

Debelina intime in medije karotidnih arterij pri mladostnikih z družinsko hiperholesterolemijo*

Carotid intima-media thickness in young patients with familial hypercholesterolemia*

Barbara Kosmina**, Aleša Lavrenčič***

Deskriptorji
hiperholesterolemija družinska
karotidne arterije-ultrazvočna preiskava
ateroskleroza

Descriptors
hypercholesterolemia familial
carotid arteries-ultrasonography
atherosclerosis

Izvleček. Družinska hiperholesterolemija je dedna presnovna bolezen, ki spada med najmočnejše aterogene dejavnike. Pri 28 mladih bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo in pri 28 zdravih preiskovancih smo določili povprečno debelino intime in medije karotidnih arterij z ultrazvočno preiskavo na način B. Določili smo koncentracije krvnih maščob, lipoproteina(a), krvnega sladkorja ter nekatere koagulacijske in fibrinolitične spremenljivke. Povprečna debelina intime in medije je bila pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo značilno večja kot pri zdravih preiskovancih ($0,71 \pm 0,15$ proti $0,49 \pm 0,08$ mm, $p < 0,0001$). Pri vseh preiskovancih skupaj smo našli značilno pozitivno povezavo debeline intime in medije s celotnim holesterolem, holesterolem v lipoproteinih male gostote, trigliceridi in sistoličnim krvnim tlakom. V skupini bolnikov z družinsko hiperholesterolemijo je bila debelina intime in medije značilno pozitivno povezana le s starostjo in mejno s sistoličnim krvnim tlakom, v skupini zdravih pa s sistoličnim krvnim tlakom, telesno težo in višino, trigliceridi in antigenom tkivnega aktivatorja plazminogena ter je bila pri moških večja kot pri ženskah. Z metodo multiple regresije smo ugotovili, da so neodvisni napovedni dejavniki za večjo debelino intime in medije pri vseh preiskovancih skupaj pripadnost skupini bolnikov z družinsko hiperholesterolemijo, večja koncentracija trigliceridov in starost. Neodvisni napovedni dejavniki za večjo debelino intime in medije pri zdravih pa so moški spol, starost in večja koncentracija trigliceridov.

Abstract. Familial hypercholesterolemia, an inheritable metabolic disorder, is the most powerful risk factor for the accelerated atherosclerosis. Mean intima-media thickness of carotid arteries was determined with B-mode ultrasonography in 28 young patients with familial hypercholesterolemia and in 28 normolipemic subjects. Serum lipids, lipoprotein(a), glucose, coagulation and fibrinolytic parameters were determined. Mean intima-media thickness was significantly greater in patients with familial hypercholesterolemia than in controls (0.71 ± 0.15 vs. 0.49 ± 0.08 mm, $p < 0.0001$). In all subjects together mean intima-media thickness was positively correlated with total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and systolic blood pressure. In patients with familial hypercholesterolemia mean intima-media thickness was positively correlated with age and systolic blood pressure, while in controls it was correlated with systolic blood pressure, body weight and height, triglycerides and tissue plasminogen activator antigen and it was greater in males than females. Multiple regression analysis identified the group of patients with familial hypercholesterolemia, higher triglycerides and age as the independent determinants of IMT in all subjects together, while in controls these determinants were sex, age and triglyceride level.

*Objavljeno je delo, ki je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado v letu 1994.

**Barbara Kosmina, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 61000 Ljubljana

***Aleša Lavrenčič, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 61000 Ljubljana

Uvod

Ateroskleroza in dejavniki tveganja

Bolezni srca in ožilja so danes v razvitem svetu vodilni vzrok umrljivosti. Te bolezni so posledica ateroskleroze, dolgotrajnega degenerativnega procesa na arterijah, na katerega vplivajo različni genetski dejavniki in dejavniki okolja. Danes znane dejavnike tveganja za aterosklerozo prikazuje tabela 1 (1).

Tabela 1. *Dejavniki tveganja za aterosklerozo. LDL – lipoprotein majhne gostote, HDL – lipoprotein velike gostote.*

Starost: moški \geq 45 let, ženske \geq 55 let ali prezgodnja menopavza brez nadomestnega estrogenskega zdravljenja

Družinska anamneza: srčni infarkt ali nenadna smrt pred 55. letom starosti pri moških sorodnikih prvega kolena ali pred 65. letom starosti pri ženskih sorodnikih prvega kolena

Hiperholesterolemija zaradi zvečane koncentracije LDL-holesterola

Majhna koncentracija HDL-holesterola

Kajenje

Hipertenzija

Sladkorna bolezen

Debelost

Manj raziskani dejavniki tveganja:

Zvečana koncentracija lipoproteina (a)

Motnje v delovanju koagulacijskega in fibrinolitičnega sistema

Najpomembnejši dejavnik tveganja je holesterol v lipoproteinih majhne gostote (LDL) (2). LDL povzroča okvaro žilnega endotelija, ki je sprva le funkcijska, nato pa tudi morfološka. Zaradi večje prepustnosti endotelija se v žilni steni kopičijo LDL in monociti, ki fagocitirajo LDL in se tako preobrazijo v penaste celice (3). V poškodovani intimi se kopičijo tudi nekatere plazemske beljakovine kot sta albumin in fibrinogen (4). Številni rastni dejavniki povzročijo deljenje gladkih mišičnih celic, ki pridejo v intimo iz medije. Kopičenje penastih celic in gladkih mišičnih celic v intimi vodi do nastanka maščobne proge. Nekatere penaste celice propadejo, zato se maščobe nabirajo v zunajceličnem prostoru; to spremembo imenujemo predaterom. Naslednja stopnja je aterom, ki ima sredico, sestavljeno iz razpadlih celic, zunajceličnih maščob, kristalov holesterola in nekaterih sestavin krvi. Sredico obdajajo gladke mišične celice, kolagenska vlakna, proteoglikani, makrofagi in limfociti T. Aterom se lahko razvije v fibroaterom, ki vsebuje več kolagena in gladkih mišičnih celic. Iz ateroma ali fibroateroma lahko nastane zapletena okvara s trombom, hematonom ali razpoko. Končni aterosklerotični spremembi sta kalcinirana okvara, ki vsebuje pretežno kalcijeve soli, in vezivna okvara, ki vsebuje predvsem kolagen (5).

Družinska hiperholesterolemija (DH) sodi med najmočnejše aterogene dejavnike. Je avtosomno dominantno dedna bolezen s prevalenco v populaciji 1 na 500. Temeljna motnja je sprememba gena, ki določa celične receptorje za LDL (LDL-receptor), zaradi če-

sar je aktivnost LDL-receptorjev zmanjšana, kar povzroči zmanjšano razgradnjo LDL in njihovo kopičenje v plazmi (6). Ker je pri bolnikih z DH koncentracija LDL-holesterola povečana od rojstva, je pri njih aterosklerotični proces pospešen, zaradi česar se pogosto že zgodaj pojavi koronarna bolezen srca. Pri moških heterozigotih nastopijo klinični znaki koronarne bolezni srca že v četrtem in petem desetletju, do 50. leta starosti doživi srčni infarkt 50 % bolnikov. Tudi pri ženskah z DH je pogostnost koronarne bolezni srca večja kot pri zdravih, vendar se začne pojavljati 10 let kasneje kot pri moških. Pri homozigotih se simptomi koronarne bolezni pojavijo že pred 10. letom starosti in nezdravljeni umrejo večinoma zaradi srčnega infarkta že okrog 20. leta (7).

Mnoge raziskave so pokazale, da je velika plazemska koncentracija lipoproteina(a) (Lp(a)) neodvisen dejavnik tveganja za koronarno bolezen srca (8–11). Lp(a) je lipoprotein, ki je po zgradbi podoben LDL, vsebuje pa tudi eno ali dve molekuli apoproteina(a) (apo(a)) (12). Apo(a) ima podobno zgradbo kot plazminogen in je specifičen za Lp(a), saj ga ne najdemo v nobenem drugem lipoproteinu (13). Sinteza Lp(a) večinoma poteka v jetrih, kje in kako se razgrajuje pa še ni znano. Prav tako ne poznamo njegove fiziološke vloge. Menijo, da je njegova plazemska koncentracija predvsem genetsko določena z izoformno obliko apo(a) in ni odvisna od starosti, spola ali prehrane. Mnogi avtorji so poskušali razložiti mehanizme aterogenega delovanja Lp(a). Možno je, da Lp(a) prehaja skozi endotelij v arterijsko steno, kjer ga fagocitirajo makrofagi, ki tako postanejo pena-te celice (14). Izsledki številnih raziskav kažejo tudi vpliv Lp(a) na fibrinolitični sistem (15, 16). Apo(a) lahko zaradi podobne zgradbe tekmuje s plazminogenom za vezavna mesta na fibrinogenu, fibrinu, endoteljskih celicah in makrofagih in tako zavira aktivacijo plazminogena. Kaže torej, da Lp(a) pospešuje aterosklerotični proces na dva načina: kot maščoba zaradi podobne zgradbe z LDL in kot zaviralec fibrinolize zaradi podobne zgradbe apo(a) s plazminogenom.

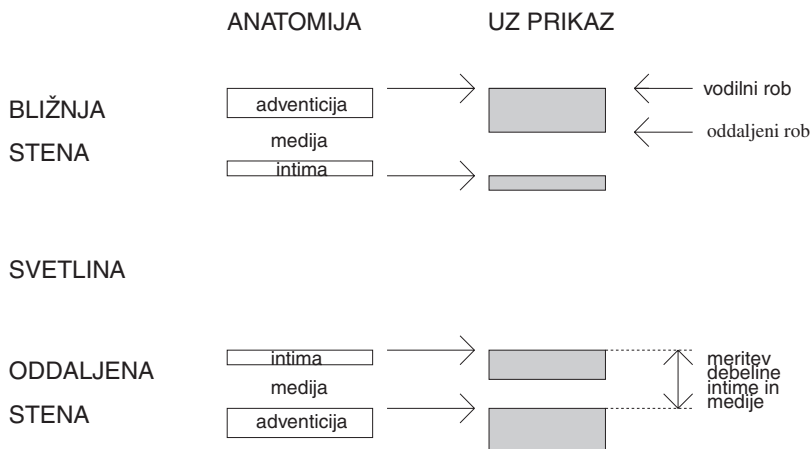
Danes pripisujejo pomembno vlogo v aterogenezi tudi koagulacijskemu in fibrinolitičnemu sistemu. To sta encimska sistema v krvi, ki sodelujeta pri hemostazi: koagulacijski sodeluje pri nastajanju krvnih strdkov, fibrinolitični pa jih raztaplja. Koagulacijski sistem deluje prek niza kaskadnih reakcij, v katerih sodelujejo različne plazemske beljakovine, imenovane faktorji koagulacije, med njimi tudi faktor VII. Končna stopnja teh reakcij je pretvorba topnega fibrinogena v netopen fibrin, ki je temeljni gradbeni element krvnega strdka (17). Končna stopnja delovanja fibrinolitičnega sistema pa je razgradnja fibrina na razgradne produkte, pri čemer sodeluje plazmin, ki nastaja iz plazminogena. Glavni aktivator tega procesa je tkivni aktivator plazminogena (t-PA), katerega aktivnost zavira inhibitor tkivnega aktivatorja plazminogena 1 (PAI-1). t-PA, ki ga izločajo endoteljske celice, in PAI-1, katerega izvor ni natančno opredeljen, sta tudi glavna dejavnika, ki uravnava aktivnost fibrinolitičnega sistema (18) (slika 1).

