

Vpliv kajenja na funkcijske in morfološke spremembe arterijske stene*

The influence of smoking on functional and morphological changes of the arterial wall*

Marta Orehek**, Erika Tratnik***

Ključne besede
karotidne arterije - ultrazvok
brahialna arterija
hiperemija
kajenje

Key words
carotid arteries - ultrasonography
brachial artery
hyperemia
smoking

Izvleček. Ateroskleroza je počasi napredujoča degenerativna bolezen arterijske stene. Na njen nastanek in hitrost napredovanja vplivajo številni dejavniki tveganja, med katere sodi tudi kajenje. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali imajo klinično zdravi kadilci morfološke spremembe arterijske stene, in oceniti akutni in kronični vpliv kajenja na hemodinamske lastnosti perifernih arterij. V ta namen smo z ultrazvokom merili debelino intime-medije karotidnih arterij in sposobnost razširitve brahialne arterije med hiperemijo – pred pokajeno cigareto in po njej. V raziskavi je sodelovalo 40 kadilcev, starih od 19 do 50 let, ki smo jih razvrstili v dve skupini glede na trajanje kajenja. V skupini A so bili kadilci, ki so kadili manj kot 15 let, v skupini B pa kadilci, ki so kadili več kot 15 let. Kontrolno skupino je sestavljalo 20 zdravih preiskovancev, ki so bili brez pomembnih dejavnikov tveganja. Z laboratorijskimi preiskavami krvi smo pri kadilcih ugotovili pomembno večje vrednosti trombocitov, levkocitov, fibrinogena in pomembno manjše vrednosti HDL-holesterola, skupne vezalne sposobnosti za železo in eritrocitov kot pri nekadilcih. Pri kadilcih smo ugotovili pomembno manjšo razširitev brahialne arterije med hiperemijo kot pri kontrolni skupini ($7 \pm 4\%$ proti $11 \pm 4\%$, $p = 0,004$) in pomembno manjši pretok krvi v brahialni arteriji v mirovanju ($78,83 \pm 31,87$ ml/min) glede na kontrolno skupino ($134,85 \pm 45,06$ ml/min, $p < 0,0001$). Kadilci so imeli pomembno večjo povprečno debelino intime-medije ($0,68 \pm 0,13$ mm) kot nekadilci ($0,59 \pm 0,04$ mm, $p < 0,001$) in večjo debelino intime-medije v razcepišču karotidnih arterij ($0,81 \pm 0,18$ mm proti $0,63 \pm 0,40$ mm, $p < 0,001$). Debelina intime-medije je bila pri kadilcih značilno

Abstract. Atherosclerosis is a slowly progressing degenerative disease of the arterial wall. Several risk factors, including cigarette smoking, precipitate its development. The purpose of the study was to investigate atherosclerotic morphologic changes in clinically healthy smokers, and to evaluate acute and chronic effects of cigarette smoking on arterial haemodynamics. Using ultrasound we determined thickness of the intima and media of the carotid arteries, and the ability of brachial arteries to dilate during hyperemia. The measurements were done before and after smoking. The study involved 40 smokers aged 19 to 50 years, who were assigned to two groups: group A comprised 20 individuals who had been smoking for less than 15 years and group B 20 subjects with a history of smoking for more than 15 years. The control group consisted of 20 healthy individuals with no major risk factors for atherosclerosis. Laboratory tests showed that smokers had significantly higher platelet, leukocyte and fibrinogen levels, and significantly lower HDL-cholesterol, TIBC and erythrocyte concentrations compared to non-smokers. In comparison to the control group, smokers demonstrated considerably reduced dilation of the brachial arteries during hyperemia ($7 \pm 4\%$ to $11 \pm 4\%$, $p = 0,004$) and notably diminished blood flow at rest ($78,83 \pm 31,87$ ml/min to $134,85 \pm 45,06$ ml/min, $p < 0,0001$). Smokers showed a significantly greater average intimal and media thickness both of the carotid arteries ($0,68 \pm 0,13$ mm to $0,59 \pm 0,04$ mm, $p < 0,001$), and of the carotid bifurcation ($0,81 \pm 0,18$ mm to $0,63 \pm 0,40$ mm, $p < 0,001$). The intimal and media thickness is associated with years of smoking

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1996.

**Marta Orehek, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

***Erika Tratnik, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

povezana s trajanjem kajenja in s številom dnevno pokajenih cigaret. Pri vseh preiskovancih je bila debelina intime-medije povezana s starostjo, indeksom telesne teže, koncentracijo celotnega in LDL-holesterola, trigliceridi, fibrinogenom in lipoproteinom(a). Rezultati raziskave kažejo, da je kajenje močan neodvisen dejavnik tveganja, ki pospešuje aterogenezo tudi v odsotnosti drugih dejavnikov tveganja.

and number of cigarettes smoked daily. In all three groups there was a relationship between the intimal and media thickness, and risk factors, including age, body mass index, cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, fibrinogen and lipoprotein(a). Our results indicate that cigarette smoking is a strong independent risk factor for atherosclerosis, and that it accelerates atherogenesis even in the absence of other precipitating factors.

Uvod

Ateroskleroza je počasi napredujoča degenerativna bolezen velikih in srednje velikih mišičnih in elastičnih arterij. Bolezenski proces lahko zajame katerokoli arterijo, zato so lahko prizadeti različni organi in organski sistemi v telesu. V končni fazi pride vedno, ne glede na mesto ateroskleroze, do zmanjšanja arterijske prekrvitve, in če je to zmanjšanje kritično, do odmrtja tistega dela organa, ki ga prizadeta arterija prehranjuje. Najpogosteje so v procesu ateroskleroze prizadeti naslednji žilni odseki: arterije spodnjih udov, abdominalna aorta, možganske, karotidne in srčne arterije. Zaradi tega so najpogostejši zapleti ateroskleroze: srčni infarkt, možganska kap ter motena arterijska prekrvitev spodnjih udov in črevesja. Ateroskleroza je ena od najbolj razširjenih boleznih sodobnega časa. O razširjenosti ateroskleroze v razvitem svetu priča umrljivost zaradi boleznih obtočil, ki predstavljajo v povprečju polovico vseh vzrokov smrti.

Ateroskleroza je neozdravljiva bolezen, možno je le preprečevati njen nastanek in napredovanje z izogibanjem dejavnikom, za katere je znano, da pospešujejo proces ateroskleroze. Taki dejavniki tveganja so zvišan krvni tlak, sladkorna bolezen, hiperlipidemija (zlasti povečana koncentracija LDL-holesterola in zmanjšana koncentracija HDL-holesterola), kajenje, pojav zgodnje ateroskleroze pri bližnjih sorodnikih, debelost in telesna neaktivnost.

Za bolezen je značilno, da poteka več desetletij klinično nemo, ko pa se izrazi, je že v tako napredovali fazi, da učinkovito preprečevanje in zdravljenje ni več možno. Ne glede na fazo bolezni je vselej treba odstraniti vse znane škodljive dejavnike, na katere lahko vplivamo. Napredovale oblike bolezni poskušamo zdraviti z zdravili za izboljšanje arterijskega pretoka in z različnimi kirurškimi postopki, ki izboljšujejo prekrvitev prizadetih organov. Kljub vsem naporom pa osebo z napredovalo boleznijo spremlja veliko tveganje za nastanek kasnejših zapletov. Zato je toliko bolj pomembno, da bolezen odkrijemo v najzgodnejši fazi, ko je preprečevanje najbolj učinkovito.

Nastanek in razvoj ateroskleroze

Razvoj ateroskleroze je počasen in zapleten biološki proces, ki ga lahko na osnovi značilnih funkcijskih in morfoloških sprememb arterijske stene razdelimo na več stopenj.

Ključni dogodek v razvoju ateroskleroze je poškodba endotelija, ki sestavlja notranjo plast arterijske stene.

V fizioloških pogojih endotelij opravlja številne funkcije, s katerimi preprečuje nastanek krvnih strdkov v žili in deluje kot polprepustna membrana, ki nadzoruje izmenjavo hranil in tekočine med plazmo in arterijsko steno. Endotelna celica, gradbena enota endotelija, vzdržuje tonus žile z uravnoteženim izločanjem vazodilatatornih (dušikov oksid (NO), prostaciklin (PGI₂)) in vazokonstriktornih molekul (endotelin (ET), angiotenzin-II). Poleg tega endotelij tvori vezivni matriks, kolagen, elastična vlakna in proteoglikane za bazalno membrano, na kateri leži, in ima zmožnost privzeti iz plazme snovi, kot so lipoproteini, in jih oksidirati ali kako drugače spremeniti. Endotelne celice preko tvorbe in sproščanja molekul, kot so ADP-aza, PGI₂ in heparan sulfat, tvorijo tudi netrombogeno površino žilne stene (1).

Že v najzgodnejši fazi aterogeneze najdemo okvaro ene ali več funkcij endotelija. Ob poškodbi endotelija se zaradi določenih glikoproteinov, ki jih sprošča poškodovana endotelna celica (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)) poveča lepljivost monocitov, T-limfocitov in trombocitov na endotelij. Zelo zgodaj se pokaže tudi povečana prepustnost endotelne celice za lipoproteine, ki se kopičijo subendotelno v oksidirani ali glikozilirani obliki (npr. oksidirani LDL-lipoproteini (oks-LDL)). Oks-LDL naj bi imeli sposobnost indukcije genov v endotelni celici za tvorbo kemotaktičnih molekul, ki še povečajo lepljenje krvnih celic na endotelno celico (1).

Najpogosteje se pokaže okvara endotelnih celic na mestih vrtinčenja krvi (razcepišča arterij). Vrtinčenje krvi predstavlja določeno poškodbo za celico in naj bi po nekaterih dokazih povzročilo spremenjeno izraznost genov in posledično pretirano tvorbo kemotaktičnih molekul za sestavine krvi (2).

