

# Rassegne

## Valutazione non invasiva della funzione endoteliale mediante ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione

Mario De Michele, Luigi Ascione\*, Pasquale Guarini\*\*, Silvio Perrotta\*, Bernardino Tuccillo\*

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi "Federico II", \*Divisione di Cardiologia, Ospedale S. Maria di Loreto, Napoli, \*\*Divisione di Cardiologia, Ospedale Villa dei Fiori, Acerra (NA)

Key words:  
Endothelium;  
Prevention; Ultrasound.

The vascular endothelium has a central role in regulating vasomotor tone, smooth muscle cell proliferation, platelet and leukocyte adhesion to the arterial wall, thrombosis and fibrinolysis. Disturbances of these endothelial functions have been suggested to be important in the early and advanced phases of atherosclerosis. The development of a simple, valid ultrasound-based method allowed to non-invasively evaluate endothelial function in a large number of individuals with traditional and non-traditional cardiovascular risk factors. The ultrasound technique measures changes in brachial artery diameter in response to an increase in blood flow (reactive hyperemia) and thus in shear stress, which causes endothelium-dependent dilation. This methodology is not yet perfect. The critical issues today involve the definition of "normal values", and standardized scanning and reading protocols to reduce variability.

(Ital Heart J Suppl 2001; 2 (11): 1155-1160)

© 2001 CEPI Srl

Ricevuto il 22 febbraio 2001; nuova stesura il 18 maggio 2001; accettato il 28 giugno 2001.

Per la corrispondenza:

Dr. Mario De Michele

Via Tommaso De Amicis, 50  
80145 Napoli  
E-mail: demic@libero.it

L'endotelio ha un ruolo essenziale nell'omeostasi vascolare, regolando il tono vasomotore, la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'interazione dei leucociti e delle piastrine con la parete arteriosa, la trombosi e la fibrinolisi<sup>1-4</sup>. Posto tra il lume e la tunica media della parete arteriosa, l'endotelio è in grado di rispondere a stimoli sia fisici che chimici mediante il rilascio di sostanze vasoattive e tromboregolatrici. Queste sostanze includono prostaciclina, endoteline, fattore von Willebrand, fattori di crescita, e soprattutto un fattore di rilascio identificato come ossido nitrico (NO)<sup>5-7</sup>.

L'NO è sintetizzato nell'endotelio vascolare a partire dall'aminoacido L-arginina per azione dell'NO-sintasi<sup>8</sup>. In condizioni normali lo "shear stress" esercitato dal sangue circolante sulle cellule endoteliali rappresenta lo stimolo per il rilascio costante di NO e prostaciclina<sup>9</sup>. L'NO produce rilascio delle cellule muscolari lisce e quindi vasodilatazione, mediante un incremento del GMP ciclico intracellulare ed una riduzione del calcio a disposizione per la contrazione<sup>10</sup>.

La vasodilatazione NO-dipendente è l'indice di funzione endoteliale più adope-

rato in studi clinici. In arterie di capacità una normale risposta dell'endotelio a stimoli fisiologici o farmacologici causa una variazione del diametro vasale, mentre in arterie di resistenza determina un incremento del flusso sanguigno.

La funzione endoteliale può essere valutata sia in vasi di capacità che in vasi di resistenza mediante l'uso di tecniche invasive o non invasive. L'angiografia quantitativa è utilizzata per misurare variazioni del diametro coronarico dopo infusione intracoronarica di acetilcolina<sup>11</sup>. L'invasività e la conseguente impossibilità ad utilizzarla in pazienti asintomatici costituisce il principale limite di questa metodica. La pletismografia "strain-gauge" ad occlusione venosa è adoperata per valutare modificazioni nel flusso sanguigno dell'avambraccio prima e dopo infusione intrarteriosa di stimoli vasodilatatori (ad esempio la metacolina). Anche questa metodica è invasiva e l'interpretazione dei risultati è complessa quando vengono paragonati soggetti con differenti pressioni arteriose o flussi sanguigni basali<sup>12</sup>.

