

Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika

Ana Čavka¹, Refmir Tadžić², Ivana Grizelj¹, Sanela Unfirer¹, Zrinka Mihaljević¹, Martina Mihalj¹,
Dragan Manojlović³, Ines Drenjančević^{1*}

¹Katedra za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek,
Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska

²Gesundheitszentrum Lange Reihe Dr. Tadzic und Kollegen, Hamburg, Njemačka

³Odjel za kirurgiju, Opća bolnica Vukovar, Vukovar, Hrvatska

*odgovorni autor:

prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.
Katedra za fiziologiju i imunologiju,
Medicinski fakultet Osijek
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku,
J Huttlera 4, 31 000 Osijek, Hrvatska
E-pošta: ines.drenjancevic@mefos.hr

Pregledni članak

UDK 616.12/.13-005

Prispjelo: 18. siječnja 2012.

Endotel je važan organ koji oblaže čitav krvožilni sustav, a njegove su najznačajnije funkcije: kontrola vaskularnoga tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke. Endotelna disfunkcija termin je koji opisuje stanje oštećenoga endotela i njegove poremećene funkcije koju karakterizira proupalni, protrombotski i vazokonstriktorski fenotip. Patofiziološki faktori koji dovode do nastanka endotelne disfunkcije su važni rizični čimbenici za nastanak, razvoj i progresiju kardiovaskularnih bolesti. Kako je jedna od temeljnih značajki endotelne disfunkcije reverzibilnost, procjenu endotelne funkcije treba uzeti kao univerzalnu metodu za procjenu kardiovaskularnoga rizika te primarnu i sekundarnu prevenciju kardiovaskularnih incidenata.

Ključne riječi: Endotel – vaskularni; Lasersko-doplerski mjerač protoka; Kardiovaskularne bolesti; Krvne žile - fiziologija

Endotel i endotelna funkcija

Iako je nekad smatran jednostavnom barijerom između krvi i stijenke krvne žile, danas se zna da je endotel dinamičan organ koji oblaže čitav vaskularni sustav. Endotel je svojom strukturom jednostavan, ali raspodjelom gotovo sveprisutan organ, prosječne težine otprilike jedan kilogram. Ukupan broj od 1 do 6×10^{13} endotelnih stanica, u sloju debljine 0.5 do 1 μm , prekriva unutarnje stijenke svih cirkulacijskih šupljina površine od 4000 do 7000 m^2 . Riječ je o heterogenoj epitelnj strukturi visoke biološke dinamike i raznovrsnih metaboličkih aktivnosti s posebno naglašenim sposobnostima prilagodbe (1,2). Stanice endotela imaju niz važnih funkcija koje uključuju prepoznavanje i prilagodbu na humoralne, mehaničke i hemodinamičke promjene. Najznačajnije su njegove

funkcije: kontrola vaskularnoga tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke (3,4). Endotel djeluje kao moćna enzimatska barijera, uspješno regulira tonus i proliferacijski status arterijske mišićnice, kontrolira izlučivanje citokina te stvaranje i ekspresiju adhezijskih molekula. U endotelnim se stanicama sintetiziraju čimbenici rasta i agregacijsko-koagulacijskoga puta, nastaju receptori za lipoproteine i inzulin, održavaju se aktivnosti lipoproteinske lipaze i angiotenzin-konvertaze, metaboliziraju noradrenalin i serotonin te stvaraju produkti arahidonske kiseline. Svojim autokrinim, parakrinim i endokrinim lučenjem, one djeluju na niz staničnih linija – trombocite, leukocite i glatke mišićne stanice, ali i na druga, različito udaljena tkiva (1, 5-8).

Regulacija vaskularnoga tonusa

Endotel krvnih žila ima kritičnu ulogu u održavanju vaskularnoga tonusa te su promjene vaskularnoga protoka u složenome međudjelovanju s endotelom. Sposobnost izazivanja vazodilatacije u odgovoru na naglu promjenu protoka (žilni stres) jedno je od glavnih svojstava prikladne funkcije endotela. Krv u lumenu krvne žile djeluje na stijenku dvjema ortogonalnim silama. Tangencijalno usmjerena sila na jedinicu površine stijenke, primarno povezana s protokom, frikcijska je sila poznata kao sila smicanja (eng. *shear stress*). Druga sila je izravna sila istezanja koja na stijenku djeluje okomito i izravno, te odgovara krvnome tlaku. Na tangencijalnu deformaciju pod smicajnim utjecajem, endotelne strukture reagiraju gotovo trenutačnim promjenama u staničnim membranama, reorganizacijom unutarnje strukture i programiranim usmjeravanjem niza biokemijskih procesa. Ta međusobno povezana zbivanja dio su jedinstvene i nespecifične reakcije kojom započinje niz akutnih i kroničnih adaptacijskih odgovora endotela na izravne podražaje. Endotelne stanice tako iskazuju sposobnost pretvaranja mehaničkih sila u biološke reakcije – rastezanje žilne stijenke bilježe mehanoreceptori koji onda potiču niz pojedinačnih događaja. Oni uključuju mehanizme poput dugotrajnih varijacija genske regulacije s pratećim restrukturiranjem žilne stijenke, ali i brze reakcije predstavljene naglom promjenom žilnoga tonusa (2, 9-12). Važnost te funkcije endotela vidi se u činjenici da se izraz “endotelna funkcija” koristi kako bi se opisala sposobnost endotela da otpušta vazoaktivne tvari i na taj način regulira krvni protok. U proteklih trideset godina otkriveni su brojni endotelni čimbenici relaksacije (eng. *endothelium-derived relaxing factors*, EDRF), kojih se većina otpušta u odgovoru na povećanu koncentraciju unutarstaničnoga kalcija. Najvažniji EDRF-ovi jesu dušikov oksid (NO), prostaciklin (PGI₂) i endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (eng. *endothelial-derived hyperpolarization factors*, EDHF). NO je prvi definirani EDRF za koji je dokazano da opušta vaskularni glatki mišić (13-16). Sintetizira ga endotelna NO sintetaza (eNOS) iz L-arginina. NO se stvara i otpušta iz endotelnih stanica u odgovoru na žilni stres (eng. *shear stress*) i djelovanje različitih spojeva kao što su ovi: acetilkolin, bradikinin, trombin, ADP itd. Otpuštanje NO-a vodi do relaksacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica (13, 17-24). Osim vazodilatatornih svojstava, NO sprječava adheziju i agregaciju trombocita, kao i adheziju i migraciju leukocita u arterijsku stijenku te inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica – svih ključnih događaja u razvoju ateroskleroze (25-28). Prostaciklin je drugi bitan EDRF koji se djelomično otpušta u odgovoru na žilni stres (17, 29). Sintetizira ga enzim ciklooksigenaza-1 (COX-1) iz arahidonske kiseline, a djeluje tako da po-

