

Zgodnje funkcijske in morfološke spremembe arterijske stene pri sladkorni bolezni*

Early functional and morphologic changes of arterial wall in diabetes

Anita Kek**

Ključne besede
diabetične angiopatije
brahialna arterija
hitrost pretoka
karotidne arterije-ultrasonografija

Key words
diabetic angiopathies
brachial artery
blood flow velocity
carotid artery-ultrasonography

Izvleček. Sladkorna bolezen je pomemben dejavnik tveganja za aterosklerozo. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali imajo mladi bolniki s sladkorno boleznijo po nekaj letih trajanja sladkorne bolezni, ko še nimajo kliničnih znakov žilnih bolezni, že prisotne določene funkcijske in morfološke spremembe v steni perifernih arterij. Merili smo sposobnost razširitve brahialne arterije med provokacijskimi testi (med hiperemijo, po gliceriltrinitratu) in debelino intime-medije karotidnih arterij. Ugotovili smo, da imajo mladi bolniki s sladkorno boleznijo po nekaj letih trajanja sladkorne bolezni že funkcijske in morfološke spremembe, ki kažejo na pospešeno aterogenezo. Funkcijske motnje (manjša sposobnost razširitve perifernih arterij zaradi endoteljske disfunkcije) nastanejo pri sladkorni bolezni pred vidnimi morfološkimi spremembami. Hkrati so funkcijske in morfološke spremembe v steni arterij tesno povezane.

Abstract. Diabetes mellitus is an important risk factor for atherosclerosis. The aim of this study was, first, to determine whether young patients with insulin-dependent diabetes mellitus display atherosclerotic changes at the stage when clinical signs of vascular disease have not yet developed, and, second, to identify the factors accelerating atherogenesis. New high-resolution ultrasound methods allow for the detection of early pathological changes of peripheral arteries. Changes in the blood flow and the diameter of brachial artery occurring during reactive hyperemia and after the administration of sublingual glyceril trinitrate were studied. In addition, the intima-media thickness of three different segments of carotid arteries was measured. Early functional and morphologic changes indicating accelerated atherogenesis were found to be present in young insulin-dependent diabetes mellitus patients. Functional disturbances (impairment of peripheral arteries flow-mediated dilation due to endothelial dysfunction) in insulin-dependent diabetes mellitus occur before morphologic changes have become apparent. Furthermore, there is a direct correlation between functional and morphologic changes of the arterial wall.

Uvod

Aterosklerozna je kronična degenerativna bolezen arterij. Kopičenje maščob v intimi in s tem povezane reakcije, ki so sestavni del aterogeneze, se pri večini prebivalstva začnejo že v otroštvu ali adolescenci in se klinično lahko pokažejo v srednjih letih ali kasneje (1). Mehanizem nastanka in razvoja ateroskleroze še ni popolnoma razjasnjen.

*Objavljeno delo je bilo nagradeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1995

**Anita Kek, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana

Ko se bolezen klinično izrazi, je sestava aterosklerotičnih sprememb že zelo napredovana in zapletena, zato je na tej stopnji razvoja težko ugotoviti in pojasniti patogenetske mehanizme ateroskleroze.

Aterogenezo lahko bolje razumemo in nanjo uspešneje vplivamo pred kliničnim pojavom bolezni. Klinični pojavi, zapleti in smrtnost zaradi ateroskleroze so bolj pogosti pri ljudeh, ki imajo določene dejavnike tveganja. Znani dejavniki tveganja, ki pospešijo aterosklerotični proces, so:

- povišana koncentracija lipidov v krvi,
- povišan krvni tlak,
- sladkorna bolezen,
- dedna nagnjenost,
- kajenje,
- nepravilna prehrana in
- premajhna telesna aktivnost.

Mnoge raziskave danes pripisujejo pomembno vlogo v aterogenezi še drugim, manj znanim dejavnikom tveganja, kot so visoka plazemska koncentracija lipoproteina a (2), motnje v strjevanju krvi in fibrinolitičnem sistemu (3) ter povišana plazemska koncentracija železa (4).

Prvi in ključni dogodek pri razvoju ateroskleroze je poškodba arterijskega endotelija, ki je lahko zgolj funkcijska ali pa tudi morfološka (5, 6). Endotelijske celice imajo med drugim tudi pomembno vlogo pri kontroli vazomotornega tonusa, saj sproščajo naslednje pomembne vazoaktivne snovi (7):

- prostaciklin, ki je močan vazodilatator in zaviralec zlepljanja (agregacije) trombocitov, poleg tega povečuje aktivnost encimov, ki razgrajujejo holesterolove estre v gladkih mišičnih celicah, zavira kopičenje holesterolovih estrov v makrofagih in preprečuje sproščanje rastnih dejavnikov;
- endotelijski relaksacijski dejavnik (angl. *endothelium derived relaxing factor*, EDRF), ki je kemijsko dušikov oksid (NO), povzroča relaksacijo gladkih mišičnih celic v steni žil, pomembno vlogo ima tudi pri zaviranju zlepljanja trombocitov med seboj in na žilno steno;
- endotelin 1, ki povzroča vazokonstrikcijo.

Raziskave na živalskih modelih in ljudeh z dejavniki tveganja za aterosklerozo so pokazale funkcijske nenormalnosti endotelija v zgodnji fazi ateroskleroze, ki se pojavijo pred vidnimi morfološkimi spremembami. V teh raziskavah so ugotovili zmanjšan ali odsoten vazodilatacijski odgovor na različne fiziološke in farmakološke dražljaje (po povečanju pretoka med hiperemijo in po dajanju acetilholina), kar je posledica endotelijske poškodbe (8–11).

Glede na razvoj in obsežnost endotelijske poškodbe je Ross (12, 13) opisal različne faze sprememb v žilni steni, od komajda zaznavnih do napredovanih aterosklerotičnih leh.

Zaradi poškodbe endotelijskih celic se spremeni njihovo delovanje, pride do pospešene vstopanja lipoproteinov v arterijsko steno in do pojava posebnih molekul glikopro-

teinov na notranji površini endotelijskih celic. Na te molekule se pritrjujejo monociti in limfociti T, ki nato prehajajo med endotelijskimi celicami v podendotelijsko plast. Na ta prehod vplivajo različni rastni in kemotaktični dejavniki, ki jih izločajo spremenjene endotelijske celice, pritrjeni levkociti in verjetno tudi gladke mišične celice v steni arterij. V nadaljevanju procesa se monociti spremenijo v makrofage, kopičijo maščobe in postanejo penaste celice. Nakopičene penaste celice skupaj z limfociti in gladkimi mišičnimi celicami tvorijo maščobno progno. Maščobna progna lahko napreduje do vezivno-maščobne lehe. Z delitvijo in pospešenim vstopanjem v arterijsko steno se v intimi nabira vse več celic. Makrofagi spodbujajo endotelijske celice k sproščanju rastnih dejavnikov ali jih poškodujejo. Lahko pride do propada endotelijskih celic in zlepljanja trombocitov na to mesto. Rastni dejavniki pospešujejo tvorbo izvenceličnih snovi v gladkih mišičnih celicah (elastičnih niti, kolagena, proteoglikanov). Tako nastala vezivno-maščobna leha je sestavljena iz vrhnjega sloja veziva in celic (gladke mišične celice, makrofagi, limfociti T) ter sredice iz razpadlih celic, kristalov holesterola, zunajceličnih maščob in nekaterih sestavin krvi. V vezivno-maščobni lehi lahko pride do kalcinacij in nastanka kalcinirane lehe, ki vsebuje kalcijeve soli, ali pa do razrasta veziva in do nastanka vezivne lehe, ki je sestavljena pretežno iz kolagena. Iz tako napredovalih sprememb pa lahko nastane zapletena okvara z razpoko, krvavitvijo ali krvnim strdkom na površini.

Vloga sladkorne bolezni pri aterogenezi

Sladkorna bolezen je pomemben dejavnik tveganja za aterosklerozo. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo je srčni infarkt najmanj dvakrat bolj pogost kot pri ljudeh brez sladkorne bolezni, še pogosteje se pojavljajo motnje prekrvavitve spodnjih udov in gangrena (14).

Mehanizmi, ki so odgovorni za razvoj ateroskleroze pri bolnikih s sladkorno boleznijo, še niso dokončno pojasnjeni. Znanih je več raziskav, v katerih so ugotavljali zgodnje aterosklerotične spremembe na izoliranih arterijah živalskih modelov po eksperimentalno povzročeni sladkorni bolezni (15–17). Raziskovali so mehanizem zmanjšanja odotelija odvisne razširitve žil po dajanju acetilholina. Ugotovitve kažejo, da so za poškodbe endotelija odgovorni kisikovi prosti radikali (15, 16). Pri sladkorni bolezni pride do pospešene tvorbe kisikovih prostih radikalov zaradi avtooksidacije glukoze (18), zaradi povečane aktivnosti encima ciklooksigenaze (16) in znotrajcelične tvorbe kisikovih prostih radikalov v mitohondrih.

Pospešena tvorba kisikovih prostih radikalov, kot sta superoksidni anion in hidroksilni radikal, poslabša odotelija odvisno relaksacijo gladkih mišic v žilni steni na več načinov (15):

- z inaktivacijo endoteljskega NO (EDRF);
- prosti radikali reagirajo z NO in tvorijo peroksinitrit, reaktivno snov, iz katere nastane hidroksilni radikal;
- pride do pospešenega sproščanja železovega iona iz celičnega feritina, kar še pospeši tvorbo kisikovih prostih radikalov;
- kisikovi prosti radikali povzročajo krčenje gladkih mišičnih celic v steni žil.

Pomembna posledica poškodbe endotelijskih celic pri sladkorni bolezni sta zmanjšana tvorba in sproščanje EDRF (19). EDRF ima poleg uravnavanja žilnega tonusa tudi varovalno vlogo v patogenezi ateroskleroze in tromboze (7).

Funkcijska sprememba v endotelijskih celicah lahko napreduje v morfološko spremembo arterijske stene po zgoraj opisanem mehanizmu, na kar pa verjetno vplivajo tudi drugi dejavniki. Eden od možnih vzrokov za pospešeno aterosklerozo je neencimska glikacija in oksidacija lipoproteinov, ki spremeni razmerje med plazemskima koncentracijama lipoproteinov z veliko gostoto (HDL) in lipoproteinov z majhno gostoto (LDL) v korist LDL (18, 20). Določeno vlogo pripisujejo motnjam v hemostatskih procesih (21) in spremembam v hemoreoloških lastnostih krvi (povečana viskoznost krvi poveča strižno silo na žilno steno), ki spremljajo bolnike s sladkorno boleznijo (22). Pri bolnikih s sladkorno boleznijo so povečane koncentracije koagulacijskih faktorjev VII in X ter fibrinogena, povečana je lepljivost (adhezivnost) trombocitov, fibrinolitična aktivnost krvi in skupno število trombocitov pa sta zmanjšana (21). Spremembe teh procesov povečajo tudi dovzetnost za trombozo.

