

Strategie terapeutiche nel trattamento della disfunzione endoteliale: fatti e prospettive

Paolo Puddu

Dipartimento di Medicina Interna, Cardioangiologia, Epatologia, Università degli Studi, Bologna

Key words:

Endothelial dysfunction; Nitric oxide; Risk factors; Atherosclerosis; Therapy.

Endothelial cells play a key role in cardiovascular homeostasis by producing several vasoactive agents, which modulate basal vascular tone and structure.

Traditional risk factors of atherosclerosis contribute to endothelial dysfunction through different mechanisms such as oxidative stress, modulation of constitutive nitric oxide synthase, activation of angiotensin-converting enzyme and presumably endothelin-1.

The purpose of this review was to evaluate the results of experimental and human studies on several treatment options that could improve endothelial function.

However, further studies are needed to evaluate whether these different classes of drugs may improve both vascular injury and cardiovascular morbidity and mortality.

(Ital Heart J Suppl 2000; 1 (2): 212-221)

Ricevuto il 3 novembre 1999; nuova stesura il 23 dicembre 1999; accettato il 27 dicembre 1999.

Per la corrispondenza:

Prof. Paolo Puddu

Dipartimento di Medicina Interna, Cardioangiologia, Epatologia
Università degli Studi Policlinico S. Orsola-Malpighi
Via Massarenti, 9
40138 Bologna

Introduzione

Le cellule endoteliali esplicano un ruolo primario nel mantenimento della fisiologica omeostasi vascolare, attraverso la liberazione di fattori che regolano la vasodilatazione e la vasocostrizione e di fattori che possono indurre modificazioni della parete vasale, contribuendo allo sviluppo e alla progressione delle malattie vascolari. Il termine disfunzione endoteliale non configura quindi esclusivamente un'alterazione della vasodilatazione endotelio-dipendente ma può abbracciare anche condizioni in cui sono riscontrabili anomalie dell'interazione fra cellule endoteliali, leucociti, piastrine e sostanze implicate nella modulazione delle funzioni vascolari. Pertanto la disfunzione endoteliale di qualunque origine comporta modificazioni sia del tono vascolare endotelio-mediato che dell'integrità strutturale dei vasi. Il controllo del tono basale dei vasi è esercitato dal complesso bilancio fra fattori endoteliali rilassanti e di contrazione (Tab. I). Il principale e più noto fattore rilassante endoteliale è l'ossido nitrico (NO) prodotto da un enzima, la NO-sintetasi (NOS) di cui si conoscono varie isoforme, alcune costitutive (cNOS endoteliale e neuronale) ed altre inducibili (iNOS) da stimoli infiammatori, presenti in vari tipi di cellule, tra cui le cellule muscolari lisce vascolari, i cardiomiociti, i neutrofili, gli endoteli, ecc. L'NO endoteliale è prodotto rapidamente

dalla cNOS a partire dalla L-arginina in presenza di calcio ioni e di cofattori quali i nucleotidi flavinici (FMN, FAD), il nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH), l'eme e la tetraidrobiopterina^{1,2}. L'NO diffonde verso le cellule muscolari lisce vascolari e, attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi, produce il guanosin monofosfato ciclico che a sua volta provoca il rilassamento vasale. Oltre a contribuire alla regolazione del tono vascolare basale l'NO è in grado di esercitare altre importanti attività sul sistema cardiovascolare (Tab. II). Si conoscono varie cause che riducono la biodisponibilità di NO (Tab. III) e sono noti, oltre all'NO, vari fattori endoteliali inibitori e stimolanti, che regolano la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (Tab. IV). Il coinvolgimento dell'endotelio nella pro-

Tabella I. Fattori endoteliali che agiscono sul tono vascolare.

Fattori rilassanti
Ossido nitrico
Prostaciclina
Fattori iperpolarizzanti
Fattori di contrazione
Endotelina-1
Trombossano A ₂
Prostaglandina H ₂
Anioni superossido
Angiotensina II
Fattore di attivazione piastrinica

Tabella II. Alcuni effetti dell'ossido nitrico endoteliale sul sistema cardiovascolare.

Vasodilatazione
Inibizione della crescita della parete vascolare e della proliferazione delle cellule muscolari lisce
Inibizione dell'adesione e aggregazione piastrinica
Inibizione dell'adesione dei monociti alle cellule endoteliali
Soppressione dell'espressione di molecole di adesione (VCAM) e chimochine (MCP-1)
Stimolazione della produzione di GMP ciclico piastrinico
Inibizione del rilascio dell'endotelina-1

Tabella III. Cause di diminuita biodisponibilità di ossido nitrico (NO) endoteliale.

Diminuita disponibilità di L-arginina e dei cofattori dell'NO-sintetasi (acido folico, tetraidrobiopterina, nucleotidi flavinici)
Aumento dei livelli di inibitori endogeni dell'NO-sintetasi
Alterazioni della localizzazione dell'NO-sintetasi sulla membrana cellulare
Interazioni dell'NO-sintetasi con proteine e fosfolipidi di membrana
Aumento dello stress ossidativo con degradazione dell'NO
Diminuzione della sintesi di NO-sintetasi (effetto delle LDL ossidate)

Tabella IV. Fattori endoteliali che regolano la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari.

Fattori stimolanti
Vascular endothelial growth factor
Platelet-derived growth factor
Epidermal growth factor
Angiotensina II
Endotelina-1
Fattori inibitori
Eparan solfati
Ossido nitrico
Transforming growth factor- β_1
Basic fibroblast growth factor

liferazione delle cellule muscolari lisce vascolari nei processi coagulativi, nella fibrinolisi, nei meccanismi di adesione dei leucociti, eritrociti e piastrine, nella permeabilità vascolare e nei fenomeni infiammatori, fa comprendere come la disfunzione endoteliale contribuisca anche all'aterogenesi (Tab. V). Alterazioni delle funzioni endoteliali, espresse da una diminuita vasodilatazione endotelio-mediata e da un eccesso di radicali liberi dell'ossigeno in situazioni di stress ossidativo, sono state infatti riscontrate nell'aterosclerosi e in varie situazioni di rischio aterosclerotico, quali l'ipercoleste-

Tabella V. Alcune cause e conseguenze della disfunzione endoteliale.