visuje koncentraciju cAMP-a u glatkim mišićnim stanicama i u trombocitima (30). Za razliku od NO-a, PGI₂ ne pridonosi održavanju bazalnoga vaskularnoga tonusa velikih provodnih krvnih žila, nego se otpušta na poticaj različitih agonista (23, 31). Također, ima važnu ulogu kao inhibitor djelovanja trombocita. Endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF) jesu molekule koje dovode do hiperpolarizacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila. Njihova je uloga regulacija vaskularne reaktivnosti, koju definiramo kao endotel-ovisan odgovor, u stanjima kada postoji kombinirana inhibicija djelovanja NO-a i PGI₂. EDHF predstavljaju kompenzatorni mehanizam endotel-ovisne vazodilatacije u stanjima kad je smanjena biodostupnost NO-a. Brojne studije definirale su nekoliko molekula ili posrednika koji djeluju kao EDHF u različitim vrstama i tkivima (32): K⁺ (33), metaboliti citokroma P450 (kao što je EETs, eng. *epoxyeicosatertranoic acids*) (34-36), produkti lipooksigenaze (37), sam NO (38), slobodni radikali kisika (H₂O₂) (39), ciklični adenzin monofosfat (cAMP) (40), natriuretski peptid tip C (41) itd. Nadalje, endotelne stanice jesu mjesto proizvodnje i važnih endotelnih čimbenika kontrakcije (eng. *endothelial-derived constricting factors*, EDCF), od kojih su najmoćniji endotelin-1 (ET-1) i tromboksan (TXA₂). Nekoliko godina nakon otkrića NO-a, otkriven je vazokonstriktorni peptid kojega proizvodi vaskularni endotel i koji djeluje kao fiziološka protuteža djelovanju NO-a, endotelin-1 (ET-1) (42-44). Nekoliko čimbenika utječe na proizvodnju i otpuštanje ET-1, među kojima su ovi: žilni stres, angiotenzin II, trombin, adrenalin, oksidirani lipoproteini male gustoće i upalni citokini (45-51). U ljudi, ET-1 povisuje krvni tlak i dovodi do vaskularne i miokardijalne hipertrofije, što su važni rizični čimbenici kardiovaskularnoga morbiditeta i mortaliteta (52,53). Drugi je važan EDCF tromboksan (TXA₂) kojega sintetiziraju COX-1 i tromboksan sintetaza u metabolizmu arahidonske kiseline. Ravnoteža između proizvodnje PGI₂ i TXA₂ sudjeluje u održavanju homeostaze u zdravim krvnim žilama. Povećana proizvodnja TXA₂ dovodi do vazokonstrukcije i agregacije trombocita povećavajući rizik od kardiovaskularnih incidenata (54,55). Prikazana složenost sustava vazoaktivnih tvari žilne stijenke, usprkos mnogobrojnim otvorenim pitanjima, ističe njihovu neupitnu ulogu u održavanju fiziološke ravnoteže i funkcije krvnih žila.

Endotelna disfunkcija

Endotelna disfunkcija (ED) danas je općeprihvaćeni termin koji opisuje stanje oštećenoga endotela, odnosno njegove poremećene funkcije. Takav poremećaj endotela obuhvaća niz patofizioloških stanja, u rasponu od početne lokalizirane mehaničke ozljede žilne intime (ED u užem smislu) do neprimjerene, perzistentne, globalne

endotelne aktivacije važne za razvoj brojnih klinički manifestnih patoloških stanja (2). Osnovu nastanka endotelne disfunkcije čini neprimjerena aktivacija endotela – nespecifična ekspresija endotelne aktivacijskih antigena koja nastaje pod utjecajem različitih štetnih podražaja, te razvoj i koordinirana regresija svih pojedinačnih svojstava i sastavnica disfunkcionalnoga endotela (56). Dok je fenotip neaktivirane, “mirne” endotelne stanice antikoagulantni, protuupalni i vazodilatacijski, ED je promjena koju karakterizira proupalni, protrombotski i vazokonstriktorski fenotip (57-59). Kako je sposobnost otpuštanja vazoaktivnih tvari i reguliranje krvnoga protoka ključna osobina zdravoga endotela, tako je neadekvatna raspoloživost NO-a jedno od glavnih obilježja ED-a koja ujedno predstavlja vodeći mehanizam pojedinačnih endotelne svojstava što ih objedinjuje sindrom ED. Nerasporedjenost raspoloživosti NO-a i aktivnosti vazokonstriktorskih čimbenika, temelj je sklonosti vazokonstrikciji u ED-u, a može biti uzrokovan nedostatkom NO-supstrata, L-arginina i/ili manjkom enzimskoga kofaktora tetrahidrobiopterina s pratećom nekompetentnošću endotelne sintaze dušikovoga oksida (eNOS). U posljednje vrijeme postaje jasno da su promjene u NO-posredovanim procesima dijelom ovisne i o genetskim razlikama u ekspresiji aktivnosti eNOS-a (60), posttranslacijskim modifikacijama enzima, a posebno se važnom čini uloga blokiranja NO-a kemijskim reakcijama s endogenim inhibitorima prije njegovoga učinka na ciljne molekule, u čemu vodeću ulogu vjerojatno imaju slobodni radikali kisika (61). Osim oštećenja endotel-ovisne vazodilatacije krvnih žila, patofiziološke posljedice razvoja ED-a su ove: 1) abnormalna vaskularna reaktivnost i spazam krvnih žila, koja je u razvijenom ED-u izražena kao paradoksalna vazokonstrikcija na acetilkolin, a navodi se i argininski paradoks koji izostankom očekivane vazodilatacije i hipotenzije, nakon infuzije L-arginina, izravno upućuje na endotelnu nesposobnost produkcije NO-a, 2) povećana propusnost endotela za makromolekule, kao npr. lipoproteine, koja nastaje zbog redistribucije proteinskih molekula u mikrofilamentima s posljedičnom kontrakcijom i deformiranjem endotelne stanice, prekidom bliskih staničnih kontakata i nastankom patoloških pukotina, 3) povećana ekspresija kemotaktičkih i adhezijskih molekula (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin), 4) novačenje i akumulacija monocita/makrofaga u intimi krvnih žila, 5) poremećaj u regulaciji rasta i preživljavanja vaskularne stanice – smanjena regeneracija endotelne stanice i povećana proliferacija i migracija glatkih mišićnih stanica, 6) poremećaj hemostatske ravnoteže obilježene ekspresijom prokoagulacijskih molekula, stvaranjem trombina, agregacijom i adhezijom trombocita i odlaganja fibrina (62-64).

Patofiziološki faktori koji dovode do nastanka ED-a i koji su posebno važni rizični čimbenici za nastanak, razvoj i progresiju kardiovaskularnih bolesti su ovi: 1) aktivacija citokina u upalnim procesima, 2) slobodni radikali kisika (ROS) i/ili oksidativni stres te glikozilacija metabolita koji su prisutni u dijabetesu i procesu starenja, 3) pušenje i hipertenzija, 4) kronična hiperhomocisteinemija i/ili hiperkolesterolemija i 5) povišena koncentracija plazmatskih oksidiranih lipoproteina male gustoće i njihova akumulacija u stijenku krvne žile, kao i infekcije bakterijama, virusima ili drugim patogenima (62-64, 65-69).

