

Tajda Košir Božič<sup>1\*</sup>, Jurij Aleš Košir<sup>2\*</sup>

## Vpliv neprilizinskega zaviralca sakubitriila v kombinaciji z valsartanom na endotelijsko funkcijo in telesno zmogljivost bolnikov s kroničnim srčnim popuščanjem

*The Effect of Neprilysin Inhibitor Sacubitril in Combination with Valsartan on Endothelial Function and Exercise Capacity of Patients with Chronic Heart Failure*

### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: sakubitril, valsartan, endotelijska funkcija, telesna zmogljivost

**IZHODIŠČA.** Zaviranje neprilizinskega sistema predstavlja nov pristop za zdravljenje bolnikov s srčnim popuščanjem. V raziskavi smo želeli oceniti obremenitveno zmogljivost in vpliv neprilizinskega zaviralca sakubitriila v kombinaciji z valsartanom na od endotelija odvisno in neodvisno vazodilatacijo. **METODE.** V pregledno nerandomizirano raziskavo smo vključili 25 bolnikov s kroničnim srčnim popuščanjem z iztisnim deležem, manjšim od 40 %. Razporedili smo jih v dve skupini. Prva skupina je ob vključitvi začela z jemanjem zdravila sakubitril/valsartan, kontrolna skupina pa je prejela zaviralec angiotenzin pretvarjajočega encima. Pri bolnikih smo izhodiščno in po osmih tednih z UZ ocenili od endotelija odvisno in neodvisno vazodilatacijo ter spiroergometrično določili največjo porabo kisika med naporom. **REZULTATI.** Vsi bolniki so zaključili raziskavo. Od endotelija odvisna vazodilatacija se v nobeni skupini ni pomembno povečala. Od endotelija neodvisna vazodilatacija je bila po osmih tednih v skupini s sakubitrilom in valsartanom pomembno boljša kot v kontrolni skupini:  $16,1 \pm 8,4$  % pri sakubitril/valsartanu proti  $7,9 \pm 2,8$  % pri kontrolni skupini ( $p = 0,012$ , dvosmerni Mann-Whitneyjev test). Največja poraba kisika med naporom se je v skupini, ki je jemala sakubitril/valsartan, pomembno povečala ( $3,6 \pm 0,4$  metaboličnih ekvivalentov (MET) ob začetku proti  $4,4 \pm 0,5$  MET ob koncu raziskave,  $p = 0,001$ ). **ZAKLJUČKI.** Kombinacija sakubitriila in valsartana v primerjavi z običajnim zdravljenjem ne vpliva na vazodilatacijo, odvisno od endotelija; izboljša pa od endotelija neodvisno vazodilatacijo in telesno zmogljivost.

<sup>1</sup> Tajda Košir Božič, dr. med., Klinični oddelek za gastroenterologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; bozic.tayda@gmail.com

<sup>2</sup> Jurij Aleš Košir, dr. med., Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

\* Avtorja si delita mesto prvega avtorstva. Objavljeno delo je bilo nagrajeno s fakultetno Prešernovo nagrado v letu 2017.

## ABSTRACT

KEY WORDS: sacubitril, valsartan, endothelial function, exercise capacity

**BACKGROUND.** Neprilysin inhibition represents a new approach to treatment of heart failure. The aim of our study was to assess the effect of neprilysin inhibitor sacubitril in combination with valsartan on endothelium-dependent and independent vasodilation and on exercise capacity. **METHODS.** In our prospective non-randomised study, we included 25 patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction. They were divided into two groups. The patients in the first group were given sacubitril and valsartan, while the patients in the second group received treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors. Measurements of the endothelium dependent and independent brachial artery dilation using ultrasound and of exercise capacity using spirometry were made at the beginning of the study and after eight weeks of treatment. **RESULTS.** All of the patients finished the study. Endothelium dependent dilation did not significantly improve in either of the groups. After eight weeks, endothelium independent dilation was significantly greater in the sacubitril/valsartan group compared to the control group:  $16.1 \pm 8.4\%$  in the sacubitril/valsartan group versus  $7.9 \pm 2.8\%$  in the control group ( $p = 0.012$ , Mann-Whitney test). A two-tailed t-test showed significant improvement of exercise capacity in the group receiving sacubitril/valsartan: from  $3.6 \pm 0.4$  metabolic equivalents (MET) to  $4.4 \pm 0.5$  MET ( $p = 0.001$ ). **CONCLUSIONS.** Treatment with sacubitril and valsartan as compared with standard treatment did not improve endothelium dependent dilation. The study group treated with sacubitril and valsartan had greater endothelial independent dilation after eight weeks compared to the control group. Sacubitril and valsartan significantly improved exercise capacity.

## IZHODIŠČA

Srčno popuščanje (SP) lahko opredelimo kot stanje, pri katerem srce ni zmožno zagotoviti zadostnega minutnega srčnega iztisa glede na presnovne potrebe brez povišanega polnilnega tlaka (1). SP je lahko končna posledica katerekoli srčne bolezni, najpogosteje pa do njega privedeta ishemična bolezen srca in arterijska hipertenzija (2). Glede na to, ali je prizadeta predvsem črpalna sposobnost srca ali predvsem polnitev, ločimo sistolično in diastolično SP (3). Črpalno sposobnost srca ocenimo s pomočjo iztisnega deleža levega prekata (angl. *left ventricular ejection fraction*, LVEF). Ta je znižan pri sistoličnem SP, pri diastoličnem SP pa je ohranjen (4, 5). Glede na stopnjo simptomov razdelimo bolnike v enega izmed štirih razredov po merilih Newyorškega združenja za srce (angl. *New York Heart Association*, NYHA) (6).

Odkvisno od hitrosti razvoja ločimo kronično in akutno SP. Kronično SP se v primerjavi z akutnim razvija postopoma, klinični znaki in simptomi so manj izraziti, v ospredju njegove patofiziologije pa so predvsem kompenzatorni mehanizmi (1, 7). Kompenzatorni mehanizmi vključujejo povečano vzdražnost nevrohormonskih osi. Aktivirajo se zaradi nezadostne dostave krvi tkivom in sprva predstavljajo koristno kompenzacijo, sčasoma pa postanejo del bolezenskega procesa in ga celo poslabšajo (8, 9). K tem mehanizmom spadajo povečana vzdraženost simpatičnega živčevja, renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema (RAAS) in natriuretične osi. RAAS se aktivira zaradi nezadostne prekrvavitve ledvic, ki sproščajo renin v kri. Natriuretični peptidi se sproščajo iz srčnomišičnih vlaken (nateg srčnomišičnih vlaken zaradi hemodinamičnih sprememb). Njihova kon-

centracija je sorazmerna volumski preobremenitvi, zato jih uporabljamo kot diagnostični kazalnik in prognostični napovednik pri kroničnem SP (4). Imajo predvsem ugodne vplive (natriureza in zmanjšanje hipertrofije ter fibroze), vendar se zaradi učinkov simpatičnega živčevja in RAAS njihovi učinki zmanjšajo (9). Tako neuravnovešena aktivacija nevrohormonskih mehanizmov ima mnogo učinkov tudi na srce. Povzroči hipertrofijo, nekrozo in apoptozo srčnomišičnih celic ter razrast fibroznega tkiva v srcu, kar škodljivo preoblikuje srčno mišico in spremeni geometrijo prekata (10). Spremeni se tudi presnova v organizmu, razgradnja prevlada nad izgradnjo, v telesu pa se poveča oksidativni stres, ki vzdržuje kronično vnetje in okvara endotelij (11).

