

# La Valutazione Non Invasiva della Funzione Endoteliale: Tecnica e Ruolo nella Stratificazione del Rischio Cardiovascolare

**Pasquale Guarini\***, **Manlio Coccozza\*\***, **Andrea Zuffi\*\*\***, **Silvio Perrotta\*\*\*\***, **Carmela Saulino\*\*\*\***, **Giancarlo Scognamiglio\***, **Michele Damiano\***, **Michele Ferrara\***, **Mario De Michele\*\*\*\*\***

\* *Divisione di Cardiologia con UTIC - Ospedale Villa dei Fiori - Acerra (NA)*

\*\* *Divisione di Cardiologia - Clinica Sanatrix - Napoli*

\*\*\* *Divisione di Cardiologia - Istituto Clinico Gavazzeni - Bergamo*

\*\*\*\* *Divisione di Cardiologia con UTIC - Ospedale Ascalesi - Napoli*

\*\*\*\*\* *Divisione di Cardiologia con UTIC - Ospedale S.G. Moscati - Aversa (NA)*

## Riassunto

L'introduzione all'inizio degli anni '90 di un metodo basato sulla ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione ha costituito un reale passo in avanti nella valutazione non invasiva della funzione endoteliale.

Questo metodo misura cambiamenti nel diametro dell'arteria brachiale, indotti da un incremento del flusso sanguigno e conseguentemente dello shear stress, che costituisce il principale stimolo per il rilascio di ossido nitrico da parte delle cellule endoteliali. Una ridotta reattività dell'arteria brachiale è stata dimostrata in un gran numero di soggetti con fattori di rischio cardiovascolare.

## Summary

The introduction to the beginning of years '90 of a method based on the B-mode high resolution sonography has constituted a real step in ahead in the not invasive appraisal of the endothelial function. This method measure changes in the diameter of the brachial artery, induced from an increment of the blood flow and consequently of shear stress, that it constitutes the main stimulus for the release of nitric oxide from part of the endothelial cells.

A reduced reactivity of the brachial artery has been demonstrated in a great number of subjects with factors of cardiovascular risk.

**Parole chiave:** Funzione endoteliale, Rischio cardiovascolare

**Key words:** Endothelial function, Cardiovascular risk

L'introduzione all'inizio degli anni '90 di un metodo basato sulla ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione ha costituito un reale passo in avanti nella valutazione non invasiva della funzione endoteliale<sup>1</sup>.

Questo metodo misura cambiamenti nel diametro dell'arteria brachiale, indotti da un incremento del flusso sanguigno e conseguentemente dello shear stress (iperemia reattiva), che costituisce il principale stimolo per il rilascio di ossido nitrico (NO) da parte delle cellule endoteliali.

Una alterata reattività a livello dell'arteria brachiale (BAR) riflette una alterata funzione endoteliale coronarica e può essere utilizzata, quindi, come marker di disfunzione endoteliale sistemica<sup>2</sup>.

## Valutazione della reattività dell'arteria brachiale. Tecnica ultrasonografica

Recentemente sono state pubblicate linee guida per la valutazione ultrasonografica della BAR<sup>3</sup>.

Ai pazienti viene chiesto di essere a digiuno, di evitare il consumo di alcol e caffè, di astenersi dal fumare e da ogni attività fisica intensa per almeno due ore prima dell'esame.

L'ecografo utilizzato deve possedere una sonda vascolare con un limite di risoluzione assiale di circa 0.3 mm.

I parametri operativi dell'apparecchio vengono mantenuti costanti durante l'esame. Un 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, biforcazione) 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>4</sup>.

Per mantenere il trasduttore nella stessa posizione nel corso dello studio può essere adoperato un reggisonda meccanico. Una registrazione basale del diametro e del flusso sanguigno brachiale viene effettuata.

Per ottenere un incremento del flusso sanguigno e

quindi dello shear stress (iperemia reattiva), lo stimolo per il rilascio di NO, un manico per la pressione viene posto intorno all'arto in esame e gonfiato ad una pressione di 50 mmHg superiore alla pressione sistolica per 4,5-5 minuti, e poi sgonfiato improvvisamente (Fig. 1). È stato dimostrato che la posizione del manico (prossimale o distale) non è importante nel determinare la risposta vasodilatatoria dell'arteria brachiale, mentre la durata dell'occlusione rappresenta un fattore determinante<sup>5,6</sup>.

