

Funkcja śródbłonna u osób z chorobami układu krążenia. Część I: czynniki humoralne i badanie funkcji śródbłonna

Endothelial function in patients with cardiovascular diseases. Part I: humoral factors and assessment of endothelial function

Summary

Endothelium acts as an organ secreting actively various substances. The vascular homeostasis is based on the precisely regulated balance between vasodilative and vasoconstrictive factors derived from endothelium. Out of numerous vasoactive factors maintaining vascular homeostasis the key role belongs to nitric oxide and endothelin-1. The determination of endothelial function may be based on flow mediated vasodilatation tests (in coronary and peripheral circulation) and on the laboratory tests of the specific markers of the endothelial function and local inflammatory process present in vessels.

key words: endothelium, humoral factors, flow-mediated dilatation

Arterial Hypertension 2005, vol. 9, no 4, pages 294–300.

Śródbłonek jako struktura utrzymująca homeostazę naczyniową

Śródbłonek jest barierą między krwią i tkankami, zbudowaną z jednej warstwy komórek, która pokrywa wewnętrzną powierzchnię naczyń krwionośnych

i zastawki serca. Jego masa wynosi około 1 kg, a powierzchnia 100–700 m² [1]. Śródbłonek uważany jest obecnie za narząd wydzielania wewnętrznego o bardzo dużej aktywności [2]. Produkuje i uwalnia różne substancje, które w zależności od mechanizmu działania można podzielić na następujące grupy [3]:

— czynniki naczyniorozszerzające: tlenek azotu, prostacyklina, śródbłonkopochodny czynnik hiperpolaryzujący, bradykinina, adrenomedulina, natriuretyczny peptyd C;

— czynniki naczyniozwężające: endotelina-1, angiotensyna II, tromboksan A₂, rodniki tlenowe, prostaglandyna H₂;

— czynniki hamujące rozrost: tlenek azotu, prostacyklina, transformujący czynnik wzrostu β, siarczan heparanu;

— czynniki sprzyjające rozrostowi: endotelina-1, angiotensyna II, rodniki tlenowe, płytkopochodny czynnik wzrostu, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, insulinopodobny czynnik wzrostu, interleukiny;

— czynniki przeciwzakrzepowe: tlenek azotu, prostacyklina, aktywator plazminogenu, białko C, inhibitor czynnika tkankowego, czynnik von Willebranda;

— czynniki sprzyjające zakrzepom: endotelina-1, rodniki tlenowe, inhibitor aktywatora plazminogenu I, tromboksan A₂, fibrynogen, czynnik tkankowy;

— wskaźniki stanu zapalnego: rozpuszczalne cząsteczki adhezyjne (selektyna-E, selektyna-P, cząsteczka przylegania międzykomórkowego, naczynio-

Adres do korespondencji: dr med. Rafał Poręba
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych
i Nadciśnienia Tętniczego Akademii Medycznej we Wrocławiu
ul. Pasteura 4, 50–367 Wrocław
tel.: (071) 784–25–20, faks: (071) 784–09–54
e-mail: sogood@poczta.onet.pl

 Copyright © 2005 Via Medica, ISSN 1428–5851

wa cząsteczka przylegania komórkowego), chemokiny, czynnik jądrowy NF- κ B;

— czynniki regulujące przepuszczalność: receptory dla końcowych produktów glikozylacji białek;

— czynnik odpowiedzialny za angiogenezę: śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*).

Już ponad 20 lat temu Furchgott i Zawadzki opisałi naczyniorozszerzające działanie acetylocholinę zależne od uwalniania tlenu azotu ze śródbłonka [4]. Śródbłonek jest powiązany z układem mechanoreceptorów, które pod wpływem przepływu krwi i zmian ciśnienia modyfikują napięcie ściany naczyń [5]. Jest on odpowiedzialny za wykrywanie zmian sił hemodynamicznych i sygnałów pochodzących z krwi, a reaguje na nie poprzez uwalnianie substancji naczynioaktywnych. Precyzyjnie regulowana równowaga pomiędzy pochodzącymi ze śródbłonka czynnikami o działaniu rozszerzającym i zwężającym jest istotą homeostazy naczyniowej [6]. Gdy równowaga ta zostaje zaburzona, stwierdza się dominujące zwężenie naczyń, inicjację i nasilenie się miejscowego stanu zapalnego, zaburzenia krzepnięcia oraz zwiększoną krzepliwość lokalną przez pobudzenie przylegania leukocytów i aktywację płytek [7]. Konsekwencje tych wszystkich zmian to powstawanie i progresja zmian miażdżycowych [3, 8]. Spośród czynników naczynioaktywnych utrzymujących homeostazę naczyniową kluczową rolę odgrywają tlenek azotu oraz endotelina-1.

