

IL RUOLO DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE NEI PAZIENTI AFFETTI DA BPCO

Mario Malerba¹, Filippo Patrucco²

¹ Dipartimento di Medicina Traslazionale, S.C. Pneumologia, Ospedale Sant'Andrea, Università del Piemonte Orientale, Vercelli

² Dipartimento Medico, S.C. Pneumologia, Ospedale Sant'Andrea, ASL VC, Vercelli

Introduzione

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) rappresenta la quarta causa di morte nei paesi occidentali (1); è caratterizzata da ostruzione delle vie aeree originante da un processo infiammatorio che coinvolge le vie aeree e il parenchima polmonare (2). La BPCO coinvolge anche il circolo polmonare dove la disfunzione endoteliale sembra giocare un ruolo cruciale. Le patologie cardiovascolari sono la principale causa di morte nei pazienti affetti da BPCO e comunque una chiara spiegazione di questa associazione e tutt'ora mancante (3).

Studi precedenti hanno documentato l'importanza della disfunzione endoteliale come predittore di morte da tutte le cause e da cause cardiovascolari nei pazienti BPCO (4).

Le cellule endoteliali dell'intima costituiscono la superficie di contatto con il flusso sanguigno e sono quindi coinvolte in numerosi meccanismi dell'omeostasi vascolare, inclusa la coagulazione, la permeabilità vaso-

lare, l'infiammazione, l'angiogenesi e il mantenimento del tono vascolare tale da assicurare un'adeguata perfusione d'organo.

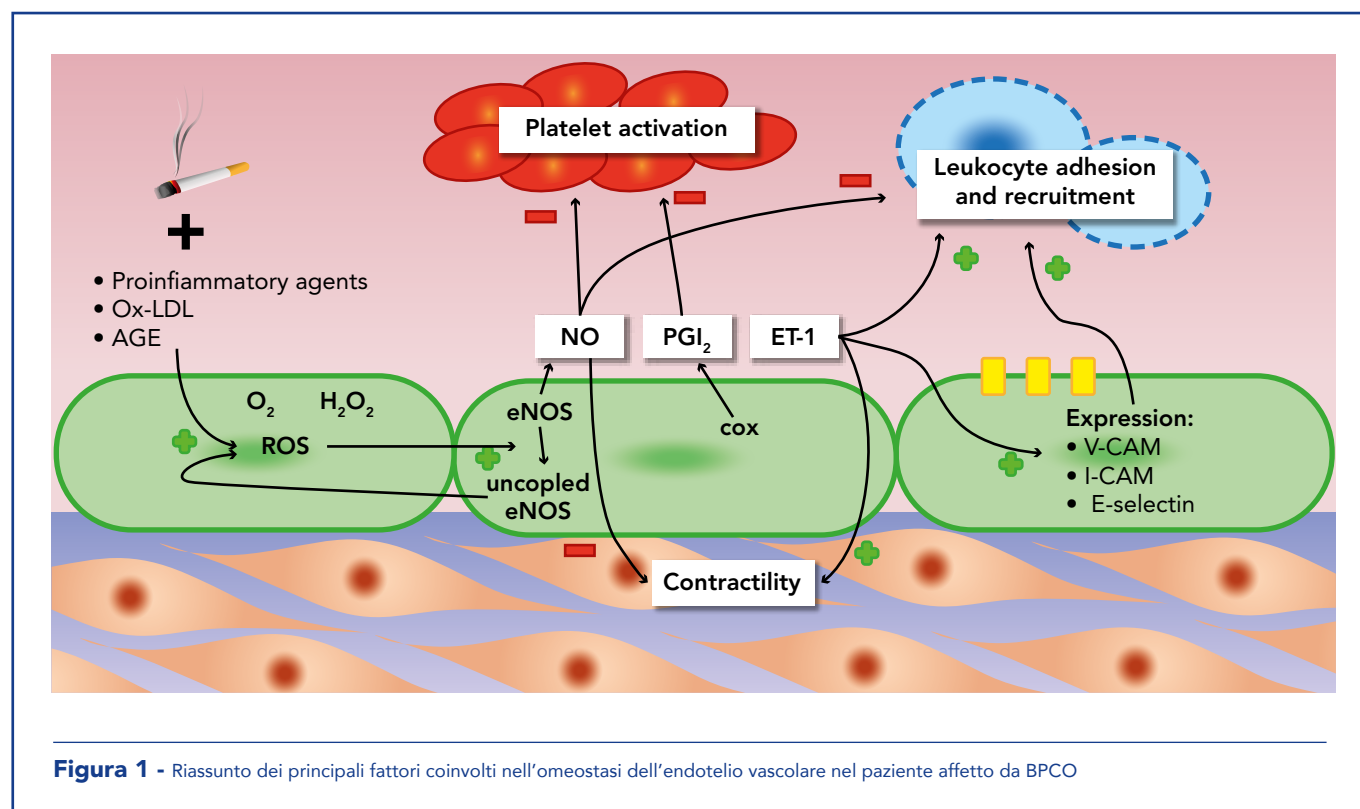
Il termine di disfunzione endoteliale è quindi riferito all'incapacità dell'endotelio a svolgere una o più funzioni dovuta ad esempio ai cambiamenti o a perdita di integrità delle cellule (5, 6).