<i>Cause</i>
Eccesso di LDL ossidate e/o modificate
Eccesso di radicali liberi prodotti in corso di ipercolesterolemia, diabete, ipertensione, fumo di sigaretta, iperomocisteinemia, infezioni virali o da Clamidio, ecc.
<i>Conseguenze</i>
Alterazione del bilancio: ossido nitrico-radicali liberi dell'ossigeno
Vasocostrizione
Aumento dell'adesività endoteliale dei leucociti e piastrine e loro attivazione
Comparsa di attività procoagulante endoteliale
Formazione di citochine e fattori di crescita
Stimolo alla migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari e rimodellamento della parete arteriosa
Accumulo di monociti-macrofagi e di linfociti attivati con rilascio di enzimi idrolitici, chemochine, citochine e fattori di crescita
Formazione della placca aterosclerotica

rolema, l'ipertensione arteriosa, il diabete, l'iperomocisteinemia, la carenza estrogenica e l'invecchiamento vascolare¹. Viene considerata un nuovo fattore di rischio anche la carenza relativa di tetraidrobiopterina, cofattore delle cNOS e delle iNOS, che in concentrazioni subottimali determina la produzione del radicale perossido di idrogeno invece che dell'NO³.

Sulla base di queste premesse, l'interesse dei ricercatori si è focalizzato, negli ultimi anni, sulla possibilità di intervenire farmacologicamente sulla disfunzione endoteliale implicata nell'ipercolesterolemia e nelle altre situazioni di rischio cardiovascolare, nel tentativo di prevenire le lesioni d'organo ad esse correlate. Il problema dell'uso dei farmaci in grado di modulare la funzione endoteliale è spesso complicato dagli effetti contemporanei che alcuni di essi esercitano su altri parametri clinici (ipertensione, ipercolesterolemia). Molte ricerche sugli effetti dei farmaci sono state finora condotte sperimentalmente e attendono conferme significative anche nella patologia umana (Tab. VI).

ACE-inibitori

Gli effetti benefici degli ACE-inibitori sul rischio coronarico e sulla protezione vascolare potrebbero essere spiegati, almeno in parte, attraverso un'attenuazione della disfunzione endoteliale⁴. Essi potrebbero agire riducendo la conversione dell'angiotensina I in angiotensina II. Infatti, la formazione di angiotensina II dopo somministrazione intracoronarica di angiotensina I nell'uomo è risultata ridotta dell'89% dal trattamento con un ACE-inibitore⁵. L'angiotensina II contribuirebbe alla disfunzione endoteliale e alla formazione della placca aterosclerotica aumentando l'adesione dei monociti sugli endoteli⁶ e la produzione di anioni superossido da parte delle cellu-

Tabella VI. Strategie terapeutiche nella disfunzione endoteliale nell'uomo.

Somministrazione in acuto	
	ACE-inibitori
	Calcioantagonisti
	Antiossidanti (vitamina C)
	L-arginina, D-arginina
	Folati
	Tetraidrobiopterina
	Glutazione
Trattamenti cronici	
	ACE-inibitori
	Calcioantagonisti
	Inibitori dell'HMG-CoA reduttasi
	Antiossidanti (vitamina C, probucol)
	Estrogeni
	Nebivololo
	L-arginina
	Nitrati
	Analoghi della prostaciclina
Prospettive future	
	Antagonisti dell'angiotensina II
	Antagonisti dell'endotelina-1

le muscolari lisce vascolari, stimolando l'attività NADH ossidasi e NADPH ossidasi^{7,8}. L'angiotensina II sembrerebbe anche esercitare un ruolo importante nella migrazione e proliferazione dei tessuti vascolari^{9,10}. Gli ACE-inibitori potrebbero potenzialmente prevenire la proliferazione miointimale dopo un danno vascolare¹¹. Tuttavia, è stato dimostrato che l'ACE-inibitore cilazapril è stato inefficace nel prevenire la risteno coronarica dopo angioplastica coronarica percutanea nell'uomo¹². Questi risultati potrebbero essere riconducibili all'osservazione che, per lo meno nel ventricolo sinistro dell'uomo, l'ACE non è l'enzima prevalente nella sintesi dell'angiotensina II¹³. Recentemente è stato osservato che enzimi della classe delle chimesi contribuiscono in maniera determinante alla formazione di angiotensina II anche in preparati di tessuti vascolari umani¹⁴. L'ACE-inibitore lisinopril inibisce solo per il 10% la sintesi di angiotensina II. Risultati apparentemente contrastanti sono stati ottenuti in preparati di siero umano normale in cui il captopril ha completamente inibito la formazione di angiotensina II. Queste osservazioni sembrano dimostrare che gli effetti benefici degli ACE-inibitori sulla disfunzione endoteliale non derivino esclusivamente dalla prevenzione della generazione di angiotensina II. In realtà essi potrebbero agire anche aumentando i livelli di bradichinina e di NO¹⁵ e si ritiene che durante l'ACE-inibizione le funzioni vasodilatatrici, antimitogeniche e antitrombotiche delle cellule endoteliali possano essere potenziate dalle azioni delle chinine vascolari^{16,17}. L'attivazione del sistema ACE può inoltre determinare un'alterazione del bilancio fra fattori proliferativi endoteliali (endotelina, angiotensina II, prostaglandina, trombossano) e fattori inibitori (NO, prostaciclina, bradichinina). Ta-

le attivazione può anche stimolare la sintesi dell'NO inducibile da parte delle cellule muscolari lisce¹⁸ e modificare le lipoproteine a bassa densità (LDL), che vengono captate dai recettori *scavenger* dei macrofagi, determinando infine un accumulo di colesterolo¹⁹.

Esiste quindi un'interazione fra dislipidemia, attivazione del sistema renina-angiotensina e malattia aterosclerotica. Gli ACE-inibitori, usati anche in associazione a farmaci ipolipemizzanti, potrebbero quindi agire, con effetto addizionale o sinergico, nella prevenzione della progressione dell'aterosclerosi sperimentale e anche umana²⁰.

Sulla base di queste premesse sono state condotte ricerche in alcune condizioni sperimentali associate ad una disfunzione endoteliale quali l'ipertensione spontanea dei ratti²¹, la cronica carenza di NO nei ratti²² e l'ipercolesterolemia nei conigli mantenuti a dieta aterogena²³. In questi ed altri studi la somministrazione protratta di alcuni ACE-inibitori ha determinato un miglioramento della funzione endoteliale.