Obsežnost bolezenskih sprememb na arterijah je odvisna od trajanja sladkorne bolezni in koncentracije glukoze. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo z intenzivnim zdravljenjem in skrbno kontrolo koncentracije krvnega sladkorja so opazili počasnejše napredovanje retinopatije, nefropatije, nevropatije (23) in redkejšo pojavljanje kliničnih oblik ateroskleroze (24).

Odkrivanje zgodnjih funkcijskih in morfoloških sprememb arterijske stene pri ateriogenezi s pomočjo ultrazvoka

Endotelijske celice v steni arterij so odgovorne za vzdrževanje žilnega tonusa. S sproščanjem vazodilatacijskih in vazokonstriktornih snovi endotelij vpliva na premer žile in na pretok v njej. Posledica motnje v delovanju endotelija je zmanjšanje sproščanja EDRF in zmanjšan vazodilatacijski odgovor na različne fiziološke in farmakološke dražljaje (25, 26).

In vivo so nenormalnost endotelija najprej ugotavljali na koronarnih arterijah z uporabo angiografije (5, 6). Ker je ta metoda invazivna, ni primerna za ugotavljanje sprememb na arterijah pri mladih osebah z dejavniki tveganja, ki še nimajo klinično izražene ateroskleroze (27, 28).

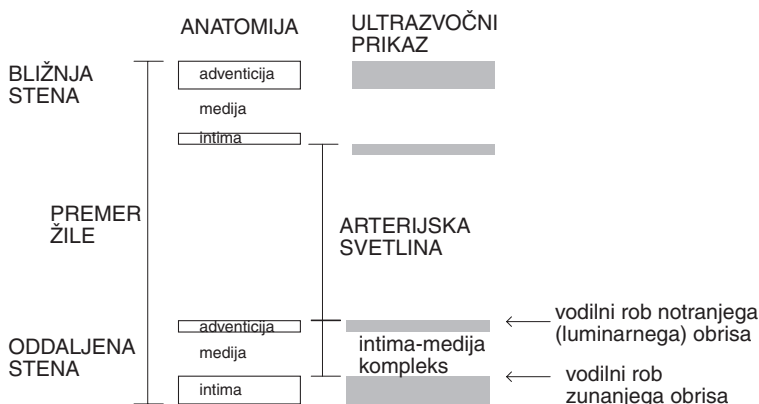
V zadnjem času so razvili neinvazivne metode za ugotavljanje fizioloških in zgodnjih bolezenskih sprememb perifernih arterij (29). Z uporabo ultrazvoka visoke ločljivosti lahko spremljamo spremembe arterijskega premera in pretoka. To nam omogoča duplex ultrazvočna preiskava. Duplex ultrazvočna preiskava je sočasni dvodimenzionalni slikovni prikaz na način B (angl. *B-mode*) in prikaz hitrosti toka krvi z doplerjevim detektorjem. Hitrost toka krvi lahko prikažemo s krivuljo frekvenčnega spektra (pulzni dopler) in v obliki barvno kodiranega signala (barvni dopler).

Funkcijsko sposobnost endotelija in arterijske stene lahko preučujemo s spreminjanjem pretoka in premera perifernih arterij, kar lahko povzročimo z različnimi provokacijskimi testi. S temi testi lahko po eni strani povzročamo spremembe premera, ki so odvisne

od endotelija (s povečanjem pretoka med hiperemijo, z dajanjem acetilholina), po drugi strani pa lahko izzovemo razširitev perifernih arterij neodvisno od endotelija oz. z neposrednim vplivom na gladke mišične celice žilne stene z gliceriltrinitratom (GTN). Po prvem mehanizmu pride pri povečanem pretoku do večjega pritiska strižnih sil na žilno steno, kar povzroči deformacijo endotelijskih celic. Ta deformacija je dražljaj za sproščanje EDRF, ki izzove razširitev žile (30). GTN pa povzroči razširitev žile z neposrednim delovanjem na gladke mišične celice. Na ta način lahko ugotovimo najzgodnejše funkcijske spremembe arterijske stene in tudi razločimo moteno delovanje endotelija od sprememb v gladkih mišičnih celicah žilne stene. Navedene metode so bile uporabljene že v več raziskavah, v katerih so ugotavljali delovanje in moteno delovanje endotelija v brahialni in femoralni arteriji pri zdravih osebah in pri osebah z dejavniki tveganja za aterosklerozo (8, 9, 29, 30).

Prva zaznavna morfološka sprememba pri aterosklerozi je zadebelitev notranjih plasti arterije – intime in medije. Tudi zgodnje morfološke spremembe lahko odkrivamo z ultrazvočnimi preiskovalnimi metodami, ki so neinvazivne in neškodljive. Ultrazvočni prikaz na način B nam omogoča dvodimenzionalno slikovno predstavitev žilne svetline in žilne stene ter njenih sestavin.

Pignoli s sodelavci (32) je leta 1986 prvi opisal ultrazvočni prikaz normalne arterijske stene kot trakasto strukturo z dvojnimi obrisi (slika 1). Ultrazvočne posnetke je primerjal s patohistološkimi analizami in ugotovil, da plast žilne stene z dvojnimi obrisi in vmesnim hipoehogenim področjem predstavlja notranji žilni plasti: intimo in medijo. Zaradi boljše ločljivosti je za meritve debeline intime-medije (angl. *intima-media thickness*, IMT) bolj primerna oddaljena arterijska stena. Na tej steni nastane vodilni rob notranjega (luminarnega) obrisa zaradi odboja ultrazvočnih valov na meji med arterijsko svetlino in intimo, vodilni rob zunanjšega obrisa pa na meji med medijo in adventicijo. IMT predstavlja razdaljo med vodilnima robovoma teh obrisov.



Slika 1. Shematski prikaz ultrazvočne slike žile v vzdolžnem preseku v primerjavi z anatomsko zgradbo.

Na ta način lahko preiskujemo le periferne arterije, ki ležijo dovolj blizu površini, da so dostopne ultrazvočni preiskavi. Med perifernimi arterijami pa so najlažje dostopne karotidne arterije, ki so hkrati predilekcijsko mesto za razvoj ateroskleroze. Z ozirom na tesno povezavo med pojavnostjo ateroskleroze na karotidnih in koronarnih arterijah predstavljajo karotidne arterije okno, ki omogoča vpogled v razširjenost ateroskleroze, zlasti pa kaže na prizadetost koronarnih arterij (33, 34).

Merjenje IMT predstavlja tudi možnost neposrednega spremljanja vpliva dejavnikov tveganja na spremembe arterijske stene in razvoj arterijske bolezni. Raziskave zadnjih let so preučevale vpliv različnih dejavnikov na IMT in ugotovile pomembno povečano IMT pri osebah, ki imajo določene dejavnike tveganja (34–36). Večina avtorjev meni, da je zadebelitev intime in medije prva morfološko vidna sprememba žilne stene, ki predstavlja predstopnjo aterosklerotičnega procesa ali morda eno od zgodnjih faz v aterogenezi.

Namen in cilji

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali imajo mladi sladkorni bolniki po nekaj letih trajanja sladkorne bolezni, ko še nimajo kliničnih znakov žilnih bolezni, že določene funkcijske in morfološke spremembe perifernih arterij, ki sodijo med najzgodnejše pojavnostne oblike ateroskleroze.

Pri tem smo želeli ugotoviti:

- ali imajo sladkorni bolniki povečano IMT karotidnih arterij v primerjavi z zdravimi preiskovanci;
- ali je pri mladih sladkornih bolnikih že prizadeta sposobnost razširitve perifernih arterij med provokacijskimi testi;
- kaj je vzrok za morebitno zmanjšano relaksacijsko sposobnost periferne arterije (endotelijska ali mišična disfunkcija);
- ali obstaja povezanost med pričakovanimi morfološkimi in funkcijskimi spremembami ter trajanjem sladkorne bolezni;
- ali so morda pri bolnikih s sladkorno boleznijo določeni klinični znaki in biokemične spremembe poleg sprememb v koncentraciji krvnega sladkorja, povezani z razvojem funkcijskih in morfoloških sprememb v perifernih arterijah, in katera od teh najzanesljiveje napoveduje razvoj aterosklerotičnega procesa.

Preiskovanci

V raziskavi je sodelovalo 59 prostovoljcev: 28 bolnikov s sladkorno boleznijo in 31 zdravih preiskovancev, ki so služili za kontrolo. Bolniki s sladkorno boleznijo so bili stari od 20 do 36 let (povprečno 29 let), preiskovanci iz kontrolne skupine pa od 22 do 36 let (povprečno 28 let). Skupini sta bili primerljivi v starosti, zastopanosti po spolih in številu kardiocentrov. Vrednosti nekaterih kliničnih spremenljivk posameznih skupin so prikazane v tabeli 1.

Tabela 1. Prikaz kliničnih značilnosti in zastopanosti kajenja v kontrolni skupini in v skupini bolnikov s sladkorno boleznijo. \bar{x} – povprečna vrednost, SD – standardna deviacija, BMI – indeks telesne teže (angl. body mass index), NS – razlika ni statistično značilna, p – nivo tveganja.

Spremenljivka	Sladkorni bolniki ($\bar{x} \pm SD$)	Kontrolna Skupina ($\bar{x} \pm SD$)	p
Število preiskovancev	28	31	NS
Moški/ženske	14/14	15/16	NS
Starost (leta)	29 \pm 5	28 \pm 5	NS
Število kadilcev	9	9	NS
Telesna višina (cm)	173 \pm 11	174 \pm 9	NS
Telesna teža (kg)	75,5 \pm 12	69 \pm 9	0,049
BMI (g/cm ²)	2,53 \pm 0,3	2,26 \pm 0,3	0,001
Sistolični tlak (mm Hg)	119 \pm 10	119 \pm 9	NS
Diastolični tlak (mm Hg)	82 \pm 8	77 \pm 7	0,037

Bolniki s sladkorno boleznijo

V preiskovani skupini je bilo 28 bolnikov s sladkorno boleznijo tipa I. Sladkorna bolezen je povprečno trajala 8 let (od 3 do 15 let). Nobeden od preiskovanih bolnikov razen inzulina ni jemal drugih zdravil. Eno bolnico s sladkorno boleznijo smo naknadno izključili iz raziskave, ker je imela deset let zvišano koncentracijo maščob v krvi in je jemala zdravila za zniževanje plazemske koncentracije holesterola. Vsi preiskovanci so imeli normalen krvni tlak in še niso imeli kliničnih znakov poznih posledic sladkorne bolezni (periferne angiopatije, retinopatije, nevrološke ali ledvične bolezni). Poleg tega v anamnezi teh bolnikov nismo zasledili družinske obremenjenosti z boleznimi srca in ožilja.

Kontrolna skupina

V kontrolno skupino smo vključili 31 zdravih prostovoljcev, ki niso imeli nobenega od pomembnih dejavnikov tveganja za aterosklerozo.

