

Funzione endoteliale quale marker di aterosclerosi subclinica: metodiche di valutazione ed applicazioni cliniche

Endothelial function as a marker of pre-clinical atherosclerosis: assessment techniques and clinical implications

Donatella Ruggiero, Stefania Paolillo, Giuseppe Della Ratta, Antonio Mariniello, Tiziana Formisano, Angela Maria Pellegrino, Pasquale Perrone Filardi

ABSTRACT: *Endothelial function as a marker of pre-clinical atherosclerosis: assessment techniques and clinical implications. D. Ruggiero, S. Paolillo, G. Della Ratta, A. Mariniello, T. Formisano, A.M. Pellegrino, P. Perrone Filardi.*

Endothelium plays a key role in maintenance of vascular homeostasis. Cardiovascular risk factors promote development of endothelial dysfunction, characterized by increased vasoconstriction and by procoagulant/pro-inflammatory endothelial activities. In coronary artery, endothelium-dependent dilation improves blood flow, while the occurrence of endothelial dysfunction reduces myocardial perfusion, so new methods have been developed for assessment of endothelial function in coronary and peripheral arteries. The quantitative angiography with intracoronary infusion of acetylcholine remains the "gold standard" to assess the endothelium-dependent vasodilatation. The use of this technique is restricted to patients who have a clinical indication for coronary angiography, so new imaging methods have been considered for non-invasive diagnosis of coronary microvascular disease, such as

magnetic resonance imaging phase contrast and positron emission tomography. The advent of new techniques has facilitated testing of endothelial dysfunction in peripheral arteries with non-invasive methods. This review presents available in-vivo and ex-vivo methods for evaluating endothelial function with special focus on more recent ones. The diagnostic tools include local vasodilatation by venous occlusion plethysmography and assessment of flow-mediated dilatation, arterial pulse wave analysis and pulse amplitude tonometry, laser Doppler flowmetry. The possibility to detect endothelial dysfunction as an early marker of atherosclerosis makes these instruments useful for early stratification of patients at risk for cardiovascular events. Aim of this review is to summarize the characteristics of non-invasive assessment of endothelial function in order to optimize cardiovascular risk management.

Keywords: coronary atherosclerosis, endothelial dysfunction, endothelium, nitric oxide.

Monaldi Arch Chest Dis 2013; 80: 106-110.

Department of Advanced Biomedical Sciences, Division of Cardiology, Federico II University, Naples, Italy.

Corresponding author: Prof. Pasquale Perrone Filardi; Via Pansini 5, I-80131 Naples, Italy; Phone/Fax +39 081 746 22 24, E-mail address: fpperron@unina.it

La funzione endoteliale

L'endotelio non è soltanto un insieme di cellule che funge da barriera tra il sangue e i tessuti circostanti, ma rappresenta un vero e proprio organo con la funzione di modulare la mitogenesi, l'angiogenesi, l'entità del flusso ematico, l'attivazione piastrinica, l'attività infiammatoria, il tono e la permeabilità vasale in risposta a stimoli umorali, nervosi e meccanici [1].

L'endotelio produce innumerevoli sostanze vasodilatatrici, tra le quali l'NO è il più importante, e rilascia fattori con azione vasoconstrictrice, come l'endotelina-1 (ET-1), l'angiotensina II, il trombosano A2 e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) [1]. Le lipoproteine a bassa densità (Low-density Lipoprotein, LDL) ossidate e le particelle derivate dalla degradazione dei chilomicroni e delle lipoproteine a densità molto bassa (Very Low-density Lipoprotein, VLDL) provocano riduzione del NO e aumento della sintesi di ET-1 [2].

Disfunzione endoteliale e patogenesi dell'aterosclerosi

Nel distretto coronarico, la prolungata esposizione ai fattori di rischio CV, provoca una netta riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente oppure una vasoconstrizione paradossa, correlata ad una aumentata azione di ET-1 e ad una ridotta biodisponibilità di NO da parte dei ROS; ne risulta una riduzione del tono vascolare e sviluppo di lesioni aterosclerotiche attraverso meccanismi secondari, quali l'up-regulation di molecole di adesione, la produzione di citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita, l'attivazione piastrinica, l'ossidazione delle LDL e la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari [3].

