

Endotelina, czynnik von Willebranda i komórki śródbłonka we krwi obwodowej chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc

Endothelin, von Willebrand factor and endothelial cells in peripheral blood in COPD patients

MARYLA KRASNOWSKA ^{1/}, MARITA NITTNER-MARSZALSKA ^{1/}, RYSZARD KRASNOWSKI ^{2/}, WACŁAW KOPEĆ ^{2/}

^{1/} Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

^{2/} Katedra i Klinika Nefrologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

U podłoża przewlekłej choroby obturacyjnej płuc (POChP) leży proces zapalny w obrębie oskrzeli, mięszu i naczyń płucnych. W procesie tym zaangażowane są różne typy komórek: makrofagi, neutrofile, limfocyty CD8 oraz komórki śródbłonka naczyniowego. Markerami uszkodzenia śródbłonka są m.in. endotelina, peptyd produkowany przez śródbłonek, silny spazmogen, czynnik proliferacyjny dla mięśni gładkich i czynnik von Willebranda (vWF). Dotychczas udowodniono, że u chorych na POChP stężenie endoteliny rośnie zarówno w krwiobiegu, jak i w BALF.

Celem pracy była ocena stanu śródbłonka naczyniowego u chorych na POChP przez zbadanie zarówno liczby komórek śródbłonka w krwi, jak i jego markerów tj. endoteliny i czynnika vW. Endotelinę i czynnik vWF oznaczano metodą immunoenzymatyczną, a komórki śródbłonka metodą immunofluorescencyjną z użyciem swoistego p/ciała monoklonalnego. Badania przeprowadzono u 14 chorych (9 mężczyzn i 5 kobiet) na POChP. Grupa kontrolna liczyła 15 zdrowych osób.

W grupie chorych stwierdzono znamienne liczniejsze komórki śródbłonka krążące we krwi obwodowej w porównaniu z kontrolną grupą ($1,14 \pm 2,1$ vs $0,45 \pm 0,14$). Stężenie endoteliny ($1,59 \pm 0,89$ vs $0,48 \pm 0,3$ pg/ml) i czynnika vWF ($110,5 \pm 13,9$ vs $102,8$ vs $32,2$), aczkolwiek nieco wyższe u chorych na POChP, nie były istotnie różne między obu grupami. Stwierdzono natomiast wybitnie dodatnią korelację między liczbą komórek śródbłonka a tymi czynnikami.

Wyniki badania sugerują, że śródbłonek naczyniowy odgrywa istotną rolę w patomechanizmie POChP.

Alergia Astma Immunologia, 2001, 6(4), 195-199

Słowa kluczowe: *endotelina, komórki śródbłonka, czynnik von Willebranda, POChP*

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized with chronic inflammation throughout the airways, parenchyma and pulmonary blood vessels. Macrophages, T lymphocytes (predominately CD8), neutrophils but also endothelial cells participate in chronic inflammation. Endothelin - a peptide produced by endothelium, a potent spasmogen, a proliferative factor of smooth muscles and the von Willebrand factor (vWF) are included among markers of endothelial damage. It has been proved so far that endothelin concentration is increased in blood and BALF of COPD patients.

The objective of the study was to assess the number of circulating endothelial cells, the concentration of endothelin and vWF in blood in COPD patients as compared with healthy individuals. The immunofluorescence method using a specific monoclonal endothelium antibody was applied. Endothelin and vWF were assessed by immunoenzymatic method. The study included 14 COPD patients (9 men and 5 women) and 15 healthy individuals, aged 20 to 40.

The circulating endothelial cells average count in COPD patients was 1.14 ± 2.1 vs 0.45 ± 0.14 cells/ml in healthy controls. The differences were of statistic significance. The concentration of endothelin (1.59 ± 0.89 vs 0.48 ± 0.3) and vWF (110.5 ± 13.9 vs 102.8 vs 32.2) although it was increased in COPD patients, was not significantly different between groups. There was significant positive correlation between endothelial cells count and concentrations of both studied factors.

These results may indicate the endothelial involvement in pathogenesis of COPD.