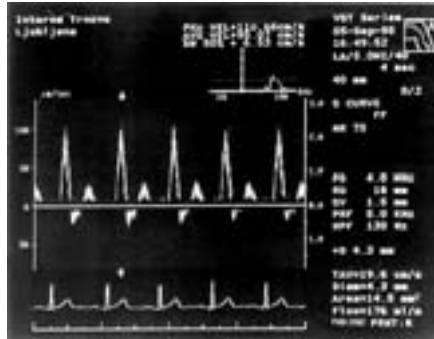
Vse preiskovance smo predhodno natančno obvestili o postopku preiskave in namenu raziskave. V raziskavi so sodelovali prostovoljno. Pri tem smo upoštevali načela Helsinško-tokijske deklaracije. Predlog raziskave je obravnavala tudi Republiška komisija za medicinsko etiko in je soglašala z vsebino raziskave.

Metode

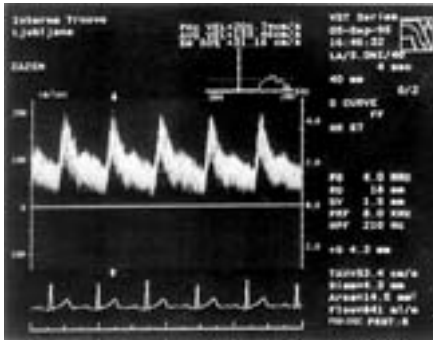
Merjenje hemodinamskih sprememb v brahialni arteriji

Ultrazvočno merjenje sprememb pretoka in premera v brahialni arteriji smo izvedli po protokolu, kot ga je opisal Celermajer s sodelavci (29).

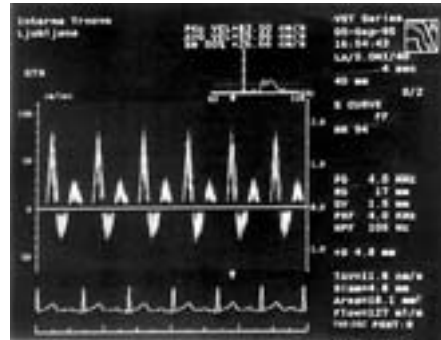
Pred začetkom merjenja je vsak preiskovanec mirno ležal najmanj 10 minut. Tudi med merjenjem so preiskovanci ležali z iztegnjeno desno roko v komolcu. Vse meritve smo opravili z linearno ultrazvočno sondo (5 MHz). Brahialno arterijo smo prikazali v vzdolž-



Mirovanje



Hiperemija



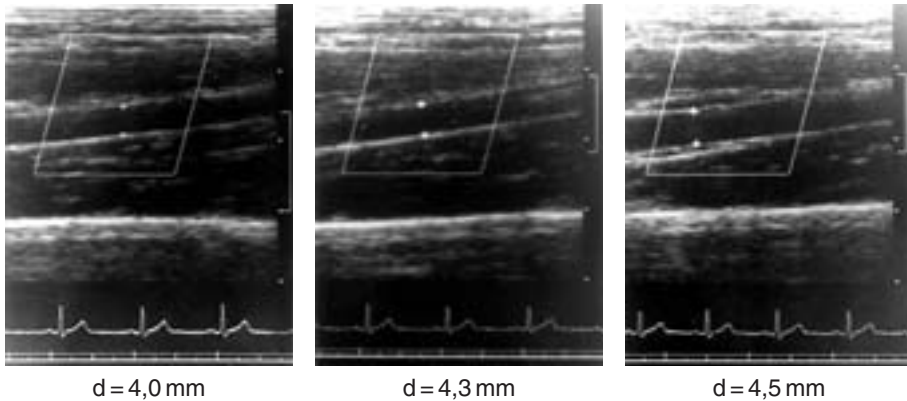
Gliceril trinitrat

Slika 2a. Ultrazvočni prikaz hitrosti toka krvi v brahialni arteriji z doplerjevimi krivuljami frekvenčnega spektra (hitrost v mirovanju, med hiperemijo, po gliceril trinitratu).

nem preseku 2–15 centimetrov nad komolcem. Globino in ostrino ultrazvočne slike smo nastavili tako, da smo dobili optimalen prikaz arterijske svetline in arterijske stene. Med ultrazvočno preiskavo smo z EKG-zapisom sočasno spremljali tudi delovanje srca.

Z ultrazvočnim prikazom na način B smo žilo predstavili v vzdolžnem preseku in na zauzavljani sliki najprej izmerili premer arterije. Ker se premer arterije spreminja med srčnim ciklusom, smo vse meritve premera opravili na koncu diastole, to je v času R-vala na EKG-krivulji. Nato smo s pulznim doplerjem pri kotu 68° izmerili povprečno hitrost toka krvi in izračunali pretok krvi.

Povečanje pretoka smo povzročili z zažemom roke distalno od mesta meritve. Manšeto smo namestili na podlaht tik pod komolcem in jo napihnil z zrakom na 180–200 mm Hg za 4 minute. Po sprostitvi manšete smo opazovali hiperemijo, ki je nastala zaradi ishemije podlakti med zažemom. Hiperemično hitrost toka krvi smo izmerili v prvih 15 sekundah po sprostitvi manšete, premer arterije pa smo merili 45–65 sekund po začetku hiperemije.



Slika 2b. Ultrazvočna slika na način B brahialne arterije v vzdolžnem preseku. Meritev premera v mirovanju ($d = 4,0$ mm), med hiperemijo ($d = 4,3$ mm), po gliceril trinitratu ($d = 4,5$ mm).

Nato smo počakali 5–7 minut, da se je hitrost toka krvi vrnila na mirovno raven in znova izmerili pretok in premer brahialne arterije.

Ob koncu preiskave je vsak preiskovanec dobil tableto GTN in jo raztopil pod jezikom. Od 3 do 4 minute po tem smo še enkrat izmerili premer in pretok v preiskovani arteriji.

Spremembe pretoka in premera žile med hiperemijo in 7 minut po njej ter po dajanju GTN smo primerjali z rezultati meritev, ki smo jih izvedli v mirovanju na začetku preiskave.

Merjenje debeline intime-medije karotidnih arterij

Ultrazvočno preiskavo karotidnih arterij smo opravili z ultrazvočno napravo Diasonics® in linearno sondo (5 Mhz). Uporabili smo dvodimenzionalni B-način ultrazvočnega prikaza, ki nam natančno pokaže morfološko arterijske stene. Središčna (aksialna) ločljivost naprave je 0,1 milimetra.

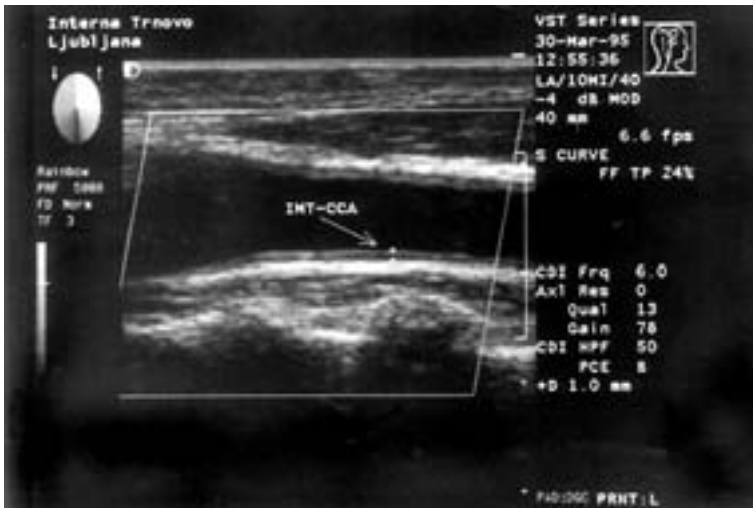
Med preiskavo so preiskovanci ležali na hrbtu brez dvignjenega vzglavja, glava je bila obrnjena stran od preiskovane strani za približno 45°. Preiskovano arterijo smo prikazali v vzdolžnem preseku iz anterolateralne ali lateralne projekcije. IMT smo izmerili na treh odsekih vsake karotidne arterije:

- končni del skupne karotidne arterije (do 1 centimeter pod razcepiščem),
- razcepišče karotidne arterije (bulbus) in
- začetni del notranje karotidne arterije (do 1 centimeter nad razcepiščem).

Na vsakem odseku smo poiskali projekcijo, v kateri so se najbolj prikazali odboji oddaljene arterijske stene. Ta stena se na ultrazvočni sliki prikaže kot vzorec z dvojnimi obrisi (angl. *double line pattern*). Prvi obris nastane zaradi odboja ultrazvočnih valov na meji med arterijsko svetlino in intimo, drugi pa zaradi odboja na meji med medijo in adventicijo. Z merilno napravo ultrazvočnega aparata smo na zaustavljeni sliki izmerili



Normalna debelina intime-medije



Zadebeljena intima-medija

Slika 3. Ultrazvočna slika (način B) skupne karotidne arterije v vzdolžnem preseku. Prikaz normalne in zadebeljene debeline intime-medije.

razdaljo med vodilnima robovoma obeh obrisov, kar predstavlja skupno debelino intime in medije (slika 1 in slika 3). Meritve IMT smo na vsakem preiskovanem odseku večkrat ponovili ter izračunali povprečne vrednosti za vsak posamezni odsek in povprečno IMT vseh preiskovanih odsekov. Meritve smo posneli na videotrak in jih dokumentirali tudi z zapisom na termoprint papir, kar omogoča kasnejše analize in preverjanje rezultatov.

Odvzem krvi in krvne preiskave

Preiskovancem smo odvzeli kri na tešče, med 7. in 10. uro zjutraj. Bolniki s sladkorno boleznijo pred odvzemom še niso vzeli insulina za tisti dan. Kri smo vzeli iz komolčne vene, med odvzemom so preiskovanci sedeli. Nadlaht smo predhodno prevezali za največ 1 minuto in odstranili prevezo takoj, ko je kri pritekla v prvo epruveto. Najprej smo odvzeli 7 mililitrov krvi za biokemične preiskave. Nato smo odvzeli kri za hematološke preiskave in pri sladkornih bolnikih še dodatno vzorec za določanje deleža glikiranega hemoglobina (HbA_{1c}). Na koncu smo v epruveto s sredstvom proti strjevanju odvzeli še 1,8 mililitra krvi za določitev koncentracije fibrinogena.

Hematološke preiskave

Z napravo Cobas Minos STE-X® (Roche) smo določili hematokrit, koncentracijo hemoglobina ter število eritrocitov, levkocitov in trombocitov.

Biokemične preiskave

Koncentracijo krvnega sladkorja smo določili s heksokinaznim testom. Koncentracijo skupnega holesterola smo določali po encimski metodi s pomočjo encimov holesterol esterase, holesterol oksidaze in peroksidaze (37).

Koncentracijo HDL-holesterola smo določali z dekstran sulfat/magnezijjevo metodo. Ta metoda temelji na specifičnem obarjanju s polianioni in dvovalentnimi kationi ter na določanju deleža holesterola v lipoproteinih HDL z encimskim postopkom (38). Koncentracijo serumskih trigliceridov smo določali po metodi GPO-PAP (encimska metoda z gliceroloksidazo) (39).

