

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Tomáš Šejda

Praha 2008

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Obor vnitřní nemoci

DISERTAČNÍ PRÁCE

Endoteliální funkce a dysfunkce, možnosti detekce a vztah

k vybraným rizikovým faktorům aterosklerózy



Disertační práce je předkládána ve formě monotématicky zaměřeného souboru 4 vědeckých publikací.

MUDr. Tomáš Šejda

I. interní klinika FTN a IPVZ, Praha

Pracoviště pro výzkum aterosklerózy IKEM, Praha

Školitel: Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc.

Školitel-konzultant: Doc. MUDr. Renata Cífková, CSc.

Praha 2008

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Základní funkce endotelu.....	7
2.1 Funkce semipermeabilní membrány.....	7
2.2 Regulace optimální cévní průchodnosti.....	8
2.3 Zajištění integrity cévy a kontrola reparačních pochodů.....	9
2.4. Schéma funkcí endotelu.....	11
3. Možnosti detekce endoteliální funkce.....	12
3.1 Zobrazovací metody.....	12
3.2 Dynamické testy.....	13
3.3 Koncentrace endoteliálních působků.....	13
3.4 Flow-mediated dilatation.....	14
4. Ateroskleróza a endoteliální funkce.....	17
4.1 Příčiny endoteliální dysfunkce.....	17
4.2 Vliv kardiovaskulárních rizikových faktorů.....	18
4.3 Klinické projevy endoteliální dysfunkce.....	19
5. Možnosti ovlivnění endoteliální funkce.....	20
5.1 Dyslipidémie.....	20
5.2 Superoxidové ionty.....	21
5.3 Arteriální hypertenze.....	21
5.4 Diabetes mellitus.....	22
5.5 Možnosti léčby.....	22
6. Cíle disertační práce.....	24
7. Základní publikace disertační práce	26

8. Publikace č. 1.....	27
Cévní endotheliální dysfunkce, možnosti detekce a ovlivnění	28
9. Publikace č. 2.....	33
Limitation of non-invasive endothelial function assessment by	
brachial artery flow-mediated dilatation.....	34
10. Publikace č. 3.....	38
The effect of an acute fat load on endothelial function after	
different dietary regimens in young healthy volunteers.....	39
11. Publikace č. 4.....	46
The effect of fluvastatin on cICAM-1 as a biomarker of endothelial	
dysfunction in patients with dyslipidemia.....	45
12. Diskuse na základě publikovaných dat.....	51
13. Souhrn.....	55
14. Poděkování.....	58
15. Seznam publikací.....	59
16. Literatura.....	61

1. Úvod

Cévní endotel je tvořen vrstvou buněk, dlouho považovanou pouze za semipermeabilní membránu, bránící prostupu makromolekul cévní stěnou a vytvářející nesmáčivý povrch (1). Endoteliální buňky tvoří jednovrstevnou vnitřní výstelku cévního lumen, mají nepravidelný podlouhlý tvar, nasedají na bazální membránu a subendoteliální vazivo, svou dlouhou osou jsou souběžné se směrem krevního proudu. Celkový povrch endotelu představuje u člověka plochu asi 500 až 1000 m², jeho hmotnost je odhadována přibližně na 1,5 až 3 kg (2).

Výzkum v posledních letech však prokázal, že endotel je metabolicky velmi aktivní orgán s celou řadou fyziologických funkcí. Robert Francis Furchgott v roce 1978 objevil, že buňky cévního endotelia produkují neznámou látku, kterou nazval EDRF (endothelium-derived relaxing factor), která způsobuje uvolnění a rozšíření cév (3). V roce 1986 zjistil, že EDRF je ve skutečnosti oxid dusnatý (NO). Za objasnění role oxidu dusnatého jako látky ovlivňující nervový systém hladkého svalstva obdržel společně s Louisem Ignarrem a Feridem Muradem v roce 1998 Nobelovu cenu.

Je známo, že buňky endotelu mohou tvořit asi 25 různých biologicky aktivních látek. Endotel je rozsahem tvorby těchto látek a svou plochou největším autokrinním, parakrinním a endokrinním orgánem lidského organismu. Podílí se na regulaci průtoku krve a tonu cévní stěny, aktivaci krevních destiček, adhezi monocytů k cévní stěně, trombogenezi, metabolismu lipidů a růstu cév. Vzhledem k těmto aktivitám je klíčovým faktorem při vzniku aterosklerózy, hypertenze a srdečního selhání (4,5).

Nejdůležitějšími látkami tvořenými endotelem jsou vazodilatátory – endoteliální relaxační faktor (EDRF), neboli oxid dusnatý (NO) a některé z prostaglandinů – prostacyklin PGI_2 a prostaglandin E_2 a vazokonstrikčně působící endotelin-1 (ET-1) a angiotenzin II (2).

Vedle vazodilatace a vazokonstrikce má význam podíl endotelu na tvorbě trombu. Za normálních okolností endotel představuje netrombogenní povrch (je toho dosahováno uvolňováním NO, prostacyklinu, tkáňového aktivátoru plazminogenu - tPA a heparansulfátu) (6). Poškozením endotelu je vyvoláváno shlukování krevních destiček (snížením dostupnosti NO a prostacyklinu) a zvýšeným uvolňováním inhibitoru tkáňového aktivátoru plazminogenu (PAI-1) a von Willebrandova faktoru (vWF) (7).