### Endotelijska disfunkcija

Žilni endotelij je notranja enoslojna plast žilne stene, ki z lokalnim sproščanjem mediatorjev uravnava žilni tonus, proliferacijo gladkomišičnih celic, vnetje v žilni steni, adhezijo trombocitov, aktivnost fibrinolize ter ohranja žilno homeostazo (12). Ustrezno delovanje endotelija omogoča dušikov monoksid (NO), ki učinkuje na gladkomišične celice in širi žile (13). Moteno endotelijsko funkcijo zaznamo pri številnih boleznih, med katerimi sta najpomembnejši ateroskleroza in SP (12, 13). Patofiziološki mehanizmi, ki se aktivirajo v sklopu kroničnega SP, postopoma povzročijo disfunkcijo endotelija. Ta namreč ne sprošča več zadostnih količin NO, ki bi zagotavljale primerno vazodilatacijo (15). Posledice okvare so vazokonstrikcija, vnetje, tromboze in proliferacija gladkomišičnih celic (16).

### Zmanjšana telesna zmogljivost

Zmanjšana telesna zmogljivost je eden ključnih simptomov kroničnega SP (17–20). Do nje vodijo številni vzroki, katerih ključna skupna lastnost je, da povzročijo neza-

dostno prekrvavitev skeletnega mišičja med naporom. Najdlje poznani med njimi so slabša zmogljivost prekatov, prerazporeditev obtoka v življenjsko pomembne organe zaradi povečane vzdražnosti simpatičnega živčevja in zaradi več razlogov okrnjena sposobnost vazodilatacije. Do nje lahko pride zaradi kopičenja natrija in vode v žilni steni ter intersticiju bolnikov s kroničnim SP, povečane vzdraženosti simpatičnega živčevja in zvišane ravni angiotenzina II (21, 22). Pomemben razlog za okrnjeno vazodilatacijo je tudi endotelijska okvara. Zaradi zmanjšane telesne zmogljivosti bolniki pogosto opustijo telesno dejavnost, kar pospeši periferne spremembe (23). Zaradi slabše prekrvavitve mišic in telesne nedejavnosti se pojavijo atrofija ter patološke spremembe skeletnega mišičnega tkiva (24, 25).

### Zdravljenje srčnega popuščanja

Za zdravljenje SP uporabljamo več skupin zdravil. Mednje spadajo zaviralci angiotenzin pretvarajočega encima (angl. *angiotensin converting enzyme*, ACE), zaviralci angiotenzinskih receptorjev (AR), zaviralci adrenergičnih receptorjev  $\beta$  in zaviralci mineralokortikoidnih receptorjev (4, 26–28). Naštetim zdravilom se dodajajo druga zdravila, ki olajšajo simptome SP, npr. diuretiki, ivabradin in digoksin (4, 29, 30).

Julija 2015 je ameriška Agencija za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila novo zdravilo za zdravljenje SP, ki vsebuje dve učinkovini: zaviralec neprilizina sakubitril ter zaviralec AR valsartan (sakubitril v kombinaciji z valsartanom, S-V) (31, 32). Z zdravilom delujemo na dve poti s pomembnim vplivom na napredovanje SP (31).

Z zaviralcem AR zaviramo delovanje RAAS. Tako se na srcu, žilah in ledvicah zavre od angiotenzina odvisen razvoj fibroze, vnetja in hipertrofije (31, 33).

Sakubitril zavira encim neprilizin, ki je odgovoren za razgradnjo natriuretinskih

peptidov, bradikinina, substance P, vazomotornega intestinalnega peptida, glukagona, nevrotenzina in adrenomedulina (33). Delovanje omenjenih peptidov je pri SP premo izraženo. Njihova zavrtost je posledica zmanjšane pretvorbe natriuretičnih peptidov v aktivno obliko, zmanjšane odzivnosti nanjo in njenega povečanega očistka, pri čemer ima vlogo povečana aktivnost neprilizina (31, 33). Natriuretični peptidi povečajo glomerulno filtracijo, zmanjšujejo ponovno absorpcijo soli, zavirajo zanko RAAS in simpatično živčevje ter zmanjšajo sproščanje endotelina. Na srce učinkujejo protivnetno, zavirajo razrast veziva in nastanek hipertrofije. Bradikinin prispeva k vazodilataciji, vendar skupaj s substancio P povzroča kašelj in angioedem, ki sta značilna stranska učinka zaviralcev ACE in zaviralcev neprilizina. Z zaviralci neprilizina se zato ne uporabljajo zaviralci ACE, ampak zaviralci AR, ki nimajo takšnih stranskih učinkov. Izolirana uporaba zaviralcev neprilizina bi močno kompenzatorno povečala aktivnost zanke RAAS, ki jo uspešno zavremo s sočasno kombinacijo z zaviralci AR (31).

Kombinacija S-V se je v primerjavi z zaviralci ACE izkazala za boljši način zdravljenja kroničnega SP z zmanjšanim LVEF. Zdravljenje s S-V pomembno podaljša preživetje in zmanjša število bolnišničnih obravnav v primerjavi z zdravljenjem z zaviralci ACE. Novo zdravljenje sicer prinaša večje tveganje za pojav hipotenzije in angioedema, zmanjša pa verjetnost za pojav ledvične okvare in hiperkaliemije ter nastanek kašlja (33, 34).

## Hipoteza

Predvidevamo, da bo osemtedensko zdravljenje s S-V izboljšalo od endotelija odvisno in neodvisno vazodilatacijo nadlaktne arterije ter obremenitveno zmogljivost pri bolnikih s kroničnim sistoličnim SP in znižanim LVEF v primerjavi z običajno oskrbo z zaviralcem ACE.

## METODE

### Preiskovanci

V raziskavo smo vključili bolnike s kroničnim SP, ki so ustrezali vključitvenim merilom, in izključili tiste, pri katerih smo zaznali izključitveno merilo (tabela 1). Preiskovance smo poiskali v registru Ambulante za srčno popuščanje Kliničnega oddelka za žilne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Vsi preiskovanci so imeli pred vključitvijo v raziskavo dokazano SP in z UZ izmerjen znižan LVEF po Simpsonovi metodi. Pri vključevanju preiskovancev smo upoštevali veljavna načela za vključevanje bolnikov s kroničnim SP v programe telesne vadbe.

