

Debelina intime in medije karotidnih arterij in koronarni dejavniki tveganja*

Thickness of carotid arteries intima and media and coronary risk factors

Bojan Vrtovec**, Andrej Gadžijev***

Deskriptorji
koronarni dejavniki tveganja
karotidna ateroskleroza
B-mode ultrazvočna preiskava

Descriptors
coronary artery disease
carotid artery atherosclerosis
B-mode ultrasonography

Izvleček. Ateroskleroza v svojem poteku zgodaj prizadene področja koronarnih in karotidnih arterij. Morfološke spremembe žilne stene karotidnih arterij lahko zgodaj odkrijemo z B-mode ultrazvočno tehniko. Ta nam omogoča oceno stopnje aterogenosti posameznih koronarnih dejavnikov tveganja in opredelitev morebitne povezave med aterosklerozo karotidnih žil in koronarno simptomatiko. Raziskava je temeljila na dveh skupinah preiskovancev, starih od 30 do 50 let. V prvi skupini so bili bolniki, ki so preboleli srčni infarkt, drugo skupino pa so sestavljali asimptomatski prostovoljci. Poleg kliničnega pregleda smo preiskovancem v krvi določali sladkor, celotni holesterol, holesterol v lipoproteinih majhne gostote (LDL-holesterol), holesterol v lipoproteinih velike gostote (HDL-holesterol), trigliceride, fibrinolitične parametre (fibrinogen, tkivni aktivator plazminogena (t-PA), inhibitor aktivatorja plazminogena (PAI-1), evglobulinska liza), železo in transferin. Debelino kompleksa intima-medija smo izmerili v notranji karotidni arteriji, karotidni bifurkaciji in skupni karotidni arteriji s pomočjo B-mode ultrazvočne tehnike. Rezultati so pokazali pomemben vpliv prebolele koronarne bolezni, diastoličnega krvnega tlaka, HDL-holesterola, aktivnosti t-PA in PAI na debelino stene karotidnih arterij ($p < 0,05$). Naši rezultati kažejo, da so pomembnejši dejavniki tveganja za nastanek aterosklerotičnih sprememb v karotidnih arterijah predvsem HDL-holesterol, hipertenzija ter fibrinolitični parametri. Zaradi povezave med aterosklerozo karotidnih in koronarnih žil lahko sklepamo, da stopnja ateroskleroze karotidnih žil predstavlja pomemben podatek pri diagnostiki koronarnih bolezni.

Abstract. The coronary and carotid arterial beds are affected early in the process of atherosclerosis. Morphologic changes of arterial walls can be easily detected using B-mode ultrasound method. This technique enables the evaluation of the degree of atherogenesis regarding specific coronary risk factors, and can be used in research concerning the connections between carotid artery atherosclerosis and coronary artery disease. Our research involved male individuals, aged 30–50, divided into two groups as follows. One including patients with a history of myocardial infarction and the second consisting of asymptomatic individuals. All the participants had assessments of blood glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL, triglycerides, t-PA, PAI, fibrinogen, serum iron and transferrin levels. The thickness of intima-media complex was measured in the common carotid arteries, in the area of bifurcation and in the proximal part of internal carotid arteries using B-mode ultrasound. The results indicated that among the coronary risk factors investigated in the study, previous history of coronary disease had the greatest effect on the carotid vessel wall thickness. Other factors that showed significant correlation with carotid intima-media thickness included diastolic blood pressure, HDL-cholesterol levels and activity of t-PA and PAI. Our results showed that HDL-cholesterol, hypertension and fibrinolytic parameters represent important risk factors for the development of atherosclerotic lesions in the carotid vascular bed. This study also presumes significant associations between atherosclerosis of coronary and carotid arteries. Therefore the carotid artery wall thickness can be an important predictor of the development of coronary artery disease.

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1994.

**Bojan Vrtovec, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

***Andrej Gadžijev, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

Uvod

Dosedanje raziskave so pokazale, da se aterosklerotične lezije ne razvijajo z enako hitrostjo po vseh delih kardiovaskularnega sistema, temveč se na določenih območjih izražajo hitreje in bolj intenzivno. Prizadete so predvsem srednje velike arterije (koronarne, karotidne, cerebralne, renalne), aorta ter arterije spodnjih okončin (1). Predilekcijska mesta za nastanek hujših aterosklerotičnih lezij lahko opredelimo tudi v poteku posamezne arterije. Aorta je prizadeta predvsem v abdominalnem delu, predelu aortnega loka in na mestu razvejitve v iliakalni arteriji. Na spodnjih okončinah je bolezen najbolj izražena v iliakalnih, femoralnih in poplitealnih arterijah (tik nad kolonom). Koronarne arterije so prizadete difuzno, značilna pa je odsotnost aterosklerotičnih sprememb v njihovih intramuralnih vejah (2). V karotidnih arterijah se aterosklerotični proces začne v predelu bifurkacije in se nato širi v smeri skupne in notranje karotidne arterije (2). Največje morfološke spremembe, ki se izražajo kot zadebelitev stene, so opazne v bifurkaciji in v začetnem delu notranje karotidne arterije (3).

Za aterosklerozo so značilne tri osnovne morfološke spremembe žilne stene: maščobne lehe, fibrozni plaki in napredovale spremembe. **Maščobne lehe** so prva, še reverzibilna pojavna oblika ateroskleroze. Mikroskopsko so zgrajene iz gladkih mišičnih celic in makrofagov, napolnjenih z lipidi. **Fibrozni plaki** so najbolj značilna morfološka sprememba zgodnje ateroskleroze. Povzročajo zožitev svetline in so temelj posledične klinične simptomatike. Histološko je vidna sredica iz ekstracelularnih lipidov in nekrotičnega celičnega debrisa, okoli nje pa je veliko število gladkih mišičnih celic, makrofagov in kolagena. **Napredovale spremembe** so kalcificirani fibrozni plaki z različnimi stopnjami nekroz, tromboz in ulceracij. Z napredovanjem procesa lahko pride tudi do rupture intime, krvavitev in nastanka arterijskih trombov in embolov (4).

Omenjeni procesi povzročijo dve temeljni in najbolj jasno vidni morfološki spremembi na žilah: zožitev svetline in zadebelitev žilne stene. Tudi metode za odkrivanje ateroskleroze temeljijo na teh dveh dejavnikih. Ker ateroskleroza neposredno prizadene steno arterije in se te spremembe nato šele sekundarno odražajo v zoženju svetline, so metode, ki temeljijo na merjenju debeline stene, bolj natančne za zgodnje odkrivanje ateroskleroze, kot metode, ki merijo zožitev lumna (5). Najpogosteje uporabljene tehnike za odkrivanje ateroskleroze so: angiografija, ultrazvok (Doppler, B-mode, intraarterijski ultrazvok), magnetna resonanca in računalniška tomografija (6). Za diagnostiko sprememb na karotidnih arterijah se uporabljajo predvsem angiografija, Doppler in B-mode ultrazvok (UZ). Prvi dve metodi temeljita na merjenju zoženja lumna, medtem ko B-mode UZ omogoča neposredno merjenje debeline žilne stene. Zato lahko B-mode UZ uporabljamo za zgodnje odkrivanje ateroskleroze. Doppler UZ in angiografija pa sta uporabna predvsem za napoved nadaljnjega poteka bolezni in njene klinične simptomatike (7). Prednosti B-mode UZ pred angiografijo so v neinvazivnosti postopka, enostavnosti izvedbi in možnosti večkratnega ponavljanja meritev pri velikem številu preiskovancev.

Z B-mode UZ lahko prikažemo vse tri osnovne tipe aterosklerotičnih sprememb. Maščobne lehe izgledajo ultrazvočno kot zadebelitev kompleksa intima-medija, s slabo eho-

genimi odboji v obliki sivih trakov ob svetlini žile. Ti trakovi so ozki in ne puščajo akustičnih senc. Fibrozni plaki se pri ultrazvočni preiskavi lahko prikažejo različno glede na ehogenost, temeljna značilnost napredovale spremembe pa je prisotnost kalcija, ki se opaža kot hiperehogeno struktura z značilno akustično senco. B-mode UZ preiskava omogoča oceno debeline stene arterij le od določene debeline, zato pri ocenjevanju debeline intime upoštevamo debelino kompleksa intima-medija. Tako lahko natančno izmerimo in primerjamo debelino arterijske stene na različnih segmentih arterije (8).