È stato dimostrato che la disfunzione endoteliale può precedere le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi coronarica verificandosi nelle fasi precoci dell'aterogenesi, perfino prima del riconoscimento angiografico delle lesioni aterosclerotiche [4]. La di-

sfunzione endoteliale può essere considerata un marcatore precoce dell'aterosclerosi, in grado di predire lo sviluppo di coronaropatia e di eventi CV fatali o potenzialmente tali, indipendentemente dalla dimostrazione di lesioni coronariche iniziali.

Valutazione della funzione endoteliale

Il parametro tradizionalmente usato per misurare il grado di funzione dell'endotelio delle arterie coronariche epicardiche è la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente indotta farmacologicamente (acetilcolina, metacolina o papaverina) durante coronarografia, che mostra una costrizione arteriosa paradossa in caso di disfunzione endoteliale [5]. È possibile, in aggiunta, quantificare l'entità della risposta vasodilatatoria a livello coronarico, durante la medesima metodica invasiva, con tecniche più sensibili quali l'ultrasonografia ed il Doppler intracoronarico. Nonostante ciò, negli ultimi anni, diverse metodiche non invasive sono state validate per lo studio della funzione endoteliale, come di seguito descritto.

Tomografia ad emissione di positroni (PET) e risonanza magnetica nucleare (RMN)

La PET ha la capacità di effettuare sia una valutazione quantitativa della perfusione miocardica, sulla base della riserva di flusso coronarico e della funzione endoteliale coronarica microvascolare, che una valutazione qualitativa della vascolarizzazione miocardica, quale significato funzionale della coronaropatia. Attraverso la PET è stata identificata la presenza di disfunzione endoteliale coronarica in condizioni di rischio CV quali iperlipidemia [6], diabete mellito [7] e abuso di tabacco [8]. La riserva di flusso coronarico si riduce in presenza di lesioni arteriose di modesta entità anche quando la perfusione miocardica, valutata a riposo, sembra conservata. Hirsch *et al.* hanno studiato la relazione tra presenza e severità del danno microvascolare, misurato mediante RMN con gadolinio e Doppler intracoronarico, in 27 pazienti con infarto del miocardio acuto dopo 48 h dal trattamento con angioplastica percutanea; lo studio, oltre a dimostrare una correlazione tra impegno microvascolare ed estensione e trasversalità dell'infarto, suggerisce che le variazioni nelle velocità di flusso coronarico al Doppler sono specifiche per aree di danno microvascolare, anche in assenza di infarto, e ben correlano con i dati ottenuti alla RMN [9].

Recente è lo studio di Pedersen *et al.* che ha dimostrato la validità della RMN, con "gadofosveset trisodico", nell'individuare il danno endoteliale e il processo angiogenetico coronarico su modello animale porcino [10].

Pletismografia venosa occlusiva

La pletismografia "strain gauge" venosa occlusiva misura le variazioni volumetriche del tessuto muscolare, conseguenti alle variazioni di perfusione del tessuto stesso, a livello dell'avambraccio (forearm blood flow, FBF) in seguito a gonfiaggio di un bracciale posto prossimalmente all'arto e somministrazione di sostanze vasodilatatrici nell'arteria brachiale (Fig. 1).

Applicazioni cliniche

Heitzer *e coll.* [11] hanno dimostrato, in un gruppo di 218 soggetti con diagnosi angiografica di coronaropatia, che i pazienti con una ridotta risposta vasoreattiva indotta dall'infusione di acetilcolina durante esame pletismografico, avevano un'incidenza maggiore di eventi CV, durante un follow-up di circa 5 anni. In aggiunta Perticone *e coll.* [12] hanno confermato il valore prognostico di una ridotta vasodilatazione acetilcolino-indotta anche in pazienti a basso rischio CV affetti da ipertensione essenziale in fase iniziale e non in trattamento farmacologico, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio. Molti autori hanno riscontrato una buona riproducibilità dei dati e ritengono la metodica valida e promettente per la valutazione della funzione vascolare.

