

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۰ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷ صفحات ۱۰۹-۱۰۵

تاثیر آملودیپین بر غلظت بافتی اندوتلین-۱ بافت قلب در خرگوش دریافت کننده رژیم آتروژن

دکتر مصطفی محمدی: دانشیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: M.Mohammadin@yahoo.com

ایرج صالحی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
فریبا میرزایی: کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر ناصر اصلان آبادی: استادیار بیماریهای داخلی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر حسین بابایی: دانشیار فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمد رضا بنیادی: مربی ایمنولوژی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۵/۱۱/۱۷، پذیرش: ۸۶/۷/۱۶

چکیده

زمینه و اهداف: طی سالهای اخیر عوامل زیادی باعث افزایش بیماریهای غیر واگیر از جمله بیماریهای قلبی و عروقی شده است. یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماریهای قلبی و عروقی پدیده آترواسکروزیس است. برخی محققین احتمال دادند که داروهای بلوکه کننده کانال کلسیم می توانند در آهسته کردن روند آترواسکروزیس موثر باشند.

روش بررسی: تعداد ۳۶ خرگوش سفید نر از نژاد نیوزیلند را به چهار گروه تقسیم نمودیم: گروه کنترل، گروه دریافت کننده داروی آملودیپین، گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول، گروه دریافت کننده رژیم پر کلسترول به همراه آملودیپین. پس از ۸ هفته حیوانات را بیهوش نموده و نمونه های خونی و بافت قلب از آنها تهیه شد.

یافته ها: مصرف آملودیپین در هشت هفته موجب کاهش معنی داری ($P < 0/01$) در غلظت اندوتلین-۱ پلاسما در هر دو گروه کلسترول همراه با آملودیپین و گروه آملودیپین گردید. مصرف آملودیپین موجب کاهش معنی داری ($P < 0/01$) در غلظت اندوتلین-۱ بافتی در گروه کلسترول همراه با آملودیپین گردید در حالیکه مصرف آملودیپین اثری بر کاهش غلظت اندوتلین-۱ بافتی در گروه آملودیپین نداشت.

نتیجه گیری: رژیم پرکلسترول، موجب افزایش سطح اندوتلین پلاسما و بافت قلب گردید و آملودیپین موجب کاهش سطح آن در پلاسما و بافت قلب در گروه با رژیم پر کلسترول شد. در نتیجه مصرف آملودیپین می تواند موجب اثرات مثبت در پاتولوژی بیماری قلبی گردد.

کلید واژه ها: آترواسکروزیس، آملودیپین، اندوتلین-۱، بافت قلب

مقدمه

عوامل ایجاد کننده بیماریهای قلبی و عروقی پدیده آترواسکروزیس است. این بیماری یک فرایند عروقی پیشرونده با منشاء سباب اندوتلیال است که در اثر ریسک فاکتورهای مختلف از جمله رژیم پر چرب، شروع و به تدریج به صورت پلاکهای آترواسکروزی تظاهر پیدا می کند که بر حسب وسعت و محل ضایعه عوارض متعددی از جمله انواع بیماریهای قلبی عروقی را بدنال خواهد داشت (۳و۴). عوامل زیادی در ایجاد و پیشرفت آترواسکروزیس دخیل هستند که یکی از این عوامل اندوتلین می باشد که در

طی سالهای اخیر افزایش جمعیت سالمندان، افزایش شهرنشینی، تغییر سبک زندگی، عادات و سنتهای جدید، مشکلات زیست محیطی و آلودگی هوا در کشورهای در حال توسعه باعث افزایش بیماریهای غیر واگیر از جمله بیماریهای قلبی و عروقی شده است (۱). بطوریکه میزان مرگ و میر ناشی از بیماریهای غیر واگیر که مهمترین آنها بیماریهای قلبی و عروقی است سیر صعودی پیدا کرده و میزان مرگ و میر کمتر از ۱۰٪ در اوایل قرن بیستم به بیش از ۳۰-۵۰٪ رسیده است (۲). یکی از مهمترین

رژیم آتروژن. گروه چهارم: گروه دریافت کننده رژیم آتروژن به همراه داروی آملودیپین. بعد از گذشت ۸ هفته برای تهیه نمونه های خونی و بافتی، حیوانات ابتدا با کتامین 30 mg/kg و تیوپیتال 20 mg/kg ، تحت بیهوشی عمومی قرار گرفتند، بلافاصله نمونه های خونی جهت تهیه پلاسما (غلظت اندوتلین پلاسما) از ورید اجوف تهیه شد. سپس حیوانات با دوز بالای پنتوباریتال کشته شده و نمونه های بافتی از قلب به منظور گیری اندوتلین بافتی تهیه شد.