Preiskovance smo ob vključitvenem pregledu seznanili s potekom raziskave. Pripravljenost sodelovanja so vsi preiskovanci potrdili s podpisom obrazca po poučtvi. Pri izvajanju raziskave smo spoštovali načela Kodeksa medicinske etike in deontologije, Helsinško-Tokijske deklaracije ter Konvencije o varovanju človekovih pravic in dostojanstva. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (soglasje št. 0120-56/2017-4).

### Potek raziskave

Raziskava je bila pregledna in zasnovana kot neslep klinični preizkus. Preiskovance smo razporedili v dve skupini – v skupino 13 bolnikov, ki so se ob zamenjavi standardnega zdravljenja z zaviralcem ACE ali AR za S-V strinjali z vključitvijo v raziskavo, ali v kontrolno skupino 12 bolnikov, ki je prejela zaviralec ACE v skladu s smernicami Evropskega združenja za kardiologijo. Raziskava ni imela kontrolne skupine s placebom. S takšno zasnovo smo zaobšli etični pomislek, da bi namesto dokazano učinkovitega zdravljenja bolnikom ponudili placebo. Vsem bolnikom smo zato ponudili uvedbo zdravila in jim ga uvedli v časovnem razponu, ki so si ga izbrali, t. i. stopenjski protokol (angl. *step-wedge design*). Bolnike, ki so želeli na uvedbo počakati do

**Tabela 1.** Vključitvena in izključitvena merila raziskave. NYHA – klasifikacija Newyorškega združenja za srce (angl. *New York Heart Association*), LVEF – iztisni delež levega prekata po Simpsonovi metodi (angl. *left ventricular ejection fraction*).

**Vključitvena merila:**

- razred funkcijske prizadetosti po merilih NYHA II ali III,
- motnja sistolične funkcije (LVEF<sup>a</sup> manjši od 40 %),
- optimalno farmakološko zdravljenje in
- stabilno stanje ob začetku preiskave vsaj mesec dni.

**Izključitvena merila:**

- akutni infarkt srčne mišice manj kot tri mesece pred vključitvenim pregledom,
- prisotnost atrijske fibrilacije,
- klinično pomembne prekatne motnje ritma,
- srčna frekvenca manj kot 65/min,
- atrioventrikularni blok II. ali III. stopnje,
- nedavni tromboembolični zapleti,
- neurejene bolezni presnove ali žlez z notranjim izločanjem,
- prenehanje s terapijo z zdravili za kronično srčno popuščanje in
- poškodba gibalnega sistema, ki onemogoča obremenitveno testiranje.

<sup>a</sup> Po Simpsonovi metodi.

rednega kontrolnega pregleda, smo povabili na izhodiščne in končne meritve v razmiku osmih tednov naključno, bodisi pred uvedbo zdravljenja (ter jih upoštevali kot kontrole) bodisi ob uvedbi zdravljenja in po osmih tednih. Hkrati smo v končni fazi pri vseh bolnikih (tudi kontrolah) uvedli ustrezno zdravljenje, le da jih nismo vključili v meritve. Preiskovanci v intervencijski skupini so prejeli S-V prva dva tedna v odmerku 24/26 mg na 12 ur, nato smo odmerek povečali za dva tedna na 49/51 mg na 12 ur, nato smo prešli na končni *per os* odmerek 97/103 mg na 12 ur. V primeru neželenih učinkov (nizek krvni tlak, slabšanje ledvičnega delovanja, elektrolitne motnje ali katerikoli drugi neželeni učinek) smo odmerek zmanjšali na tisti odmerek, ki ga je bolnik prenašal. Pri prilagajanju odmerka smo tako sledili priporočilom, ki so jih uporabili v raziskavi PARADIGM-HF (4, 34).

Raziskava je vključevala dva obiska preiskovancev: začetni obisk in obisk po osmih tednih jemanja zdravil. Pri vsakem obisku smo z UZ izmerili endotelijsko odvisno in neodvisno dilatacijo na nadlaktni

arteriji ter največjo porabo kisika med vadbo na cikloergometru.

## Ultrazvočna preiskava

Pri vseh preiskovancih smo meritve na nadlaktni arteriji opravili v ležečem položaju po najmanj desetih minutah počitka v tistem prostoru z nadzorovano temperaturo v območju 22–24 °C. Preiskovance smo prosili, da so bili pred meritvami tešči vsaj osem ur in da v tem času niso bili fizično aktivni ter niso uživali alkoholnih pijač, kofeinskih napitkov, hrane z visoko vsebnostjo maščob in niso kadili. Meritve so bile pri preiskovancih narejene v enakem času dneva (35). Pred začetkom preiskave smo preiskovancem na levi nadlakti izmerili krvni tlak. Prikaz arterijske svetline smo uskladili s srčnim ciklom s pomočjo sočasnega EKG. Vse UZ meritve smo izvajali na desni nadlaktni arteriji na UZ aparatu Hitachi Aloka – ProSound Alpha 10 (japonskega proizvajalca Aloka Co., LTD). Meritve smo opravljali avtorji naloge. Tehnike merjenja smo se učili nekaj mesecev na zdravih prostovoljcih, tako da je postopek merjenja potekal ponovljivo.

Pri preiskovancih smo pred intervencijskim obdobjem in po njem določili od endotelija odvisno vazodilatacijo nadlaktne arterije z UZ-metodo po Celermajerju (36). Metoda se opira na ugotovitev, da povečanje krvnega pretoka povzroči v arterijah s funkcijsko neokrnjenim endotelijem sproščanje NO in posledično razširitev žile (37–39). V žilah z endotelijsko disfunkcijo, kjer je sproščanje NO prizadeto, pa je vazodilatacija manj izrazita (40). V nasprotju s povečanjem pretoka, ki povzroča razširjanje žil posredno z delovanjem na endotelij, deluje gliceril trinitrat neposredno na gladkomišične celice v arterijski žilni steni, zato je njegov učinek neodvisen od endotelija. Tako lahko ločimo med motnjami v delovanju endotelija in motnjami v delovanju gladkomišičnih celic v arterijskih stenah. Celermajerjeva metoda je neinvazivni način merjenja endotelijske funkcije, dobro korelira z invazivnimi metodami ter daje dobro ponovljive rezultate (41).

Povečan pretok in strižne sile v nadlaktni arteriji dosežemo z nekajminutnim zažetjem podlakti, ki zaradi ishemije in pospešenega nastajanja vazoaktivnih presnovkov povzroči prehodno razširitev žilja v podlakti. Ko sprostimo zažem, se v nadlaktni arteriji zaradi distalne dilatacije poveča pretok in z njim sproščanje NO, kar vodi v razširitev nadlaktne arterije, ki jo izmerimo z UZ.