Alergia Astma Immunologia, 2001, 6(4), 195-199

Key words: *endothelin, endothelial cells, von Willebrand factor, COPD*

W przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POChP), obok zmian destrukcyjnych w mięszu płucnym, uwarunkowanych rozedmą, występuje długotrwały proces zapalny błony śluzowej oskrzeli, zwłaszcza obwodowych. Zmiany te prowadzą do postępującego i nieodwracalnego upośledzenia wentylacji płuc, co jest podstawowym kryterium rozpoznawczym tego zespołu chorobowego. W nacieku zapalnym śluzówki dominują neutrofile, które w zwiększonej liczbie stwierdza się w świetle oskrzeli.

Występują również makrofagi, eozynofile w okresach zaostrzeń, a też limfocyty T. W odróżnieniu od astmy, w POChP stwierdza się inny podtyp limfocytów, a mianowicie CD8 [1]. Wymienione komórki nie wyczerpują listy zaangażowanych w procesie zapalnym. Obok zmian w nabłonku oskrzelowym, dysponujemy danymi wskazującymi na reakcje ze strony komórek śródbłonka [2]. W ostatnich latach wykazano, że nie tylko w astmie [3], ale również w POChP zwiększa się stężenie endoteliny

we krwi obwodowej oraz w popłuczynach oskrzelowych (BALF) [4,5]. Endotelina, peptyd wyizolowany w końcu lat 80., wytwarzany m.in. przez nabłonki, makrofagi, ale przede wszystkim śródbłonek, jest bardzo silnym spazmogenem oraz wykazuje szereg innych właściwości, np. nasila odczyny proliferacyjne [6,7]. W stanach niedotlenienia zarówno ostrego, jak i przewlekłego, co ma miejsce właśnie w POChP, dochodzi do wzrostu we krwi stężenia czynnika von Willebranda (vWF). Stwierdzono to przede wszystkim w nadciśnieniu płucnym i traktuje się jako wyraz uszkodzenia śródbłonka [8,9]. Odkrycie endoteliny stworzyło niezwykle ciekawe perspektywy badań jej patognomicznej roli w chorobach obturacyjnych płuc. Uszkodzenie śródbłonka spowodowane różnymi przyczynami, np. stresem rozciągania, zmianami w przepływie i ciśnieniu krwi, skaleczeniem, jest źródłem całego szeregu patofizjologicznych zjawisk. Stąd wynika fakt, że nieprawidłową liczbę krążących komórek śródbłonka i zmiany w nich, obserwuje się w nadciśnieniu, chorobach nerek, kolagenozach [10,11,12]. Na upośledzenie czynności śródbłonka wpływa również niedotlenienie. Ponieważ zaburzenia gazometryczne w chorobach płuc takich, jak POChP i ciężka astma są częstym objawem, a chodzi tu przede wszystkim o hipoksemię, w chorobach tych istnieją warunki sprzyjające uszkodzeniu komórek śródbłonka [13,14]. Za najlepiej odzwierciedlające stan śródbłonka uważa się pomiary osoczowej trombomoduliny oraz czynnika von Willebranda (vWF) [9,15].

Celem pracy było zbadanie stanu śródbłonka w POChP. Równoczesne oznaczenie liczby komórek śródbłonka we krwi obwodowej w skojarzeniu z pomiarem czynnika vW i endoteliny może służyć ocenie zmian naczyniowych w chorobie, która wiąże się z niedotlenieniem; niedotlenienie jest uznaną przyczyną uszkodzenia śródbłonka. Z kolei stwierdzenie większej liczby krążących komórek śródbłonka może być, według naszego przypuszczenia, wyrazem aktywności procesów wytwórczych i angiogenezy. Takie kompleksowe badania nie były dotąd prowadzone.