Metody oceny funkcji śródbłonka

Badanie funkcji śródbłonka opiera się na ocenie rozszerzalności naczyń w badanym łożysku naczyniowym (krążeniu wieńcowym lub obwodowym) oraz określaniu stężeń krążących wskaźników funkcji śródbłonka i miejscowego stanu zapalnego w naczyniach.

Badanie funkcji śródbłonka na podstawie oceny rozszerzalności naczyń

Rozszerzenie naczyń w krążeniu wieńcowym ocenia się za pomocą ilościowej angiografii wieńcowej, po dowieńcowym wstrzyknięciu wazodylatorów, takich jak na przykład acetylocholina. W zdrowych naczyniach acetylocholina wywołuje reakcję wazodylatacyjną zależną od tlenu azotu. U chorych z dysfunkcją śródbłonka działanie to jest osłabione lub występuje paradoksalne zwężenie naczyń [9].

Czynność śródbłonka mikrokrążenia wieńcowego można ocenić za pomocą śródwieńcowego badania dopplerowskiego, mierząc przepływ krwi przez naczynia wieńcowe w odpowiedzi na bodźce farmakologiczne lub fizjologiczne. Metody nieinwazyjne służące do oceny czynności śródbłonka wieńcowego obejmują także pozytronową tomografię emisyjną i fazowo-kontrastowe obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego [8].

Ocena rozszerzania naczyń w krążeniu obwodowym opiera się na badaniu ultradźwiękowym tętnicy ramiennej. Pięciominutowe zamknięcie przepływu przez ramię powoduje przekrwienie reaktywne po zwolnieniu mankieta ciśnieniomierza. Wzrost siły ścinającej wywołuje śródbłonkopochodne, zależne od przepływu, rozszerzenie naczyń. Funkcja śródbłonka oceniana tą metodą koreluje ze stanem śródbłonka tętnic wieńcowych [10–12]. Zależne od przepływu rozszerzenie naczynia kontrolowane przez śródbłonek (FMD, *flow-mediated dilatation*) jest oceniane na prawym ramieniu chorego przebywającego w pozycji leżącej po 15-minutowym odpoczynku, w pomieszczeniu z kontrolowaną temperaturą powietrza (22–25°C). Średnicę tętnicy ramiennej (BAD, *brachial artery diameter*) mierzy się w ultrasonograficznej projekcji B w okresie końcoworozkurczowym. Badana tętnica jest obrazowana na długości około 5 cm proksymalnie do dołu łokciowego, gdzie uzyskuje się najdokładniejszy obraz i gdzie dokonuje się pomiaru BAD. Po spoczynkowym badaniu wstępnym na poziomie środkowej części przedramienia (dystalnie od mierzonej tętnicy) zakłada się pneumatyczną opaskę uciskową, a następnie pompuje się do chwili zahamowania przepływu krwi przez tętnicę ramienną, równocześnie oceniając za pomocą sondy dopplerowskiej, po czym ciśnienie to jest utrzymywane przez 5 minut. Gwałtowne opróżnienie mankieta powoduje zwiększenie przepływu i przeprowadza się badanie ciągłe, trwające 1 minutę. W celu dokonania oceny przekrwienia reaktywnego mierzy się BAD w czasie 45–60 s po opróżnieniu mankieta. Zależne od przepływu rozszerzenie naczynia wyliczane jest na podstawie średnic jako: (przekrwienie reaktywne — wartość wyjściowa)/wartość wyjściowa \times 100%. Zgodnie z zaleceniami Vogla, FMD uznaje się za „prawidłowe”, gdy odpowiedzią tętnicy ramiennej jest rozszerzenie o $>$ 10% w stosunku do wartości wyjściowej. Za wartości „nieprawidłowe” uznaje się rozszerzenie $<$ 10% lub sytuację, gdy występuje skurczowa reakcja naczynia [11, 13].