Zvečana koncentracija fibrinogena in zvečana aktivnost faktorja VII v krvi ter zmanjšano delovanje fibrinolitičnega sistema so povezani z napredovanjem ateroskleroze in njenimi zapleti (19, 20), ni pa še jasno, kakšen je njihov pomen pri začetnih stopnjah tega procesa. Znano je, da pri motenem delovanju endotelija fibrinogen prehaja v intimo, kjer se s pomočjo trombina pretvori v fibrin (21). Poleg tega fibrinogen sodeluje tudi pri prehodu monocitov v podendoteljski prostor (22). Penaste celice izločajo tkivni faktor

ne spremembe na koronarnih in karotidnih arterijah pojavljajo sočasno (24). Tako so kar pri 90% bolnikov z DH in koronarno boleznijo srca, starejših od 40 let, ugotovili hude aterosklerotične spremembe karotidnih arterij (25). Poleg tega menijo, da so dejavniki tveganja za aterosklerozo ekstrakranialnih karotidnih arterij enaki kot za aterosklerozo koronarnih arterij, zato je proces na karotidnih arterijah zrcalo dogajanja na koronarnih (26–28).

Ena od neinvazivnih metod za pregled ekstrakranialnih karotidnih arterij je ultrazvočna preiskava na način B, s katero lahko opazujemo arterijsko steno in merimo njeno debelino. Večina avtorjev danes meni, da je zadebeljena arterijska stena prva morfološko vidna aterosklerotična sprememba, katere patoanatomska podlaga je maščobna proga in morda tudi predaterom (29).

Pignoli in sodelavci (30) so prvi opisali ultrazvočno sliko normalne arterijske stene, ki kaže vzporedni ehogeni črti, ločeni z manj ehogenim ali neehogenim pasom (vzorec dvojne črte). Shema anatomije žilne stene in ultrazvočne slike prikazuje slika 2.



Slika 2. Shema anatomije žilne stene in ultrazvočni prikaz karotidnih arterij na način B. V zgornjem delu slike, ki je bližje sondi, sta dve ehogeni črti, ločeni z neehogenim pasom. Spodnji del je zrcalna slika odbojev zgornjega dela. Med obema deloma je neehogeno področje, ki predstavlja svetlino arterije. Zgornjo mejno črto odboja imenujemo vodilni rob, spodnjo pa oddaljeni rob.

Wendelhag in sodelavci (31) so dokazali, da nastane vodilni rob odboja na meji dveh struktur z različno akustično impedanco, oddaljeni rob pa je odvisen od lastnosti ultrazvočne naprave. Debelina ehogene črte torej nima anatomske podlage, zaradi česar je treba vse meritve opraviti na vodilnih robovih.

Na bližnji steni nastane vodilni rob prve ehogene črte med periadventicijo in adventicijo, vodilni rob druge ehogene črte pa med intimo in svetlino. Oddaljeni rob nima anatomske podlage, zato debeline bližnje stene ne moremo meriti.

Na oddaljeni steni nastane vodilni rob prve ehogene črte med svetlino in intimo, vodilni rob druge ehogene črte pa med medijo in adventicijo. Razdalja med obema vodilnima robovoma oddaljene stene predstavlja debelino intime in medije (DIM).

Namen naloge

Ker je pri bolnikih z DH proces ateroskleroze pospešen, pričakujemo pri njih izrazitejšo morfološke spremembe arterij že v mladosti. Želeli smo ugotoviti, ali lahko te zgodnje spremembe zaznamo z neinvazivno ultrazvočno preiskavo karotidnih arterij. Naš namen je bil tudi osvetliti vlogo nekaterih manj raziskanih dejavnikov, ki sodelujejo pri razvoju ateroskleroze.

V raziskavi smo si zadali naslednje cilje:

- izmeriti DIM pri mladih bolnikih z DH in jo primerjati z DIM zdravih preiskovancev,
- ugotoviti, ali obstaja povezava med DIM in nekaterimi kliničnimi in krvnimi parametri, zlasti koncentracijo maščob in Lp(a) ter testi koagulacije in fibrinolize.

Preiskovanci in način dela

Preiskovanci

Bolniki

V arhivu Interne klinike Trnovo smo našli 115 bolnikov, ki se ambulantno zdravijo zaradi DH. Njih ali njihove družinske člane, stare od 10 do 30 let, smo povabili k sodelovanju. Odzvalo se je 39 družin z 58 družinskimi člani, med katerimi smo poiskali bolnike z DH. Diagnozo heterozigotne DH smo postavili na podlagi naslednjih meril (32):

- vrednosti celotnega in LDL-holesterola (tabela 2),
- pojavljanje boleznih v družini.

Tabela 2. Vrednosti celotnega in LDL-holesterola ter trigliceridov (mmol/l), potrebnih za diagnozo družinske hiperholesterolemije, glede na starost in pojavljanje boleznih v družini.

Starost	Celotni holesterol (LDL-holesterol) bolezen pri sorodnikih 1. kolena	Celotni holesterol (LDL-holesterol) bolezen pri sorodnikih 2. kolena	Celotni holesterol (LDL-holesterol) ni podatkov o boleznih v družini	Trigliceridi
Do 18 let	>5,7 (4,0)	>6,0 (4,3)	>7,0 (5,2)	<1,1
19 do 29 let	>6,2 (4,4)	>6,5 (4,7)	>7,5 (5,7)	<1,7
30 do 39 let	>7,0 (4,9)	>7,3 (5,2)	>8,8 (6,2)	<2,0
Nad 39 let	>7,5 (5,3)	>7,8 (5,6)	>9,3 (6,7)	<2,3

Za homozigotne bolnike z DH so značilne vrednosti holesterola nad 15 mmol/l pri otrocih in pojav ksantomov pred 20. letom starosti.

Zbrali smo 27 bolnikov s heterozigotno in eno bolnico s homozigotno DH. Med njimi se je en bolnik zdravil zaradi arterijske hipertenzije z enalaprilom, drugi so imeli normalen krvni tlak. Trije bolniki so se zdravili z lovastatinom, bolnica s homozigotno DH pa z LDL-afe-

rezo, tako da je bila vrednost celotnega holesterola pri njej okoli 12 mmol/l. Nihče ni imel sladkorne bolezni niti simptomov srčno-žilnih bolezni.

Kontrolna skupina

V kontrolno skupino smo vključili 28 zdravih preiskovancev, ki so po spolu in starosti ustrezali bolnikom in so imeli normalne koncentracije maščob v krvi:

- koncentracijo celotnega holesterola manj kot 4,4 mmol/l, LDL-holesterola manj kot 2,8 mmol/l, trigliceridov manj kot 1,1 mmol/l pri starosti do 18 let (33),
- koncentracijo celotnega holesterola manj kot 5,2 mmol/l, LDL-holesterola manj kot 3,5 mmol/l, trigliceridov manj kot 2,3 mmol/l pri starosti 19 let in več (1).

Nihče ni imel zvišanega krvnega tlaka, sladkorne bolezni ali zgodnje koronarne bolezni v družini (pri moških sorodnikih prvega in drugega kolena pred 55. letom starosti, pri ženskih pa pred 65. letom). Med raziskavo niso jemali nobenih zdravil.

Ker je kajenje eden izmed poglavitnih dejavnikov tveganja za aterosklerozo, smo bili pri vključevanju bolnikov in zdravih preiskovancev pozorni, da je bilo število kadilcev v obeh skupinah enako, tako da so bili končno med izbranimi preiskovanci trije kadilci v skupini z DH in trije v skupini zdravih.

Vse sodelujoče smo seznanili z namenom raziskave. V sodelovanje so privolili prostovoljno. Raziskavo je odobrila republiška komisija za medicinsko-etična vprašanja.

Anamneza in klinični pregled

Zbrali smo podatke o povišani koncentraciji holesterola in srčno-žilnih boleznih v družini, v osebni anamnezi pa nas je zanimala navzočnost dejavnikov tveganja za aterosklerozo (kajenje, sladkorna bolezen, zvišan krvni tlak, telesna neaktivnost) in podatki o jemanju zdravil.

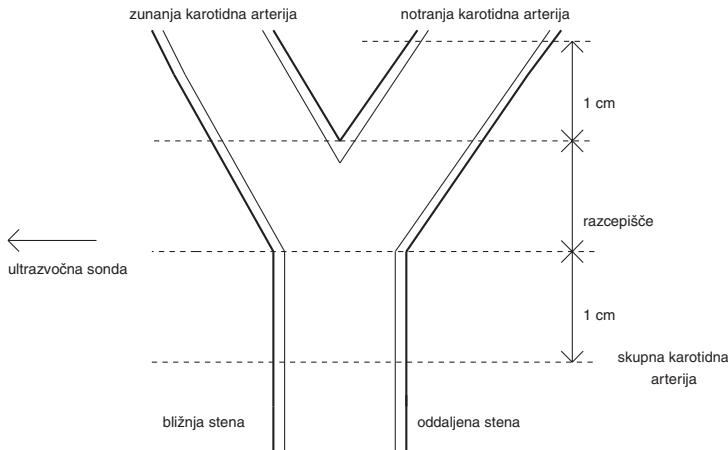
Vsem preiskovancem smo v sedečem položaju izmerili krvni tlak z živosrebrnim sfigmomanometrom in za normalno vrednost uporabili merila Svetovne zdravstvene organizacije (34). Potem smo preiskovance stehali, jim izmerili višino ter izračunali indeks telesne teže (ITT) kot razmerje med telesno težo in kvadratom višine.

Ultrazvočna preiskava karotidnih arterij

Opravili smo dvodimenzionalno ultrazvočno preiskavo na način B na levi in desni karotidni arteriji. Uporabili smo ultrazvočno napravo Dasonics VST in 10 MHz linearno sondo. Preiskovance smo namestili v ležeči položaj. Najprej smo arterije pregledali v prečnem preseku, da smo dobili vtis o višini razcepišča ter medsebojnem odnosu notranje in zunanje karotidne arterije, hkrati pa smo lahko ugotovili tudi morebitne aterosklerotične spremembe. Nato smo si ogledali arterije v vzdolžnem preseku in poiskali naslednje predele (slika 3):

- razcepišče skupne karotidne arterije,
- distalni del skupne karotidne arterije do 1 cm pod razcepiščem,
- proksimalni del notranje karotidne arterije do 1 cm nad razcepiščem,

V vsakem od omenjenih predelov smo poiskali projekcijo, ki najbolje prikazuje odboje oddaljene arterijske stene. Na tej steni nastaneta odboja med svetlino in intimo ter med medijo in adventicijo. Z ultrazvočnimi kazalci smo na »zamrzjeni« sliki poiskali največ-



Slika 3. Shema karotidne arterije s prikazanimi predeli, kjer smo merili debelino intime in medije z ultrazvočno preiskavo na način B.

jo razdaljo med vodilnima robovoma teh odbojev in to uporabili kot največjo DIM na tem predelu. Vse meritve je opravil en preiskovalec, ki je zanesljivost svojih ugotovitev preveril tako, da je meritve pri desetih preiskovancih primerjal z meritvami drugega preiskovalca. Preiskovalec ni poznal serumskih koncentracij holesterola pri preiskovancih. Za dokumentacijo smo vse meritve posneli na termoprint papir.

