015; 7(11): 719.
 89. Rao A, Pandya V, Whaley-Connell A. Obesity and Insulin Resistance in Resistant Hypertension: Implications for the Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis* 2015; 22(3): 211-7.
 90. Maffei A, Di Pardo A, Carangi R, et al. Nebivolol Induces Nitric Oxide Release in the Heart Through Inducible Nitric Oxide Synthase Activation. *Hypertension* 2007; 50(4): 652-6.
 91. Feng M-G, Prieto MC, Navar LG. Nebivolol-induced vasodilation of renal afferent arterioles involves β_3 -adrenergic receptor and nitric oxide synthase activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303(5): F775-82.
 92. Momi S, Caracchini R, Falcinelli E, Evangelista S, Gressele P. Stimulation of Platelet Nitric Oxide Production by Nebivolol Prevents Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(4): 820-9.
 93. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation* 2001; 104(5): 511-4.
 94. Zepeda RJ, Castillo R, Rodrigo R, et al. Effect of Carvedilol and Nebivolol on Oxidative Stress-related Parameters and Endothelial Function in Patients with Essential Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 111(5): 309-16.
 95. Napoli C, Salomone S, Godfraind T, et al. 1,4-Dihydropyridine calcium channel blockers inhibit plasma and LDL oxidation and formation of oxidation-specific epitopes in the arterial wall and prolong survival in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 1999; 30(9): 1907-15.
 96. Reriani MK, Dunlay SM, Gupta B, et al. Effects of statins on coronary and peripheral endothelial function in humans: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011; 18(5): 704-16.
 97. Serban C, Sahebkar A, Ursoniu S, et al. A systematic review and meta-analysis of the effect of statins on plasma asymmetric dimethylarginine concentrations. *Sci Rep* 2015; 5(1): 9902.
 98. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Can J Cardiol* 2015; 31(5): 631-41.
 99. Wang Q, Yang M, Xu H, Yu J. Tetrahydrobiopterin Improves Endothelial Function in Cardiovascular Disease:

- A Systematic Review. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2014; 2014: 1-7.
100. Porkert M, Sher S, Reddy U, et al. Tetrahydrobiopterin: a novel antihypertensive therapy. *J Hum Hypertens* 2008; 22(6): 401-7.
 101. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The Effect of an Endothelin-Receptor Antagonist, Bosentan, on Blood Pressure in Patients with Essential Hypertension. *N Engl J Med* 1998; 338(12): 784-91.
 102. Spence S, Anderson C, Cukierski M, Patrick D. Teratogenic effects of the endothelin receptor antagonist L-753,037 in the rat. *Reprod Toxicol* 1999; 13(1): 15-29.
 103. Thaete LG, Neerhof MG, Silver RK. Differential effects of endothelin A and B receptor antagonism on fetal growth in normal and nitric oxide-deficient rats. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8(1): 18-23.
 104. Chaumais M-C, Guignabert C, Savale L, et al. Clinical Pharmacology of Endothelin Receptor Antagonists Used in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs* 2015; 15(1): 13-26.