Pri vseh preiskovancih smo s pomočjo visokoločljivega UZ z 10 MHz linearno sondo določili hemodinamske značilnosti nadlaktne arterije (41). S sondo smo desno nadlaktno arterijo najprej prikazali prečno in nato vzdolžno 5–12 cm nad komolčno kotanjo. Mesto prikaza smo označili, da smo lahko merili na stalnem mestu. Ko je bila slika jasna in smo lahko natančno določili sprednji in zadnji rob med intimo in žilno svetlino, smo sliko zamrznili in opravili tri meritve premera nadlaktne arterije. Tako smo izmerili izhodiščni premer nadlaktne arterije. Podlaket smo nato zaželi z manšeto merilca krvnega tlaka s tlakom 200 mmHg

ali z vrednostjo tlaka, ki je za 50 mmHg višja od preiskovančevega sistolnega tlaka, če je bila ta vrednost višja. Zažetje podlakti povzroči ishemijo in sproščanje vazoaktivnih peptidov, ki ob sprostitvi zažema povečajo pretok v nadlaktni arteriji. Povečan pretok z delovanjem strižnih sil na endotelij proksimalnega odseka nadlaktne arterije sprošča NO, ki jo razširi (12). Takšna razširitev je odvisna od ustreznega delovanja endotelija in jo uporabimo za oceno endotelijske funkcije (41). Razširitev nadlaktne arterije se po zažemu sicer povečuje s trajanjem zažema do 4,5 minut, kasneje pa se ne povečuje več, zato smo po tem času manšeto sprostili (42). V 60–90 sekundah po sprostitvi zažema smo izmerili premer arterije.

Od pretoka oz. endotelija odvisno vazodilatacijo (angl. *flow-mediated dilation*, FMD) smo izračunali kot količnik med razliko premerov arterije po povečanem pretoku in izhodiščne vrednosti ter izhodiščnega premera arterije.

Po desetih minutah počitka smo izmerili še od endotelija neodvisno vazodilatacijo (angl. *nitroglycerin-mediated dilation*, NMD), sproženo z 0,8 mg gliceril trinitrata, ki ga je bolnik zaužil z dvema podjezičnima vpihoma. Premer nadlaktne arterije smo izmerili 4,5 minute po zaužitju zdravila. NMD smo izračunali kot količnik med razliko premerov arterije po zaužitju gliceril trinitrata in izhodiščne vrednosti ter izhodiščnega premera arterije.

## Obremenitveno testiranje

Ob vključitvi v raziskavo in po intervencijskem obdobju smo pri bolnikih opravili obremenitveno testiranje za oceno največje porabe kisika med telesno obremenitvijo. Obremenitveno testiranje smo opravili na cikloergometru znamke Schiller, tip Cardiovit CS-200. Preiskovance smo prosili, da niso jedli, kadili, pili alkoholnih ali kofeinskih pijač vsaj tri ure pred testiranjem. Med testiranjem smo pri bolnikih spremljali srčni utrip in krvni tlak.

Za vsakega preiskovanca smo iz tablic Svetovne zdravstvene organizacije po Stephardu odčitali največjo dovoljeno obremenitev (v vatih) in največjo pričakovano srčno frekvenco ob obremenitvi. Testiranje smo prekinili ob pojavu simptomov (izčrpanost, občutek težkega dihanja ter bolečina v prsih ali nogah), znakov (porast krvnega tlaka na več kot 250/120 mmHg, padec sistoličnega krvnega tlaka za več kot 10 mmHg, dosežek največjega srčnega utripa, zmanjšanje srčnega utripa) in sprememb v zapisu EKG (upad spojnice ST za več kot 3 mm, porast spojnice ST za več kot 1 mm, pojav aritmij) (1). Da bi se izognili morebitnim zapletom, smo preiskovance po obremenitvi še 20 minut zadržali v čakalnici.

Velikost obremenitve smo izmerili glede na porabo kisika, ki jo je aparat za spiroergometrijo izračunal kot razliko v koncentraciji kisika v vdihanem in izdihanem zraku. To smo izrazili v metaboličnih ekvivalentih (MET) – 1 MET opredeljuje porabo kisika med mirovanjem 70 kg težkega, 40 let starega moškega (3,5 ml O<sub>2</sub>/min/kg). Obremenitveno testiranje smo ponovili po osmih tednih intervencijskega obdobja.

### Statistične metode

Normalnost porazdelitve spremenljivk smo preverili kvalitativno s slikovnim prikazom porazdelitve za posamezno spremenljivko. Normalno razporejene zvezne spremenljivke smo izrazili s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom, nenormalno razporejene zvezne spremenljivke smo izrazili z mediano vrednostjo ter prvim in tretjim kvartilom, kategorične spremenljivke pa smo izrazili s številom in deležem.

Razlike med posameznimi skupinami bolnikov smo preverjali z dvosmernim Studentovim t-testom za normalno razporejene neodvisne spremenljivke in z dvosmernim Mann-Whitneyjevim testom U za asimetrično razporejene spremenljivke.

Kategorične spremenljivke smo primerjali s testom  $\chi^2$ .

Razlike med meritvami pred intervencijskim obdobjem in po njem smo preverjali z dvosmernim parnim t-testom za normalno razporejene spremenljivke in dvosmernim Wilcoxonovim testom za asimetrično razporejene spremenljivke.

Statistične izračune smo opravili s pomočjo računalniškega programa SPSS 22.0 (IBM Corporations, 2013) za programsko okolje Windows. Vrednost  $p < 0,05$  smo ovrednotili kot statistično značilno.

## REZULTATI

### Izhodiščne značilnosti preiskovancev

V raziskavo smo vključili 25 preiskovancev s kroničnim SP (16 moških in 9 žensk), starosti 50–76 let. Preiskovanci so bili razdeljeni v dve skupini po 12 in 13 bolnikov, ki se med seboj nista pomembno razlikovali po starosti, vzrokih, ki so privedli do kroničnega SP, razredu funkcijske prizadetosti NYHA, LVEF in zdravljenju z zdravili (tabela 2). Raziskavo so zaključili vsi preiskovanci. P-vrednost smo izračunali s testom  $\chi^2$  za kategorične spremenljivke. Za ostale neodvisne spremenljivke smo uporabili dvo-smerni Studentov t-test za normalno razporejene neodvisne spremenljivke.

### Z ultrazvokom izmerjene značilnosti nadlaktne arterije

Premer v mirovanju, FMD in NMD se pred intervencijskim obdobjem med skupinama niso statistično pomembno razlikovali (tabela 3). Statistično značilnih razlik v FMD nismo zaznali niti znotraj posamezne skupine pred intervencijskim obdobjem in po njem niti med obema skupinama po intervencijskem obdobju (slika 1). Nasprotno pa se je NMD v skupini S-V povečala, v kontrolni skupini pa zmanjšala; razlika NMD med skupinama po intervencijskem obdobju je bila statistično značilna ( $p = 0,012$ ) (slika 2).

Razlike med posameznimi skupinami smo preverjali z dvosmernim Mann-Whitneyjevim testom U. Razlike med

meritvami pred intervencijskim obdobjem in po njem smo preverjali z dvosmernim Wilcoxonovim testom.