Koncentracijo holesterola v lipoproteinih LDL smo izračunali iz skupne koncentracije holesterola, koncentracije HDL-holesterola in trigliceridov po Fridewaldovi enačbi (40).

Koncentracijo železa in transferina v krvi smo določali v analizatorju KODAK Ektachem 250 Analyzer®.

Koncentracijo fibrinogena smo določali po Claussovi metodi (41) z napravo Fibrintimer® (Behring, Marburg/Kahn, Nemčija).

Preiskave seča

Sladkornim bolnikom smo v vzorcu jutranjega seča z aparatom Clintek 100®, Bayer diagnostic, določili koncentracijo glukoze in beljakovin.

Statistične metode

Vse statistične analize smo opravili s programom Statistica (Stat Soft Inc., ZDA).

Aritmetično sredino smo uporabili za prikaz srednjih vrednosti, za prikaz variabilnosti pa standardno deviacijo. Razlike med skupinama smo ugotavljali z dvosmernim Studentovim t-testom. Povezavo med dvema spremenljivkama smo prikazali s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (za spremenljivke, ki so se razporejale normalno) in s Spearmanovim korelacijskim koeficientom (za spremenljivke z nenormalno razporeditvijo) (42). Za ugotavljanje neodvisnega vpliva posamezne spremenljivke na odvisno spremenljivko smo uporabili model multiple linearne regresijske analize.

Rezultati

Laboratorijske preiskave

Krvne preiskave

Med skupino bolnikov s sladkorno boleznijo in kontrolno skupino smo ugotovili pomembne razlike v plazemski koncentraciji krvnega sladkorja, fibrinogena, transferina in števila trombocitov. V ostalih krvnih preiskavah pa se skupini nista razlikovali. Rezultate krvnih preiskav prikazuje tabela 2.

Tabela 2. Vrednosti krvnih preiskav in statistične razlike med obravnavanima skupinama. \bar{x} – povprečna vrednost, SD – standardna deviacija, HbA_{1c} – delež glikiranega hemoglobina A, NS – razlika ni statistično značilna, p – nivo tveganja.

	Bolniki s sladkorno boleznijo ($\bar{x} \pm SD$)	Kontrolna skupina ($\bar{x} \pm SD$)	p
Koncentracija glukoze (mmol/l)	11,9 ± 3,9	5,1 ± 0,6	< 0,0001
Koncentracija celotnega holesterola (mmol/l)	5,03 ± 1,23	4,84 ± 0,87	NS
Koncentracija HDL-holesterola (mmol/l)	1,51 ± 0,44	1,53 ± 0,26	NS
Koncentracija LDL-holesterola (mmol/l)	3,0 ± 0,87	2,74 ± 0,77	NS
Koncentracija trigliceridov (mmol/l)	1,20 ± 0,63	1,24 ± 0,68	NS
Koncentracija fibrinogena (g/l)	2,4 ± 0,45	2,13 ± 0,4	0,02
Koncentracija železa (μmol/l)	17,5 ± 9,1	18,6 ± 6,7	NS
Koncentracija transferina (μmol/l)	58,7 ± 9,0	65 ± 6,7	0,038
Koncentracija hemoglobina (g/l)	14,02 ± 1,4	13,08 ± 1,1	NS
Hematokrit (%)	41,5 ± 3,8	41,0 ± 3,5	NS
Število eritrocitov (10 ⁶ /ml)	4,90 ± 0,4	4,85 ± 0,4	NS
Število levkocitov (10 ³ /ml)	6,06 ± 1,66	5,55 ± 1,25	NS
Število trombocitov (10 ³ /ml)	168,3 ± 40,8	196,1 ± 30,3	0,004
HbA _{1c}	8,7 ± 1,35	–	–

Preiskave seča

Pri 19 bolnikih s sladkorno boleznijo smo odkrili glukozo v seču. Njena povprečna koncentracija je bila 23,7 mmol/l, največja izmerjena koncentracija pa 55 mmol/l.

Pri 26 bolnikih s sladkorno boleznijo nismo odkrili beljakovin v seču. Pri enem bolniku so bile prisotne v sledovih, ena bolnica pa je imela v seču 3 mmol/l beljakovin.

Hemodinamske meritve

Pri merjenju pretoka in premera brahialne arterije v mirovanju in po štiriminutnem zažemu podlakti so sodelovali vsi preiskovanci. Preizkus z GTN pa je odklonilo 6 preiskovancev (3 bolniki s sladkorno boleznijo, 3 preiskovanci iz kontrolne skupine).

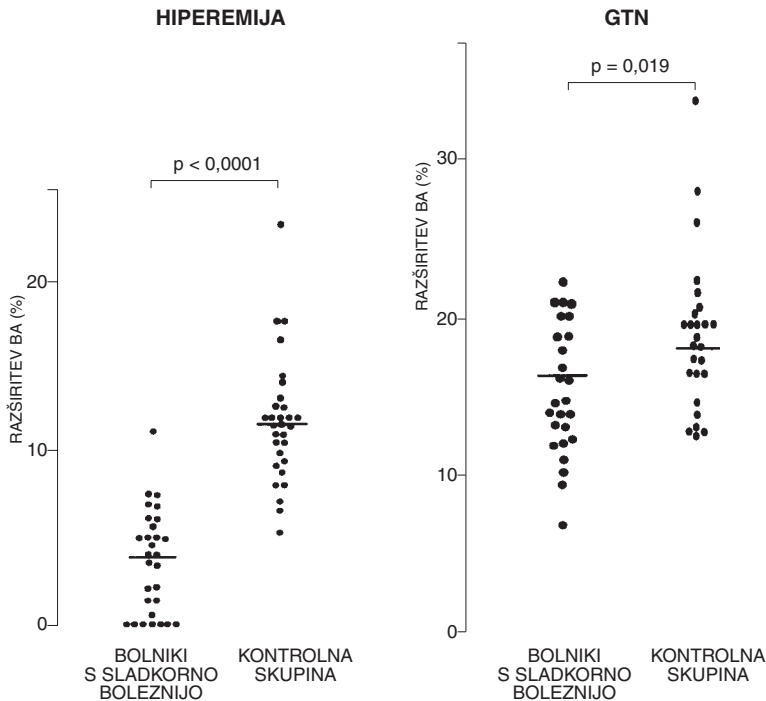
V mirovanju smo pri bolnikih s sladkorno boleznijo izmerili nekoliko večji pretok (170 ± 60 ml/min) kot pri preiskovancih iz kontrolne skupine (150 ± 66 ml/min), vendar razlika ni bila statistično značilna. Tudi povprečen premer brahialne arterije v mirovanju je bil primerljiv med skupinama ($3,97 \pm 0,5$ mm pri bolnikih s sladkorno boleznijo in $3,7 \pm 0,5$ mm pri zdravih preiskovancih).

Med hiperemijo smo pri vseh preiskovancih izmerili statistično značilno povečanje pretoka krvi v brahialni arteriji, tudi v teh spremenljivkah med skupinama ni bilo razlik (tabela 3). Pri obeh skupinah se je pretok 5–7 minut po začetku hiperemije znova vrnil na izhodiščno vrednost. Po dajanju GTN pomembnih sprememb pretoka v primerjavi z mirovnim pretokom nismo ugotovili, prav tako ni bilo pomembnih razlik med skupinama (tabela 3).

Hiperemija je povzročila povečanje premera arterije pri obeh skupinah preiskovancev. Bolniki s sladkorno boleznijo so imeli med hiperemijo pomembno manjše povečanje premera brahialne arterije kot preiskovanci iz kontrolne skupine. Pri 7 bolnikih s sladkorno boleznijo med hiperemijo ni prišlo do povečanja premera opazovane arterije. Po dajanju GTN se je premer brahialne arterije v obeh skupinah značilno povečal, razlike med skupinama pa so bile manjše kot pri hiperemiji. Tudi v tem primeru je bila razširitev brahialne arterije pri zdravih preiskovancih večja kot pri bolnikih s sladkorno boleznijo (tabela 3).

Tabela 3. Vrednosti pretokov in premerov v brahialni arteriji v mirovanju in med provokacijskimi testi pri obeh skupinah preiskovancev. \bar{x} – povprečna vrednost, SD – standardna deviacija, NS – razlika ni statistično značilna, p – nivo tveganja.

Spremenljivka	Bolniki s sladkorno boleznijo ($\bar{x} \pm SD$)	Kontrolna Skupina ($\bar{x} \pm SD$)	p
Pretok v mirovanju (ml/min)	170 ± 60	150 ± 66	NS
Povečanje pretoka med hiperemijo (%)	339 ± 95	346 ± 101	NS
Pretok po zaužitju gliceril trinitrata (ml/min)	170 ± 88	146 ± 67	NS
Premer v mirovanju (mm)	3,97 ± 0,5	3,7 ± 0,5	NS
Povečanje premera med hiperemijo (%)	3,6 ± 2,8	11,3 ± 3,6	<0,00001
Povečanje premera po zaužitju gliceril trinitrata (%)	15,2 ± 4,3	18,3 ± 4,9	0,019



Slika 4. Prikaz razširitve brahialne arterije (BA) med hiperemijo in po zaužitju gliceril trinitrata. Povprečna vrednost posamezne skupine je prikazana z ravno črto.

Razširitev brahialne arterije pri bolnikih s sladkorno boleznijo in kontrolni skupini prikazuje slika 4.

Ugotovili smo več pomembnih povezav med razširitvijo brahialne arterije po hiperemiji in zaužitju GTN ter nekaterimi spremenljivkami (tabela 4).

Da bi ugotovili, kateri od dejavnikov neodvisno vpliva na zmanjšanje razširitve brahialne arterije med hiperemijo, smo vse spremenljivke iz tabele 4 vstavili v model multiple regresijske analize kot neodvisne spremenljivke. Poleg tega smo v model vstavili tudi sladkorno bolezen. Ugotovili smo statistično pomembno povezavo med prisotnostjo sladkorne bolezni in razširitvijo brahialne arterije med hiperemijo (delni koeficient = $-0,51$, $p = 0,00008$), ostale spremenljivke pa niso dosegle statistično značilne povezave z razširitvijo brahialne arterije. Ta model pojasnjuje 62 % variabilnosti sprememb premera po povečanju pretoka ($p < 0,00001$).

V primeru razširitve po dajanju GTN multivariatna linearna regresijska analiza ni pokazala pomembnih vplivov navedenih dejavnikov (tabela 4) in tudi ne vpliva sladkorne bolezni na razširitev po zaužitju GTN.