Hypercholesterolemie i jiné rizikové faktory ischemické choroby srdeční (ICHS) vyvolávají dysfunkci endotelu, která se projeví sníženou dostupností NO. Narušené funkce endotelu je možné zlepšit ovlivněním rizikových faktorů, především pak snížením LDL cholesterolu. Endotelová dysfunkce je někdy považována za časnou manifestaci aterosklerózy (8). Některé studie zjistily poruchu funkce endotelu u osob s rizikovými faktory ICHS, ale s ještě normálním angiografickým nálezem. Na druhé straně k úpravě endotelové funkce došlo rychle po omezení rizikových faktorů, i když angiografické změny přetrvávaly (9).

Klinické studie, v nichž byla použita různá hypolipidemika (statiny, fibráty), případně LDL-aferéza, potvrdily, že současně se snížením cholesterolu dochází k normalizaci funkce endotelu (10). Z toho vyplývá, že zlepšení funkce endotelu může být jedním z mechanismů, kterými je při hypolipidemické léčbě rychle zabezpečována stabilita aterosklerotických plátů a sníženo riziko vytvoření trombu (11).

Skutečnost, že dysfunkci endotelu lze pomocí hypolipidemik odstranit i při rozvinuté ateroskleróze, je považována za doklad oprávněnosti názoru, že hlavní příčinou dysfunkce jsou rizikové faktory ICHS, nikoli ateroskleróza (tj. dysfunkce endotelu předchází ateroskleróze) (2,11,12).

2. Základní funkce endotelu

2.1 Funkce semipermeabilní membrány

Jednou ze základních funkcí endotelu je zajištění řízené propustnosti mezi krví a okolními tkáněmi. Endotel kontroluje prostup jak pro buněčné elementy, tak pro nebuněčné krevní komponenty. Nebuněčné komponenty využívají pro svou cestu jak paracelulární, tak transcelulární transportní mechanismy. Prostup krevních elementů (především leukocytů) je realizován pomocí vazoadhezivních molekul, kterých endotel na svém povrchu exprimuje celou řadu (13).

Migrace leukocytů začíná aktivací a interakcí selektinů, tyto interakce zprostředkovávají prvotní kontakt leukocytů (L-selektiny) s aktivovaným endotelem (E-selektiny, event. P-selektiny), a přechází do tzv. rolování leukocytů podél endoteliálních buněk (14). Následuje vazba mezi integriny na povrchu leukocytů (LFA-1, MAC-1) a příslušnými adhezivními molekulami na povrchu endoteliálních buněk (ICAM-1, VCAM-1). Tato vazba je silnější, dochází k adhezi leukocytů. Třetí fáze – transmigrace leukocytů do subendoteliálních prostor – je zprostředkována dalšími adhezivními molekulami (PECAM-1) a cytokiny (MCP-1) (15).

2.2 Regulace optimální cévní průchodnosti

Druhou úlohou endotelu je řízení optimálního průtoku krve cévou. Endotel syntetizuje celou řadu látek s vazoaaktivním účinkem. Mezi nejdůležitější patří oxid dusnatý (NO). Jeho tvorba je zprostředkována NO-syntázou, která je specificky aktivována smykovým napětím krevního proudu (shear stress), hypoxií a celou řadou působků. NO má mohutný vazodilatační účinek, inhibuje expresi adhezivních molekul, adhezi a agregaci trombocytů a apoptózu endoteliálních buněk (2). Brzdí také migraci myocytů z medie, jejich proliferaci a transformaci v sekreční buňky.

Mezi další vazodilatační faktory produkované endotelem se řadí prostacyklin PGI₂. Prostacyklin působí aditivně k účinku NO, je uvolňován za obdobných situací, jejich účinek se také navzájem potencuje. Třetím vazodilatačně působícím faktorem je endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), jehož hlavní biologickou úlohou je pravděpodobně vazodilatace v koronárním řečišti (16,17).

K zachování rovnováhy vzniká v endotelu několik látek s vazokonstrikčním působením, z nichž nejvýznamnější jsou endoteliny – v endotelu je produkován endotelin-1. Vedle podnětů, které vedou i k uvolnění NO (například bradykinin, angiotenzin II, shear stress), stimulují syntézu endotelinu-1 některé aterogenní proteiny (trombin) nebo lipoproteiny-oxidovaný LDL (ox-LDL) (12). V intaktních cévách působí endotelin-1 bimodálně – vazokonstrikční účinek je mírněn současnou stimulací produkce NO a prostacyklinu. Plná vazokonstrikce se objeví až při poškození endotelu. Endotelin-1 také stimuluje proliferaci myocytů v cévní stěně (18). Na povrchu endotelu je také vázán angiotenzin-konvertující enzym (ACE) a endotel může prostřednictvím změny jeho aktivity ovlivňovat hladiny angiotenzinu II a bradykininu (19).