Z B-mode UZ, ki omogoča odkrivanje zgodnjih aterosklerotičnih sprememb in ocenjevanje stopnje aterogenosti posameznih dejavnikov tveganja za razvoj kardiovaskularnih bolezni, ni moč preiskovati koronarnih arterij, preiskavi pa so lahko dostopne karotidne arterije. Če so pri aterosklerotičnem procesu karotidnih arterij udeleženi enaki dejavniki kot pri koronarnih arterijah in nekatere raziskave govorijo za to (2, 9), potem bi bile karotidne arterije lahko zrcalo dogajanja na koronarnih arterijah in bi lahko posredno s proučevanjem sprememb na njih določili verjetnost sprememb na koronarnem ožiliju pri preiskovancih, ki so še brez simptomov koronarne bolezni, imajo pa aterogene dejavnike tveganja.

Ugotavljali smo morebitno razliko v ultrazvočnem izvidu karotidnih arterij, pri čemer nas je zanimala debelina intime in medije na različnih segmentih teh arterij, med bolniki, ki so že preboleli srčni infarkt, in posamezniki brez kliničnih znakov koronarne bolezni.

Hkrati smo proučili vpliv koronarnih dejavnikov tveganja na debelino kompleksa intima-medija karotidnih arterij, pri čemer smo poleg nedvomnih koronarnih dejavnikov, kot so koncentracija lipidov v serumu, arterijska hipertenzija in kajenje, zasledovali tudi vpliv manj jasnih dejavnikov, kot so serumska koncentracija železa, transferina in fibrinolitični parametri krvi.

Preiskovanci in metode

Preiskovanci

V raziskavi je sodelovalo 60 prostovoljcev moškega spola, starih od 30 do 50 let. V študijsko skupino smo vključili bolnike, ki so preboleli srčni infarkt in so bili zaradi tega ambulantno rehabilitirani na Interni kliniki Trnovo Kliničnega centra v Ljubljani. Izmed vseh bolnikov, ki so opravili ambulantno rehabilitacijo v obdobju 1985–94, smo izbrali glede na starost 30 bolnikov. Srčni infarkt so preboleli v obdobju od 1 do 9 let pred vključitvijo v raziskavo. Diagnoza srčnega infarkta je bila postavljena na osnovi anamnestičnih podatkov, značilnega elektrokardiografskega izvida in encimskih sprememb v krvi. Preiskovanci v študijski skupini so prejeli več vrst zdravil (tabela 1).

V kontrolno skupino smo vključili 30 zdravih prostovoljcev, ki so po starosti ustrezali bolnikom. Merilo za vključitev v kontrolno skupino je odsotnost simptomov koronarne bolezni pri bolniku v času raziskave ali v preteklosti. Prostovoljce smo zbrali deloma na Zavodu za transfuzijo krvi med krvodajalsko akcijo, deloma pa so bili to uslužbenci Interne klinike Trnovo. Nihče od preiskovancev v tej skupini ni dobival nobenih zdravil.

Pri raziskavi smo upoštevali načela Helsinško-tokijske deklaracije in Kodeks etike slovenskih zdravnikov. Vsi preiskovanci so bili seznanjeni s potekom raziskave in so se prostovoljno odločili za sodelovanje v raziskavi. Zbrali smo pisna privoljenja vseh preiskovancev. Raziskavo je odobrila Republiška komisija za medicinsko-etična vprašanja.

Tabela 1. Pogostost zdravljenja z različnimi zdravili v študijski skupini.

Vrsta zdravila	Število bolnikov (%)
Antihipertenzivi	7 (23)
Beta adrenergični blokatorji	18 (60)
Inhibitorji agregacije trombocitov	29 (97)
Blokatorji kalcijevih kanalov	4 (13)
Lipolitiki	6 (20)

Klinični pregled

Pri preiskovancih smo opravili natančno družinsko anamnezo, usmerjeno osebno anamnezo ter fizikalni pregled po standardnem vprašalniku in protokolu. Pri družinski anamnezi smo zbrali podatke o pojavljanju naslednjih bolezni pri starših: sladkorni bolezn, arterijski hipertenziji, hiperholesterolemiji, možganski kapi, periferni arterijski okluzijski bolezn in srčnem infarktu. Pri usmerjeni osebni anamezi smo zbrali podatke o sladkorni bolezn, arterijski hipertenziji, hiperholesterolemiji, periferni arterijski okluzijski bolezn ter o telesni aktivnosti in razvadah. Preiskovance smo opredelili kot redno telesno aktivne, če so se ukvarjali s telesno aktivnostjo več kot trikrat tedensko po pol ure, ostale pa kot telesno neaktivne. Glede na anamnestične podatke o kajenju smo razdelili preiskovance na sedanje kadilce, bivše kadilce in tiste, ki niso nikoli kadili. Pri fizikalnem pregledu smo preiskovancem izmerili telesno višino in težo ter krvni tlak na brahialni arteriji z živosrebrnim manometrom. Izračunali smo indeks telesne mase (BMI) po enačbi:

$$\text{BMI} = \text{telesna teža (g)} / \text{telesna višina}^2 \text{ (cm}^2\text{)}$$

Odvzemi krvi

Vzorke krvi smo jemali iz kubitalne vene po 12 urah teščega stanja in 15 minutah počitka v sedečem položaju med 7. in 9. uro zjutraj. Nihče od preiskovancev v času odvzema krvi ni preboleval akutne okužbe ali opravljal težjega fizičnega dela dan pred tem. Kri smo jemali brez preveze nadlahti oziroma smo nadlaht prevezali za največ eno minuto. Odvzeli smo 10 ml krvi za biokemične preiskave v epruveto brez antikoagulantnega sredstva, 4,5 ml krvi v epruveto z Na-citratom za teste fibrinolize in 5 ml krvi v epruveto z nakisanim Na-citratom za določitev tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA).

Vzorke krvi za teste 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 ependorf, jo zamrznili v tekočem dušiku in jo hranili do laboratorijske analize v zmrzovalniku pri -70 °C.

Laboratorijske metode

Koncentracijo celotnega holesterola smo določali z encimsko metodo (10). Holesterolne estre v vzorcih in standardu smo hidrolizirali s holesterol esterazo v prosti holesterol in proste maščobne kisline. Nastali prosti holesterol smo oksidirali v prisotnosti kisika. Pri tem je nastajal vodikov peroksid, ki je ob prisotnosti katalaze in fenola oksidiral 4-aminofenazon v obarvano spojino. Merili smo njeno absorbnost pri 500 nm. Koncentracijo holesterola smo določali na podlagi razmerja med absorpcijo vzorca in standarda.

Koncentracijo HDL-holesterola smo določali s fosforvolframatom magnezijevo metodo. Najprej smo z obarjalnim reagentom, ki vsebuje raztopino fosforvolframove kisline in magnezijevega klorida, oborili vse apoproteine, ki vsebujejo apoprotein B. Nato smo v supernatantu določili celotni holesterol z encimsko metodo, ki je opisana za določanje celotnega holesterola.

Koncentracijo LDL-holesterola smo določali posredno z izračunom po Friedewaldovi enačbi, pri kateri so koncentracije posameznih lipidov izražene v mmol/l:

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

Koncentracijo trigliceridov smo določali z encimsko metodo (11). Trigliceridi v vzorcih in standardu so se z lipazo hidrolizirali v prosti glicerol in proste maščobne kisline. Dobljeni prosti glicerol se je ob prisotnosti ATP in glicerol kinaze pretvoril v glicerol-3 fosfat, ta pa se je z glicerol-fosfat-kinazo ob prisotnosti kisika oksidiral v dihidroksiacetofosfat. Pri tem je nastajal vodikov peroksid. Nadaljnji postopek je potekal enako in na istih aparataturah kot pri določanju koncentracije celotnega holesterola.