Naslednja stopnja v aterogenezi, ki sledi poškodbi endotelija, je po Rossu, potovanje gladkih mišičnih celic iz medije v intimo pod vplivom kemotaktičnih snovi, ki jih v večini tvori funkcijsko okvarjena endotelna celica. Aktivirana potujoča mišična celica začne proizvajati številne rastne dejavnike, ki delujejo parakrino in avtokrino in imajo za posledico razrast tako samih gladkih mišičnih celic kot tudi drugih celic v bližini (1, 3).

Vse oblike aterosklerotičnih lezij vsebujejo poleg značilnih degenerativnih sprememb tudi sestavine kroničnega vnetja: iz monocitov nastale makrofage in številne T-limfocite (1, 4, 5). Iz makrofagov nastajajo s privzemom oks-LDL in drugih lipidov penaste celice, ki so vedno prisotne v aterosklerotičnih lezijah (6). Makrofagi so tudi močan vir raznih rastnih dejavnikov in citokinov (1). Vloga T-limfocitov in drugih vnetnih celic v aterosklerotičnih lezijah še ni pojasnjena, razen morebiti pri imunsko pogojeni aterosklerozi (pri zavrnitvi presajenega srca).

Tvorba in sproščanje rastnih dejavnikov in citokinov iz aktiviranih makrofagov, gladkih mišičnih celic, T-limfocitov in iz endotelne celice v sodelovanju z razrastjo gladkih mišičnih celic in s holesterolnimi kristali vodi v nastanek aterosklerotičnega plaka. Ateroskle-

rotični plak predstavlja napredovalo aterosklerotično lezijo. Pojavlja se v dveh oblikah, in sicer kot:

- napredovala kompleksna lezija (zgrajena je iz tanke vrhnje plasti veziva in gladkih mišičnih celic ter iz obilne sredice, ki jo sestavljajo številne penaste celice, razpadle celice, kristali holesterola in nekatere sestavine krvi) ali kot
- fibrozni plak (zgrajen je iz obilne čvrste skorje iz veziva in gladkih mišičnih celic in iz pičle sredice, ki jo sestavljajo maloštevilne penaste celice in le malo nekrotičnega materiala; v takem plaku se lahko zbirajo tudi kalcijeve soli, kar vodi v nastanek kalcinirane lezije (1)).

Napredovala kompleksna lezija je občutljiva na hemodinamski stres in lahko v predelu najmanjše odpornosti počí, pri čemer se trombogena vsebina plaka izlije navzven – v svetlino arterije. Na takih mestih se zbirajo in lepijo trombociti ter v kombinaciji s sočasno aktivacijo koagulacijskega sistema pripeljejo do tvorbe krvnega strdka in lahko povzročijo zaprtje svetline arterije in posledično ishemijo tkiva, ki ga ta arterija prehranjuje (1, 7). Fibrozni plaki pa so bolj odporni in na njihovi površini pride le redko do poškodb in posledičnih zapletov.

Vloga kajenja pri aterogenezi

Med kadilci je pojavnost koronarne srčne bolezni 2,5-krat večja, umrljivost zaradi infarkta pa 1,5-krat večja kot pri nekadilcih (8, 9).

V cigaretnemu dimu je bilo ugotovljenih več kot 4000 spojin (10). Aterogenezo naj bi najbolj spodbujali: nikotin, ogljikov monoksid (CO), policiklični aromatski ogljikovodiki, glikoproteini tobaka in tiocianat (8, 11). Za številne spojine v cigaretnem dimu pa velja, da so kancerogene.

Točen mehanizem, preko katerega kajenje spodbuja aterogenezo, še ni jasen, lahko pa bi k temu prispevale naslednje spremembe, ki spremljajo kajenje (8):

- spremenjeno razmerje med snovmi, ki sodelujejo v koagulacijskem sistemu (povečana koncentracija von Willebrandovega faktorja (vWf) in fibrinogena),
- povečana reaktivnost in agregabilnost trombocitov,
- spremembe v lipidih in lipoproteinih,
- spremembe v ravni prostaglandinov s prevlado vazokonstriktornih spojin nad vazodilatatornimi in
- neposreden toksičen učinek na endotelij (CO povzroči hipoksijo in poškodbo endotela).

Cigaretni dim vsebuje snovi, ki spodbujajo peroksidacijo lipidov. Tako spremenjeni lipidi naj bi po nekaterih raziskavah (poleg neposrednega aterogenega delovanja) spodbujali tudi sproščanje vWF (12, 13). K sproščanju vWF naj bi prispevala nikotin in tiocianat (14). vWF ni le označevalec poškodbe endotelija, temveč aktivno sodeluje v trombocitnem procesu s spodbujanjem agregacije trombocitov in s sodelovanjem pri lepljenju trombocitov na subendotelij – torej je prokoagulantna molekula (15). Oksidirani lipidi lažje

vstopajo v žilno steno in naj bi povzročili večjo občutljivost LDL-lipoproteinov za peroksidacijo, kar še dodatno okvarja endotelij (12, 16). V omenjenih študijah so v plazmi kadičev dokazali tako povišano raven vWF kot tudi lipidnih peroksidov.

Kajenje predstavlja dejavnik tveganja za srčno-žilne bolezni tudi zaradi povečevanja koncentracije skupnega in LDL-holesterola ter zaradi zmanjševanja koncentracije varovalnega – HDL-holesterola (10). LDL-holesterol se pospešeno kopiči v makrofagih subendotelno. To se dogaja zlasti takrat, ko se LDL-holesterol na poti iz jeter v krvnem obtoku oksidira, kar je pri kadičih pogost pojav. Kadičli imajo pogosto v krvnem obtoku oksidirane tudi HDL-lipoproteine. Oksidiran HDL-lipoprotein izgubi svojo spodbujevalno vlogo pri izstopu holesterola iz celic, kar aterogenezo še pospeši (17, 18).

Kadičli naj bi imeli tudi moteno odzivnost presnove na obrok uravnotežene hrane (lipidno intoleranco). Axelsen in sodelavci so dokazali, da imajo kadičli (tudi v odsotnosti hipertrigliceridemije) po uravnoteženem mešanem obroku hipertrigliceridemijo z nizko ravni HDL-holesterola v krvi (19).

V več študijah so pri zdravih kadičih ugotovili povečano koncentracijo fibrinogena v krvi. Koncentracija fibrinogena je bila odvisna od števila pokajenih cigaret. Povečana koncentracija fibrinogena pa je znan dejavnik, ki pospešuje aterogenezo (20–23).

Kronične posledice kajenja se lahko kažejo tudi v obliki povečanega perifernega upora. Zaradi dolgotrajnega kajenja se zožijo koronarne arterije in koronarna rezerva se zmanjša. To se zgodi tudi v primeru, ko so koronarne arterije angiografsko nespremenjene (11). Zoženje koronarnih arterij naj bi bila posledica z nikotinom povzročene količinsko manjše sinteze PGI₂ v endotelni celici. Na sintezo tromboksana A₂ pa nikotin nima vpliva. Zato se razmerje med tromboksanom A₂, ki deluje vazokonstriktorno, in PGI₂, ki žile širi, spremeni v prid tromboksana A₂ (11). Posledica zvečanega upora v koronarnih arterijah in hitrejšega napredovanja ateroskleroze pri kadičih je, da kroničnim kadičcem bolj grozi nestabilna angina pectoris, srčnomišični infarkt in nenadna smrt (11).

Kajenje ima poleg kroničnih tudi akutne učinke. Znani akutni učinki kajenja so: zvišanje ravni adrenalina, zvišanje krvnega tlaka, pospešitev frekvence srca in zvečanje srčnega indeksa (8, 11). To je verjetno posledica delovanja nikotina, ki naj bi spodbujal izločanje kateholaminov s posledičnimi spremembami v žilnem tonusu in srčni dinamiki (24).

Da kajenje pospešuje aterogenezo in srčno-žilne zaplete, posredno dokazujejo ugotovitve študij, ki kažejo, da umrljivost bivših kadičev upada progresivno s trajanjem abstinence, v primerjavi s primerljivo starostno skupino kadičev. V *American Cancer Society Study* so ugotovili, da se je umrljivost zaradi srčne bolezni po 10 letih abstinence pri kadičih, ki so kadili manj kot 20 cigaret dnevno, približala osebam, ki niso nikoli katile. Umrljivost bivših kadičev, ki so kadili več kot 20 cigaret dnevno, se je tudi zmanjšala, še vedno pa je za 35 % presežala umrljivost nekadičev (25).

V nekaterih študijah so pri kadičih dokazali moten vazodilatatorni odgovor endotela perifernih arterij na provokacijski test (26, 27), v drugih pa niso našli nobenih razlik glede na nekadičce (28). Celermajer in sodelavci so našli moteno, od endotelija odvisno vazodilatacijo pri zdravih mladih odraslih kadičih, ki je bila povezana s številom

pokajenih cigaret in trajanjem kajenja. V isti študiji so tudi dokazali, da je od endotelija odvisna vazodilatacija manj motena pri bivših kadilcih, še vedno pa je bolezenska v primerjavi z zdravimi nekadilci (26). Ta podatek naj bi dokazoval, da je kvarni učinek kajenja na žilno funkcijo vsaj delno popravljiv. Seveda pa je nazadovanje ateroskleroze vprašljivo, ko se že pojavijo aterosklerotični plaki. Jacobs in sodelavci pa niso dokazali motenega vazodilatatornega odgovora v arterijah podlahti pri zdravih mladih kroničnih kadilcih in sklepajo, da kajenje ne povzroči trajne endotelne okvare delovanja v podlahtnih arterijah (28).