2.3 Zajištění integrity cévy a kontrola reparačních pochodů

Další funkcí endotelu je zajištění integrity cévního řečiště. Intaktní endotel je dokonale nesmáčivým povrchem. Už při pouhé deskvamaci endoteliálních buněk dochází k absorpci vWF, který prostřednictvím destičkových receptorů aktivuje adhezi trombocytů, jež se vážou na subendoteliálně lokalizovaná vlákna kolagenu. Poté dochází k jejich aktivaci a degranulaci, což vede k uvolnění řady dalších proagregačně a vazokonstrikčně působících látek. Prostřednictvím destičkových receptorů IIb/IIIa a fibrinogenu destičky agregují. Primární destičková fáze hemokoagulace je doprovázena sekundární hemostázou, na jejímž konci je přeměna fibrinogenu trombinem v nerozpustný fibrin. I tato fáze je ovlivnitelná endotelem (2,6).

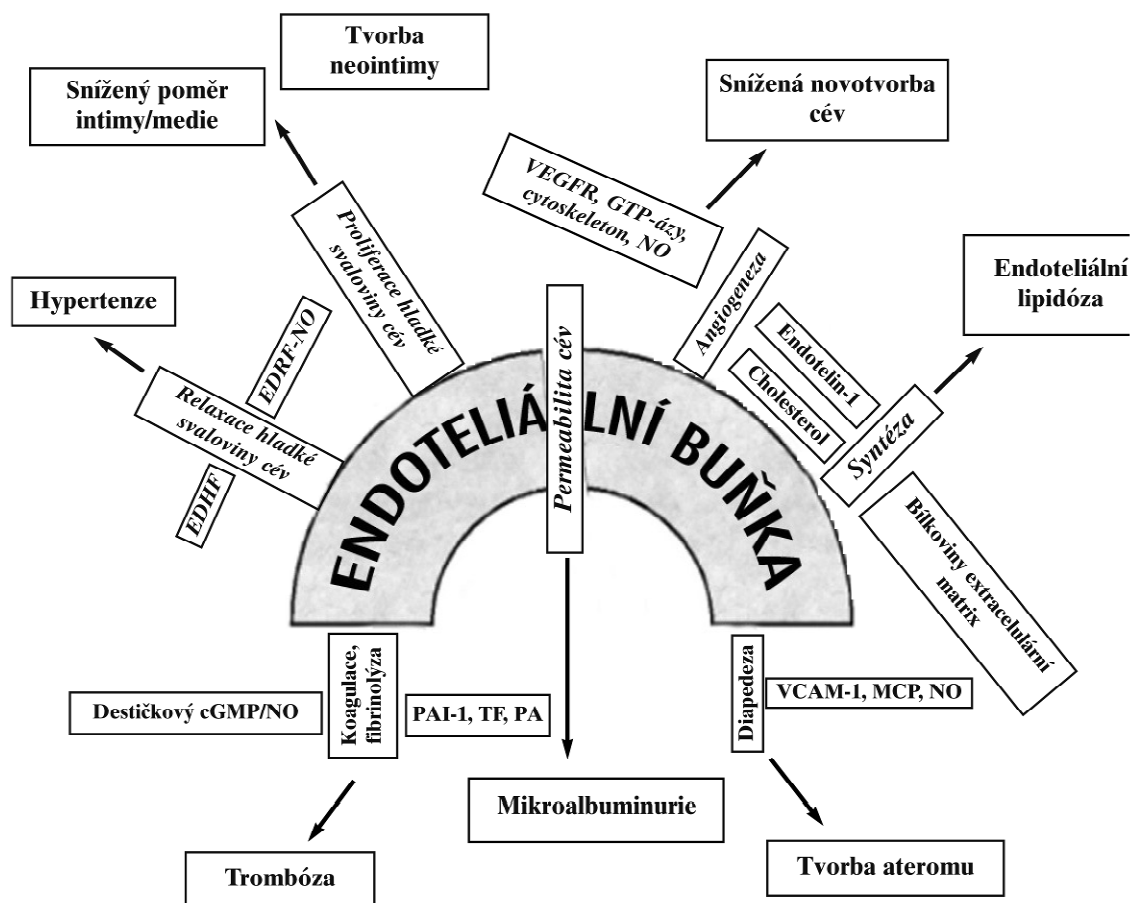
Endotel váže na svém povrchu antitrombin III, který inaktivuje trombin, a vzniklý komplex je z cirkulace odstraněn. Endotel také produkuje trombomodulin. Komplex trombomodulin-trombin má už omezenou schopnost štěpit fibrinogen, navíc aktivuje protein C, který – v komplexu s proteinem S – inaktivuje faktory Va a VIIa, a tím inhibuje koagulaci (2,7).

Endotel reguluje navíc i fibrinolýzu. Klíčovým enzymem štěpícím molekuly fibrinu je plazmin. Ten vzniká z cirkulujícího plazminogenu působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA). Ten naopak může být inhibován svým inhibitorem (PAI-1). Jak t-PA, tak PAI-1 jsou v endotelu syntetizovány a mohou být v různém poměru uvolňovány.

Endotel může zasahovat i do reparačních procesů a angiogeneze. Reparativní pochody v cévní stěně jsou řízeny řadou cytokinů. Mezi růstové faktory a cytokiny endoteliálního původu jsou řazeny například transformující růstový faktor beta, fibroblastový

růstový faktor, destičkový růstový faktor, interleukin-1 a endotelin-1 (20). Tyto mitogeny stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendoteliálního prostoru z medie s následnou hyperplazií intimy a hypertrofií cévní stěny. Naopak velmi významným antimitogenem je NO, který inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny a zabraňuje hypertrofii cévní stěny (21,22).