Analisi dell'onda pulsata

Una metodica particolarmente indicata per la valutazione della rigidità arteriosa è l'analisi dell'onda pulsata (pulse wave analysis, PWA). La rigidità arteriosa è parzialmente dipendente dal tono vasale ed un suo incremento è considerato un fattore di rischio CV indipendente e un indice di aterosclerosi subclinica.

Applicazioni cliniche

L'Augmentation Index (AI, rapporto in percento tra l'onda riflessa sistolica meno l'onda diretta sistolica e la pressione di polso espresso in percento) è il parametro di riferimento utilizzato nell'analisi dell'onda pulsata, come surrogato dell'entità della rigidità arteriosa e marker della funzione endoteliale. Un aumento dell'AI sembra ben correlare con la riduzione dei valori di dilatazione flusso-mediata (flow mediated dilation, FMD). Inoltre la metodica ha confermato le storiche correlazioni tra disfunzione endoteliale e diabete, ipercolesterolemia, coronaropatia, arteriopatía vascolare periferica e artrite reumatoide [13].

Dilatazione flusso mediata

Per la valutazione della funzione endoteliale è stata standardizzata mediante linee guida lo studio ecografico dell'FMD dell'arteria brachiale (brachial artery ultrasound system, BAUS). Tale metodica sfrutta l'aumento della forza tangenziale sulla parete

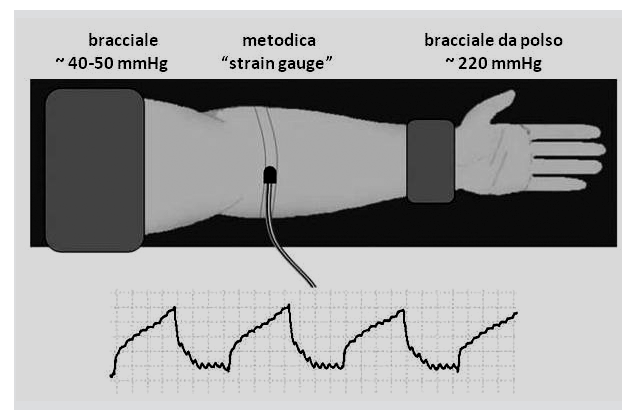


Figura 1. - Rappresentazione della metodica pletismografica "strain gauge" venosa occlusiva.

vascolare in corso di iperemia (shear stress) che determina rilascio endoteliale di NO; la risposta vasodilatatoria può essere considerata come un indice della funzione vasomotoria (Fig. 2).

Applicazioni cliniche

Heitzer *et al.* [11] hanno osservato che, nei soggetti con patologia coronarica, una ridotta risposta dilatatoria dell'arteria brachiale all'infusione intra-arteriosa di acetilcolina è un predittore indipendente di eventi CV. Neunteufl *et al.* [14] in un recente studio hanno valutato la funzione endoteliale mediante metodica FMD in un gruppo di pazienti sintomatici per angina e sottoposti a studio coronarografico, dimostrando un maggiore ricorso a procedure di rivascularizzazione miocardica (BPAC e PTCA) nei soggetti che presentavano compromissione dell'FMD (cut-off del 10%). Infine, il gruppo di Gocke [15] ha arruolato pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia vascolare periferica, dimostrando che un alterata FMD può essere considerata predittore di eventi coronarici durante follow-up a lungo termine.

Perticone *et al.* [12] hanno evidenziato la comparsa di maggior numero di eventi in soggetti ipertesi con alterata risposta all'acetilcolina. Perrone Filardi *et al.* [16] in uno studio su 44 pazienti affetti da arteriopatía periferica, ma asintomatici per ischemia coronarica, hanno dimostrato la stretta correlazione esistente tra FMD e danno aterosclerotico coronarico valutato mediante scintigrafia miocardica a riposo e dopo stress farmacologico (dipiridamolo); tale dato concorda perfettamente con quanto già dimostrato nel 2001 da Kuvín *et al.* [17], secondo il quale pazienti ad elevato rischio CV, ma conservata dilatazione flusso-mediata, mostrano un'elevata prevalenza di risultati negativi ai test di imaging CV con stress fisico. Recentemente, lo studio dal-VESSEL, in pazienti con malattia coronarica o con rischio CV equivalente e bassi livelli di colesterolo HDL, trattati con dalcetrapib, un inibitore della proteina trasportatrice di esteri del colesterolo, che determina aumento delle HDL, ha utilizzato come endpoint principale la valutazione della funzione endoteliale tramite FMD [18].

