

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Inflamación y disfunción endotelial en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica

Douglas Greig¹, Pablo Castro¹, Luigi Gabrielli¹, Rodrigo Miranda¹, Hugo Verdejo¹, Hernán Alcaíno², Carlos Bustos², Mario Chiong², Iván Godoy¹, Rosemarie Mellado², Lorena García², Daniela Salas², Raúl Vivar², José Luis Vukasovic³, Roberto Concepción⁴, Guillermo Díaz-Araya².

Inflammation and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure

Background: In chronic heart failure (CHF), endothelial dysfunction (ED) is a consequence of an imbalance of vascular tone regulating substances. The relationship between ED and inflammation has not been fully investigated. **Aim:** To assess the association between inflammation and ED in CHF. **Material and methods:** Forty two patients aged 56 ± 14 years (80% male) with a CHF in functional capacity II-III (New York Heart Association) and an ejection fraction (EF) $<40\%$ were consecutively studied. Patients were classified according to the presence or absence of ED, evaluated by reactive vasodilation measured by ultrasound, after brachial artery compression. Circulating levels of highly sensitive C reactive protein (usCRP), tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-6 (IL-6) were determined by ELISA. A group of 15 healthy subjects of similar age, were studied as controls. **Results:** Sixty seven percent of patients had ED. Compared to controls, patients with CHF had higher usCRP (0.58 ± 0.4 and 4.9 ± 7.1 mg/dl respectively, $p < 0.01$) and IL-6 (1.38 ± 0.06 and 3.1 ± 1.7 mg/dl respectively, $p < 0.01$). Compared to patients without ED, patients with CHF and ED had higher levels of usCRP (3.0 ± 0.4 and 6.0 ± 5.7 mg/dl respectively, $p < 0.01$) and TNF α (0.31 ± 0.26 and 1.0 ± 1.1 pg/ml, $p = 0.02$). No differences in IL-6 were found between CHF groups. **Conclusions:** In CHF patients, the presence of ED was associated with increased levels of inflammatory markers (Rev Méd Chile 2008; 136: 687-93).

(Key words: Endothelium, vascular; Heart failure; Inflammation)

Recibido el 27 de agosto, 2007. Aceptado el 13 de noviembre, 2007.

¹Departamento de Enfermedades Cardiovasculares, Pontificia Universidad Católica de Chile. ²Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ³Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ⁴Hospital DIPRECA, Santiago, Chile.

Correspondencia a: Dr. Pablo Castro. Pontificia Universidad Católica de Chile. Marcoleta 367, Santiago, Chile. E-mail: pcastro@med.puc.cl o Dr. Guillermo Díaz-Araya, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Olivos 1007, Santiago, Chile. E-mail: gdiaz@ciq.uchile.cl

En pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) y disfunción ventricular izquierda, la disminución de la eficacia contráctil está asociada a un proceso inflamatorio con aumento de citoquinas, activación neurohumoral (sistemas simpático, renina-angiotensina-aldosterona y arginina-vasopresina, entre otros) y estrés oxidativo (EO)¹. Estudios recientes de pacientes con IC muestran niveles elevados de reactantes de fase aguda, como proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) y citoquinas, tales como, interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), lo que se asocia a mayores eventos cardiovasculares y aumento de la morbimortalidad^{2,3}.

La función endotelial se altera en enfermedades cardiovasculares, jugando un papel protagónico en la regulación del tono, homeostasis e inflamación vascular⁴. Ya hace algunos años se demostró la presencia de disfunción endotelial (DE) en pacientes con IC y su valor pronóstico⁵. La DE en la IC se ha atribuido a una disminución de la síntesis del óxido nítrico, aumento de su degradación por especies reactivas del oxígeno, inflamación e hiporrespuesta del músculo liso vascular^{4,6-8}.

La interacción entre los mecanismos citados es compleja y no está bien definida, pero tienen un efecto adverso en la remodelación y función ventricular, en el tono vascular (expresado como DE) y en el desarrollo de enfermedad aterosclerótica, favoreciendo la progresión de la IC⁹.