رژیم غذایی و دارویی:

به مدت هشت هفته (۱۲)، گروه اول و دوم از رژیم غذایی معمولی و گروه سوم و چهارم از رژیم غذایی پرکلسترول برخوردار بودند. کلسترول به میزان ۲٪ با غذای روزانه مخلوط می شد. پودر کلسترول از شرکت Merk تهیه شده بود. در همین مدت، گروه دوم و چهارم، داروی آملودیپین (تهیه شده از شرکت آریا) به میزان 5 mg/kg/day دریافت می کردند. دارو به صورت پودر خالص بوده و میزان لازم در آب حل شده، هر روز ساعت ۹:۳۰ صبح، به صورت گاواژ به حیوانات داده می شد.

اندازه گیری اندوتلین پلاسما:

برای تهیه پلاسما و اندازه گیری سطح اندوتلین-۱، مقدار سه میلی لیتر خون در لوله های آزمایش حاوی EDTA (1 mg/cc) ریخته شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت 4°C سانتی گراد با دور 3500 سانتریفوژ گردید و اسی سی پلاسما توسط سمپلر برداشته شد و تا زمان انجام آنالیز در دمای 80°C درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس جهت اندازه گیری اندوتلین از حالت انجماد خارج و با استفاده از کیت اختصاصی اندوتلین (Titer Zyme® EIA kit -No:03080625) و طبق روش کار مندرج در آن، غلظت اندوتلین-۱ پلاسما اندازه گیری شد.

اندازه گیری اندوتلین بافتی:

برای تهیه نمونه های بافتی، بعد از اتمام خونگیری، حیوان با دوز بالای پنتوباریتال کشته شده و نمونه های بافتی از عضله بطن چپ تهیه شد. نمونه ها وزن گردید. سپس با مقدار مشخص محلول هموژنیزه (اسید کلریدریک 20 mmol/l - اسید استیک 1 mol/l) مخلوط شده، توسط دستگاه هموژنایزر (HOMO (4/R) MIT، هموژنیزه شدند. سپس محلول هموژنیزه به مدت ۱۰ دقیقه با دور 3000 در دمای 4°C درجه سانتی گراد، سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت شفاف برداشته شده و در دمای 80°C درجه منجمد گردید. سپس به مدت ۴۸ ساعت توسط دستگاه لیوفیلیزاتور (Christ Alpha1-4)، لیوفیلیز شد و با استفاده از کیت اختصاصی اندوتلین (Titer Zyme® EIA kit -No:03080625) و طبق روش کار مندرج در آن، غلظت اندوتلین-۱ بافتی اندازه گیری شد.

جهت مقایسه بیش از سه گروه با یکدیگر و تشخیص معنی دار بودن تفاوت بین گروه های مورد آزمایش با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه داخل گروهی از مقایسه چند گانه پست هاک (Tukey) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده اند. برای رسم نمودارها و آنالیز آماری