Krvni sladkor smo določali s heksokinaznim testom.

Koncentracijo železa v serumu smo določali s pomočjo metode s ferozinom (12). Zaradi delovanja gvanidina se je železo sproščalo s transferina, askorbinska kislina pa ga je pretvarja v fero-obliko. Reducirano železo je tvorilo s ferozinom obarvan kompleks, katerega koncentracijo smo merili fotometrično.

Koncentracijo transferina smo določali s TIBC metodo (13). Celotno kapaciteto vezanja železa določamo po zasičenju transferina z raztopino železa in po adsorpciji prebitka železa na magnezijev hidroksikarbonat.

Koncentracijo antigena tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA) smo določali z imunsko-encimskim testom ELISA z dvojnimi protitelesi z reagenti Biopool (Umea, Švedska) (14–16). Vzorce plazme smo inkubirali na mikrolitskih 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 iz plazme. Koncentracijo t-PA smo odčitali z umeritveno krivuljo, ki smo jo določili s pomočjo standardnih raztopin t-PA.

Aktivnost t-PA smo določali spektrofotometrično z reagenti Spectrolyse TM/fibrin (Biopool, Umea, Švedska). Merili smo jo posredno preko aktivnosti plazmina na kromoge-

ni substrat ob prisotnosti fibrina (17, 18). Porast absorpcije pri 405 nm je bil premo sorazmeren količini t-PA v vzorcu plazme. Aktivnost t-PA smo odčitali z umeritvene krivulje, pripravljene s standardnimi vzorci t-PA.

Koncentracijo antigena inhibitorja tkivnega aktivatorja plazminogena (PAI-1) smo določali z encimsko-imunskim testom (ELISA) z dvojnimi protitelesi z reagenti Biopool (Umea, Švedska) (19, 20). Postopek določanja antigena PAI je bil enak kot pri določanju antigena t-PA.

Aktivnost PAI-1 smo določali z dvostopenjskim encimskim testom z reagenti Spectrolyse TM/pL (Biopool, Umea, Švedska) (21–23). Plazmo smo titrirali z naraščajočimi koncentracijami t-PA. Preostalo aktivnost t-PA smo merili s kromogenim substratom tako kot 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 določali s postopkom po Buckellu (24). Plazmo smo razredčili in nakisali z očetno kislino do pH 5. Tako smo oborili evglobuline, ki vsebujejo sestavine fibrinolitičnega sistema, razen inhibitorjev. Po centrifugiranju so v odlitem supernatantu ostali inhibitorji fibrinolize. Nato smo dobljene evglobuline raztopili v pufru in koagulirali ter izmerili čas, ki je bil potreben, da se je strdek raztopil. Rezultate smo izražali v minutah.

Koncentracijo fibrinogena smo določili z aparatom Fibrintimer (Behring, Marburg/Lahn) po prirejeni Claussovi metodi (25). Razredčeno citratno plazmo smo koagulirali s trombinom in merili čas strjevanja, ter nato vrednosti fibrina odčitali iz umeritvene tabele.

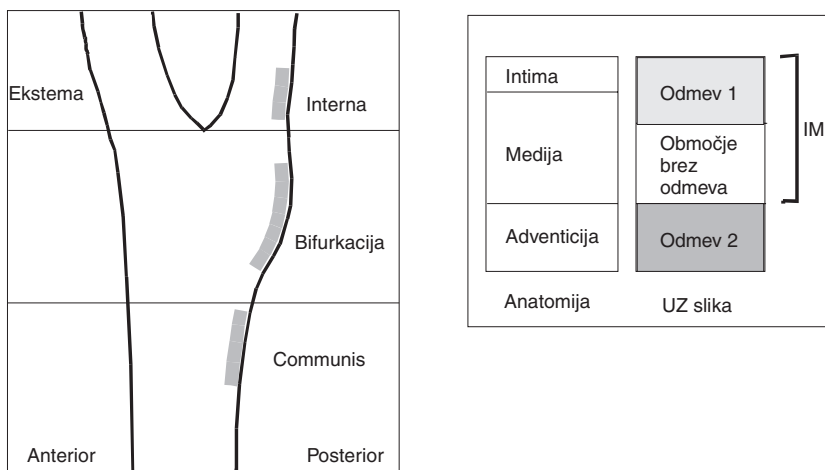
Ultrazvočna preiskava

Pri vseh preiskovancih smo opravili B-mode ultrazvočno preiskavo z 10 MHz sondo na aparatu Disonics VST. Meritve so potekale po načelu dvojnega slepega poskusa. Merili smo debelino kompleksa intima-medija na zadnji steni skupne karotidne arterije, karotidnega razcepišča in notranje karotidne arterije (slika 1). Kot kompleks intima-medija smo opredelili razdaljo med proksimalnim delom prvega odmeva in proksimalnim delom drugega odmeva. Na vsakem mestu smo izmerili debelino trikrat in izračunali povprečje treh meritev. Debelino kompleksa intima-medija smo prikazali kot srednjo vrednost meritev na vseh merjenih mestih na levi in desni strani.

Ugotavljali smo tudi prisotnost plakov, pri čemer smo kot plak definirali vsako kalcinirano zadebelitev kompleksa intima-medija, ki je dajala na ultrazvočni sliki značilno akustično senco.

Statistične metode

Dejavnike, ki se razporejajo normalno, smo izražali s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom, dejavnike, ki se ne razporejajo normalno pa z mediano in razponom med prvim in tretjim kvartilom. Za testiranje razlik med skupinami smo uporabili t-test za ne-parne vrednosti pri dejavnikih z normalno distribucijo, Mann-Whitneyjev U-test pri dejavnikih z nenormalno distribucijo in χ^2 -test za atributivne spremenljivke. Povezanost med posameznimi dejavniki smo ocenjevali s Pearsonovim korelacijskim koeficientom pri de-



Slika 1. Shematski prikaz a) mest merjenja debeline kompleksa intima-medija, b) morfologije in ultrazvočne žilne stene ter prikaz merjenega kompleksa intima-medija (IM).

javnih z normalno distribucijo, Spearmanovim korelacijskim koeficientom pri dejavnih z nenormalno distribucijo in z multiplo regresijsko analizo. Rezultate smo analizirali s pomočjo statističnega paketa Statistica (Stat Soft Inc. 1993, ZDA).