Una occlusione inferiore a 4,5-5 minuti non è in grado di determinare una vasodilatazione massimale, mentre una occlusione superiore ai 5 minuti non apporta alcun vantaggio in termini di vasodilatazione. Il flusso

sanguigno nell'arteria brachiale viene registrato per 10 secondi prima e 15 secondi dopo lo sgonfiaggio del manico 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 minuti dopo sgonfiaggio del manico per valutare adeguatamente la reattività brachiale<sup>7</sup>. Le misurazioni vengono effettuate off-line. In letteratura è stato riportato un flusso basale nell'arteria brachiale variabile da  $84 \pm 26$  a  $140 \pm 102$  ml/min. L'aumento di flusso sanguigno post-occlusione viene calcolato per assicurarsi che lo stimolo per il rilascio di NO sia adeguato in tutti i soggetti in esami. Generalmente l'incremento varia dal 600% al 1000%. Le modifiche di diametro dell'arteria brachiale vengono misurate, comunemente, come cambiamenti percentuali rispetto al diametro basale (Fig. 2). Il diametro esterno dell'arteria viene preso al picco dell'onda R, o alternativamente in corrispondenza dell'onda T, che nell'arteria brachiale dovrebbe corrispondere alla massima distensione. La scelta di misurare il 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". Celermajer e coll. hanno valutato l'accuratezza e la riproducibilità del metodo in "arterie fantoccio" ed in vivo<sup>8</sup>. 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 3.8% per il diametro basale e 2.3% per il diametro durante iperemia reattiva.

ne endoteliale in un gran numero di soggetti con aterosclerosi già manifesta o fattori di rischio cardiovascolare.

È ormai chiaro che la disfunzione endoteliale è un evento chiave nelle fasi iniziali ed avanzate del **processo aterosclerotico**<sup>9,10</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 vasocostrittrici. Le conseguenze di queste modificazioni funzionali predispongono alla 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.

Gaeta et al. hanno dimostrato una ridotta BAR ed un aumentato spessore medio-intimale carotideo in un campione di soggetti giovani che avevano come unico fattore di rischio cardiovascolare una **storia familiare di malattia coronarica prematura**<sup>11</sup>. I risultati di questo studio suggeriscono una diretta influenza genetica sulla funzione arteriosa, i cui effetti potrebbero essere rilevanti per il successivo sviluppo del processo aterosclerotico.

L'**invecchiamento** si associa con una progressiva disfunzione endoteliale in soggetti senza altri fattori di rischio cardiovascolare<sup>12</sup>. I meccanismi con cui l'invecchiamento altera la funzione endoteliale includono una ridotta produzione di sostanze vasodilatatrici, un aumentato catabolismo di tali sostanze o un maggiore rilascio di sostanze vasocostrittrici<sup>13</sup>. I cambiamenti associati con l'età si verificano un decennio prima negli uomini rispetto alle donne, anche se il declino nella funzione endoteliale è accelerato in queste ultime al tempo della menopausa.

La differenza legata al sesso si può spiegare con gli effetti protettivi degli **estrogeni** sulla parete arteriosa, in parte dovuti all'aumentata disponibilità di NO<sup>14</sup>. Il ruolo degli ormoni ovarici endogeni sulla funzione endoteliale è stato studiato e soprattutto 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 e vasodilatazione a livello dell'arteria brachiale<sup>15</sup>.

L'**ipercolesterolemia** si associa con una anormale BAR sia in bambini che in adulti, con significative

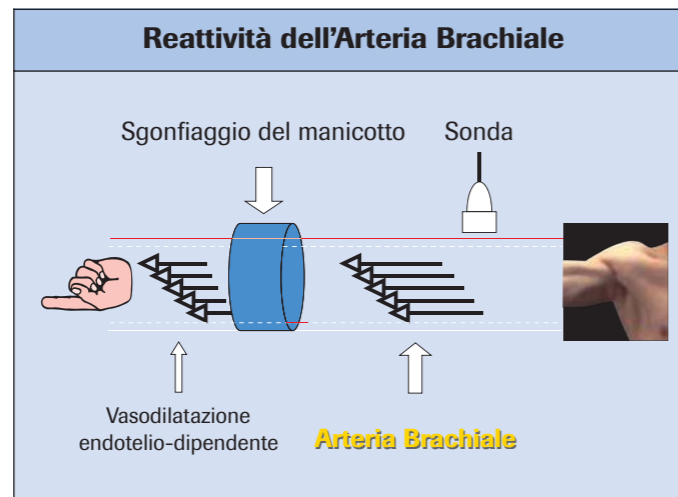


Fig. 1 - Sgonfiaggio del manico per la pressione posto intorno all'arto in esame, incremento del flusso sanguigno e quindi dello shear stress (iperemia reattiva) che costituisce lo stimolo per il rilascio dell'ossido nitrico.

