M. Barton

Abteilung Kardiologie,
Departement Innere Medizin,
Universitätsspital Zürich

Endothelin und Atherosklerose

Kausale Bedeutung und therapeutische Implikationen[1]

Summary

Endothelin and atherosclerosis: causal role and therapeutic implications

Atherosclerosis accounts for the majority of cardiovascular morbidity and mortality in industrialised countries. Endothelin-1 (ET-1), a 21-amino acid peptide, is increased in patients with atherosclerosis, who also exhibit endothelial dysfunction and reduced release and/or bioavailability of NO. This article reviews the experimental and clinical evidence for involvement of ET-1 in functional and structural atherosclerotic changes and discusses the effect of chronic endothelin ET_A receptor blockade in apolipoprotein E-deficient mice. After 30 weeks of treatment with a high-fat diet to accelerate atherosclerosis, extensive atherosclerosis, increased ET binding, and impaired endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was observed in the aorta. Chronic treatment with the ET_A antagonist LU135252 restored impaired endothelial function, reduced atherosclerosis and increased plasma nitrate levels without affecting ET receptor binding, plasma cholesterol levels or blood pressure. Thus, ET-1 contributes to both NO-mediated endothelial dysfunction and atheroma formation. *In summary,* chronic inhibition of the endothelin system increases the bioavailability of NO and provides a novel approach for the treatment of atherosclerosis and its vascular complications.

Keywords: coronary artery disease; endothelial dysfunction; cholesterol; blood pressure

Zusammenfassung

Atherosklerose ist die Hauptursache von kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität in Industrienationen. Endothelin-1 (ET-1), ein aus 21-Aminosäuren bestehendes Peptid, wird vermehrt im Gewebe von Patienten mit Atherosklerose exprimiert. Diese Patienten zeigen typischerweise eine Abschwächung der Endothel-vermittelten Dilatation der Koronararterien, die u.a. durch verminderte Produktion und/oder vermehrten Abbau von «Stickstoffmonoxid» (NO) bedingt ist. Dieser Artikel diskutiert die experimentellen und klinischen Hinweise für eine Beteiligung von ET-1 an funktionellen und strukturellen Veränderungen der Atherosklerose sowie Wirkungen chronischer Blockade des Endothelinsystems bei experimenteller Atherosklerose. In unserer Untersuchung bewirkte die 30wöchige Behandlung Apolipoprotein-E-defizienter Mäuse mit einer fettreichen Diät eine Beschleunigung der Atherosklerose-Entwicklung, eine Erhöhung der ET-Rezeptorbindungkapazität und eine Abschwächung der Endothel-abhängigen Relaxation in der Aorta. Die zusätzliche Behandlung mit dem Endothelin-ET_A-Rezeptor-Antagonisten LU135252 führte zu einer vollständigen Wiederherstellung der Endothelfunktion, zu einem Anstieg der Plasma-Nitrat-Spiegel und zur Verringerung der Atherosklerose. Diese Wirkungen waren unabhängig

1 Die diesem Artikel zugrundeliegende Originalarbeit [28] wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft Bonn, dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung Bern, der ADUMED-Stiftung Zürich, der Schweizerischen Herzstiftung Bern sowie den National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, unterstützt.

Korrespondenz:
Dr. med. Matthias Barton
Abteilung Kardiologie
Departement Innere Medizin
Universitätsspital
Rämistrasse 100
CH-8091 Zürich
e-mail: MatthiasBarton@compuserve.com

von Blutdruck, Plasmacholesterin und von der ET-Rezeptorbindungskapazität. *Zusammenfassend* hemmt eine chronische Blockade des Endothelinsystems die Atherosklerose-Entstehung und fördert die Bioverfügbarkeit von NO und bietet somit eine neue Möglichkeit zur Behandlung von atherosklerotisch bedingten Gefässerkrankungen und ihrer Komplikationen.
Keywords: endotheliale Dysfunktion; Blutdruck; Cholesterin; koronare Herzkrankheit