Recientemente, se ha descrito en pacientes con enfermedad coronaria una correlación entre PCRus y DE, sugiriendo un nexo entre inflamación y función endotelial en enfermedades cardiovasculares¹⁰. Sin embargo, esta relación en pacientes con IC no ha sido sistemáticamente evaluada.

En el presente estudio se investigaron los niveles plasmáticos de estos marcadores inflamatorios y la presencia o ausencia de DE en pacientes con IC.

MÉTODOS

Pacientes y controles. Se estudiaron 42 pacientes consecutivos con IC capacidad funcional (CF) II-III de la *New York Heart Association* (NYHA), provenientes de nuestros centros ambulatorios. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado aprobado por

el Comité de Ética de cada institución participante. Los criterios de inclusión fueron: a) Fracción de eyección del ventrículo izquierdo menor a 40% determinada por ecocardiografía; b) Tratamiento médico convencional con bloqueadores beta-adrenérgicos, diuréticos e inhibidores de la enzima convertidora o antagonistas de los receptores de angiotensina; c) Situación clínica estable durante las últimas cuatro semanas. Se excluyeron aquellos pacientes con: a) Angina inestable, infarto del miocardio, cirugía de revascularización miocárdica o angioplastia coronaria en los últimos 6 meses; b) Hipertensión arterial no controlada definida como presión arterial sistólica mayor a 140 mmHg o presión arterial diastólica mayor a 90 mmHg; c) Miocardiopatía hipertrófica, cardiopatía congénita o enfermedades valvulares significativas y d) Enfermedades concomitantes que afecten las determinaciones de marcadores inflamatorios (infecciones, neoplasias y enfermedades autoinmunes, entre otras).

Se utilizó un grupo control de 15 sujetos sanos de similar distribución en edad y sexo. Ninguno de ellos presentaba factores de riesgo coronario conocidos, terapia farmacológica ni DE.

Evaluación de disfunción endotelial. Luego de 30 min en reposo, se obtuvo mediante ecografía imágenes bidimensionales de la arteria braquial del brazo derecho, en estado basal y luego de 5 min de hiperemia reactiva inducida por oclusión con manguito (observador único, transductor 7-11 MHz, Sonos 5500, Philips)^{11,12}. Los resultados se expresaron como porcentaje de cambio en el diámetro de la arteria. La DE dependiente del endotelio se definió como un porcentaje de cambio menor a 7%.

Evaluación de los marcadores inflamatorios sistémicos. Los niveles plasmáticos de TNF α , PCRus e IL-6 se determinaron mediante ensayos disponibles comercialmente (ELISA). Para el caso de la PCRus se utilizó un ELISA de competencia (Calbiochem-Novabiochem).

Estadística. Los grupos fueron testeados para normalidad mediante test de Shapiro-Wilk. Los grupos se compararon mediante el test de Mann-Whitney U para variables continuas y test de chi cuadrado para la comparación de variables categóricas. Además, para la comparación de tertiles de IL-6, TNF α y PCRus se utilizó el test de

Spearman para correlación de variables ordinales. Los resultados se expresaron como promedio ± desviación estándar (SEM). Un valor p <0,05 se consideró significativo.

RESULTADOS

La edad promedio fue 56±14 años (rango 20 a 85), 34 hombres (80%), 28 pacientes (67%) presentaron DE. La Tabla 1 muestra las características de los pacientes con IC según presencia o ausencia de DE. En el grupo control, la edad promedio fue de 56±15 años, 80% fueron hombres y el porcentaje de cambio endotelio dependiente fue de 10%±1,5%. El porcentaje de cambio endotelio dependiente en el grupo global de pacientes con IC fue de 4,4%±1,9%, siendo de 3,7%±2,1% en los pacientes con IC y DE, mientras que en aquellos sin DE fue de 11,1±1,6 (valor p <0,001). Respecto a los marcadores de inflamación, los pacientes con IC presentaron nive-