L'introduzione di un metodo basato sull'ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione ha costituito un reale passo in avanti nel-

la valutazione non invasiva della funzione endoteliale<sup>13</sup>. Tale metodo misura cambiamenti nel diametro dell'arteria brachiale, indotti da un incremento del flusso sanguigno (iperemia reattiva). L'iperemia reattiva si ottiene gonfiando un manicotto pressorio, posto intorno all'arto in esame, ad una pressione di 50 mmHg superiore alla pressione sistolica per 4.5-5 min, e poi sgonfiandolo rapidamente. L'incremento di flusso brachiale e conseguentemente dello "shear stress" costituisce il principale stimolo per il rilascio di NO da parte delle cellule endoteliali (sequenza: occlusione → rilascio → iperafflusso brachiale → aumento "shear stress" → liberazione di NO → cambiamenti del diametro dell'arteria brachiale). Un'alterata reattività a livello dell'arteria brachiale è stato dimostrato riflettere un'alterata funzione endoteliale coronarica e può essere utilizzata, quindi, come marker di disfunzione endoteliale sistemica<sup>14,15</sup>. Nello studio di Anderson et al.<sup>14</sup>, il valore predittivo positivo di un'alterata arteria brachiale nel predire disfunzione endoteliale coronarica era del 95%.

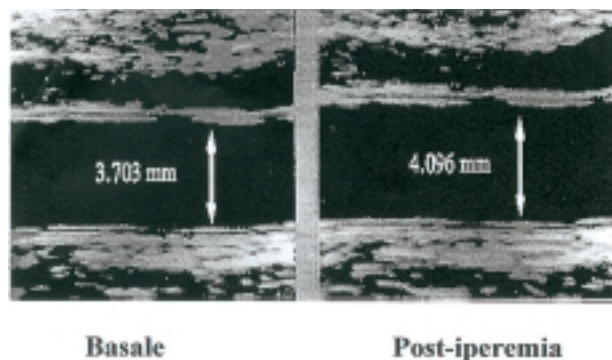
### Tecnica ultrasonografica

La valutazione ultrasonografica dell'arteria brachiale è un esame facile da effettuare (Tab. I). Ai pazienti viene chiesto di essere a digiuno, di evitare il consumo di alcool e caffè, di astenersi dal fumare e da ogni attività fisica intensa per almeno 2 ore prima dell'esame. L'ecografo da utilizzare deve avere una sonda da 7-13 MHz ed un potere di risoluzione assiale di circa 0.3 mm. I parametri operativi dell'apparecchio vengono mantenuti costanti durante l'esame. L'ECG viene monitorizzato per tutto lo studio. L'arteria brachiale viene visualizzata in proiezione longitudinale e le immagini vengono ingrandite con l'uso della funzione zoom. Punti di riferimento anatomici (tendini, biforca-