PACJENCI I METODY

Pacjenci

Do badania zakwalifikowano wg przyjętych kryteriów 14 chorych (9 mężczyzn) na POChP. Wiek chorych wynosił 55 do 78 lat (średnio 63 lata). Objawy choroby trwały od 2 lat do 21. Kryterium dyskwalifikującym chorego do badania było współistnienie nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, zapalenia kłębuszków nerkowych. Chorzy mieli ustalone leczenie; wszyscy przyjmowali antycholinergiki oraz α -sympatykomimetyki, 3 chorych stosowało wziewne kortykosteroidy.

Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób, 8 kobiet i 7 mężczyzn w wieku od 20 do 40 lat. Każdy z pacjentów wyraził zgodę na udział w badaniu, a protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Metody

Komórki śródbłonka

Stosowana do lat 90. metoda liczenia krążących we krwi obwodowej komórek śródbłonka była oparta na cechach morfologicznych komórek i obciążona dużym błędem. W naszych badaniach posłużyliśmy się nowoczesną metodą immunologiczną opracowaną wg Sbarbati i wsp. z użyciem swoistego przeciwciała monoklonalnego [16]. Autorzy ci wykazali, że filtr płucny nie stanowi przeszkody dla przenikania śródbłonka i jego fragmentów z krążenia płucnego do obwodowego; było to argumentem za zastosowaniem tej metody w planowanym badaniu.

Krew z żyły łokciowej pobierano na cytrynian w ilości 4-5 ml, a następnie nawarstwiano na zawieszinę Percollu i wirowano przez 10 min. przy szybkości obrotowej 1000 g w temp. pokojowej. Warstwę znad osadu odrzucono, a uzyskany osad komórek zawieszano w PBS z dodatkiem 2% albuminy bydlęcej i osadzano na szkiełkach podstawowych w cytowirówce. Osadzone komórki śródbłonka utrwalano metanolem przez 10 min., dwukrotnie przemywano roztworem PBS i inkubowano przez 1 godz. z rozcieńczonym 1:1000 w PBS z 2% BSA monoklonalnym przeciwciałem CLB-HEC19 (wysięk otrzewnowy) swoistym dla komórek śródbłonka. MoAb CLB-HEC 19 użyte do naszych badań otrzymaliśmy dzięki uprzejmości doktora Jana A. Mourika, kierownika Departamentu Krzepliwości Krwi Centralnego Laboratorium Służby Krwiodawstwa Holenderskiego Czerwonego Krzyża w Amsterdamie. Po dwukrotnym przemyciu w PBS z BSA, komórki śródbłonka traktowano przez godzinę poliklonalnym kozim przeciwciałem znakowanym izotocjanianem fluoresceiny swoistym dla immunoglobulin mysich (DAKO, Dania). Zastosowane przeciwciało nie reaguje z erytrocytami, limfocytami, monocytami, granulocytami, trombocytami, ani z hodowanymi fibroblastami i komórkami mięśni gładkich. Po przemyciu w PBS na preparaty nakrapiano 87% glicerol w PBS (9:1) z dodatkiem 1 mg (ml) para-fenylenodwuaminy. W mikroskopie fluorescencyjnym liczono komórki fluoryzujące. Wynik wyrażano w ilości komórek w 1ml krwi obwodowej.

Oznaczanie endoteliny

Endotelinę 1 oznaczano w osoczu metodą immunoenzymatyczną na handlowych zestawach firmy Biomedica Gruppe, Austria. Metoda polega na wiązaniu endoteliny w badanym osoczu przez swoiste poliklonalne przeciwciało uprzednio osadzone w dołkach polistyrenowych mikropłytetek miareczkowych. Związana endotelina jest następnie wykrywana przez mysie poliklonalne przeciwciało swoiste dla endoteliny, które z kolei jest wiązane przez anty-mysie IgG przeciwciało znakowane peroksydazą. Powstały kompleks: przeciwciało poliklonalne-endotelina-przeciwciało poliklonalne znakowane wykrywany jest w oparciu o barwną reakcję enzymatyczną peroksydazy

z substratem TMB. Intensywność barwy jest proporcjonalna do ilości endoteliny obecnej w badanym materiale.