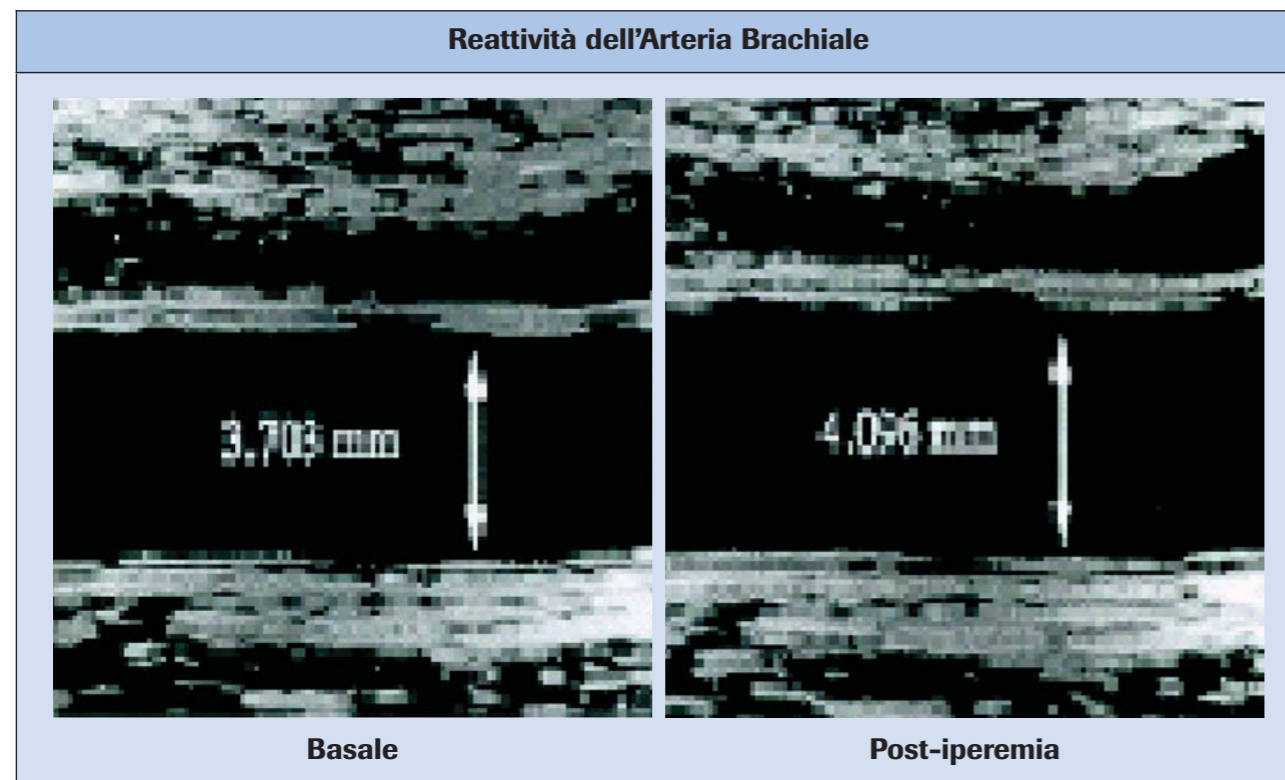


Fig. 2 - Misurazione del diametro dell'arteria brachiale a riposo e post-iperemia.

### Reattività brachiale e rischio cardiovascolare

L'introduzione di un metodo ultrasonografico ha permesso la valutazione non invasiva della funzio-

correlazioni tra livelli di LDL-colesterolo e Lp(a) e vasodilatazione endotelio-dipendente<sup>16,17</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 della ipercolesterolemia. Lo stress ossidativo produce disfunzione endoteliale attraverso 2 processi: modificazione delle LDL e incrementata produzione endoteliale di superossido e di altri radicali liberi dell'ossigeno che inattivano NO.

Il fumo di sigaretta riduce la vasodilatazione endotelio-dipendente 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>18</sup>.

Nel caso del fumo il danno endoteliale è mediato dallo stress ossidativo con formazione di perossidi lipidici che inattivano l'ossido nitrico. Inoltre anche la sintesi di NO è ridotta per la diminuita disponibilità di tetraidrobiopterina, cofattore della NO sintasi<sup>19</sup>.

Due altre interessanti osservazioni sono la dimostrazione di un effetto tossico acuto del fumo di sigaretta sulla BAR, e la presenza di una ridotta reattività brachiale in soggetti sani esposti a "fumo passivo", più o meno dello stesso grado di quella riscontrabile in attivi fumatori<sup>20,21</sup>.

L'esame della funzione endoteliale nei vasi di capacità di soggetti con diabete mellito ha portato a risultati contrastanti<sup>22-25</sup>. Nello studio di Clarkson<sup>22</sup> adulti con diabete insulino-dipendente, ed assenza di malattia aterosclerotica clinicamente evidente, mostravano una diminuita vasodilatazione brachiale, correlata con la durata della malattia e i livelli di LDL-colesterolo.