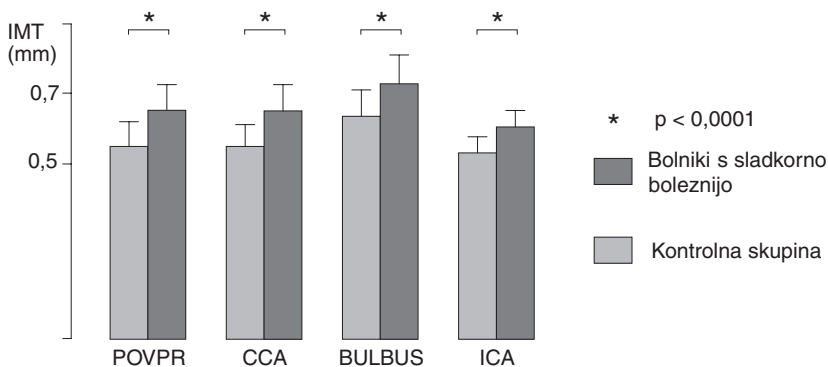
Tabela 4. Prikaz statistično značilnih povezav med razširitve brahialne arterije med hiperemijo in po zaužitju gliceril trinitrata z naštetimi kliničnimi in laboratorijskimi spremenljivkami. BMI – indeks telesne teže, IMT – debelina intime-medije, r – korelacijski koeficient, p – nivo tveganja.

Razširitev med hiperemijo	r	p	Razširitev po dajanju gliceril trinitrata	r	p
BMI	-0,39	0,0023	BMI	-0,27	0,047
Koncentracija LDL- holesterola	-0,27	0,037	Koncentracija glukoze	-0,37	0,007
Koncentracija glukoze	-0,68	<0,0001	Koncentracija HDL- holesterola	0,29	0,04
Koncentracija fibrinogena	-0,37	0,004	Koncentracija hemoglobina	-0,36	0,009
IMT karotidnih arterij	-0,64	<0,0001	Število eritrocitov	-0,32	0,02

Debelina intime-medije karotidnih arterij

Pri vseh preiskovancih smo izmerili IMT na odseku skupne karotidne arterije in na razcepišču, na odseku notranje karotidne arterije pa meritev IMT pri 6 preiskovancih (4 sladkorni bolniki, 2 kontrolni) ni bila mogoča.

Pri sladkornih bolnikih je bila IMT na vseh odsekih pomembno večja kot pri kontrolni skupini. Tako so bile vrednosti IMT pri sladkornih bolnikih med 0,58 mm in 0,72 mm, preiskovanci iz kontrolne skupine pa so imeli IMT od 0,48 mm do 0,65 mm. Med levo in desno karotidno arterijo vseh preiskovanih odsekov ni bilo pomembnih razlik. Vrednosti IMT so prikazane v tabeli 5 in na sliki 5.



Slika 5. Prikaz debeline intime-medije (IMT) na posameznih odsekih karotidnih arterij ter povprečne IMT vseh odsekov pri bolnikih s sladkorno boleznijo in kontrolni skupini. POVPR – povprečna debelina vseh odsekov, CCA – skupna karotidna arterija, BULBUS – razcepišče skupne karotidne arterije, ICA – notranja karotidna arterija.

Tabela 5. Vrednosti debeline intime-medije (IMT) na posameznih odsekih karotidnih arterij (CCA – skupna karotidna arterija, BULB – razcepišče, ICA – notranja karotidna arterija), IMT povpr. – povprečne debeline vseh odsekov, \bar{x} – povprečna vrednost, SD – standardna deviacija, p – nivo tveganja.

	Bolniki s sladkorno boleznijo ($\bar{x} \pm SD$)	Kontrolna skupina ($\bar{x} \pm SD$)	p
IMT povpr. (mm)	0,65 ± 0,04	0,56 ± 0,04	< 0,0001
IMT CCA (mm)	0,63 ± 0,04	0,55 ± 0,05	< 0,0001
IMT BULB (mm)	0,71 ± 0,05	0,62 ± 0,04	< 0,0001
IMT ICA (mm)	0,60 ± 0,04	0,52 ± 0,04	< 0,0001

Pri preučevanju odvisnosti IMT od različnih dejavnikov smo pri preiskovancih obeh skupin ugotovili, da nanjo vplivajo različne klinične in laboratorijske spremenljivke. Povezave so prikazane v tabeli 6.

Tabela 6. Povezave med debelino intime-medije ter različnimi kliničnimi in laboratorijskimi spremenljivkami pri obeh skupinah preiskovancev. r – korelacijski koeficient, p – nivo tveganja.

Spremenljivka	r	p
Starost	0,32	0,016
Telesna teža	0,26	0,047
Indeks telesne teže	0,52	< 0,0001
Diastolični tlak	0,36	0,005
Koncentracija LDL-holesterola	0,30	0,024
Koncentracija glukoze	0,62	< 0,0001
Koncentracija fibrinogena	0,36	0,005
Število trombocitov	-0,29	0,026

Vplivi posameznih spremenljivk na IMT so bili na različnih odsekih karotidnih arterij enaki, z izjemo odseka notranje karotidne arterije. Na tem odseku smo ugotovili tudi pomembno povezavo med IMT in številom levkocitov ($r=0,31$, $p=0,02$), ki na drugih odsekih karotidnih arterij ni bila značilna.

Linearna multipla regresija je pokazala neodvisen vpliv sladkorne bolezni, starosti, diastoličnega tlaka in koncentracije LDL-holesterola na poprečno IMT. Regresijski model, ki nam je pojasnil največji delež variabilnosti IMT, prikazuje tabela 7.

Z multiplo regresijo smo za odsek notranje karotidne arterije ugotovili, da na IMT neodvisno vplivajo sladkorna bolezen (delni koeficient = 0,43, $p=0,016$), indeks telesne teže (delni koeficient = 0,21, $p=0,045$) in število levkocitov (delni koeficient = 0,22, $p=0,029$), ne pa tudi koncentracija glukoze, fibrinogena in razširitev brahialne arterije med hiperemijo. Vse našteje spremenljivke pojasnijo 65 odstotkov variabilnosti IMT na odseku notranje karotidne arterije.

Tabela 7. Model multiple regresijske analize vplivov različnih dejavnikov na povprečno debelino intime-medije.

Neodvisna spremenljivka	Delni koeficient	p	R ²
Sladkorna bolezen	0,46	0,0004	
Starost	0,38	0,0043	0,707
Diastolični tlak	0,29	0,03	p < 0,0001
Koncentracija LDL-holesterola	0,29	0,032	
Koncentracija glukoze	0,18	NS	
Hiperemična razširitev brahialne arterije	-0,067	NS	

Analiza rezultatov merjenja IMT je pokazala, da lahko sladkorne bolnike glede na IMT razdelimo na dve podskupini. V prvo podskupino smo uvrstili 15 bolnikov, pri katerih je bila vrednost povprečne IMT primerljiva s kontrolno skupino ($\leq 0,64$ mm = povprečna vrednost kontrolne skupine + 2 standardni deviaciji). V drugi podskupini je bilo 13 bolnikov s povečano IMT. Ob tem smo ugotovili, da se skupini pomembno razlikujeta v trajanju sladkorne bolezni, starosti in da so bili pri bolnikih s povečano IMT bolj izraženi nekateri dejavniki tveganja za aterosklerozo (tabela 8).

Tabela 8. Razlike med prisotnostjo dejavnikov tveganja pri obeh podskupinah sladkornih bolnikov z normalno in zadebeljeno debelino intime-medije. \bar{x} – povprečna vrednost, SD – standardna deviacija, IMT – debelina intime-medije, p – nivo tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Spremenljivka	Bolniki s sladkorno boleznijo z normalno IMT ($\bar{x} \pm SD$)	Bolniki s sladkorno boleznijo z zadebeljeno IMT ($\bar{x} \pm SD$)	p
Starost (leta)	27 ± 4,5	31 ± 3	0,009
Trajanje sladkorne bolezni (leta)	7,7 ± 3	10,2 ± 3	0,041
Koncentracija celotnega holesterola (mmol/l)	4,5 ± 0,7	5,6 ± 1,4	0,011
Koncentracija HDL-holesterola (mmol/l)	1,36 ± 0,3	1,7 ± 0,5	0,039
Koncentracija LDL-holesterola (mmol/l)	2,6 ± 0,54	3,41 ± 1,01	0,018
Hiperemična razširitev brahialne arterije (%)	4,35 ± 2,9	2,8 ± 2,6	NS

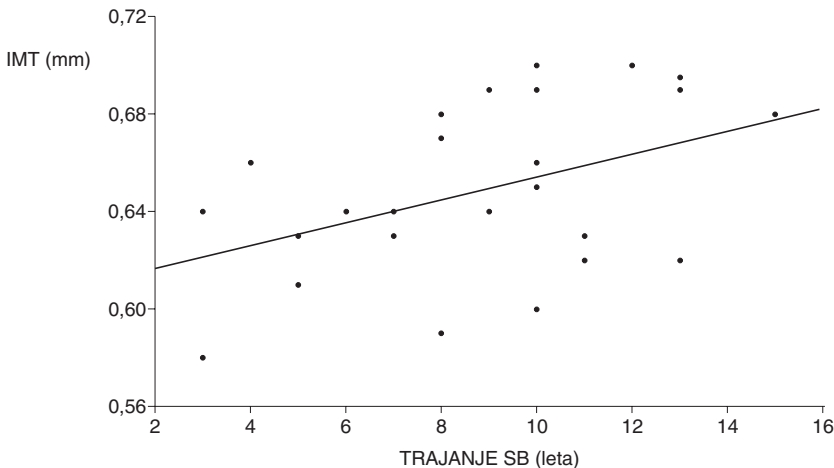
Pri bolnikih s sladkorno boleznijo smo odkrili povezavo med povprečno IMT in trajanjem sladkorne bolezni (slika 6), ki je bila najizrazitejša na odseku skupne karotidne arterije ($r = 0,55$, $p = 0,004$), na odseku notranje karotidne arterije pa ni bila statistično značilna. Povezavo med starostjo in IMT smo pri bolnikih s sladkorno boleznijo ugotovili le na razcepšču karotidne arterije ($r = 0,42$, $p = 0,027$).

Poleg tega smo pri bolnikih s sladkorno boleznijo ugotovili statistično značilno povezavo med povprečno IMT in kajenjem, plazemsko koncentracijo skupnega holesterola in trigliceridov (tabela 9). Nakazovala se je tudi povezava IMT s koncentracijo LDL-holesterola, vendar ni bila statistično značilna ($p = 0,056$). Povezave spremenljivk z IMT notranje karotidne arterije so se delno razlikovale od povezav s povprečno IMT (tabela 9).

Tabela 9. Statistično značilne povezave med debelino intime-medije in nekaterimi spremenljivkami pri bolnikih s sladkorno boleznijo. r – korelacijski koeficient, p – nivo tveganja.

Povprečne debeline intime-medije vseh odsekov	r	p	Debelina intime-medije notranje karotidne arterije	r	p
Trajanje sladkorne bolezni tipa I	0,45	0,022	Kajenje	0,43	0,036
Kajenje	0,45	0,017	Koncentracija celotnega holesterola	0,43	0,036
Koncentracija celotnega holesterola	0,48	0,017	Koncentracija trigliceridov	0,45	0,029
Koncentracija trigliceridov	0,39	0,048	Število levkocitov	0,61	0,0015
			Hiperemična razširitev brahialne arterije	-0,43	0,037

Multipla regresija je pokazala, da so pri sladkornih bolnikih neodvisni dejavniki, ki vplivajo na IMT, trajanje sladkorne bolezni (delni koeficient = 0,40, $p = 0,025$), koncentraci-



Slika 7. Povezava debeline intime-medije s trajanjem sladkorne bolezni (SB). Debelina intime-medije (IMT) = $0,61 + 0,005 \times$ trajanje sladkorne bolezni, korelacijski koeficient (r) = 0,44, nivo tveganja (p) = 0,023.