Badanie czynnika vW

Czynnik vW oznaczano w osoczu metodą immunoenzymatyczną (zestaw firmy Asserachrom, Diagnostica Stago, Francja). Metoda polega na wiązaniu czynnika przez swoiste królicze przeciwciała uprzednio osadzone w dołkach płytek miareczkowych, a następnie związaniu przeciwciała króliczego wyznakowanego peroksydazą przez pozostałe wolne determinanty antygenowe czynnika vW. Związana peroksydaza z przeciwciałem króliczym w obecności substratu orto-phenylenediaminy i H_2O_2 daje barwną reakcję, która odzwierciedla stężenie czynnika, wyrażone w procentach stężenia jakie spotyka się w dorosłej zdrowej populacji ludzi.

Statystyka

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując test t-Studenta dla grup niepowiązanych. Poza tym oznaczano współczynniki korelacji między poszczególnymi parametrami badań. Za różnicę statystycznie istotną (p) przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI

W grupie chorych na POChP liczba krążących komórek śródbłonka wyniosła średnio 1,59 w ml krwi, w grupie kontrolnej zdrowych osób - 0,48 komórki. Różnica ta była wysoce statystycznie znamienna. Wyniki przedstawiono w tab. I i na ryc. 1. Stężenie endoteliny we krwi

chorych wynosiło średnio 1,14 pg/ml, w grupie zdrowych 0,45 pg/ml. Różnica ta nie była znamienna. Wartości czynnika vW kształtowały się następująco: grupa chorych - 110,5%, zdrowych - 102,8%; nie wykazano różnicy statystycznej. Obliczony współczynnik korelacji wykazał znamienne istotną zależność między liczbą komórek śródbłonka a czynnikiem vW oraz komórkami śródbłonka a endoteliną. Wyniki tych obliczeń przedstawiono w tab. II.

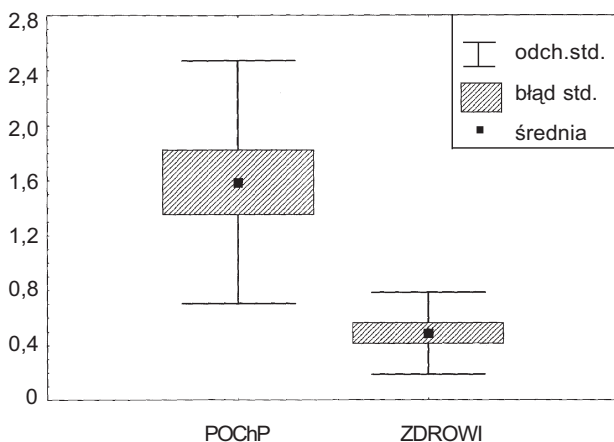
Osiem osób chorych na POChP miało zaburzenia gazometryczne pod postacią hipoksemii. Wykazano ujemną korelację między liczbą komórek śródbłonka a ciśnieniem parcjalnym tlenu w żyłnej krwi arterializowanej ($r = -0,49$; wskaźnik ten był bliski istotności statystycznej, $p = 0,07$). Nie wykazano takiej korelacji między ciśnieniem tlenu a pozostałymi badanymi parametrami.

DYSKUSJA

vWF jest multimerem produkowanym przez komórki śródbłonka i megakariocyty, magazynowanym w śródkomórkowych organellach: ciałkach Weibel-Palade' a i ziarnistościach komórek śródbłonka i płytek. Czynnik ten jest glikoproteiną o wysokim ciężarze i służy jako nośnik dla czynnika VIIIc, a zatem bierze udział w homeostazie układu krążenia. vWF odgrywa również istotną rolę w agregacji płytek i ich adhezji do uszkodzonego naczynia [8]. Okazało się, że vWF jest wskaźnikiem zaburzeń śródbłonka w wielu chorobach naczyniowych i nie tylko. Znacznie rośnie w surowicy chorych z nadciśnieniem płucnym, zwłaszcza pierwotnym [17,18]. Lopes i wsp. obserwowali przez rok grupę chorych z tą chorobą i stwierdzili,

Tabela I. Endotelina, komórki śródbłonka i czynnik von Willebranda u chorych na POChP i zdrowych