Endotelna disfunkcija i kardiovaskularne bolesti

ED je prisutan znatno prije pojave opstruktivnih aterosklerotskih lezija i u provodnim i u otporničkim krvnim žilama (70), a može biti prisutan čak i u djece s obiteljskom povijesti kardiovaskularnih bolesti (68). ED će biti izraženiji što je veća izloženost različitim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima (71). Također, ED je bitan prognostički pokazatelj budućih kardiovaskularnih incidenata u pacijenata oboljelih od kardiovaskularnih bolesti (72). Pokazano je da administracija L-arginina i povećanje biološke dostupnosti NO-a poboljšava endotelnu funkciju u pacijenata s povećanim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti (73). Antihipertenzivi ili statini koji se koriste u terapiji kardiovaskularnih bolesti imaju povoljan učinak na endotelnu funkciju upravo kroz smanjenje razine oksidativnoga stresa i akumulacije lipida (74).

Endotelna disfunkcija i hipertenzija

Jedna je od glavnih značajki ED-a, prisutna u razvoju i progresiji hipertenzije, poremećaj u proizvodnji ili djelovanju glavnoga endotelne vazodilatatora NO-a praćenoga dominacijom vazokonstriktora kao što je ET-1 (75). Takva narušena ravnoteža između vazodilatatora i vazokonstriktora u endotelnim stanicama dovodi do povišenja krvnoga tlaka. Iako se još sa sigurnošću ne zna je li ED uzrok ili posljedica povišenoga krvnoga tlaka, dokazano je da je ED jedan od esencijalnih čimbenika u hipertenziji (76). Kao potvrda tome, humane studije su pokazale da je u hipertenzivnih pacijenata znatno pogoršan vazodilatatorni odgovor otporničkih krvnih žila na acetilkolin, ali ne i na natrijev nitroprusid – dokazujući oštećenje funkcije endotela (77). Također, u pacijenata s povišenim krvnim tlakom i rizikom od razvoja kardiovaskularnih incidenata, oštećena je protokom uzrokovana dilatacija provodnih krvnih žila (78). Terapija ACE inhibitorima dovodi do poboljšanja endotelne funkcije smanjenjem oksidativnoga stresa i povećanjem biodostupnosti NO-a (79,80).

Endotelna disfunkcija i dijabetes

Jedna od glavnih komplikacija koja se javlja u oboljelih od dijabetesa tipa I i tipa II jest mikrovaskularni i makrovaskularni ED (81). Štoviše, ED može postojati i u zdravih pojedinaca koji u obiteljskoj povijesti bolesti imaju dijabetes (82). U pacijenata koji boluju od dijabetesa povećan je oksidativni stres i oksidacija LDL-a uslijed hiperglikemije što rezultira smanjenom biodostupnosti NO-a (83,84). Smanjenje oksidativnoga stresa i povećanje biodostupnosti NO-a prisutno je u pacijenata koji u svojoj terapiji koriste ACE inhibitore (85).

Endotelna disfunkcija i upalne bolesti

Pacijenti oboljeli od upalnih bolesti kao što su reumatoidni artritis, Bechetova bolest i upalne bolesti crijeva imaju povećan rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (86-89). U reumatoidnome artritisu, ozbiljnost i jačina upale utječu na pojavu ED-a (90). Procjena aterosklerotskih promjena u karotidnoj arteriji prihvaćena je kao dobar prognostički čimbenik u pacijenata oboljelih od upalnih bolesti i kao takav se koristi za procjenu kardiovaskularnoga rizika u oboljelih (91-93). Studije su pokazale kako korištenje antiupalnih lijekova može poboljšati endotelnu funkciju u otporničkim i provodnim krvnim žilama i na taj su način potvrdile ulogu upalnoga procesa u razvoju kardiovaskularnih bolesti u pacijenata primarno oboljelih od sistemskih upalnih bolesti (94-96).

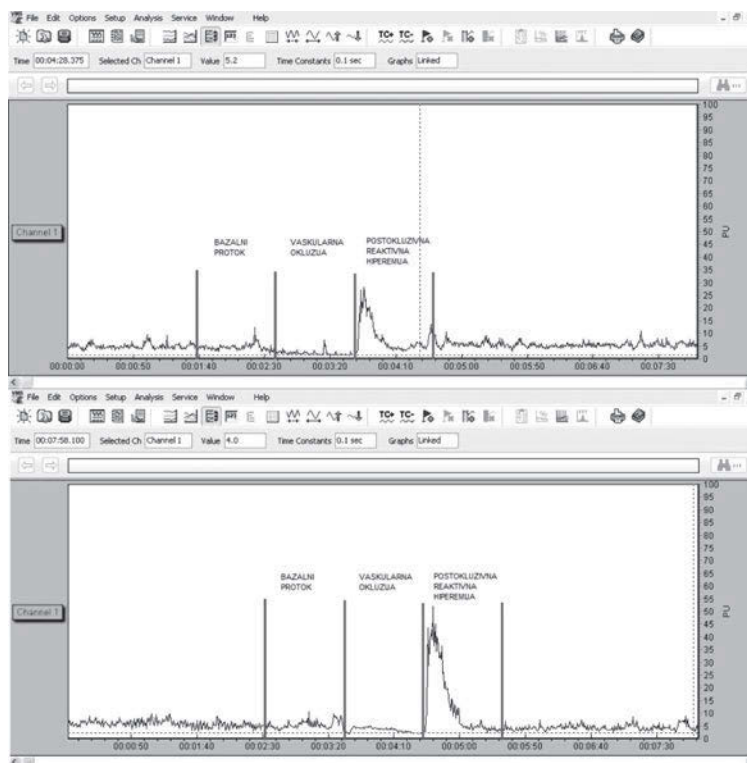
Dakle, endotelna disfunkcija razvija se djelovanjem različitih kardiovaskularnih rizičnih čimbenika, a njena temeljna odrednica jest reverzibilnost. Uklanjanje rizičnih čimbenika, uzimanje odgovarajuće terapije i promjena stila življenja može dovesti do značajnoga poboljšanja endotelne funkcije i time smanjenja rizika pojave kardiovaskularnih incidenata. Ovisno o vrsti, dužini trajanja i intenzitetu nokse, endotelni poremećaji mogu biti ishodišni, podržavajući ili progresijski činitelji u većemu broju metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti. Kako je nedvojbeno dokazano da se radi o generaliziranoj vaskulopatiji, pojedini testovi endotelne funkcije iskazuju jednak značaj, bez obzira na to jesu li izvedeni na razini koronarnih ili perifernih arterija (56). Procjena endotelne funkcije važan je predskazivač budućih kardiovaskularnih incidenata u pacijenata oboljelih od kardiovaskularnih bolesti, kao i izvrstan pokazatelj uspješnosti provođenja određene terapije u postupku liječenja istih bolesti. Procjena endotelne funkcije najčešće podrazumijeva mjerenje dilatacije krvnih žila u odgovoru na zadani stimulus sa smanjenom vazodilatacijom kao pokazateljem poremećene funkcije endotela. Ipak, smanjena vazodilatacija krvne žile u odgovoru na zadani stimulus može biti rezultat oštećenoga signalnog puta između en-

dotelnih stanica i vaskularnih glatkih mišićnih stanica ili nemogućnosti primjerenoga odgovora glatkoga mišićja krvne žile i nastanka vazodilatacije. Kako bi se razlikovala disfunkcija endotela od disfunkcije vaskularnoga glatkog mišićja, uobičajeno je odrediti endotel-ovisnu i endotel-neovisnu dilataciju krvne žile. Različite se tehnike koriste za procjenu endotelne funkcije u različitim vrstama krvnih žila. U ovom pregledu spomenut ćemo najvažnije i najčešće korištene metode.