سال ۱۹۸۵ Hickey و همکاران یک فاکتور متقبض کننده عروقی که از اندوتلیوم آزادی شد معرفی کرده و آنرا اندوتلین نامیدند (۵). در سیستم قلبی و عروقی انواع اندوتلین در چند بافت مختلف مثل سلولهای اندوتلیوم عروق، عضله صاف عروق و میوسیت های قلبی و فیبروبلاست ها بیان می شود (۶). انواع اندوتلین که شامل نوع ۱، ۲ و ۳ می باشد همگی دارای ۲۱ اسید آمینه بوده و فقط از نظر چند اسید آمینه با هم اختلاف دارند که در میان آنها اندوتلین ۱-۱ نسبت به بقیه از غلظت بالاتری برخوردار است (۶). اندوتلین-۱ نقش فیزیولوژیکی مهمی در تنظیم عملکرد طبیعی قلب دارد. اندوتلین دارای اثرات مستقیم بر عمل انقباضی، سنتز پروتئین و حوادث الکتروفیزیولوژیکال در میوسیت های قلبی دارد که اغلب این اثرات را از طریق رسپتور نوع A انجام می دهد (۷). بنابر این افزایش غیر طبیعی آن با پاتولوژی بیماری های نظیر هیپرتانسیون؛ ایسکمی و نارسایی قلب و اختلالات الکتروفیزیولوژی در ارتباط است (۸). ET-۱ در بافت قلب در پاسخ به اثرات مختلف تولید می شود (۹). فشار مکانیکی و چند فاکتور نوروهومورونال نظیر آنژیوتانسین ۲ و نور اپی نفرین تولید ET-۱ را تحریک می کنند (۶). بطور مثال در نارسایی قلبی ناشی از ایسکمی بیان ژن mRNA مربوط به ET-۱ در بافت قلب افزایش می یابد (۱۰). مطالعات انجام شده بر روی میزان تولید موضعی ET-۱ در قلب اندک است (۱۱).

برخی از این اعمال اندوتلین وابسته به کلسیم می باشد. بنابراین نقش احتمالی بلوکه کننده های کانال کلسیم مورد توجه قرار گرفته است. این داروها در سه گروه طبقه بندی شدند. ۱- دی هیدروپیریدینی ها مانند آملودیپین و نیفدپین ۲- فینیل آلکیل آمین ها مانند بیریدیل و وراپامیل ۳- بنزوتیازین ها مانند دیلتیازم. آملودیپین داروی مصرفی در این مطالعه از خانواده دی هیدروپیریدینی ها می باشد. ساختمان آملودیپین موجب افزایش عمر دارو در بدن و در نتیجه مصرف تک دوز آن در روز می باشد (۱۲). با توجه به اینکه برخی اعمال اندوتلین وابسته به کلسیم بوده و در جریان آترواسکلروزیس نیز میزان اندوتلین افزایش می یابد، از این رو در این مطالعه بر آن شدیم تا با بررسی اثر یک داروی بلوکه کننده کانال کلسیم در فرایند آترواسکلروزیس به نام آملودیپین که نسبت به سایر داروهای این گروه از عوارض جانبی کمتری برخوردار بوده و بعلاوه ویژگی خاص ساختمان خود بصورت تک دوز روزانه مورد استفاده قرار می گیرد، بر غلظت بافتی ET-۱ در بافت قلب خرگوش دریافت کننده رژیم آتروژن مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

تعداد ۳۶ خرگوش سفید نر از نژاد نیوزیلند، با وزن 79 ± 0 کیلوگرم، به صورت تصادفی انتخاب شده و در چهار گروه ۹ تایی تقسیم شدند: گروه اول: گروه کنترل. گروه دوم: گروه دریافت کننده داروی آملودیپین. گروه سوم: گروه دریافت کننده

معنی داری مشاهده نگردید. مصرف آملودیپین در گروه آملودیپین موجب کاهش معنی داری در غلظت اندوتلین-۱ پلاسما ($P < 0/01$) نسبت به گروه کنترل شد (نمودار ۱).

تغییرات اندوتلین بافتی:

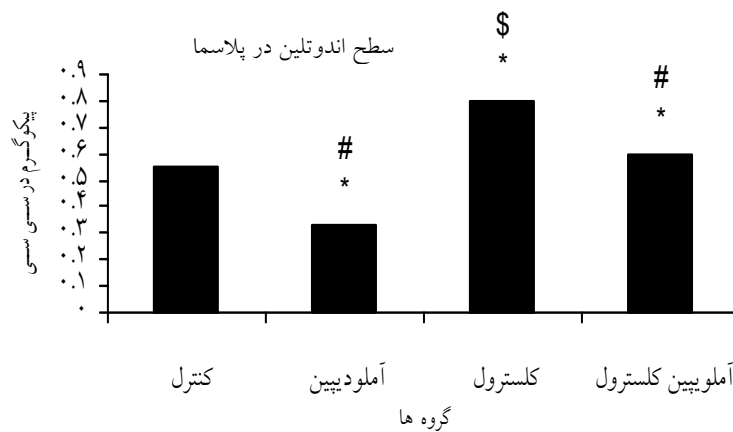
مصرف رژیم غذایی با کلسترول بالا موجب افزایش معنی داری ($P < 0/01$) در غلظت بافتی اندوتلین-۱ نسبت به گروه کنترل گردید. در گروه کلسترول همراه با آملودیپین به دنبال مصرف هم زمان آملودیپین و رژیم غذایی پر کلسترول کاهش معنی داری ($P < 0/01$) در غلظت اندوتلین-۱ بافتی نسبت به گروه پر کلسترول دیده شد. مصرف آملودیپین در گروه آملودیپین موجب تفاوت معنی داری در غلظت اندوتلین-۱ بافتی نسبت به گروه کنترل نگردید (نمودار ۲).