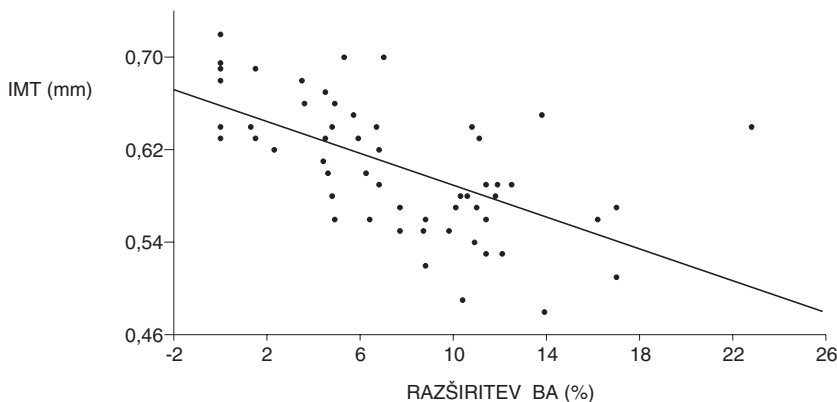
ja celotnega holesterola (delni koeficient = 0,41, $p = 0,042$) in število trombocitov (delni koeficient = -0,4, $p = 0,036$). Naštete spremenljivke pojasniyo 49 odstotkov variabilnosti IMT pri sladkornih bolnikih ($p < 0,0039$).

Pri kontrolni skupini je bila povprečna IMT povezana z indeksom telesne teže in sistoličnim tlakom (tabela 10). Tudi pri tej skupini je izstopal odsek notranje karotidne arterije, kjer smo našli največ statistično pomembnih povezav IMT z navedenimi dejavniki tveganja (tabela 10).

Tabela 10. Statistično značilne povezave med debelino intime-medije in nekaterimi dejavniki tveganja v kontrolni skupini, r – korelacijski koeficient, p – nivo tveganja.

Povprečje debeline intime-medije vseh odsekov	r	p	Debelina intime-medije notranje karotidne arterije	r	p
Indeks telesne teže	0,47	0,009	Telesna teža	0,38	0,043
Sistolični tlak	0,53	0,0026	Indeks telesne teže	0,47	0,011
			Sistolični tlak	0,54	0,0029
			Koncentracija HDL-holesterola	-0,50	0,006
			Hematokrit	0,38	0,046

Našli smo pomembno negativno povezavo med IMT karotidnih arterij in razširitvijo brahialne arterije med hiperemijo ($r = -0,64$, $p < 0,0001$) (slika 7).



Slika 8. Povezava med razširitvijo brahialne arterije (BA) med hiperemijo in debelino intime-medije karotidnih arterij (IMT). $IMT = 0,66 - 0,007 \times \text{razširitev BA}$, korelacijski koeficient (r) = -0,60, nivo tveganja (p) < 0,00001.

Razprava

Hemodinamske spremembe brahialne arterije

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo smo ugotovili pomembno manjšo sposobnost razširitve brahialne arterije po povečanju pretoka v primerjavi z zdravimi preiskovanci brez dejavnikov tveganja. Raziskave so pokazale, da je za razširitev žile po povečanju pretoka potrebna neokrnjeno delovanje endotelija (25). Ob zmanjšanem vazodilatacijskem odgovoru pri bolnikih s sladkorno boleznijo zato sklepamo na funkcijske nenormalnosti oziroma na poškodbe endotelija. Ugotovitve naše raziskave so v skladu s poročili drugih raziskav, v katerih so z enakimi metodami ugotovili zmanjšano ali odsotno razširitev žile pri osebah z družinsko hiperholesterolemijo (10), kajenjem (8), homozigotno homocistinurijo (9). Te raziskave kažejo, da zgoraj naštetih dejavnikov tveganja za aterosklerozo pomembno okvarjajo endotelij in spremenijo njegovo delovanje. Motnja v delovanju endotelija pa velja za najzgodnejšo spremembo v procesu aterogeneze.

Poročila več raziskav kažejo, da tudi sladkorna bolezen podobno kot drugi dejavniki tveganja poškoduje endotelijske celice. To so dokazali tako v eksperimentalnih kot v kliničnih raziskavah. V kulturi endotelijskih celic, ki so jo izpostavili visoki koncentraciji glukoze, so ugotovili motnje celičnega ciklusa in hitrejše propadanje endotelijskih celic (43). Motnjo v delovanju endotelija so raziskovali na živalskih modelih po eksperimentalno povzročeni sladkorni bolezni (15–17). Ugotovili so poslabšanje od endotelija odvisne razširitve žile, ki je v normalnih pogojih odvisna od sproščanja EDRF. Predlaganih je več mehanizmov nastanka motnje v delovanju endotelija pri sladkorni bolezni (15): zmanjšanje tvorbe EDRF, inaktivacija EDRF s prostimi kisikovimi radikali, oviran prehod EDRF v gladke mišične celice, okvarjen odgovor gladkih mišičnih celic na vazodilatacijski dražljaj z EDRF in povečana tvorba snovi, ki povzročajo skrčenje žile. Zdi se, da je pri sladkorni bolezni nesposobnost razširitve žile v pretežni meri posledica zmanjšane sinteze EDRF (17).

Tudi v raziskavah na bolnikih s sladkorno boleznijo so odkrili nenormalnost endotelija. Pri večletnem spremljanju bolnikov s sladkorno boleznijo so ugotovili značilen in stalen porast koncentracije von Willebrandovega faktorja, ki je pokazatelj okvare endotelijskih celic (44).

V literaturi nismo zasledili podatkov o raziskavah, v katerih bi neposredno opazovali spremembe premera in pretoka v perifernih arterijah pri sladkornih bolnikih. Spremenjeno delovanje in reaktivnost perifernih arterij so pri bolnikih s sladkorno boleznijo ugotavljali na nadlakti z metodo venske okluzijske pletizmografije (45, 46). Navedene pletizmografske metode omogočajo spremljanje hemodinamskih sprememb, ki so v pretežni meri posledica sprememb perifernega upora, ne omogočajo pa neposrednega vpogleda v sposobnost razširitve perifernih arterij. S temi metodami lahko spremljamo le lokalne spremembe pretoka krvi v odvisnosti od perifernega žilnega upora in proučujemo sposobnost relaksacije majhnih uporovnih arterij. Ugotovili so značilno manjšo razširitev žile med hiperemijo pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa I z mikroalbuminurijo (43). Enako metodo so uporabili v raziskavi razširitve žil pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa II (44). V slednji raziskavi je bilo povečanje perifernega pretoka med reaktivno

hiperemijo po ishemiji pri bolnikih s sladkorno boleznijo primerljivo s kontrolami. Pomembno manjše povečanje pretoka pa so ugotovili po infuziji acetilholina in GTN.

V naši raziskavi smo pri mladih bolnikih s sladkorno boleznijo z razmeroma kratkotrajnim trajanjem sladkorne bolezni tipa I z metodo neposrednega merjenja premera arterije ugotovili značilno manjšo razširitev arterije med hiperemijo kot pri kontrolni skupini. Spremembe premera periferne arterije med provokacijskim testom so verjetno eden najbolj občutljivih pokazateljev zgodnjih funkcijskih okvar endotelija. Zmanjšanje razširitve arterije med povečanjem pretoka nastane celo pred spremenjenim dilatacijskim odgovorom na acetilholin, čeprav je v obeh primerih razširitev preiskovane arterije odvisna od endotelija (25).

V raziskavi smo ugotovili tudi pomembno negativno povezavo med razširitvijo brahialne arterije po povečanju pretoka ter indeksom telesne teže, plazemsko koncentracijo LDL-holesterola, glukoze in fibrinogena ter IMT karotidnih arterij. Vse našete spremembe pogosto spremljajo sladkorno bolezen (14, 22) in so poleg samih motenj presnove glukoze verjetno odločilnega pomena za razvoj aterosklerotičnih zapletov. Najdena negativna povezava med sposobnostjo razširitve brahialne arterije in navedenimi dejavniki je bila zato pričakovana. Tudi multivariatna regresijska analiza je potrdila, da je sladkorna bolezen najpomembnejši dejavnik, ki zmanjša razširitev brahialne arterije po povečanju pretoka.

Pri razširitvi brahialne arterije z GTN nismo ugotovili povezave med sladkorno boleznijo in spremembo premera. Kljub temu smo med bolniki s sladkorno boleznijo in kontrolno skupino ugotovili pomembne razlike v obsegu razširitve brahialne arterije po zaužitju GTN v korist kontrolne skupine, ki pa niso bile tako izrazite kot v primeru razširitve po povečanju pretoka. Ta ugotovitev nakazuje, da sladkorna bolezen poleg okvare endotelija povzroči tudi selektivno funkcijsko okvaro gladkih mišičnih celic v steni žil in tako poslabša odgovor na vazodilatacijski dražljaj. Poročila raziskav o tem, ali sladkorna bolezen povzroči tudi funkcijsko okvaro gladkih mišičnih celic, niso enotna. Nekatere raziskave poročajo o normalnem odgovoru gladkih mišičnih celic na NO (47), v drugih raziskavah pa so ugotovili, da je ta odgovor zmanjšan (19, 45). Vzrok za različne ugotovitve teh raziskav je lahko v uporabi različne metodologije ali pa neupoštevanju trajanja sladkorne bolezni.

V povečanju pretoka med reaktivno hiperemijo med skupinama nismo ugotovili razlik. To je v skladu z ugotovitvami naše predhodne raziskave (48) in ostalih raziskav, ki so preučevale vpliv dejavnikov tveganja na hemodinamske spremembe v perifernih arterijah (10, 11, 29). Zmanjšanje povečanja pretoka po provokaciji se verjetno pojavi šele takrat, ko aterosklerotični proces napreduje do te mere, da zajame tudi periferne – uporovne arterije. Do manjšega povečanja pretoka pride bodisi preko zmanjšane sproščanja dilatacijskih dejavnikov, ali pa napredovan aterosklerotični proces povzroči togost žilne stene in razširitev kljub prisotnosti vazodilatacijskih posrednikov ni možna. S tem lahko razložimo pomembno manjši porast pretoka, ki so ga drugi ugotovili pri bolnikih s sladkorno boleznijo z mikroalbuminurijo, saj je le-ta pokazatelj razširjenosti oziroma napredovanosti žilnih poškodb (45, 46, 49). V opisanih raziskavah (45, 46) niso našli

pomembnih povezav med spremembo pretoka po provokaciji ter trajanjem sladkorne bolezni, koncentracijo LDL-holesterola, koncentracijo glukoze in deležem glikiranega hemoglobina (HbA_{1c}). Poleg tega so bile zgoraj navedene raziskave opravljene na starejših bolnikih s sladkorno boleznijo tipa I in tipa II.