Czynność oporowych naczyń obwodowych można oceniać za pomocą impedencyjnej żylniej pletyzmografii okluzyjnej [14, 15].

Badanie funkcji śródbłonka na podstawie oceny stężeń parametrów biochemicznych i wskaźników miejscowego stanu zapalnego

W ostatnich latach funkcję śródbłonka naczyniowego ocenia się podstawie oznaczania stężeń krążących wskaźników biochemicznych. Do grupy rozpuszczalnych wskaźników funkcji śródbłonka i miejscowej reakcji zapalnej należą [3]:

- tlenek azotu;
- endotelina-1;
- cząsteczki adhezyjne (CAM, *cellular adhesion molecules*);
- czynnik von Willebranda (vWf, *von Willebrand factor*);
- asymetryczna dimetyloarginina;
- białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*);
- tkankowy aktywator plazminogenu;
- fibrynogen;
- amyloid A;
- interleukiny.

Znaczenie tlenu azotu w utrzymaniu homeostazy naczyniowej

Tlenek azotu (NO, *nitric oxide*), odkryty wcześniej jako śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia (EDRF, *endothelial derived relaxing factor*), pełni zasadniczą rolę w utrzymaniu napięcia i reaktywności naczyń [16]. Jest on wydzielany w sposób ciągły i powoduje osłabienie napięcia skurczowego naczyń tętniczych, przez co zapewnia odpowiedni do zapotrzebowania przepływ tkankowy krwi. Jest kluczowym czynnikiem wpływającym na napięcie mięśni gładkich naczyń i przeciwdziała czynnikom silnie zwężającym naczynia, takim jak endotelina-1 oraz angiotensyna II [17]. Ponadto hamuje adhezję, aktywację i agregację płytek oraz powstrzymuje rozrost mięśni gładkich naczyń. Zmniejsza produkcję czynnika aktywującego płytki (PAF, *platelet activating factor*) przez śródbłonek [2]. Tlenek azotu wykazuje ochronny wpływ w odniesieniu do ściany naczyniowej, przede wszystkim poprzez zapobieganie utlenianiu lipidów i obniżanie aktywności wolnych rodników tlenowych [18]. Naczniorozszerzające działanie NO odbywa się przez aktywację cyklicznej guanylanowej i wzrost stężenia cyklicznego GMP [19, 20]. Układ wytwarzający NO występuje nie tylko w komórkach śródbłonka i płytkach krwi, ale również w strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Przyjmuje się, że NO może odgrywać znaczącą

rolę w ośrodkowej regulacji ciśnienia tętniczego, głównie poprzez zmniejszanie aktywności układu współczulnego [21]. Okres półtrwania tlenu azotu jest bardzo krótki i wynosi około 6 s.

Powstały w śródbłonku NO przedostaje się do komórek mięśni gładkich w warstwie środkowej ściany naczyń, gdzie pobudza cyklazę guanylową w obrębie sarkoplazmy i zwiększa produkcję cyklicznego guanozylomonofosforanu (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*). Wzrost stężenia cGMP nasila aktywność kinazy białkowej G, uczestniczącej w pobudzeniu zależnej od wapnia ATP-azy w siateczce sarkoplazmatycznej. Zwiększa się czynny wychwyty jonów wapnia (Ca^{2+}) z sarkoplazmy i następuje rozkurcz mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych [22].

Tlenek azotu jest uwalniany w wyniku połączenia się niektórych endogennych substancji z odpowiadającymi im receptorami. Należą do nich takie substancje, jak: acetylocholina — pobudzająca receptor M1, adenozyntrifosforan i adenozyndifosforan — stymulujące receptor P2, histamina — działająca poprzez receptor H1, serotonina — łącząca się z receptorem 52 oraz wazopresyna — działająca za pośrednictwem receptora V2 [23, 24].