les aumentados de PCRus e IL-6 respecto del grupo control (PCRus 4,9±7,1 vs 0,6±0,3 mg/l, p <0,01; IL-6 3,1±1,7 vs 1,4±0,1 mg/dl, p <0,01). Se observó una tendencia no significativa a mayores valores de TNFα en el grupo de sujetos con IC respecto del grupo control (0,8±0,9 vs 0,5±0,3 pg/ml). Los pacientes con IC y DE presentaron niveles elevados de PCRus y TNFα respecto de los pacientes con IC sin DE (PCRus 6,0±5,7 vs 3,0±0,4 mg/dl, p <0,01; TNFα 1,0±1,1 vs 0,3±0,3 pg/ml, p =0,02). No hubo diferencias en los niveles de IL-6 respecto a la presencia de DE en los pacientes con IC. La Figura 1 muestra que en el grupo con DE, la proporción de pacientes con CF III fue de 65%, mientras que en el grupo sin DE fue de 21% (valor p =0,02). Las Figuras 2 y 3 muestran la distribución de pacientes agrupados por tertiles de TNFα y PCRus según presencia o ausencia de DE. El 71% de los pacientes con DE tenían valores plasmáticos de TNFα de 0,22 pg/ml vs 46% de los pacientes sin DE (r =0,35, valor p =0,02 para la correlación). Además, 79% de los pacientes

Tabla 1. Características de los pacientes con IC de acuerdo a la función endotelial

	Con DE (n =28)	Sin DE (n =14)	Valor p
Edad, años (promedio ± SEM)	57±16	56±9	0,9
Sexo masculino-n (%)	23 (82)	11 (79)	0,5
Etiología de la IC-n (%)			0,5 [¶]
Hipertensiva	5 (18)	2 (14)	
Isquémica	6 (21)	6 (42)	
Idiopática	13 (46)	5 (36)	
Otra	4 (14)	1 (7)	
Factores de riesgo-n (%)			
Hipertensión arterial	16 (57)	7 (50)	0,5
Diabetes mellitus	4 (14)	2 (14)	0,3
Dislipidemia	4 (14)	3 (21)	0,4
Tabaquismo	5 (18)	2 (14)	0,6
Tratamiento n (%)			
IECA o ARA II	18 (64)	12 (86)	0,14
Betabloqueadores	23 (82)	12 (86)	0,6
Diuréticos	23 (82)	12 (86)	0,6
Espironolactona	22 (79)	11 (79)	0,7
FEVI%	29±5,5	31±3,3	0,4

DE: Disfunción endotelial. IECA: Inhibidor de enzima convertidora de angiotensina I. ARA II: inhibidores del receptor de angiotensina II. FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo.

¶: Para el grupo completo.

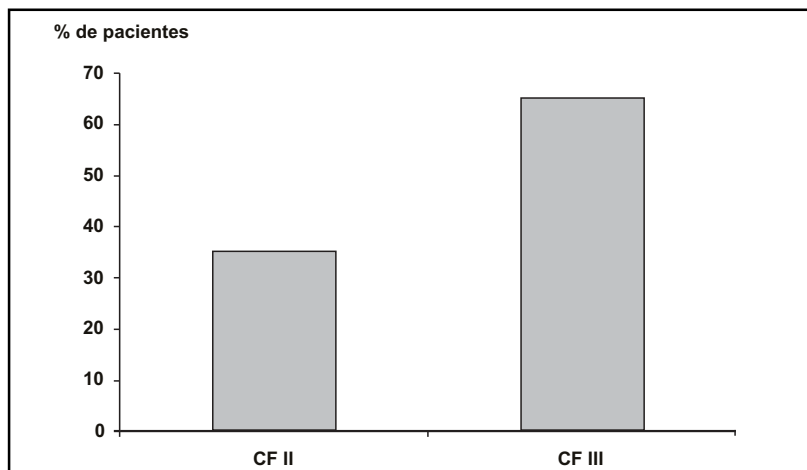


Figura 1. Distribución de pacientes con DE según clase funcional de la NYHA. Valor $p < 0,05$.