	Endotelina (pg/ml \pm SD)	Komórki śródbłonka (EC/ml)	Czynnik von Willebranda (% \pm SD)
Chorzy na POChP (n = 14)	1,14 \pm 2,1	1,59 \pm 0,89	110,5 \pm 13,9
Zdrowi (n = 15)	0,45 \pm 0,14	0,48 \pm 0,3	102,8 \pm 32,2
p	0,21	0,0001	0,43



Ryc. 1. Porównanie liczby krążących komórek śródbłonka we krwi obwodowej (EC/ml) u chorych na POChP i zdrowych ochotników; $p < 0,0005$.

Tabela II. Współczynniki korelacji endoteliny, komórek śródbłonka i czynnika von Willebranda u chorych na POChP

	Endotelina	Komórki śródbłonka	Czynnik von Willebranda
Endotelina		0,59 ($p < 0,05$)	0,34 (NS)
Komórki śródbłonka	0,59 ($p < 0,05$)		0,8 ($p < 0,001$)
Czynnik von Willebranda	0,34 (NS)	0,8 ($p < 0,001$)	

że osobnicy z wysokim stężeniem we krwi czynnika vWF znacznie wcześniej umierali niż pozostali. Miał on zatem znaczenie rokownicze [18]. Okazał się też być również czynnikiem prognostycznym w ostrym uszkodzeniu płuc [9]. Zwiększone stężenie vWF obserwowano ponadto w POChP. Czynnikiem ten jest produktem zarówno płucnego, jak i systemowego śródbłonka, a surowicze jego stężenie rośnie w ostrym zapaleniu oskrzeli. Opierając się na tym, Chambers i wsp. założyli, że wzrost surowiczego vWF może wskazywać na subkliniczne uszkodzenie płuc, a zatem być może pozwoli na przewidywanie przyspieszonego upośledzenia wentylacji płucnej [17]. Ich wieloletnia obserwacja dużej grupy chorych potwierdziła to przypuszczenie; autorzy wnioskują, że istnieje związek między vWF a spadkiem wartości FEV1. Ferroni i wsp. również stwierdzili wzrost stężenia vWF u chorych z POChP w porównaniu z kontrolą, choć różnica ta nie osiągnęła znamienności [15]. W naszych badaniach nie wykazaliśmy różnicy między grupą chorych i zdrowych; nieco wyższe wartości u chorych nie były istotne. Stwierdziliśmy natomiast znamiennej korelację tego czynnika z liczbą komórek śródbłonka krążących we krwi. Liczba ta była istotnie większa w grupie chorych na POChP. Podobną dodatnią korelację obserwowano między komórkami śródbłonka a endoteliną. Rodzina endotelin obejmuje 4 pokrewne peptydy, które wywierają swe działania poprzez receptory ET-A i ET-B, związane z białkiem G [19]. To działanie obejmuje m.in. silne reakcje skurczowe oskrzeli, jak też indukowanie różnicowania miofibroblastów [6]. Badania *in vivo* dobitnie wskazują, że endotelina sama, proporcjonalnie do dawki, pobudza proliferację mięśni gładkich oskrzeli oraz, że potęguje działanie czynnika wzrostu - EGF (*Epidermal Growth Factor*), a więc jest nie tylko komitogenem, ale i mitogenem [7]. Stąd przypuszczenia, że peptyd ten bierze udział w procesach *remodelingu* w astmie [20]. Większa liczba komórek śródbłonka we krwi krążącej oraz związek z endoteliną, rzucają nowe światło na zmiany w ścianie oskrzeli prowadzące do ich zwężenia w POChP. Ważne spostrzeżenie poczynili Celik i wsp. [21]. Ich eksperyment w grupie chorych na POChP polegał m.in. na zbadaniu zawartości endoteliny we krwi z tętnicy płucnej, promieniowej i żyłnej. Okazało się, że najwyższe stężenia endoteliny obserwowano we krwi tętniczej płucnej u osób z nadciśnieniem płucnym; stężenie to odwrotnie korelowało z ciśnieniem parcjalnemu tlenu we krwi. Wyniki te wskazują na lokalne uwalnianie endoteliny i równocześnie pozwalają na interpretowanie naszych badań. Oznaczaliśmy endotelinę jedynie we krwi żyłnej i choć jej stężenie było wyższe w grupie chorych, to wskutek znacznego rozrzutu wyników różnica ta nie była istotna.