Regulacja syntezy i izoforny tlenu azotu

Tlenek azotu jest syntetyzowany w sposób ciągły przez komórki śródbłonka oraz przez leukocyty z aminokwasu L-argininy, cząsteczkowego tlenu i fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) przy udziale enzymu syntazy tlenu azotu (NOS, *nitric oxide synthase*) [25, 26]. Kofaktorami tego enzymu są: tetrahydrobiopteryna, dinukleotyd flawinoadeninowy oraz mononukleotyd flawinowy. Syntaza NO występuje jako izofornia konstytutywna i indukowalna. Postać konstytutywna występuje jako izofornia neuronalna (nNOS, NOS-1, *neuronal nitric oxide synthase*) oraz śródbłonkowa (eNOS, NOS-3, *endothelial nitric oxide synthase*) [27].

Konstytutywna postać enzymu NOS-1 występuje w neuronach, astrocytach oraz w zakończeniach nerwowych układu autonomicznego — produkuje NO, który pełni funkcję przekaźnika w synapsach neuronalnych [25].

Konstytutywna postać enzymu NOS-3 występuje w śródbłonku, komórkach mięśnia sercowego i płytkach krwi. Charakteryzuje się stałą ekspresją, przy braku zewnętrznej stymulacji. Aktywność enzymu może się jednak zwiększać pod wpływem takich czynników, jak: trombina, dwufosforan adenozyny

(ADP, *adenosine diphosphate*) oraz siły ścinające. Ekspresja NOS-3 ulega zmniejszeniu w wyniku oddziaływania czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor α*), erythropoetyny, utlenionej postaci cholesterolu frakcji LDL oraz przy niedotlenieniu tkanek [18, 20, 28, 29]. Regulatorem śródbłonkowej izoformy syntazy tlenu azotu jest też sam NO, poprzez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, w którym uczestniczy cGMP [30, 31]. Wykazywano, że śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (NOS-3) zapobiega powstawaniu zmian miażdżycowych oraz zmniejsza ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego.

Indukowalna postać syntazy NO (iNOS, NOS-2, *inductable nitric oxide synthase*) różni się od izoformy konstytutywnej tym, że jej ekspresja jest czasowa. Występuje przede wszystkim w makrofagach, komórkach mięśni gładkich, fibroblastach oraz komórkach śródbłonna [32]. Produkcja NO przez iNOS jest związana z odpowiedzią odpornościową, między innymi z wewnątrzkomórkowym niszczeniem drobnoustrojów przez makrofagi [33]. Ekspresja formy indukowalnej może wzrastać pod wpływem cytokin o działaniu prozapalnym [34]. Wykazywano, że jej aktywność może się zwiększać w przebiegu wstrząsu septycznego, czym tłumaczony jest efekt związany z rozszerzeniem naczyń krwionośnych oraz obniżaniem się ciśnienia tętniczego [35].

Ważną różnicą między izoformami enzymu syntetyzującego NO jest to, że eNOS wytwarza stale umiarkowane ilości tlenu azotu, podczas gdy iNOS zwykle produkuje duże ilości NO. W badaniach prowadzonych na myszach wykazywano, że u zwierząt pozbawionych izoformy enzymu iNOS wzrasta stężenie cholesterolu całkowitego oraz nasila się proces powstawania zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych [32].

Podsumowując, NOS-3 oraz NOS-1 są enzymami konstytutywnymi i wymagają do aktywacji jonów wapnia. Izoenzym NOS-2 jest indukowany przez cytokiny i odgrywa rolę w odpowiedzi odpornościowej, a zwłaszcza w reakcjach zapalnych. Aktywność wszystkich form NOS jest hamowana przez analogi L-argininy, między innymi L- ω -nitro-L-argininę (L-NOARG) czy też L-N^G-nitroargininę (L-NMMA) [36, 37].

Tlenek azotu jest szybko neutralizowany przez aniony nadtlenkowe i oksyhemoglobinę. Aniony nadtlenkowe przekształcają NO do anionu azotawego (NO₂⁻) i nieczynnego anionu azotowego (NO₃⁻) [38]. W wyniku reakcji oksyhemoglobiny z tlenkiem azotu powstaje methemoglobina i jon azotanowy [39, 40]. Przyczyną tego stanu jest silniejsze wiązanie się hemu z tlenkiem azotu niż z tlenem. Dzięki

szybkiej neutralizacji NO w warunkach prawidłowych pełni on swoją funkcję fizjologiczną jedynie w miejscu zetknięcia się komórek śródbłonna ze strumieniem krwi [41, 42].