Gefässendothel und Atherosklerose

Atherosklerose, eine chronische Systemerkrankung des Gefässsystems mit entzündlicher Komponente, ist für den Grossteil der Morbidität und Mortalität in den Industrienationen verantwortlich. Bereits im Mutterleib können erste Gefässveränderungen auf proatherogene, sogenannte «fatty streaks» bei entsprechender Konstellation des mütterlichen Organismus im Fetus auftreten [1]. Diese potentiell reversiblen Vorläufer des atherosklerotischen Plaques lassen sich auch bei einem Grossteil von Jugendlichen nachweisen [2]. Sie bilden die Grundlage für einen zunehmend gefässokkludierenden Prozess, der sich über Jahrzehnte fortsetzt und bei Gefässverschluss zu Organverlust durch Infarkt führt [2, 3].

Im Jahr 1980 wurde an isolierten Kaninchenarterien gezeigt, dass das Gefässendothel den Spannungszustand der Gefässmuskulatur verändern kann: Robert Furchgott beschrieb die Freisetzung eines gefässerweiternden Stoffes aus Gefässendothelzellen, den sogenannten «endothelium-derived relaxing factor» (EDRF) [4], der später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert wurde [5]. Bereits vor Ausbildung struktureller atherosklerotischer Veränderungen kommt es zur funktionellen Schädigung des Gefässendothels [2], was sich unter anderem in einer Abnahme von Synthese und Wirkung gefässdilatierender Substanzen [6–8] sowie einer erhöhten Freisetzung vasokonstriktiver und proliferationsfördender Substanzen bemerkbar macht [9].

Endothelin

Nur wenige Jahre nach Entdeckung des «EDRF» wurde von zwei Arbeitsgruppen eine weitere Substanz isoliert, die ebenfalls von Endothelzellen produziert wurde, jedoch gefässverengend wirkte [10–12]; die Gensequenz dieser neuen Substanz wurde 1987 in Japan entschlüsselt (Abb. 1) und das Protein seiner Herkunft entsprechend Endothelin genannt [13–15]. Endothelin-$1_{(1-21)}$, die wichtigste Isoform der Endotheline, ist ein starker Vasokonstriktor und ein potenter Stimulus des Zellwachstums (Abb. 2). Inzwischen haben zahlreiche Studien gezeigt, dass das Endothelinsystem in fast ausnahmslos allen Herz- und Gefässerkrankungen aktiviert ist. Hierzu zählen Bluthochdruck [16, 17], Atherosklerose [18], Herzinfarkt [19] und Herzinsuffizienz [20]. In histologischen Schnitten von Plaquematerial

Abbildung 1

Biosynthese von Endothelin-$1_{(1-21)}$ und Endothelin$_{(1-31)}$. Nach Bildung von Preproendothelin mRNA und Translation kommt es zur Bildung von preproET-1, einem aus 203 Aminosäuren bestehenden Peptid, das durch eine Furin-Konvertase zum Vorläufer des Endothelins umgewandelt wird. Es entsteht bigET-$1_{(1-38)}$, das von einer Reihe von Enzymen zu ET-$1_{(1-21)}$ gespalten werden kann, u. a. von Endothelin-Converting-Enzymen (ECE), Mastzell-Chymase, Chymase in glatten Muskelzellen und non-ECE-Metalloproteasen (links). Alternativ hierzu kann Mastzell-Chymase aus big-ET sogenanntes ET-$1_{(1-31)}$ bilden, eine neue Endothelin-Isoform, die aus 31 Aminosäuren besteht (rechts) (modifiziert nach [13]).