Debelina intime-medije karotidnih arterij

Pri zdravih preiskovancih je bila povprečna IMT od 0,5 mm do 0,6 mm, kar je primerljivo z rezultati drugih raziskav, ki so vključevale mlajše osebe (35, 50). Pri bolnikih s sladkorno boleznijo in zdravih preiskovancih smo opazili razlike v IMT med posameznimi odseki karotidnih arterij, največjo IMT smo ugotovili na razcepišču karotidnih arterij. Običajno je arterijska intima pri ljudeh na različnih odsekih različne debeline (1). Področja relativno debele intime se pojavijo že v otroštvu in predstavljajo fiziološko prilagoditev na lokalne spremembe krvnega pretoka ali notranjega pritiska na steno arterije. V področjih s prilagoditveno zadebelitvijo so opazili razlike v funkciji glede na področja brez zadebelitve. Ugotovili so hitrejšo obnavljanje endotelijskih in gladkih mišičnih celic ter povečano koncentracijo lipoproteinov in drugih sestavin plazme v žilni steni (1).

V več raziskavah so ugotovili, da je intimalna zadebelitev različnih oblik (difuzna zadebelitev, kopičenje gladkih mišičnih celic, maščobna proga) predhodnica aterosklerotičnih sprememb, čeprav danes še ni mogoče napovedati, katera zadebelitev se bo razvila v aterosklerotične lehe in katera ne (1, 32, 34, 36). Poleg tega so ugotovili značilno povezavo med IMT in prisotnostjo znanih dejavnikov tveganja pri osebah srednjih let brez klinično izražene ateroskleroze (33, 34).

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo smo ugotovili pomembno povečano IMT na vseh preiskovanih odsekih karotidnih arterij, kar je v skladu s poročili drugih raziskav (48, 50). Razvitih aterosklerotičnih sprememb v obliki leh v naši raziskavi nismo odkrili, pomembna zadebelitev intime-medije na vseh preiskovanih odsekih pa kaže na patološki proces v steni karotidnih arterij, česar pri zdravih preiskovancih ni bilo opaziti.

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo smo odkrili tudi druge dejavnike tveganja, ki so pogosti spremljevalci sladkorne bolezni ali morda sploh neobhodni sestavni del presnovnih motenj pri sladkorni bolezni. Tako sta se skupini značilno razlikovali v telesni teži in indeksu telesne teže. Bolniki s sladkorno boleznijo so imeli v primerjavi s kontrolno skupino višji diastolični krvni tlak, ki pa je bil še v območju normalnih vrednosti. To je v skladu z ugotovitvami drugih raziskav, ki so prav tako pokazale povečanje telesne teže in krvnega tlaka pri bolnikih s sladkorno boleznijo (51, 52). Ker je znano, da sta povečanje telesne teže in povišan krvni tlak pomembna dejavnika tveganja za razvoj ateroskleroze (53), sta pri bolnikih s sladkorno boleznijo verjetno soodgovorna za pospešeno aterogenezo, s tem pa razlagamo tudi povezavo med IMT in omenjenima dejavnikoma.

Z analizo rezultatov krvnih preiskav smo pri bolnikih s sladkorno boleznijo ugotovili prisotnost nekaterih manj znanih dejavnikov tveganja za aterosklerozo. Tako so bolniki s sladkorno boleznijo imeli večjo koncentracijo fibrinogena v primerjavi s kontrolno skupino. Koncentracija fibrinogena je bila značilno povezana z IMT. O podobnih ugotovitvah po-

ročajo tudi druge raziskave (35) in navajajo, da je fibrinogen lahko sicer neodvisen dejavnik tveganja (54), najpogosteje pa je le spremljevalec drugih dejavnikov, ki vplivajo na aterosklerotični proces (starost, povišana plazemska koncentracija holesterola, sladkorna bolezen).

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo smo ugotovili tudi značilno manjšo koncentracijo transferina, v koncentraciji prostega železa pa se skupini nista razlikovali. Pri majhni zasedenosti vezavnih mest z železom deluje transferin kot antioksidant, če pa je prenasičen, oziroma pri višjih koncentracijah železa, deluje kot oksidant (55). Zato menijo, da je nizka koncentracija transferina neodvisen dejavnik tveganja za nastanek srčnega infarkta in morda tudi drugih oblik ateroskleroze (56). Pomembno je razmerje med koncentracijo železa in koncentracijo transferina. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo je bilo to razmerje povečano, kar pomeni večjo reaktivnost železa v oksidativnih reakcijah in večjo možnost nastanka kisikovih prostih radikalov.

Bolniki s sladkorno boleznijo so nadalje imeli značilno manjše število trombocitov v krvi v primerjavi s kontrolno skupino. Rezultati naše raziskave so pokazali, da je zmanjšano število trombocitov neodvisen dejavnik, ki vpliva na zadebelitev intime-medije pri bolnikih s sladkorno boleznijo. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo pride do manjšega števila trombocitov zaradi večje reaktivnosti in večje porabe trombocitov. Zaradi pospešene porabe trombociti pospešeno nastajajo, mladi trombociti pa so bolj reaktivni kot starejši. Zdrave endotelijske celice preprečujejo zlepljanje trombocitov na žilno steno. Pri poškodbah endotelija in pomanjkanju EDRF, ki je tudi antitrombocitni dejavnik, pa se trombociti pospešeno zlepljajo na žilno steno. Pri tem izločajo rastne in kemotaktične dejavnike, potencirajo poškodbe endotelijskih celic in tako prispevajo k napredovanju aterosklerotičnega procesa (12, 13).

Koncentracija holesterola in trigliceridov je bila v obeh preiskovanih skupinah v območju normalnih vrednosti. Toda tudi v območju normalnih vrednosti se je pokazal pomemben in neodvisen vpliv koncentracije LDL-holesterola na debelino intime-medije. Pri sladkornih bolnikih smo ugotovili tudi povezavo med IMT ter koncentracijo skupnega holesterola in trigliceridov. Pri kontrolni skupini pa smo na odseku notranje karotidne arterije našli negativno povezavo med koncentracijo HDL-holesterola in IMT. Navedene ugotovitve so v skladu s pričakovanji, kajti klinične in eksperimentalne raziskave so dokazale, da je visoka koncentracija LDL-holesterola povezana s pospešeno aterogenezo (12). Za to naj bi bil odgovoren zlasti pospešen prehod holesterola v žilno steno. Obstajata dva načina prehoda holesterola in holesterolnih estrov v žilno steno (57): prvi je odvisen od specifičnih receptorjev, drugi pa je pasiven. Zlasti pasiven prehod holesterola naj bi se močno povečal v primeru poškodbe endotelija. Kemično spremenjeni oziroma oksidirani LDL, ki v večjih količinah nastaja pri sladkorni bolezni, lahko dodatno poškoduje endotelijske celice in zato pospešeno prehaja v žilno steno. Menijo, da je povečana oksidacija in peroksidacija lipoproteinov eden od možnih vzrokov za pospešeno aterosklerozo pri sladkorni bolezni (18, 20).

Vlogo maščob v aterogenezi pri sladkorni bolezni podpira tudi ugotovitev večjih koncentracij holesterola (čeprav še v normalnem območju) pri bolnikih s sladkorno boleznijo,

ki so imeli zadebeljeno intimo-medijo, v primerjavi z bolniki s sladkorno boleznijo z normalno IMT. Ta ugotovitev kaže, da je pri sladkorni bolezni v proces aterogeneze verjetno vpletenih več mehanizmov: oksidacija lipoproteinov in povišanje plazemske koncentracije holesterola.

V naši raziskavi se je pri sladkornih bolnikih nakazovalo tudi večje število levkocitov, vendar razlika med skupinama ni bila statistično značilna. Ugotovili pa smo pomembno povezavo med številom levkocitov in IMT na odseku notranje karotidne arterije. Povezava med številom levkocitov in IMT je pričakovana, saj v literaturi opisujejo pomembno vlogo vnetnih celic, predvsem monocitov in makrofagov v procesu ateroskleroze (12, 13, 57). Makrofagi v žilni steni razgrajujejo oksidirane lipoproteine z majhno gostoto. Če je kopičenje oksidiranih lipoproteinov v makrofagih preveliko, lahko pride do razpada celic. Pri tem se iz makrofagov sprostito oksidirani lipoproteini, prosti radikali in duge citotoksične snovi, ki nadalje poškodujejo endotelij (57).

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo smo ugotovili tudi pomemben vpliv kajenja na IMZ. Večina kadičev med preiskovanimi bolniki s sladkorno boleznijo je imela pomembno zadebeljeno IMT. V literaturi obstajajo nasprotujoča si mnenja o neposredni povezanosti kajenja z zapleti, ki so v neposredni zvezi s samo sladkorno boleznijo. Znano pa je, da kajenje pri bolnikih s sladkorno boleznijo pomembno poveča tveganje za obolevnost in smrtnost, in to zlasti na račun bolezni srca in ožilja (58). V predhodni raziskavi (48) nismo našli pomembnega vpliva kajenja na IMT pri osebah brez ostalih dejavnikov tveganja, verjetno pa postane vpliv kajenja na IMT očiten v kombinaciji s sladkorno boleznijo. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo-kadičih so ugotovili tudi slabšo urejenost koncentracije krvnega sladkorja, nezdrav način življenja, opazili so tudi povečano agregabilnost trombocitov in pomanjkanje kisika v tkivih (59).

Rezultati naše raziskave so med drugim pokazali pomemben vpliv starosti na IMT. Ta povezava potrjuje ugotovitve številnih raziskav (1, 34, 35), da je ateroskleroza kroničen proces, ki se začne že v mladosti, s staranjem pa se posledice stopnjujejo.

Pri sladkorni bolezni je ateroskleroza pospešena. Večanje IMT s trajanjem sladkorne bolezni je ena pomembnejših ugotovitev naše raziskave. Tudi s kliničnimi opazovanji so ugotovili, da se s trajanjem sladkorne bolezni povečuje obsežnost aterosklerotičnih sprememb in da pri večini bolnikov s sladkorno boleznijo pride po določenem času do zapletov s področja srca in ožilja (60). Verjetnost nastanka le-teh pa je pri tipu I in tipu II sladkorne bolezni tem večja, čim dlje bolezen traja.

Naša raziskava je potrdila ugotovitve drugih raziskav, da se pri aterogenezi funkcijske motnje (nesposobnost razširitve perifernih arterij) pojavijo pred morfološkimi spremembami žilne stene, saj je bilo delovanje endotelija pomembno okvarjeno tudi pri tistih bolnikih s sladkorno boleznijo, ki še niso imeli morfoloških sprememb. V kasnejši fazi, ko se pojavijo tudi morfološke spremembe arterijske stene (zadebelitev intime-medije), pa so le-te tesno povezane z motnjami v delovanju endotelija. Ta ugotovitev potrjuje predpostavko, da se pri aterogenezi odigravajo funkcijske in morfološke spremembe in da njihovo medsebojno delovanje verjetno potencira patofiziološko dogajanje pri aterogenezi.