Metode za procjenu mikrovaskularne endotelne funkcije

Mjerenje protoka metodom laser Dopplera

Najčešće korištena metoda za procjenu endotelne funkcije u mikrocirkulaciji jest mjerenje protoka laser Dopplerom (eng. *Laser Doppler Flowmetry*, LDF). Metoda radi na principu procjene protoka u mikrocirkulacijskoj vaskulaturi kože putem laserske zrake koja se reflektira od eritrocita u mikrocirkulaciji te se na temelju promjene valne duljine nakon odbijanja (Dopplerov efekt) računalnim programima određuje veličina protoka, a iskazuje se u arbitrarnim jedinicama (eng. *perfusion units*, PU) i prikazuje u obliku krivulje. Ta je metoda posljednjih godina dobila svoje nove i različite aplikacije, od mjerenja protoka jednom laserskom sondom, primjenom ili bez primjene iontoforeze ili mikrodijalize, do mogućnosti prikaza mikrocirkulacijskoga protoka čitave podlaktice. Kako bi se odredila funkcija endotela, LDF-om se mjeri protok u odgovoru na različite stimuluse. Postokluzivna reaktivna hiperemija u mikrocirkulaciji kože, iznad bazalnih vrijednosti, odnosi se na povećan protok koji se javlja kao odgovor na otpuštanje kratkotrajne okluzije arterijskog protoka. Četiri su važna čimbenika uključena u mehanizam nastanka postokluzivne hiperemije: vazodilatatorni metaboliti ishemije, endotelni vazodilatatori, odgovor glatkoga mišićja krvne žile i senzorički živci. Biodostupnost NO-a u mikrocirkulaciji može se mjeriti putem iontoforeze. Iontoforeza koristi električnu struju male jačine za unos pozitivno i negativno nabijenih vazoaktivnih agenata u otporničke žile mikrocirkulacije kože. Dva najčešće korištena agenta koji se iontoforezom unose u kožu jesu acetilkolin i natrijev nitroprusid. Za vrijeme unošenje agenata u kožu, pomoću kojih se mjeri endotel-ovisna ili endotel-neovisna vazodilatacija, LDF-om se mjeri protok u koži podlaktice. Najvažnije su prednosti metode LDF-a: 1) neinvazivna je i ne izaziva neugodu u ispitanika i 2) osjetljiva je za detekciju i kvantifikaciju relativnih promjena protoka u mikrocirkulaciji kože na zadani stimulus (vaskularna okluzija, promjene temperature, farmakološki agenti itd.) (97). Slika 1. prikazuje primjer mjerenja protoka metodom



SLIKA 1.
Mjerenje protoka metodom laser Dopplera.

Promjene mikrocirkulacijskoga protoka krvi u koži podlaktice bilježe se u obliku krivulje i izražavaju se u arbitrarnim jedinicama protoka (eng. *perfusion units*, PU). Kako bi se odredila relativna promjena protoka tijekom postokluzivne reaktivne hiperemije, mjeri se površina ispod krivulje (eng. *area under the curve*, AUC), koja predstavlja vrijednost protoka za vrijeme bazalnoga mjerenja, vaskularne okluzije i postokluzivne reaktivne hiperemije. Rezultati mjerenja prikazuju se kao razlika postotka promjene protoka za vrijeme reperfuzije i okluzije (delta R-O) u odnosu na bazalne vrijednosti (izvor slike: vlastita mjerenja)

FIGURE 1
Measurement of perfusion by Laser Doppler method.

laser Dopplera gdje se kao stimulus koristi okluzija protoka praćena postokluzivnom reaktivnom hiperemijom.

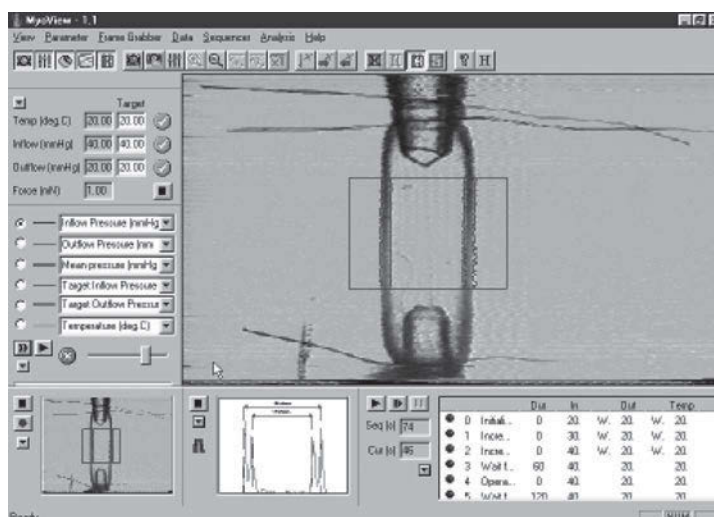
tice tijekom infuzije različitih vazoaktivnih agenata kao što su acetilkolin, bradikinin, indometacin itd (98).

Venska okluzivna pletizmografija

Određivanje vaskularne reaktivnosti u izoliranim krvnim žilama

Metoda mjerenja protoka i procjene endotelne funkcije mikrocirkulacije koja se temelji na zaustavljanju povratka venske krvi iz podlaktice uz održan arterijski priljev krvi u podlakticu, što dovodi do linearnoga povećanja krvnoga protoka u određenom vremenu, koji je proporcionalan arterijskome pritoku krvi. Okluzija venske cirkulacije podlaktice postiže se napuhivanjem manžete iznad vrijednosti dijastoličkoga tlaka, dok se drugom manžetom isključuje protok krvi kroz šaku kako bi se smanjile promjene protoka krvi ovisne o temperaturi. Promjene protoka bilježe se promjenom električnoga otpora u pletizmografu postavljenom oko najširega dijela podlaktice. Tom se metodom mogu mjeriti promjene protoka i endotelne funkcije u mikrocirkulaciji podlak-

Invazivna metoda koja se temelji na uzimanju biopsije određene vrste humanoga (npr. subkutano ili visceralno masno tkivo) ili tkiva eksperimentalne životinje (npr. mozak ili mišić) iz kojeg se izoliraju otporničke krvne žile i u laboratoriju postavljaju na posebne elektrode uređaja koji u *in vitro* uvjetima oponaša uvjete u intaktnome organizmu i simulira protok kroz izoliranu krvnu žilu. Endotel-ovisna ili endotel-neovisna dilatacija izolirane krvne žile, izazvana promjenom protoka ili dodavanja različitih vazoaktivnih agenata, može se bilježiti uz pomoć mikroskopa, kamere i monitora (Slika 2.) (99).