zione) vengono utilizzati per identificare il segmento in cui effettuare poi le misurazioni. È importante che il segmento visualizzato sia sempre lo stesso, perché all'interno del vaso si possono avere in punti diversi risposte vasodilatatorie differenti<sup>16,17</sup>. Per mantenere il trasduttore nella stessa posizione nel corso dello studio può essere adoperato un reggisonda meccanico. Viene effettuata una registrazione basale del diametro e del flusso sanguigno brachiale. Per ottenere un incremento del flusso sanguigno e quindi dello "shear stress" (iperemia reattiva), un manicotto pressorio viene posto intorno all'arto in esame e gonfiato ad una pressione di 50 mmHg superiore alla pressione sistolica per 4.5-5 min, e poi sgonfiato rapidamente. È stato dimostrato che la posizione del manicotto (prossimale o distale) non è importante nel determinare la risposta vasodilatatoria dell'arteria brachiale, mentre la durata dell'occlusione rappresenta un fattore determinante<sup>18-21</sup>. Un'occlusione < 4.5-5 min non è in grado di determinare una vasodilatazione massimale, mentre un'occlusione > 5 min non apporta alcun vantaggio in termini di vasodilatazione. Il flusso sanguigno nell'arteria brachiale viene registrato per 10 s prima e 15 s dopo lo sgonfiaggio del manicotto mediante l'uso del Doppler pulsato. Poiché il tempo necessario ad ottenere una vasodilatazione massimale è variabile, il diametro dell'arteria deve essere registrato in continuo per almeno 2 min dopo sgonfiaggio del manicotto per valutare adeguatamente la reattività brachiale<sup>22</sup>. Le misurazioni vengono effettuate off-line. In letteratura è stato riportato un flusso basale nell'arteria brachiale variabile da  $84 \pm 26$ <sup>18</sup> a  $140 \pm 102$  ml/min<sup>23</sup>. L'aumento di flusso sanguigno post-occlusione viene calcolato per essere sicuri che lo stimolo per il rilascio di NO sia adeguato in tutti i soggetti in esame. Generalmente l'incremento varia dal 500 al 1000%. Le modifiche di diametro dell'arteria brachiale vengono misurate, comunemente, come cambiamenti percentuali rispetto al diametro basale (Fig. 1). Il diametro esterno dell'arteria viene preso al picco dell'onda R, o alternativamente in corrispondenza dell'onda T dell'ECG, che dovrebbe corrispondere alla massima distensione del vaso. La scelta di misurare il

**Tabella I.** Protocollo ultrasonografico per la valutazione della reattività dell'arteria brachiale.

Paziente a digiuno
No alcool, caffè, fumo ed attività fisica per 2 ore prima dell'esame
Monitorizzazione continua dell'ECG durante l'esame
Arteria brachiale insonorizzata longitudinalmente
Uso di riferimenti anatomici per individuare il segmento in cui effettuare la valutazione
Ottimizzazione delle immagini ecografiche (regolazione dei guadagni, utilizzazione della funzione zoom)
Parametri operativi dell'apparecchio costanti durante l'esame
Registrazione basale del diametro dell'arteria brachiale e della velocità Doppler di flusso sanguigno
Gonfiaggio del manicotto per la pressione 50 mmHg > pressione sistolica per 4.5-5 min e poi rapido sgonfiaggio
Registrazione velocità Doppler per 15 s e diametro brachiale per 2 min dopo sgonfiaggio
Somministrazione sublinguale di 0.2 mg di isosorbide dinitrato
Registrazione finale diametro brachiale dopo 4 min
Effettuazione delle misurazioni



**Figura 1.** Immagine ultrasonografica del diametro basale e post-iperemia dell'arteria brachiale.

diametro esterno, nella maggior parte degli studi, deriva dalla difficoltà di visualizzare il diametro interno. L'arteria brachiale può andare incontro ad una dilatazione variabile dal 5 al 20%, inversamente correlata con il diametro basale (arterie di calibro minore dilatano in misura maggiore).

Poiché una normale vasodilatazione richiede oltre ad un endotelio intatto anche un corretto funzionamento delle cellule muscolari lisce, il diametro dell'arteria brachiale viene misurato anche dopo somministrazione sublinguale di 0.2 mg di isosorbide dinitrato, un vasodilatatore che agisce direttamente sulle cellule muscolari lisce. Questo permette la valutazione della vasodilatazione endotelio-indipendente<sup>19</sup>.

Celermajer et al.<sup>13,24</sup> hanno valutato l'accuratezza e la riproducibilità del metodo in "arterie fantoccio" ed *in vivo*. Il metodo si è dimostrato accurato identificando differenze di 0.1 mm in diametro in più della metà delle strutture studiate. I coefficienti di variazione riportati erano del 3.8% per il diametro basale e del 2.3% per il diametro durante iperemia reattiva.

### Reattività brachiale e malattia aterosclerotica

La disfunzione endoteliale è un evento chiave nelle fasi iniziali del processo aterosclerotico<sup>25,26</sup>. I meccanismi attraverso i quali un endotelio disfunzionante promuove l'aterosclerosi comprendono una ridotta disponibilità di NO, per diminuita produzione o aumentata degradazione, ed un aumentato rilascio di sostanze vasoconstrictrici. Le conseguenze di queste modificazioni funzionali predispongono all'adesione leucocitaria e piastrinica, determinano un accumulo di lipoproteine e macrofagi nella parete arteriosa, la proliferazione delle cellule muscolari lisce e, messe insieme, promuovono la formazione e la progressione della placca aterosclerotica<sup>27,28</sup>.