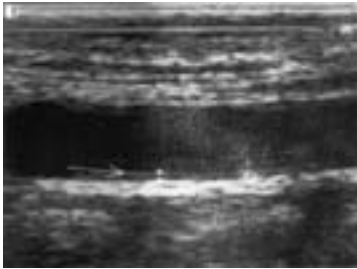
Povprečno DIM smo izračunali kot povprečje največjih DIM na zgoraj opisanih predelih obeh strani. Spremembe žilne stene smo razdelili v 4 stopnje:

- normalna DIM (povprečna DIM $\leq 0,6$ mm),
- zadebeljena intima in medija z gladko steno (povprečna DIM $> 0,6$ mm, žilna stena je gladka),
- zadebeljena intima in medija z neravno steno (povprečna DIM $> 0,6$ mm, žilna stena ni gladka),
- lehe (žariščne spremembe debeline > 1 mm).

Ultrazvočni prikaz normalne arterijske stene, zadebeljene intime in medije ter aterosklerotične lehe prikazuje slika 4.

Ponovljivost metode pri posameznem preiskovalcu smo ugotavljali tako, da je en preiskovalec dvakrat v razmiku enega meseca pregledal 10 preiskovancev, ki smo jih vključili v raziskavo. Izmeril je DIM po zgoraj opisanem protokolu, nato pa smo izračunali povprečno DIM za prvo in drugo meritev ter absolutno razliko med njima. Variabilnost smo izračunali kot razmerje med povprečno absolutno razliko in povprečjem povprečnih DIM vseh meritev. Izračunali smo tudi koeficient korelacije med povprečnimi DIM obeh meritev.

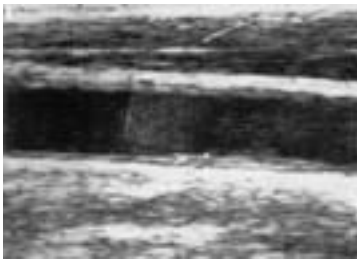
Ponovljivost metode med dvema preiskovalcema smo ugotavljali tako, da sta preiskovalca pregledala 10 preiskovancev, ki smo jih vključili v raziskavo. Izmerila sta DIM po zgoraj opisanem protokolu, nato pa smo izračunali obe povprečni DIM za vsakega preiskovanca in absolutno razliko med njima. Variabilnost smo izračunali kot razmerje med



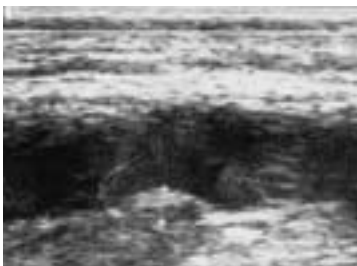
NORMALNA ARTERIJSKA STENA

← BLIŽNJA STENA

← ODDALJENA STENA



ZADEBELJENA INTIMA IN MEDIJA



ATEROSKLEROTIČNA LEHA

Slika 4. *Ultrazvočni prikaz normalne arterijske stene, zadebeljene intime in medijske ter aterosklerotične lehe. Kazalci označujejo, kako smo merili debelino intime in medijske na oddaljeni steni.*

povprečno absolutno razliko in povprečjem povprečnih DIM vseh meritev. Izračunali smo tudi koeficient korelacije med povprečnimi DIM obeh preiskovalcev.

Odvzem krvi

Kri za določitev krvnih maščob smo odvzeli dvakrat v razmiku od 1 do 8 tednov in za raziskavo uporabili povprečje obeh meritev. Ob drugem odvzemu smo odvzeli še kri za določitev krvnega sladkorja, Lp(a) ter za teste koagulacije in fibrinolize. Na dan preiskave so bili vsi preiskovanci 12 ur tešči. Kri smo odvzeli v sedečem položaju iz komolčne vene med 7. in 9. uro zjutraj.

Pred drugim odvzemom so bolniki 20 minut sede počivali. Kri smo jemali brez preveze nadlahti oziroma smo nadlaht prevezali za največ eno minuto in smo takoj, ko je kri pri-

tekla v prvo epruveto, prevezo odstranili. Žilo smo prebodli le enkrat in igle v žili nismo premikali. Vedno smo najprej odvzeli 7 ml krvi za biokemične preiskave v epruveto brez antikoagulantnega sredstva. Nato smo odvzeli 9 ml krvi v epruveto z natrijevim-citratom za teste koagulacije in fibrinolize, razen za določitev t-PA, za katerega smo odvzeli 4,5 ml krvi v epruveto z nakisanim natrijevim citratom.

Za določitev Lp(a) smo iz epruvete za biokemične preiskave po centrifugiranju odvzeli 0,5 ml seruma v epruveto Eppendorf in ga do laboratorijske preiskave hranili v zmrzovalniku pri -20°C .

Vzorci krvi za teste koagulacije in fibrinolize smo do centrifugiranja hranili v vodi z ledom v toplotno izolirani posodi. Kri smo centrifugirali v hladilni centrifugi 30 min pri 2000 g in 4°C . Plazmo smo odpipetirali v epruvete Eppendorf, jo zamrzili v tekočem dušiku in do laboratorijske preiskave hranili v zmrzovalniku pri -70°C .

Biokemične preiskave

Koncentracijo celotnega holesterola smo določali z encimsko metodo (35). Holesterolne estre v vzorcih in standardu smo hidrolizirali s holesterolno esterazo v prosti holesterol in maščobne kisline. Nastali prosti holesterol smo oksidirali v navzočnosti kisika. Pri tem je nastajal vodikov peroksid, ki je ob navzočnosti katalaze in fenola oksidiral 4-aminofenazon v obarvano spojino, katere absorbnost smo merili pri 500 nm. Koncentracijo holesterola smo določali na napravi VP-Abott z reagenti proizvajalca Boehringer.

Koncentracijo HDL-holesterola smo določali s fosforvolframatom magnezijevo metodo (36). Najprej smo z obarjalnim reagentom, ki vsebuje raztopino fosforvolframove kisline in magnezijevega klorida, oborili vse lipoproteine, ki vsebujejo apoprotein B. V supernatantu smo določili koncentracijo celotnega holesterola z encimsko metodo, opisano v prejšnjem odstavku.

Koncentracijo trigliceridov smo določali z encimsko metodo (37). Trigliceride v vzorcih in standardu smo z lipazo hidrolizirali v prosti glicerol in maščobne kisline. Nastali prosti glicerol se je ob navzočnosti ATP in glicerol kinaze pretvoril v glicerol-3-fosfat, ta pa se je z glicerol-fosfat-kinazo oksidiral v dihidroksiacetonfosfat. Pri tem je nastajal vodikov peroksid. Nadaljnji postopek je potekal enako kot pri določanju celotnega holesterola.

Koncentracijo LDL-holesterola smo izračunali po Friedewaldovi enačbi (38):

$$\text{LDL-holesterol} = \text{celotni holesterol} - \text{HDL-holesterol} - (\text{trigliceridi}/2,2)$$

Koncentracijo krvnega sladkorja smo določali s heksokinaznim testom.

Koncentracijo lipoproteina(a) smo določali z elektroimunodifuzijo po Laurellu (39). To je imunokemijski postopek, pri katerem pod vplivom električne napetosti Lp(a) potuje v agaroznem gelu in se srečuje z molekulami protiteles proti Lp(a), ki so vgrajene v gel. Pri tem prihaja do reakcije antigen-protitelo in do nastanka precipitacijskih trikotnikov. Površine precipitacijskih trikotnikov so premosorazmerne koncentracijam Lp(a) v vzorcih. S pomočjo več standardov različnih koncentracij smo določili umeritveno krivuljo in na podlagi le-te vrednotili vzorce neznanih koncentracij. Ponovljivost v seriji je imela pri koncentraciji 203 mg/l koeficient variacije 6,7 %, pri koncentraciji 523 mg/l pa 3,6 %. Po-

novljivost od dne do dne je imela pri koncentraciji 207 mg/l koeficient variacije 13,5 %, pri koncentraciji 516 mg/l pa 6,0 %. Občutljivost postopka je bila 50 mg/l.

Testi koagulacije in fibrinolize

Aktivnost koagulacijskega faktorja VII smo določali po prirejeni Osterudovi metodi (40). Plazmi smo dodali tromboplastin in kalcij, kar je aktiviralo protrombin v trombin prek faktorjev V, VII in X. Tako nastali trombin je cepil kromogeni substrat. Ob tem se je sproščalo barvilo, ki je absorbiralo svetlobo pri 405 nm. Merili smo čas, v katerem je absorpcija narasla za 0,1. Izmerjeni čas smo vnesli v umeritveno krivuljo, narisano s standardnimi vzorci, in odčitali aktivnost faktorja VII. Vrednosti smo izrazili kot odstotek aktivnosti standardne plazme. Koeficient variacije je bil pri ponovljivosti v seriji 4,6 % pri normalni kontrolni plazmi in 2,7 % pri patološki kontrolni plazmi ter od dne do dne 2,4 % pri normalni kontrolni plazmi in 7,9 % pri patološki kontrolni plazmi.

Koncentracijo fibrinogena smo določali z napravo Fibrintimer (Behring, Marburg/Lahn, Nemčija) po prirejeni Claussovi metodi (41). Razredčeno citratno plazmo smo koagulirali s trombinom v prebitku in v napravi merili čas do nastanka strdka. Koncentracije fibrinogena smo odčitali z umeritvene krivulje.

Koncentracijo antigena t-PA smo določali z encimsko-immunskim testom (ELISA) z dvojnimi protitelesi (42) po navodilih proizvajalca (Imulyse™ tPA, Biopool, Umea, Švedska). Vzorce plazme smo inkubirali na mikrotitrskih ploščah, prekritih s protitelesi proti t-PA. Na kompleks med protitelesi, vezanimi na površino plošče, in t-PA iz vzorca plazme smo vezali druga protitelesa proti t-PA, označena s peroksidazo. Po dodatku substrata za peroksidazo je bil porast absorpcije pri 405 nm sorazmeren količini t-PA v vzorcu plazme. Koncentracijo t-PA smo odčitali z umeritvene krivulje, ki smo jo narisali s pomočjo standardnih raztopin t-PA.

Aktivnost t-PA smo določali po navodilih proizvajalca testa (Spectrolyse™ /pL, Biopool, Umea, Švedska) (43). Vzorcem plazme in standardnim vzorcem t-PA smo dodali plazminogen in kromogeni substrat. Plazmin, ki je nastal iz plazminogena pod vplivom t-PA, je učinkoval na kromogeni substrat, ki je zato spremenil barvo. Porast absorpcije pri 405 nm je bil premosorazmeren količini t-PA v vzorcu plazme. Aktivnost t-PA smo odčitali z umeritvene krivulje, pripravljene s standardnimi vzorci t-PA.

Antigen PAI-1 smo določali z encimsko-immunskim testom (ELISA) z dvojnimi protitelesi (44) po navodilih proizvajalca (Imulyse™ PAI, Biopool, Umea, Švedska). Postopek določanja antigena PAI-1 je bil enak tistemu, ki je opisan pri določanju antigena t-PA.