Una parallela, sebbene meno importante riduzione della vasodilatazione endotelio-indipendente era presente, il che suggerisce anche una ridotta sensibilità delle cellule muscolari lisce all'azione del NO. Enderle e coll.<sup>25</sup> hanno riscontrato invece una conservata BAR in pazienti con diabete insulino-dipendente di lunga durata in buon controllo metabolico, in contrasto con l'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente di pazienti con diabete non insulino-dipendente e complicanze cardiovascolari. I meccanismi attraverso i quali il diabete contribuisce alla disfunzione endoteliale comprendono

una ridotta sintesi ed una incrementata degradazione di NO ad opera dei prodotti avanzati di glicosilazione<sup>26</sup>.

Gli studi ultrasonografici indicano la presenza di una disfunzione endoteliale in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale<sup>27-29</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 una alterazione nella via L-arginina-NO ed inoltre la normalizzazione dei valori pressori mediante terapia non sembra migliorare la funzione endoteliale<sup>30,31</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 con una alterata BAR<sup>32,33</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.

È interessante notare che i fattori di rischio coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi interagiscono nel produrre la disfunzione endoteliale, con un effetto moltiplicativo simile a quello esercitato sul rischio cardiovascolare<sup>34</sup>. In particolare vi è un effetto sinergistico di colesterolo e fumo di sigaretta, dovuto alla capacità del fumo di promuovere l'ossidazione delle LDL<sup>35</sup>.

## Conclusioni

In conclusione, la determinazione con l'ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione della reattività dell'arteria brachiale è un metodo semplice, non invasivo, ed accurato per valutare la funzione endoteliale.

Tale metodo potrebbe essere utilizzato per **identificare soggetti ad alto rischio in prevenzione cardiovascolare**.

La reattività dell'arteria brachiale potrebbe, inoltre, essere utilizzata, come "surrogate end-point" in studi di intervento farmacologico a breve termine ed insieme allo spessore medio intimale carotideo in studi di intervento farmacologico a lungo termine.

## Bibliografia

- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-15.
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al: Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235-1241.
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al: 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;39:257-265.
- Penny WF, Rockman H, Long J, et al: Heterogeneity of vasomotor response to acetylcholine along the human coronary artery. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1046-1055.
- 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: 22-27.
- Saouaf R, Arora S, Smakowski P, et al: Reactive hyperemic response of the brachial artery: Comparison of proximal and distal occlusion. *Acad Radiol* 1998;5:556-560.
- Tang R, Mercuri M, Devi K, Crouse R, Bond MG: Evaluation of brachial arterial vasodilation using high resolution B-mode ultrasound. *J Neuroimaging* 1997; 7 (3):234.
- Sorensen K, Celermajer D, Spiegelhalter D, et al: Non invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995;74:247-253.
- Zeiger AM, Drexler H, Wallschlager A, et al: Modulation of coronary vasomotor tone in humans: Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991;83:391-401.
- Cooke JP, Tsao PS: Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb* 1994;14:653-5.
- Gaeta G, De Michele M, Cuomo S, et al: Arterial abnormalities in offspring of patients with premature myocardial infarction. *N Engl J Med* 2000;343:840-846.
- 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.
- Egashira K, Inou T, Hirooka Y, et al: Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993;88:77-81.
- Miller VM, Gisclard V, Vanhoutte PM: Modulation of endothelium-dependent and vascular smooth cell responses by oestrogens. *Phlebology* 1988;3:63-69.
- 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;92:3431-3435.
- Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, et al: Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein (a) level. *J Clin Invest* 1994; 93:50-55.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide production. *J Clin Invest* 1993;91:2546-2551.
- 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;88:2149-2155.
- Powell J: Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall. *Vascular Medicine* 1998;3:21-28.
- Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, et al: Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. *Am J Cardiol* 1997;79:529-31.
- Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, et al: Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996;334:150-4.
- 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.
- Lambert J, Aarsen M, Donker AJM, et al: Endothelium-dependent and independent vasodilation of large arteries in normoalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:705-711.
- Donaghue KC, Robinson J, McCredie R, et al: Large vessel dysfunction in diabetic adolescents and its relationship to small vessel complications. *J Ped Endocr Metab* 1997;10:593-8.
- Enderle M, Benda N, Schmuelling RM, et al: Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes Care* 1998;21:271-277.
- Watts GF, Playford DA: Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:17-30.
- Iiyama K, Nagano M, Nagano N, et al: Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J* 1996; 132:779-82.
- Li J, Zhao SP, Li XP, et al: Non invasive detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol* 1997;61:165-9.
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, et al: Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993;87:1468-74.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P et al: Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* 1996;94:1298-1303.
- Creager MA, Roddy MA: Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension* 1994;24:499-505.
- Woo KS, Chook P, Lolin YI, et al: Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial dysfunction in humans. *Circulation* 1997;96:2542-2544.
- 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.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C et al: Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1468-74.
- Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, et al: Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation* 1996;93: 1346-1353.