2.4 Schéma funkcí endotelu



V tomto schématu jsou všechny funkce na sobě vzájemně závislé a případná porucha jedné z nich by ovlivnila všechny ostatní. Patofyziologické důsledky endoteliální dysfunkce jsou uvedeny na obvodu schématu.

Zkratky: EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDRF, endothelium-derived relaxing factor; NO, oxid dusnatý; PAI-1, inhibitor aktivátoru plazminogenu-1; TF, tkáňový faktor; PA, aktivátor plazminogenu; MCP, monocytární chemotaktický protein.

3. Možnosti detekce endoteliální funkce

3.1 Zobrazovací metody

Snížení biologické dostupnosti NO v důsledku endoteliální dysfunkce je patofyziologickým podkladem omezené schopnosti tepenné stěny reagovat přiměřenou vazodilatací na určité, tzv. endotel-dependentní podněty. Tento stav nedostatečné vazomotorické odpovědi, a v určitých případech dokonce paradoxní vazokonstrikce, je jedním z prvních objektivně měřitelných projevů endoteliální dysfunkce (23,24).

Zobrazovací metody, jež stanovují endoteliální dysfunkci na základě reakce cévní stěny, lze rozdělit na invazivní a neinvazivní. Přímo v koronárním řečišti lze pomocí kvantitativní koronarografie nebo intrakoronární dopplerovské ultrasonografie posuzovat schopnost dilatace epikardiálních věnčitých tepen po podání infuze acetylcholinu, který představuje endotel-dependentní podnět, obdobně jako bradykinin nebo L-arginin. Ke srovnání lze užít jiné endotel-independentní podněty, například nitráty, adenosin či papaverin (25,26).

Vzhledem k invazivitě a náročnosti na prostorové a přístrojové vybavení byla vyvíjena snaha nalézt jiné, neinvazivní metody k posouzení vazomotorických funkcí endotelu. Použití těchto metod vychází z předpokladu, že endoteliální dysfunkce je systémový děj a že výsledky získané na vyšetřované tepně lze extrapolovat na stav arteriálního řečiště v ostatních, méně přístupných a přitom klinicky významnějších lokalizacích (27). Mezi ultrazvukové metody se řadí měření dilatace tepny zprostředkované průtokem – flow-mediated dilatation (FMD) (28) a změny v průtoku krve během reaktivní hyperémie, které lze detekovat dopplerometricky. Jde o maximální průtok během prvních sekund reaktivní hyperémie – peak blood flow (PBF) (29), procentuální vzestup průtoku ve srovnání

s klidovým průtokem – blood flow increase (BFI) a decelerační index (DI) (30). Zatímco hodnota FMD je závislá na lokální vazomotorické funkci v přesně definovaném arteriálním segmentu, dopplerometrické metody odrážejí celkovou vazomotoriku mnohem větší části arteriálního řečiště (31). Dalším neinvazivním způsobem měření změn krevního průtoku nejčastěji v oblasti předloktí je okluzní pletyzmografie (32).

3.2 Dynamické testy

Jiným způsobem detekce je použití dynamických testů využívající značeného substrátu, do jehož metabolismu zasahuje funkční endotel. Požívají se buď radioizotopem značené přirozené prekursory nebo působky (například angiotenzin II či L-arginin), anebo uměle syntetizované substráty (například ³H-BPAP, substrát pro ACE, který není metabolizován nespecifickými proteázami) (2). Nepřímou metodou určující stupeň poškození endotelu je stanovení endotelémie, tj. množství odloupaných endotelií v určeném objemu plazmy (6,33).

3.3 Koncentrace endoteliálních působků

Další možností vyšetření endoteliální dysfunkce je měření koncentrací endoteliálních působků. O funkci endotelu nejlépe vypovídají vzorky krve získané přímo z postiženého místa, například při koronarografii, což však vyžaduje invazivní přístup. Koncentraci endoteliálních působků lze rovněž stanovit v plazmě nebo v séru. Tyto metody jsou stále více využívány, protože vyžadují pouze odběr žilní krve. Stanovení však může být ovlivněno biotransformací endoteliálního působku v organismu, anebo paralelně probíhajícím patologickým procesem, například zánětem. Podle potřeby lze hodnotit nativní koncentrace či koncentrace po stimulaci (fyzickou zátěží, farmaky apod.). Ideální by bylo stanovení NO, to je však pro jeho nestabilitu obtížné (2).

Specifickou metodou je zhodnocení celotělové produkce NO měřením konverze značeného ^{15}N -argininu na ^{15}N -citrulin, anebo měření lokální produkce NO elektrochemicky mikroelektrodou. Tyto metody jsou však špatně dostupné (13). Dostupnější je stanovení jiných endoteliálních působků - například angiotenzinu II, endotelinů, vazoadhezivních molekul, PGI₂, t-PA, PAI-1, trombomodulinu, vWF (34,35).