SLIKA 2.

Određivanje vaskularne reaktivnosti u izoliranim krvnim žilama.

Izolirana krvna žila kanulira se na posebne mikroelektrode u tkivnoj komori ispunjenoj otopinom čiji sastav (elektroliti i kisik), temperatura (37°C) i tok imitiraju protok kroz krvnu žilu intaktnoga organizma te time omogućuju opstanak ciljanoga organa za vrijeme trajanja pokusa (i više sati). Putem mikroskopa i kamere žila se vizualizira na zaslonu računala te je posebnim programom s videomikrometrijskim mjerenjem moguće u svakom trenutku odrediti unutrašnji i vanjski promjer krvne žile. Reaktivnost krvne žile ispituje se u odgovoru na različite zadane stimuluse (hipoksija, acetilkolin, itd.) (izvor slike: vlastita mjerenja).

FIGURE 2

Determination of vascular reactivity in isolated blood vessels

Metode procjene makrovaskularne endotelne funkcije

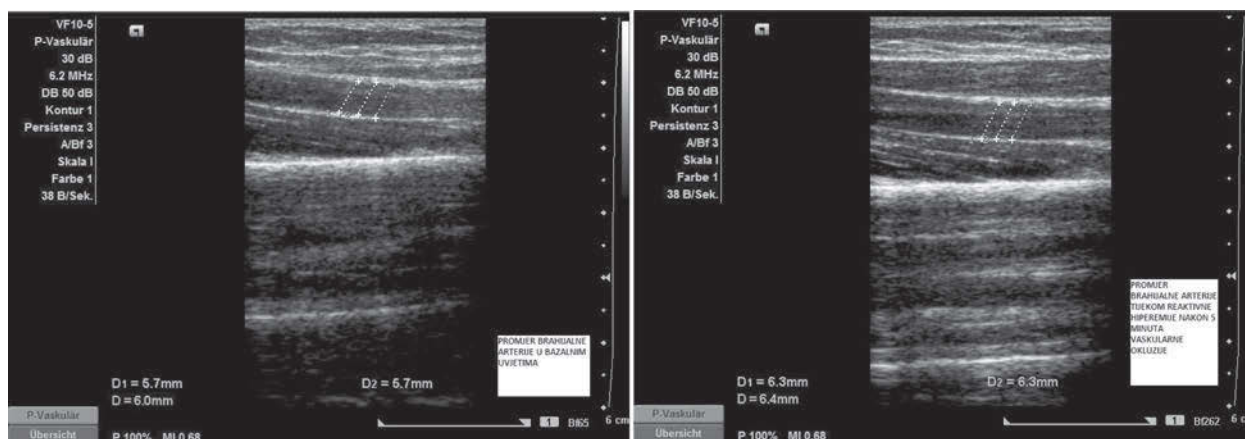
Ultrazvučni test protokom posredovane dilatacije perifernih arterija (eng. Flow Mediated Dilation, FMD)

FMD je tehnika koja se temelji na izazivanju vazodilatacije uslijed povećanja protoka krvi kroz arteriju – povećan protok izaziva žilni stres endotela s posljedičnom stimulacijom endotelnih stanica na povećano otpuštanje NO-a (100). Kao što je već bilo naglašeno, smanjena vazodilatacija koja se javlja zbog povećanoga žilnog stresa predstavlja poremećaj biodostupnosti NO-a i prisutnost endotelne disfunkcije (101). Žilni stres se izaziva okluzijom protoka manžetom postavljenom na podlakticu, a promjer brahijalne arterije se mjeri visokorezolucijskim ultrazvučnim aparatom. Promjer krvne žile se mjeri tijekom bazalnih uvjeta, tijekom pet minuta žilne okluzije i tri minute reaktivne hiperemije (Slika 3.). FMD se izražava kao maksimalni postotak dilatacije tijekom reaktivne hiperemije u odnosu na bazični promjer krvne žile. Za određivanje endotel-neovisne dilatacije krvne žile, ispitanicima se sublingvalno aplicira natrijev nitroprusid te se bilježi najveća promjena promjera krvne žile tijekom pet minuta od aplikacije lijeka. FMD se obično

mjeri na brahijalnoj arteriji, iako se može određivati i na radijalnoj ili femoralnoj arteriji (70,98,102-105).

Određivanje elastičnosti krvnih žila (eng. arterial stiffness)

Prilikom svakoga otkucaja srca šalje se tlačni val kroz vaskulaturu, a popustljiva arterijska stijenka služi kako bi se ublažile oscilacije tlaka i na taj se način omogućio miran protok krvi do svih tkiva. Tlačni val reflektira se natrag k srcu kada dosegne grananje krvnih žila u vaskulaturi. U zdravih pojedinaca taj reflektirani tlačni val stiže do srca za vrijeme dijastole kako bi pomogao punjenje koronarnih krvnih žila. Ipak, u pojedinaca sa smanjenom elastičnosti arterija tlačni val se vraća k srcu znatno brže i stiže do srca za vrijeme sistole. Time se povećava *afterload* kojega srce mora svladati kako bi se otvorili aortalni polumjesečasti zalisci. Kao posljedica takvih promjena dolazi do nastanka komplikacija smanjene elastičnosti krvnih žila kao što su ove: angina i/ili infarkt miokarda ili hipertrofija lijevoga ventrikula koja može rezultirati zatajenjem srca (105). Smanjenje elastičnosti stijenke krvne žile može se dogoditi uslijed smanjene proizvodnje NO-a u endotelnim stanicama, gubitka tonusa glatkoga mišićja krvne žile, degeneracije vlakana elastina i povećanoga odlaganja kolagena



SLIKA 3.

Ultrazvučni test protokom posredovane dilatacije perifernih arterija (eng. Flow Mediated Dilatation, FMD).

Brahijalna arterija se vizualizira i snima ultrazvučnim aparatom u longitudinalnoj ravnini sa sondom postavljenom 1-3 cm od kubitalne jame. Nakon mjerenja promjera brahijalne arterije u bazalnim uvjetima, izaziva se vaskularna okluzija u trajanju od pet minuta (napuhivanjem manžete 50 mmHg iznad vrijednosti sistoličkoga tlaka ispitanika) i zatim se snima promjer arterije tijekom reaktivne hiperemije. Taj je test danas prihvaćen kao jedna od najboljih metoda za ispitivanje i ocjenu endotelne funkcije (izvor slike: vlastita mjerenja).