از برنامه های Excel و SPSS استفاده شد. مقادیر $P > 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی اندوتلین پلاسما:

بدنبال دریافت رژیم غذایی با کلسترول بالا به مدت هشت هفته افزایش معنی داری ($P < 0/01$) در غلظت اندوتلین-۱ پلاسما نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. مصرف آملودیپین در هشت هفته موجب کاهش معنی داری ($P < 0/01$) در غلظت اندوتلین-۱ پلاسما در گروه کلسترول همراه با آملودیپین نسبت به گروه کلسترول شد در حالیکه در غلظت اندوتلین-۱ پلاسما در گروه کلسترول همراه با آملودیپین نسبت به گروه کنترل تفاوت



نمودار ۱: تغییرات اندوتلین پلاسما بر حسب پیکو گرم در سی سی (pg/cc) در چهار گروه مورد مطالعه: گروه کنترل، گروه دریافت کننده داروی آملودیپین، گروه دریافت کننده رژیم پر کلسترول، گروه دریافت کننده رژیم پر کلسترول به همراه آملودیپین. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm انحراف معیار می باشد.



نمودار ۲: تغییرات اندوتلین بافت بطن چپ بر حسب پیکو گرم در صد گرم بافت (pg/100 mg tissue) در چهار گروه مورد مطالعه: گروه کنترل، گروه دریافت کننده داروی آملودیپین، گروه دریافت کننده رژیم پر کلسترول، گروه دریافت کننده رژیم پر کلسترول به همراه آملودیپین. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm انحراف معیار می باشد.

- × اختلاف معنی دار را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد ($P < 0/01$)
- # اختلاف معنی دار با گروه کلسترول را نشان می دهد ($P < 0/01$)
- \$ اختلاف معنی دار با گروه آملودیپین را نشان می دهد ($P < 0/01$)

بحث

هیپرکلسترولمی یکی از ریسک فاکتورهای اصلی در بیماریهای قلبی عروقی است (۶). مطالعات نشان داده است که بعد از انفارکتوس میوکارد و نارسایی قلبی به دنبال ایسکمی میزان ET-1 پلاسما افزایش یافته که موجب افزایش انقباض عروق کرونری و ایسکمی میوکارد و اختلال بطنی می شود و در نتیجه عوارض بیماری را افزایش می دهد (۱۰ و ۱۳) که بیانگر اهمیت اندوتلین - ۱ در پاتولوژی بیماریهای قلبی عروقی است.

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر موبد افزایش غلظت اندوتلین-۱ پلاسما و بافت قلب بدنال رژیم هیپر کلسترولمی می باشد که می تواند به ایجاد یا گسترش عوارض بیماری قلبی عروقی کمک کند. از آنجا که گزارش شده است که لیپو پروتئین ها مخصوصا LDL و VLDL می توانند آزادی اندوتلین از سلولهای اندوتلیال (۱۴ و ۱۵) و سلولهای عضله صاف را (۱۶) تحریک کنند در تحقیق ما احتمالاً رژیم آتروژن با افزایش لیپو پروتئین ها موجب افزایش اندوتلین -۱ شده است.