3.4 Flow-mediated dilatation

Nejčastěji používané ultrazvukové vyšetření detekující poruchu vazomotorické funkce endotelu je měření dilatace tepny zprostředkované průtokem, flow-mediated dilatation (FMD). Tato metoda byla poprvé popsána Celermajerem v roce 1992 (36). Je založena na stanovení endotel-dependentní postischemické vazodilataci tepny, která je ultrazvukovému vyšetření dobře dostupná. Vyšetřovanou tepnou je nejčastěji a. brachialis, eventuálně a. poplitea, u dětí to může být a. femoralis superficialis. Důvodem je to, že tepna musí být uložena povrchově, aby byla dobře dostupná ultrazvukovému vyšetření. Musí jít o tepnu končetinovou, umožňující provedení periferní ischemie zevní kompresí manžetou tonometru, a tepna musí mít přiměřený klidový průměr, aby byla dobře zobrazitelná, tedy ne moc malá, ale ani ne moc velká, protože se zvětšujícím se průměrem tepny roste množství elastických vláken na úkor svaloviny a tepna má menší schopnost aktivní vazodilatace. Ideální průměr tepny je od 2,5 do 5 mm. Dilataci předchází periferní ischemie, která je navozena kompresí končetiny manžetou tonometru nafouknutou na hodnotu převyšující systolický tlak. Ischemie vede k periferní vazodilataci, což po uvolnění komprese způsobuje zvýšení průtoku i v oblasti konduktivní části řečiště, tedy v místě vyšetření. Zvýšení průtoku má za následek zvýšení smykového napětí na cévní stěnu, což – při správné funkci endotelu – vede ke zvýšené produkci NO stimulací NO-syntázy a k vazodilataci tepny. Ultrazvukový obraz je během celého vyšetření snímán lineární vysokofrekvenční sondou ultrazvukového přístroje

a simultánně s EKG křivkou nahráván na záznamové médium. Vlastní měření průměru brachiální tepny probíhá ze záznamu, s pomocí příslušného počítačového softwaru na konci diastoly. Změna průměru tepny je potom mírou funkce nebo dysfunkce endotelu. FMD se vypočítá podle vzorce $[(\text{reaktivní průměr tepny}/\text{klidový průměr tepny}) - 1] \times 100$ a je vyjádřena v procentech.

Někteří autoři vyšetření ještě doplňují následným podáním nitroglycerinu v době restituice. Dilatace cévní stěny je pak reakcí na endotel-independentní podnět nevyžadující NO. Použití FMD jako náhradního parametru (surrogate endpoint) pro postižení koronárního řečiště se opírá o výsledky prací, které prokázaly, že FMD koreluje s abnormální vazomotorickou odpovědí v oblasti koronárních tepen, se stupněm koronární aterosklerózy i s incidencí kardiovaskulárních příhod (37).

Z hlediska diagnostiky preklinické fáze aterosklerózy jsou významné práce prokazující korelaci FMD a brachialis s jinými, morfologickými markery časně aterosklerózy – s počtem koronárních kalcifikací hodnocených EBCT (electron beam computer tomography) a s tloušťkou komplexu intimy-medie měřené v oblasti společné karotidy (38). S poklesem FMD jsou také asociovány hlavní rizikové faktory aterosklerózy. Už zmíněné první použití metody Celermajerem prokázalo snížení FMD u dětí s familiární hypercholesterolémií, u dospělých kuřáků a u jedinců s už diagnostikovanou koronární nemocí (35). Snížená FMD byla detekována také v přítomnosti dalších rizikových faktorů, jako jsou: vyšší věk, hypertenze, diabetes mellitus, rodinná anamnéza koronární nemoci, menopauza, nedostatek pohybu, hyperhomocysteinémie či obezita (39).

Je známo, že FMD je závislá na řadě faktorů (40) (bazálním průměru vyšetřované tepny, požití alkoholu, kofeinu, tučného jídla, kouření, předchozí fyzické aktivitě, psychické pohodě, u žen na fázi menstruačního cyklu, užívání různých léků i vitamínů, například vitamínu C). Dále záleží na technickém vybavení, způsobu vyhodnocování a erudici vyšetřujícího a zřejmě i na celé řadě dalších faktorů (41). Není tedy překvapením, že závěry jednotlivých studií přinášejí velmi heterogenní škálu výsledných hodnot FMD, a to jak ve skupinách postižených, tak i zdravých jedinců. Navíc má většina pracovišť vypracovaný vlastní protokol vyšetření, což ještě víc komplikuje vzájemné srovnávání výsledků. Snaha o sjednocení a standardizaci vyšetřovacího protokolu vedla skupinu expertů k vypracování doporučení, které bylo publikováno v roce 2002 (39). Doporučení se věnují přípravě pacienta, technickému vybavení a správnému zobrazení vyšetřované tepny, standardizují provedení vyšetření a následnou analýzu ultrazvukového záznamu. Velký důraz je kladen na erudici, psychickou a fyzickou pohodu vyšetřujícího, protože na něm nejvíce závisí kvalita záznamu.