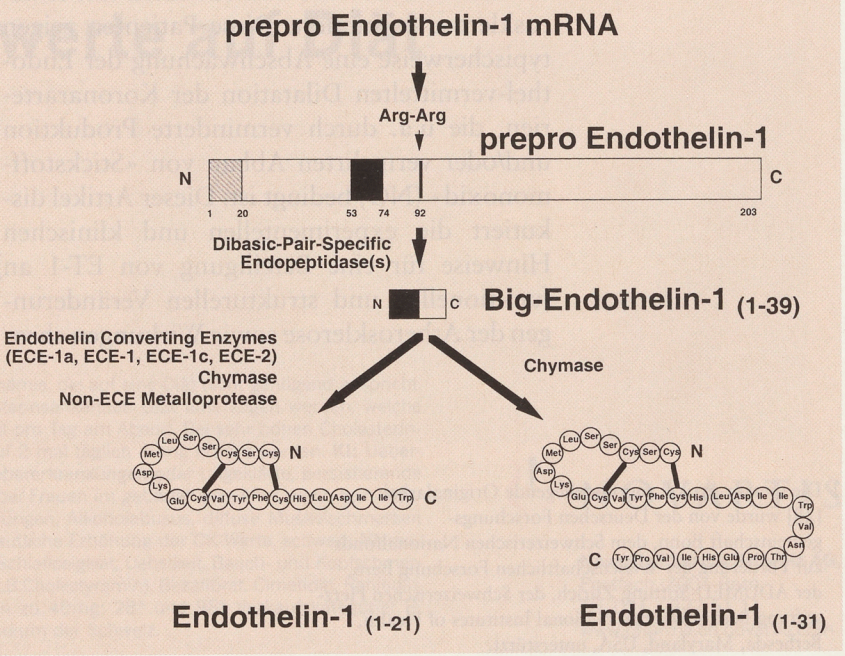
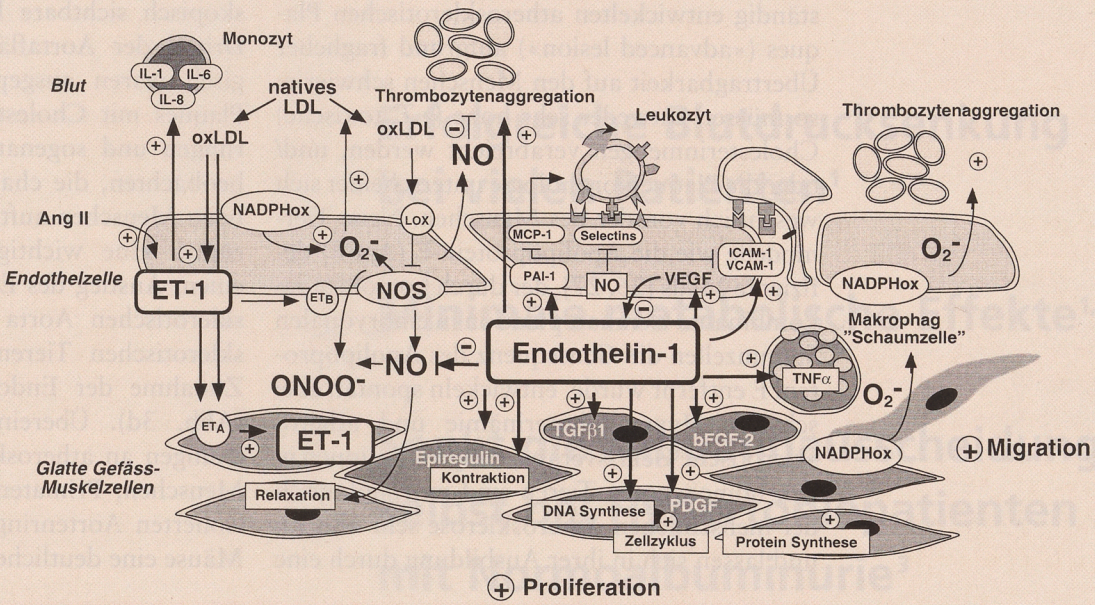