Aktivnost PAI-1 smo določali z dvostopenjskim encimskim testom po navodilih proizvajalca (Spectrolyse™ /pL, Biopool, Umea, Švedska) (45). Plazmo smo titrirali z naraščajočimi koncentracijami t-PA. Preostalo aktivnost t-PA smo merili spektrofotometrično s pomočjo kromogenega substrata, tako kot je opisano pri merjenju aktivnosti t-PA. Količina t-PA, ki smo jo morali dodati plazmi, da smo presegli inhibicijo, je bila merilo celotne aktivnosti PAI-1 v plazmi.

Čas evglobulinske lize smo merili s postopkom po Buckellu (46). Plazmo smo razredčili z destilirano vodo in nakisali z očetno kislino na pH 5,9. S tem smo oborili evglobuline, ki vsebujejo vse sestavine fibrinolitičnega sistema, razen inhibitorjev t-PA. Evglobuline smo ločili od raztopine s centrifugiranjem, raztopili v pufru, koagulirali in merili čas, v katerem se je tak strdek spontano raztopil.

Statistična obdelava

Vrednosti, ki so se razporejale normalno, smo prikazali kot aritmetično sredino in standardni odklon, tiste, ki so se razporejale nenormalno, pa kot mediano ter razpon med prvim in tretjim kvartilom.

Za testiranje razlik med skupinami smo pri spremenljivkah z normalno porazdelitvijo uporabili Studentov test t za neodvisne vzorce, pri spremenljivkah z nenormalno porazdelitvijo pa Mann-Whitneyjev test U.

Povezavo med različnimi spremenljivkami in povprečno DIM smo testirali s koeficientom korelacije po Pearsonu, razen pri fibrinolizi, kjer smo uporabili koeficient korelacije po Spearmanu. Da bi ugotovili, katere spremenljivke imajo največjo napovedno vrednost za povprečno DIM, smo uporabili multivariatno analizo-metodo standardne multiple regresije.

Pri preizkušanju domnev smo vrednost $p < 0,05$ imeli za statistično značilno. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket Statistica (Stat Soft Inc. 1992, ZDA).

Izsledki

Klinične značilnosti preiskovancev

V tabeli 3 so prikazane klinične značilnosti preiskovancev iz obeh skupin. Skupini sta se med seboj razlikovali le po vrednosti sistoličnega krvnega tlaka, ki je bil večji v skupini bolnikov z DH.

Tabela 3. Klinične značilnosti bolnikov z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in zdravih preiskovancev (KONTROLA). Starost je prikazana kot aritmetična sredina in razpon, druge vrednosti pa kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. ITT – indeks telesne teže, n – število preiskovancev, ns – ni značilnih razlik med skupinama.

Spremenljivka	DH n=28	KONTROLA n=28	p
Starost (leta)	19,9 (11–27)	20,4 (11–27)	ns
Spol (moški/ženske)	12/16	12/16	ns
Kadilci (število)	3	3	ns
Sistolični krvni tlak (mmHg)	118 \pm 11	110 \pm 11	0,007
Diastolični krvni tlak (mmHg)	78 \pm 10	77 \pm 10	ns
telesna teža (kg)	62,4 \pm 14,4	64,3 \pm 13,2	ns
telesna višina (cm)	168 \pm 11	172 \pm 11	ns
ITT (kg/m ²)	21,8 \pm 3,3	21,6 \pm 2,7	ns

Biokemične preiskave

Izsledke biokemičnih preiskav prikazuje tabela 4. Skupina bolnikov z DH je imela večje koncentracije celotnega in LDL-holesterola ter trigliceridov kot kontrolna skupina.

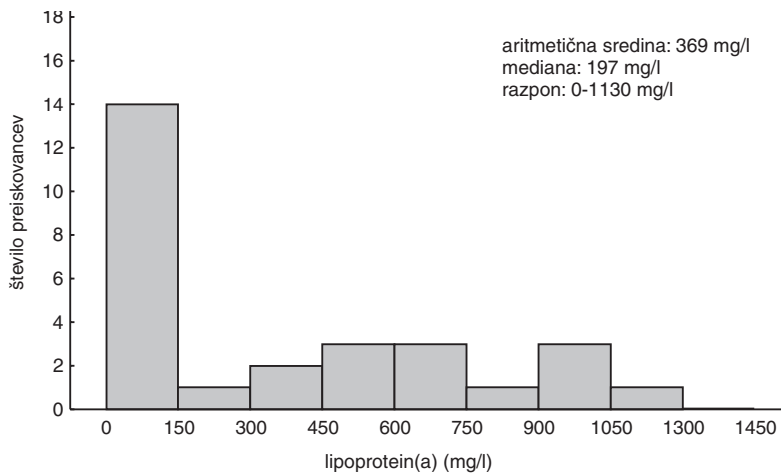
Tabela 4. Vrednosti krvnih lipidov in sladkorja pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in zdravih preiskovanceh (KONTROLA). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. HDL – lipoprotein velike gostote, LDL – lipoprotein majhne gostote, n – število preiskovancev, ns – ni značilnih razlik med skupinama.

Spremenljivka	DH n=28	KONTROLA n=28	p
Celotni holesterol (mmol/l)	8,3 \pm 1,7	4,1 \pm 0,6	< 0,0001
HDL-holesterol (mmol/l)	1,4 \pm 0,3	1,5 \pm 0,4	ns
LDL-holesterol (mmol/l)	6,5 \pm 1,8	2,3 \pm 0,5	< 0,0001
Trigliceridi (mmol/l)	1,0 \pm 0,5	0,5 \pm 0,2	< 0,0001
Krvni sladkor (mmol/l)	4,8 \pm 0,5	4,8 \pm 0,5	ns

Lipoprotein(a)

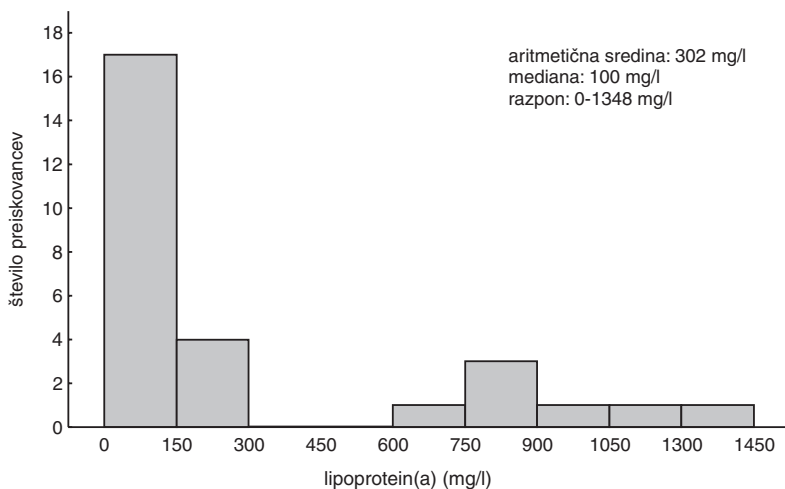
Med bolniki z DH in kontrolno skupino ni bilo značilnih razlik v vrednostih Lp(a). Niti delež preiskovancev z ogrožujočimi vrednostmi Lp(a) (nad 300 mg/l) se ni pomembno razlikoval med skupinama; med bolniki z DH je bilo takih 13 (46 %), med zdravimi preiskovanci pa 7 (25 %). Frekvenčno porazdelitev vrednosti Lp(a) pri bolnikih z DH in v kontrolni skupini prikazujeta slika 5a in slika 5b.

DH



Slika 5a. Frekvenčna porazdelitev vrednosti lipoproteina(a) pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH).

KONTROLA



Slika 5b. Frekvenčna porazdelitev vrednosti lipoproteina(a) v kontrolni skupini (KONTROLA).

Koagulacija in fibrinoliza

Izsledke testov koagulacije in fibrinolize prikazuje tabela 5. V skupini bolnikov z DH so bile vrednosti aktivnosti faktorja VII večje kot v kontrolni skupini, vrednosti drugih spremenljivk pa se med skupinama niso razlikovale.

Obdelava vrednosti krvnih maščob, ločeno po spolih, je pokazala pomembno večje koncentracije HDL-holesterola pri ženskah iz kontrolne skupine v primerjavi z moškimi iz kontrolne skupine ($1,6 \pm 0,4$ mmol/l proti $1,3 \pm 0,2$ mmol/l, $p = 0,009$), medtem ko nismo

Tabela 5. Vrednosti koagulacijskih in fibrinolitičnih testov pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in pri zdravih preiskovancih (KONTROLA). Vrednosti faktorja VII so prikazane kot aritmetična sredina \pm standardni odklon, vrednosti drugih spremenljivk pa kot mediana ter razpon med prvim in tretjim kvartilom. t-PA – tkivni aktivator plazminogena, PAI-1 inhibitor aktivatorja plazminogena, n – število preiskovancev, ns – ni značilnih razlik med skupinama.

Spremenljivka	DH n=28	KONTROLA n=28	p
Faktor VII (%)	94,31 \pm 2,64	86,01 \pm 2,42	0,02
Fibrinogen (g/l)	2,70 (2,43–3,05)	2,87 (2,43–3,25)	ns
Antigen t-PA (ng/ml)	4,6 (3,3–5,2)	4,3 (3,4–5,4)	ns
Aktivnost t-PA (IE/ml)	1,0 (0,8–1,2)	1,0 (0,9–1,6)	ns
Antigen PAI-1 (ng/ml)	9,2 (6,4–15,2)	8,8 (4,7–15,4)	ns
Aktivnost PAI-1 (IE/ml)	5,6 (3,5–10,0)	6,8 (2,3–11,2)	ns
Evglobulinska liza (min)	202 (140–306)	228 (127–273)	ns

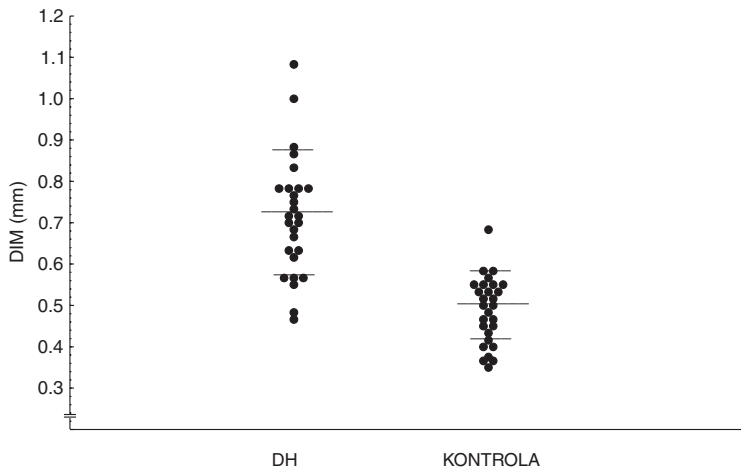
ugotovili razlik med spoloma v skupini bolnikov z DH. V nobeni skupini ni bilo razlik med spoloma v celotnem in LDL-holesterolu.

Ultrazvočna preiskava karotidnih arterij

Variabilnost metode pri enem preiskovalcu je bila 8,5 %. Povprečna razlika med povprečnima DIM obeh meritev je bila 0,05 mm (razpon 0,03 do 0,08 mm). Koeficient korelacije med povprečnimi DIM obeh meritev je bil 0,93 ($p < 0,0001$).