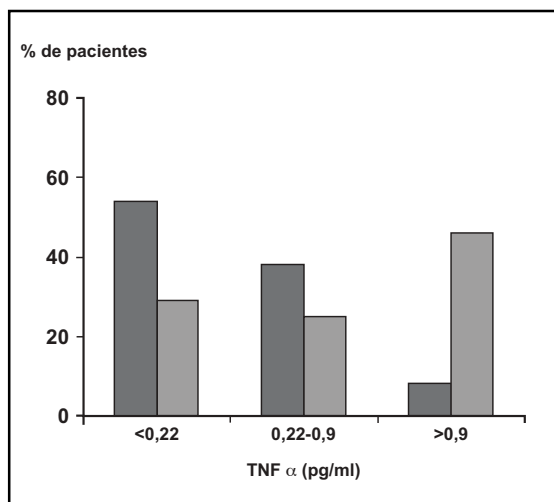


Figura 2. Proporción de pacientes con (barra gris) y sin (barra negra) disfunción endotelial según tertiles de niveles circulantes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). $R = 0,353$, valor $p = 0,02$ para la correlación.

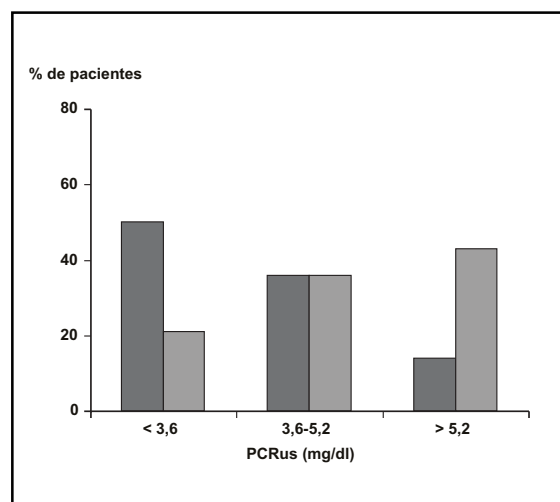


Figura 3. Proporción de pacientes con (barra gris) y sin (barra negra) disfunción endotelial según tertile de nivel plasmático de proteína C reactiva ultrasensible (PCRus). $r = 0,336$, valor $p = 0,03$ para la correlación.

con DE tenían niveles circulantes de PCRus $\geq 3,6$ mg/dl vs 50% de los pacientes sin DE ($r = 0,34$, $p = 0,03$ para la correlación). Los niveles de IL-6 no fueron diferentes en los pacientes con y sin DE ($3,3 \pm 1,8$ vs $2,2 \pm 1,2$ pg/ml, respectivamente, $p = 0,12$). No se encontraron diferencias en los valores de PCRus, TNF α o IL-6 entre pacientes de IC de diferentes etiologías (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este estudio es que en pacientes con IC, la presencia de DE se asoció a presencia de factores proinflamatorios determinada por PCRus y citoquinas inflamatorias (IL-6, TNF α) y a un mayor deterioro de la capacidad funcional de la NYHA. Los pacientes con IC

presentaron niveles elevados de PCRus e IL-6, respecto del grupo control.

En pacientes con IC, la presencia de DE se ha asociado a un pronóstico desfavorable y mayor mortalidad^{5,13}. En pacientes con IC de etiología isquémica, el exceso de mortalidad podría estar relacionado con aumento de los eventos isquémicos. Sin embargo, otros mecanismos también contribuyen, ya que esta asociación parece ser independiente de la etiología de la IC. La DE en la microcirculación coronaria podría inducir áreas de isquemia o necrosis en ausencia de enfermedad aterosclerótica. Adicionalmente, por cambios en las condiciones de carga ventricular se promueve remodelamiento ventricular y progresión de la enfermedad.