Namen in cilji

Kajenje je pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze, še zlasti ob prisotnosti drugih dejavnikov tveganja. Ugotovitve raziskav pa se razhajajo glede dolžine latentnega obdobja od začetka kajenja do pojava zgodnjih funkcijskih sprememb arterijske stene, ko kajenje nastopa kot edini dejavnik tveganja (26, 28). Zato smo želeli v naši raziskavi proučiti akutne in kronične učinke kajenja na funkcijske in morfološke spremembe arterijske stene. Pri tem smo si zastavili naslednja vprašanja:

- ali se kadilci v določenih kliničnih in laboratorijskih značilnostih razlikujejo od primerljivih nekadilcev,
- ali imajo kadilci v primerjavi z nekadilci moteno sposobnost razširitve brahialne arterije med provokacijskim testom,
- ali imajo kadilci v primerjavi z nekadilci že določene morfološke spremembe v stenah karotidnih arterij (zadebeljeno intimo-medijo (IM)),
- ali pride neposredno po pokajeni cigareti do zmanjšanja od endotelija odvisne dilatacije brahialne arterije in
- zanimala nas je tudi povezava med izraženostjo funkcijskih in morfoloških sprememb arterijske stene z leti kajenja, številom pokajenih cigaret in spolom kadilca.

Tabela 1. Prikaz kliničnih značilnosti kontrolnih preiskovancev in kadilcev. Spol preiskovancev je prikazan kot razmerje med moškimi in ženskami – M/Ž, ostale vrednosti pa so prikazane kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. BMI – indeks telesne teže (body mass index), p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna, * – velja za skupino kadilcev A, ki so kadili manj kot 15 let.

Spremenljivka	Enota	Kontrola	Kadilci	p
Število preiskovancev		20	40	
Spol	M/Ž	9/11	18/22	NS
Trajanje kajenja	leta	0	15,05 \pm 7,74	
Število cigaret	/dan	0	19,38 \pm 7,54	
Starost	leta	29,10 \pm 4,53	* 28,10 \pm 6,24	NS
BMI	g/cm²	2,27 \pm 0,28	2,43 \pm 0,41	NS
Sistolični tlak	mmHg	121,85 \pm 9,29	115,13 \pm 8,05	0,05
Diastolični tlak	mmHg	77,00 \pm 8,80	76,63 \pm 9,01	NS

Preiskovanci

V raziskavi je sodelovalo 60 prostovoljcev: 40 kadilcev in 20 zdravih preiskovancev, ki so služili za kontrolo. Kadilci so bili stari od 19 do 50 let, v povprečju 33 let. Preiskovanci iz kontrolne skupine pa so bili stari od 23 do 36 let, v povprečju 29 let. Kadilci se v osnovnih kliničnih značilnostih niso razlikovali od zdravih preiskovancev, razen v sistoličnem krvnem tlaku, ki je bil pri kadilcih nižji, vendar so bile vrednosti sistoličnega krvnega tlaka v obeh skupinah še v normalnem območju (tabela 1).

Kadilci

Kadilce smo glede na trajanje kajenja razvrstili v dve skupini: v prvi skupini so bili kadilci, ki so kadili manj kot 15 let (skupina A), v drugi pa tisti, ki so kadili več kot 15 let (skupina B). Zajeli smo le kadilce, ki pokadijo več kot 10 cigaret dnevno. Vsi kadilci so bili zdravi in brez drugih znanih dejavnikov tveganja (hipertenzija, sladkorna bolezen, hiperlipidemija, dedna obremenitev). Dedno obremenitev smo definirali kot pojav aterosklerotičnih zapletov – bolezni srca in ožilja (akutni srčnomišični infarkt, možganska kap, periferna arterijska okluzivna bolezen) pred 55. letom pri moških sorodnikih iz prvega kolena in pred 65. letom pri ženskih sorodnikih iz prvega kolena (starši, bratje ali sestre). Med skupinama kadilcev ni bilo pomembnih razlik v kliničnih značilnostih, razen v starosti, kar je spričo zasnovne raziskave razumljivo, saj so bili v skupini B preiskovanci, ki so kadili več kot 15 let (tabela 2).

Tabela 2. Prikaz kliničnih značilnosti kadilcev, ki so kadili do 15 let (skupina A), in tistih, ki so kadili več kot 15 let (skupina B). Spol preiskovancev je prikazan kot razmerje med moškimi in ženskami – M/Ž, ostale vrednosti pa so prikazane kot aritmetična sredina ± standardni odklon. BMI – indeks telesne teže (body mass index), p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Spremenljivka	Enota	Kadilci A	Kadilci B	p
Število preiskovancev		20	20	
Spol	M/Ž	8/12	10/10	NS
Trajanje kajenja	leta	8,95 ± 4,01	21,15 ± 5,35	< 0,001
Število cigaret	/dan	17,60 ± 6,48	21,15 ± 8,24	NS
Starost	leta	28,10 ± 6,24	39,50 ± 5,46	NS
BMI	g/cm²	2,52 ± 0,47	2,33 ± 0,32	NS
Sistolični tlak	mmHg	115,75 ± 8,32	114,50 ± 7,93	NS
Diastolični tlak	mmHg	78,00 ± 10,31	75,25 ± 7,52	NS

Kontrolna skupina

V kontrolno skupino smo vključili 20 zdravih prostovoljcev – nekadilcev, ki niso imeli nobenega od pomembnih dejavnikov tveganja za aterosklerozo.

Vse preiskovance smo predhodno natančno seznanili s postopki, z namenom preiskave in z morebitnimi nevšečnostmi ter zapleti. V raziskavi so sodelovali prostovoljno, kar so potrdili s podpisom. V raziskavi smo upoštevali načela Helsinško-Tokijske deklaracije. Predlog raziskave je obravnavala Republiška komisija za medicinsko etiko in je soglašala z vsebino raziskave in predlaganimi postopki.

Metode dela

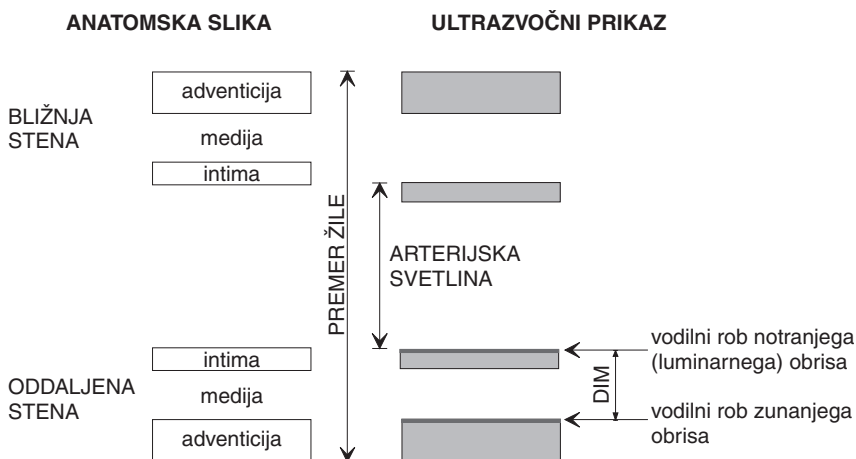
Anamneza in klinični pregled

Iz pogovora s preiskovanci smo dobili podatke o starosti, spolu, trajanju kajenja, povprečnem številu pokajenih cigaret na dan in prisotnosti drugih pomembnih dejavnikov tveganja za aterosklerozo (sladkorna bolezen, arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, telesna aktivnost, debelost). Zanimala nas je prisotnost morebitnih akutnih in kroničnih bolezni in jemanje zdravil. Spraševali smo tudi po družinski obremenjenosti za aterosklerozo (arterijska hipertenzija, sladkorna bolezen, srčni infarkt, možganska kap, periferna arterijska okluzivna bolezen pri starših, bratih oz. sestrah).

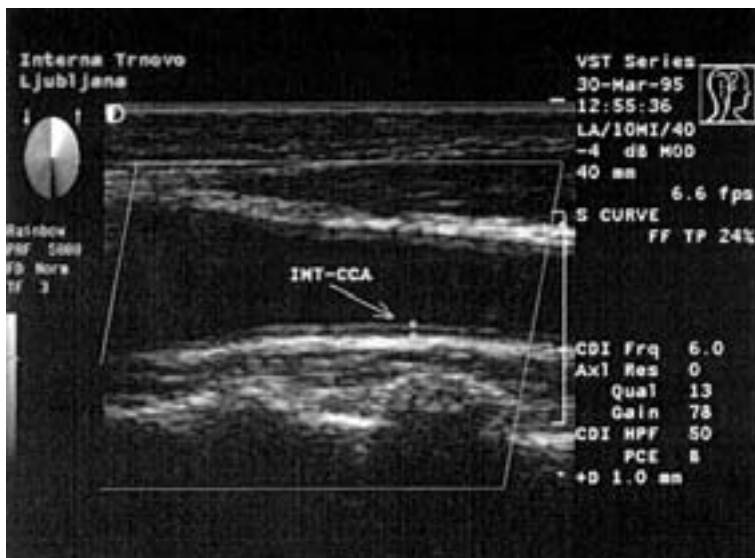
S kliničnim pregledom smo določili telesno višino in težo, izmerili krvni tlak in iskali morebitne klinične znake aterosklerotične bolezni.

Merjenje debeline intime-medije karotidnih arterij

Prva zaznavna in merljiva morfološka sprememba v poteku ateroskleroze je zadebelitev notranjih plasti arterije: intime in medije, ki sta ultrazvočno prikazani kot enotna plast: intima-medija. Zato smo pregledali karotidne arterije z ultrazvočnim aparatom Diasonics in z linearno sondo (10 MHz) na dvodimenzionalni način (B), ki natančno prikaže morfologijo arterijske stene. Značilni slikovni prikaz arterijske stene v preseku ima dve ehogeni (svetli) črti, ločeni s hipoehogenim (temnim) prostorom. Značilni vzorec je torej trakasta tvorba iz dvojnimi obrisom. Pri identifikaciji struktur, ki tvorijo ta slikovni vzorec, so ugotovili, da notranja (luminarna) črta predstavlja odboj ultrazvočnih valov od intimalne površine, zunanja črta pa odboj od adventicije na meji medija-adventicija. Razdalja med tema dvema črtama predstavlja debelino intime in medije (DIM) (29) (slika 1).