Tonometria arteriosa periferica

La tonometria arteriosa periferica (Peripheral Arterial Tonometry, PAT) è una nuova e promettente

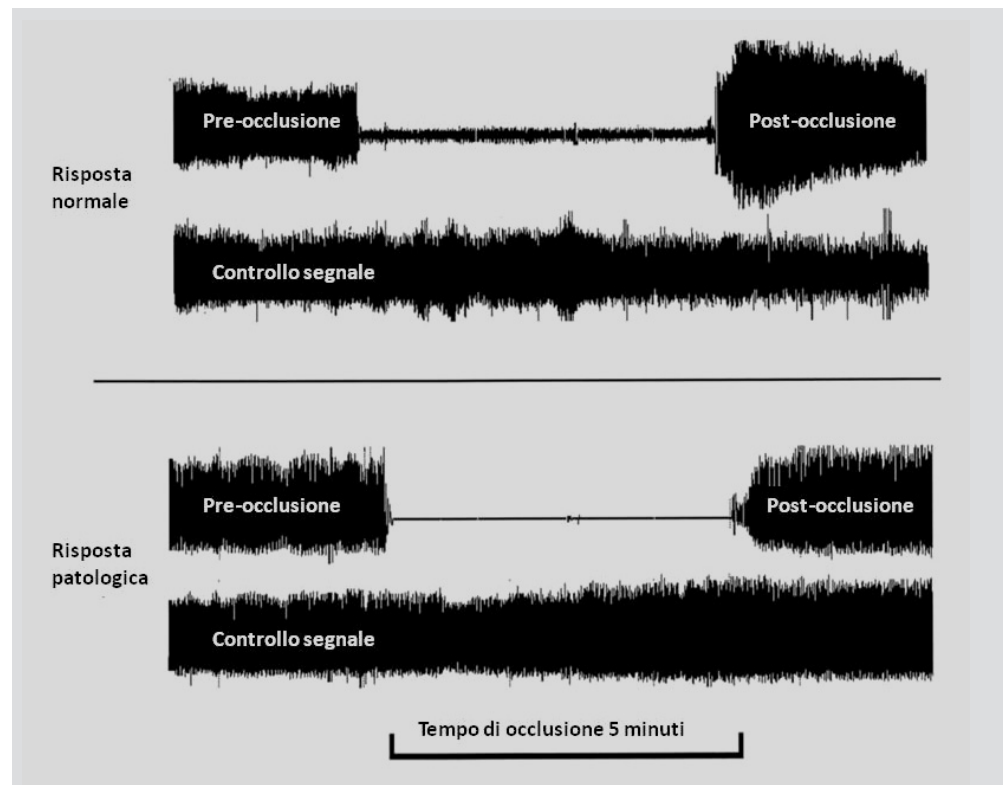


Figura 2. - Rappresentazione dello studio ecografico della FMD brachiale. (a) Un morsetto è utilizzato per tenere la sonda ecografica. Il bracciale è posizionata appena sotto il gomito. (b) Il tracciato Doppler mostra il profilo della velocità di flusso durante iperemia reattiva. (c) immagine B-mode dell'arteria brachiale della regione di interesse.

metodica non invasiva per la valutazione della funzione endoteliale, basata sulla registrazione pletismografia dell'ampiezza dell'onda di polso delle arterie digitali durante l'iperemia reattiva (Fig. 3). La misura della iperemia reattiva (Reactive Hyperemia Index, RHI) viene fornita automaticamente dal software del sistema che esegue il rapporto tra la media della ampiezza del segnale dopo e prima l'occlusione, indotta dal manicotto di uno sfigmomanometro, corretta per le variazioni sistemiche del segnale di base.