**Tabela 2.** Značilnosti preiskovancev ob vključitvi v raziskavo. NYHA – klasifikacija Newyorškega združenja za srce (angl. *New York Heart Association*), LVEF – iztisni delež levega prekata (angl. *left ventricular ejection fraction*), ACE – angiotenzin pretvarjajoči encim (angl. *angiotensin converting enzyme*), AR – angiotenzinski receptorji, N – število.

Parameter	Skupina, ki je prejela sakubitrid in valsartan	Kontrolna skupina	p-vrednost
Število moški/ženske, N (%)	8/5, (62/38)	8/4, (67/33)	0,790
Starost <sup>a</sup> (leta)	63,2 ± 7,1	64,5 ± 5,6	0,636
Vzrok: ishemična/neishemična kardiomiopatija, N (%)	9/4, (69/31)	8/4, (67/33)	0,891
NYHA II/III, N (%)	11/2, (85/15)	10/2, (83/17)	0,930
LVEF <sup>a</sup> (%)	31,3 ± 5,6	30,2 ± 6,1	0,629
Opravljen rehabilitacija, N (%)	11 (85)	10 (83)	0,930
<b>Zdravljenje z zdravili</b>			
Zaviralci ACE ali AR, N (%)	12 (92)	12 (100)	0,327
Zaviralci adrenergičnih receptorjev β, N (%)	9 (69)	12 (100)	0,121
Dolgodelujoči nitrati, N (%)	0 (0)	0 (0)	/
Diuretiki, N (%)	10 (77)	12 (100)	0,247
Spironolakton, N (%)	10 (77)	12 (100)	0,247
Statini, N (%)	9 (69)	8 (67)	0,891
Acetilsalicilna kislina, N (%)	8 (62)	8 (67)	0,790

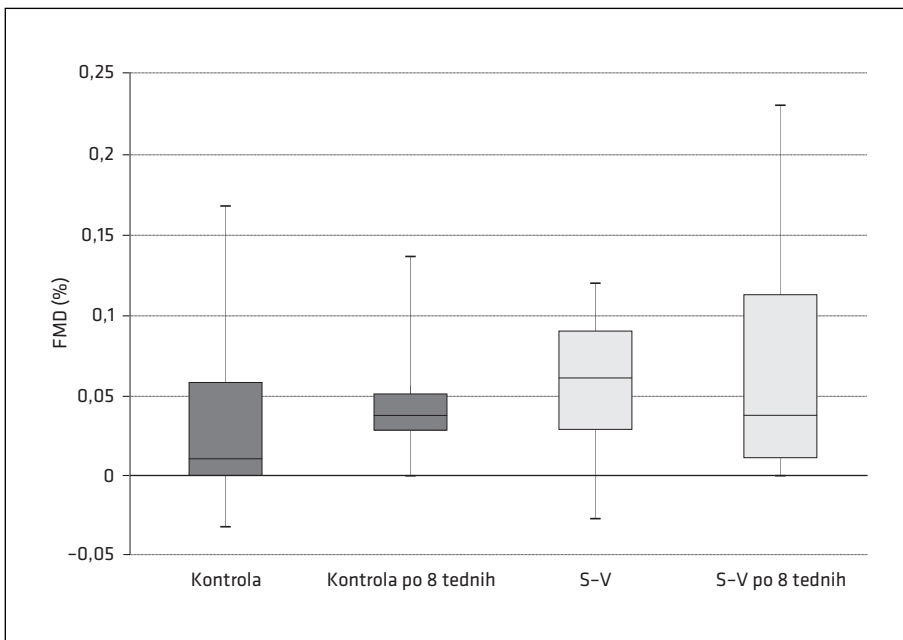
<sup>a</sup> Vrednosti za starost in iztisni delež so podane kot srednja vrednost ± standardni odklon, ostale vrednosti so podane s številom bolnikov in deležem.

**Tabela 3.** Z UZ izmerjene značilnosti nadlaktne arterije preiskovancev, ki so prejeli sakubitrid v kombinaciji z valsartanom, in v kontrolni skupini pred intervencijskim obdobjem ter po njem. FMD – od endotelija odvisna vazodilatacija (angl. *flow-mediated dilation*), NMD – od endotelija neodvisna vazodilatacija (angl. *nitroglycerin-mediated dilation*), S-V – sakubitrid v kombinaciji z valsartanom, K – kontrolna skupina.

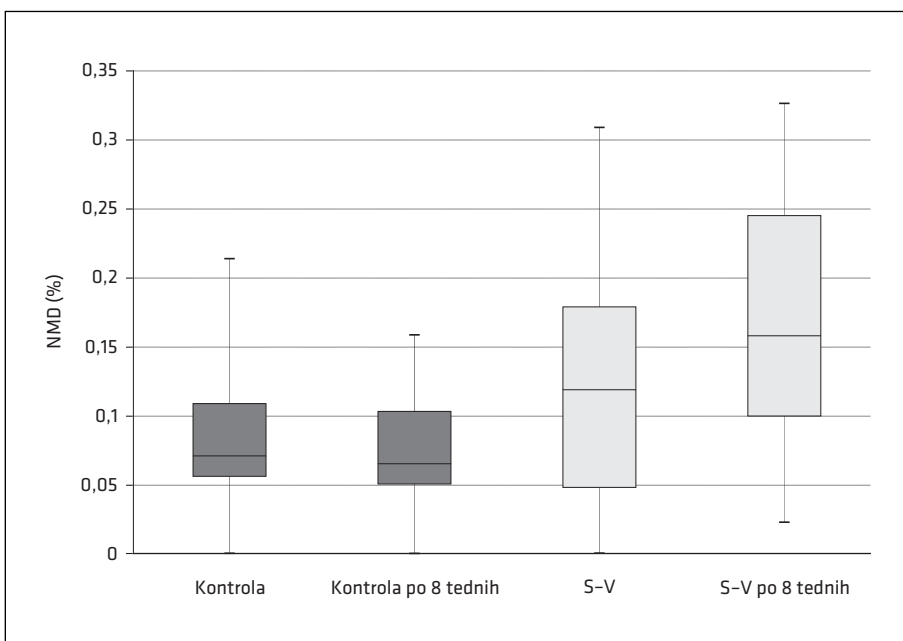
Parametere	Pred	Po	p-vrednost
Premer v mirovanju (mm)	S-V 3,9 ± 0,5	S-V 3,7 ± 0,8	0,925
	K 3,8 ± 0,5	K 3,8 ± 0,5	0,862
FMD (%)	S-V 6,0 ± 3,1	S-V 6,8 ± 5,7	0,575
	K 3,7 ± 3,7	K 4,3 ± 1,5	0,688
NMD (%)	S-V 13,3 ± 8,5	S-V 16,1 ± 8,4	0,171
	K 8,8 ± 3,1	K 7,9 ± 2,8	0,595

<sup>a</sup> Vrednosti so podane kot srednja vrednost ± standardni odklon.