Slika 1. Shematski primerjalni prikaz anatomske in ultrazvočne slike arterije v vzdolžnem preseku. DIM – debelina intime-medije.



Slika 2. B-mode ultrazvočna slika skupne karotidne arterije v vzdolžnem preseku. Prikaz merjenja debeline intime-medije (zadebeljena intima-medija pri kadiľcu).

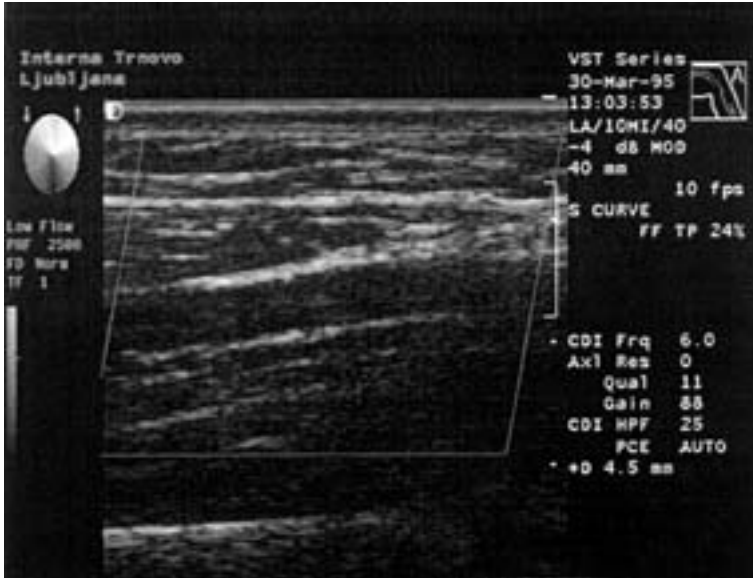
Med preiskavo so preiskovanci ležali na hrbtu brez dvignjenega vzglavja. Glava je bila rahlo nagnjena nazaj in obrnjena stran od preiskovane strani za približno 40°. Preiskovano arterijo smo prikazali v vzdolžnem preseku iz anterolateralne ali lateralne projekcije v celotnem poteku, ki je bil dostopen ultrazvočni preiskavi. DIM smo izmerili obojestransko na:

- skupni karotidni arteriji (ACC) in sicer 1 cm pod razcepiščem in na
- razcepišču skupne karotidne arterije (bulbusu).

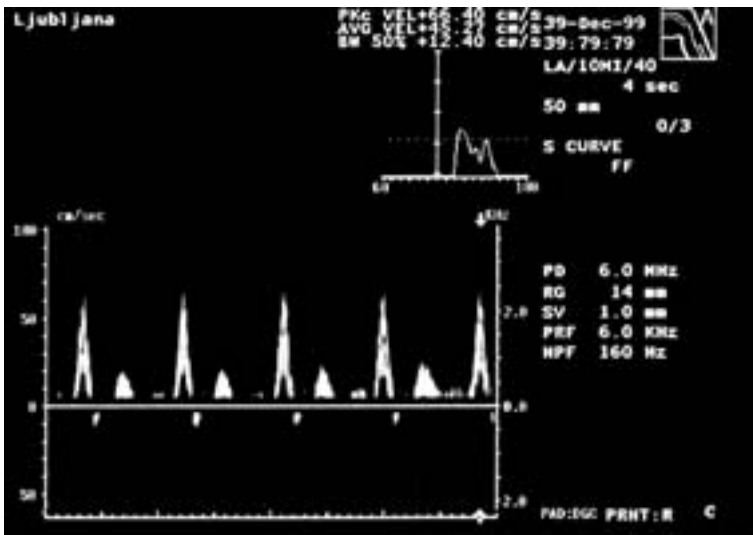
V vsakem od teh odsekov smo poiskali projekcijo, ki je najbolje prikazala odboje oddaljene arterijske stene. Na vsakem preiskovanem mestu smo meritev 3-krat ponovili in eno izmed meritev dokumentirali na videotrak ali na termoprint papir (slika 2). Za vsak posamezni odsek smo izračunali povprečno DIM, prav tako smo izračunali skupno povprečno DIM. Poiskali in opisali smo tudi aterosklerotične plake.

Merjenje hemodinamskih sprememb v brahialni arteriji

Še pred pojavom morfoloških sprememb žilne stene se pojavijo motnje, ki so posledica motene funkcije endotelija. Ultrazvočno lahko funkcijsko sposobnost endotelija proučujemo le z uporabo provokacijskih testov, s katerimi spremenimo premer arterije. Eden izmed pogosteje uporabljenih provokacijskih testov je arterijski zažem podlahti, ki po odstranitvi zažema povzroči hiperemijo. Ob povečanem pretoku skozi arterijo pride do povečanih strižnih sil na žilno steno, kar povzroči deformacijo endotelnih celic. Ta deformacija pa naj bi bila dražljaj za sproščanje vazodilatatorne snovi – endoteljskega



Slika 3. B-mode ultrazvočna slika brahialne arterije v vzdolžnem preseku. Prikaz merjenja premera.



Slika 4a. Ultrazvočni prikaz hitrosti toka krvi v brahialni arteriji v mirovanju s pomočjo spektralne analize doplerjevega signala.

smo v prvih 15 sekundah izmerili hiperemično hitrost toka krvi v brahialni arteriji. Premer arterije smo izmerili 45–65 sekund po sprostitvi manšete in izračunali pretok v času hiperemije (slika 4b). Dinamiko vračanja pretoka in premera na raven v mirovanju smo zasledovali tako, da smo še trikrat izmerili premer brahialne arterije (po 1., 5. in 10. minuti). Ko so bile vrednosti primerljive tistim, ki smo jih izmerili v mirovanju, je vsak kadilec pokadil 1 cigareto znamke, ki jo običajno kadi. Nato smo ponovno izmerili premer brahialne arterije in izračunali povprečno vrednost, ki smo jo uporabili za izračun pretoka v mirovanju. Zatem smo ponovili zažem podlakti za 4 minute in znova izmerili hiperemično hitrost in premer brahialne arterije ter izračunali hiperemični pretok. Rezultate teh meritev smo primerjali z rezultati meritev pred pokajeno cigareto.

Odvzem krvi in krvne preiskave

Vsem preiskovancem smo odvzeli kri na tešče med 7. in 9. uro zjutraj, in sicer v sedečem položaju iz komolčne vene. Vensko stazo smo naredili za največ 1 minuto. Najprej smo odvzeli kri za biokemične preiskave, nato pa še za hematološke in koagulacijske preiskave.

S hematološkim aparatom Cobas Minos STE-X (Roche) smo določili hematokrit, število eritrocitov, levkocitov in trombocitov ter koncentracijo hemoglobina.

Koncentracijo krvnega sladkorja smo določili s heksokinaznim testom v analizatorju KODAK Ektachem 250 Analyzer.

Koncentracijo skupnega holesterola smo določali po encimski metodi s pomočjo encimov: holesterol esteraze, holesterol oksidaze in peroksidaze v analizatorju KODAK Ektachem 250 Analyzer (32).

Koncentracijo HDL-holesterola smo določali z dekstran sulfat/magnezijevno metodo v analizatorju KODAK Ektachem 250 Analyzer. Ta metoda temelji na specifičnem obarvanju VLDL- in LDL-delcev s fosforvolframovo kislino in magnezijevim kloridom. HDL-holesterol, ki ostane v raztopini, se določi z barvno encimsko metodo (33).

Koncentracijo serumskih trigliceridov smo določili v analizatorju KODAK Ektachem 250 Analyzer po metodi GPO-PAP. To je encimski postopek, ki uporablja gliceroloksidazo (34).

Koncentracijo LDL-holesterola smo izračunali iz vrednosti skupnega holesterola, HDL-holesterola in trigliceridov po Fredericksonovi enačbi: $LDL\text{-holesterol} = \text{celotni holesterol} - HDL\text{-holesterol} - \text{trigliceridi}/2,2$, (35).

Koncentracijo železa in skupno vezalno sposobnost za železo v krvi (TIBC, angl. *total iron binding capacity*) smo določali v analizatorju KODAK Ektachem 250 Analyzer.

Koncentracijo fibrinogena smo določali po Claussovi metodi z napravo Fibrintimer (Behring, Marburg/Kahn, Nemčija) (36).

Koncentracijo lipoproteina(a) (Lp(a)) smo določali s TintElize® Lp(a) testom. To je test ELISA za kvantitativno določanje Lp(a) v humani plazmi in izkorišča afinitetno prečiščena poliklonska protitelesa proti prečiščenemu Lp(a).

Statistične metode

Vse statistične analize smo opravili s programom Statistica (Stat Soft Inc 1993 ZDA). Za osnovni opis značilnosti smo uporabili parametrične (aritmetična sredina, standardni odklon) ali neparametrične metode (mediana, interkvartilni razmik), glede na porazdelitev posameznih vrednosti. Za testiranje razlik med skupinami smo za spremenljivke, katerih porazdelitev je bila dovolj podobna normalni porazdelitvi, uporabili Studentov t-test, za ostale pa Mann-Whitnejev U-test. Povezavo med dvema spremenljivkama smo prikazali s Pearsonovim korelacijskim testom (za spremenljivke, ki so se razporejale normalno) in s Spearmanovim korelacijskim koeficientom (za spremenljivke z nenormalno razporeditvijo) (37).

Rezultati

Laboratorijske preiskave

Med skupino kadilcev in kontrolno skupino smo ugotovili pomembne razlike v plazemski koncentraciji HDL-holesterola, glukoze, TIBC, fibrinogena in v številu eritrocitov, trombocitov in levkocitov. V ostalih krvnih preiskavah se skupini nista razlikovali. Rezultati krvnih preiskav so prikazani v tabeli 3.