Applicazioni cliniche

Bonetti *et al.* [19] hanno valutato nei pazienti senza evidenza angiografica di malattia arteriosa coronarica la funzione endotelio-dipendente sia in maniera invasiva con il test all'acetilcolina che in maniera non invasiva con la tecnica PAT, ed hanno dimostrato una riduzione dell'indice di iperemia reattiva nei pazienti con disfunzione endoteliale coronarica. La risposta iperemica, come dimostrato dallo studio di Framingham, è ridotta in presenza di fattori di rischio CV [20]. Lo studio di Gargiulo *et al.* ha valutato la funzione endoteliale in pazienti diabetici con coronarie indenni confrontati con pazienti diabetici e coronaropatici e pazienti non diabetici con e senza malattia coronarica dimostrando valori di RHI più bassi nei pazienti diabetici indipendentemente dalla presenza di coronaropatia [21]. Più recentemente, Rubinstein *et al.* [22] hanno dimostrato che la disfunzione endoteliale, identificata con metodica PAT, è in grado di predire eventi CV indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio CV o coesistenza di cardiopatia ischemica.

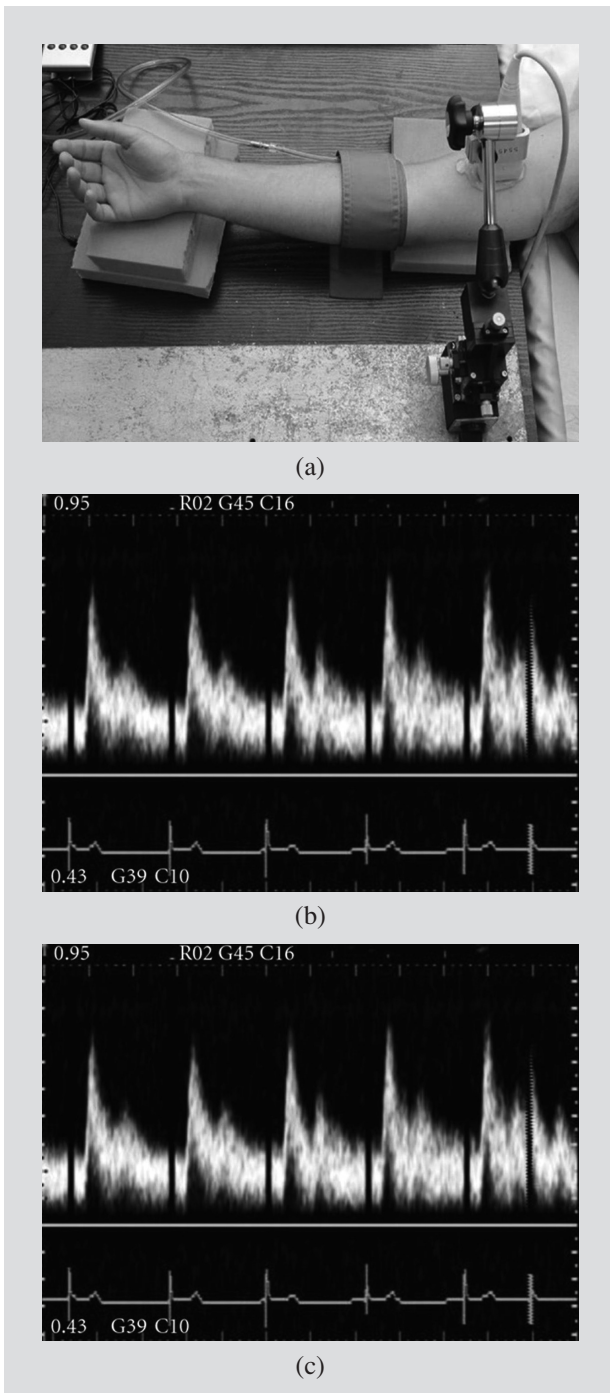


Figura 3. - Ampiezza del segnale PAT registrato durante la fase di iperafflusso arterioso e in condizioni basali.

Flussimetria Laser Doppler

Tra le differenti metodiche, assume particolare interesse la flussimetria Laser Doppler (Laser Doppler Flussimetry, LDF) associata alla ionoforesi. La tecnica permette il monitoraggio del microcircolo cutaneo e i risultati ottenuti sono interpretati come surrogato del funzionamento endoteliale anche in altri distretti vascolari.