Disfunzione endoteliale e BPCO

Mediatori endoteliali dell'omeostasi vascolare.

Una delle principali manifestazioni della disfunzione endoteliale è lo squilibrio del metabolismo del monossido d'azoto, che porta ad un suo incrementato consumo e ad una sua parallela ridotta produzione. Il monossido d'azoto è un gas prodotto partendo dalla L-arginina da parte della monossido d'azoto sintetasi endoteliale (eNOS) ed è il principale mediatore endoteliale di vasodilatazione (7, 8).

Cause di anomalie nel metabolismo dell'NO sono l'elevato stress ossidativo e l'infiammazione. Inoltre



lo stress ossidativo incrementa la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); il NO inoltre esercita un'importante attività inibitrice sull'adesione e l'aggregazione piastrinica (9).

Queste funzioni sono alterate nel paziente affetto da BPCO. In questi individui l'eNOS è ridotto e porta ad anomalie del tono vascolare, perfusione tissutale e aggregazione piastrinica.

L'endotelina è un vasocostrittore endoteliale; non ci sono dati definitivi sul ruolo dell'endotelina nella BPCO e non vi è differenza della sua espressione rispetto a pazienti sani non fumatori (2, 10).

La prostaciclina (PGI₂) invece causa vasodilatazione ed inibisce l'aggregazione piastrinica (11); è stata dimostrata una ridotta produzione di prostaciclina sintasi in pazienti con enfisema severo (12) (Figure 1, 2).

Aterosclerosi

L'aterosclerosi rappresenta una delle principali cause di disfunzione endoteliale portando ad una ridotta capacità nel regolare infiammazione e trombosi (13-16). Nella coorte dello studio Lung Health che ha incluso 5800 pazienti affetti da BPCO lieve e moderata, gli eventi cardiovascolari rappresentavano la principale causa di ospedalizzazione (17). Alcuni studi hanno dimostrato una relazione causale dose-risposta tra il fumo di sigaretta e il quantitativo di aterosclerosi (18, 19). La prevalenza di coronaropatie tra i pazienti affetti da BPCO si aggira tra il 10 e il 38% dei pazienti e la

mortalità cardiovascolare secondaria ad un episodio di esacerbazione acuta (AE) ammonta al 60% dei casi (20).

Durante l'AE di BPCO l'incremento della troponina cardiaca è significativamente correlato all'incremento del rischio di mortalità da tutte le cause, anche in assenza di sintomi o segni di sindrome coronarica acuta (21).

Infiammazione stimolata dal fumo di sigaretta e conseguenze sull'endotelio

Il fumo di sigaretta rappresenta la principale causa di BPCO (22). Nei fumatori lo squilibrio tra ossidanti ed antiossidanti porta ad un danno del parenchima e della matrice cellulare, attivando macrofagi che rilasciano mediatori dell'infiammazione, ROS e proteasi (23).

Lo stress ossidativo è uno dei principali agenti patogeni della BPCO e deriva dal fumo di sigaretta (24); i pazienti affetti da BPCO, in particolar modo durante le AE, hanno elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno come l'anione superossido nell'aria esalata (25). Da un punto di vista sistemico, la persistenza di infiammazione nella BPCO porta ad un incremento dei livelli di interleuchina 6 e 8, proteina C reattiva, e fibrinogeno (26), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ed altre proteine di fase acuta. Durante le AE è stato dimostrato un ulteriore incremento dei livelli dei mediatori dell'infiammazione rispetto alle fasi di stabilità clinica (27, 28).