Nell'uomo la somministrazione in acuto di captopril determina un transitorio miglioramento della funzione endoteliale nei pazienti ipertesi inducendo un aumento della vasodilatazione endotelio-dipendente dei vasi dell'avambraccio²⁴ e dei vasi coronarici²⁵. Gli studi a lungo termine sull'uomo hanno dato risultati non univoci, negativi per il captopril, enalapril e lisinopril per alcuni ricercatori²⁶⁻³⁰, positivi per altri nei riguardi del quinapril^{31,32}. Ciò suggerisce una differenza potenziale d'azione fra i singoli composti. Recentemente è stato pubblicato il primo trial atto a verificare se gli ACE-inibitori siano in grado di inibire la formazione di angiotensina II a livello vascolare anche nell'uomo. Zhuo et al.³³ hanno dimostrato che il trattamento con perindopril per 1 mese ha determinato un'ACE-inibizione nell'avventizia e nell'endotelio dell'arteria mammaria interna di pazienti con cardiopatia ischemica. Una riprova clinica dell'effetto favorevole degli ACE-inibitori sulla funzione endoteliale è fornita dallo studio TREND³¹. È stato dimostrato che in pazienti con cardiopatia ischemica (non ipertesi né portatori di significative alterazioni dell'assetto lipidico), il trattamento per 6 mesi con quinapril ha determinato un significativo miglioramento della funzione endoteliale, valutata attraverso la favorevole risposta angiografica alla vasocostrizione da acetilcolina. Mancini³⁴ e Parmley³⁵ sono concordi nel prospettare che i risultati dello studio TREND e di altri trial clinici tuttora in corso potrebbero confermare nei prossimi anni che gli ACE-inibitori, attraverso la riduzione dei livelli di angiotensina II e l'incremento dell'NO, possano contrastare la progressione dell'aterosclerosi e diminuire gli eventi coronarici.

Calcioantagonisti

Nelle cellule endoteliali non sono presenti recettori specifici del calcio di tipo L ed è noto che il calcio

rappresenta un cofattore per l'NO-sintetasi, necessario per la sua attivazione^{36,37}. Tuttavia, è stato osservato che il blocco dei canali del calcio riduce la pressione arteriosa e migliora la disfunzione endoteliale nelle arterie di resistenza perfuse dei ratti spontaneamente ipertesi³⁸. Inoltre il trattamento con un calcioantagonista diidropiridinico ha determinato un miglioramento del rilassamento arterioso endotelio-mediato anche nei conigli ipercolesterolemici³⁹. Il meccanismo di tali azioni non è stato completamente chiarito. Infatti, è stato recentemente dimostrato⁴⁰ che la nifedipina e il diltiazem non stimolano il rilascio di NO dai microvasi coronarici isolati di cani normali, mentre l'amlodipina si è dimostrata efficace. Si tratta presumibilmente di un meccanismo chinina-dipendente ma non è escluso che alcuni calcioantagonisti facilitino gli effetti di fattori rilassanti endoteliali o contrastino l'azione vasocostrittrice dell'endotelina-1 (ET-1)^{41,42}. Alcuni studi su pazienti ipertesi hanno dimostrato che la nifedipina non migliorerebbe neppure in acuto²⁴ il rilassamento vascolare endotelio-dipendente²⁶, mentre altri avrebbero dimostrato un effetto favorevole nei pazienti con ipercolesterolemia familiare⁴³. L'isradipina, al contrario, ha determinato sia a medio che a lungo termine un miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente in pazienti ipertesi mai trattati. Si è ipotizzato che ciò sia dovuto ad un aumento di produzione endoteliale di NO attraverso un meccanismo calcio-dipendente⁴⁴. È tuttavia presumibile che i calcioantagonisti possiedano anche una capacità antiossidante, che potrebbe contrastare l'eccesso di anioni superossido, in grado di inattivare l'NO ed ossidare le LDL⁴⁵. Non si può neppure escludere che i calcioantagonisti ostacolino l'azione dell'ET-1. Infatti, il blocco dei canali del calcio, contrariamente ai nitrati e al fattore rilassante endoteliale, ha determinato nell'uomo una regressione della vasocostrizione indotta dall'ET-1⁴⁶. Infine nelle situazioni di cronica deprivazione di NO come l'ipertensione^{47,48} sia il calcioantagonista verapamil che l'ACE-inibitore trandolapril sembrano potenziare meccanismi vasodilatatori endoteliali indipendenti dall'NO che di norma non hanno un ruolo nel mantenere il tono vascolare⁴².

Antagonisti dell'angiotensina II

Si tratta di un gruppo eterogeneo di composti, utilizzati quali farmaci antipertensivi e caratterizzati dal possedere un nucleo imidazolico variamente modificato e dalla proprietà di antagonizzare selettivamente il recettore AT-1 dell'angiotensina II. Essi bloccano quindi gli effetti di tale ormone. Esistono alcuni studi sperimentali che dimostrano che il losartan induce una regressione dell'ipertrofia cardiovascolare e aumenta il rilassamento arterioso endotelio-dipendente nel ratto geneticamente iperteso^{49,50}, probabilmente per un aumento della disponibilità di NO⁵¹. Peraltro saranno necessarie

ulteriori ricerche per confermare l'effetto sulla funzione endoteliale anche nell'uomo.

Antagonisti dell'endotelina-1

L'ET-1 è una sostanza vasocostrittrice di derivazione endoteliale dotata di attività mitogena e trofica, in grado di influenzare il tono basale vascolare, il tono vasomotore coronarico e la pressione arteriosa⁵²⁻⁵⁵ attraverso l'attivazione dei recettori ET-A delle cellule muscolari lisce e dei recettori endoteliali ET-B. L'ET-1, prodotta dalle cellule endoteliali in risposta a stimoli chimici o meccanici, potenzia l'azione di altre sostanze vasocostrittrici in aggiunta alla vasocostrizione che produce direttamente agendo su recettori muscolari ET-A. Agendo contemporaneamente sui recettori endoteliali ET-B stimola invece la formazione tonica di NO e si oppone alla vasocostrizione. Molti studi hanno dimostrato che la generazione di ET-1 o la sensibilità all'ET-1 non è aumentata negli stati ipertensivi⁵⁶. Pur tuttavia, se la produzione endoteliale di NO è ridotta, come avviene nella disfunzione endoteliale presente nell'ipertensione, gli effetti vasocostrittori dell'ET-1 sono accentuati. Nello stesso tempo compaiono anche altri effetti dannosi sui vasi determinati dalle complesse attività dell'ET-1, che partecipa così al rimodellamento cardiaco e vascolare ed anche al danno renale dell'ipertensione. L'endotelina può quindi contribuire alla fisiopatologia di varie condizioni di alterata omeostasi vascolare, nell'ipertensione, nello stroke, nell'emorragia subaracnoidea, nell'insufficienza renale, nello scompenso cardiaco e nell'aterogenesi⁵⁷⁻⁶⁰. Sono attualmente disponibili numerosi antagonisti selettivi dei recettori ET-A, ET-B ed altri che antagonizzano entrambi i recettori ET-A-ET-B. Trial clinici appropriati potrebbero stabilire nei prossimi anni se gli antagonisti dell'endotelina possano rappresentare una classe di nuovi farmaci efficaci nel trattamento delle malattie cardiovascolari.