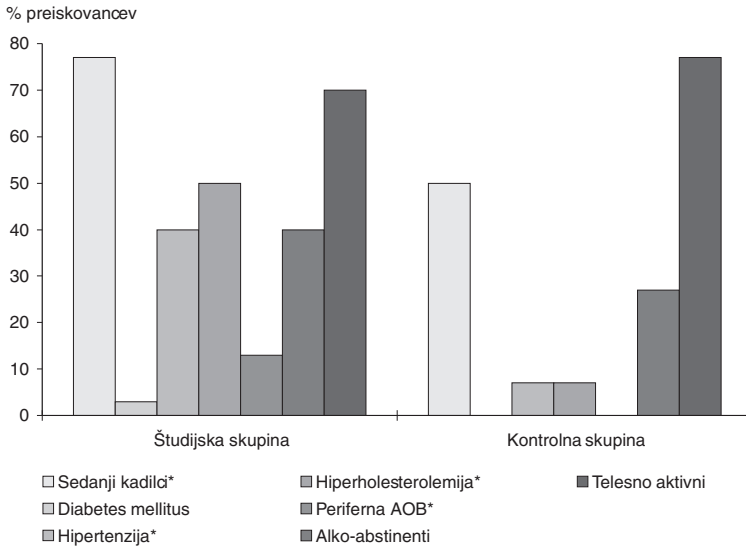
Rezultati

Klinične značilnosti preiskovancev

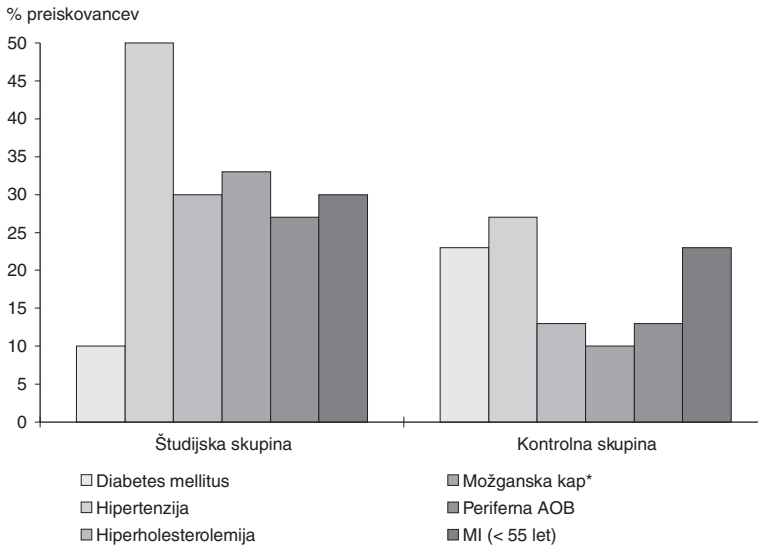
Klinične značilnosti preiskovancev v študijski in kontrolni skupini prikazuje tabela 2. Med preiskovanci v študijski skupini je bilo statistično pomembno več kadilcev, pomembno več jih je imelo arterijsko hipertenzijo, periferno arterijsko okluzijsko bolezen in hiperholesterolemijo (slika 2). Med starši preiskovancev v študijski skupini je bil pomembno večji delež tistih, ki so preboleli možgansko kap, medtem ko v pogostosti drugih aterosklerotičnih bolezni in dejavnikov tveganja v družinski anamnezi ni bilo razlik (slika 3).

Tabela 2. Klinične značilnosti preiskovancev v študijski in kontrolni skupini. Razlike med vrednostmi prikazanih parametrov v obeh skupinah niso statistično značilne ($p > 0,05$). Povp – povprečna vrednost, SD – standardni odklon, Min – najmanjša vrednost, Max – največja vrednost, BMI – indeks telesne mase (body mass index).

Spremenljivka	Študijska skupina				Kontrolna skupina			
	Povp	SD	Min	Max	Povp	SD	Min	Max
Starost (leta)	46,03	3,79	37	50	43,50	5,88	32	51
Sistolični tlak (mmHg)	128,83	13,63	110	160	126,50	9,39	110	150
Diastolični tlak (mmHg)	87,20	11,24	70	120	83,80	5,93	70	95
BMI (g/cm ²)	2,77	0,35	2,17	3,79	2,70	0,46	2,16	4,24



Slika 2. Pogostnost koronarnih dejavnikov tveganja v osebni anamnezi pri preiskovancih v študijski in kontrolni skupini. * – statistično pomembna razlika med skupinama ($p < 0,05$), AOB = arterijska okluzijska bolezen.



Slika 3. Pogostnost koronarnih dejavnikov tveganja in srčno-žilnih boleznih pri starejših preiskovancih v študijski in kontrolni skupini. * – statistično pomembna razlika med skupinama ($p < 0,05$), AOB = arterijska okluzijska bolezen, MI = miokardni infarkt.

Biokemične preiskave krvi

Rezultate biokemičnih preiskav krvi v obeh skupinah preiskovancev prikazuje tabela 3. Preiskovanci v študijski skupini so imeli statistično pomembno manjše vrednosti HDL-holesterola, ni pa bilo razlik v glukozi, celotnem holesterolu, LDL-holesterolu, trigliceridih, fibrinogenu, železu in transferinu.

Tabela 3. Rezultati biokemičnih preiskav krvi v študijski in kontrolni skupini. Parametri, označeni z * so statistično značilno različni ($p < 0,05$). Povp – povprečna vrednost, SD – standardni odklon, Min – najmanjša vrednost, Max – največja vrednost, HDL – lipoprotein velike gostote, LDL – lipoprotein majhne gostote.

Spremenljivka	Študijska skupina				Kontrolna skupina				p
	Povp	SD	Min	Max	Povp	SD	Min	Max	
Glukoza (mmol/l)	5,29	0,68	4,4	7,4	5,48	0,76	3,6	7,0	0,305
Holesterol (mmol/l)	5,99	1,28	3,5	8,8	6,30	1,44	4,2	9,8	0,383
LDL-hol. (mmol/l)	3,98	1,12	1,7	6,4	4,10	1,07	2,6	6,3	0,694
HDL-hol. (mmol/l)	1,11	0,24	0,6	1,7	1,34	0,39	0,6	2,5	0,006*
Trigliceridi (mmol/l)	2,02	0,87	1,0	4,0	1,97	1,69	0,5	7,1	0,878
Fe (mmol/l)	19,95	5,74	11,5	33,0	18,97	5,51	9,0	30,7	0,518
Transferin (mmol/l)	62,43	7,24	48,3	75,3	64,31	9,67	42,8	82,3	0,420
Fibrinogen (g/l)	3,07	0,39	2,31	3,76	2,99	0,50	2,11	4,07	0,500

Fibrinolitični parametri

Rezultate fibrinolitičnih parametrov pri preiskovancih v obeh skupinah prikazuje tabela 4. Skupini sta se razlikovali le po statistično pomembno večjih vrednostih antigena t-PA pri preiskovancih v študijski skupini.

Tabela 4. Fibrinolitični parametri pri študijski in kontrolni skupini: mediana, spodnja in zgornja kvartila. Parametri, označeni z * so med skupinama statistično značilno različni ($p < 0,05$). Sp. K. – spodnja kvartila, Zg. K. – spodnja kvartila, t-PA – tkivni aktivator plazminogena, PAI – inhibitor aktivatorja plazminogena.

Spremenljivka	Študijska skupina			Kontrolna skupina			p
	Mediana	Sp. K.	Zg. K.	Mediana	Sp. K.	Zg. K.	
Aktivnost t-PA (IU/ml)	0,79	0,54	1,06	1,05	0,58	1,44	0,092
Antigen t-PA (ng/ml)	9,50	7,90	12,00	8,0	5,60	8,95	0,016*
Aktivnost PAI (IU/ml)	15,40	11,20	29,90	12,50	8,90	23,35	0,436
Antigen PAI (ng/ml)	23,00	15,30	34,20	20,40	10,40	34,70	0,721
Euglobulinska liza (min)	318	276	360	300	250	354	0,369

Debelina kompleksa intima-medija

Rezultati ultrazvočnih meritev debeline kompleksa intima-medija karotidnih arterij ter prisotnost plakov so prikazani v tabeli 5 in na slikah 4 in 5. Preiskovanci v študijski skupini

ni so imeli statistično pomembno večjo debelino kompleksa intima-medija na vseh segmentih karotidnih arterij in pomembno večje število plakov.

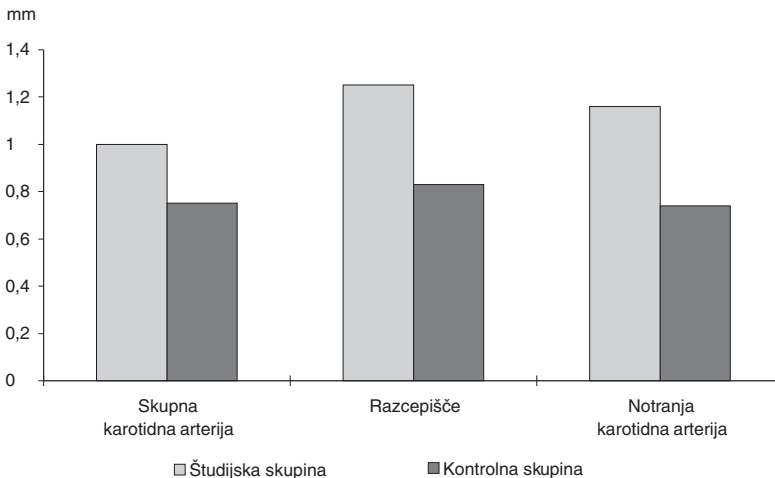
Tabela 5. Debelina kompleksa intima-medija pri študijski in kontrolni skupini. Povp = povprečna vrednost, SD – standardni odklon, Min – najmanjša vrednost, Max – največja vrednost.