Variabilnost metode med dvema preiskovalcema je bila 9 %. Povprečna razlika med povprečnima DIM pri enem preiskovancu je bila 0,06 mm (razpon 0,02 do 0,09 mm). Koeficient korelacije med povprečnimi DIM obeh preiskovalcev je bil 0,91 ($p = 0,001$).

Povprečna DIM karotidnih arterij je bila pri bolnikih z DH značilno večja kot v kontrolni skupini ($p < 0,0001$). Porazdelitev povprečne DIM v obeh skupinah prikazuje slika 6.



Slika 6. Porazdelitev povprečne debeline intime in medije (DIM) karotidnih arterij pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in pri zdravih preiskovancih (KONTROLA). Črte označujejo aritmetični sredini in standardne odklone.

Vrednosti meritev na različnih predelih prikazuje tabela 6.

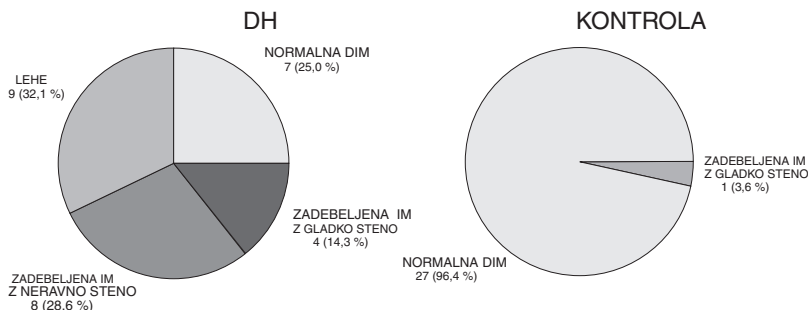
Tabela 6. Debelina intime in medije (DIM) na različnih predelih karotidnih arterij pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in pri zdravih preiskovancih (KONTROLA). Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. SKA – skupna karotidna arterija, NKA – notranja karotidna arterija, povprečna DIM – povprečje izmerjenih debelin intime in medije v predelih skupne in notranje karotidne arterije ter razcepišča.

DIM (mm)	DH	KONTROLA	p
Povprečna DIM	0,71 \pm 0,15	0,49 \pm 0,08	< 0,0001
SKA	0,61 \pm 0,13	0,50 \pm 0,09	0,0004
Razcepišče	0,71 \pm 0,26	0,52 \pm 0,12	0,0016
NKA	0,80 \pm 0,31	0,45 \pm 0,09	< 0,0001

Tabela 7. Število preiskovancev s posameznimi stopnjami aterosklerotičnih sprememb stene karotidnih arterij in razpon povprečne debeline intime in medije (DIM) pri posamezni spremembi. DH – bolniki z družinsko hiperholesterolemijo, KONTROLA – zdravi preiskovanci, 3 – lehe, 2 – zadebeljena intima in medija z neravno steno, 1 – zadebeljena intima in medija z gladko steno, 0 – normalna DIM, n – število preiskovancev.

Stopnja	DH n=28 (število)	Razpon povprečne DIM (mm)	KONTROLA n=28 (število)	Razpon povprečne DIM (mm)
3	9	0,63–1,08	0	–
2	8	0,67–0,78	0	–
1	4	0,62–0,70	1	0,68
skupaj 1,2,3	21	0,62–1,08	1	0,68
0	7	0,46–0,57	27	0,35–0,58

Aterosklerotične lehe in zadebeljeno intimo in medijo z neravno steno smo našli le pri bolnikih z DH, ne pa v kontrolni skupini. Število posameznih sprememb v obeh skupinah prikazuje tabela 7, delež posameznih sprememb pri bolnikih z DH in zdravih preiskovancih pa slika 7. Koeficient korelacije med povprečno DIM in štirimi stopnjami aterosklerotičnih sprememb je bil 0,83 ($p < 0,0001$).



Slika 7. Delež različnih sprememb stene karotidnih arterij pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in pri zdravih preiskovancih (KONTROLA). Številke pomenijo število bolnikov z določeno spremembo (v oklepaju je odstotek bolnikov z določeno spremembo). DIM – debelina intime in medije, IM – intima in medija.

V skupini bolnikov z DH je bilo 7 takih, ki so imeli normalno DIM. Ti so se od drugih bolnikov razlikovali le po manjši vrednosti sistoličnega krvnega tlaka (aritmetična sredina \pm standardni odklon: 111 ± 9 mmHg proti 120 ± 11 mmHg, $p = 0,04$). Razlike med bolniki z normalno DIM in drugimi bolniki prikazuje tabela 8.

V skupini z DH je imelo 9 bolnikov lehe v steni karotidnih arterij. Ti so se od drugih bolnikov z DH razlikovali po večji vrednosti Lp(a) (mediana in razpon: 552; 19–1130 mg/l proti 83; 0–982 mg/l, $p < 0,05$) in manjši vrednosti trigliceridov (aritmetična sredina \pm standardni odklon: $0,7 \pm 0,5$ mmol/l proti $1,1 \pm 0,5$ mmol/l, $p = 0,04$).

Med moškimi in ženskami pri vseh preiskovancih skupaj in v skupini bolnikov z DH ni bilo značilnih razlik v povprečni DIM karotidnih arterij, pri preiskovancih iz kontrolne skupine pa je bila ta razlika značilna ($p = 0,006$). Izsledke prikazuje tabela 9.

Tabela 8. Značilnosti bolnikov z družinsko hiperholesterolemijo (DH), ki imajo normalno debelino intime in medije (normalna DIM) in drugih bolnikov z DH (drugi). Vrednosti lipoproteina(a) so prikazane kot mediana in razpon, vrednosti fibrinogena in fibrinolitičnih parametrov kot mediana ter razpon med prvim in tretjim kvartilom, vrednosti drugih spremenljivk pa kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. ITT – indeks telesne teže, HDL – lipoprotein velike gostote, LDL – lipoprotein majhne gostote, t-PA – tkivni aktivator plazminogena, PAI-1 – inhibitor aktivatorja plazminogena 1, n – število preiskovancev, ns – ni značilnih razlik med skupinama.

Spremenljivka	Normalna DIM n=7	Drugi n=21	p
Starost (leta)	19,3 \pm 4,2	20,1 \pm 4,5	ns
Spol (moški/ženske)	2/5	10/11	ns
Sistolični krvni tlak (mm Hg)	111 \pm 9	120 \pm 11	0,04
Diastolični krvni tlak (mm Hg)	76 \pm 9	79 \pm 10	ns
ITT (kg/m ²)	21,6 \pm 2,4	21,9 \pm 3,6	ns
Celotni holesterol (mmol/l)	7,6 \pm 1,3	8,5 \pm 1,8	ns
HDL-holesterol (mmol/l)	1,4 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	ns
LDL-holesterol (mmol/l)	5,8 \pm 1,5	6,7 \pm 1,9	ns
Trigliceridi (mmol/l)	0,9 \pm 0,5	1,0 \pm 0,5	ns
Krvni sladkor (mmol/l)	4,7 \pm 0,4	4,8 \pm 0,5	ns
Lipoprotein(a) (mg/l)	139 (0–982)	253 (19–1130)	ns
Faktor VII (%)	96,24 \pm 21,75	93,67 \pm 10,93	ns
Fibrinogen (g/l)	2,70 (2,43–3,48)	2,70 (2,31–2,86)	ns
Antigen t-PA (ng/ml)	3,7 (2,9–4,9)	4,7 (3,3–5,3)	ns
Aktivnost t-PA (IE/ml)	1,0 (0,6–1,2)	1,1 (0,8–1,1)	ns
Antigen PAI-1 (ng/ml)	10,6 (8,0–17,5)	7,6 (6,1–11,3)	ns
Aktivnost PAI-1 (IE/ml)	6,4 (4,6–10,5)	4,9 (2,2–9,0)	ns
Evglobulinska liza (min)	290 (115–320)	175 (140–283)	ns

Tabela 9. Debelina intime in medije (DIM) karotidnih arterij glede na spol pri vseh preiskovancih, pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in pri zdravih preiskovancih (KONTROLA). ns – ni značilnih razlik med skupinama.

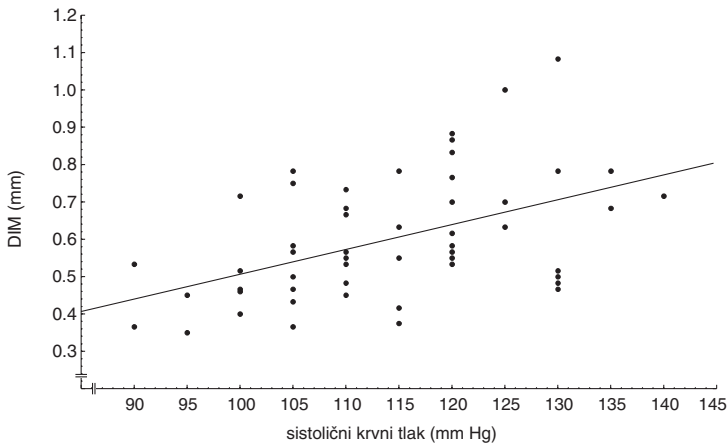
Spol	DIM (mm)		
	Vsi preiskovanci	DH	Kontrola
Moški	0,63 \pm 0,15	0,72 \pm 0,17	0,53 \pm 0,06
Ženske	0,58 \pm 0,17	0,70 \pm 0,14	0,45 \pm 0,07
p	ns	ns	0,006

Nihče od treh kadilcev iz kontrolne skupine ni imel sprememb na karotidnih arterijah. Med tremi kadilci z DH smo enega uvrstili v skupino z zadebeljeno intimo in medijo z gladko steno, dva pa sta imela zadebeljeno intimo in medijo z neravno steno.

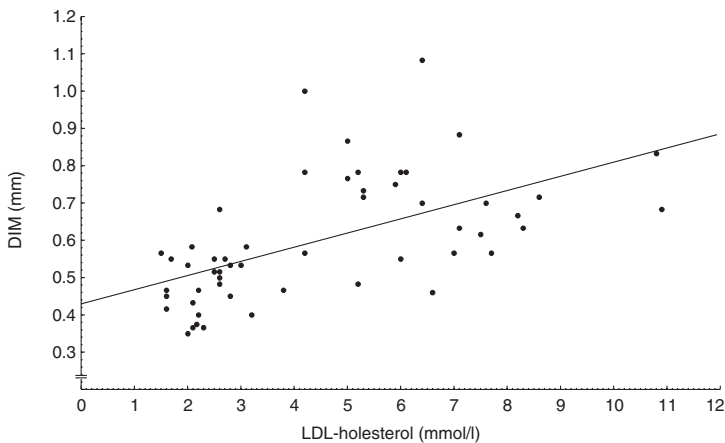
Pri bolnici s homozigotno DH (starost 17 let) smo našli aterosklerotično leho, povprečna DIM pa je bila 0,83 mm.