Numerosi studi realizzati con ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione hanno evidenziato una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente non solo in soggetti adulti con aterosclerosi manifesta (coronarica o periferica degli arti)<sup>29-31</sup>, ma anche in individui con fattori di rischio cardiovascolare tradizionali e non tradizionali<sup>32-39</sup>.

L'invecchiamento si associa ad una progressiva disfunzione endoteliale in soggetti senza altri fattori di rischio cardiovascolare<sup>34</sup>. I meccanismi con cui l'invecchiamento altera la funzione endoteliale includono una ridotta produzione di sostanze vasodilatatrici, un aumentato catabolismo di tali sostanze ed un maggiore rilascio di sostanze vasoconstrictrici. I cambiamenti associati all'età si verificano un decennio prima negli uomini rispetto alle donne. La differenza legata al sesso può essere spiegata con gli effetti protettivi degli estrogeni sulla parete arteriosa, in parte dovuti all'aumentata disponibilità di NO. Il ruolo degli ormoni ovarici endogeni sulla funzione endoteliale è stato studiato e so-

prattutto l'estradiolo sembra esercitare un effetto benefico, dimostrato dalla correlazione positiva tra concentrazione sierica di estrogeni durante le fasi follicolare e luteinica del ciclo mestruale ed arteria brachiale<sup>35</sup>.

Significative correlazioni esistono tra livelli di colesterolo LDL ed arteria brachiale<sup>13</sup>. I meccanismi del danno endoteliale dovuto all'ipercolesterolemia non sono completamente noti, ma alcuni studi suggeriscono che lo stress ossidativo ha un ruolo importante nel mediare gli effetti dell'ipercolesterolemia. Lo stress ossidativo produce disfunzione endoteliale attraverso due processi: modificazione delle LDL e incrementata produzione endoteliale di superossido e di altri radicali liberi dell'ossigeno che inattivano l'NO<sup>40,41</sup>. Il fumo di sigaretta riduce l'arteria brachiale e tale effetto è maggiore con l'incremento del numero di sigarette fumate. Tuttavia la disfunzione endoteliale causata dal fumo sembra parzialmente reversibile, con gli ex-fumatori che hanno una funzione endoteliale migliore rispetto ai fumatori correnti<sup>33</sup>. Gli studi ultrasonografici indicano la presenza di una disfunzione endoteliale in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale<sup>38</sup>. Comunque, l'alterata funzione endoteliale potrebbe essere alla base e non essere una conseguenza dell'ipertensione arteriosa, in quanto è stato dimostrato che figli normotesi di soggetti ipertesi presentano un'alterazione nella via L-arginina-NO ed inoltre la normalizzazione dei valori pressori mediante terapia non sembra migliorare la funzione endoteliale<sup>42</sup>. L'iperomocisteinemia, un "nuovo" fattore di rischio per malattie cardiovascolari, e l'omocistinuria, una rara condizione caratterizzata da elevati livelli plasmatici di omocisteina (> 100 mmol/l) ed alto rischio per trombosi premature, sono associate ad un'alterata arteria brachiale<sup>32,39</sup>. I meccanismi coinvolti nel danno endoteliale legato all'omocisteina comprendono una potenziale azione tossica diretta sull'endotelio o mediata attraverso la produzione di radicali liberi dell'ossigeno che degradano NO.

In un recente studio di Gaeta et al.<sup>43</sup>, una ridotta arteria brachiale era evidenziabile già in bambini-adolescenti a rischio (con familiarità per infarto miocardico prematuro), ed era correlata con un aumento dello spessore medio-intimale carotideo, un altro indicatore preclinico di aterosclerosi, supportando l'idea che alterazioni funzionali e strutturali della parete arteriosa sono evidenziabili mediante ultrasonografia B-mode già in giovane età.