Inibitori dell'HMG-CoA reduttasi (statine)

Le statine sono potenti farmaci ipolipidemizzanti e rappresentano uno dei cardini della prevenzione e della terapia dell'aterosclerosi ed in particolare della cardiopatia ischemica. Agiscono determinando una riduzione dei livelli di colesterolo LDL e un aumento delle lipoproteine ad alta densità. L'elevazione delle LDL modificate dalla glicazione in corso di diabete oppure progressivamente ossidate nell'intima vascolare negli stati di stress ossidativo, gioca un ruolo critico nell'aterogenesi. La deposizione di LDL ossidate o modificate nella parete vascolare determina l'internalizzazione delle stesse nei macrofagi, con formazione della precoce lesione dell'aterosclerosi, la stria lipidica. Le LDL ossidate riducono anche il rilascio endoteliale di NO e stimolano l'espressione di molecole di adesione e l'induzione

di citochine infiammatorie^{61,62}. Secondo l'ipotesi della disfunzione endoteliale dell'aterosclerosi, tra le cause che inducono questa alterazione sono da considerare le LDL modificate o ossidate e l'aumento dei radicali liberi che si può osservare nell'ipertensione, nel diabete, nel fumo di sigarette, l'iperomocisteinemia, le infezioni, le modificazioni genetiche, ecc.⁶³. Oltre alla riduzione del colesterolo LDL, le statine agiscono nell'aterogenesi anche attraverso altri meccanismi, tra cui sembra giocare un ruolo il miglioramento della disfunzione endoteliale⁶⁴. Sono state infatti descritte azioni benefiche di alcuni farmaci della classe delle statine sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari, sull'infiammazione, sulla trombogenesi e l'ossidazione delle LDL, sulle interazioni leucociti-endoteli, sulla stabilizzazione della placca e sulla prevenzione della rottura delle placche instabili. Come avviene in alcuni modelli di ipertensione sperimentale⁶⁵ anche nell'uomo Leung et al.⁶⁶ hanno dimostrato che i farmaci ipocolesterolemizzanti sono efficaci nell'indurre un miglioramento del rilassamento endotelio-mediato nelle coronarie di pazienti ipercolesterolemici. Questi dati sono stati confermati dalle ricerche di Gould et al.⁶⁷ mediante la tomografia ad emissione di positroni ed anche da altri studi^{68,69}. Ciò sembrerebbe dimostrare che l'azione sulla funzione endoteliale sia una diretta conseguenza della diminuzione dei livelli di colesterolo e in particolare delle LDL^{70,71}. Tuttavia Williams et al.⁷² hanno suggerito che gli effetti favorevoli della pravastatina possono essere indipendenti dall'azione sulle LDL. Kaesemeyer et al.⁷³ hanno infatti dimostrato che la pravastatina e in maniera minore la simvastatina hanno determinato una significativa vasodilatazione di anelli di aorta di ratto e un aumento della produzione di NO da parte di colture di cellule endoteliali di aorta bovina. È stata inoltre riscontrata un'attivazione dell'NO-sintetasi endoteliale. Ciò confermerebbe un effetto diretto delle statine sulle cellule endoteliali. È stato infine recentemente dimostrato che il trattamento della severa ipercolesterolemia con atorvastatina in monoterapia o con simvastatina associata a colestiramina determina un miglioramento della funzione endoteliale arteriosa⁷⁴.

L'insieme di questi dati è in accordo con l'ipotesi che l'azione favorevole delle statine sulla disfunzione endoteliale possa prevenire l'insorgenza di eventi coronarici futuri⁷⁵ e rapidamente migliorare la funzione endoteliale dopo l'infarto miocardico o l'angina instabile⁷⁶.

Antiossidanti

Studi sugli animali^{77,78} hanno da tempo dimostrato che il trattamento con il probucol, che possiede un'attività ipocolesterolemizzante e antiossidante, e con le vitamine antiossidanti E e beta-carotene, determina un miglioramento della disfunzione endoteliale nell'ipercolesterolemia. Il meccanismo consiste nel preservare l'azione dell'NO limitando lo stress ossidativo e la generazione di

anione superossido indotti dall'eccesso di colesterolo. La somministrazione protratta di vitamina E in soggetti ipercolesterolemici^{79,80} e nei diabetici di tipo II⁸¹ non ha prodotto invece alcun effetto sulla vasodilatazione endotelio-dipendente, mentre nell'ipercolesterolemia determina una diminuzione della P-selectina⁸². Un effetto favorevole sarebbe invece riscontrabile nell'angina vasospastica⁸³. Più promettenti sono le ricerche effettuate con la somministrazione in acuto di acido ascorbico che hanno dimostrato un miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente nell'ipercolesterolemia⁸⁴, nel fumo cronico di sigarette⁸⁵, nel diabete non insulino-dipendente⁸⁶, nella malattia coronarica⁸⁷ e nell'ipertensione arteriosa^{88,89}. Tale effetto è probabilmente connesso all'attività antiossidante posseduta dalla vitamina C, che esercita un'azione *scavenger* sui radicali liberi che inattivano l'NO nel sistema vascolare, nelle varie situazioni di rischio cardiovascolare ed anche nello scompenso cronico⁹⁰. Sono in corso studi che consentiranno di valutare gli effetti a lungo termine della somministrazione di vitamine antiossidanti sulla morbilità e mortalità cardiovascolare^{91,92}. Risultati promettenti sono stati recentemente pubblicati in pazienti con aterosclerosi coronarica, che hanno dimostrato l'azione favorevole sulla disfunzione endoteliale esercitata dalla somministrazione protratta per 1 mese di acido ascorbico⁹³.