Spremenljivka	Študijska skupina				Kontrolna skupina			
	Povp	SD	Min	Max	Povp	SD	Min	Max
Skupna karotidna arterija	1,00	0,18	0,70	1,42	0,75	0,12	0,48	0,98
Razcepišče karotidne arterije	1,25	0,25	0,80	1,73	0,83	0,12	0,55	1,15
Notranja karotidna arterija	1,17	0,24	0,70	1,65	0,74	0,09	0,53	0,90

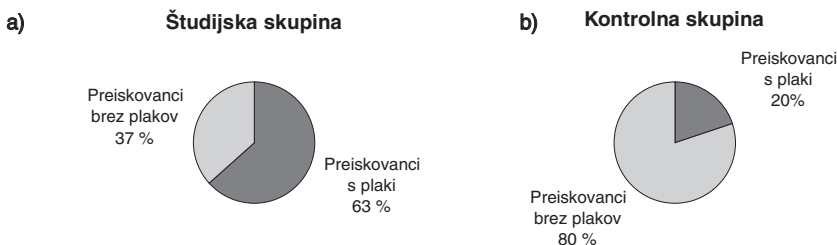
Medsebojna povezanost debeline kompleksa intima-medija s kliničnimi, biokemičnimi in fibrinolitičnimi parametri

Rezultate univariantne regresijske analize prikazuje tabela 6. Med kliničnimi dejavniki smo našli statistično pomembno pozitivno povezanost debeline kompleksa intima-medija le s sedanjim kajenjem v osebni anamnezi in diastoličnim tlakom (slika 6), ne pa s sistoličnim krvnim tlakom, starostjo, BMI, telesno aktivnostjo in pozitivno družinsko anamnezo (prisotnost kardiovaskularnih bolezni v družini).

Med biokemičnimi dejavniki smo našli pomembno obratno povezanost debeline kompleksa intima-medija v razcepišču in interni karotidni arteriji (ne pa v skupni karotidni arteriji) s HDL-holesterolom (slika 7). Ostali preiskovani dejavniki (glukoza, holesterol, LDL-holesterol, trigliceridi, železo in transferin) niso bili pomembno povezani z debelino kompleksa intima-medija.



Slika 4. Debelina kompleksa intima-medija pri študijski in kontrolni skupini. V vseh treh vrednostih se skupini statistično značilno razlikujeta ($p < 0,00001$).

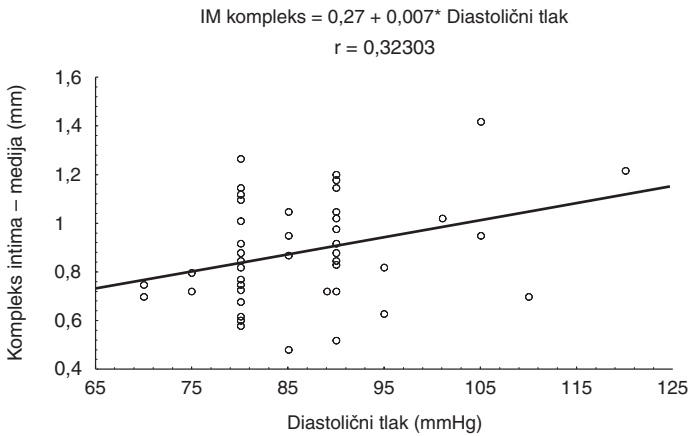


Slika 5. Prisotnost plakov. a – študijska, b – kontrolna skupina. Skupini se statistično značilno razlikujeta glede prisotnosti plakov pri preiskovancih ($p < 0,0007$).

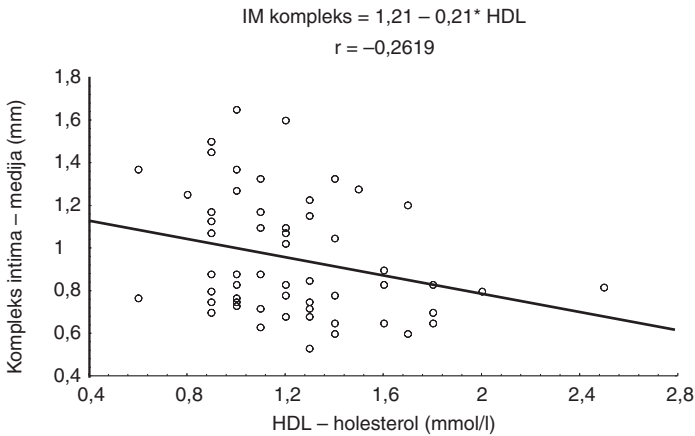
Med fibrinolitičnimi parametri smo našli pomembno obratno povezanost debeline kompleksa intima-medija skupne karotidne arterije, ne pa tudi v bifurkaciji in notranji karotidni arteriji, z aktivnostjo t-PA ($r = -0,34$) (slika 8) in pozitivno povezanost z aktivnostjo PAI ($r = 0,29$) (slika 9).

Tabela 6. Univariantna povezanost med debelino kompleksa intima-medija in različnimi dejavniki tveganja (Pearsonov ali Spearmanov korelacijski koeficient r) pri vseh preiskovancih skupaj. a. – arterija, BMI – indeks telesne mase. Pri vseh prikazanih parametrih je $p < 0,05$. Parametri, označeni z *, so statistično značilno povezani z debelino kompleksa intima – medija, HDL – lipoprotein velike gostote, LDL – lipoprotein majhne gostote, t-PA – tkivni aktivator plazminogena, PAI – inhibitor aktivatorja plazminogena.

Parameter	Skupna karotidna a. (r)	Razcepišče (r)	Notranja karotidna a. (r)
Starost	0,17	0,24	0,12
BMI	0,24	0,12	0,23
Sistolični pritisk	0,13	0,14	0,11
Diastolični pritisk	0,32*	0,17	0,20
Kajenje	0,16	0,27*	0,23
Alkohol	0,01	0,12	0,11
Telesna aktivnost	-0,15	-0,12	-0,15
Pozitivna druž. anam.	0,02	0,00	0,13
Krvni sladkor	0,08	0,02	0,05
Celokupni holesterol	0,01	0,05	0,01
LDL-holesterol	0,06	0,10	0,05
HDL-holesterol	-0,20	-0,26*	-0,26*
Trigliceridi	0,01	0,10	0,06
Železo	0,16	0,10	0,06
Transferin	-0,04	-0,05	-0,09
t-PA antigen	0,27	0,25	0,21
t-PA aktivnost	-0,34*	-0,06	-0,26
PAI antigen	0,25	0,06	0,21
PAI aktivnost	0,29*	0,06	0,21
Fibrinogen	0,14	0,02	0,13
Euglobulinska liza	0,25	0,22	0,10



Slika 6. Povezanost debeline kompleksa intima-medija (IM) skupne karotidne arterije z diastoličnim tlakom.

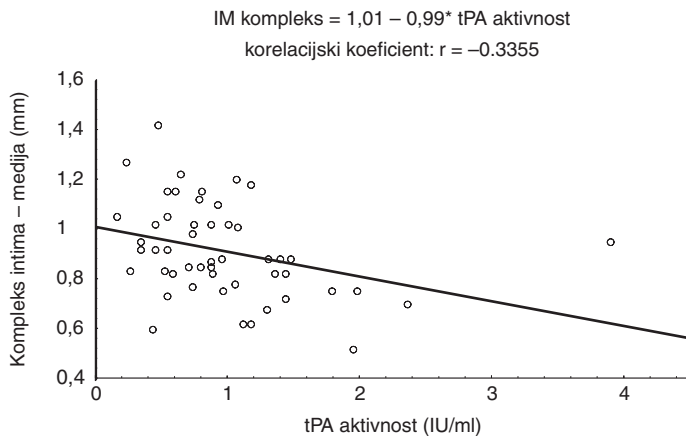


Slika 7. Povezanost med HDL-holesterolom in debelino kompleksa intima-medija (IM) v notranji karotidni arteriji.