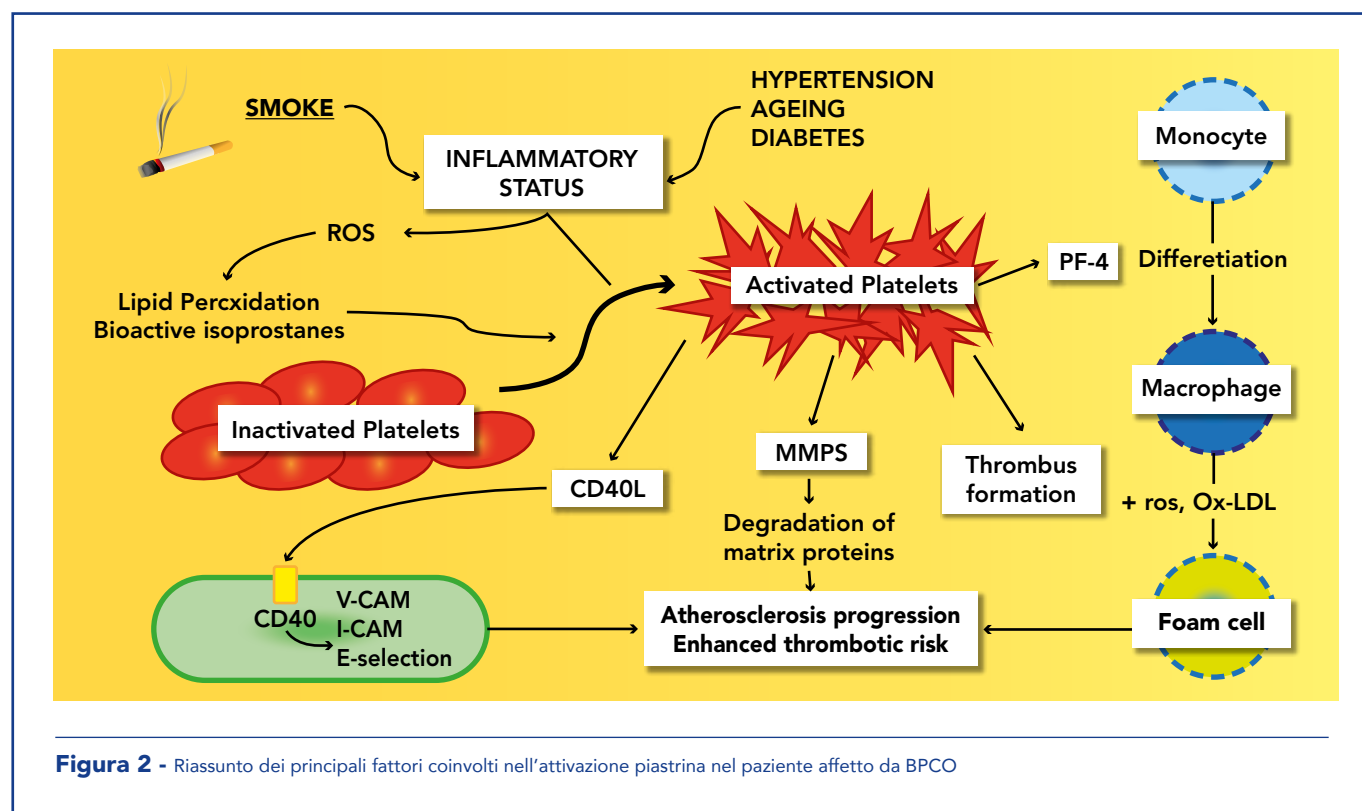


Figura 2 - Riassunto dei principali fattori coinvolti nell'attivazione piastrinica nel paziente affetto da BPCO

I mediatori proinfiammatori, direttamente o indirettamente, incrementano lo stato di infiammazione sistemica persistente attivando l'endotelio vascolare, la coagulazione e inducono infiammazione vascolare, formazione di placche e loro instabilità (29). Inoltre è stato dimostrato come una ridotta funzionalità polmonare è un marker di infiammazione sistemica (30). L'infiammazione è probabilmente il collegamento tra BPCO ed incrementata prevalenza di eventi cardiovascolari in pazienti affetti da BPCO (31). È stato dimostrato come elevati valori di proteina c reattiva, fibrinogeno e conta leucocitaria sono associati ad un incrementato rischio di AE (32).