FIGURE 3

Ultrasound testing of Flow Mediated Dilatation (FMD)

u stijenku krvne žile (107). Kao posljedica, elastičnost krvnih žila ovisna je o funkcionalnim i strukturalnim promjenama u vaskulaturi. Za procjenu elastičnosti perifernih krvnih žila koriste se brojne neinvazivne metode. Najčešće su korištene analiza pulsnoaga vala (eng. *pulse wave analysis*, PWA) i određivanje brzine pulsnoaga vala (eng. *pulse wave velocity*, PWV) zbog njihove reproducibilnosti i lakoće izvođenja (108). Pokazano je kako su ti testovi povezani s koronarnom mikrovaskularnom endotelnom funkcijom (109). PWA se temelji na bilježenju valova krvnoga tlaka radijalne arterije pomoću odgovarajućega pretvarača stavljenoga na mjesto gdje su pulsni valovi najjači. Kako bi se izmjerila PWV, arterijski pulsni valovi simultano se bilježe na dvije arterije, najčešće karotidnoj i radijalnoj. Određuje se udaljenost između dva mjesta na kojima se bilježe pulsni valovi te se izračunava vrijeme potrebno da pulsni val dođe od jedne do druge točke mjerenja. Što je PWV veća, veća je refleksija pulsnoaga vala natrag k srcu što ukazuje na smanjenu elastičnost krvnih žila (110).

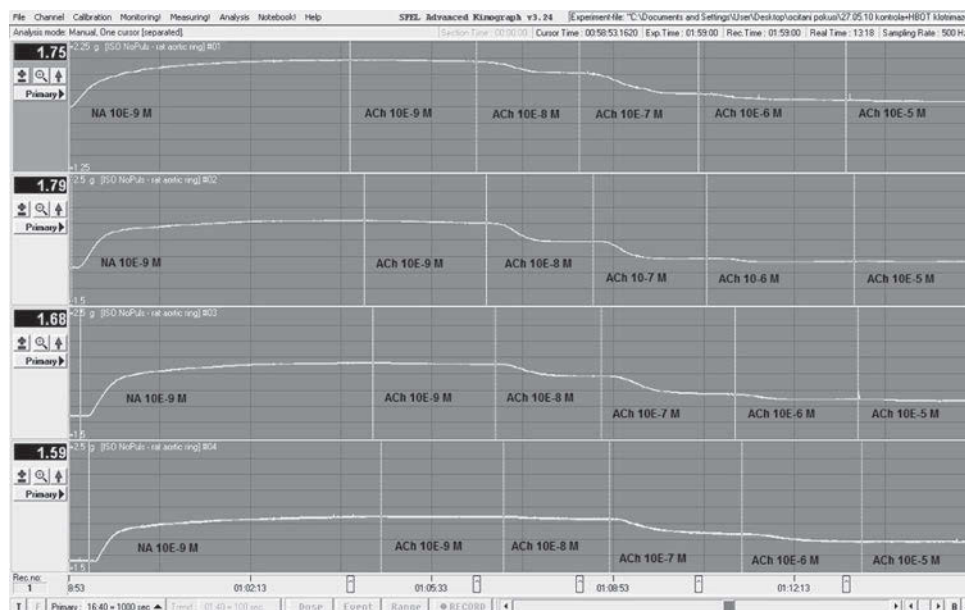
Određivanje debljine intima-medie karotidne arterije (eng. *carotid intima-media thickness*, cIMT)

Ovom metodom procjenjuje se debljina medije vaskularne stijenke karotidne arterije koja je prihvaćeni predskazivač kardijalnih incidenata u pacijenata koji imaju rani stadij ateroskleroze, kao i dobar prognostički čim-

benik za razvoj restenoze u pacijenata koji su bili na perkutanoj koronarnoj intervenciji (111, 112). Studije su pokazale da su promjene cIMT-a posljedica smanjenja biodostupnosti NO-a kao i povišenja razine ET-1, koji s vremenom rezultiraju povećanom proizvodnjom upalnih citokina, slobodnih radikala, adhezijskih molekula i faktora zgrušavanja koji vode do proliferacije glatkoga mišićja stijenke krvne žile (113,114). cIMT se uobičajeno određuje na zajedničkoj karotidnoj arteriji, unutarnjoj karotidnoj arteriji i točkama bifurkacije (115), a svaka točka mjerenja ima slična svojstva za procjenu budućih kardiovaskularnih incidenata (116).

Određivanje vaskularne reaktivnosti u izoliranim aortalnim prstenovima

Ova se metoda provodi u sustavu tkivnih kupelji za izolirane organe (eng. *Tissue Organ Bath System*) omogućujući proučavanje (pat) fizioloških odgovora izoliranih organa (krvne žile, mišić, segmenti crijeva, maternica itd.) na razne podražaje (aktivne tvari, lijekovi, električni podražaji). Tkivo koje se promatra razapeto je između dna tkivne kupelji i pretvarača sile, koji odgovor organa (kontrakcija ili dilatacija) na podražaj prepoznaje i mjeri kao silu. Signal koji stvara pretvarač sile (eng. *transducer*) dalje se pojačava pojačivačem sile (eng. *amplifier*) te preko prijemnika pretvara iz analognoga u digitalni signal koji se očitava na zaslonu računala. Tkivne kupelji oponašaju sastav (elektroliti, kisik) i temperaturu (37 °C)



SLIKA 4.
Određivanje vaskularne reaktivnosti u izoliranim aortalnim prstenovima štakora.

Prstenovi aorte štakora razapeti su između dna tkivne kupelji i pretvarača sile, koji odgovor krvne žile na podražaj (kontrakcija ili dilatacija) prepoznaje i mjeri kao silu. Signal koji stvara pretvarač dalje se pojačava te preko prijemnika pretvara iz analognoga u digitalni signal koji se očitava na monitoru računala. Prekontrakcija krvne žile izaziva se noradrenalinom, a vazodilatacijski odgovor krvne žile ovisan je o endotelu primjenom različitih doza acetilkolina (ACh 10^{-9} - 10^{-5} M) (izvor slike: vlastita mjerenja).

FIGURE 4
Determination of vascular activity in isolated aortic rings of rats

intaktnoga organizma te time omogućuju opstanak ciljane organa za vrijeme trajanja pokusa (i do više sati). Metoda je našla svoju primjenu u znanstveno-istraživačkom radu, posebice u proučavanju funkcije krvožilnoga sustava, a vrlo često se kao modeli koriste eksperimentalne životinje. Primjenjuje se u proučavanju većih krvnih žila, primjerice aorte štakora (Slika 4.). Kombiniranjem različitih vazoaktivnih tvari (KCl, noradrenalin i acetilkolin) i blokatora specifičnih enzima, moguće je proučavati funkciju endotela i glatkih mišićnih stanica te razne vazodilatacijske i vazokonstriktorske mehanizme. Taj sustav karakterizira jednostavna i brza primjena, a osim primjene u znanstveno-istraživačkom radu, danas ima bitnu ulogu i u završnim fazama pretkliničkih ispitivanja novih farmakoloških pripravaka (117).