Metabolizm i izoformy endoteliny

Znane są trzy izoformy endoteliny: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) i endotelina-3 (ET-3) [43]. Ze śródbłonkiem jest związana endotelina-1, która ma bardzo duże znaczenie w patogenezie wielu chorób układu krążenia [44]. Jest ona zbudowana z 21 reszt aminokwasowych. Sekwencja aminokwasowa ET-1 różni się od ET-2 dwiema resztami, a od ET-3 sześcioma resztami aminokwasowymi. Endoteliny, poza układem krążenia, występują w nerkach, przewodzie pokarmowym oraz przysadce mózgowej [45].

Endotelina-1 powstaje na drodze enzymatycznej przemiany z dwóch nieaktywnych peptydów: preproendoteliny i proendoteliny. Aktywna forma ET-1 jest przekształcana z nieaktywnych prekursorów pod wpływem endopeptydazy, zwanej enzymem konwertującym endotelinę (ECE, *endothelin converting enzyme*). Ekspresję ECE stwierdzono w komórkach śródbłonna oraz w oskrzelach, nerkach, nadnerczach i gonadach [46].

Czynniki stymulujące uwalnianie ET-1 mogą wykazywać działanie endokrynne, parakrynne i autokrynne. Endotelina-1 jest uwalniana pod wpływem adrenaliny, angiotensyny II, wazopresyny, trombiny, interleukiny-1 β , TGF- β oraz podczas niedotlenienia i stosowania niektórych leków, na przykład cyklosporyny [47, 48]. Tlenek azotu, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, hamuje syntezę ET-1. Podobne działanie wykazuje stabilna pochodna drugorzędowego przekaźnika NO, czyli 8-bromo-cGMP, która hamując syntezę ET-1, indukowaną trombiną, jednocześnie nasila wytwarzanie tlenu azotu [49].

U ssaków zidentyfikowano dwa typy receptorów dla endotelin. Receptory zlokalizowane na powierzchni mięśni gładkich naczyń wykazują wysokie powinowactwo do ET-1 i ET-2, a niewielkie do ET-3. Ten typ receptorów nazwano podtypem A (ET_A). Drugi typ receptorów zlokalizowany jest głównie na komórkach śródbłonna i nazwano go podtypem B (ET_B) [26]. U ludzi liczba receptorów ET_A przewyższa znacznie liczbę receptorów ET_B. Na przykład w dużych naczyniach niaserdziowych receptory ET_A stanowią 85%, a receptory ET_B 15%. Receptory dla endotelin są zlokalizowane na powierzchni komórek mięśniówki gładkiej oraz na powierzchni komórek śródbłonna [50]. Pobudzenie receptorów ET_A wywołuje efekt naczyniozężyzający.

Pobudzenie receptorów ET_B z jednej strony pośredniczy w uwalnianiu NO i prostacyliny ze śródbłonka, a z drugiej powoduje skurcz mięśniówki gładkiej [51]. Endotelina-1 działa przede wszystkim za pośrednictwem receptorów typu A. Podkreśla się, że ET-1 współdziała z innymi substancjami o działaniu naczyniozwiążającym, przede wszystkim z angiotensyną II [52–54].

Cząsteczki adhezyjne i inne czynniki humoralne regulujące funkcję śródbłonka

Cząsteczki adhezji (międzykomórkowa i naczyniowa) należą do rodziny cząsteczek o budowie podobnej do immunoglobulin i odgrywają znaczącą rolę w adhezji leukocytów [55]. Molekuły adhezyjne podlegają procesowi złączania i dzięki temu mogą być wykrywane we krwi jako formy rozpuszczalne (*s, soluble*). Ulegają ekspresji na powierzchni komórek śródbłonka i leukocytów w odpowiedzi na działanie czynników upośredzających funkcję śródbłonka [56]. W skład rodziny cząsteczek adhezyjnych (CAM, *cellular adhesion molecule*) o budowie podobnej do immunoglobulin wchodzi 32 selektyny oraz integryny β_1 i β_2 [57]. Są to między innymi:

- selektyny (P, L i E);
- cząsteczka przylegania międzykomórkowego-1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*);
- naczyniowa cząsteczka przylegania komórkowego-1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*);
- płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka przylegania komórkowego-1 (PECAM-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*).