L'ipossia è la responsabile dell'attivazione del sistema renina angiotensina aldosterone, inducendo vasocostrizione e quindi incremento dello stress ossidativo (33). L'ipossia cronica presente nei pazienti BPCO induce muscolarizzazione e rigidità delle arterie, e la ridotta elasticità correla con il grado di severità della patologia (34, 35).

La disfunzione endoteliale porta all'esposizione di proteine adesive e collagene, alla perdita del segnale antitrombotico e all'attivazione della cascata della coagulazione (36-38). L'espressione delle molecole di adesione cellulare (CAMs) rappresenta la più comune risposta endoteliale ad una varietà di stimoli infiammatori e tossici. I-CAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) e V-CAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) sono espresse dalle cellule endoteliali e dai leucociti in risposta a citochine infiammatorie e a lipoproteine ossidate (39). Queste molecole promuovono la chemiotassi dei leucociti e livelli incrementati di CAMs predicono l'insorgenza di eventi cardiovascolari (40-42). Marwik e coll. hanno dimostrato una ridotta espressione di VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare), un mitogeno specifico per l'endotelio vascolare, e di VEGFR-2 (il recettore-2 del VEGF) nei polmoni enfisematosi, ipotizzando che nella BPCO e nei pazienti fumatori il complesso VEGF e VEGFR-2 se danneggiato porterebbe allo sviluppo di enfisema (43).

Cellule progenitrici dell'endotelio

Recentemente la ricerca si è concentrata sull'identificazione di markers di disfunzione endoteliale. Lo studio delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) è considerato fondamentale nella valutazione della disfunzione endoteliale in quanto queste cellule rinnovano l'intima vascolare danneggiata (44).

Il numero e la funzione delle EPC correla con la disfunzione endoteliale periferica, portando a considerarle come marker di funzione endotele e target di terapia (45). Elevati livelli di EPC sono stati riscontrati in pazienti asmatici rispetto a controlli sani (46). Nei pazienti esposti a fumo passivo è stato riscontrato un incrementato numero di cellule circolanti, dimostrando una ridotta capacità a seguire

il gradiente citochinico o una ridotta motilità (47). Caramori e coll. hanno osservato che il numero di cellule staminali endoteliali circolanti non è correlato alla presenza o alla severità dell'enfisema polmonare, o alla presenza o meno di BPCO (48).

Uno studio recente condotto da Barnes e coll. ha dimostrato che i progenitori endoteliali circolanti nei pazienti affetti da BPCO sono disfunzionali, mostrando un'alterata angiogenesi e incrementata attività apoptotica se confrontate con le cellule di non fumatori (49).

Microparticelle endoteliali

In alcuni studi la perdita di cellule endoteliali alveolari per apoptosi è stata sottolineata come un punto cruciale nella patogenesi della distruzione polmonare (50-56). Questo indica l'ipotesi che la disfunzione endoteliale potrebbe essere correlata alla progressione dell'enfisema nell'essere umano (52, 57). Thomashow e coll. hanno dimostrato che il numero di microparticelle endoteliali circolanti (EMP) di origine apoptotica era significativamente associato alla percentuale di enfisema nei pazienti affetti da BPCO. In particolare, l'EMP è rilasciato dall'endotelio in risposta a diversi stimoli, in particolare al danno endoteliale o all'apoptosi (58-61). Gordon e coll. hanno dimostrato che i valori di EMP erano maggiori in caso in pazienti fumatori con spirometria normale ma ridotta DLCO rispetto a pazienti non fumatori e pazienti sani, fumatori e con normale DLCO (62).

Nei pazienti affetti da BPCO è stato riscontrato un maggior quantitativo di EMP, suggerendo la presenza di un danno endoteliale (62). È stato poi dimostrato che il danno endoteliale compare durante una AE e continua anche quando i sintomi scompaiono, suggerendo che i livelli elevati di EMP quando sono stabili possono indicare i pazienti che sono più suscettibili alle esacerbazioni (63).