Tabela 3. Prikaz vrednosti krvnih preiskav in statistične razlike med kadilci in kontrolno skupino. Vrednosti s parametrično porazdelitvijo so prikazane kot aritmetična sredina \pm standardni odklon, vrednosti z neparametrično porazdelitvijo pa kot mediana z interkvartilnim razmikom. TIBC – skupna vezalna sposobnost za železo v krvi, Lp(a) – lipoprotein(a), p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Spremenljivka	Enota	Kontrolna skupina	Kadilci	p
Eritrociti	10¹²/l	4,87 \pm 0,38	4,63 \pm 0,40	0,03
Trombociti	10⁹/l	194,00 (180–224)	231,50 (190–260)	0,02
Levkociti	10⁹/l	5,27 \pm 0,83	6,52 \pm 1,36	0,0004
HDL-holesterol	mmol/l	1,50 \pm 0,24	1,13 \pm 0,30	0,00001
LDL-holesterol	mmol/l	2,64 \pm 0,68	2,94 \pm 0,84	NS
Trigliceridi	mmol/l	1,09 (0,75–1,50)	1,26 (0,88–1,47)	NS
Železo	mmol/l	16,95 \pm 5,27	15,47 \pm 6,19	NS
TIBC	mmol/l	66,04 \pm 6,72	59,58 \pm 9,31	0,008
Fibrinogen	g/l	2,09 (1,74–2,26)	2,54 (2,26–3,57)	0,00002
Lp(a)	mg/l	26,00 (13,50–136,50)	49,77 (17,66–155,75)	NS

Pri kadilcih, ki so kadili manj kot 15 let, smo ugotovili pomembno manjšo koncentracijo celotnega holesterola in Lp(a) kot pri kadilcih, ki so kadili več kot 15 let. V številu eritrocitov, levkocitov, trombocitov in koncentraciji hemoglobina, HDL-holesterola, LDL-holesterola, železa, TIBC in fibrinogena se skupini kadilcev nista razlikovali.

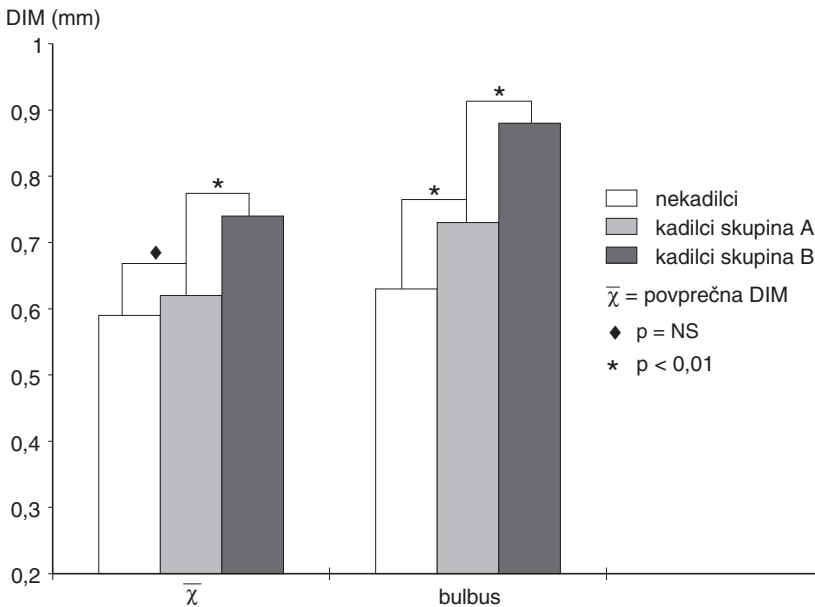
Morfološke spremembe karotidnih arterij

DIM je bila tako pri kadilcih kot nekadilcih največja v bulbosu, vendar so imeli kadilci statistično značilno zvečano vrednost povprečne DIM in DIM v področju bulbusa. Med skupinama kadilcev in kontrolnih preiskovancev pa ni bilo razlik v DIM skupne karotidne arterije. Izmerjene vrednosti DIM so prikazane v tabeli 4.

Tabela 4. Vrednosti DIM pri kadilcih in pri kontrolni skupini. Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. DIM – debelina intime-medije, ACC – skupna karotidna arterija, p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Spremenljivka	Enota	Kontrolna skupina	Kadilci	p
Povprečna vrednost DIM	mm	0,59 \pm 0,04	0,68 \pm 0,13	< 0,001
ACC	mm	0,56 \pm 0,04	0,56 \pm 0,09	NS

S trajanjem kajenja se je DIM povečevala. Tako so imeli tisti preiskovanci, ki so kadili več kot 15 let, pomembno večjo DIM kot preiskovanci, ki so kadili manj kot 15 let (slika 5).



Slika 5. Prikaz povprečnih vrednosti DIM vseh preiskovanih odsekov (\bar{x}) karotidnih arterij in posebej v bulbosu pri nekadilcih, kadilcih, ki so kadili do 15 let (skupina A), in kadilcih, ki so kadili več kot 15 let (skupina B). DIM – debelina intime-medije, p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Tabela 5. DIM pri kadilcih do 15 let (skupina A) in kadilcih nad 15 let (skupina B) ter razlike nasproti zdravim preiskovancem. DIM – debelina intime-medije, ACC – skupna karotidna arterija, ($\bar{x} \pm SD$) – aritmetična sredina ± standardni odklon, p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

	Kadilci A		Nekadilci		Kadilci B
	$\bar{x} \pm SD$	p	$\bar{x} \pm SD$	p	$\bar{x} \pm SD$
Povprečna DIM (mm)	0,62 ± 0,10	NS	0,59 ± 0,04	< 0,0001	0,74 ± 0,11
ACC (mm)	0,51 ± 0,08	0,03	0,56 ± 0,04	0,02	0,60 ± 0,07
Bulbus (mm)	0,73 ± 0,14	0,004	0,63 ± 0,40	< 0,0001	0,88 ± 0,18

Rezultati hemodinamskih meritev v brahialnih arterijah

Povprečen premer brahialne arterije v mirovanju se pri kadilcih ni pomembno razlikoval od premera pri kontrolni skupini. Pretok skozi brahialno arterijo je bil v mirovanju pri kadilcih značilno manjši kot pri nekadilcih. Med hiperemijo smo pri obeh skupinah izmerili značilno povečanje pretoka krvi v brahialni arteriji, med skupinama pa ni bilo pomembnih razlik. Pri obeh skupinah preiskovancev je med hiperemijo prišlo do povečanja premera žile, vendar je bilo pri skupini kadilcev to povečanje značilno manjše (tabela 6).

Tabela 6. Prikaz vrednosti pretokov krvi in premerov brahialne arterije v mirovanju in med reaktivno hiperemijo pri obeh skupinah preiskovancev. Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina ± standardni odklon. BA – brahialna arterija, p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Spremenljivka	Enota	Kontrolna skupina	Kadilci	p
Premer BA v mirovanju	mm	3,67 ± 0,43	3,56 ± 0,65	NS
Pretok v mirovanju	ml/min	134,85 ± 45,06	78,83 ± 31,87	< 0,0001
Razširitev BA med hiperemijo	%	11 ± 4	7 ± 4	0,004
Povečanje pretoka med hiperemijo	%	253 ± 78	226 ± 109	NS

Pri nekadilcih se je premer brahialne arterije od 5 do 7 minut po začetku hiperemije vrnil na izhodiščno vrednost, medtem ko je vrnitev premerov na normalo pri kadilcih zamujala in se pri šestih kadilcih premer brahialne arterije ni vrnil na izhodiščno vrednost niti po desetih minutah.

Proučevali smo tudi akutne učinke kajenja. Hemodinamske spremembe v brahialni arteriji pred pokajeno cigareto in neposredno po njej so prikazane v tabeli 7. Premer brahialne arterije v mirovanju je bil po pokajeni cigareti nekoliko manjši kot pred kajenjem, vendar razlika ni bila statistično značilna. Tudi pretok skozi brahialno arterijo v mirovanju se po pokajeni cigareti ni pomembno razlikoval od pretoka pred kajenjem. Razširitev brahialne arterije in zvečanje pretoka med hiperemijo pred kajenjem sta bila primerljiva z vrednostmi, ki smo jih izmerili med provokacijskim poskusom po kajenju.

Tabela 7. Prikaz premerov in pretokov v brahialni arteriji kadilcev pred kajenjem in po pokajeni cigareti v mirovanju in med reaktivno hiperemijo. Vrednosti so prikazane kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. BA – brahialna arterija, p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Spremenljivka	Enota	Pred kajenjem	Po kajenju	p
Premer BA v mirovanju	mm	3,56 \pm 0,65	3,44 \pm 0,64	NS
Pretok v mirovanju	ml/min	78,83 \pm 31,87	74,44 \pm 31,17	NS
Razširitev BA med hiperemijo	%	7 \pm 4	7 \pm 5	NS
Povečanje pretoka med hiperemijo	%	226 \pm 109	241 \pm 141	NS

Razlike med spoloma v laboratorijskih in hemodinamskih značilnostih

Tabela 8. Prikaz laboratorijskih in hemodinamskih spremenljivk v brahialni arteriji pri skupini kadilcev glede na spol. Število trombocitov je prikazano kot mediana z interkvartilnim razmikom, ostale vrednosti pa kot aritmetična sredina \pm standardni odklon. BA – brahialna arterija, p – raven tveganja, NS – razlika ni statistično značilna.