Śródbłonek jako pośrednik pomiędzy krwią krążącą a tkanką pozanaczyniową jest ważnym regulatorem migracji leukocytów, hemostazy i napięcia ściany naczyniowej. Szczególną uwagę zwraca się na rolę śródbłonka jako aktywatora i sprawcę mobilizacji leukocytów w pro-

cesie zapalnym [22]. Dotyczy to również zmian zapalnych w układzie oddechowym. W rezultacie tego precyzyjnie sterowanego i wielostopniowego procesu, dochodzi do diapedezy komórek zapalnych ze światła naczynia przez śródbłonek do tkanki otaczającej naczynie. Morfologiczne i czynnościowe zmiany komórek śródbłonka, ich aktywacja pod wpływem różnych czynników np. cytokin i chemokin, została dobrze poznana [23]. Wydaje się, że szczególnie ważnym w przewlekłym zapaleniu oskrzeli jest współdziałanie komórek nabłonka oskrzelowego i śródbłonka. Boussat i wsp. [24] badali ekspresję VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) na powierzchni hodowanych ludzkich komórek nabłonka oskrzeli. VEGF jest mocnym czynnikiem wzrostu i przepuszczalności śródbłonka i pojawia się w nabłonku wskutek jego uszkodzenia lub naprawy. Wspomniani autorzy wykazali, że ekspresja VEGF w hodowanych nabłonkach znamienne rośnie pod wpływem TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor*) oraz hipoksji. Wyniki te, jak i innych autorów [22] wskazują, że nabłonek oskrzelowy bierze udział w proliferacji śródbłonka. Jest to ważna konstatacja.

W pracy naszej stwierdziliśmy, że w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych osób, we krwi obwodowej chorych na POChP występują znamiennej liczniej komórki śródbłonka. Jak to ma znaczenie? Interpretacja tej obserwacji jest dość trudna, zwłaszcza, że w dostępnym nam piśmiennictwie nie ma podobnych badań. W nadciśnieniu tętniczym, w przewlekłym zapaleniu kłębuszków nerkowych stwierdzano we krwi liczniejsze niż u zdrowych osób komórki śródbłonka. Traktowano to jako wyraz ich uszkodzenia (znane zjawisko stresu nadciśnieniowego i rozciągania). Krasnowski wykazał, że w zapaleniu nerek z zespołem nerczycowym bez nadciśnienia, również znamienne rośnie liczba komórek śródbłonka [12]. Uważał, że jest to uwarunkowane działaniem zmian metabolicznych występujących w nerczycy. Nasze badanie było inspirowane tymi obserwacjami, gdyż widzimy pewną analogię między płucami i nerkami, zwłaszcza jeśli chodzi o łożysko naczyniowe. Wynik badania potwierdza nasze założenia. Wydaje się, że mechanizm prowadzący do wzrostu liczby badanych komórek w POChP jest inny niż np. w nadciśnieniu tętniczym, a prawdopodobnie związany z nowotworzeniem naczyń. Ta zwiększona angiogeneza, jej kolejne etapy nie są dobrze poznane. Przewlekłe niedotlenienie, które ma miejsce w POChP może być przyczyną, lub co najmniej czynnikiem sprzyjającym. Przemawia za tym odwrotna korelacja między ciśnieniem tlenu a liczbą komórek śródbłonka. W długotrwałej hipoksji dochodzi do rozluźnienia ciasnych połączeń między komórkami, które migrując dają początek nowemu naczyniu [23]. Jest tu pewne podobieństwo do złączania się, po rozluźnieniu wiązań, komórek nabłonkowych. Kaskada międzykomórkowych reakcji i odpowiedzi śródbłonka, które mają miejsce zwłaszcza wskutek hipoksji, została dokładnie opisana przez Michielsa i wsp. [25]

Stwierdzony w badaniu istotny wzrost liczby komórek śródbłonna we krwi chorych na POChP i wybitnie dodatniej korelacje z markerami stanu śródbłonna, tj. endotelina i vWF, wskazują z jednej strony, na uszkodzenie

śródbłonna prawdopodobnie wskutek niedotlenienia, z drugiej zaś być może na jego uaktywnienie przez wydzielany z nabłonków VEGFj.