### Terapia della disfunzione endoteliale

L'importante ruolo svolto dall'endotelio nelle fasi iniziali del processo aterosclerotico ha fornito le basi per studi di intervento, i quali hanno utilizzato l'ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione come metodica di immagine per valutare l'effetto di diverse strategie terapeutiche (farmaci ipolipidizzanti, vitamine antiossidanti, supplementazione dietetica con L-arginina,

estrogenici, antipertensivi) sulla funzione endoteliale<sup>44-53</sup>.

Gli studi con farmaci ipocolesterolemizzanti hanno dimostrato come 1) l'effetto ottenuto, con una riduzione della colesterolemia, sulla funzione endoteliale sia rapido; 2) la terapia ipolipidizzante deve essere continuativa, perché una sospensione del trattamento di alcune settimane determina un nuovo peggioramento della funzione endoteliale; 3) la riduzione della colesterolemia totale e del colesterolo LDL al di sotto di valori considerati "desiderabili" in soggetti sani di mezza età fornisce un beneficio sulla vasodilatazione endotelio-dipendente. È importante sottolineare come i risultati di questi studi siano in accordo con le conclusioni di importanti trial di prevenzione primaria e secondaria (AFCAPS/TextCAPS<sup>54</sup>, WOSCOPS<sup>55</sup>, 4S<sup>56</sup>, CARE<sup>57</sup>), i quali hanno dimostrato un beneficio della terapia con statine in termini di eventi cardiovascolari e mortalità totale, anche in soggetti con lieve ipercolesterolemia. Tale beneficio può essere in parte spiegato da una migliore funzione endoteliale e da una stabilizzazione della placca aterosclerotica.

Poiché lo stress ossidativo è implicato nella patogenesi della disfunzione endoteliale, studi clinici hanno testato l'effetto di antiossidanti sulla funzione endoteliale. L'aggiunta di vitamina E (300 UI) alla terapia con simvastatina determinava un miglioramento dell'arteria brachiale in soggetti ipercolesterolemici, superiore a quello ottenuto con la sola terapia ipolipidizzante<sup>47</sup>. La somministrazione orale di vitamina C (1 g) o vitamina E (800 UI) aboliva completamente la transitoria alterazione dell'arteria brachiale, dovuta ad un pasto ricco in grassi<sup>48</sup>. Questi risultati sono promettenti, ma devono essere confermati in più ampi trial randomizzati.

Poiché la disfunzione endoteliale è caratterizzata da una ridotta disponibilità di NO, si è ipotizzato che una supplementazione dietetica con l'aminoacido L-arginina potesse normalizzare la funzione endoteliale. Il trattamento orale con L-arginina ha dimostrato, però, solo un beneficio parziale e temporaneo sull'arteria brachiale in pazienti ipercolesterolemici e in giovani coronaropatici<sup>49,50</sup>. Ci sono ancora numerosi punti da chiarire, come il dosaggio orale di L-arginina da somministrare, la durata della terapia per ottenere il massimo beneficio ed il meccanismo attraverso il quale la L-arginina può migliorare la funzione endoteliale. L'evidenza di una più bassa incidenza di malattia coronarica nelle donne prima della menopausa ed il ridotto rischio cardiovascolare in donne in terapia ormonale sostitutiva, ha condotto a testare gli effetti della terapia con estrogeni sulla funzione endoteliale<sup>51,52</sup>. La terapia sostitutiva con estrogeni per via orale o transdermica in donne in menopausa migliora l'arteria brachiale e l'aggiunta di progesterone non attenua questo effetto favorevole. I meccanismi con cui gli estrogeni migliorano la funzione endoteliale sono probabilmente molteplici e comprendono un'augmentata produzione di NO attraverso l'attivazione della NO-sintasi, l'inibi-

zione della degradazione di NO e modificazioni del metabolismo lipoproteico [riduzione del colesterolo LDL e di lipoproteina(a) ed aumento delle concentrazioni di colesterolo HDL]. A questo proposito, sebbene la terapia estrogenica e quella con statine abbiano differenti effetti sui livelli di lipoproteine, la combinazione delle due non determina alcun beneficio additivo sulla funzione endoteliale<sup>53</sup>.