Povezave debeline intime in medije s kliničnimi in laboratorijskimi spremenljivkami

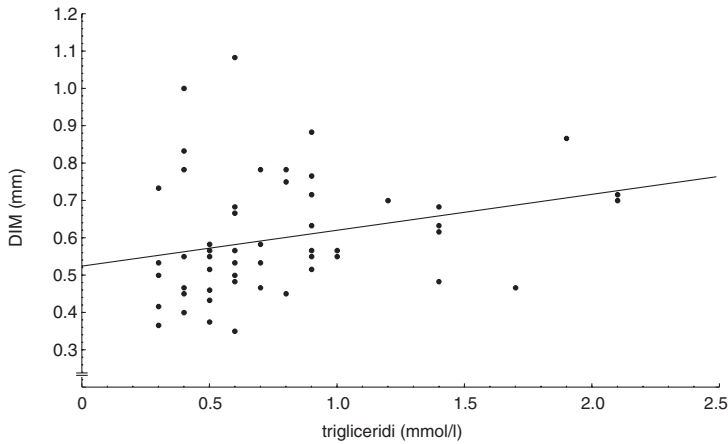
Pri vseh preiskovancih je povprečna DIM linearno naraščala s sistoličnim krvnim tlakom (slika 8), koncentracijo LDL (slika 9) in celotnega holesterola ter trigliceridov (slika 10). Pri bolnikih z DH smo našli pomembno povezavo DIM le s starostjo. V kontrolni skupini je bila DIM povezana s sistoličnim krvnim tlakom, telesno težo, telesno višino in koncentracijo trigliceridov. Izsledke prikazuje tabela 10.



Slika 8. Povezava med sistoličnim krvnim tlakom ter debelino intime in medije (DIM). $DIM = -0,159 + 0,007 \times \text{sistolični krvni tlak}$, $r = 0,47$, $p = 0,0002$.



Slika 9. Povezava med koncentracijo holesterola v lipoproteinih majhne gostote (LDL-holesterol) ter debelino intime in medije (DIM). $DIM = 0,429 + 0,038 \times \text{LDL-holesterol}$, $r = 0,60$, $p < 0,0001$.



Slika 10. Povezava med koncentracijo trigliceridov ter debelino intime in medije (DIM).
 $DIM = 0,523 + 0,096 \times \text{trigliceridi}$, $r = 0,28$, $p = 0,04$.

Tabela 10. Povezava nekaterih kliničnih in laboratorijskih spremenljivk z debelino intime in medije (DIM) karotidnih arterij pri vseh preiskovancih, pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in v kontrolni skupini (KONTROLA). Prikazani so univariatni korelacijski koeficienti. Značilne povezave so poudarjene. KT – krvni tlak, ITT – indeks telesne teže, HDL – lipoprotein velike gostote, LDL – lipoprotein majhne gostote.

Spremenljivka	Vsi preiskovanci		DH		Kontrola	
	r	p	r	p	r	p
Starost	0,22	0,11	0,38	0,048	0,36	0,06
Sistolični KT	0,47	0,0002	0,36	0,06	0,40	0,036
Diastolični KT	0,13	0,35	0,15	0,44	0,11	0,60
Teža	0,15	0,29	0,19	0,33	0,50	0,007
Višina	0,07	0,62	0,19	0,34	0,48	0,009
ITT	0,17	0,21	0,14	0,47	0,35	0,07
Celotni holesterol	0,59	< 0,0001	-0,05	0,81	0,04	0,85
HDL-holesterol	-0,16	0,23	0,02	0,91	-0,28	0,15
LDL-holesterol	0,60	< 0,0001	-0,02	0,92	0,19	0,32
Trigliceridi	0,28	0,038	-0,21	0,30	0,40	0,036
Krvni sladkor	0,03	0,86	0,12	0,53	-0,03	0,89
Lipoprotein(a)	0,15	0,28	0,09	0,65	0,08	0,69

Med izsledki koagulacijskih in fibrinolitičnih testov smo našli značilno povezavo z DIM le pri antigenu t-PA v kontrolni skupini, druge povezave niso bile značilne. Izsledke prikazuje tabela 11.

Tabela 11. Povezava koagulacijskih in fibrinolitičnih spremenljivk z debelino intime in medije (DIM) karotidnih arterij pri vseh preiskovancih, pri bolnikih z družinsko hiperholesterolemijo (DH) in v kontrolni skupini (KONTROLA). Značilna povezava je poudarjena. t-PA – tkivni aktivator plazminogena, PAI-1 – inhibitor aktivatorja plazminogena.

Spremenljivka	Vsi preiskovanci		DH		Kontrola	
	r	p	r	p	r	p
Faktor VII	0,09	0,58	-0,12	0,62	-0,25	0,27
Fibrinogen	-0,10	0,42	-0,14	0,48	-0,01	0,58
Antigen t-PA	0,23	0,08	0,29	0,13	0,45	0,02
Aktivnost t-PA	-0,04	0,77	0,70	0,73	0,07	0,72
Antigen PAI-1	0,02	0,82	-0,07	0,70	0,13	0,51
Aktivnost PAI-1	0,01	0,93	0,07	0,72	0,18	0,35
Evglobulinska liza	-0,04	0,78	-0,12	0,53	-0,02	0,30

Za ugotavljanje neodvisne povezanosti DIM z drugimi spremenljivkami pri vseh preiskovancih skupaj smo uporabili dva modela multiple regresijske analize. V oba modela smo kot odvisno spremenljivko vstavili DIM. V prvi model smo kot neodvisne spremenljivke vstavili LDL-holesterol, trigliceride, sistolični krvni tlak, spol, starost in antigen t-PA. Statistično značilnost sta dosegla LDL-holesterol (delni koeficient = 0,56, $p < 0,0001$) in sistolični krvni tlak (delni koeficient = 0,28, $p = 0,035$). S tem modelom smo pojasnili 44 % variabilnosti DIM ($p < 0,0001$). V drugi model smo namesto LDL-holesterola vstavili skupino preiskovancev (bolniki z DH, kontrolna skupina). Statistično značilnost so dosegli skupina, trigliceridi in starost (tabela 12). Ta model nam je pojasnil 61 % variabilnosti DIM ($p < 0,0001$).

Tabela 12. Izsledki multiple regresije, s katero smo določili spremenljivke, ki imajo največjo napovedno vrednost za povprečno debelino intime in medije (DIM) karotidnih arterij. S tem modelom lahko pojasnimo 61 % variabilnosti DIM ($p < 0,0001$).

Spremenljivka	Delni koeficient	p	R ²
Skupina	0,78	< 0,0001	
Trigliceridi	0,29	0,009	
Starost	0,22	0,016	0,61
Sistolični krvni tlak	0,21	0,052	($p < 0,0001$)
Antigen t-PA	0,17	0,073	
Spol	0,13	0,196	

Da bi določili spremenljivke, ki imajo največjo napovedno vrednost za večjo DIM pri zdravih preiskovancih, smo preizkusili več modelov multiple regresijske analize, v katere smo kot odvisno spremenljivko vstavili DIM, kot neodvisne spremenljivke pa: spol, starost, trigliceride, sistolični krvni tlak, telesno težo in višino, indeks telesne teže ter antigen t-PA. Glede na število preiskovancev v skupini smo lahko v vsak model vstavili le po tri neodvisne spremenljivke. Največji delež variabilnosti DIM (47 %, $p < 0,001$) nam je pojasnil

Tabela 13. *Izsledki multiple regresije, s katero smo določili spremenljivke, ki imajo največjo napovedno vrednost za povprečno debelino intime in medije (DIM) karotidnih arterij pri zdravih preiskovalcih. S tem modelom lahko pojasnimo 47 % variabilnosti DIM ($p < 0,0001$).*

Spremenljivka	Delni koeficient	p	R ²
Spol	0,47	0,003	0,47
Starost	0,45	0,004	(p < 0,001)
Trigliceridi	0,33	0,03	

model, v katerega smo vstavili spol, starost in trigliceride, vse tri spremenljivke so dosegle statistično značilnost (tabela 13).

Razprava

Ultrazvočna preiskava arterijske stene na način B omogoča zgodnje odkrivanje in merjenje aterosklerotičnih sprememb, zato lahko z njo preučujemo povezavo med dejavniki tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni in razvojem ateroskleroze. Žal s to preiskavo ne moremo pregledati koronarnih arterij. Ker pa aterosklerotični proces prizadene tako koronarne kot karotidne arterije (24), bi bil patološki ultrazvočni izvid karotidnih arterij lahko dober napovedovalec koronarne bolezni srca (25, 27). Zato smo v svoji raziskavi opravili ultrazvočni pregled karotidnih arterij pri mladih bolnikih z DH, ki velja za najpomembnejši aterogeni dejavnik, in jih primerjali z izvidi enako starih zdravih preiskovancev z normalnimi vrednostmi krvnega holesterola.

Poleg znatno višjih vrednosti celotnega in LDL-holesterola pri bolnikih z DH (srednja vrednost celotnega holesterola za 102 %, LDL-holesterola pa za 183 % večja) kot v kontrolni skupini sta se skupini preiskovancev razlikovali še po značilno večji koncentraciji trigliceridov v skupini z DH, ki pa je bila še vedno v območju normalnih vrednosti. Skupini sta se razlikovali tudi v srednji vrednosti sistoličnega krvnega tlaka, ki je bil pomembno višji pri bolnikih z DH, vendar še v območju normalnih vrednosti.

Pri naših preiskovancih ni bilo razlik v vrednostih Lp(a) med bolniki z DH in kontrolno skupino. To se ujema z izsledki Ghisellija in sodelavcev (47), ki niso našli razlik v vrednostih Lp(a) med 28 bolniki z DH (povprečna starost 41 let, razpon 9–69 let), ki niso imeli koronarne bolezni srca, in 31 zdravimi preiskovanci (povprečna starost 41 let, razpon 9–67 let). Večina drugih avtorjev (48, 49) pa je našla zvečane vrednosti Lp(a) pri bolnikih z DH, vendar so v te raziskave vključili tudi bolnike s koronarno boleznijo srca. Morda je prav različen izbor preiskovancev vzrok za razhajanje ugotovitev.

Od koagulacijskih in fibrinolitičnih dejavnikov so se v naši raziskavi bolniki z DH razlikovali od zdravih preiskovancev le po pomembno večji aktivnosti koagulacijskega faktorja VII. Večjo aktivnost faktorja VII pri bolnikih z DH, starih povprečno 48 let, so našli tudi Bruckert in sodelavci (50), nismo pa našli podatkov o tem pri bolnikih, mlajših od 30 let. Večjo aktivnost faktorja VII bi lahko pojasnili na več načinov. Možno je, da je ta povezana s hiperholesterolemijo, saj so nekateri avtorji našli pozitivno povezavo med koncentracijo holesterola in aktivnostjo faktorja VII (51), čeprav drugi avtorji tega niso

mogli dokazati (50, 52). Večja aktivnost faktorja VII pri naših bolnikih z DH bi lahko bila povezana tudi z večjo koncentracijo trigliceridov pri njih. Tej domnevi v prid govorijo izsledki Bruckerta in sodelavcev (50), ki so pri bolnikih z DH ugotovili pozitivno povezavo med aktivnostjo faktorja VII in koncentracijo trigliceridov v plazmi, ki je bila v območju priporočenih vrednosti. Pozitivno povezavo med aktivnostjo faktorja VII in koncentracijo trigliceridov so našli tudi pri zdravih mladih preiskovancih (52) in pri preiskovancih s hipertrigliceridemijo (53). Možna razlaga za povečano aktivnost faktorja VII pri bolnikih z DH pa je, da je le-ta posledica okvare žilne stene. Pri okvari žilne stene se namreč sprošča tkivni faktor, ki je glavni aktivator faktorja VII (21).