V pravidelných intervalech by měla být stanovována variabilita vyšetření. Kvalita stanovení a ovlivnění FMD výše uvedenými faktory určují reproducibilitu tohoto vyšetření, která je v poslední době mnohými diskutována (42). Byly už vyvinuty systémy, které jsou schopné během reaktivní hyperémie měřit průměr brachiální tepny během každého srdečního cyklu automaticky. Tím odpadají chyby manuálního měření a variabilita vyšetření klesá. Navíc tak lze získat křivku změn FMD v čase během reaktivní hyperémie, která by mohla ještě více vypovídat o vlastnostech cévní stěny (38).

I když je stanovení FMD neinvazivní a minimálně zatěžuje pacienta, jde o vyšetření relativně náročné jak po stránce přístrojového vybavení (kvalitní ultrazvukový přístroj,

počítač, software pro analýzu záznamů, event. stereotaktický fixátor ultrazvukové sondy), tak personálního obsazení. Přestože někteří autoři považují FMD za možný prediktor kardiovaskulárních chorob, který integruje vliv zevních faktorů i genetických dispozic, bude třeba ještě více studií, které určí, zda endoteliální dysfunkce brachiální tepny spolehlivě identifikuje jedince ohroženého manifestací aterosklerózy, a zda je tato metodika dostatečně reprodučibilní a má dostatečně nízkou biologickou variabilitu, aby získané výsledky byly validní.

4. Ateroskleróza a endoteliální dysfunkce

4.1 Příčiny endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazomotorickými, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími, resp. stimujícími působky. Kromě selektivního zvýšení permeability se projevuje sklonem k vazospasmu, resp. nedostatečnou vazomotorickou odpovědí na endotel-dependentní podnět (někdy dokonce paradoxní vazokonstrikcí), tendencí k trombóze a nedostatečnou inhibicí subendoteliální proliferace (43). Představuje časnou, morfologicky němou fázi aterosklerózy, ale podílí se i na vývoji morfologicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy (6,44). Hraje rovněž důležitou roli v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, renálního selhání, komplikací diabetes mellitus, sepse a dalších chorob (8).

Existuje řada příčin endoteliální dysfunkce. Většina z nich je řazena mezi známé rizikové faktory aterosklerózy: arteriální hypertenze, hyperlipoproteinemie (zejména hypercholesterolémie, a to především zvýšená hladina LDL, přičemž nejnebezpečnější jsou oxidované (ox-LDL) či glykované (gly-LDL) LDL částice) (45), hyperglykémie,

hyperinzulinémie, hypoxie, hyperhomocysteinémie, kouření, ionizující záření, cytostatika, stárnutí, imunokomplexy a různé infekce. Je zřejmé, že například u diabetu působí navzájem několik rizikových faktorů, které vznik endoteliální dysfunkce akcelerují. K těmto systémovým faktorům se mohou přidat lokálně působící faktory, jako jsou turbulence krevního toku (bifurkace cévy, její menší fixace k okolí), vrozené nebo získané cévní anomálie či intravaskulární výkony (angioplastika) (46,47).

4.2 Vliv kardiovaskulárních rizikových faktorů

Působením kardiovaskulárních rizikových faktorů (kouření, ateroskleróza, hypertenze) je v endotelu zvyšována tvorba látek s vazokonstrikčními účinky – endotelinu-1, tromboxanu A₂, prostaglandinu H₂, superoxidového aniontu (O₂) a v důsledku aktivity enzymu konvertujícího angiotenzin (ACE) také angiotenzinu II. Zvýšením hladin uvedených vazokonstrikčních faktorů je zpětně snižována dostupnost NO, především přímou reakcí NO se superoxidovým aniontem (2).

Endotel se podílí na degradaci lipidů a jejich vychytávání tím, že tvoří lipoproteinovou lipázu a exprimuje receptory pro LDL. Endotelové buňky jsou schopné oxidovat („modifikovat“) lipoproteiny – ovšem oxidované LDL částice jsou pravděpodobně hlavním faktorem, který iniciuje vznik aterosklerózy (vůbec nejspíše se oxidují tzv. malé denzní částice LDL) (12).

Lipoprotein(a) svou molekulovou strukturou v podstatě odpovídá LDL apolipoproteinu B-100, ale liší se postranními řetězci, které jsou do velké míry homologní s plazminogenem. Obsazením endotelových receptorů pro plazminogen je pak vyvoláván protrombotický stav. Pacienti s hladinou lipoprotein(a) vyšší než 30 mg/dl mají trojnásobně

zvýšené riziko ICHS (48). Působení malých denzních částic LDL a lipoproteinů(a) ilustruje komplexní interakce mezi lipidy, trombózou a aterosklerózou v mikroprostředí endotelu (49,50).

4.3 Klinické projevy endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce se podílí na vývoji jak časných, tak i pozdních fází aterosklerózy. Sama její přítomnost i bez morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí je dnes akceptována jako iniciální fáze aterosklerotického procesu. Dysfunkční endotel umožňuje vyšší průnik aterogenních lipidů. Zvýšenou expresí adhezivních molekul a produkcí některých cytokinů usnadňuje také kumulaci monocytů v cévní stěně, jejich přeměnu v makrofágy a pěnové buňky. Nedostatečná produkce NO vede k uplatnění řady růstových faktorů, stimulujících buňky hladkého svalstva k migraci do subendoteliálních prostor a k produkci extracelulární vazivové komponenty aterosklerotických lézí. Už v těchto fázích, kdy morfologické změny cévy nejsou přítomny, anebo jsou hemodynamicky nevýznamné, se může klinicky manifestovat přítomný sklon k vazospasmům, například formou mikrovaskulární anginy pectoris, Raynaudova fenoménu či tranzitorní mozkové ischemie (51).