Cząsteczki adhezyjne uczestniczą w procesie toczenia się, przylegania i przemieszczania się leukocytów pod błonę wewnętrzną naczynia [58, 59]. Ekspresja CAM jest regulowana przez cytokiny o działaniu prozapalnym [60–62]. Cząsteczki takie jak VCAM-1, selektyny CD62E i CD62P są obecne wyłącznie na aktywowanych komórkach śródbłonka. Cząsteczka ICAM-1 występuje dodatkowo na takich komórkach jak: histiocyty, komórki dendrytyczne i fibroblasty. Natomiast integryna β_1 jest obecna również w macierzy międzykomórkowej [63, 64] oraz w sarkolemie regenerujących się miocytów mięśni szkieletowych [65, 66].

Cytokiny stanowią grupę związków zaangażowanych w kontrolę oraz modulację procesu zapalnego. Główną interleukiną o działaniu prozapalnym jest IL-1 β . Syntetyzowana przez makrofagi aktywuje limfocyty do czynnej regulacji zapalenia poprzez stymulację tworzenia kolejnych cytokin, w tym IL-6,

która z kolei zwiększa syntezę białka C-reaktywnego (CRP) w wątrobie [67]. Interleukina-1 β działa na komórki mięśniówki gładkiej, prowadząc do wzmożonej odpowiedzi z ich strony na czynniki wzrostu i proliferacji [68]. Przeciwną funkcję pełni IL-10, która hamuje uwalnianie prozapalnych cytokin z aktywowanych makrofagów i limfocytów [69].

Streszczenie

Śródbłonek uważany jest obecnie za narząd wydzielania wewnętrznego o bardzo dużej aktywności. Precyzyjnie regulowana równowaga pomiędzy pochodzącymi ze śródbłonka czynnikami o działaniu rozszerzającym i zwężającym jest istotą homeostazy naczyniowej. Spośród czynników naczynioaktywnych utrzymujących homeostazę naczyniową kluczową rolę odgrywają tlenek azotu oraz endotelina-1. Badanie funkcji śródbłonka może się opierać na ocenie rozszerzalności tętnic w badanym łożysku naczyniowym (krążeniu wieńcowym lub obwodowym) oraz określaniu stężeń krążących wskaźników funkcji śródbłonka i miejscowego stanu zapalnego toczonego się w naczyniach.

słowa kluczowe: śródbłonek, czynniki humoralne, rozszerzenie naczynia zależne od przepływu

Naciśnienie Tętnicze 2005, tom 9, nr 4, strony 294–300.

Piśmiennictwo

1. Douglas P., Moorhead G., Hong Y., Morrice N., McKintosh C. Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea Oleracea* leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase. *Planta* 1998; 206: 435–442.
2. Redl H. The endothelium as an immune organ: active player or passive target? W: Marshall J.C., Cohen J. (red.). *Immune response in the critically ill*. Springer, Heidelberg 1999.
3. Verma S., Arikawa E., Lee S., Dumont A.S., Yao L., McNeill J.H. Exaggerated coronary reactivity to endothelin-1 in diabetes: reversal with bosentan. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2002; 80: 980–986.
4. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–376.
5. Gibbons G.H., Dzau V.J. Angiotensin converting enzyme inhibition and vascular hypertrophy in hypertension. *Cardiovasc. Drugs Therap.* 1990; 4: 237–242.
6. Prasad A., Halcox J.P., Waclawiw M.A., Quyyumi A.A. Angiotensin type 1 receptor antagonism reverses abnormal coronary vasomotion in atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 1089–1095.
7. Traupe T., Ortmann J., Munter K., Barton M. Endothelial therapy of atherosclerosis and its risk factors. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2003; 1: 111–121.
8. Anderson T.J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34: 631–638.