Abbildung 2

Schematischer Überblick der proatherosklerotischen Wirkungen von Endothelin auf die Gefässwand. Endothelin wird sowohl unter basalen Bedingungen als auch durch Stimuli wie vasoaktive Substanzen oder oxidierte Lipoproteine in Endothelzellen und glatten Gefässmuskelzellen gebildet. Eine Stimulation endothelialer ET_B-Rezeptoren stimuliert die Freisetzung von NO und führt zur Gefässrelaxation, während eine ET_A-Rezeptoraktivierung eine Kontraktion sowie Gefässmuskelwachstum bewirkt. ET-1 fördert die Bildung von Interleukinen and TNF-α in Monozyten, es bewirkt eine Steigerung der Leukozyten-Adhärenz und Thrombozytenaggregation und steigert die Bildung von Adhäsionsmolekülen. Ausserdem potenziert ET-1 die Wirkung von anderen Wachstumsfaktoren, stimuliert DNA and Proteinbiosynthese und steigert die Aktivität des Zellzyklus. Abkürzungen: Ang II = Angiotensin II; $ONOO^-$ = Peroxynitrit; ET-1 = Endothelin-1; ET_A = Endothelin-A-Rezeptor, ET_B = Endothelin-B-Rezeptor; NO = Nitric Oxide; NOS = Nitric Oxide Synthase; MCP-1 = Monocyte Chemoattractant Protein-1; ICAM-1 = Intracellular Adhesion Molecule-1; VCAM = Vascular Cell Adhesion Molecule-1; LDL = Low Density Lipoprotein; oxLDL = oxidized Low Density Lipoprotein; O_2^- = Superoxide Anion; LOX = oxidized LDL Rezeptor; IL-1 = Interleukin 1; IL-6 = Interleukin 6; IL-8 = Interleukin 8; TNF-α = Tumor Necrosis Factor α; TGF-β_1 = Transforming Growth Factor β-1; phox = NADPH Oxidase; (+) = Stimulation, (–) = Hemmung (nach [20]).



von Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde Endothelin sowohl im Plaque wie auch in Makrophagen nachgewiesen [18]. Zeiher und Mitarbeiter zeigten, dass in Patienten mit koronarer Herzkrankheit das Ausmass des im Plaquematerial nachgewiesenen Endothelins mit dem klinischen Schweregrad korreliert [21]. Hierzu passend sind Untersuchungen an Koronararterien von Schweinen mit Hypercholesterinämie, bei denen sowohl eine Abschwächung der Endothel-abhängigen koronaren Dilatation als auch ein Anstieg des Endothelins in histologischen Schnitten zu beobachten war, ein Befund, der sich später bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit bestätigen liess [22]. Unklar blieb jedoch, ob es sich bei diesen Beobachtungen um Epiphänomene handelt oder ob die vermehrte Expression des Endothelins für die funktionellen und strukturellen Veränderungen möglicherweise eine kausale Rolle spielt.

Endothelin-Antagonisten

Kurz nach Entdeckung des Endothelins wurden zwei Endothelin-Rezeptoren (ET_A und ET_B) charakterisiert und kloniert [23], was die Entwicklung spezifischer Endothelin-Antagonisten ermöglichte. Diese neue Substanzgruppe bindet entweder selektiv an einem oder an beiden Rezeptoren. Einige dieser Medikamente sind, wie der selektive ET_A-Rezeptorantagonist LU135252 [24], oral wirksam und erlauben es, chronisch die Wirkungen des Endothelins zu blockieren und so die pathophysiologische Bedeutung des Endothelins zu erforschen.

Endothelin-Antagonisten zur Behandlung der Atherosklerose

In einem Modell chronischer Hypercholesterinämie, einem Hauptrisikofaktor für koronare Herzkrankheit, liess sich durch chronische Behandlung mit einem Endothelin-ET_A-Rezeptorantagonisten die Adhäsion von Makrophagen an die Gefässwand sowie die Ausbildung von «fatty streaks» günstig beeinflussen [25]. Obwohl der Atheroskleroseforschung eine Reihe von Tiermodellen zur Verfügung steht, ist die Untersuchung des vollständig entwickelten atherosklerotischen Plaques («advanced lesion») aufgrund fraglicher Übertragbarkeit auf den Menschen schwierig: so müssen entweder sehr hohe (z.T. toxische) Cholesterinmengen verabreicht werden, und/oder die Plaquemorphologie unterscheidet sich wesentlich von der des Menschen. Neue Tiermodelle wie die Apolipoprotein-E (ApoE)-defiziente Maus [26, 27], der durch homologe rekombinante Genmanipulation in embryonalen Stammzellen die Gensequenz des Apolipoprotein E entfernt wurde, entwickeln spontan eine schwere Hypercholesterinämie und atherosklerotische Gefässveränderungen. Läsionen in den homozygoten Tieren sind morphologisch der menschlichen Atherosklerose sehr ähnlich und lassen sich in ihrer Ausbildung durch eine fettreiche Diät beschleunigen, die vergleichsweise wenig Cholesterin enthält [26].