Izsledke ultrazvočnih meritev DIM karotidnih arterij prikazujejo različno: kot povprečje največjih (54–56) ali povprečnih DIM (57) ali kot njihovo vsoto (58, 59). Ker se aterosklerotični proces začne v razcepišču, od koder se širi v začetni del notranje karotidne arterije in v skupno karotidno arterijo (60), smo v svoj protokol vključili meritve na vseh treh omenjenih predelih, izsledke pa smo prikazali kot povprečje največjih DIM na teh predelih. Ponovljivost protokola smo najprej testirali na 10 preiskovancih. Povprečna razlika povprečnih DIM med dvema meritvama pri enem preiskovalcu je bila 0,05 mm (razpon od 0,03 do 0,08 mm), med dvema preiskovalcema pa 0,06 mm (razpon od 0,02 do 0,09 mm), medtem ko je bil razpon posameznih meritev od 0,3 do 2,8 mm. Odstopanj meritev 8,5 % pri enem preiskovalcu in 9 % med dvema preiskovalcema sta podobni tistim, ki so jih dobili drugi avtorji (29, 61) in govorita za dobro ponovljivost metode.

V naši raziskavi smo v skupini 28 zdravih mladih preiskovancev brez dejavnikov tveganja za aterosklerozo, z izjemo kajenja pri treh, ugotovili, da je povprečna DIM le pri enem presegala vrednost 0,6 mm. Na podlagi teh izsledkov smo opredelili za normalno DIM za to starostno obdobje povprečno DIM, ki ne presega 0,6 mm. Dosedanje populacijske raziskave, v katerih so merili DIM karotidnih arterij, niso zajele tako mladih preiskovancev, kot smo jih v naši raziskavi. Finske raziskave so pokazale, da je povprečna DIM karotidnih arterij pri ljudeh v srednjih letih med 0,7 in 1,2 mm, odvisno od starosti (29). Handa in sodelavci (59) so pri zdravih preiskovancih brez dejavnikov tveganja za aterosklerozo, starih od 24 do 74 let, ugotovili povprečno DIM $0,59 \pm 0,15$ mm in vse vrednosti, manjše od 1,0 mm.

V skupino z zadebeljeno intimo in medijo z gladko steno smo uvrstili preiskovance, pri katerih je povprečna DIM presegala 0,6 mm, vendar je bila njihova žilna stena gladka. Ker drži, da je pri aterosklerotičnih spremembah žilna stena neravna (28), bi morda ti preiskovanci morali pripadati skupini z normalno DIM. Potrebne so nadaljnje raziskave, da bi ugotovili, ali se bodo pri teh preiskovancih pojavili neravna žilna stena in aterosklerotične lehe prej kot pri tistih, ki smo jih uvrstili v skupino z normalno DIM.

V naši raziskavi so imeli mladi bolniki z DH bistveno večjo DIM kot zdravi preiskovanci, saj je pri 75 % presegala 0,6 mm. Prav tako smo neravno žilno steno in aterosklerotične lehe našli le pri bolnikih z DH, ne pa v kontrolni skupini. Večina aterosklerotičnih leh je bila v razcepišču in začetnem delu notranje karotidne arterije. V drugih predelih karotidnih arterij so bile lehe le pri tistih preiskovancih, pri katerih smo jih našli tudi v prej omenjenih predelih. To kaže na smotrnost vključitve teh predelov v protokol preiskave.

Zadebeljeno intimo in medijo z gladko steno je imel le en preiskovanec iz kontrolne skupine, kar govori za dobro izbrano mejo med normalno in zadebeljeno intimo in medijo.

Naši izsledki se ujemajo z izsledki Spengla in sodelavcev (62). Ti so z ultrazvočno preiskavo ugotavljali pogostnost aterosklerotičnih leh na karotidnih arterijah pri bolnikih z DH, starih od 2 do 29 let. Od 44 bolnikov jih je 31 (70 %) imelo lehe. Omenjeni avtorji pa niso merili DIM. V naši skupini 28 mladih bolnikov smo ugotovili zadebeljeno intimo in medijo ali aterosklerotične lehe pri 17 (61 %) bolnikih.

Našli smo dobro povezavo med povprečno DIM in štirimi stopnjami aterosklerotičnih sprememb. Kljub temu menimo, da je treba ugotavljati tako povprečno DIM kot morfološke spremembe, ker ne vemo, kaj je pomembnejše. Drugi avtorji priporočajo merjenje DIM za spremljanje poteka bolezni, ker lahko tako zaznamo tudi manjše spremembe znotraj posamezne stopnje in ker so te meritve boljše ponovljive (61).

V naši raziskavi pri četrtini bolnikov z DH povprečna DIM ni presejala normalne vrednosti. Zato smo znotraj skupine bolnikov iskali še druge dejavnike tveganja, ki bi poleg povečanega holesterola lahko sodelovali pri aterogenezi. Ugotovili smo, da se je skupina bolnikov z normalno DIM statistično značilno razlikovala od drugih bolnikov z DH le po manjši srednji vrednosti sistoličnega krvnega tlaka, čeprav so bile pri vseh bolnikih vrednosti krvnega tlaka v normalnem območju. Bolniki z normalno DIM so imeli tudi manjše vrednosti celotnega in LDL-holesterola ter antigena t-PA, vendar te razlike niso bile značilne, kar pripisujemo premajhnemu številu preiskovancev. Izsledki pri vseh preiskovancih skupaj namreč kažejo, da na DIM statistično pomembno vplivata vrednosti celotnega in LDL-holesterola, izsledki pri zdravih preiskovancih pa kažejo, da njo vpliva antigen t-PA.

Naša raziskava ni pokazala povezanosti med DIM in vrednostjo Lp(a). Ugotovili pa smo, da imajo tisti bolniki z DH, ki imajo lehe v steni karotidnih arterij, statistično pomembno večje vrednosti Lp(a). Ta izsledek dopušča razlago, da zvečan Lp(a) ne sodeluje pri razvoju zgodnjih aterosklerotičnih sprememb, pač pa prispeva k hitrejšemu napredovanju ateroskleroze, kar potrjujejo tudi nekatere druge raziskave (10, 63). Tato in sodelavci (64) so našli povezavo med Lp(a) in patološkim ultrazvočnim izvidom karotidnih arterij pri bolnikih z DH, starejših od 30 let, za mlajše bolnike pa teh podatkov v literaturi nismo našli.

Pri vseh preiskovancih smo našli statistično značilno pozitivno povezavo med koncentracijo trigliceridov in DIM. Pri bolnikih z DH, ki so imeli lehe v steni karotidnih arterij, pa smo ugotovili statistično značilno manjšo koncentracijo trigliceridov kot pri drugih bolnikih z DH. Ker so imeli ti bolniki tudi večje vrednosti Lp(a), je zanimiv podatek, da so v Framinghamski raziskavi našli negativno povezavo med koncentracijo Lp(a) in trigliceridov (65).

Naša raziskava ni pokazala povezave aktivnosti faktorja VII in fibrinogena z DIM. Tudi Sosef in sodelavci (66) niso ugotovili teh povezav v skupini zdravih preiskovancev, starih od 18 do 56 let, in menijo, da ti dve spremenljivki nimata zaznavnega vpliva na zgodnje aterosklerotične spremembe. Našli pa smo značilno pozitivno povezavo med kon-

centracijo antigena t-PA in DIM pri zdravih preiskovancih, pa tudi v skupini bolnikov z DH so imeli tisti z normalno DIM manjše vrednosti antigena t-PA.

Z univariatno regresijsko analizo smo pri bolnikih z DH ugotovili, da je DIM značilno pozitivno povezana le s starostjo in mejno s sistoličnim krvnim tlakom, kar kaže, da je razvoj aterosklerotičnih sprememb odvisen od časa izpostavljenosti dejavnikom tveganja.

Pri zdravih preiskovancih je bila DIM značilno pozitivno povezana s telesno višino in težo, sistoličnim krvnim tlakom, trigliceridi, antigenom t-PA ter mejno s starostjo in indeksom telesne teže. Večja je bila pri moških kot pri ženskah. Pri multivariatni regresijski analizi so se kot neodvisni napovedni dejavniki za večjo DIM pri zdravih mladih preiskovancih pokazali moški spol, starost in večja koncentracija trigliceridov. Pri bolnikih z DH teh povezav DIM, razen s starostjo, nismo našli. Menimo, da pri njih izrazit vpliv zvečanega holesterola prekriva morebiten prispevek drugih dejavnikov k večji DIM.

Univariatna regresijska analiza povezave med DIM in dejavniki tveganja za ateroskleroza pri vseh preiskovancih skupaj je pokazala, da je DIM značilno pozitivno povezana z vrednostjo celotnega in LDL-holesterola, s sistoličnim krvnim tlakom in koncentracijo trigliceridov. Z multivariatnim regresijskim modelom smo našli tri neodvisne napovedne dejavnike za večjo DIM; to so navzočnost DH, večja plazemska koncentracija trigliceridov in starost. Največjo napovedno vrednost za DIM ima pripadnost skupini bolnikov z DH, zato je pomembno, da te bolnike čimprej odkrijemo in skušamo z zdravljenjem upočasniti potek ateroskleroze.

V zadnjih letih se pojavljajo poročila o tem, da lahko aterosklerotični proces upočasnimo ali celo omogočimo njegovo nazadovanje (67). Pri bolnikih z DH so po intenzivnem dvoletnem hipolipemičnem zdravljenju z angiografijo ugotovili nazadovanje ateroskleroze koronarnih arterij pri večini bolnikov (68). Angiografija koronarnih arterij zaradi invazivnosti ni primerna za ugotavljanje aterosklerotičnih sprememb pri mladih asimptomatskih bolnikih z DH, pri katerih pa bi lahko uporabljali neinvazivno ultrazvočno merjenje DIM in leh karotidnih arterij za spremljanje poteka bolezni.

Naša raziskava je pokazala, da bi zaradi različne občutljivosti bolnikov z DH za povečano koncentracijo holesterola lahko uporabili ultrazvočno preiskavo karotidnih arterij kot dodatno preiskavo pri opredelitvi ogroženosti za nastanek bolezni srca in ožilja, kar bi bilo lahko v pomoč pri izbiri načina zdravljenja. Predvidevamo, da bi to metodo lahko uporabili v enak namen tudi pri osebah z drugimi dejavniki tveganja za ateroskleroza, vendar so za to potrebne dodatne raziskave.

Sklepi

Izsledki naše raziskave nam omogočajo naslednje sklepe:

- Mladi bolniki brez znakov bolezni z DH imajo kot skupina značilno debejšo intimo in medijo karotidnih arterij kot zdravi preiskovanci, vendar pa je med njimi tudi del takih z normalno DIM. Zato menimo, da meritev DIM z ultrazvokom omogoča natančnejše opredeljevanje ogroženosti zaradi ateroskleroze pri bolnikih z DH pa tudi pri posameznikih z drugimi dejavniki tveganja.