برخی از فاکتورهای موثر در ایجاد بیماریهای قلبی عروقی از جمله هیپرتانسیون، دیابت، سیگار (۱۷) و هیپرکلسترولمی (۱۸) موجب افزایش ET-1 هم می شوند پس می توان نتیجه گرفت که بین بیماریهای قلبی عروقی و افزایش ET-1 رابطه نزدیکی وجود دارد. مطالعات زیادی در مورد تاثیر کلسیم بلوکرها بر ضایعه آترواسکلروتیک در عروق کرونری انجام گرفته است که نشان داده اند این داروها می توانند میزان ضایعات عروق کرونری و ضایعات بافتی عضله قلب را کاهش دهند که نشان دهنده تاثیر مثبت این داروها بر ضایعات قلبی عروقی است (۲۱-۱۹). نشان داده شده است که آملودیپین موجب کاهش تجمع کلسترول و پراکسیداسیون لیپید در خون و آئورت می شود (۲۲).

بنابراین کاربرد هر عاملی که موجب کاهش سطح ET-1 شود می تواند از بروز یا گسترش بیماریهای قلبی عروقی جلوگیری کند. مطالعات انجام شده بر روی میزان تولید ET-1 موضعی در قلب بسیار کم است (۱۱) و اندک مطالعات انجام شده هم نشان داده اند که ET-1 در پاتوفیزیولوژی بیماریهای قلبی از جمله ایسکمی (۲۲) و نارسایی احتقانی قلب (۱۱) و هیپرتروفی قلب (۹) نقش مهمی می تواند داشته باشد. کاهش اثرات اندوتلین نیز در بهبود بیماریهای قلبی نقش مهمی دارد به طوری که تایید شده است مصرف آنتاگونیست های ET-1 نیز می توانند وسعت ناحیه انفارکتوس شده را کاهش دهد (۲۳).

با وجود شواهد فوق احتمال داده شده است که کاهش میزان اندوتلین با CCBS در کاهش میزان ضایعات آترواسکلروزیس بسیار مفید هستند ولی برخی مطالعات انجام شده این داروها را بی اثر یا حتی تشدید کننده آترواسکلروزیس معرفی کرده اند (۲۴).

نتایج بدست آمده در تحقیق ما نشان داد که مصرف خوراکی آملودیپین به میزان ۵ mg/kg/day، به مدت ده هفته به صورت

خوراکی موجب کاهش غلظت بافتی اندوتلین در قلب گروه با رژیم آتروژن گردید که این نتایج موافق با سایر گزارشات ارائه شده از مطالعات قبلی در خصوص کلسیم بلوکرها است (۲۵).

در تحقیق ما مصرف خوراکی آملودیپین به میزان مشابه در حیوانات با رژیم غذایی معمولی موجب کاهش غلظت پلاسمایی اندوتلین-۱ گردید در حالیکه اثری بر میزان اندوتلین-۱ بافتی نداشت. این تفاوت می تواند در نتیجه تاثیر انتخابی آملودیپین بر کانال های کلسیم موجود در عضلات صاف جدار عروق و یا اختلاف در نوع کانال های موجود در عضلات صاف عروق و عضله قلبی باشد (۲۶).

نتیجه گیری

مصرف خوراکی آملودیپین در گروه با رژیم آتروژن موجب کاهش پلاسمایی و بافتی سطح اندوتلین در خون و عضله قلب گردید. داده های این تحقیق نشان دهنده تاثیر مثبت آملودیپین در درمان افزایش اندوتلین-۱ ناشی از رژیم آتروژن می باشد. در رژیم غذایی معمولی مصرف خوراکی آملودیپین با کاهش اندوتلین می تواند به عنوان پیشگیری از بیماریهای قلبی عروقی در افرادی که خطر بیماریهای قلبی در آنها زیاد است مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات تکمیلی در خصوص تاثیر آملودیپین بر سایر فاکتورهای دخیل در پاتوژنز بیماریهای قلبی عروقی به منظور شناسایی مکانیسم دقیق تر این دارو پیشنهاد می گردد