I v pozdějších fázích endoteliální dysfunkce akceleruje vývoj aterosklerózy (52). Podílí se na kumulaci makrofágů a pěnových buněk v aterosklerotickém plátu, a prostřednictvím metaloproteináz, které mohou rozrušovat fibrózní čepičku plátu, zvyšuje jeho vulnerabilitu. Nedostatečná produkce NO, prostacyklinu a dalších působků inhibujících adhezi a agregaci destiček, a naopak zvýšená exprese von Willebrandova a tkáňového faktoru navozují protrombogenní stav (53). Tak může ruptura i hemodynamicky nevýznamného plátu s nasedající trombózou vést k rychlému uzavření tepny zvláště, když endoteliální dysfunkci

provází snížená fibrinolýza. K úplnému uzávěru tepny může také přispět už zmíněný zvýšený sklon k vazospasmům (54).

5. Možnosti ovlivnění endoteliální funkce

5.1 Dyslipidémie

U těchto metabolických poruch byla prokázána porucha endotel-dependentní vazodilatace, již v období před strukturálními změnami cév či klinickými symptomy ischemické nemoci koronárních či periferních tepen. Porucha endoteliální funkce má zde především vztah k vysokým hodnotám LDL, a to především jeho oxidované formě. Studie in vitro prokázaly vliv ox-LDL na sníženou tvorbu EDRF a jeho zvýšenou inaktivaci, především generováním superoxidových radikálů (2).

Při podání specifického inhibitoru syntézy EDRF- L-NMMA (L-N-monomethyl-1-arginin) dochází u pacientů bez prokázané poruchy lipidového metabolismu k podobné redukci krevního průtoku a. brachialis, jako u pacientů s hypercholesterolémií. Tento fenomén již neplatí při podání acetylcholinu a L-NMMA, kdy vazodilatace u pacientů hypercholesterolémií je výrazně snížena. Tento jev vede k úvaze o obdobné bazální sekreci EDRF u obou skupin a o poruše tvorby a uvolnění EDRF při stimulaci acetylcholinem (11). Řada studií prokázala vztah mezi hypolipidemickou léčbou a úpravou porušené endoteliální funkce (12).

Terapie, která u pacientů s hypercholesterolémií vede především ke snížení LDL-cholesterolu, zlepšuje odpověď endotel-dependentní cévní vazodilatace po podání acetylcholinu (55). Tento účinek byl prokázán při terapii statiny (inhibitory HMG koenzymA-reduktázy), kdy v průběhu 6-12 měsíců dochází k postupné úpravě endoteliální funkce (56).

Význam statinů byl prokázán ve dvou velkých studiích sledující vliv na primární (WOSCOPS) (57) a sekundární prevenci (4S) (58). Obě studie prokázaly souvislost mezi snížením celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu a významným poklesem úmrtnosti na ischemickou chorobu srdeční.

5.2 Superoxidové ionty

Dalším činitelem v patogenezi porušené endoteliální funkce je vznik superoxidových iontů, které se podílejí na tvorbě ox-LDL a urychlují inaktivaci EDRF. Jejich vznik je dáván do souvislosti s poraněním cévní stěny, vznikem ischemie, dále vznikají při aktivaci leukocytů či hladké cévní svaloviny a také v přítomnosti ox-LDL (59). Mezi antioxidanty patří především vitamíny E a C. Snižují celkové množství volných radikálů a inhibují oxidaci LDL částic. Ve studiích byly s relativním úspěchem kombinovány s hypolipidemickou terapií (60).

5.3 Arteriální hypertenze

Arteriální hypertenze jako další z hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění je také provázena sníženou endotel-dependentní relaxací cév (61). V experimentální hypertenzi byla potlačena NO-syntáza a tím snížena tvorba EDRF, způsobující jeho sníženou bazální sekreci, dále dochází ke zvýšené expresi vazoadhezivních molekul (62,63). Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE-I) upravují funkci endotelu především inhibicí ACE a tím snížením hladiny angiotenzinu II. Ten způsobuje vazokonstrikci, hypertrofii svalové vrstvy cév v myokardu, sekreci endotelinu-1 a sekreci aldosteronu. Dále inhibice ACE zvyšuje hladinu bradykininu, ten uvolňuje NO a prostacyklin z endotelových buněk, snižuje tvorbu superoxidových iontů a potlačuje procesy degradace NO (64). Tímto širokým protektivním účinkem na cévy mohou ACE inhibitory dlouhodobě

zlepšit endoteliální koronární dysfunkci i u pacientů bez závažné hypertenze či dyslipidémie (65). Léčba kalciovými antagonisty u pacientů s arteriální hypertenzí zvyšuje účinky NO, snižuje vliv endotelinu-1 a má protektivní vliv před poškozením endotelu volnými radikály (66). U betablokátorů je uváděna možnost snížené oxidability ovlivněním charakteru LDL částic (jeden z metabolitů carvedilolu má výrazný antioxidační účinek) (23).