Spremenljivka	Enota	Ženske	Moški	p
Celotni holesterol	mmol/l	5,03 \pm 0,74	4,24 \pm 0,99	0,007
HDL-holesterol	mmol/l	1,26 \pm 0,29	0,96 \pm 0,21	0,001
LDL-holesterol	mmol/l	3,22 \pm 0,69	2,61 \pm 0,89	0,02
Trombociti	10 ⁹ /l	239 (203–273)	198 (174–229)	0,009
Premer BA v mirovanju	mm	3,16 \pm 0,32	4,06 \pm 0,62	< 0,0001
Pretok v mirovanju	ml/min	62,74 \pm 20,55	98,51 \pm 32,61	< 0,001
Razširitev BA med hiperemijo	%	8 \pm 5	6 \pm 5	NS
Povečanje pretoka med hiperemijo	%	243 \pm 116	206 \pm 97	NS

Ko smo primerjali moške kadilce in nekadilce ter ženske kadilke in nekadilke, smo ugotovili, da so imeli tako moški kadilci kot ženske kadilke v primerjavi z nekadilci oziroma nekadilkami statistično značilno: zmanjšano koncentracijo HDL-holesterola, zmanjšan pretok krvi v BA v mirovanju in manjšo razširitev BA med hiperemijo. Ženske kadilke so imele v primerjavi z nekadilkami še statistično značilno povečano koncentracijo trombocitov. Pri obeh spolih se je pri kadilcih v primerjavi z nekadilci nakazovala tudi povečana koncentracija celotnega in LDL-holesterola, vendar razlika ni bila statistično značilna.

Analize povezanosti med proučevanimi spremenljivkami

Med sposobnostjo razširitve brahialne arterije in DIM karotidnih arterij nismo našli statistično pomembne povezave. Tudi med dilatacijo brahialne arterije in proučevanimi kliničnimi ter laboratorijskimi spremenljivkami ni bilo značilnih povezav. DIM pa je bila povezana s trajanjem kajenja, s številom pokajenih cigaret, s koncentracijo celotnega holesterola, LDL-holesterola, fibrinogena in Lp(a) (tabela 9).

Tabela 9. Statistično pomembne povezave med DIM karotidnih arterij ter kliničnimi in laboratorijskimi spremenljivkami pri vseh preiskovancih. BMI – indeks telesne teže (body mass index), Lp(a) – lipoprotein(a), r – korelacijski koeficient, p – raven tveganja.

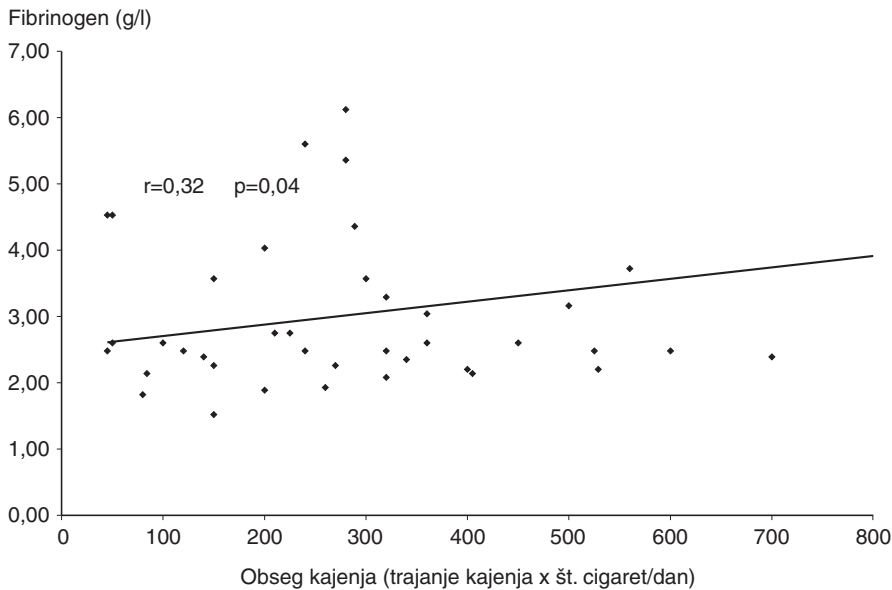
Spremenljivka		r	p
Klinična	Starost	0,66	< 0,001
	Trajanje kajenja	0,69	< 0,001
	Število cigaret/dan	0,45	< 0,001
	BMI	0,45	< 0,001
Laboratorijska	Celotni holesterol	0,35	0,006
	LDL-holesterol	0,42	0,001
	Trigliceridi	0,27	0,04
	Fibrinogen	0,37	0,004
	Lp(a)	0,32	0,01

Trajanje kajenja je bilo značilno povezano s koncentracijo celotnega holesterola, LDL-holesterola in povprečno DIM (tabela 10).

Tabela 10. Prikaz statističnih povezav med trajanjem kajenja, DIM in koncentracijo celotnega holesterola. ACC – skupna karotidna arterija, DIM – debelina intime-medije, r – korelacijski koeficient, p – raven tveganja.

Spremenljivka	r	p
Celotni holesterol	0,40	0,010
LDL-holesterol	0,39	0,012
DIM ACC	0,57	< 0,0001
DIM bulbus	0,65	< 0,0001
DIM povprečna	0,68	< 0,0001

Obseg kajenja (trajanje kajenja x število cigaret na dan) je bil pomembno povezan s koncentracijo trombocitov, fibrinogena in Lp(a) (slika 6).



Slika 6. Povezava med obsegom kajenja (trajanje kajenja \times št. cigaret na dan) in koncentracijo fibrinogena. r – korelacijski koeficient, p – raven tveganja.

Razprava

Klinične značilnosti preiskovancev

V naši študiji je bila skupina kadilcev po kliničnih značilnostih povsem primerljiva s skupino zdravih nekadilcev, z izjemo sistoličnega krvnega tlaka, ki je bil pri kadilcih nižji kot pri nekadilcih. Toda vrednosti krvnega tlaka so bile pri vseh preiskovancih obeh skupin še v normalnem območju. Najdba nižjega sistoličnega krvnega tlaka pri kadilcih je v nasprotju z znanim akutnim učinkom kajenja na simpatično živčevje. Kajenje namreč poveča sproščanje kateholaminov in s tem tonus simpatičnega živčevja, vendar je ta učinek kratkotrajen. Kronični učinek kajenja pa naj bi bil obraten. Kajenje naj bi namreč dolgoročno zvečalo občutljivost gladkih mišičnih celic na endogene vazodilatatorske dražljaje, zato naj bi imeli kadilci v osnovnih pogojih v povprečju nižji krvni tlak kot nekadilci (38).

Laboratorijske ugotovitve

V naši raziskavi smo pri kadilcih odkrili pomembne razlike v nekaterih laboratorijskih spremenljivkah glede na nekadilce. Zlasti so se kadilci razlikovali od nekadilcev v številu levkocitov in trombocitov. Obe števili sta bili pri kadilcih zvečani, medtem ko je bilo število eritrocitov zmanjšano. Zvečanje števila trombocitov in levkocitov je bilo pričakovano. Zvečano število levkocitov in večje koncentracije fibrinogena naj bi bile pri kadilcih posledica prisotnosti kroničnega vnetnega procesa in povečanega izločanja adrenalina (39, 40).

Podobne spremembe pri kadičih so odkrili tudi v drugih raziskavah (39, 41, 42). Čeprav mehanizem nastanka teh sprememb ni povsem jassen, pa gre za spremembe, ki pomembno vplivajo na hemoreološke lastnosti krvi in zmanjšujejo njeno tekočnost. Med dejavnike, ki najodločilneje vplivajo na viskoznost in tekočnost krvi, sodi koncentracija fibrinogena, ki je bila pri naših kadičih pomembno večja kot pri nekadičih. Poleg tega je zvečana koncentracija fibrinogena znana kot neodvisni dejavnik tveganja za aterosklerozo. Tudi v drugih študijah so našli pozitivno povezavo med kajenjem in zvečano koncentracijo fibrinogena v krvi (20–23, 41). Zaradi zvečanih koncentracij trombocitov in fibrinogena naj bi bili kadičji bolj podvrženi različnim trombotičnim zapletom. Večje število trombemboličnih zapletov pri kadičih naj bi bilo pogojeno tudi z večjo reaktivnostjo trombocitov in povečano lepljivostjo trombocitov na žilno steno (26, 43). Hemoreološke spremembe so odvisne od količine pokajenih cigaret in so prehodnega značaja, saj se po prenehanju kajenja normalizirajo že v nekaj mesecih (39, 44).

Zmanjšano število eritrocitov, ki smo ga našli pri naših kadičih, ni bilo povsem pričakovano, saj je znano, da določene dejavnike tveganja, vključno s kajenjem, pogosto spremljata zvečan hematokrit in zvečano število eritrocitov (39, 41). Zvečano število eritrocitov in zvečano koncentracijo hemoglobina, ki so bile najdene v večini študij pri kadičih, razlagajo s kronično hipoksemijo in prisotnostjo ogljikovega monoksida v krvi (39). Zato je bila naša najdba verjetno povsem slučajna in so pri tem sodelovali nam neznan dejavniki.

Naši kadičji so se značilno razlikovali od nekadičev tudi po manjših koncentracijah HDL-holesterola, kar kaže na to, da kajenje kot dejavnik tveganja deluje aterogeno tudi preko zmanjšanja koncentracije HDL-holesterola. Znano je namreč, da so zmanjšane koncentracije HDL-holesterola, zlasti pri ženskah, zelo pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze (19, 45). Zaradi kajenja naj bi prišlo do sprememb določenih apolipoproteinov in povečanega sproščanja prostih maščobnih kislin, kar povzroči zmanjšanje koncentracije HDL-holesterola. Poleg tega se pri kadičih HDL-holesterol (podobno kot LDL-holesterol) v večjem obsegu oksidira in kot tak pospešuje aterogenezo (17, 18, 44). Nekatere študije so pri kadičih odkrile tudi povečane koncentracije celotnega in LDL-holesterola (46). V naši študiji so se pri kadičih sicer nakazovale nekoliko večje koncentracije LDL-holesterola, toda razlika ni bila statistično značilna. Pri iskanju povezav smo ugotovili, da se je koncentracija LDL-holesterola povečevala s trajanjem kajenja.