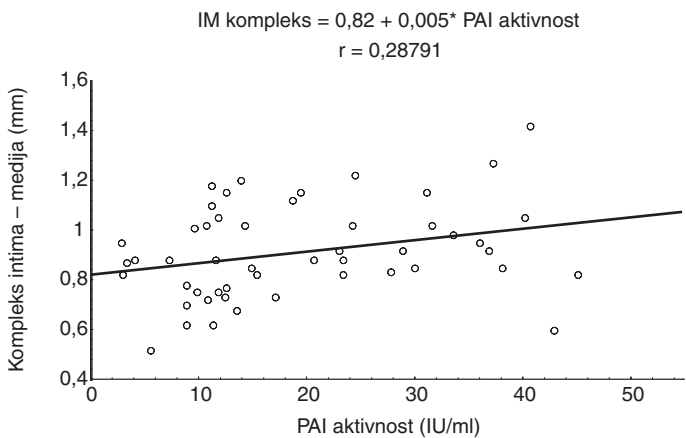
Multipla regresija

V multiplem regresijskem modelu s povprečno debelino kompleksa intime-medije v različnih segmentih karotidne arterije kot odvisno spremenljivko in vsemi spremenljivkami, ki so kazale statistično pomembno univariatno povezanost z debelino intime in medije (to so bili diastolični tlak, HDL-holesterol, aktivnost t-PA in aktivnost PAI) kot neodvisnimi spremenljivkami, smo ugotovili najmočnejši vpliv diastoličnega tlaka in t-PA aktivnosti.

Ko pa smo poleg naštetih v regresijski model vnesli kot neodvisno spremenljivko še skupino preiskovancev, je ta postala najpomembnejši določitelj debeline kompleksa intima-



Slika 8. Povezanost aktivnosti t-PA z debelino kompleksa intima-medija (IM) v skupni karotidni arteriji.



Slika 9. Povezanost aktivnosti PAI z debelino kompleksa intima-medija (IM) v skupni karotidni arteriji.

medija v vseh segmentih karotidnih arterij (vrednosti beta v skupni karotidni arteriji 0,642860, v bifurkaciji 0,727156, v interni pa 0,771971; $p < 0,00001$).

Razprava

V naši raziskavi smo na karotidnih arterijah preučevali zgodnje morfološke spremembe, ki jih povzročata aterosklerotični proces. Z B-mode ultrazvočno metodo smo merili kompleks intima-medija, kajti debelina tega kompleksa naj bi odražala začetne aterosklerotične spremembe (2). Karotidne arterije smo izbrali, ker jih lahko preučujemo z ultrazvočno metodo, ki je neinvazivna, nenevarna in lahko ponovljiva in se zato vse bolj uveljavlja v te namene (2, 26).

Tabela 7. Rezultati multiple regresijske analize. Statistično pomembni rezultati so označeni z *: art. – arterija, HDL – lipoprotein velike gostote, t-PA – tkivni aktivator plazminogena, PAI – inhibitor aktivatorja plazminogena.

Odvisna spremenljivka	Neodvisna spremenljivka	β	p	R ²
Skupna karotidna art.	Diastolični tlak	0,4447*	0,0171	0,3077
	Aktivnost t-PA	-0,4443*	0,0114	
	Aktivnost PAI	0,0793	0,6366	
	HDL-holesterol	-0,1893	0,1334	
Razcepišče karotidne art.	Diastolični tlak	0,1537	0,3320	0,2057
	Aktivnost t-PA	-0,0018	0,9925	
	Aktivnost PAI	0,0145	0,9390	
	HDL-holesterol	-0,2630	0,0596	
Notranja karotidna art.	Diastolični tlak	0,2704	0,0942	0,2402
	Aktivnost t-PA	-0,2634	0,1774	
	Aktivnost PAI	0,0333	0,8772	
	HDL-holesterol	-0,2610	0,0629	

V raziskavo smo vključili bolnike z znaki prezgodnje koronarne bolezni srca, saj so srčni infarkt vsi doživeli pred 50. letom starosti. Želeli smo namreč ugotoviti, ali že pri razmeroma mladih ljudeh obstajajo razlike v debelini kompleksa intima-medija med bolniki s klinično izraženo koronarno boleznijo in med preiskovanci brez simptomov koronarne bolezni. Poleg tega smo skušali ugotoviti, kakšen je vpliv manj znanih koronarnih dejavnikov tveganja (koncentracije serumskega železa, transferina, fibrinogena in fibrinolitičnih dejavnikov) na debelino kompleksa intima-medija v karotidnih arterijah. V dosedanjih raziskavah je vloga naštetih dejavnikov manj natančno opisana (27).

Naša raziskava je pokazala, da imajo mladi bolniki s prebolelim srčnim infarktom pomembno večjo debelino kompleksa intima-medija kot enako stari posamezniki brez simptomov koronarne bolezni. Razlika je bila prisotna na vseh segmentih karotidnih arterij, ki smo jih proučevali. Tako pri bolnikih kot pri zdravih je bila debelina kompleksa največja v področju razcepišča karotidne arterije, tu je bil razpon debeline kompleksa pri bolnikih s koronarno boleznijo od 0,8 do 1,73 mm, pri zdravih pa od 0,55 do 1,15 mm, povprečna debelina pa je bila pri bolnikih s koronarno boleznijo za 51 % večja kot pri zdravih preiskovancih. Med bolniki s koronarno boleznijo je bil tudi pomembno večji delež takih, pri katerih smo našli v karotidnih arterijah aterosklerotične plake; pri skupini bolnikov s koronarno boleznijo je bilo takih preiskovancev 63 %, pri skupini zdravih pa 20 %. Rezultati naše študije kažejo, da imajo mladi bolniki s koronarno boleznijo izrazitejšo zgodnje morfološke aterosklerotične spremembe na karotidnih arterijah kot preiskovanci brez simptomov koronarne bolezni. Podobni so tudi rezultati drugih raziskav, ki ugotavljajo tudi do 1,5-krat večjo povprečno debelino kompleksa intima-medija karotidnih arterij pri bolnikih s koronarno boleznijo v primerjavi s posamezniki brez simptomov (9, 28). Zato si morda lahko obetamo, da nam bo ocenjevanje teh sprememb na karotidnih arterijah omogočalo posredno sklepanje o dogajanju na koronarnem ožilju.

V naši raziskavi smo ocenjevali tudi vpliv klasičnih in manj znanih dejavnikov tveganja na debelino kompleksa intima-medija. Koronarni dejavniki tveganja so bili prisotni pri obeh skupinah, vendar v večjem obsegu pri bolnikih s koronarno boleznijo. Anamnestični podatki so pri njih odkrili večjo pogostost kajenja, hipertenzije in hiperholesterolemije, vendar so bili v času raziskave v glavnem ti dejavniki odstranjeni bodisi s spremenjenim načinom življenja ali zdravili, tako da se skupini nista razlikovali po višini sistoličnega in diastoličnega krvnega tlaka in po koncentraciji celotnega in LDL-holesterola. Skupini se nista razlikovali po pogostosti sladkorne bolezni, stopnji običajne telesne aktivnosti in indeksu telesne teže. Med maščobnimi dejavniki smo našli razlike le v koncentraciji HDL-holesterola, ki je bil pomembno manjši pri bolnikih s koronarno boleznijo. Med fibrinolitičnimi parametri smo našli pomembno večje vrednosti t-PA antigena, o čemer so poročali tudi drugi avtorji (29–31), ni pa bilo razlik v koncentraciji fibrinogena, ki naj bi bil enako pomemben dejavnik tveganja kot holesterol. Prav tako ni bilo razlik v koncentraciji serumskega železa in transferina, čeprav poročajo, da so visoke koncentracije železa in nizke koncentracije transferina dejavnik tveganja za srčni infarkt (32).