Um eine mögliche kausale Beteiligung von Endothelin an der Atherosklerose-Entstehung zu untersuchen, haben wir in unserer Arbeitsgruppe ApoE-defiziente Mäuse und entsprechende Kontrolltiere sieben Monate lang mit dem ET_A-Rezeptorantagonisten LU135252 behandelt [28]. In unbehandelten ApoE-defizienten Mäusen zeigten sich in der Aorta makroskopisch sichtbare Läsionen, die etwa zwei Drittel der Aortafläche bedeckten. Histologisch waren ausgeprägte atherosklerotische Plaques mit Cholesterinkristallen, Kalzifizierungen und sogenannten «fibrous caps» zu beobachten, die charakteristischerweise auch beim Menschen auftreten und für die Plaqueruptur eine wichtige Rolle spielen. Neben einem Anstieg des Endothelins in der atherosklerotischen Aorta kam es in den atherosklerotischen Tieren zu einer ausgeprägten Zunahme der Endothelin-Bindungskapazität (Abb. 3d). Übereinstimmend mit Untersuchungen an atherosklerotischen Arterien von Menschen, Primaten und Kaninchen war in isolierten Aortenringen der ApoE-defizienten Mäuse eine deutliche Abschwächung der NO-

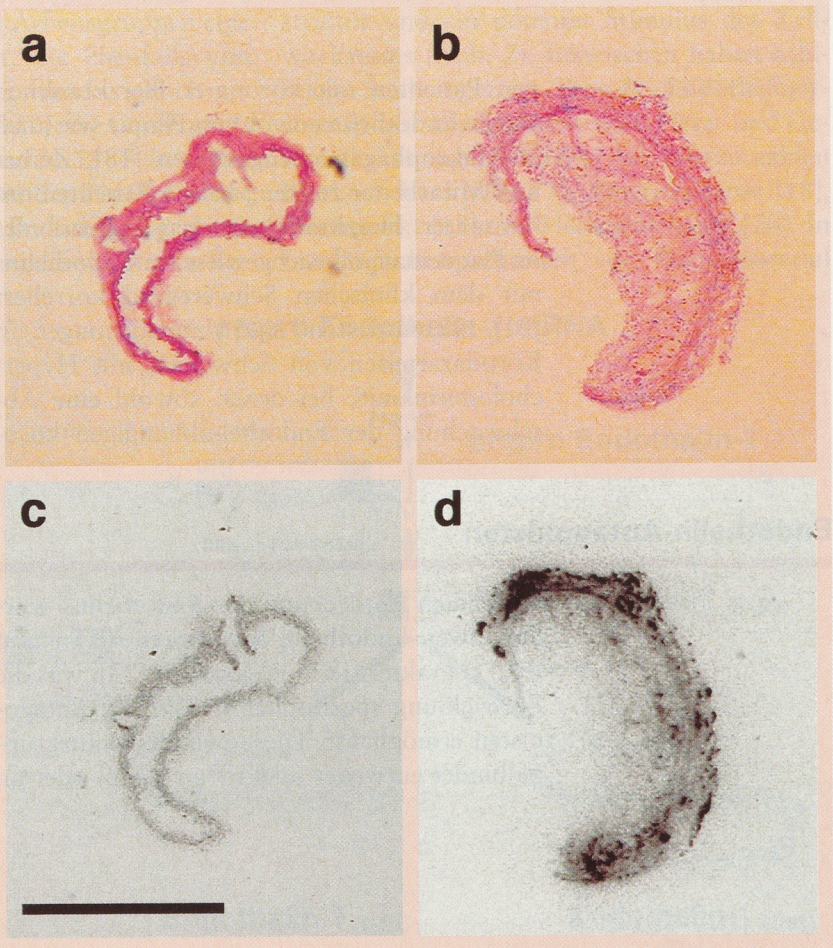


Abbildung 3

Histologie (oben) und Autoradiographie (unten) der Aorta von C57BL/6-Kontrollmäusen ohne Atherosklerose und ApoE-defizienten Mäusen. Repräsentatives histologisches Präparat der Aorta eines C57BL/6-Kontrolltieres (a) und einer atherosklerotischen ApoE-defizienten Maus (b). Beachte die grosse, das Lumen weit ausfüllende atherosklerotische Plaque in der Aorta der ApoE-defizienten Maus (b). Im Vergleich zum Kontrolltier (c) war in diesen Tieren die Bindungskapazität für radioaktiv markiertes ^{125}I-ET-1 sowohl in der Gefässwand wie auch im Bereich der Plaque deutlich erhöht (d). Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Originalvergrösserung 10×, Balken : 1000 µm (aus [28]). (Reproduziert mit Genehmigung der National Academy of Sciences, Washington, USA)

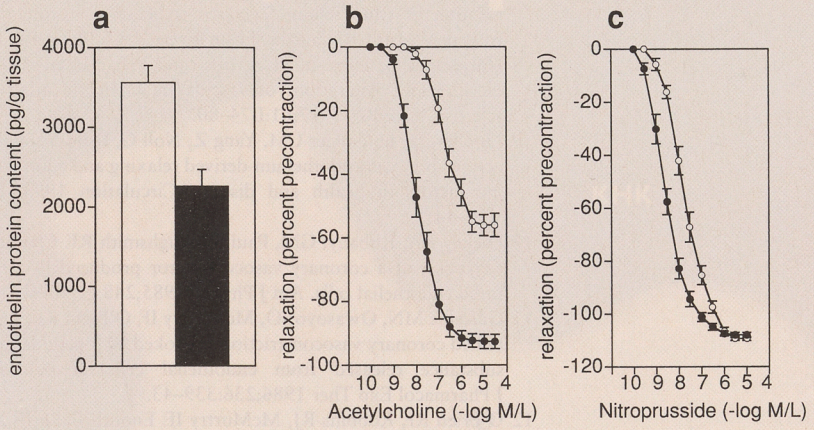


Abbildung 4