Ormoni sessuali

Numerose ricerche sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione in acuto di estrogeni determina un rilassamento dei muscoli lisce vascolari in particolare nei primati in periodo post-menopausale⁹⁴, nelle coniglie private acutamente di estrogeni⁹⁵ o nei conigli trattati con un inibitore dell'NO-sintetasi⁹⁶. È stato osservato che nelle donne in periodo post-menopausale con aterosclerosi coronarica, ma non nei maschi, la somministrazione intracoronarica di 17-beta estradiolo determina un miglioramento del rilassamento endotelio-dipendente acetilcolina-mediato⁹⁷. Il trattamento con estradiolo transdermico a breve termine determina un miglioramento della vasomotilità coronarica nelle donne in periodo post-menopausale con angina e arterie coronarie angiograficamente normali⁹⁸. Risultati simili sono stati ottenuti anche dopo 9 settimane di terapia estrogenica⁹⁹. La presenza di recettori per gli estrogeni sia in molte specie di mammiferi che nelle cellule endoteliali umane¹⁰⁰ avvalorata l'ipotesi che gli estrogeni possano agire direttamente sui tessuti vascolari. È stato anche suggerito che gli estrogeni possiedano un'azione antiossidante nei confronti delle LDL¹⁰¹, facilitino il rilascio di fattori rilassanti endoteliali o inibiscano quello di fattori costrittivi¹⁰², contrastino gli effetti costrittori dell'ET-1¹⁰³ ed esercitino un'azione calcioantagonista¹⁰⁴.

È stato infine osservato che la carenza di androgeni nel maschio determinata dall'orchietomia bilaterale o dal trattamento per 6 o più mesi per carcinoma prosta-

tico determina un aumento della vasodilatazione endotelio-dipendente dei vasi dell'avambraccio¹⁰⁵.

Diabete

Si ritiene che la disfunzione endoteliale espliciti un ruolo cruciale nello sviluppo delle complicanze vascolari del diabete. Lo stress ossidativo e la dislipidemia con formazione di LDL ossidate o glicate determinano una ridotta disponibilità di vasodilatatori endoteliali ed un aumento dei fattori procoagulanti e vasocostrittori, che attraverso un'azione di rimodellamento vascolare possono spiegare l'aumentata incidenza di ipertensione e di aterosclerosi negli stati diabetici. È stato sperimentalmente osservato che la disfunzione endoteliale e l'insulino-resistenza precedono lo sviluppo dell'ipertensione¹⁰⁶ e che il trattamento protratto con insulina nel diabete da streptozotocina nel ratto previene l'alterazione del rilassamento arterioso, mentre la somministrazione in acuto non ha alcun effetto¹⁰⁷. Un effetto difficilmente spiegabile è stato riscontrato con il trattamento protratto mediante uno *scavenger* idrosolubile dell'NO (NOX-101) nel diabete da streptozotocina nel ratto. Il NOX-101 determina una minore disponibilità di NO ma ciononostante previene l'alterazione del rilassamento vascolare endotelio-dipendente ma non quello endotelio-indipendente nei ratti diabetici. Ciò sembrerebbe suggerire che in queste condizioni sperimentali la disfunzione endoteliale sia determinata da un incremento paradossale dell'NO durante il decorso del diabete e che questo meccanismo potrebbe rappresentare una nuova via di complicanze vascolari¹⁰⁸.

Nel soggetto normale, la somministrazione di insulina non produce da sola un aumento del flusso ematico dei vasi dell'avambraccio, ma potenzia l'effetto endotelio-dipendente dell'acetilcolina¹⁰⁹. Questo effetto potrebbe essere mediato, almeno in parte, da un'attivazione del sistema arginina-NO. Infine è stato osservato che il trattamento protratto con un ACE-inibitore (perindopril) non determina un miglioramento della funzione endoteliale in pazienti adulti con diabete di tipo 1¹¹⁰.

Altri farmaci

I nitrati sono una categoria di farmaci vasodilatatori endotelio-indipendenti. Infatti, essi liberano NO direttamente nella media arteriosa, agendo quali agenti NO-simili, fornendo NO alle cellule endoteliali e al muscolo liscio della tonaca media in condizioni di diminuita disponibilità di tale composto, come avviene nella disfunzione endoteliale. La massima attività vasodilatatrice viene esplicata proprio nelle condizioni di disfunzione endoteliale, mentre in presenza di una normale funzione hanno una capacità molto minore. Ciò spiega l'utilità e l'efficacia dei nitrati, che possiedono anche un'attività antiplastrinica^{111,112} e modulatrice dell'attivazione dei

neutrofili¹¹³ nei pazienti con malattie vascolari associate a disfunzione endoteliale¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Un'altra opzione terapeutica può essere rappresentata dalla somministrazione di L-arginina, precursore dell'NO costitutivo ma presumibilmente dotata anche di altre attività metaboliche¹¹⁷. I risultati di vari studi nell'uomo¹¹⁸ sembrerebbero prospettare un effetto favorevole della L-arginina sulla vasodilatazione endotelio-dipendente da acetilcolina nell'aterosclerosi coronarica e nell'ipercolesterolemia^{27,117,119,120} e nei fumatori ma non nei diabetici insulino-dipendenti¹²¹. Recentemente è stato osservato un risultato positivo della L-arginina anche sulla funzione miocardica ed endoteliale nel trapianto cardiaco sia nella riperfusione precoce che tardiva¹²². Altri farmaci, quali ad esempio i folati, la tetraidrobiopterina, il glutatione, il nebulolo, ecc., avrebbero dimostrato un miglioramento della disfunzione endoteliale. Occorrono tuttavia ulteriori studi che confermino l'efficacia della somministrazione protratta di tali trattamenti.