**Slika 1.** Vrednosti od endotelija odvisne vazodilatacije preiskovancev, ki so prejeli sakubitril z valsartanom, in v kontrolni skupini. FMD – od endotelija odvisna vazodilatacija (angl. *flow-mediated dilation*), S-V – sakubitril v kombinaciji z valsartanom.



**Slika 2.** Vrednosti od endotelija neodvisne vazodilatacije preiskovancev, ki so prejeli sakubitril z valsartanom, in v kontrolni skupini. NMD – od endotelija neodvisna vazodilatacija (angl. *nitroglycerin-mediated dilation*), S-V – sakubitril v kombinaciji z valsartanom.

## Obremenitveno testiranje

Razlike med preiskovalnima skupinama pred intervencijskim obdobjem in po njem nista bili statistično značilni (slika 3). Pri obeh skupinah se je obremenitvena zmogljivost med naporom po intervencijskem obdobju povečala, vendar je bil porast največje porabe kisika med naporom statistično značilen le znotraj skupine, ki je jemala S-V ( $p = 0,001$ ) (tabela 4). Razlike med posameznimi skupinami smo preverjali z dvosmernim Studentovim t-testom za normalno razporejene spremenljivke. Razlike med meritvami pred intervencijskim obdobjem

in po njem smo preverjali z dvosmernim parnim t-testom za odvisne spremenljivke.

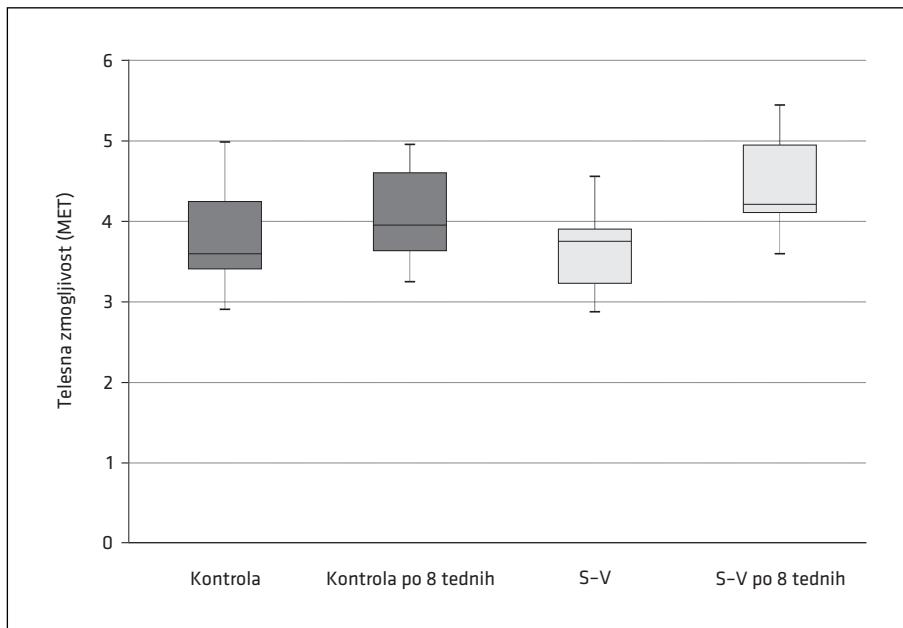
## RAZPRAVA Endotelijska funkcija

Naša raziskava ni pokazala, da bi zdravljenje s S-V izboljšalo od endotelijske odvisne vazodilatacije nadlaktne arterije v primerjavi z običajno oskrbo pri bolnikih s kroničnim SP z znižanim LVEF. Vrednosti FMD pri preiskovancih v naši raziskavi so bile višje, kot smo pričakovali za populacijo bolnikov s kroničnim SP, saj je bila večina vrednosti FMD nad mejo, ki določa endotelijsko

**Tabela 4.** Obremenitvena zmogljivost preiskovancev, ki so prejeli sakubitrid z valsartanom, in v kontrolni skupini pred intervencijskim obdobjem in po njem. MET – metabolični ekvivalent, S-V – sakubitrid v kombinaciji z valsartanom, K – kontrolna skupina.

Parametera	Pred	Po	p-vrednost
Obremenitvena zmogljivost <sup>a</sup> (MET)	S-V $3,6 \pm 0,4$ K $3,7 \pm 0,3$	S-V $4,4 \pm 0,5$ K $4,0 \pm 0,4$	0,001 0,121

<sup>a</sup> Vse vrednosti so podane kot srednja vrednost  $\pm$  standardni odklon.



**Slika 3.** Vrednosti obremenitvene zmogljivosti v metaboličnih ekvivalentih preiskovancev, ki so prejeli sakubitrid z valsartanom, in v kontrolni skupini. MET – metabolični ekvivalent, S-V – sakubitrid v kombinaciji z valsartanom.

disfunkcijo. Glede na izmerjene vrednosti naši preiskovanci niso imeli bolezenskih vrednosti FMD, torej niso imeli endotelijske disfunkcije, čeprav imajo SP in dejavnike tveganja za aterosklerozo in endotelijsko disfunkcijo. Normalne vrednosti FMD nadlaktne arterije pri zdravih preiskovanih srednjih let so se v nekaterih raziskavah gibale v območju 5,0–7,5 % (43, 44). V nekaterih raziskavah so bile njihove vrednosti celo 2,0–4,5 %, zato omenjena odstopanja sprožajo pomisleke o uporabnosti metode za ustrezno ocenjevanje endotelijske funkcije, na kar so opozorili že drugi raziskovalci (45–47, 58). Morda moramo vzrok za povečane vrednosti FMD iskati v jemanju zdravil za SP in sodelovanju pri nefarmakoloških ukrepih (npr. redna telesna dejavnost). Med zdravili, ki so imela vpliv na povečanje FMD, so zaviralci ACE ali AR, statini, zaviralci adrenergičnih receptorjev  $\beta$  in zaviralci aldosteronskih receptorjev. Bolniki, ki jih zdravimo s temi zdravili, imajo že zaradi samega zdravljenja izboljšano endotelijsko funkcijo (47–49). Znan je tudi učinek telesne vadbe na izboljšanje endotelijske funkcije (50). Učinki delovanja telesne vadbe in posameznih zdravil na endotelijsko funkcijo se po predvidevanju nekaterih avtorjev lahko celo seštevajo (47, 50). Načini delovanja zdravil iz različnih skupin se večinoma kljub temu deloma prekrivajo, zato je sprememba FMD, ki jo povzroča posamezno zdravilo, manjša. Tako smo pričakovali, da bo sprememba v FMD po intervencijskem obdobju na račun S-V majhna, saj sakubitril kot zaviralec neprilizina posredno zavira tudi zanko RAAS, kar je skupno tako zaviralcem ACE in AR, kot tudi zaviralcem aldosteronskih receptorjev (31).