- Pri mladih bolnikih z DH vplivata na DIM karotidnih arterij poleg zvečanega holesterola tudi starost bolnika, torej čas izpostavljenosti dejavnikom tveganja za aterosklerozo, in verjetno sistolični krvni tlak.
- Pri zdravih ljudeh z normalnimi vrednostmi holesterola, starih do 27 let, DIM karotidnih arterij ne presega 0,6 mm. Pri njih DIM narašča s telesno višino in težo, sistoličnim krvnim tlakom in koncentracijo trigliceridov ter je večja pri moških kot pri ženskah. Neodvisni napovedni dejavniki za večjo DIM pri zdravih ljudeh so moški spol, starost in večja plazemska koncentracija trigliceridov.
- Koagulacijski faktor VII, fibrinogen in PAI-1 niso povezani z DIM niti pri mladih bolnikih z DH niti pri zdravih preiskovancih. Antigen t-PA je pozitivno povezan z DIM pri zdravih preiskovancih, pri bolnikih z DH pa ne. Lp(a) ni povezan z DIM, je pa povečan pri bolnikih z aterosklerotičnimi lehami.
- Neodvisni napovedni dejavniki za večjo DIM pri vseh preiskovancih skupaj so pripadnost skupini bolnikov z DH, večja plazemska koncentracija trigliceridov in starost.

Zahvale

Mentorici doc. dr. Ireni Keber se zahvaljujema za vse nasvete, spodbude in požrtvovalno vodenje pri raziskovalnem delu, saj je bila pripravljena priskočiti na pomoč vedno, ko se je zataknilo.

Mentorju asist.mag. Viktorju Videčniku hvala za pomoč in prijazno sodelovanje.

Vsem preiskovancem se zahvaljujema za sodelovanje, ki jim je vzelo kar precej časa.

Dr. Mojci Stegnar in drugemu osebju v laboratoriju se zahvaljujema za brezhibno opravljene laboratorijske teste.

Mag. Darku Černetu iz Inštituta za klinično biokemijo se zahvaljujema za opravljene laboratorijske teste za določitev lipoproteina(a).

Višji medicinski sestri Brigiti Valenčič in tajnici Jelki Kos se zahvaljujema za pomoč pri številnih drobnih, vendar ne nepomembnih stvareh.

Alenki Mavri, dr.med. se zahvaljujema za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Prof.dr. Dušanu Kebru se zahvaljujema za kritične pripombe pri pisanju naloge.

Lektorici Marti Anžlovar se zahvaljujema za lektoriranje naloge.

Literatura

1. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Summary of the second report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel II). *JAMA* 1993; 269: 3015–23.
2. Pathobiological determinant of atherosclerosis in youth research group. Relationship of atherosclerosis in young men to serum lipoprotein cholesterol concentrations and smoking. *JAMA* 1990; 264: 3018–24.
3. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488–98.
4. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis: a multifactorial disease. *Circulation* 1993; 87: Suppl 2: 3–16.
5. Strydom HC. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol* 1994; 89: Suppl 1: 17–32.

6. Brown MS, Goldstein JL. The hyperlipoproteinemias and other disorders of lipid metabolism. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill, 1991: 1814–25.
7. Thompson GR. *A handbook of hyperlipidaemia*. New Jersey: Merck 1994: 111–26.
8. Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Qunici GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1981; 38: 51–61.
9. Armstrong VW, Cremer P, Eberle E et al. The association between Lp(a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1986; 62: 249–57.
10. Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto AM. Association of levels of Lp(a) plasma lipids and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 1986; 74: 758–65.
11. Rhoads GG, Dahlen GG, Berg K, Morton NE, Dannenberg AL. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* 1986; 256: 2540–4.
12. Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM. Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and Lipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein(a). *J Biol Chem* 1986; 261: 8712–8.
13. Eaton DL, Fless GM, Kohr WJ et al. Partial amino acid sequence of apoprotein (a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3224–8.
14. Scanu AM, Fless GM. Lipoprotein(a): Heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest* 1990; 85: 1709–15.
15. Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature* 1989; 339: 301–3.
16. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989; 339: 303–5.
17. Handin RI. Bleeding and thrombosis. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK, eds. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill, 1991: 348–53.
18. Nilsson TK, Wallen P. The fibrinolytic system: biochemistry and assay methods. In: Nilsson TK, Boman K, Jansson JH, eds. *Clinical aspects of fibrinolysis*. Stockholm: Almqvist & Wiksell International, 1991: 9–53.
19. Aznar J, Estelles A, Tormo G et al. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Br Heart J* 1988; 59: 535–41.
20. Collen D, Juhan-Vague I. Fibrinolysis and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14: 180–3.
21. Tanaka K, Sueishi K. The coagulation and fibrinolysis systems and atherosclerosis. *Lab Invest* 1993; 69: 5–18.
22. Altieri DC, Mannucci PMM, Capitanio AM. Binding of fibrinogen to human monocytes. *J Clin Invest* 1986; 78: 968–76.
23. Hogg N. Human monocytes are associated with the formation of fibrin. *J Exp Med* 1983; 257: 473–85.
24. Solberg LA, McGarry PA, Moossy J, Strong J, Tejada C, Loken A. Severity of atherosclerosis in cerebral arteries, coronary arteries and aortas. *Ann N Y Acad Sci* 1968; 2: 956–73.
25. Schuster H, Kroner K, Keller C, Spengel F, Wolfram G, Zollner N. Atherosclerosis of carotid arteries documented by duplex scan as a predictor of coronary artery disease in familial hyperlipidemias. *Klin Wochenschr* 1987; 65: 34–9.
26. Crouse JR, Toole JF, McKinney WM et al. Risk factors for extracranial carotid artery atherosclerosis. *Stroke* 1987; 18: 990–6.
27. Craven TE, Ryu JE, Espeland MA et al. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. *Circulation* 1990; 82: 1230–42.
28. Crouse JR, Thompson CJ. An evaluation of methods for imaging and quantifying coronary and carotid lumen stenosis and atherosclerosis. *Circulation* 1993; 87: Suppl 2: 17–33.
29. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation* 1993; 87: Suppl 2: 56–65.
30. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74: 1399–406.

31. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analyzing system. *Clin Physiol* 1991; 11: 565–77.
32. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993; 72: 171–6.
33. National cholesterol education program. Report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics* 1992; 89: Suppl 3: 525–584.
34. Dolenc P. Definicija hipertenzije. In: Jezeršek P, Dobovišek J, eds. *Arterijska hipertenzija*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 1992: 9–10.
35. Allain CC, Poon LS, Chan GSG. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1970; 20: 470–5.
36. Finley PR, Schifman RB, William RJ et al. Cholesterol and high density lipoprotein. *Clin Chem* 1978; 24: 931–3.
37. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476–82.
38. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499–502.
39. Laurell CB. Electroimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 29: Suppl 124: 21–37.
40. Osterud B. How to measure factor VII and factor VII activation. *Haemostasis* 1983; 13: 161–8.
41. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haemat* 1957; 17: 237–46.
42. Ranby M, Bergsdorf N, Nilsson T, Mellring G, Winblad B, Bucht G. Age dependence of tissue plasminogen activator concentration in plasma, as studied by improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem* 1986; 32: 2160–5.
43. Ranby M, Norrman B, Wallen P. A sensitive assay for tissue plasminogen activator. *Thromb Res* 1982; 27: 743–9.
44. Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruitkof EKO, Juhan-Vague I, Collen D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; 19: 9–12.
45. Verheijen JH, Chang GTG, Kluft C. Evidence for the occurrence of a fast-acting inhibitor for tissue-type plasminogen activator in human plasma. *Thromb Haemostasis* 1984; 51: 392–5.
46. Buckell M. The effect of citrate on euglobulin methods of estimating fibrinolytic activity. *J Clin Pathol* 1959; 11: 403–5.
47. Ghiselli G, Gaddi A, Barozzi G, Ciarrocchi A, Descovich G. Plasma lipoprotein(a) concentration in familial hypercholesterolemic patients without coronary artery disease. *Metabolism* 1992; 41: 833–8.
48. Wiklund O, Angelin B, Olofsson SO et al. Apolipoprotein(a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterolemia. *Lancet* 1990; 335: 1360–3.
49. Seed M, Hoppichler F, Reaveley D et al. Relation of serum Lp(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1990; 322: 1494–9.
50. Bruckert E, Carvalho de Sousa J, Giral P et al. Interrelationship of plasma triglyceride and coagulant factor VII levels in normotriglyceridemic hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1989; 75: 129–34.
51. Dalaker K, Hermann I, Prydz H. A novel form of factor VII in plasma from men at risk for cardiovascular disease. *Br J Haematol* 1985; 61: 315–21.
52. Marckmann P, Sandstrom B, Jespersen J. The variability of and associations between measures of blood coagulation, fibrinolysis and blood lipids. *Atherosclerosis* 1992; 96: 235–44.
53. Simpson HCR, Meade TW, Stirling Y, Mann JI, Chakrabarte R, Woolf L. Hypertriglyceridemia and hypercoagulability. *Lancet* 1983; 1: 786–7.
54. The MIDAS research group, Furberg CD, Byington RP, Borhami NA. Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study (MIDAS): Design features. *Am J Med* 1989; 86: 37–9.
55. Salonen R, Salonen JT. Progression of carotid atherosclerosis and its determinants: a population-based ultrasonography study. *Atherosclerosis* 1990; 81: 33–40.

56. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C, and the ARIC investigators. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: Associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 250–6.
57. Poli A, Tremoli E, Colombo A, Sirtori M, Pignoli P, Paoletti IR. Ultrasonographic measurement of the common carotid artery wall thickness in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 1988; 70: 235–61.
58. Crouse JR, Harpold GH, Kahl FR, Toole JF, McKinney WM. Evaluation of a scoring system for extracranial carotid atherosclerosis extent with B-mode ultrasound. *Stroke* 1986; 17: 270–5.
59. Handa N, Matsumoto M, Maeda H et al. Ultrasonic evaluation of early carotid atherosclerosis. *Stroke* 1990; 21: 1567–72.
60. Solberg LA, Eggen DA. Localization and sequence of development of atherosclerotic lesions in the carotid and vertebral arteries. *Circulation* 1971; 43: 711–23.
61. Riley WA, Barnes RW, Applegate WB. Reproducibility of noninvasive ultrasonic measurement of carotid atherosclerosis: The asymptomatic carotid artery plaque study. *Stroke* 1992; 23: 1062–8.
62. Spengel FA, Kaess B, Keller C et al. Atherosclerosis of the carotid arteries in young patients with familial hypercholesterolemia. *Klin Wochenschr* 1988; 66: 65–8.
63. Költringer P, Jürgens G. A dominant role of lipoprotein(a) in the investigation and evaluation of parameters indicating the development of cervical atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1985; 58: 187–98.
64. Tato F, Keller C, Schuster H, Spengel F, Wolfram G, Zollner N. Relation of lipoprotein(a) to coronary heart disease and duplexsonographic findings of the carotid arteries in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1993; 101: 69–77.
65. Jenner JL, Ordovas JM, Lamon-Fava S et al. Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein(a) levels. The Framingham offspring study. *Circulation* 1993; 87: 1135–41.
66. Sosef MN, Bosch JG, van Oostayen J, Visser T, Reiber JHC, Rosendaal FR. Relation of plasma coagulation factor VII and fibrinogen to carotid artery intima-media thickness. *Thromb Haemostasis* 1994; 72: 250–4.
67. Brown G, Albers JJ, Fisher LD et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990; 323: 1289–98.
68. Kane JP, Malloy MJ, Ports TA, Phillips NR, Diehl JC, Havel RJ. Regression of coronary atherosclerosis during treatment of familial hypercholesterolemia with combined drug regimens. *JAMA* 1990; 264: 3007–12.

Prispelo 22.10.1994