Gli ACE-inibitori sono in grado di migliorare la funzione endoteliale in pazienti con malattia coronarica, riducendo i livelli di angiotensina II e inibendo la degradazione della bradichinina<sup>46</sup>. Gli ACE-inibitori non hanno, però, tutti lo stesso effetto sulla reattività vascolare e l'affinità per l'ACE tissutale sembra un fattore importante per spiegare tale diversità. Il quinapril, un ACE-inibitore con alta affinità per l'ACE tissutale, è in grado di migliorare la vasodilatazione endotelio-dipendente sia in acuto che in cronico a differenza dell'enalapril.

### Limiti e prospettive future

La determinazione con l'ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione della reattività dell'arteria brachiale è un metodo semplice, non invasivo, valido per la valutazione della funzione endoteliale, ma presenta ancora dei limiti. Innanzitutto è necessario definire valori di "normalità", tenendo comunque presente che l'arteria brachiale vasodilata in maniera inversamente proporzionale al diametro basale.

Un altro potenziale limite per studi ripetuti nel corso del tempo è l'evidenza di una differente dilatazione in segmenti diversi della stessa arteria. La definizione di protocolli standardizzati, simili a quelli utilizzati negli studi di progressione/regressione dell'aterosclerosi carotidea, con punti di repere anatomici ben precisi per individuare i segmenti in cui effettuare le misurazioni, è di vitale importanza.

L'uso di sonde ad alta frequenza (10-13 MHz) e di sistemi semiautomatici per la misurazione del diametro dell'arteria brachiale basale e post-iperemia sono tra i sistemi attualmente adottati per cercare di migliorare la riproducibilità.

Una volta superati tali limiti, l'arteria brachiale potrebbe essere ampiamente utilizzata nella pratica clinica per l'identificazione di soggetti ad alto rischio cardiovascolare.

### Riassunto

L'endotelio ha un ruolo essenziale nell'omeostasi vascolare, regolando il tono vasomotore, la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'interazione dei leucociti e delle piastrine con la parete arteriosa, la trombosi e la fibrinolisi. Un'alterazione delle funzioni endoteliali è un evento chiave nelle fasi iniziali ed

avanzate del processo aterosclerotico. L'introduzione di un metodo basato sull'ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione ha consentito di valutare la funzione endoteliale in un gran numero di individui con fattori di rischio cardiovascolare tradizionali e non tradizionali. La tecnica ultrasonografica misura cambiamenti nel diametro dell'arteria brachiale, indotti da un incremento del flusso sanguigno (iperemia reattiva) e conseguentemente dello "shear stress", che costituisce il principale stimolo per il rilascio di ossido nitrico da parte delle cellule endoteliali. La metodologia non è ancora perfetta. Attualmente, punti critici includono la definizione di "valori di normalità" e di protocolli standardizzati di scansione e lettura per ridurre la variabilità.

*Parole chiave:* Endotelio; Prevenzione; Ultrasuoni.