Valutazione della funzione endoteliale

Diversi test sono stati proposti per valutare la funzione endoteliale (Tabella 1).

La valutazione biochimica e cellulare diretta dell'integrità e della microcircolazione raramente è stata utilizzata con intenti clinici (64). Test indiretti valutano la risposta vascolare a stimoli endotelio-dipendenti, principalmente lo shear stress in risposta a sostanze vasoattive. Disfunzioni micro- e macrovascolari sono state correlate ad eventi cardiovascolari in studi di coorte (65-68).

Il test della dilatazione flusso-mediata (FMD) è principalmente utilizzato come valutazione non invasiva di biodisponibilità di monossido d'azoto e di funzionalità endoteliale negli umani. Brevemente, un bracciale pneumatico, posizionato all'avambraccio del paziente, è insufflato ad una pressione sovrasistolica per 5



minuti, determinando una transitoria ischemia distale; durante la desufflazione della cuffia, l'incremento del flusso genera shear stress delle pareti vascolari, portando al rilascio di NO e vasodilatazione, valutabile con gli ultrasuoni (69).

La velocità dell'onda di polso (pulse wave velocity, PWV) e la tonometria arteriosa periferica (peripheral arterial tonometry, PAT) rappresentano due metodi non invasivi per la valutazione della funzione endoteliale rispettivamente in sede centrale e periferica.

La PWV aortica è stata identificata come un predittore indipendente di eventi cardiovascolari (70, 71).

Ad oggi non ci sono dati di letteratura che pongono una specifica indicazione all'utilizzo di test di valutazione di disfunzione endoteliale in pazienti affetti da BPCO; un potenziale utilizzo sarebbe per l'identificazione e il trattamento precoce delle patologie aterosclerotiche in pazienti affetti da BPCO a differenti stadi di malattia o in pazienti fumatori asintomatici.

Conclusioni

Nonostante i recenti progressi nella conoscenza della patogenesi della BPCO, diverse domande sul ruolo dell'endotelio in questi pazienti restano senza risposta. In particolare, nonostante la dimostrazione di un ruolo delle funzioni endoteliali nell'omeostasi vascolare, l'impatto clinico nella BPCO è ancora scarso anche per la mancanza di metodi di valutazione della disfunzione endoteliale in questa popolazione specifica. Un punto cruciale irrisolto è se la misura della disfunzione endoteliale durante le valutazioni di routine garantirebbe una migliore stratificazione delle comorbidità o del rischio di eventi cardiovascolari.

Tutti questi fattori suggeriscono la necessità di indagare ulteriormente il ruolo del sistema vascolare nei pazienti affetti da BPCO, consentendo al clinico di trovare un razionale per lo studio di nuove molecole per la terapia e il management della disfunzione endoteliale.

TECNICA	VASO TARGET	VANTAGGI	SVANTAGGI	DESCRIZIONE
Coronarie				
FMD coronarica	Coronarie epicardiche	Valutazione diretta delle coronarie	Invasivo: necessaria procedura angiografica	La valutazione è eseguita tramite infusione intracoronarica di acetilcolina o con il test allo stimolo del freddo
Intracoronary Doppler Wire	Microcircolo coronarico	Valutazione diretta delle coronarie	Procedura angiografica	Misura delle variazioni di diametro delle coronarie in risposta all'infusione intracoronarica di acetilcolina
Recentemente la valutazione del flusso di riserva coronarico (CFR) è anche possibile con test non invasivi come la MRI e la PET: insieme agli stimoli farmacologici endotelio dipendenti possono valutare la funzione dell'endotelio microvascolare coronarico.				
Arterie periferiche				
Dilatazione flusso mediata (FMD)	Arteria di conduzione periferica	Facilità d'uso e discreta riproducibilità	Esperienza. Differenze tra letto vascolare periferico e coronarico. Influenza degli ormoni	Largamente utilizzato. Misura le variazioni di diametro tramite gli ultrasuoni, derivando l'NO endoteliale
EndoPAT	Piccole arterie e microcircolo	Non invasivo, elevata riproducibilità	Recentemente introdotto: mancanza di evidenza nella relazione di stratificazione del rischio	Pletismografia del polpastrello, valutazione dell'indice di iperemia reattiva
Venous occlusion plethysmography	Vena dell'avambraccio	Ampie evidenze sull'utilizzo	Invasività: incannulazione dell'arteria brachiale. Scarsa riproducibilità.	Scopo di valutare il flusso sanguigno tramite la valutazione del cambiamento di volume tissutale indotto dall'insufflazione di un bracciale. Per molto tempo considerato il gold standard.