Dokazano je bilo, da je endotelijska disfunkcija dober napovedni dejavnik za prihodnje srčno-žilne dogodke in povečano umrljivost pri bolnikih z znano ishemično boleznijo srca (51). Izhodiščno dobra endotelijska funkcija utegne napovedovati bolj-

ši potek bolezni pri skupini bolnikov, ki so bili vključeni v našo raziskavo; hkrati utegne kazati na razliko med populacijo naših bolnikov in bolnikov, ki so bili vključeni v raziskavo PARADIGM-HF, ki je pokazala učinek S-V na preživetje bolnikov s kroničnim SP in znižanim LVEF. Zdravljenje z zdravili, funkcijski razred po NYHA in povprečni LVEF so bili sicer primerljivi med našimi bolniki in študijsko populacijo PARADIGM-HF, vendar je velik delež naših bolnikov – ne pa tudi bolnikov v raziskavi PARADIGM-HF – predhodno zaključil rehabilitacijo, kar bi utegnilo pojasniti tovrstne razlike (33, 34).

NMD se je po intervencijskem obdobju med našima preiskovalnima skupinama statistično pomembno razlikoval. Pomembno večji je bil v skupini, ki je jemala S-V ( $p = 0,012$ ). Raziskave, ki so spremljale učinek valsartana na od endotelija odvisno in neodvisno vazodilatacijo nadlaktne arterije, niso ugotovile pomembnih sprememb NMD, so pa ugotovile izboljšanje FMD (47, 48). Razlog za izboljšanje NMD lahko torej iščemo v delovanju sakubitрила na patofiziološke poti, ki obidejo zanko RAAS.

NMD predstavlja od endotelija neodvisen potencial arterije, da se razširi. Nitroglicerina namreč neposredno deluje na gladko mišičje, njegov učinek je zato neodvisen od endotelija. Na od nitroglicerina odvisen potencial za razširjanje arterije vpliva izraženost vazokonstrikcije arterije v mirovanju in zmožnost gladkega mišičja arterij, da se sprosti. Med našima preiskovanima skupinama ni bilo pomembnih razlik v premeru arterije v mirovanju, zato lahko predpostavimo, da je bila izraženost vazokonstrikcije v mirovanju med preiskovanima skupinama enaka. Manjši NMD torej predstavlja predvsem manjšo zmožnost gladkega mišičja arterij, da se povsem sprosti, kar je povezano s proliferacijo gladkega mišičja v arterijski steni in z napredovanjem ateroskleroze, ki otrdi žile (52, 53). V raziskavah, kjer so spremljali NMD in

FMD, so ugotovili, da sta oba kazalnika neodvisna dejavnika tveganja za napredovanje koronarne bolezni in prihodnje srčno-žilne zaplete (54). Analogno temu so pri preiskovancih s slabšim NMD ugotovili večjo količino kalcija v koronarnih arterijah (55). Boljši NMD v prid S-V, ki smo ga ugotovili v naši raziskavi, je v skladu z dognanji raziskave PARADIGM-HF, ki je potrdila boljše preživetje bolnikov s SP, ki so jemali S-V. Posredni kazalniki torej kažejo, da boljši NMD napoveduje boljši potek bolezni; v tem pogledu naši izsledki dodatno ponujajo patofiziološko razlago, zakaj je raziskava PARADIGM-HF pokazala boljše preživetje ob zdravljenju s S-V – pri tem je pomemben učinek na vazodilatacijo arterij, ki ni odvisna od delovanja endotelija, pač pa od gladkomišičnega sproščanja žilne stene (33, 34).

### Obremenitvena zmogljivost

Obremenitvena zmogljivost se je pri preiskovancih, ki so prejeli S-V, pomembno povečala ( $p < 0,001$ ). Obremenitvena zmogljivost je določena z največjo porabo kisika v organizmu, ki je posledica največjega minutnega iztisa srca in največje arterijske razlike za kisik. Spremembe največjega minutnega iztisa srca pri telesnem naporu so pri bolnikih s kroničnim SP pričakovano manj izrazite kot pri zdravih osebah; posledično so spremembe, ki povzročijo večji prevzem kisika v tkivih (povečana aerobna presnova v mišičju na račun povečanja števila mitohondrijev in prostornine kapilar v skeletnih mišicah ter ugodnejša preusmeritev pretoka iz splahnličnega žilja in ožilja neaktivnih mišic v ožilje

aktivnih mišic), izrazitejše (56). Boljša endotelijska funkcija je povezana z zvečano obremenitveno zmogljivostjo, saj prispeva k preusmeritvi pretoka v dejavno mišičje (57). V naši raziskavi nismo ugotovili pomembnih učinkov S-V na endotelijsko funkcijo, zato sklepamo, da je izboljšanje obremenitvene zmogljivosti ob jemanju S-V vezano na druge že omenjene dejavnike, ki vplivajo na povečanje obremenitvene zmogljivosti.

Slabša obremenitvena zmogljivost je neodvisen negativni prognostični dejavnik pri SP – obremenitvena zmogljivost pod 5 MET je povezana s slabšim preživetjem (58, 59). V naši raziskavi so bile srednje vrednosti obremenitvene zmogljivosti opazovanih skupin 3,5–4,5 MET, kar kaže na močno okrnjeno telesno zmogljivost. Izboljšanje obremenitvene zmogljivosti, ki smo jo ugotovili v naši raziskavi, se sklada z izboljšanjem preživetja, kar so ugotovili v raziskavi PARADIGM-HF (33, 34).

Raziskava je ugotavljala do zdaj še neraziskan vpliv S-V na endotelijsko funkcijo in telesno zmogljivost med obremenitvijo. Nismo potrdili hipoteze, da bi osem tedensko zdravljenje s S-V v primerjavi s standardnim zdravljenjem z zaviralcem ACE izboljšalo FMD pri bolnikih s kroničnim SP z znižanim LVEF. V obeh skupinah preiskovancev smo ugotovili statistično neznačilno povečanje FMD. Zdravljenje s S-V je povečalo NMD v primerjavi s standardnim zdravljenjem z zaviralcem ACE pri bolnikih s kroničnim SP z znižanim LVEF. Zdravljenje s S-V je pri teh bolnikih povečalo največjo porabo kisika med naprom.