Conclusioni

Fin dal 1980 è stato dimostrato da Furchgott e Zawadzki "il ruolo obbligatorio delle cellule endoteliali nel rilassamento delle cellule muscolari lisce arteriose indotto dall'acetilcolina"¹²³. Si ritiene attualmente che vari gradi di disfunzione endoteliale, espressa da un'alterata vasodilatazione arteriosa endotelio-mediata, siano presenti in molti pazienti con uno o più fattori di rischio dell'aterosclerosi. La valutazione della disfunzione endoteliale *in vivo* viene attuata attraverso lo studio della vasoreattività endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente in seguito alla somministrazione di agonisti sia a livello del circolo coronarico che arterioso sistemico. Non esistono infatti attualmente metodiche affidabili per la determinazione *in vivo* di molecole, quali ad esempio l'NO, in grado di modulare sia il tono vasale che le altre funzioni endotelio-mediate. Tali molecole infatti possiedono emivite biologiche estremamente brevi e svolgono varie azioni, che si intrecciano fra loro. Tra le metodiche disponibili sono da considerare gli studi del flusso coronarico, mediante Doppler intracoronarico, in risposta a stimoli vasodilatatori¹²⁴ o mediante tomografia ad emissione di positroni^{67,125}. Sono utilizzate per lo studio dei vasi periferici la pletismografia ad impedenza degli arti⁴⁸, l'ultrasonografia ad alta risoluzione delle arterie brachiali e femorali¹²⁶ e meno frequentemente la valutazione della venodilatazione in risposta ad agenti endoteliali della vena dorsale della mano mediante un trasduttore lineare¹²⁷. Sarebbe peraltro auspicabile che le metodologie non invasive impiegate fino ad ora, in parte inficiate da variabilità spontanee anche giornaliere, venissero meglio standardizzate. Ciò consentirebbe una più ampia valutazione sia dell'accuratezza e riproducibilità delle metodiche che della loro importanza predittiva di sviluppo dell'aterosclerosi e delle sue complicanze¹²⁸.

Inoltre non è tuttora possibile stabilire se l'alterazione della capacità vasodilatatrice endotelio-mediata rappresenta un fattore predittivo preminente di evoluzione della malattia aterosclerotica senza che sia conseguente o correlata ad altri parametri di alterata funzione endoteliale, quali ad esempio l'attivazione dei leucociti e delle piastrine, i disturbi della coagulazione, le alterazioni infiammatorie e immunologiche, ecc. Infatti, i farmaci in grado di migliorare la vasodilatazione NO-mediata esplicano in genere anche altre azioni sulle alterazioni metaboliche e funzionali correlate all'aterogenesi. Neppure è possibile sapere, allo stato attuale delle conoscenze, se gli interventi finalizzati a correggere la disfunzione endoteliale rappresentino un obiettivo terapeutico primario nel mantenimento dell'omeostasi e nella prevenzione del danno vascolare. Per chiarire ciò saranno necessari studi prospettici, a lungo termine e su un ampio campione di popolazione, che possibilmente considerino sia la risposta vasomotoria dei farmaci sia gli altri aspetti della funzione endoteliale. È auspicabile che queste ricerche possano confermare se i farmaci attivi sulla disfunzione endoteliale siano in grado di contrastare l'evoluzione dell'aterosclerosi e ridurre la morbilità e mortalità cardiovascolare.

Riassunto

L'endotelio esplica un ruolo cruciale nell'omeostasi cardiovascolare attraverso la liberazione di fattori che agiscono sul tono vascolare di base e sulle modificazioni strutturali della parete arteriosa. I tradizionali fattori di rischio dell'aterosclerosi contribuiscono alla disfunzione endoteliale attraverso vari meccanismi, tra cui lo stress ossidativo, la modulazione dell'enzima ossido nitrico-sintetasi costitutiva, l'attivazione del sistema ACE e presumibilmente l'endotelina-1.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati di studi sperimentali e sull'uomo di varie categorie di farmaci (ACE-inibitori, calcioantagonisti, antagonisti dell'angiotensina II e dell'endotelina-1, statine, vitamine antiossidanti, alcuni ormoni ed altri farmaci) che in particolari condizioni potrebbero migliorare la disfunzione endoteliale.

Ulteriori ricerche sono peraltro necessarie per chiarire se tali interventi siano in grado di prevenire i danni cardiovascolari dell'alterata funzione endoteliale e la morbilità e mortalità cardiovascolare. Infatti, non è ancora noto se il ripristino delle attività endoteliali connesse ai fattori di rischio possa prevenire o migliorare gli eventi clinici ad essi correlati.

È tuttavia auspicabile che in futuro gli interventi specifici sulla disfunzione endoteliale possano rappresentare un obiettivo terapeutico nel mantenimento della normale omeostasi cardiovascolare.

Parole chiave: Disfunzione endoteliale; Ossido nitrico; Fattori di rischio; Aterosclerosi; Terapia.

Bibliografia

1. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20 (Suppl II): II3-II10.
2. Cosentino F, Katuzic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial cell nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 1995; 91: 139-44.
3. Heinzel B, John M, Klatt P, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992; 281: 627-30.
4. Pepine CJ. Improved endothelial function with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Cardiol* 1997; 79 (5A): 29-32.
5. Zisman LS, Abraham WT, Meixell GE, et al. Angiotensin II formation in the intact human heart. *J Clin Invest* 1995; 96: 1490-8.
6. Hahn AWA, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett* 1994; 347: 178-80.
7. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-8.
8. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. Evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999; 99: 2027-33.
9. Naftilan AJ, Gilliland G, Eldridge CS, Kraft AS. Induction of the protooncogene c-jun by angiotensin II. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5536-40.
10. Schelling H, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991; 9: 3-15.
11. Powell JS, Clozel JP, Muler RKM, et al. Inhibitors of angiotensin converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1991; 245: 186-8.
12. Faxon DP. Effect of high dose angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis: final results of the MARCATOR study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril. The Multicenter American Research Trial With Cilazapril After Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MARCATOR) Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1995; 2: 362-9.
13. Urata H, Healy B, Stewart RW, et al. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* 1990; 66: 883-90.
14. Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Miyazaki M. Chymase-dependent angiotensin II formation in human vascular tissue. *Circulation* 1999; 100: 654-8.
15. Mombouli JV. ACE inhibition, endothelial function and coronary artery lesions. Role of kinins and nitric oxide. *Drugs* 1997; 54 (Suppl 5): 12-22.
16. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and the regulation of vascular smooth muscle function by the endothelium. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 679-705.
17. Vanhoutte PM, Boulanger CM, Vidal MJ, Mombouli JV. Endothelium-derived mediators and the renin-angiotensin system. In: Robertson JIS, Nicholls MG, eds. *The renin-angiotensin system*. London: Gower Medical, 1993; cap 29.
18. Ikeda U, Maeda Y, Kawahara Y, et al. Angiotensin II augments cytokine-stimulated nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *Circulation* 1995; 92: 2683-9.
19. Keidar S, Kaplan M, Aviram M. Angiotensin II-modified LDL is taken up by macrophages via the scavenger receptor, leading to cellular cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 97-105.
20. Pitt B. The potential use of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with hyperlipidemia. *Am J Cardiol* 1997; 79 (5A): 24-8.

21. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1998; 16: 457-66.
22. Takase H, Moreau P, Kung CF, et al. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency: effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension* 1996; 27: 25-31.
23. Finta KM, Fischer MJ, Lee L, et al. Ramipril prevents impaired endothelium-dependent relaxation in arteries from rabbits fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis* 1993; 100: 149-56.
24. Hirooka Y, Imaizumi T, Masaki H, et al. Captopril improves impaired endothelium-dependent vasodilation in hypertensive patients. *Hypertension* 1992; 20: 175-80.
25. Antony I, Lerebours G, Nitenberg A. Angiotensin-converting enzyme inhibition restores flow-dependent and cold pressor test-induced dilations in coronary arteries of hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 3115-22.
26. Panza J, Quyyumi AA, Callahan TS, Epstein SE. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 1145-51.
27. Creager MA, Roddy MA. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension* 1994; 24: 499-505.
28. Kiowski W, Linder L, Nuesch R, Martina B. Effects of cilazapril on vascular structure and function in essential hypertension. *Hypertension* 1996; 27 (Part 1): 371-6.
29. Mullen MJ, Clarkson P, Donald AE, et al. Effect of enalapril on endothelial function in young insulin-dependent diabetic patients: a randomized, double-blind study. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1330-5.
30. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on endothelium-dependent vasodilatation in essential hypertensive patients. *J Hypertens* 1998; 16: 447-56.
31. Mancini GBJ, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease: the TREND study. *Circulation* 1996; 94: 258-65.
32. Lyons D, Webster J, Benjamin N. Effect of enalapril and quinapril on forearm vascular ACE in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 51: 373-8.
33. Zhuo JL, Froomes P, Casley D, et al. Perindopril chronically inhibits angiotensin-converting enzyme in both the endothelium and adventitia of the internal mammary artery in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1997; 96: 174-82.
34. Mancini GBJ. Role of angiotensin-converting enzyme inhibition in reversal of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Am J Med* 1998; 105 (1A): 40S-47S.
35. Parmley WW. Evolution of angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertension, heart failure and vascular protection. *Am J Med* 1998; 105 (1A): 27S-31S.
36. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
37. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-41.
38. Dohi Y, Criscione L, Pfeiffer K, Luscher TF. Angiotensin blockade or calcium antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension: studies in perfused mesenteric resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: 372-9.
39. Habib JB, Bossaller C, Wells S, et al. Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium blocker PN 200110. *Circ Res* 1986; 58: 305-9.
40. Zhang X, Xie YW, Nasjletti A, et al. ACE inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation* 1997; 95: 176-82.
41. Tschudi MR, Criscione L, Novosel D, et al. Antihypertensive therapy augments endothelium-dependent relaxations in coronary arteries of spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 1994; 89: 2212-8.
42. Takase H, Moreau P, Kung CF, et al. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. *Hypertension* 1996; 27: 25-31.
43. Rabelink T. El endotelio. Un objetivo para la modulacion terapéutica. In: Fruhstorfer RB, Hilpert U, Berger D, Grenlich S, Hasse S, eds. *Cardiovascular insight*. Heidelberg: Springer Verlag, 1998: 1-2.
44. Perticone F, Ceravolo R, Maio R, et al. Calcium antagonist isradipine improves abnormal endothelium-dependent vasodilation in never treated hypertensive patients. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 299-306.
45. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454-6.
46. Kiowski W, Luscher TF, Linder L, Buhler FR. Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 1991; 83: 469-75.
47. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for the release of endothelium-derived relaxing factor in the human forearm circulation in vivo: blunted response in essential hypertension. *Circulation* 1990; 81: 1762-7.
48. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-7.
49. Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT₁ angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30: 75-83.
50. Rodrigo E, Maeso R, Munoz-Garcia R, et al. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J Hypertens* 1997; 15: 613-8.
51. Maeso R, Rodrigo E, Munoz-Garcia R, et al. Factors involved in the effects of losartan on endothelial dysfunction induced by aging in SHR. *Kidney Int Suppl* 1998; 68: S30-S35.
52. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-5.
53. Haynes WG, Ferro CJ, O'Kane KPJ, et al. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996; 93: 1860-70.
54. Newby DE, Webb DJ. The endothelin system in cardiovascular disease. *BMJ* 1997; 314: 531-2.
55. MacCarthy PA, Prendergast BD, Pegge NC, et al. Endogenous endothelin contributes to the maintenance of coronary vasomotor tone in humans. (abstr) *Eur Heart J* 1999; 20 (Suppl): 654.
56. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998; 16: 1081-98.
57. Webb DJ, Monge JC, Rabelink TJ, Yanagisawa M. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 5-8.
58. Webb DJ, Strachan FE. Clinical experience with endothelin antagonists. *Am J Hypertens* 1998; 11 (Part 3): 71S-79S.
59. Hand MF, Haynes WG, Webb DJ. Reduced endogenous endothelin-1-mediated vascular tone in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55: 613-20.
60. Saad D, Mukherjee R, Thomas PB, et al. The effects of endothelin-A receptor blockade during the progression of pac-