Zaključki

Bolniki s sladkorno boleznijo se od zdravih oseb razlikujejo ne le po povečanih koncentracijah krvnega sladkorja, ampak tudi po določenih kliničnih znakih (večji indeks telesne teže, večja telesna teža, višji diastolični tlak) in biokemičnih spremembah v krvi (večja koncentracija fibrinogena, manjša koncentracija transferina, manjše število trombocitov). Omenjeni dejavniki predstavljajo dodatno tveganje za razvoj ateroskleroze, saj so pomembno povezani s funkcijskimi in morfološkimi spremembami žilne stene.

Bolniki s sladkorno boleznijo tipa I imajo kljub razmeroma kratkemu trajanju sladkorne bolezni zmanjšano sposobnost razširitve perifernih arterij med provokacijskim testom. To je verjetno v pretežni meri posledica okvarjenega delovanja endotelija, medtem ko funkcija gladkih mišičnih celic v steni arterij še ni pomembno prizadeta.

Na zmanjšanje razširitve perifernih arterij po povečanju pretoka najizraziteje vpliva prisotnost sladkorne bolezni. V sklopu sladkorne bolezni zmanjšujejo dilatacijsko sposobnost še povečan indeks telesne teže ter povečana koncentracija LDL-holesterola in fibrinogena.

Zmanjšanje dilatacijske sposobnosti perifernih arterij je ena od najzgodnejših sprememb, ki se tudi pri sladkornih bolnikih pojavi pred morfološkimi spremembami žilne stene (še predno se zadebeli intima-medija).

Periferni upor se pri mladih bolnikih s sladkorno boleznijo ne razlikuje od zdravih preiskovancev, zato se pri bolnikih s sladkorno boleznijo med hiperemijo pretok krvi v perifernih arterijah poveča enako kot pri zdravih preiskovancih.

Bolniki s sladkorno boleznijo imajo pomembno zadebeljeno intimo-medijo na vseh odsekih karotidnih arterij. Na to neodvisno vplivajo trajanje sladkorne bolezni, koncentracija celotnega holesterola in manjše število trombocitov.

Na IMT poleg sladkorne bolezni neodvisno vplivajo še starost, diastolični tlak in koncentracija LDL-holesterola. Na IMT notranje karotidne arterije pa pomembno vplivata še število levkocitov in indeks telesne teže.

Zahvala

Prof. dr. Pavlu Poredošu se najlepše zahvaljujem za posredovano znanje, nasvete, spodbude in žrtvovani čas pri uvajanju v raziskovalno delo in nastajanju raziskovalne naloge.

As. mag. Marku Medveščku lepa hvala, ker je omogočil sestavo skupine bolnikov s sladkorno boleznijo in s strokovnimi nasveti pomagal pri raziskavi.

As. dr. Igorju Bardorferju in as. mag. Viktorju Videčniku hvala za koristne nasvete in prijazno pomoč pri delu z ultrazvokom.

Hvala višji medicinski sestri Brigiti Valenčič za pomoč pri odvzemu krvi ter osebju laboratorija Interne klinike Trnovo in Dispanzerja za diabetike za opravljene laboratorijske preiskave.

Gospe Jelki Kos hvala za toplo besedo in prijazno spodbudo v dneh nastajanja raziskovalne naloge.

Najlepša hvala Tanji za skrbno in natančno lektoriranje naloge.

Hvala sestri Darji, ker mi je pomagala pri iskanju prostovoljcev in pri delu z računalnikom.

Hvala vsem preiskovancem, da so žrtvovali čas in s svojim sodelovanjem omogočili nastanek naloge.

Literatura

1. Stary HS. Changes of components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol* 1994; 89: Suppl 1: 17–32.
2. Scanu AM, Fless GM. Lipoprotein (a). Heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest* 1990; 85: 1709–15.
3. Tanaka K, Sueishi K. Biology of disease: The coagulation and fibrinolysis systems and atherosclerosis. *Lab Invest* 1993; 69: 5–18.
4. Salonen JT. The role of iron as a cardiovascular risk factor. *Curr Opin Lipid* 1993; 4: 277–82.
5. Zeiher AM, Drexler H, Wolschlagel H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1993; 391–401.
6. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, et al. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 833–43.
7. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27–36.
8. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88: 2149–55.
9. Celermajer DS, Sonensen K, Ryalls M, et al. Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 854–8.
10. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86: 228–34.
11. Laurent S, Lacolley P, Brunel P, et al. Flow-dependent vasodilatation of brachial artery in essential hypertension. *Am J Physiol* 1990; 258: 1004–11.
12. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488–500.
13. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801–9.
14. Foster DW. Diabetes mellitus. In: Wilson DJ, Braunwald E, Isselbacher KJ, eds. *Principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill 1991: 1753–6.
15. Dietrich D, Skopec J, Dietrich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol* 1994; 266: H1153–51.
16. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263: H321–6.
17. Kamata K, Miyata N, Kasuya Y. Impairment of endothelium dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 614–8.
18. Hunt JV, Smith CT, Wolff SP. Autooxidative glycosilation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39: 1420–4.
19. Calver A, Collier J, Vallane P. Inhibition and stimulation NO synthesis in the human forearm arterial bed of patients with IDDM. *J Clin Invest* 1992; 90: 2548–54.

20. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advances glycosilation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Eng J Med* 1988; 318: 1315–21.
21. Fuller JH, Keen H, Jarett RJ, et al. Haemostatic variables associated with diabetes and its complications. *Brit Med J* 1979; 2: 964–6.
22. Lowe GDO, Lowe JM, Drummond MM, et al. Blood viscosity in young male diabetics with and without retinopathy. *Diabetologia* 1980; 18: 359–63.
23. The Diabetes Control and Complication Research Group. The effect of intensive treatment diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977–86.
24. Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes care* 1995; 18: 258–68.
25. Pohl U, Holtz J, Busse R, et al. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to incised flow in vivo. *Hypertension* 1986; 8: 37–44.
26. Guerra R, Brotherton AFA, Googwin PJ, et al. Mechanisms of abnormal endothelium dependent vascular relaxation in atherosclerosis: Implication for altered autocrine and paracrine functions of EDRF. *Blood Vessels* 1989; 26: 300–14.
27. Rubba P, Faccenda F. Noninvasive ultrasound techniques versus angiography for monitoring drug-induced changes of arterial walls. *FASEB* 1993; 7: 1491–8.
28. Sharrett AR. Invasive versus noninvasive studies of risk factors and atherosclerosis. *Circulation* 1993; 87: Suppl 2: 48–53.
29. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111–5.
30. Melkumyants AM, Balashov SA, Khayutin VM. Endothelium dependent control of arterial diameter by blood viscosity. *Cardiovasc Research* 1989; 23: 741–7.
31. Sornsen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, et al. Impairment of endothelium dependent dilation is an early event in children with familiar hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein (a) level. *J Clin Invest* 1994; 93: 50–5.
32. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Padetti R. Intimal plus medial thickness of arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74: 1399–406.
33. Salonen R, Salonen JT. Progression of carotid atherosclerosis and its determinants: A population based ultrasonography study. *Atherosclerosis* 1990; 81: 33–40.
34. Jukka T, Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation* 1993; 87: Suppl 2: 56–65.
35. Sosef MN, Bosch JG, van Oostayen J, et al. Relation of plasma coagulation factor VII and fibrinogen to carotid artery intima-media thickness. *Thromb and Haemost* 1994; 72: 250–4.
36. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, et al. 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.
37. Allain CC, Poon LS, Chan GSG. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1970; 20: 470–5.
38. Warnick GR. Dextran sulphate – Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28: 1379–88.
39. Bucolo G, David M. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476–82.
40. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of plasma low density lipoprotein – cholesterol concentration without use of the preparation ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499–502.
41. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des fibrinogens. *Acta Haemat* 1957; 17: 237–46.
42. Adamič Š. *Temelji biostatistike*. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, 1989.
43. Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture: Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes* 1985; 34: 621–7.

44. Stehouwer CDA, Fischer HRA, van Kuijk AWR, et al. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes* 1995; 44: 561–64.
45. Gugliemi MD, Pierdomenico SD, Salvatore L, et al. Impaired left ventricular diastolic function and vascular postischemic vasodilation associated with microalbuminuria in IDDM patients. *Diabetes Care* 1995; 18: 353–60.
46. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35: 771–6.
47. Elliot TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci* 1993; 85: 687–93.
48. Kek A, Verhovec R. *Odkrivanje zgodnjih aterosklerotičnih sprememb na perifernih arterijah: Poskus opredelitve razširjenosti aterosklerotičnega procesa in vpliva dejavnikov tveganja*. Prešernova naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta univerze v Ljubljani; 1994.
49. Deckert T, Feld – Rasmussen B, Borch – Johnsen K, Jensen T, Kofoed – Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage: The Steno hypothesis. *Diabetologia* 1989; 32: 219–26.
50. Yokoyama H, Yoshitake E, Otani T, et al. Carotid atherosclerosis in young-aged IDDM associated with diabetic retinopathy and diastolic blood pressure. *Diabetes Res Clin Pract* 1993; 21: 155.
51. Epstein M, Sowers JR. Diabetes mellitus and hypertension. *Hypertension* 1992; 19: 403–18.
52. Chaturvedi N, Stevens LK, Fuller JH, The WHO Multinational Study Group. Mortality and morbidity associated with body weight in people with IDDM. *Diabetes Care* 1995; 18: 761–5.
53. Licata G, Scaglione R, Avellone G, et al. Obesity, hypertension and atherosclerosis. *Int Angiol* 1993; 12: 326–30.
54. Sanguigni V, Gallu M, Novo S, Strano A. Cholesterol and fibrinogen as predictive factors of progressive carotid atherosclerosis. *Int Angiol* 1993; 12: 335–6.
55. Štalcer B, Ploj T. Kisikovi prosti radikali – nastanek, reakcije in pomen v organizmu. *Med Razgl* 1993; 32: 403–27.
56. Magnusson MK, Sigfusson N, Sigvaldson H, et al. Low iron-binding capacity as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89: 102–7.
57. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis: A multifactorial disease: *Circulation* 1993; 87; Suppl 2: 3–16.
58. Gay EC, Cruickshanks KJ, Cai Y, et al. Smokers with IDDM experience excess morbidity. *Diabetes Care* 1992; 15: 947–52.
59. Chaturvedi N, Stephenson JM, Fuller JH, The EURODIAB IDDM Complications Study Group. The relationship between smoking and microvascular complications in the EURODIAB IDDM complication study. *Diabetes Care* 1995; 18: 785–92.
60. Janka HU, Standl E, Mehnert H. Peripheral vascular disease in diabetes mellitus and its relation to cardiovascular risk factors: Screening with Doppler ultrasonic technique. *Diabetes care* 1980; 3: 207–13.

Prispelo 3. 10. 1996