9. Farouque H.M., Meredith I.T. The assessment of endothelial function in humans. *Coron. Artery Dis.* 2001; 12: 445–454.
10. Agewall S. Is impaired flow-mediated dilatation of the brachial artery a cardiovascular risk factor? *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2003; 1: 107–109.
11. Anderson T.J., Meredith I.T., Yeung A.C., Frei B., Selwyn A.P., Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 488–493.
12. Anderson T.J., Uehata A., Gerhard M.D. i wsp. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995; 26: 1235–1241.
13. Li L.J., Geng S.R., Yu C.M. Endothelial dysfunction in normotensive Chinese with a family history of essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 2005; 27: 1–8.
14. Laroia S.T., Ganti A.K., Laroia A.T., Tendulkar K.K. Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. *Int. J. Cardiol.* 2003; 88: 1–9.
15. Mather K.J., Anderson T.J., Verma S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J. Vasc. Res.* 2001; 38: 415–422.
16. Gryglewski R. Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii za rok 1998. *Medycyna Praktyczna* 1998; 12: 15–20.
17. Levin E.R. Endothelins. *N. Engl. J. Med.* 1995; 323: 356–363.
18. Toporsian M., Govindaraju K., Nagi M., Eidelman D., Thibault G., Ward M.E. Down regulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia *in vivo*. *Circ. Res.* 2000; 86: 671–675.
19. Vaziri N.D., Ni Z., Oveis F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 1248–1254.
20. Wang X.Q., Vaziri N.D. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* 1999; 33: 894–899.
21. Ramchandra R., Barrett C.J., Malpas S.C. Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32: 440–446.
22. Tsoukias N.M., Popel A.S. A model of nitric oxide capillary exchange. *Microcirculation* 2003; 10: 479–495.
23. Vanhoutte P.M. Endothelial adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001; 38: 796–808.
24. Vanhoutte P.M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 23–35.
25. Moncada S. The L-Arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 1992; 145: 201–227.
26. Ohlstein E.H., Elliott J.D., Feuerstein G.Z., Ruffolo R.R. Jr. Endothelin receptors: receptor classification, novel receptor antagonists, and potential therapeutic targets. *Med. Res. Rev.* 1996; 16: 365–390.
27. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A. i wsp. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527–3561.
28. Bank N., Aynedjian H.S., Khan G.A. Mechanism of vasoconstriction induced by chronic inhibition of nitric oxide in rats. *Hypertension* 1994; 24: 322–328.
29. Laufs U., La Fata V., Plutzky J., Liao J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129–1135.
30. Buga G.M., Griscavage J.M. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ. Res.* 1993; 73: 808–812.
31. Vaziri N.D., Liang K., Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* 1999; 56: 1492–1499.
32. Speyer C.L., Neff T.A., Warner R.L. i wsp. Regulatory effects of iNOS on acute lung inflammatory responses in mice. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 2319–2328.
33. Marcinkiewicz J. Biologiczna rola tlenu azotu w układzie odpornościowym. *Immunol. Pol.* 1992; 17: 45–52.
34. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 54: 469–487.
35. Stein B., Eschenhagen T., Rudiger J., Scholz H., Forstermann U., Gath I. Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 32: 1179–1186.
36. Frew J.D., Paisley K., Martin W. Selective inhibition of basal but not agonist-stimulated activity of nitric oxide in rat aorta by NG-monomethyl-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110: 1003–1008.
37. Tabrizchi R., Triggle C.R. Actions of L- and D-arginine and NG-monomethyl-L-arginine on the blood pressure of pithed normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 1992; 14: 527–546.
38. Higashi Y., Chayama K., Yoshizumi M. Angiotensin II type I receptor blocker and endothelial function in humans: role of nitric oxide and oxidative stress. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.* 2005; 3: 133–148.
39. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87: 1620–1624.
40. Beckman J.S., Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: 1424–1437.
41. Cannon R.O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry* 1998; 44: 1809–1819.
42. Jen C.J., Jhiang S.J., Chen H.I. Cellular response to mechanical stress. Invited Review: effects of flow on vascular endothelial intracellular calcium signaling of rat aortas *ex vivo*. *J. Appl. Physiol.* 2000; 89: 1657–1669.
43. Schiffrin E.L., Deng L.Y., Sventek P., Day R. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J. Hypertens.* 1997; 15: 57–63.
44. Vanhoutte P.M. Is endothelin involved in the pathogenesis of hypertension? *Hypertension* 1993; 21: 741–751.
45. Moore K. Endothelin and vascular function in liver disease. *Gut* 2004; 53: 159–161.
46. Janas J., Sitkiewicz D., Januszewicz A., Szcześniak C., Grenda R., Janas R.M. Endothelin-1 inactivating peptidase in the human kidney and urine. *J. Hypertens.* 2000; 18: 475–483.
47. Głowińska B., Urban M., Hryniewicz A., Peczyńska J., Florys B., Al-Hwish M. Endothelin-1 plasma concentration in children and adolescents with atherogenic risk factors. *Kardiologia Pol.* 2004; 61: 329–338.
48. Sitkiewicz D. Parakryny układ endothelin. *Patofizjologia i znaczenie kliniczne*. W: Januszewicz A. (red.). *Nadciśnienie Tętnicze*. Medycyna Praktyczna, Kraków 2000.
49. Boulanger C., Lüscher T.F. Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 587–590.
50. Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730–732.