## LITERATURA

1. Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, et al. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2011.
2. Morissey RP, Czer L, Shah PK. Chronic heart failure: current evidence, challenges to therapy, and future directions. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2011; 11 (3): 153-71.
3. Lee DS, Gona P, Vasani RS, et al. Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute. *Circulation*. 2009; 119 (24): 3070-7.
4. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2016; 18 (8): 891-975.
5. McMurray JJ. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med*. 2010; 362 (3): 228-38.
6. The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 9<sup>th</sup> ed. Boston: Little, Brown & Co; 1994.
7. Jug B. Telesna vadba pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem. *Med Razgl*. 2000; 39: 365-79.
8. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54 (19): 1747-62.
9. Flore G, Suppress P, Triggiani V, et al. Neuroimmune activation in chronic heart failure. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2013; 13 (1): 68-75.
10. Chatterjee K. Congestive heart failure: what should be the initial therapy and why? *Am J Cardiovasc Drugs*. 2002; 2 (1): 1-6.
11. Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*. 1999; 341 (8): 577-85.
12. Poredos P, Jezovnik MK. Testing endothelial function and its clinical relevance. *J Atheroscler Thromb*. 2013; 20 (1): 1-8.
13. Furchott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288 (5789): 373-6.
14. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362 (6423): 801-9.
15. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31 (1): 51-60.
16. Parodi O, De Maria R, Roubina E. Redox state, oxidative stress and endothelial dysfunction in heart failure: the puzzle of nitrate-thiol interaction. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2007; 8 (10): 765-74.
17. Davie AP, Francis CM, Caruana L, et al. Assessing diagnosis in heart failure: which features are any use? *QJM*. 1997; 90 (5): 335-9.
18. Oudejans I, Mosterd A, Bloemen JA, et al. Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. *Eur J Heart Fail*. 2011; 13 (5): 518-27.
19. Fonseca C. Diagnosis of the heart failure in primary care. *Heart Fail Rev*. 2006; 11 (2): 95-107.
20. Clark A, Poole-Wilson P, Coats A. Exercise limitation in chronic heart failure: central role of periphery. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 28 (5): 1092-102.
21. Wilson JR, Ferraro N, Wiener DH. Effect of the sympathetic nervous system on limb circulation and metabolism during exercise in patients with heart failure. *Circulation*. 1985; 72 (1): 72-81.
22. Zelis R, Flaim SF. Alterations in vasomotor tone in congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 1982; 24 (6): 437-59.
23. Wilson JR, Mancini DM. Factors contributing to exercise limitation of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 22 (4 Suppl A): 93A-8A.
24. Drexler H, Riede U, Münzel T, et al. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation*. 1992; 85 (5): 1751-9.
25. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation*. 1990; 81 (2): 518-27.
26. Cohn JN, Tognoni G. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2001; 345 (23): 1667-75.
27. Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin converting-enzyme inhibitors: the CHARN-Alternative trial. *Lancet*. 2003; 362 (9386): 772-6.

28. Flannery G, Gehrig-Mills R, Billah B, et al. Analysis of randomized controlled trials on the effect of magnitude of heart rate reduction on clinical outcomes in patients with systolic chronic heart failure receiving beta-blockers. *Am J Cardiol.* 2008; 101 (6): 865–9.
29. Digitalis Investigation Group. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med.* 1997; 336 (8): 525–33.
30. Reil JC, Böhm M. Heart rate and heart failure: the role of ivabradine therapy. *Curr Opin Cardiol.* 2013; 28 (3): 326–31.
31. Hubers SA, Brown NJ. Combined angiotensin receptor antagonism and neprilysin inhibition. *Circulation.* 2016; 133 (11): 1115–24.
32. King JB, Bress AP, Reese AD, et al. Neprilysin inhibition in heart failure with reduced ejection fraction: a clinical review. *Pharmacotherapy.* 2015; 35 (9): 823–37.
33. Packer M, McMurray JJ, Desai AS, et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with heart failure. *Circulation.* 2015; 131 (1): 54–61.
34. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin–neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med.* 2014; 371 (11): 993–1004.
35. Etsuda H, Takase B, Uehata A, et al. Monitoring attenuation of endothelium dependent, flow mediated dilation in healthy young men: possible connection to morning peak of cardiac events? *Clin Cardiol.* 1999; 22 (6): 417–21.
36. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction of children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 340 (8828): 1111–5.
37. Fitzgerald GA, Brash AR, Falardeau P, et al. Estimated rate of prostacyclin secretion into circulation of normal man. *J Clin Invest.* 1981; 68 (5): 1272–6.
38. Miller VM, Vanhouette PM. Enhanced release of endothelium-derived relaxing factor(s) by chronic releases in blood flow. *Am J Physiol.* 1988; 255 (3): H446–51.
39. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997; 30 (2): 325–33.
40. 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 (1): 22–7.
41. 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 (2): 257–65.
42. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol.* 1995; 268 (4 Pt 2): H1397–404.
43. Doshi SN, Naka KK, Payne N, et al. Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clin Sci (Lond).* 2001; 101 (6): 629–35.
44. Franzoni F, Ghiadoni L, Galetta F, et al. Physical activity, plasma antioxidant capacity, and endothelium-dependent vasodilation in young and older man. *Am J Hypertens.* 2005; 18 (4 Pt 1): 510–6.
45. Šebeštjen M. Vpliv statinov in fibratov na funkcionalne in morfološke lastnosti arterijske stene pri bolnikih s kombinirano hiperlipidemijo [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2000.
46. Wray DW, Uberoi A, Lawrenson L, et al. Evidence of preserved endothelial function and vascular plasticity with age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290 (3): H1271–7.
47. Janič M. Pleiotropni učinki nizkih odmerkov zaviralcev sistema renin-angiotenzin in statinov na arterijsko steno [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2016.
48. Hanžel J, Piletič Ž. Vpliv kombinacije nizkih odmerkov fluvastatina in valsartana na lastnosti arterijske stene pri moških po miokardnem infarktu [raziskovalna naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2013.
49. Likožar AR. Vpliv ranolazina in trimetazidina na endotelijsko funkcijo pri bolnikih s stabilno koronarno boleznijo [raziskovalna naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2014.
50. Jug B. Telesna vadba pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem [raziskovalna naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2000.
51. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, et al. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000; 101 (9): 948–54.
52. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, et al. Nitroglycerine-induced vasodilation for assessment of vascular function: a comparison with flow-mediated vasodilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33 (6): 1401–8.
53. Rusu CC, Ghervan L, Racasan S, et al. Nitroglycerin mediated dilation evaluated by ultrasound is associated with sTWEAK in hemodialysis patients. *Med Ultrason.* 2016; 18 (1): 57–63.

54. Akamatsu D, Sato A, Goto H, et al. Nitroglycerin mediated vasodilation of the brachial artery may predict long-term cardiovascular events irrespective of the presence of atherosclerotic disease. *J Atheroscler Thromb*. 2010; 17 (12): 1266–74.
55. Kullo IJ, Malik AR, Bielak LF, et al. Brachial artery diameter and vasodilator response to nitroglycerin, but not flow-mediated dilation, are associated with the presence and quantity of coronary artery calcium in asymptomatic adults. *Clin Sci (Lond)*. 2007; 112 (3): 175–82.
56. Wielenga R, Coats A, Moser W, et al. The role of exercise training in chronic heart failure. *Heart*. 1997; 78 (5): 431–6.
57. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO, et al. Cardiac rehabilitation, exercise training, and preventive cardiology research at Ochsner Heart and Vascular Institute. *Tex Heart Inst J*. 1995; 22 (1): 44–52.
58. Mark DB, Lauer MS. Exercise capacity. The prognostic variable that doesn't get enough respect. *Circulation*. 2003; 108 (13): 1534–6.
59. McNeer JF, Margolis JR, Lee KL, et al. The role of the exercise test in the evaluation of patients for ischemic heart disease. *Circulation*. 1978; 57 (1): 64–70.

Prispelo 21. 12. 2017