Applicazioni cliniche

La metodica con uso di acetilcolina presenta risultati alterati in alcune condizioni patologiche quali la sindrome da apnea ostruttiva del sonno, l'obesità o il diabete, l'ipercolesterolemia o l'ipertensione, anche in assenza di lesioni macrovascolari.

Negli ultimi anni la LDF è stata utilizzata per valutare le anomalie della perfusione retinica; la retinopatia e la dilatazione venulare retinica sembrano associate alla presenza di aterosclerosi in differenti distretti. I cambiamenti di calibro delle arterie retiniche sono predittivi di morbilità e mortalità CV, anche se questa associazione sembra più significativa nelle donne, nei soggetti di età inferiore ai 75 anni e nei diabetici [23]. Altri parametri di riferimento per valutazione del microcircolo retinico mediante LDF, come il rapporto parete/lume delle arteriole retiniche, sono attualmente in esame e probabilmente aiuteranno a chiarire ulteriormente queste correlazioni.

Conclusioni e prospettive future

L'FMD dell'arteria brachiale costituisce la tecnica di scelta per lo studio non invasivo della funzione endoteliale e rappresenta il gold standard per la ricerca sulla funzione dell'endotelio in fisiopatologia CV, nonostante sia operatore-dipendente. La PAT, semplice da effettuare e non operatore-dipendente fornisce buoni risultati in termini di accuratezza diagnostica e correlazione dei dati ottenuti con la stessa FMD. Scarsa applicazione al momento hanno nella pratica clinica la PET e la RMN, in quanto gravate da elevati costi e non facilmente reperibili in diversi sistemi sanitari, così come scarsa applicazione hanno al momento la LDF, la PWA e la pletismografia venosa oclusiva, per mancanza di protocolli standardizzati e di dati clinici forti che ne supportino l'utilizzo nella pratica clinica. Si rendono necessari studi di confronto tra le varie metodiche, per definire i gruppi che ne possono trarre i maggiori vantaggi e identificare l'eventuale beneficio clinico in termini di prevenzione di eventi CV.

Riassunto

L'endotelio è il principale organo deputato al mantenimento dell'omeostasi vascolare. I fattori di rischio cardiovascolare favoriscono lo sviluppo di disfunzione endoteliale, caratterizzata da una vaso-costrizione inappropriata e da un'attività pro-coagulante e pro-infiammatoria dell'endotelio. Nel distretto coronarico la dilatazione endotelio-dipendente è responsabile dell'incremento del flusso ematico, mentre una sua compromissione provoca una ridotta perfusione cardiaca, pertanto sono state sviluppate metodiche in grado di valutare la funzione endoteliale a livello coronarico e nei territori vascolari periferici. L'angiografia quantitativa con infusione intracoronarica di acetilcolina è il "gold standard" nella quantificazione della risposta vasodilatatoria endotelio-dipendente. L'impiego di questa tecnica, sebbene valida, è ristretto ai pazienti che hanno una indicazione clinica all'esecuzione di una coronarografia e pertanto nuove metodiche di imaging non invasive sono state considerate per diagnosticare la patologia microvascolare coronarica. Di queste ne sono un esempio la risonanza magnetica cardiaca e la tomografia ad emissione di positroni. In aggiunta, la pletismografia venosa oclusiva, lo studio della dilatazione flusso-mediata, l'analisi dell'onda pulsata, la flussimetria laser-

Doppler e la tonometria arteriosa periferica sono state negli ultimi anni proposte e validate per lo studio della funzione endoteliale. La possibilità di identificare la disfunzione endoteliale come marcatore precoce dell'aterosclerosi e predittore dello sviluppo di coronaropatia, rende questi strumenti utili per la stratificazione precoce dei pazienti a rischio di eventi cardiovascolari. Obiettivo di tale revisione è quello di illustrare i chiarire le metodiche di valutazione della funzione endoteliale al fine di ottimizzare il management diagnostico del rischio cardiovascolare.

Parole chiave: aterosclerosi coronarica, disfunzione endoteliale, endotelio, ossido nitrico.