El endotelio mantiene el tono vascular mediante un estricto balance entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Además, regula la coagulación y participa en la inflamación, mediante la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión¹³. La fisiopatología de la DE es compleja y no es exclusiva de la IC, por ejemplo, se ha descrito DE en pacientes con hipertensión arterial, diabetes mellitus y aterosclerosis¹⁴⁻¹⁶.

Para evaluar la función endotelial, nosotros utilizamos el modelo de vasodilatación reactiva postcompresión^{11,12}. Este método se ha utilizado para validar indirectamente la presencia de DE en diferentes territorios vasculares. Modelos humanos han determinado que es mediado por la liberación de óxido nítrico, prostaglandinas y activación simpática, entre otros^{17,18}.

Por otro lado, estudios recientes han establecido la importancia de la activación del sistema inmune y la inflamación en la patogénesis de la IC¹. Las citoquinas inflamatorias pueden modular la función cardiovascular a través de diferentes mecanismos, tales como alteración en la homeostasis del calcio, disminución del inotropismo a través de la alteración de receptores betaadrenérgicos y regulación de la hipertrofia y apoptosis cardíaca^{19,20}. Del mismo modo, diversos estudios han relacionado a la DE con niveles aumentados de TNF α e IL-6; sin embargo, su asociación con PCRus no es clara. La IL-6 se ha relacionado a mal pronóstico, determinándose en el estudio de Framingham como un factor independiente de mortalidad²¹. La IL-6 es producida por el sistema

monocito/macrófago, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas y cardíacas en respuesta a múltiples estímulos, como la hipoxia^{22,23}. Además, algunos reportes han mostrado que su aumento es mayor en pacientes con IC de etiología isquémica comparados con miocardiopatía dilatada²⁴. Pese a lo anterior, el papel de la IL-6 en la patogenia de la IC es compleja, ya que evidencia reciente sugiere que su aumento sería un factor cardioprotector al promover la neovascularización e hipertrofia compensatoria²⁵. En nuestro trabajo, no se encontró una relación entre IL-6 y DE. Tampoco hubo diferencias entre pacientes con IC de etiología isquémica vs no isquémica. Además, los niveles de IL-6 fueron menores a los descritos en la literatura²⁶, lo que cual podría deberse a una situación clínica más estable de la población estudiada. Por otro lado, se han detectado niveles circulantes aumentados de TNF α en diferentes estadios de pacientes con IC, siendo mayor su aumento en las etapas más avanzadas de la IC, independiente de su etiología²⁷. La principal fuente de TNF α son los macrófagos circulantes y adheridos al endotelio²⁸. Diversas terapias en humanos han intentado antagonizar su acción con resultados desalentadores en esta área, lo que señala que TNF α no es la única citoquina responsable de la progresión de la enfermedad²⁹. Modelos animales han establecido que actuaría mediante la activación del factor nuclear kappa B y que su inhibición podría relacionarse con disminución del tamaño del infarto inducido experimentalmente³⁰. Nuestros hallazgos concuerdan con los publicados por Tentolouris et al²⁴, en los cuales se observó un aumento de TNF α en pacientes con IC de cualquier etiología y la correlación de sus niveles plasmáticos con el grado de DE. Su relación de causalidad escapa al modelo planteado en este estudio.

La PCR es una proteína de fase aguda sintetizada en el hígado como respuesta principalmente, a la IL-6²². Diversos estudios han mostrado que es un predictor sensible de eventos cardiovasculares adversos²⁶, incluso en individuos sanos, quienes tienen, habitualmente, valores ≤ 2 mg/dl^{26,31}. Su mecanismo de daño en la IC es complejo, involucrando, por mencionar algunos de sus efectos, la activación del complemento que conlleva a apoptosis, DE mediada por inactivación de óxido nítri-

co³² e inducción de otras citoquinas y moléculas de adhesión³³. Además, se ha postulado un efecto proinflamatorio directo en las células endoteliales³⁴. La principal diferencia entre PCR y PCRus radica en que ésta tiene un rango de detección más bajo, lo que la hace más sensible en la estratificación del riesgo cardiovascular²⁶. No hay estudios que vinculen PCRus y el grado de DE en pacientes con IC. En nuestro estudio, al igual como se observa con TNF α , los niveles plasmáticos de PCRus fueron mayores en el grupo con DE y valores elevados ($\geq 5,2$ mg/dl) se asociaron a una mayor proporción de pacientes con DE.