References

1. Main NP, Vander Sande MA, Hazel M. Changing cause of death in the west African town of Bangul. *BWHO* 2001; **79**(2):133-41.
2. Shammas NW. Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease. *Vasc Health Risk Manag* 2007;**3**(2):229-34
3. Masaki T. Historical review : Emdothelin. *TERND in oharmacol Sci* 2004; **25**(4), 119-224.
4. Mohacsi A, Magyar J, Tamas B, Nanasi PP. Effects of endothelins on cardiac and vascular cells: new therapeutic target for the future. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; **2**(1):53-63.
5. Luscher F, Barton M.. Endothelins and endothelin receptor antagonists. *Circualtion* 2000; **102**: 2434-2440.
6. Yamauchi R, Miyauchi T, Hoshino T, Kobayashi T, Aihara H, Sakai S., et al. Role of endothelin in deterioration of heart failure due to cardiomyopathy in hamsters. *Circulation* 1999; **99**: 2171-76.
7. Barton M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr Hypertens Rep* 2000; **2**(1): 84-91.
8. Bruner F, Brassilva C, Cerderia AS ,Moreira FL. Cardiovascular endothelins:Essential regulators Cardiovascular homestasis. *Pharmacology &Therap* 2006; **111**(2):508-531.
9. Shohet RV, Kishanoki YY, Zhao XS, Siddiquee Z, Franco F, Yanagisava M.. Mice with cardiomyocyte specific disruption of the gene are resistant to hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**(7): 2088-93.
10. Tonnesen T, Christensen G, Oie E, Holt E, Kjekshus H. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats. *Cardiovas res* 1999; **33**(3):601-610.
11. Tonnesen T, Lunde PK, Giad A, Christensen G. Pulmonary and cardiac expression of preproendothelin-1 mRNA are increased in heart failure after myocardial infarction in rats. *Cardiovas Res* 1998; **39**(3):633-643.
12. Mason RP. Mechanism of stabilization for the dihydropyridine calcium channel blocker amlodipine :review of the evidence. *Atherosclerosis* 2002; **165**: 191-199.
13. Eickelberg O, Roth M, Block LH. Effect of amlodipine on gene expression and extracellular matrix formation in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts: implications for vascular protection. *Int J Cardiol* 1997; **62**(2): 31-37.
14. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; **70**: 1191-1192.
15. Horio T, Kohno M, Yasonari K, Murakawa K, Yokokawa K, Ikeda M. Stimulation of endothelin -1 release by low density lipoproteins and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis* 1993; **101**: 185-190.
16. Haug C, Schmid Kotsas A, Zorn U, Schaett S, Gross HJ, Gruenert A., et al. Endothelin -1 synthesis and endothelin B receptor expression in human coronary artery smooth muscle cells and monocyte derived macrophages is up regulated by low density lipoproteins. *J Mol cell Cardiol* 2001; **33**:1701-1712.
17. Dashwood MR, Tsui CS. Endothelin -1 and atherosclerosis: potential complication associated with endothelin receptor blockade. *Atherosclerosis* 2002; **160**: 297-304.
18. Haak T, Marz W, Joungman E, Hausser S, Siekmeier R, Gross W. Elevated endothelin levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Clin Investing* 1994; **72**(8): 580-584
19. Chen L, Hanght WH, Yang B, Saldean TGP, Parathasarathy S, Mehta JL. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of anti-atherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J Am Cardiol* 2001; **30** :596-575.
20. Byington PR, Craven TE, Furberg CD, Pahor M. Isradipine ,raised glycosylated haemoglobin, and risk of cardiovascular events. *Lancet* 1997; **350**: 1075-1076.
21. Pitt B, Byington PR, Furberg CD, Hunninghake DB, Mancini J, Miller ME, et al. Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. *Circulation* 2000; **102**: 1503-1510.
22. Dense JA, Desmet WJ, Coussemont PC, Sheerder IK. Long term effects of nisoldipine on the progression of coronary atherosclerosis and the occurrence of clinical events. *Heart* 2003; **89**(8): 887-892.
23. Miyauchi T, Goto K. Heart failure and endothelin receptor antagonists. *Tren Pharmacology scien* 1999; **20**(5): 210-217.
24. Nayler WC. Review of preclinical data of calcium channel blockers and atherosclerosis , *J cardiovasc Pharmacol* 1999; **33** (2) , 7 – 11.
25. Hoshida S, Yamashida N, Kuzuya T, Hori M. Reduction in infarct size by chronic amlodipine treatment in cholesterol fed rabbits. *Atherosclerosis* 1997; **138**(1):163-170
26. Curtis TM, Scholfield CN. Evidence for two endothelin Et(A) receptor subtypes in rabbit arteriolar smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 2001;**134**(8):1787-95