ABBREVIAZIONI

BPAC = bypass aorto-coronarico
 cGMP = guanosina monofosfato ciclica intracellulare
 CV = cardiovascolare
 EDRF = fattore di rilascio endotelio-derivato
 EDH = fattore iperpolarizzante endotelio-derivato
 eNOS = NO sintasi
 FBF = flusso ematico dell'avambraccio
 FMD = dilatazione flusso-mediata
 LDF = flussimetria laser Doppler
 LDL = lipoproteine a bassa densità
 NO = ossido nitrico
 PAT = tonometria arteriosa periferica
 PET = tomografia ad emissione di positroni
 PTCA = angioplastica coronarica percutanea
 PWA = analisi dell'onda pulsata
 RMN = risonanza magnetica cardiaca
 ROS = specie reattive dell'ossigeno
 RHI = indice di iperemia reattiva
 VLDL = lipoproteine a densità molto bassa

Bibliografia

- Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 (suppl 2) : S3-S6.
- Inoue T, Saniabadi AR, Matsunaga R, Hoshi K, Yaguchi I, Morooka S. Impaired endothelium-dependent acetylcholine-induced coronary artery relaxation in patients with high serum remnant lipoprotein particles. *Atherosclerosis* 1998; 139: 363-7.
- Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002; 105: 546-9.
- Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, *et al.* Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002 Aug 6; 106 (6): 653-8.
- Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 2003; 108: 2054-2059.
- Pitkänen OP, Nuutila P, Raitakari OT, *et al.* Coronary flow reserve in young men with familial combined hyperlipidemia. *Circulation* 1999 Apr 6; 99 (13): 1678-84.
- Yokoyama I, Momomura S, Ohtake T, *et al.* Reduced myocardial flow reserve in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1997 Nov 15; 30 (6): 1472-7.
- Campisi R, Czernin J, Schöder H, *et al.* Effects of long-term smoking on myocardial blood flow, coronary vasomotion, and vasodilator capacity. *Circulation* 1998 Jul 14; 98 (2): 119-25.
- Hirsch A, Nijveldt R, Haeck JD, *et al.* Relation between the assessment of microvascular injury by cardiovascular magnetic resonance and coronary Doppler flow velocity measurements in patients with acute anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008 Jun 10; 51 (23): 2230-8.
- Pedersen SF, Thrysoe SA, Paaske WP *et al.* CMR assessment of endothelial damage and angiogenesis in porcine coronary arteries using gadofosveset. *J Cardiovasc Magn Reson* 2011 Jan 26; 13: 10.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2003 Jul 29; 108 (4): 500.
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, *et al.* Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104: 191-6.
- Hayward CS, Kraidly M, Webb CM, Collins P. Assessment of endothelial function using peripheral waveform analysis: a clinical application. *J Am Coll Cardiol* 2002 Aug 7; 40 (3): 521-8.
- Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, *et al.* Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol* 2000; 86: 207-10.
- Gocke N, Keaney J, Hunter LM, *et al.* 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.
- Perrone-Filardi, Cuocolo A, Brevetti G, *et al.* Relation of brachial artery flow-mediated vasodilation to significant coronary artery disease in patients with peripheral arterial disease. *Am J Cardiol* 2005; 96: 1337-41.
- Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, *et al.* Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001 38: 1843-9.
- Kastelein JJ, Duivenvoorden R, Deanfield J, *et al.* Rationale and design of dal-VESSEL: a study to assess the safety and efficacy of dalcetrapib on endothelial function using brachial artery flow-mediated vasodilatation. *Curr Med Res Opin* 2011 Jan; 27 (1): 141-150.
- Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes Jr DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44 (11): 2137-41.
- Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, *et al.* Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008 May 13; 117 (19): 2467-74.
- Gargiulo P, Marciano C, Savarese G, *et al.* endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with normal coronary arteries. A digital resctive hyperemia study. *Int J Cardiol* 2011 August 16. (Epub ahead of print).
- Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, *et al.* Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010; 31 (9): 1142-8.
- Faglia E, Favales F, Calia P, *et al.* Cardiac events in 735 type 2 diabetic patients who underwent screening for unknown asymptomatic coronary heart disease: 5-year follow-up report from the Milan Study on Atherosclerosis and Diabetes (MiSAD). *Diabetes Care* 2002; 25: 2032-6.