Abbreviazioni: FMD dilatazione flusso mediata; MRI: risonanza magnetica; PET: tomografia ad emissione di positroni; EndoPAT: tonometria arteriosa periferica endoteliale

Tabella 1



Bibliografia

1. Campo G, Pavasini R, Malagù M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and ischemic heart disease comorbidity: overview of mechanisms and clinical management. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2015;29:147–157.
2. Blanco I, Piccari L, Barberà JA. Pulmonary vasculature in COPD: The silent component. *Respirology.* 2016;21:984–994.
3. Vestbo J, Anderson JA, Brook RD, et al. Fluticasone furoate and vilanterol and survival in chronic obstructive pulmonary disease with heightened cardiovascular risk (SUMMIT): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387:1817–1826.
4. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur. Respir. J.* 2009;33:1165–1185.
5. Florey. The endothelial cell. *Br. Med. J.* 1966;2:487–490.
6. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180:1332–1339.
7. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979).* 1994;23:1121–1131.
8. Reis SE, Holubkov R, Lee JS, et al. Coronary flow velocity response to adenosine characterizes coronary microvascular function in women with chest pain and no obstructive coronary disease. Results from the pilot phase of the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999;33:1469–1475.
9. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1987;92:639–646.
10. Barberà JA, Peinado VI, Santos S, et al. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001;164:709–713.
11. Willis AL, Smith DL, Vigo C, et al. Effects of prostacyclin and orally active stable mimetic agent RS- 93427-007 on basic mechanisms of atherogenesis. *Lancet (London, England).* 1986;2:682–683.
12. Nana-Sinkam SP, Lee JD, Sotto-Santiago S, et al. Prostacyclin prevents pulmonary endothelial cell apoptosis induced by cigarette smoke. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007;175:676–685.
13. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1986;315:1046–1051.
14. Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation.* 1990;81:1586–1593.
15. Cohen RA, Zitnay KM, Haudenschild CC, et al. Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circ. Res.* 1988;63:903–910.
16. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, et al. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1984;160:618–623.
17. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. *JAMA.* 1994;272:1497–1505.
18. Sackett DL, Gibson RW, Bross ID, et al. Relation between aortic atherosclerosis and the use of cigarettes and alcohol. An autopsy study. *N. Engl. J. Med.* 1968;279:1413–1420.
19. Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Smoking in relation to atherosclerosis of the coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1965;273:775–779
20. Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, et al. Identification of oxidative stress related proteins as biomarkers for lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease in bronchoalveolar lavage. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:3440–3455.
21. Pavasini R, D'Ascenzo F, Campo G, et al. Cardiac troponin elevation predicts all-cause mortality in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cardiol.* 2015;191:187–193.
22. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur. Respir. J.* 2003;22:672–688.
23. Domej W, Oettl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD—implications and relevance for treatment. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2014;9:1207–1224.
24. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J. Suppl.* 2003;46:14s–27s.
25. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996;154:813–816.
26. Boschetto P, Beghé B, Fabbri LM, et al. Link between chronic obstructive pulmonary disease and coronary artery disease: implication for clinical practice. *Respirology.* 2012;17:422–431.
27. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, et al. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax.* 2000;55:114–120.
28. Gompertz S, Bayley DL, Hill SL, et al. Relationship between airway inflammation and the frequency of exacerbations in patients with smoking related COPD. *Thorax.* 2001;56:36–41.
29. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Chest Med.* 2014;35:71–86.
30. Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax.* 2004;59:574–580.
31. Austin V, Crack PJ, Bozinovski S, et al. COPD and stroke: are systemic inflammation and oxidative stress the missing links? *Clin. Sci. (Lond).* 2016;130:1039–1050.
32. Thomsen M, Ingebrigtsen TS, Marott JL, et al. Inflammatory biomarkers and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA.* 2013;309:2353–2361.
33. Foster GE, Hanly PJ, Ahmed SB, et al. Intermittent Hypoxia Increases Arterial Blood Pressure in Humans Through a Renin-Angiotensin System-Dependent Mechanism. *Hypertension.* 2010;56.
34. Vivodtzev I, Tamisier R, Baguet J-P, et al. Arterial stiffness in COPD. *Chest.* 2014;145:861–875.
35. Sabit R, Bolton CE, Edwards PH, et al. Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care*