Wirkungen chronischer ET_A-Rezeptorblockade (schwarz) mit LU135252 auf die ET-1-Proteinkonzentration und Endothel-abhängige Relaxation in isolierten Aortenringen in apoE-defizienten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Tieren (weiss). Endothelinblockade senkte das Ausmass der Atherosklerose um etwa 30% und normalisierte die aortalen ET-1-Proteinspiegel auf das Niveau nicht-atherosklerotischer C57BL6J- Mäuse (a). LU135252 verhinderte die Abschwächung der NO-vermittelten Endothel-abhängigen Relaxation nach Gabe von Acetylcholin und ging mit einer Erhöhung der Plasma-Nitrat-Spiegel einher, die als indirektes Mass für die endogene endotheliale NO-Bioverfügbarkeit dienen (b). Das Ausmass der Relaxation korrelierte invers mit der Höhe der vaskulären Endothelinspiegel. Die Sensitivität für exogenes NO war leicht erhöht (c), was möglicherweise auf eine Verbesserung der Gefässstruktur durch Abnahme der Atherosklerose zurückzuführen ist. Die Wirkungen von LU135252 waren unabhängig von Blutdruck oder Plasmalipiden (aus [28]). (Reproduziert mit Genehmigung der National Academy of Sciences, Washington, USA)

vermittelten Endothel-abhängigen Relaxation zu beobachten. Dieses Phänomen wurde von einer Abnahme der Plasma-Nitrat-Werte begleitet, die ein indirektes Mass für die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit darstellen.
Obwohl die mit dem Endothelin-Antagonisten behandelten Tiere vergleichbare Blutdruck- und Lipidwerte wie die unbehandelten Tiere zeigten, war das Ausmass der makroskopisch sichtbaren atherosklerotischen Plaques um gut ein Drittel reduziert, ohne jedoch die histologische Morphologie der Plaques zu beeinflussen. Obschon die Atherosklerose-Ausbildung nur zum Teil gehemmt werden konnte, zeigte sich eine vollständige Normalisierung der in unbehandelten Tieren stark eingeschränkten NO-vermittelten Endothel-abhängigen Dilatation (Abb. 4b) sowie eine Zunahme der Plasma-Nitrat-Spiegel. Interessanterweise senkte die Behandlung mit LU135252 auch die Endothelin-Gewebespiegel auf das Niveau der Kontrolltiere ohne Atherosklerose (Abb. 4a).