Pri kadičih smo našli pomembno manjšo vrednost TIBC. TIBC predstavlja transferin, ki posredno kaže zalogo železa v telesu. Čim manjša je koncentracija TIBC (pri zdravem človeku), tem večje so zaloge železa v telesu. Zvečane zaloge železa naj bi po ugotovitvah nekaterih študij delovale aterogeno preko povečane tvorbe prostih radikalov. Slednji so odgovorni za oksidacijo LDL-holesterola, ki običajno poteka v subendotelnih plasteh arterij. Za zmanjšane vrednosti TIBC so dokazali, da predstavljajo močan neodvisni negativni dejavnik tveganja za srčno-mišični infarkt (47, 48).

Morfološke spremembe karotidnih arterij

V naši študiji je DIM pri zdravih preiskovancih v povprečju znašala 0,59 mm, kar je primerljivo z ugotovitvami drugih študij (29, 49). Podobno kot v drugih raziskavah so imeli tudi v naši raziskavi zdravi preiskovanci najdebelejšo IM v območju bulbusa (50, 51).

Pri kadilcih smo ugotovili pomembno večjo DIM kot pri zdravih preiskovancih. DIM se je pri kadilcih v primerjavi z nekadilci najbolj povečala v področju bulbusa. Že pri osebah, ki so kadile manj kot 15 let, smo v področju bulbusa našli pomembno večje vrednosti DIM kot pri nekadilcih, medtem ko se povprečne vrednosti DIM še niso pomembno razlikovale od nekadilcev. DIM se je povečevala s trajanjem kajenja in s številom dnevno pokajenih cigaret. To pomeni, da je kajenje pomemben dejavnik, ki vpliva na morfolgijo žilne stene. Izsledki naše raziskave kažejo, da škodljivost kajenja zvezno narašča z intenzivnostjo kajenja, saj so bile morfološke spremembe preiskovanih arterij tem bolj izražene, čim dalj je preiskovanec kadil in čim več cigaret je pokadil na dan.

Zadebelitev notranjih plasti žilne stene še ne predstavlja aterosklerotične lezije, z veliko verjetnostjo pa napoveduje kasnejši razvoj aterosklerotičnih sprememb. V prid tej trditvi govori največja DIM v območju bulbusa, ki je tudi predilekcijsko mesto za nastanek ateroskleroze. Nadalje govorijo v prid tej trditvi ugotovitve nekaterih študij, kjer so našli tesno povezavo med DIM ter velikostjo in številom aterosklerotičnih plakov (51, 52). Za tesno povezavo med DIM in vplivi različnih dejavnikov tveganja priča tudi izginotje intimalne zadebelitve po odstranitvi določenega dejavnika tveganja. Tako so ugotovili, da se je pri bolnikih s povišanim krvnim tlakom zadebeljena IM stanjšala na normalo, če so jim z zdravili znižali krvni tlak (53).

Povečanje DIM pri kadilcih je lahko posledica neposrednega toksičnega učinka različnih snovi, ki so prisotne v cigaretinem dimu in kvarno delujejo na endotelij ter na subendotelne sestavine žilne stene (8, 12, 14, 54). Zadebelitev IM predstavlja verjetno prilagoditveni mehanizem oziroma način, kako žilna stena odgovori na poškodbo. K zadebelitvi IM karotidnih arterij pri kadilcih pa so verjetno prispevale tudi spremljajoče biokemične spremembe – zlasti spremenjena presnova maščob (zvečana koncentracija celotnega in LDL-holesterola ter zmanjšana koncentracija HDL-holesterola) in zvečana koncentracija fibrinogena v serumu. Pri manjši koncentraciji HDL-holesterola je izstopanje LDL-holesterola iz žilne stene zmanjšano, zato se ta nabira v subendotelnih plasteh. To vodi do kopičenja makrofagov in penastih celic in je lahko vzrok za zadebelitev IM pri kadilcih (1, 6, 55). Zvečana koncentracija fibrinogena lahko okvari žilno steno na različne načine in tako pripelje do njene zadebelitve. Zvečana koncentracija fibrinogena vpliva na povečano odlaganje in prepojitev arterijske stene s fibrinogenom. Obenem fibrinogen povečuje viskoznost krvi in agregabilnost trombocitov (43). V prid tem ugotovitvam govorijo tudi rezultati naše študije, zlasti tesna povezava med zvečano koncentracijo fibrinogena pri kadilcih in DIM.

DIM je bila pri naših preiskovancih povezana tudi z nekaterimi drugimi dejavniki. Tako smo našli pozitivno povezavo s kliničnimi značilnostmi preiskovancev, kot sta indeks telesne teže in starost, ter z nekaterimi laboratorijskimi spremembami, ki so bile pri kadilcih bolj izražene. Med laboratorijskimi spremenljivkami so na DIM vplivale zvečana koncentracija celotnega in LDL-holesterola ter zvečana koncentracija fibrinogena in Lp(a). Za starost je znano, da vpliva na DIM, in da se DIM povečuje za približno 0,6 % na leto (51, 56). Pričakovano je bil tudi vpliv lipidov na DIM, saj sodi zlasti zvečana koncentracija LDL-holesterola med najbolj znane dejavnike tveganja (19, 45). Zato pri osebah, ki imajo zvečano koncentracijo celotnega in LDL-holesterola ter zmanjšano koncentracijo

HDL-holesterola (kar je pri kadičih pogosta najdba), pričakujemo zgodnejši pojav morfoloških sprememb arterijske stene.

Hemodinamske spremembe brahialne arterije

Pri kadičih smo že v mirovanju našli značilno manjši pretok krvi v brahialni arteriji kot pri nekadičih, in to kljub temu da v premerih preiskovanih arterij med skupinami v mirovanju ni bilo pomembnih razlik. Med reaktivno hiperemijo je prišlo v obeh skupinah do pomembnega povečanja pretoka krvi. To povečanje je bilo nekoliko manjše v skupini kadičev, vendar razlika ni bila statistično značilna.

Skupini sta se pomembno razlikovali v obsegu razširitve brahialne arterije med reaktivno hiperemijo. Pokazalo se je, da se med provokacijskim testom brahialne arterije pri kadičih pomembno manj razširijo kot pri osebah, ki ne kadijo. Ta ugotovitev kaže na okvarjeno delovanje endotelija. Razširitev periferne arterije med reaktivno hiperemijo je povzročena z zvečanim sproščanjem vazodilatacijskih snovi (EDRF), do česar pride zaradi povečanega toka krvi (30, 57, 58). Zmanjšan dilatatorni odgovor pri kadičih je lahko posledica manjše občutljivosti gladkih mišičnih celic v steni arterije na vazodilatacijske dražljaje, težjega dostopa snovi z dilatativnim učinkom (EDRF, PGI₂) do subendotelialnih mišičnih struktur zaradi zadebeljene IM, najverjetnejši vzrok za zmanjšan dilatacijski odgovor pa je zmanjšana sinteza in sproščanje EDRF zaradi okvare endotelne celice (26, 27, 59).

Rezultati naše raziskave tudi kažejo, da je bilo kajenje pri obeh spolih povezano z manjšim pretokom krvi v brahialni arteriji med mirovanjem, zlasti je bilo to opazno pri kadičkah, ki so imele pomembno manjši pretok krvi kot kadičci. Po drugi strani pa so kadičci imeli pomembno manjše vrednosti HDL-holesterola kot kadičke, čeprav je bil tudi pri slednjih HDL-holesterol nižji kot pri nekadičkah. To kaže, da se škodljivi učinki kajenja razlikujejo glede na spol, zlasti so bile razlike med spoloma opazne v presnovi maščob. Ker v številu pokajenih cigaret med spoloma ni bilo pomembnih razlik, so bile omenjene razlike verjetno konstitucionalno pogojene, najverjetneje so bile posledica hormonskih različnosti med spoloma.

Rezultati naše študije so torej skladni z ugotovitvami drugih raziskav, ki so pokazale, da kajenje povzroča okvaro endotelija. Posledica okvare endotelija pa je nesposobnost razširitve arterije med hiperemijo, kar sodi med najzgodnejše zaznavne spremembe aterogeneze (26, 43). Okvarjeno delovanje endotelija je verjetno tudi eden od najpomembnejših mehanizmov, preko katerega kajenje pospešuje aterogenezo. Okvarjeno delovanje endotelija napoveduje kasnejše aterosklerotične žilne spremembe, kar kažejo ugotovitve raziskav na primatih in na človeških presajenih srcih (60, 61). Na vzročno povezanost med kajenjem in aterogenezo kaže tudi s količino cigaret pogojena stopnja endotelne okvare. Tako je Celermajer s sodelavci našel pri osebah, ki so pokadile 20 in več cigaret dnevno, močno okvarjeno ali pa povsem odsotno sposobnost razširitve brahialne arterije med reaktivno hiperemijo (26). Toda zdi se, da učinek kajenja na delovanje endotelija ni takojšen. Pri naših kadičih namreč nismo našli sprememb v sposobnosti razširitve brahialne arterije neposredno po pokajeni cigareti, v primerjavi z rezultati

pred kajenjem. To se sklada z ugotovitvami Celermajerja in sodelavcev, ki prav tako niso našli povezave med koncentracijo nikotina v slini (ki kaže na akutno izpostavitve cigaretnemu dimu) in sposobnostjo razširitve brahialne arterije (26). Obstaja pa možnost, da bi bili rezultati drugačni, če bi kadilci pokadili cigareto z večjo vsebnostjo nikotina in če bi ugotavljali akutni učinek kajenja tudi pri nekadilcih, česar zaradi etičnih zadržkov nismo izvedli.

Zaključki

Kajenje kot dejavnik tveganja za aterosklerozo povzroča spremembe v sestavi krvi ter morfološke in funkcijske spremembe arterijske stene.

Med najbolj značilne spremembe v sestavi krvi, ki napovedujejo pospešeno aterosklerozo pri kadilcih, sodita zmanjšana koncentracija HDL-holesterola in TIBC ter zvečana koncentracija fibrinogena.