- Med. 2007;175:1259–1265.
36. Miner SES, Al-Hesayen A, Nield LE, et al. Acetylcholine acutely modifies nitric oxide synthase function in the human coronary circulation. *Exp. Physiol.* 2010;95:1167–1176.
 37. Stein CM, Brown N, Vaughan DE, et al. Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998;32:117–122.
 38. Stabenfeldt SE, Gossett JJ, Barker TH. Building better fibrin knob mimics: an investigation of synthetic fibrin knob peptide structures in solution and their dynamic binding with fibrinogen/fibrin holes. *Blood.* 2010;116:1352–1359.
 39. Gimbrone MA, Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990;598:77–85.
 40. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:165–197.
 41. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6:508–519.
 42. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1997;96:4219–4225.
 43. Marwick JA, Stevenson CS, Giddings J, et al. Cigarette smoke disrupts VEGF165-VEGFR-2 receptor signaling complex in rat lungs and patients with COPD: morphological impact of VEGFR-2 inhibition. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006;290:L897–908.
 44. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:1185–1189.
 45. Murasawa S, Kawamoto A, Horii M, et al. Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:1388–1394.
 46. Asosingh K, Swaidani S, Aronica M, et al. Th1- and Th2-dependent endothelial progenitor cell recruitment and angiogenic switch in asthma. *J. Immunol.* 2007;178:6482–6494.
 47. Heiss C, Amabile N, Lee AC, et al. Brief Secondhand Smoke Exposure Depresses Endothelial Progenitor Cells Activity and Endothelial Function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008;51:1760–1771.
 48. Caramori G, Rigolin GM, Mazzoni F, et al. Circulating endothelial stem cells are not decreased in pulmonary emphysema or COPD. *Thorax.* 2010;65:554–555.
 49. Paschalaki KE, Starke RD, Hu Y, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence. *Stem Cells.* 2013;31:2813–2826.
 50. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.* 2004;56:515–548.
 51. Kasahara, Tuder, Cool, et al. Expression of 15-lipoxygenase and evidence for apoptosis in the lungs from patients with COPD. *Chest.* 2000;117:260S.
 52. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, et al. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001;163:737–744.
 53. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur. Respir. J.* 2001;17:946–953.
 54. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003;28:555–562.
 55. Platakis M, Tzortzaki E, Rytala P, et al. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2006;1:161–171.
 56. Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2009;4:19–31.
 57. Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Mizuno S. COPD/emphysema: The vascular story. *Pulm. Circ.* 1:320–326.
 58. Yanada M, Kojima T, Ishiguro K, et al. Impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: lipopolysaccharide and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin-deficient mice. *Blood.* 2002;99:2455–2458.
 59. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, et al. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* 2009;335:143–151.
 60. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* 2003;109:175–180.
 61. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, et al. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front. Biosci.* 2004;9:1118–1135.
 62. Gordon C, Gudi K, Krause A, et al. Circulating Endothelial Microparticles as a Measure of Early Lung Destruction in Cigarette Smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;184:224–232.
 63. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, et al. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax.* 2012;67:1067–1074.
 64. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 2012;33:829–37, 837a–837d.
 65. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, et al. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation.* 2009;120:502–509.
 66. Huang AL, Silver AE, Shvenke E, et al. Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:2113–2119.
 67. Anderson TJ, Charbonneau F, Title LM, et al. Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: long-term results from the Firefighters and Their Endothelium (FATE) study. *Circulation.* 2011;123:163–169.
 68. Lind L, Berglund L, Larsson A, et al. Endothelial function in resistance and conduit arteries and 5-year risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2011;123:1545–1551.
 69. Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Noninvasive assessment of endothelial function in clinical practice. *Rev. española Cardiol. (English ed.)*. 2012;65:80–90.
 70. Mattace-Raso FUS, van der Cammen TJM, Hofman A, et al. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation.* 2006;113:657–663.
 71. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, et al. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation.* 2006;113:664–670.