Procjena endotelne funkcije u pacijenata s rizikom od kardiovaskularnih bolesti važna je kako bi se otkrile vaskularne abnormalnosti te kako bi se pratio tijek intervencija i postupaka liječenja koji bi mogli poboljšati endotelnu funkciju i na taj način smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti i incidenata. Endotel ima ključnu ulogu u vaskularnoj biologiji i zbog toga u budućnosti treba uzeti u obzir procjenu endotelne funkcije kao uni-

verzalnu metodu za procjenu kardiovaskularnoga rizika te primarnu i sekundarnu prevenciju kardiovaskularnih incidenata.

LITERATURA

1. Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer; 1997. str. 1-26.
2. Ruzic A, Miletic B, Nola AI, Persic V, Razov Radas M, Vcev A. Endotelna disfunkcija u "enigmatskoj slagalici" kardiovaskularnih bolesti. Med Glas. 2009;6(1):2-15.
3. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. Prog Cardiovasc Dis. 1997;39:287-324.
4. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. N Engl J Med. 1990;323:27-36.
5. Iruela-Arispe ML, Dvorak, HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. Thromb Haemost. 1997;78:672-7.
6. Chappey O, Wautier MP, Wautier JL. Structures and functions of the endothelium. Rev Prat. 1997;47:2223-6.
7. Thurston G, Baluk P, McDonald DM. Determinants of endothelial cell phenotype in venules. Microcirculation. 2000;7:67-80.
8. Dzau VJ, Braun Dullaes RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. Nat Med. 2002;8:1249-56.

9. Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear stress biology of the endothelium. *Ann Biomed Eng.* 2005;33:1714-8.
10. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:237-52.
11. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2005;118:4103-11.
12. Belohlavkova S, Simak J. Adhesion receptors of the vascular endothelium and their role in acute inflammation. *Cesk Pysiol.* 1999;48:51-61.
13. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
14. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:9265-9.
15. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition of endothelium-derived nitric-oxide. *J Clin Invest.* 1990;85:587-90.
16. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
17. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986;250:H1145-9.
18. Anderson EA, Mark AL. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. *Circulation.* 1989;79:93-100.
19. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
20. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:1251-6.
21. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989;2:997-1000.
22. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation.* 1994;89:2035-40.
23. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, i sur. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91:1314-9.
24. Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Linder L, Luscher TF, Thuillez C. Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. *Hypertension.* 1995;26:327-31.
25. Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial “stunning” following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction?. *Cardiovasc Res.* 1996;32:822-9.
26. Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation.* 1997;96:3042-7.
27. Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, i sur. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation.* 2000;102:994-9.
28. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2000;102:1000-6.
29. Koller A, Kaley G. Prostaglandins mediate arteriolar dilation to increased blood flow velocity in skeletal muscle microcirculation. *Circ Res.* 1990;67:529-34.
30. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976;263:663-5.
31. Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 1992;105:485-9.
32. Duvall WL. Endothelial dysfunction and antioxidants. *Mt Sinai J Med.* 2005;72:71-80.
33. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998;396:269-72.
34. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* 2007;49:590-6.
35. Larsen BT, Gutterman DD, Sato A, Toyama K, Campbell WB, Zeldin DC, i sur. Hydrogen peroxide inhibits cytochrome p450 epoxygenases: interaction between two endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 2008;102:59-67.
36. Taddei S, Versari D, Cipriano A, Ghiadoni L, Galetta F, Franzoni F, i sur. Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:508-15.
37. Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD, Weintraub NL. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281:R246-53.
38. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368:850-3.
39. Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:1013-28.
40. Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res.* 2002;90:800-6.
41. Wei CM, Hu S, Miller VM, Burnett JC Jr. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:765-71.
42. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol.* 1985;248:C550-6.
43. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, i sur. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-5.
44. Lüscher TF, Yang Z, Tschudi M, von Segesser L, Stulz P, Boulanger C, i sur. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res.* 1990;66:1088-94.
45. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, i sur. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161:859-64.
46. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest.* 1991;88:1054-7.
47. Kohno M, Murakawa K, Yokokawa K, Yasunari K, Horio T, Kurihara N, i sur. Production of endothelin by cultured porcine

- endothelial cells: modulation by adrenaline. *J Hypertens Suppl.* 1989;7:S130-1.
48. Ohta K, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Emori T, Shichiri M, i sur. Cytokine-induced release of endothelin-1 from porcine renal epithelial cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;169:578-84.
49. Miyamori I, Takeda Y, Yoneda T, Iki K, Takeda R. Interleukin-2 enhances the release of endothelin-1 from the rat mesenteric artery. *Life Sci.* 1991;49:1295-300.
50. Woods M, Bishop-Bailey D, Pepper JR, Evans TW, Mitchell JA, Warner TD. Cytokine and lipopolysaccharide stimulation of endothelin-1 release from human internal mammary artery and saphenous vein smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31(Suppl1):S348-50.
51. Dohi Y, Hahn AW, Boulanger CM, Bühler FR, Lüscher TF. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension.* 1992;19:131-7.
52. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhäusl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation.* 1990;81:1415-8.
53. Kiely DG, Cargill RI, Struthers AD, Lipworth BJ. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man. *Cardiovasc Res.* 1997;33:378-86.
54. Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin-thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull.* 1983;39:271-6.
55. Marwali MR, Mehta JL. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thromb Haemost.* 2006;96:401-6.
56. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2000;32:293-304.
57. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251:788-91.
58. Ewenstein MG. Vascular biology of von Willebrand factor. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities.* Stuttgart: Schattauer; 1997. str. 107-22.
59. Haller H. Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities.* Stuttgart: Schattauer; 1997. str. 273-98.
60. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2005;118:4103-11.
61. Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction?. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H2484-8.
62. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:168-75.
63. Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:230-40.
64. Lerman A, Burnett JC Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation.* 1992;86 (6 Suppl):III12-9.
65. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev.* 2011;91:327-87.
66. Aboyans V, Criqui MH, Denenberg JO, Knoke JD, Ridker PM, Fronck A. Risk factors for progression of peripheral arterial disease in large and small vessels. *Circulation.* 2006;113:2623-9.
67. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-74.
68. Ross R. Atherosclerosis -- an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
69. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295:369-77.
70. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, i sur. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340:1111-5.
71. Hashimoto M, Kozaki K, Eto M, Akishita M, Ako J, Iijima K, i sur. Association of coronary risk factors and endothelium dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. *Hypertens Res.* 2000;23:233-8.
72. Gokce N, Kearney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, i sur. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1769-75.
73. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1992;90:1248-53.
74. Widlansky ME, Gokce N, Kearney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(7):1149-60.
75. Nadar S, Blann AD, Lip GY. Endothelial dysfunction: methods of assessment and application to hypertension. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3591-605.
76. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990;323:22-7.
77. Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Endothelium-dependent relaxation of small arteries from essential hypertensive patients: mechanisms and comparison with normotensive subjects and with responses of vessels from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 1995;88:611-22.
78. Muiesan ML, Salvetti M, Pajani A, Monteduro C, Galbassini G, Poisa P, i sur. Prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery in hypertensive patients. *J Hypertens.* 2008;26:1612-8.
79. Aznaouridis KA, Stamatelopoulos KS, Karatzis EN, Protogerou AD, Papamichael CM, Lekakis JP. Acute effects of renin-angiotensin system blockade on arterial function in hypertensive patients. *J Hum Hypertens.* 2007;21:654-63.
80. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:631-8.
81. Krentz AJ, Clough G, Byrne CD. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9:781-91.
82. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, i sur. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999;48:1856-62.
83. Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit.* 2001;7:1075-85.
84. Jaap AJ, Shore AC, Tooke JE. Relationship of insulin resistance to microvascular dysfunction in subjects with fasting hyperglycaemia. *Diabetologia.* 1997;40:238-43.
85. Arcaro G, Zenere BM, Saggiani F, Zenti MG, Monauni T, Lechi A, i sur. ACE inhibitors improve endothelial function in type 1 diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria. *Diabetes Care.* 1999;22:1536-42.