Klinische Implikationen

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen erstmals, dass Endothelin nicht nur eine Blutdruck- und Cholesterin-unabhängige Atherosklerose-fördernde Wirkung besitzt, sondern auch kausal an Veränderungen der Endothelfunktion beteiligt ist. Die Normalisierung NO-vermittelter Vasodilatation mittels Endothelin-Rezeptorblockade, ein Prinzip, das mittlerweile auch für experimentelle Hypercholesterinämie [29], Hypertonie [17] und Herzinsuffizienz [30] demonstriert wurde, stellt ein neues therapeutisches Konzept dar, das Risikofaktor-bedingten funktionellen und strukturellen Gefässveränderungen entgegenwirken kann. Klinische Untersuchungen mit Endothelin-Antagonisten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und anderen kardiovaskulären Erkrankungen werden zeigen, ob diese neuen Medikamente auch am Menschen eine Verringerung der Atherosklerose und ihrer Komplikationen bewirken können.

Danksagung: Der Autor dankt Prof. Thomas F. Lüscher und Prof. Paul R. Lichtlen für ihre Förderung und langjährige Unterstützung. Grossen Dank schuldet der Autor Dr. Sidney Shaw und Dr. Livius d'Uscio für ihre Hilfe und ihren unermüdlichen Einsatz.

Literatur

1 Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesion. J Clin Invest 1997;100: 2680–90.
2 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990s. Nature 1993;362:801–9.
3 Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340:115–26.
4 Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;299:373–6.
5 Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:9265–9.
6 Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. J Clin Invest 1987;79:170–4.

7 Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistad DD. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. J Clin Invest 1987;80:1808–11.

8 Harrison DG, Freiman PC, Armstrong ML, Marcus ML, Heistad DD. Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. Circ Res 1987;61:II74–80.

9 Lüscher TF, Boulanger CM, Yang Z, Noll G, Dohi Y. Interactions between endothelium-derived relaxing and contracting factors in health and disease. Circulation 1993;87: V36–44.

10 Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. Am J Physiol 1985;248:C550–6.

11 Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF, O'Brien RF. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. J Pharmacol Exp Ther 1986;236:339–43.

12 O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. J Cell Physiol 1987;132:263–70.

13 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988;332:411–5.

14 Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, et al. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85:6964–7.

15 Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86:2863–7.

16 Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Lüscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ET_A-receptors for endothelin regulation. Biochem Biophys Res Commun 1997;238:861–5.

17 Barton M, d'Uscio L, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Lüscher TF. ET_A receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. Hypertension 1998;31: 499–504.

18 Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. N Engl J Med 1991;325:997–1001.

19 Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1991;18:38–43.

20 Lüscher TF, Barton M. Endothelin and endothelin antagonists. Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. Circulation (in press).

21 Zeiher AM, Ihling C, Pistorius K, Schächinger V, Schaefer HE. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. Lancet 1994;344:1405–6.

22 Lerman A, Holmes DJ, Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JJ. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. Circulation 1995;92: 2426–31.

23 Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. Annu Rev Physiol 1999;61:391–415.

24 Rohmeiss P, Birck R, Braun C, Münter K, van der Woude FJ, Kirchengast M. Pharmacology of the endothelin A receptor antagonist LU135252. Cardiovasc Drug Rev 1998;16: 391–412.

25 Kowala MC, Rose PM, Stein PD, Goller N, Recce R, Beyer S, et al. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. Am J Pathol 1995;146:819–26.

26 Plump AS, Smith JD, Hayek T, Allto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. Cell 1992;71:343–53.

27 Zhang S, Reddick TL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. Science 1992;258:468–71.

28 Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Münter K, Lüscher TF. Endothelin ET_A receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apoE-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:14367–72.

29 Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR Jr, Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. Circulation 1999;99:1747–52.

30 Bauersachs J, Fraccarollo D, Widder J, Ertl G. Correction of endothelial dysfunction in rats with chronic myocardial infarction by treatment with endothelin receptor antagonists [abstract]. J Am Coll Cardiol 1999;33(No. 2, Suppl. A): 178A.