Kadilci imajo tudi take spremembe v sestavi krvi (zvečano število levkocitov in trombocitov ter povečano koncentracijo fibrinogena), ki zmanjšujejo njeno tekočnost in povečujejo pogostnost trombemboličnih zapletov.

S trajanjem kajenja se spremembe v sestavi krvi poslabšujejo: poveča se koncentracija celotnega holesterola in LDL-holesterola, število trombocitov, koncentracija fibrinogena in Lp(a).

Pretok krvi v perifernih arterijah (brahialnih arterijah) je pri kadilcih manjši kot pri nekadilcih.

Kadilci imajo moteno sposobnost razširitve brahialne arterije med reaktivno hiperemijo, kar kaže na okvarjeno delovanje endotelija.

Kadilci imajo značilno večje povprečne vrednosti DIM karotidnih arterij kot nekadilci. DIM se pri kadilcih najbolj poveča v bulbusu, kjer je tudi v normalnih razmerah največja.

DIM se povečuje s trajanjem kajenja in s številom dnevno pokajenih cigaret.

DIM je povezana tudi s starostjo preiskovancev, s koncentracijo celotnega in LDL-holesterola, s koncentracijo fibrinogena, trigliceridov in Lp(a).

Zdi se, da kajenje nima neposrednega akutnega učinka na sposobnost razširitve brahialne arterije.

Učinek kajenja je odvisen od spola preiskovanca. Tako kajenje pri moških bolj zniža koncentracijo HDL-holesterola v krvi kot pri ženskah. Pri ženskah pa bolj prizadene pretok krvi v brahialni arteriji kot pri moških.

Zahvala

Zahvaljujema se mentorju prof. dr. Pavlu Poredošu, dr. med., ki naju je uvedel v raziskovalno delo, nama pomagal pri reševanju problemov in za naju žrtvoval veliko časa.

As. mag. Viktorju Videčniku, dr. med., se zahvaljujema za potrpežljivo učenje ultrazvočne tehnike in koristne nasvete.

As. mag. Igorju Bardorferju, dr. med., se zahvaljujema za prijaznost in pripravljenost pomagati, kadar sva potrebovali pomoč pri delu z ultrazvokom.

Mag. Barbari Salobir - Pajnič, dr. med., se zahvaljujema za spodbudo ob seznanjanju z raziskovalnim delom.

Rajku Košnjeku se zahvaljujema za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujema se višji medicinski sestri Brigiti Valenčič za pomoč pri odvzemu krvi.

Osebjem laboratorija v Interni kliniki Trnovo se zahvaljujema za prijaznost in za brezplačno opravljene laboratorijske preiskave.

Zahvaljujema se gospe Jelki Kos in vsem drugim zaposlenim v Interni kliniki Trnovo za številne drobne, a ne nepomembne usluge.

Najlepša hvala vsem prostovoljkam in prostovoljcem, ki so žrtvovali svoj čas in s svojim sodelovanjem omogočili nastanek te raziskovalne naloge.

Literatura

1. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 791–804.
2. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 885–91.
3. Libby P, Warner SJC, Salomon RN, Birinyi LK. Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med* 1988; 318: 1493–98.
4. Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis: II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1986; 125: 191–207.
5. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131–8.
6. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site of macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 333–7.
7. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis: evolving concepts. *Circulation* 1990; 82: (Suppl 2): 47–59.
8. Blann AD, McCollum CN. Adverse influence of cigarette smoking on the endothelium. *Thrombosis & Haemostasis* 1993; 70: 707–11.
9. Fielding JE. Smoking: Health effects and control. *N Engl J Med* 1985; 313: 491–8.
10. Tell GS, Polak JF, Ward BJ, Kittner SJ, Savage PJ, Robbins J. Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults. The cardiovascular health study. *Circulation* 1994; 90: 2905–8.
11. Zhu BQ, Parmley WW. Hemodynamic and vascular effects of active and passive smoking. *Am Heart J* 1995; 130: 1270–5.
12. Pre J, LeFloch R, Vassy R, LeNoble C. Increased plasma levels of fluorescent lipid-peroxidation products in cigarette smokers. *N Engl J Med* 1989; 17: 1029–30.
13. Blann AD. Increased circulating levels of von Willebrand factor antigen in smokers may be due to lipid peroxides. *Med Sci Res* 1991; 19: 535–6.
14. Blaes N, Piovella F, Samaden A, Bouterin-Falson O, Ricetti M. Nicotine alters fibronectin and factor VIII/vWF in human vascular endothelial cells. *Br J Haematol* 1986; 64: 675–87.
15. Blann AD. The acute influence of smoking on the endothelium (letter; comment). *Atherosclerosis* 1992; 96: 249–50.
16. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biomed Sci* 1990; 15: 129–35.

17. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915–24.
18. Yokode M, Nagano Y, Ueyama K, Ueda Y, Kita T. Cigarette smoke and lipoprotein modification. A possible interpretation for development of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748: 294–300.
19. Axelsen M, Eliasson B, Joheim E, Lenner RA, Taskinen MR, Smith U. Lipid intolerance in smokers. *J Intern Med* 1995; 237: 449–55.
20. Wilhelmssen L, Swärdsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1984; 311: 501.
21. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. *J Am Med Assoc* 1987; 311: 1183.
22. Eliasson M, Asplund K, Evrin PE, Lundblad D. Relationship of cigarette smoking and snuff dipping to plasma fibrinogen, fibrinolytic variables and serum insulin. The Northern Sweden MONICA Study. *Atherosclerosis* 1995; 113: 41–53.
23. Ogston D, Bennett NB, Ogston CM. The influence of cigarette smoking on the plasma fibrinogen concentration. *Atherosclerosis* 1970; 11: 349–52.
24. Robertson D, Tseng C-J, Appalsamy M. Smoking and mechanisms of cardiovascular control. *Am Heart J* 1988; 115: 258–63.
25. Wilhelmssen L. Coronary heart disease: Epidemiology of smoking and intervention studies of smoking. *Am Heart J* 1988; 115: 242–9.
26. 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.
27. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334: 150–4.
28. Jacobs MC, Lenders JW, Kapma JA, Smits P, Thien T. Effect of chronic smoking on endothelium-dependent relaxation in humans. *Clin Sci* 1993; 85: 51–5.
29. 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.
30. Melkumyants AM, Balashov SA, Khayutin VM. Endothelium dependent control of arterial diameter by blood viscosity. *Cardiovasc Research* 1989; 23: 741–7.
31. Kek A. *Zgodnje funkcijske in morfološke spremembe arterijske stene pri sladkorni bolezni*. Prešernova naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1995.
32. Allain CC, Poon LS, Chan GSG. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1970; 20: 470–5.
33. Warnick GR. Dextran sulphate – Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28: 1379–88.
34. Bucolo G, David M. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476–82.
35. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of plasma low density lipoprotein-cholesterol concentration without use of preparation ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499–502.
36. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des fibrinogens. *Acta Haemat* 1957; 17: 237–46.
37. Adamič Š. *Temelji biostatistike*. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, 1989.
38. Rängemark C, Wennmalm G. Endothelium-dependent and independent vasodilation and reactive hyperemia in healthy smokers. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: Suppl 12: 198–201.
39. Ernst E, Mairai A, Schmölzl CH, Magyarosy I. Dose-effect relationship between smoking and blood rheology. *B J Haematol* 1987; 65: 485–7.
40. Pilegram LO, Pickard LR. Control of fibrinogen biosynthesis: the role of free fatty acids. *J Ather Research* 1968; 8: 155–9.
41. McGill HC. The cardiovascular pathology of smoking. *Am Heart J* 1988; 115: 250–7.

42. Galea G, Davidson RJL. Haematological and haemorheological changes associated with cigarette smoking. *J Clin Pathol* 1985; 38: 978–84.
43. Smith FB, Lowe GDO, Fowkes FGR, et al. Smoking, haemostatic factors and lipid peroxides in a population case control study of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 1993; 102: 155–62.
44. Green MS, Harari G. A prospective study of the effects of changes in smoking habits on blood count, serum lipids and lipoproteins, body weight and blood pressure in occupationally active men. The Israeli Cordis Study. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 1159–66.
45. Mjfs OD. Lipid effects of smoking. *Am Heart J* 1988; 115: 272–5.
46. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *Br Med J* 1989; 298: 784–8.
47. 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; 89: 102–8.
48. Weiss G, Ffuchs D, Wachter H. High stored iron levels and the risk of myocardial infarction. *Circulation* 1993; 87: 1425.
49. 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.
50. Sary HC. Changes of components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basis Reas Cardiol* 1994; 89: Suppl 1: 17–32.
51. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation* 1993; 87: Suppl 2: 56–65.
52. Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J. Atherosclerotic changes in the femoral and carotid arteries in familial hypercholesterolemia. Ultrasonographic assessment of intima-media thickness and plaque occurrence. *Arteriosclerosis* 1993; 13: 1404.
53. Salonen R, Salonen JT. Carotid atherosclerosis in relation to systolic and diastolic blood pressure: Kuopio ischemic heart disease risk factor study. *Annals of Medicine* 1991; 23: 23–7.
54. Davis JW, Shelton L, Eigenberg DA, et al. Effects of tobacco and non-tobacco smoking on endothelium and platelets. *Clin Pharmacol Ther* 1985; 37: 529–33.
55. Ross R The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective of the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801–9.
56. Poredoš P, Kek A. Možnosti odkrivanja zgodnjih aterosklerotičnih sprememb arterijske stene. *Zdrav Vestn* 1996; 65: 131–5.
57. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986; 8: 37–44.
58. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: 1145–9.
59. 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.
60. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistad DD. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 1987; 80: 1808–11.
61. Fish RD, Nabel EG, Selwyn AP, et al. Responses of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine. *J Clin Invest* 1988; 81: 21–31.