Z univariantno regresijsko analizo smo ugotovili, da je debelina kompleksa intima-medija pri moških, starih med 30 in 50 let tem večja, čim večja sta diastolični krvni tlak in aktivnost PAI, in manjša, čim večji sta koncentracija HDL-holesterola in aktivnost t-PA. Nismo pa našli vpliva starosti, sistoličnega krvnega tlaka, koncentracije celotnega in LDL-holesterola, krvnega sladkorja, debelosti, koncentracije fibrinogena, koncentracije serumskega železa in transferina.

Povezavo med arterijsko hipertenzijo in debelino žilne stene poskuša razložiti več teorij. Kot pomembni dejavniki v teh teorijah so omenjeni predvsem neposredni mehanski vpliv zvišanega krvnega tlaka, strižne sile in vloga rastnih faktorjev (33). Mnoge dosedanje raziskave, ki so temeljile na poskusih na živalih ali na patoanatomskih izsledkih pri ljudeh, so dokazale zadebelitev arterijske stene pri preiskovancih s hipertenzijo (34, 35). Tudi študije z B-mode UZ tehniko so pokazale bistveno večjo debelino kompleksa intima-medija pri preiskovancih s hipertenzijo v primerjavi s kontrolno skupino ($p < 0,001$) (33). Domnevamo, da je bila v naši skupini preiskovancev močnejša povezava verjetno zakrita, saj je bil razpon vrednosti sistoličnega in diastoličnega krvnega tlaka razmeroma majhen. Kar 23 % preiskovancev iz študijske skupine je namreč jemalo antihipertenzivna zdravila.

V okviru preiskovanega starostnega razpona (30–50 let), nismo našli povezave med starostjo in debelino kompleksa intima-medija. Za razliko od naše študije so mnogi raziskovalci ugotovili pomembno korelacijo med starostjo in debelino žilne stene (3, 36, 37), kar je pričakovano, saj se z naraščajočo starostjo kopičijo škodljivi vplivi koronarnih dejavnikov tveganja na steno žil (3). V večini drugih raziskav pa je bil interval starosti preiskovancev bistveno širši, raziskave so natančneje obravnavale predvsem preiskovance, starejše od 50 let.

Eden od možnih dejavnikov tveganja za nastanek sprememb na žilni steni je tudi stopnja prehranjenosti, ki smo jo v naši raziskavi opredelili na podlagi indeksa telesne ma-

se. Ta se ni izkazal kot pomemben dejavnik, saj so vrednosti v kontrolni in študijski skupini dokaj visoke in se med seboj bistveno ne razlikujejo.

Med že dobro poznane dejavnike tveganja v patogenezi ateroskleroze spadajo koncentracije celotnega, LDL- in HDL-holesterola v krvi. Večina raziskovalcev je ugotovila povezanost med navedenimi dejavniki in aterogenezo (38–40), pri čemer naj bi bil predvsem pomemben HDL-holesterol (33, 41). To se je pokazalo tudi v naši raziskavi, ki je pokazala močno obratno povezavo med koncentracijo HDL-holesterola v krvi in debelino kompleksa intima-medija v predelu razcepišča in notranje karotidne arterije. Za razliko od drugih raziskav (38–40), pa nismo našli povezave med koncentracijami celotnega in LDL-holesterola in zgodnjimi morfološki spremembami v karotidnih arterijah, kar si lahko razlagamo z majhnim razponom vrednosti teh dveh dejavnikov pri obeh skupinah. Tudi v skupini koronarnih bolnikov so bile vrednosti celotnega holesterola in LDL-holesterola pri večini v normalnem območju, kar je bilo posledica zdravljenja povišanih koncentracij lipidov pri večjem številu preiskovancev študijske skupine.

Koncentracija glukoze v krvi še ni natančno opredeljena kot dejavnik tveganja za nastanek ateroskleroze. Nekaj raziskav je pokazalo zvezo med sladkorno boleznijo in spremembami na žilni steni (3, 42), druge pa tako povezavo zanikajo (43, 44). Tudi v naši raziskavi morebitne povezave med vrednostjo krvnega sladkorja in debelino žilne stene karotidnih arterij nismo uspeli dokazati.

V novejših raziskavah se poleg analize klasičnih koronarnih dejavnikov tveganja vedno večja pozornost usmerja tudi k hematološkim dejavnikom. To so dejavniki, ki uravnavajo procese koagulacije in fibrinolize, verjetno pa igrajo tudi pomembno vlogo pri aterogenezi (45). V nekaj raziskavah s tega področja je že bila opredeljena pomembna vloga fibrinogena in trombocitne agregacije pri nastanku aterosklerotičnih sprememb (29–31).

Pri našem delu smo večjo pozornost posvetili fibrinogenu, antigenu in aktivnosti t-PA, antigenu in aktivnosti PAI in euglobulinski lizi. Rezultati naše raziskave kažejo, da med proučevanimi fibrinolitičnimi dejavniki vplivata na debelino intime in medije v skupni karotidni arteriji aktivnost t-PA in aktivnost PAI. Čim večja je bila aktivnost t-PA, manjša je bila debelina, obratno velja za aktivnost PAI. Do sedaj še niso proučevali vpliva koncentracije t-PA in PAI na debelino intime in medije karotidnih arterij, vpliv koncentracije fibrinogena pa so proučevali Sosef in sodelavci (27), ki tako kot v naši raziskavi niso našli pomembne povezanosti med koncentracijo fibrinogena in ultrazvočno merjeno debelino intime in medije karotidnih arterij.

Med manj raziskane dejavnike, ki jim pripisujejo vlogo pri nastanku srčnega infarkta, spadajo tudi dejavniki presnove železa (Fe, transferin, feritin). Pomembne naj bi bile predvsem nizke koncentracije transferina, ki naj bi kot antioksidant deloval varovalno (32). Glede koncentracije železa v krvi so mnenja deljena, tako da vloga tega dejavnika v nastanku aterosklerotičnih sprememb ni natančno opredeljena (46, 47). Rezultati naše študije kažejo, da koncentracija železa in transferina v serumu ne vpliva na debelino intime in medije karotidnih arterij. V literaturi nismo našli poročil o tem, zato bo seveda potrebno naš izsledek preveriti na večjem številu preiskovancev.

Zaključki

Moški bolniki, ki so preboleli srčni infarkt pred 50. letom starosti, imajo pomembno debelejšo intimo in medijo karotidnih arterij kot enako stari moški brez kliničnih znakov koronarne bolezni. Zato lahko sklepamo, da ima ultrazvočno določanje debeline intime in medije karotidnih arterij diagnostični pomen pri predvidevanju koronarne bolezni pri ogroženih preiskovancih.

Na debelino intime in medije karotidnih arterij pri moških, starih od 30 do 50 let, med klasičnimi koronarnimi dejavniki tveganja vplivata diastolični krvni tlak in koncentracija HDL-holesterola, med manj znanimi pa aktivnost t-PA in PAI. Debelina intime in medije karotidnih arterij je tem večja, čim večji je diastolični krvni tlak in aktivnost PAI in čim manjša je koncentracija HDL-holesterol in aktivnost t-PA.

Na debelino intime in medije karotidnih arterij pri moških, starih od 30 do 50 let, ne vpliva koncentracija LDL-holesterola, kadar je v normalnem območju. Nanjo tudi ne vplivajo koncentracija fibrinogena, železa in transferina v krvi, torej dejavniki, ki jim tudi pripisujejo pomen v etiopatogenezi srčnega infarkta.

Zahvala

Mentorici, prof. dr. Ireni Keber se zahvaljujeva za vse nasvete in pomoč pri izvedbi raziskovalne naloge. Zahvaljujeva se ji za njeno potrpežljivost in čas, ki si ga je vzela, da smo skupaj prebrodili nastale probleme in nalogo speljali do konca.