86. Kitas GD, Erb N. Tackling ischaemic heart disease in reumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42:607-13.
87. Ozturk MA, Oktar SO, Unverdi S, Ureten K, Göker B, Haznedaroglu S, i sur. Morphologic evidence of subclinical atherosclerosis obtained by carotid ultrasonography in patients with Behcet's disease. *Rheumatol Int*. 2006;26:867-72.
88. Dagli N, Poyrazoglu OK, Dagli AF, Sahbaz F, Karaca I, Kobat MA, i sur. Is inflammatory bowel disease a risk factor for early atherosclerosis?. *Angiology*. 2010;61:198-204.
89. Pahor A, Hojs R, Gorenjak M, Rozman B. Accelerated atherosclerosis in pre-menopausal female patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2006;27(2):119-23.
90. Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR, Forouhi NG, Elliott HL, Connell JM. Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2000;98:531-5.
91. Bilginer Y, Ozaltin F, Basaran C, Duzova A, Besbas N, Topaloglu R, i sur. Evaluation of intima media thickness of the common and internal carotid arteries with inflammatory markers in familial Mediterranean fever as possible predictors for atherosclerosis. *Rheumatol Int*. 2008;28:1211-6.
92. Nagata-Sakurai M, Inaba M, Goto H, Kumeda Y, Furumitsu Y, Inui K, i sur. Inflammation and bone resorption as independent factors of accelerated arterial wall thickening in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:3061-7.
93. Gasparyan AY. The use of carotid artery ultrasonography in different clinical conditions. *Open Cardiovasc Med J*. 2009;3:78-80.
94. Raza K, Carruthers DM, Stevens R, Filer AD, Townend JN, Bacon PA. Infliximab leads to a rapid but transient improvement in endothelial function in patients with primary systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:946-8.
95. Hürlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, i sur. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2002;106:2184-7.
96. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum*. 2005;35:8-17.
97. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(9):503-8.
98. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J*. 2010;4:302-12.
99. Drenjancevic-Peric I, Phillips SA, Falck JR, Lombard JH. Restoration of normal vascular relaxation mechanisms in cerebral arteries by chromosomal substitution in consomic SS.13BN rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H188-95.
100. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, i sur. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem*. 2002;277:3388-96.
101. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:325-33.
102. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, i sur. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-65.
103. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, i sur. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-9.
104. Alam TA, Seifalian AM, Baker D. A review of methods currently used for assessment of in vivo endothelial function. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2005;29:269-76.
105. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, Donald AE, Taylor M, Vallance P, i sur. Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2001;88:145-51.
106. Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens*. 2005;18:3-10.
107. Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation*. 2002;105:213-7.
108. Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, Spratt JC, Murray GD, Cockcroft JR, i sur. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens*. 1998;16:2079-84.
109. Saito M, Okayama H, Nishimura K, Ogimoto A, Ohtsuka T, Inoue K, i sur. Possible link between large artery stiffness and coronary flow velocity reserve. *Heart*. 2008;94:e20.
110. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:554-66.
111. Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Muratori I, Carella M, Novo S. Endothelial dysfunction and carotid lesions are strong predictors of clinical events in patients with early stages of atherosclerosis: a 24-month follow-up study. *Coron Artery Dis*. 2008;19:139-44.
112. Corrado E, Camarda P, Coppola G, Muratori I, Ciaramitaro G, Farinella M, i sur. Prognostic role of endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness in patients undergoing coronary stent implantation. *Int Angiol*. 2009;28:12-9.
113. Wohlin M, Helmersson J, Sandström J, Arnlöv J, Vessby B, Larsson A, i sur. Both cyclooxygenase- and cytokine-mediated inflammation are associated with carotid intima-media thickness. *Cytokine*. 2007;38:130-6.
114. Shimizu M, Kohara S, Yamamoto M, Ando Y, Haida M, Shinohara Y. Significant relationship between platelet activation and intra-media thickness of the carotid artery in patients with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Res*. 2006;117:647-52.
115. Ter Avest E, Stalenhoef AF, de Graaf J. What is the role of non-invasive measurements of atherosclerosis in individual cardiovascular risk prediction?. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112:507-16.
116. Iglesias del Sol A, Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, Witteman JC. Carotid intima-media thickness at different sites: relation to incident myocardial infarction; The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 2002;23:115-26.
117. Kibel A, Cavka A, Cosic A, Falck JR, Drenjancevic I. Effects of hyperbaric oxygenation on vascular reactivity to angiotensin II and angiotensin-(1-7) in rats. *Undersea and Hyperbaric Medicine Journal*. 2012.

ENDOTHELIAL FUNCTION – FUNCTIONAL INDICATOR OF CARDIOVASCULAR RISK FACTORS

Ana Čavka¹, Refmir Tadžić², Ivana Grizelj¹, Sanela Unfirer¹, Zrinka Mihaljević¹, Martina Mihalj¹,
Dragan Manojlović³, Ines Drenjančević^{1*}

¹ Faculty Department of Physiology and Immunology, Faculty of Medicine,
J. J. Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

² Gesundheitszentrum Lange Reihe Dr. Tadzic und Kollegen, Hamburg, Germany

³ Department of Surgery, General Hospital Vukovar, Vukovar, Croatia

*correspondence to:

prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Katedra za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku,

J Huttlera 4, HR-31 000, Osijek, Hrvatska

E-mail: ines.drenjancevic@mefos.hr

Review

ABSTRACT

Endothelium is a dynamic organ which lines the entire vascular system. Endothelial cells control vascular function by responding to various hormones, neurotransmitters and vasoactive factors which affect vasomotion, thrombosis, platelet aggregation and inflammation. These functions are compromised in endothelial dysfunction, a systemic disorder that is characterized by a proinflammatory, proliferative, procoagulatory and vasoconstrictive milieu that favors all stages of atherogenesis. The pathophysiological factors leading to endothelial dysfunction are key risk factors for development and progression of cardiovascular diseases. Endothelium dysfunction is reversible so it seems attractive to consider integrating endothelial function testing as a universal tool for cardiovascular risk stratification in primary and secondary prevention.

Keywords: Endothelium - vascular; Laser-Doppler flowmetry; Cardiovascular diseases; Blood vessels – physiology