Piśmiennictwo

1. Jeffery P. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998; 9: 129-136.
2. Roland M, Bhowmik A, Sapsford RJ i wsp. Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001; 56: 30-35.
3. Redington AE, Springall DR, Ghatei MA i wsp. Endothelin in bronchoalveolar lavage fluid and its relation to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1034-1039.
4. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988; 58: 249-261.
5. Nomura A, Uchida Y, Kameyama M i wsp. Endothelin and bronchial asthma *Lancet* 1989; 2: 747-748.
6. Sun G, Stacey MA, Bellini A i wsp. Endothelin-1 induces bronchial myofibroblast differentiation. *Peptides* 1997; 18: 1449-1451.
7. Kizawa Y, Onuchi N, Saito K i wsp. Effects of endothelin-1 and nitric oxide on proliferation of cultured guinea pig bronchial smooth muscle. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol* 2001; 495: 495-501.
8. Spadafora-Ferrera M, Lopes AA, Coelho V i wsp. Two novel anti-von Willebrand factor monoclonal antibodies. *Thromb Res* 2000; 97: 3-13.
9. Siemiątkowski A, Kłoczko J, Galar M i wsp. Von Willebrand factor antigen as a prognostic marker in posttraumatic acute lung injury. *Haemostasis* 2000; 30: 189-195.
10. Lusher TF. Endothelin: systemic arterial and pulmonary effects of a new peptide with potent biologic properties. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: S56-S60.
11. Giamesi D, Del RYS, Vitale RL. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 2001; 43: 111-126.
12. Krasnowski R. Uszkodzenie śródbłonna naczyniowego w kłębuszkowych zapaleniach nerek i w chorobie nadciśnieniowej - ocena na podstawie pomiarów krążących komórek śródbłonna oraz oznaczeń czynnika von Willebranda we krwi obwodowej. Praca doktorska. Wrocław 1997.
13. Trakaola G i wsp. Mechanisms of endothelin-1 elevation in chronic obstructive pulmonary disease patients with nocturnal oxyhemoglobin desaturation. *Respiration* 2001; 68: 134-139.
14. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 662-675.
15. Ferroni P, Basil S, Martini F i wsp. Soluble P-selectin as a marker of platelet hyperreactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease *J Invest Med* 2000; 48L: 21-27.
16. Sbarbati R, De Boer M, Marzilli M i wsp. Immunologic detection of endothelial cells in whole blood. *Blood* 1991; 77: 764-769.
17. Chambers DC, Boldy DA, Ayres JG. Chronic respiratory symptoms, von Willebrand factor and longitudinal decline in FEV1. *Respir Med* 1999; 93: 726-733.
18. Lopes AA, Maeda NY, Goncalves RC i wsp. Endothelial cells dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary hypertension. *Am Heart J* 2000; 139: 618-623.
19. Roland M, Bhowmik A, Sapsford RJ i wsp. Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001; 56: 30-35.
20. Goldie RG i wsp. The endothelins in the pulmonary system. *Pul Pharmacol* 1996; 9: 69-75.
21. Celik G, Karabiyikoglu G. Local and peripheral plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 1998; 65: 289-294.
22. Mul FP, Zuurbier AE, Janssen H i wsp. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 529-537.
23. Vestweber D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol* 2000; 190: 280-291.
24. Boussat S, Eddahibi S, Coste A i wsp. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 2000; 279: L 371-383.
25. Michiels C, Arnould T, Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1479: 1010.