## Bibliografia

1. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989; 13: 658-67.
2. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.
3. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth proliferation. *Circulation* 1993; 87 (Suppl V): V51-V55.
4. Hekman CM, Loskutoff DJ. Fibrinolytic pathways and the endothelium. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13: 514-27.
5. Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993; 87 (Suppl V): V9-V17.
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
7. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, et al. The nature of endothelium-derived relaxant factor. *Nature* 1984; 308: 645-7.
8. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
9. Pohl U, Holtz J, Busse R, et al. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986; 8: 37-44.
10. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, et al. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89: 2035-40.
11. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-51.
12. Benjamin N, Calver A, Collier J, et al. Measuring forearm blood flow and interpreting the responses to drugs and mediators. *Hypertension* 1995; 25: 918-23.
13. 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.
14. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard M, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1235-41.
15. Anderson TJ, Gerhard M, Meredith I, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75: 71B-74B.
16. El-Tamimi H, Mansour M, Wargovich TJ, et al. Constrictor and dilator responses to intracoronary acetylcholine in adjacent segments of the same coronary artery in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1994; 89: 45-51.
17. Penny WF, Rockman H, Long J, et al. Heterogeneity of vasomotor response to acetylcholine along the human coronary artery. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1046-55.
18. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol* 1995; 268 (Part 2): H1397-H1404.
19. Leeson P, Thorne S, Donald A, et al. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997; 78: 22-7.
20. Uehata A, Lieberman E, Gerhard M, et al. Noninvasive assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery. *Vasc Med* 1997; 2: 87-92.
21. Saouaf R, Arora S, Smakowski P, et al. Reactive hyperemic response of the brachial artery: comparison of proximal and distal occlusion. *Acad Radiol* 1998; 5: 556-60.
22. Bressler B, Chan S, Mancini GBJ. Temporal response of brachial artery dilation after occlusion and nitroglycerin. *Am J Cardiol* 2000; 85: 391-4.
23. 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.
24. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. Non-invasive measurement of human endothelium-dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; 74: 247-53.
25. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
26. Zeiher AM, Drexler H, Walschlagler E, et al. Modulation of coronary vasomotor tone in humans: progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991; 83: 391-401.
27. Cooke JP, Tsao PS. Is nitric oxide an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 653-5.
28. Steinberg DS. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 1987; 76: 508-14.
29. Lieberman EH, Gerhard MA, Uehata A, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients < 40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996; 78: 1210-4.
30. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997; 129: 111-8.
31. Harris LM, Faggioli GL, Shah R, et al. Vascular reactivity in patients with peripheral vascular disease. *Am J Cardiol* 1995; 76: 207-12.
32. Celermajer DS, Sorensen KE, Ryalls M, et al. Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 854-8.
33. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88: 2149-55.
34. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, et al. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 471-6.
35. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, et al. Modulation of endothelium dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995; 92: 3431-5.
36. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial di-

- lation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334: 150-4.
37. Clarkson P, Donald A, Sampson M, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 573-9.
  38. Iiyama K, Nagano M, Nagano N, et al. Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J* 1996; 132: 779-82.
  39. Woo KS, Chook P, Lolin YI, et al. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial dysfunction in humans. *Circulation* 1997; 96: 2542-4.
  40. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized LDL. *J Clin Invest* 1992; 89: 10-8.
  41. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-51.
  42. Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 1298-303.
  43. Gaeta G, De Michele M, Cuomo S, et al. Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction. *N Engl J Med* 2000; 343: 840-6.
  44. Simons LA, Sullivan D, Simons J, et al. Effects of atorvastatin monotherapy and simvastatin plus cholestyramine on arterial endothelial function in patients with severe primary hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1998; 137: 197-203.
  45. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Changes in flow-mediated brachial artery vasoactivity with lowering of desirable cholesterol levels in healthy middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996; 77: 37-40.
  46. Kon Koh K, Bui MN, Hathaway L, et al. Mechanism by which quinapril improves vascular function in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999; 83: 327-31.
  47. Neunteufl T, Kostner K, Katzenschlager R, et al. Additional benefit of vitamin E supplementation to simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic men. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 711-6.
  48. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA* 1997; 278: 1682-6.
  49. Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, et al. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 1996; 97: 1989-94.
  50. Adams MR, McCredie R, Jessup W, et al. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997; 129: 261-9.
  51. 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.
  52. Gerhard MD, Walsh BW, Tawakol A, et al. Estradiol therapy combined with progesterone and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Circulation* 1998; 98: 1158-63.
  53. Kon Koh K, Cardillo C, Bui MN, et al. Vascular effects of estrogen and cholesterol-lowering therapies in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Circulation* 1999; 99: 354-60.
  54. Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279: 1615-22.
  55. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1301-7.
  56. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-9.
  57. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye A, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. *N Engl J Med* 1996; 335: 1001-9.