- ing-induced congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1779-86.
61. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91: 2844-50.
62. Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilation in humans, in vivo. *Circulation* 1997; 96: 3042-7.
63. Ross R. Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
64. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins. Implications for cardiovascular event reduction. *JAMA* 1998; 279: 1643-50.
65. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, et al. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 1987; 80: 1808-11.
66. Leung WH, Lau CP, Wong CK. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. *Lancet* 1993; 341: 1496-500.
67. Gould KL, Martucci JP, Goldberg DI, et al. Short-term cholesterol lowering decreases size and severity of perfusion abnormalities by positron emission tomography after dipyridamole in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1994; 89: 1530-8.
68. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 481-7.
69. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, et al. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995; 332: 488-93.
70. Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F, et al. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 1996; 93: 1647-50.
71. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, et al. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997; 95: 76-82.
72. Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 684-91.
73. Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 234-41.
74. Simons LA, Sullivan D, Simons J, Celmaj DS. Effects of atorvastatin monotherapy and simvastatin plus cholestyramine on arterial endothelial function in patients with severe primary hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1998; 137: 197-203.
75. Davignon J. Advances in drug treatment of dyslipidemia: focus on atorvastatin. *Can J Cardiol* 1998; 14 (Suppl B): 28B-38B.
76. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Thérroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (Reduction of Cholesterol in Ischemia and Function of the Endothelium) Trial. *Circulation* 1999; 99: 3227-33.
77. Simon B, Haudenschild CC, Cohen RA. Preservation of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 893-901.
78. Keaney JF, Xu A, Cunningham D, et al. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 1995; 95: 2520-9.
79. Gilligan DM, Sack MN, Guetta V, et al. Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1611-7.
80. Elliott TG, Barth JD, Mancini GBJ. Effects of vitamin E on endothelial function in men after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1995; 76: 1188-90.
81. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 304-11.
82. Davi G, Romano M, Mezzetti A, et al. Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998; 97: 953-7.
83. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, et al. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1672-9.
84. Ting HH, Timimi FK, Haley EA, et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 95: 2617-22.
85. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94: 6-9.
86. Ting HH, Timimi TF, Boles KS, et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996; 97: 22-8.
87. Levine GN, Frei B, Koulouris SN, et al. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 93: 1107-13.
88. Solzbach U, Hornig B, Jeserich M, Just H. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation* 1997; 96: 1513-9.
89. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998; 97: 2222-9.
90. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 97: 363-8.
91. The HOPE Study Investigators. The HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) study: the design of a large, simple randomized trial of an angiotensin converting enzyme inhibitor (ramipril) and vitamin E in patients at high risk of cardiovascular events. *Can J Cardiol* 1996; 12: 127-37.
92. Sleight P. Primary prevention of coronary heart disease in hypertension. *J Hypertens* 1996; 14 (Suppl 2): S35-S39.
93. Gokce N, Keaney JF Jr, Frei B, et al. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999; 99: 3234-40.
94. Williams JK, Adams MR, Herrington DM, Clarkson TB. Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 452-7.
95. Collins P, Shay J, Jang C, Moss J. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation following acute estrogen withdrawal. *Circulation* 1994; 90: 1964-8.
96. Nascimento CA, Kausar K, Rubanyi GM. Effect of 17 beta-estradiol in hypercholesterolemic rabbits with severe endothelial dysfunction. *Am J Physiol* 1999; 276 (Part 2): H1788-H1794.
97. Collins P, Rosano GMC, Sarrel PM, et al. 17 beta-estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation* 1995; 92: 24-30.
98. Roque M, Heras M, Roig E, et al. Short-term effects of transdermal estrogen replacement therapy on coronary vascular reactivity in postmenopausal women with angina pec-

- toris and normal results on coronary angiograms. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 139-43.
99. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, et al. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1994; 121: 936-41.
100. Kim-Schulze S, McGowan KA, Hubchak SC, et al. Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 1996; 94: 1402-7.
101. Yagi K, Komura S. Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. *Biochem Int* 1986; 13: 1051-5.
102. Polderman KH, Stehouwer CDA, van Kamp GJ, et al. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med* 1993; 118: 429-32.
103. Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. *Am J Physiol* 1992; 263: H271-H275.
104. Collins P, Rosano GMC, Jiang C, et al. Hypothesis - Cardiovascular protection by oestrogen: a calcium antagonist effect? *Lancet* 1993; 341: 1264-5.
105. Herman SM, Robinson JT, McCredie RJ, et al. Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilatation in adult men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2004-9.
106. Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig ME, Miller AW. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol* 1998; 275 (Part 2): R788-R792.
107. Pieper GM. Divergent actions of chronic insulin treatment in vivo versus acute treatment ex vivo on diabetic-induced endothelial dysfunction. *Life Sci* 1997; 60: PL371-PL376.
108. Pieper GM, Dembny K, Siebeneich W. Long-term treatment in vivo with NOX-101, a scavenger of nitric oxide, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *Diabetologia* 1998; 41: 1220-6.
109. Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. Effect of insulin on acetylcholine-induced vasodilation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 1995; 92: 2911-8.
110. McFarlane R, McCredie RJ, Bonney MA, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition and arterial endothelial function in adults with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 62-6.
111. Lam JYT, Chesebro JH, Fuster V. Platelets, vasoconstriction and nitroglycerin during arterial wall injury: a new antithrombotic role for an old drug. *Circulation* 1988; 78: 712-6.
112. Loscalzo J. Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. *Am J Cardiol* 1992; 70 (Suppl): 18B-22B.
113. Tang AT, Geraghty P, Dascombe MJ. Nitroglycerine reduces neutrophil activation and acute damage in latissimus dorsi muscle grafts. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 2015-21.
114. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine atherosclerotic arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-51.
115. Luscher TF. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J* 1991; 12 (Suppl E): 2-11.
116. Abrams J. Beneficial actions of nitrates in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 1996; 77: 31C-37C.
117. Quyyumi AA. Does acute improvement of endothelial dysfunction in coronary artery disease improve myocardial ischemia? *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 904-11.
118. Quyyumi AA, Dakak N, Diodati JG, et al. Effect of L-arginine on human coronary endothelium-dependent and physiologic vasodilation. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1220-7.
119. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991; 338: 1546-50.
120. Lerman A, Burnett JC, Higano ST, et al. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 1998; 97: 2123-8.
121. Thorne S, Mullen MJ, Clarkson P, et al. Early endothelial dysfunction in adults at risk from atherosclerosis: different responses to L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 110-6.
122. Szabo G, Bahrle S, Batkai S, et al. L-arginine: effect on reperfusion injury after heart transplantation. *World J Surg* 1998; 22: 791-7.
123. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
124. Doucette JW, Corl PD, Payne HM, et al. Validation of a Doppler guide wire for intravascular measurement of coronary artery flow velocity. *Circulation* 1992; 85: 1899-911.
125. Uren NG, Melin JA, de Bruyne B, et al. Relation between myocardial blood flow and the severity of coronary-artery stenosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 1782-8.
126. 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: 1111-5.
127. Zarnke KB, Feldman RD. Direct angiotensin converting enzyme inhibitor-mediated venodilation. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 59: 559-68.
128. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 631-8.