Nuestro estudio muestra observaciones y correlaciones en una población seleccionada de pacientes estables y con tratamiento optimizado de la IC, lo cual limita la extrapolación de los resultados a la población general de pacientes con IC. Por otro lado, nuestro estudio evalúa un número reducido de pacientes y el modelo impide demostrar causalidad. El grupo control no tenía factores de riesgo conocidos, sin embargo, no existió diferencias en los factores de riesgo entre el grupo de pacientes

con y sin DE. En el presente estudio no se exploraron otros marcadores (i.e: células endoteliales periféricas, células progenitoras endoteliales entre otras³⁵) que pudiesen estar alterados en pacientes con IC. Del mismo modo, el hecho que los coeficientes de determinación entre TNF α y DE, así como entre PCRus y DE sean significativos, pero relativamente bajos ($r^2 = 12\%$), señalan que otros factores participan en la etiopatogenia de la DE⁴.

En resumen, los pacientes con IC y DE estables y en tratamiento médico optimizado tienen valores aumentados de citoquinas inflamatorias, principalmente TNF α , y PCRus. Estos hallazgos fortalecen la asociación entre inflamación medida a través de marcadores en sangre periférica y DE en pacientes con IC. Estrategias destinadas a disminuir estos marcadores inflamatorios, podrían contribuir a mejorar la función endotelial en pacientes con IC y DE.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por el Proyecto FONDECYT 1050768.

REFERENCIAS

1. YNDESTAD A, KRISTIAN DJ, OIE E, UELAND T, GULLESTAD L, AUKRUST P. Systemic inflammation in heart failure—the whys and wherefores. *Heart Fail Rev* 2006; 11: 83-92.
2. BLESKE BE, NICKLAS JM, BARD RL, BROOK RD, GURBEL PA, BLIDEN KP ET AL. Neutral effect on markers of heart failure, inflammation, endothelial activation and function, and vagal tone after high-dose HMG-CoA reductase inhibition in non-diabetic patients with non-ischemic cardiomyopathy and average low-density lipoprotein level. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 338-41.
3. HUANG PH, LEU HB, CHEN JW, WU TC, LU TM, DING YA ET AL. Comparison of endothelial vasodilator function, inflammatory markers, and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with or without chronotropic incompetence to exercise test. *Heart* 2006; 92: 609-14.
4. WIDLANSKY ME, GOKCE N, KEANEY JF JR, VITA JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1149-60.
5. KATZ SD, HRYNIEWICZ K, HRILJAC I, BALIDEMAJ K, DIMAYUGA C, HUDAHIED A ET AL. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005; 111: 310-14.
6. TOUSOULIS D, CHARAKIDA M, STEFANADIS C. Inflammation and endothelial dysfunction as therapeutic targets in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2005; 100: 347-53.
7. MIRANDA R, CASTRO P, VERDEJO H, CHIONG M, DÍAZ-ARAYA G, MELLADO R. Estrés oxidativo e inflamación en Insuficiencia Cardíaca: Mecanismos de daño y alternativas terapéuticas. *Rev Méd Chile* 2007; 135: 1056-63.
8. LANDMESSER U, DREXLER H. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20: 547-51.
9. CORRY DB, TUCK ML. Uric acid and the vasculature. *Curr Hypertens Rep* 2006; 8: 116-9.
10. PETERSEN JW, FELKER GM. Inflammatory biomarkers in heart failure. *Congest Heart Fail* 2006; 12: 324-8.
11. CELERMAJER DS, SORENSEN KE, GOOCH VM, SPIEGELHALTER DJ, MILLER OI, SULLIVAN ID ET AL. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-5.
12. CORRETTI MC, ANDERSON TJ, BENJAMIN EJ, CELERMAGER D, CHARBONNEAU F, CREAGER MA ET AL. Guidelines for the

- ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-65.
13. LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
 14. PANZA JA, QUYYUMI AA, BRUSH JE JR, EPSTEIN SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-7.
 15. BECKMAN JA, GOLDFINE AB, DUNAIF A, GERHARD-HERMAN M, CREAGER MA. Endothelial Function Varies According to Insulin Resistance Disease Type. *Diabetes Care*. On line, Jan 29, 2007.
 16. ZEIHNER AM, DREXLER H, WOLLSCHLAGER H, JUST H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84: 1984-92.
 17. JOANNIDES R, HAEFELI WE, LINDER L, RICHARD V, BAKKALI EH, THUILLEZ C ET AL. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries *in vivo*. *Circulation* 1995; 91: 1314-9.
 18. SUN D, HUANG A, SMITH CJ, STACKPOLE CJ, CONNETTA JA, SHESELY J ET AL. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* 1999; 85: 288-93.
 19. YOKOYAMA T, VACA L, ROSSEN RD, DURANTE W, HAZARIKA P, MANN DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 1993; 92: 2303-12.
 20. FINKEL MS, ODDIS CV, JACOB TD, WATKINS SC, HATTLER BG, SIMMONS RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-9.
 21. VASAN RS, SULLIVAN LM, D'AGOSTINO RB, ROUBENOFF R, HARRIS T, SAWYER DB ET AL. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003; 107: 1486-91.
 22. SATO Y, TAKATSU Y, KATAOKA K, YAMADA T, TANIGUCHI R, SASAYAMA S ET AL. Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol* 1999; 22: 811-3.
 23. YAMAUCHI-TAKIHARA K, IHARA Y, OGATA A, YOSHIZAKI K, AZUMA J, KISHIMOTO T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 1995; 91: 1520-4.
 24. TENTOLOURIS C, TOUSOULIS D, ANTONIADES C, BOSINAKOU E, KOTSPOULOU M, TRIKAS A ET AL. Endothelial function and proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2004; 94: 301-5.
 25. HILFIKER-KLEINER D, LANDMESSER U, DREXLER H. Molecular mechanisms in heart failure focus on cardiac hypertrophy, inflammation, angiogenesis, and apoptosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: A56-A66.
 26. YIN WH, CHEN JW, JEN HL, CHIANG MC, HUANG WP, FENG AN ET AL. Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure. *Am Heart J* 2004; 147: 931-8.
 27. LEVINE B, KALMAN J, MAYER L, FILLIT HM, PACKER M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323: 236-41.
 28. VASSALLI P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-52.
 29. VON HS, JANKOWSKA EA, ANKER SD. Tumour necrosis factor-alpha and the failing heart—pathophysiology and therapeutic implications. *Basic Res Cardiol* 2004; 99: 18-28.
 30. WONG SC, FUKUCHI M, MELNYK P, RODGER I, GIAID A. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 98: 100-3.
 31. GABAY C, KUSHNER I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448-54.
 32. CLARK DJ, CLEMAN MW, PFAU SE, ROLLINS SA, RAMAHI TM, MAYER C ET AL. Serum complement activation in congestive heart failure. *Am Heart J* 2001; 141: 684-90.
 33. YIN WH, CHEN JW, JEN HL, CHIANG MC, HUANG WP, FENG AN ET AL. The prognostic value of circulating soluble cell adhesion molecules in patients with chronic congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2003; 5: 507-16.
 34. PASCERI V, WILLERSON JT, YEH ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 2165-8.
 35. DEANFIELD JOHN E, HALCOX JULIAN P, RABELINK TON J. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 2007; 115: 1285-95.