51. Nava E., Luscher T.F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypertens. Suppl.* 1995; 13: 39–48.
52. Januszewicz A., Lon S., Łapiński M., Styś A. Effect of endothelin-3 on blood pressure in conscious spontaneously hypertensive [SHR] and DOCA-salt hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 1994; 45: 105–119.
53. Januszewicz A., Łapiński M., Symonides B. i wsp. Elevated endothelin-1 plasma concentration in patients with essential hypertension. *J. Cardiovasc. Risk* 1994; 1: 81–85.
54. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S. i wsp. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411–415.
55. Saku K., Zhang B., Ohta T., Shirai K., Tsuchiya Y., Arakawa K. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with angiographically defined coronary atherosclerosis. *Jpn. Circ. J.* 1999; 63: 19–24.
56. Muro S., Gajewski C., Koval M., Muzykantov V.R. ICAM-1 recycling in endothelial cells: a novel pathway for sustained intracellular delivery and prolonged effects of drugs. *Blood* 2005; 105: 650–658.
57. Noutsias M., Seeberg B., Schultheiss H.P., Kühl U. Cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99: 2124–2131.
58. Hershkoviz R., Miron S., Cahalon L., Lider O. The beta 1-integrin (CD29) receptors: mediators of T lymphocyte-extracellular matrix recognition that affect adhesion, activation and lymphokine secretion. *Isr. J. Med. Sci.* 1993; 29: 321–325.
59. Hillyer P., Mordelet E., Flynn G., Male D. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 134: 431–441.
60. Libby P., Ridker P.M. Novel inflammatory markers of coronary risk. *Circulation* 1999; 100: 1148–1150.
61. Noguchi T., Tsujisaki M., Imai K. i wsp. Relationship among risk factors of atherosclerosis, leukocyte count, and soluble intercellular adhesion molecule-1. *Intern. Med.* 1998; 37: 123–126.
62. Ridker P.M., Buring J.E., Shih J., Matias M. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998; 98: 731–733.
63. Delcommenne M., Streuli C.H. Control of integrin expression by extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 26794–26801.
64. Gabalawy H., Wilkins J. Beta-1 (CD29) integrin expression in rheumatoid synovial membranes: an immunohistologic study of distribution patterns. *J. Rheumatol.* 1993; 20: 231–237.
65. Hurme T., Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1992; 24: 197–205.
66. Hurme T., Kalimo H. Adhesion in skeletal muscle during regeneration. *Muscle Nerve* 1992; 15: 482–489.
67. Fernandez-Real J.M., Vayreda M., Richart C. i wsp. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 1154–1159.
68. Norioka K., Hara M., Harigai M. i wsp. Pretreatment of human vascular smooth muscle cells with interleukin-1 enhances interleukin-6 production and cell proliferation. *Autoimmunity* 1990; 7: 41–50.
69. Tedgui A., Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ. Res.* 2001; 88: 877–887.