Asist. dr. Igorju Bardorferju se zahvaljujeva za nasvete pri ultrazvočnih preiskavah.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujeva dr. Mojci Stegnar, višji medicinski sestri Brigiti Valencič ter osebju hematološkega in koagulacijskega laboratorija Interne klinike Trnovo.

Posebej se zahvaljujeva osebju Zavoda za transfuzijo krvi za njihovo nesebično pomoč pri pridobivanju prostovoljcev, odvzemih krvi in laboratorijskem delu.

Interni kliniki Trnovo pa se zahvaljujeva za materialno pomoč pri izvedbi naloge.

Literatura

1. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis – a multifactorial disease. *Atherosclerosis* 1993; 3: 3–16.
2. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation* 1993; 3: 56–65.
3. Tell GS, Howard G, McKinney WM. Risk factors for site specific extracranial carotid artery plaque distribution as measured by B-mode ultrasound. *J Clin Epidemiol* 1989; 6: 551–9.
4. Bierman E. Atherosclerosis and other forms of arteriosclerosis. 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: 992–1001.
5. Crouse JR. B-mode ultrasound in clinical trials – answers and questions. *Circulation* 1993; 1: 319–21.
6. Pearson TA, Heiss GM. Atherosclerosis – quantitative imaging, risk factors, prevalence, and change. *Atherosclerosis* 1993; 3: 2.

7. Crouse JR, Thompson CJ. An evaluation of methods for imaging and quantifying coronary and carotid lumen stenosis and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993; 3: 17–33.
8. Javid H. The development of carotid plaque. *Am J Surg* 1979; 138: 224–7.
9. Crouse JR. Carotid and coronary atherosclerosis – what are the connections? *Atherosclerosis* 1991; 3: 175–9.
10. Ellefson RD, Caraway WT. PAP method for cholesterol assesment. In: Tietz N, ed. *Fundamentals of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders 1976: 507.
11. Fredrickson DS, Levy RT, Lees RS. Triglycerides. *New England Journal of Medicine* 1967; 34: 275.
12. Eisennuriener HG, Rietz P, Schlapfer P. Fero test – F. *J Clin Chem* 1979; 17: 149.
13. Ramsay WNM. TIBC. *J Clin Chem* 1957; 40: 219.
14. Rijken DO, Juhan I, deCock F, Collen D. Measurement of human tissue type plasminogen activator by a two-site imunoradiometric assay. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 274–84.
15. Korniger C, Speiser W, Wojta J, Binder BR. Sandwich ELISA for t-PA antigen employing a monoclonal antibody. *Thromb Res* 1986; 41: 527–35.
16. Ranby M, Bergsdorf N, Nilsson T, Melbring G, Winblad B, Blucht G. Age dependence of tissue plasminogen activator concentrations in plasma studied by an improved linked immunosorbent assay. *Clin Chem* 1986; 32: 2160–5.
17. Verheijen JH, Mullaart E, Chang GTG, Klufft C, Wijngaards GA. A simple and sensitive spectrofotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma. *Thrombos Hemost* 1982; 48: 266–9.
18. Stegnar M, Keber D, Pentek M, Vene N, Klufft C. Age and sex differences in resting and postocclusion values of tissue plasminogen activator in a healthy population. *Fibrinolysis* 1988; 2: 121–2.
19. Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruithof EKO, Juhan I, Collen D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biological fluids with murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; 71: 220–5.
20. Spregers ED, Klufft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69: 381–7.
21. Ranby M, Norrman B. A sensitive assay for tissue plasminogen activator. *Thromb Res* 1982; 27: 743–9.
22. Wiman B, Mellbring G, Ranby M. Plasminogen activator release during venous occlusion, stasis and exercise as determined by a new specific assay. *Clin Chem Acta* 1983; 127: 270–88.
23. Ranby M, Sundell IB, Nilsson TK. Blood collection in strong acidic citrate anticoagulant used in a study of dietary influence on basal t-PA activity. *Thromb Haemost* 1989; 62: 917–22.
24. Buckell M. The effect of citrate on eulobulin methods of estimating fibrinolytic activity. *J Clin Pathol* 1959; 11: 403.
25. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol* 1957; 17: 237–46.
26. Weinberger J, Ramos L, Ambrose JA, Valentin F. Morphologic and dynamic changes of atherosclerotic plaque at the carotid artery bifurcation: sequential imaging by real time B-mode ultrasonography. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 1515–21.
27. Sosef MN, Bosch JG, vanOstayen J, Visser T, Reiber JHC. Relation of plasma coagulation factor VII and fibrinogen to carotid artery intima-media thickness. *Thromb Haemost* 1994; 72: 250–4.
28. Sanguigni V, Gallu M, Strano A. Incidence of carotid artery atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Angiology* 1993; 1: 34–8.
29. Wu KK, Folsom AR, Heiss G, Davis CE, Conlan MG, Barnes R. Association of coagulation factors and inhibitors with carotid artery atherosclerosis – early results of the ARIC study. *Ann Epidemiol* 1992; 2: 471–80.
30. Grotta JC, Yatsu FM, Pettigrew LC, et al. Prediction of carotid stenosis progression by lipid and hematologic measurements. *Neurology* 1989; 39: 1325–31.
31. Salonen JT. The role of iron as a cardiovascular risk factor. *Current opinion in lipidology* 1993; 4: 277–82.
32. Magnusson MK, Sigfusson N, Sigvaldason H, Johannesson GM, Magnusson S, Thorgeirsson G. Low iron-binding capacity as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1994; 1: 102–8.
33. Garipey J, Massonneau M, Levenson J, Heudes D, Simon A, et al. Evidence for in vivo carotid and femoral wall thickening in human hypertension. *Hypertension* 1993; 1: 111–8.

34. Wolinsky H. Effects of hypertension and its reversal on the thoracic aorta of male and female rats: morphological and chemical studies. *Circ Res* 1971; 28: 622–37.
35. Aars H. Static load-length characteristics of aortic strips from hypertensive rabbits. *Acta Physiol Scand* 1968; 73: 101–10.
36. Craven TE, Ryu JE, Espeland MA, Kahl FR, McKinney WM, Toole JF, McMahan MR, Thompson CJ, Heiss G, Crouse JR. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. *Circulation* 1990; 4: 1230–42.
37. Ahn SS, Baker JD, Walden K, Moore WS. Which asymptomatic patients should undergo routine screening carotid duplex scan. *Am J Surg* 1991; 162: 180–4.
38. Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Salonen JT. Prevalence of carotid atherosclerosis and serum cholesterol levels in eastern Finland. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 788–92.
39. Poli A, Tremoli E, Colombo A, Sirtori M, Pignoli P, Paoletti R. Ultrasonographic measurement of the common carotid artery wall thickness in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 1988; 70: 253–61.
40. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C, et al. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol* 1991; 3: 250–56.
41. Yasaka M, Yamaguchi T, Shichiri M. Distribution of atherosclerosis and risk factors in atherothrombotic occlusion. *Stroke* 1993; 2: 206–11.
42. Robertson WB, Strong JP. Atherosclerosis in persons with hypertension and diabetes mellitus. *Lab Invest* 1968; 18: 538–51.
43. Passero s, Rossi G, Nardini M, Bonelli G, D'Ettore MD, Martini A, Battistini N, Albanese V, Bono G, Brambilla GL, Candelise L et al. Italian multicenter study of reversible cerebral ischemic attacks. Part 5. Risk factors and cerebral atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1987; 63: 221–24.
44. Javid H, Ostermiller WE, Hengesh JW, Dye WS, Hunter JA, Najafi H, Julian OC. Natural history of carotid bifurcation atheroma. *Surgery* 1970; 67: 80–6.
45. Lowe GDO. Blood rheology, haemostasis and vascular disease. *Haemostasis and thrombosis* 1993; 3: 1169–88.
46. Cooper RS, Liao Y. Iron stores and coronary heart disease: negative findings in the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Circulation* 1993; 87: 686.
47. Stampfer MJ, Grodstein F, Rosenberg I, Willet W, Hennekens C. A prospective study of plasma ferritin and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1993; 87: 688.