5.4 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je spojený s progresivní vaskulární dysfunkcí, a to nejen v mikrocirkulaci, ale také v systémových artériích. Na zvířecích modelech s tímto onemocněním byla demonstrována porucha endotel-dependentní vazodilatace (67). V klinických studiích byla srovnávána vaskulární odpověď diabetiků I. typu a nediabetiků, kdy u první skupiny byla zjištěna porucha vaskulární endotel-dependentní i independentní odpovědi. Naopak u diabetiků II. typu dominovalo pouze snížení endotel-dependentní dilatace (68). V literatuře se dále uvádí vztah vyšší inzulinémie a vyšší glykémie k poruše endoteliální funkce (69,70) a její úpravě při dlouhodobé kompenzaci tohoto metabolického onemocnění (71).

5.5 Možnosti léčby

Mezi předpokládané možnosti léčby porušené endoteliální funkce patří ovlivnění známých rizikových faktorů aterosklerózy (72). K těmto řadíme důslednou dietní léčbu, farmakologickou léčbu (73), odstranění aktivního i pasivního kuřáctví (74). Mezi farmakologické možnosti léčby endotheliální dysfunkce řadíme léčbu hypolipidemiky- statiny (75,76) (snížení LDL-cholesterolu, snížení aktivace endotelu, nižší tvorba ox-LDL, ↑ aktivita NOs a dostupnost NO, úprava zánětlivých a koagulačních parametrů, snížení adhesivních molekul, CRP a hladiny fibrinogenu a PAI-1), fibráty (77)-(stimulace specifických receptorů

(PPARs) - ↑apo AI (HDL-cholesterolu), ↓apo CIII (LDL-cholesterolu), ↓ tvorbu cytokinů a adhesivních molekul) dále antihypertenzní terapii – především ACE-inhibitory (blokáda konverze ATI na ATII, zábrana odbourávání bradykininu), dále antagonisté AT-1 receptorů (78) pro ATII, antagonisté receptorů pro ET-1 (zvýšení produkce NO, zvýšením aktivity NOs), Ca-blokátory (redukce oxidativního stresu, ↑NOs), důsledná kompenzace cukrovky, možné je i podání antioxidantů a nitrátů. Další možností je příznivý účinek protizánětlivé léčby na endoteliální funkci při zjištěné vysoké koncentraci C-reaktivního proteinu (79).

6. Cíle disertační práce

Disertační práce je tvořena řadou monotematicky zaměřených publikací, které mají za cíl postupně studovat různé aspekty činnosti cévního endotelu a různé možnosti sledování jeho funkčního stavu.

1. Úkolem prvního přehledného článku je

- sumarizovat dostupné poznatky o cévní endoteliální funkci i dysfunkci,
- získat základní informace o fyziologické funkci endotelu, možnostech detekce, klinickém významu a terapeutickém ovlivnění endoteliální dysfunkce.

2. Cílem druhé publikace je

- zhodnocení nejčastěji používaného neinvazivního ultrazvukového vyšetření detekujícího poruchu vazomotorické funkce endotelu, tzn. měření dilatace tepny zprostředkované průtokem (flow-mediated dilatation, FMD),
- nalézt odpověď na otázku, jak je metoda hodnocení endoteliální funkce v oblasti a. brachialis klinicky či experimentálně využitelná a zda má nějaká omezení, která by její širší využití znemožňovala,
- zavedení této ultrazvukové metody na našem pracovišti.

3. Cílem třetí práce je

- posouzení vlivu akutní vysokotukové zátěže na činnost cévního endotelu (předpokladem poruchy endoteliální funkce je aterogenní působení lipoproteinů bohatých na triglyceridy),
- sledovat vazoreaktivitu a. brachialis po podání přesně definované dietní zátěže v návaznosti na dva zavedené zcela odlišné dietní režimy.

4. Cílem poslední publikace je

- hodnocení další široce používané metody detekce porušené endoteliální funkce stanovením koncentrace vybrané adhezivní molekuly v séru,

- určit vliv léčby statinem na dynamiku koncentrace ICAM-1 ve spojitosti s dynamikou standardních lipidových parametrů u pacientů s poruchou lipidového metabolismu. Předpokladem je jak snížení koncentrace těchto částic v séru, tak úprava sledovaných parametrů lipidového metabolismu.

Cílem publikovaných prací je tedy rozsáhlý popis a rozbor současných poznatků o cévním endotelu, o možnostech detekce normální a porušené endoteliální funkce a zhodnocení řady různých faktorů ovlivňující endoteliální funkci, jak ve smyslu její poruchy, tak i možné úpravy porušené funkce endotelu.

7. Základní publikace disertační práce

Šejda T. Cévní endoteliální dysfunkce, možnosti detekce a ovlivnění. Vnitř lék

2000;46(7):403-407.

Šejda T, Piřha J, Švandová E, Poledne R. Limitations of non-invasive endothelial function

assessment by brachial artery flow-mediated dilatation. Clin Physiol Funct Imaging

2005;25:58-61. **IF 0,973**

Šejda T, Kovář J, Piřha J, Cífková R, Švandová E, Poledne R. The effect of an acute fat load

on endothelial function after different dietary regimens in young healthy volunteers. Physiol

Res 2002;51:99-105. **IF 0,984**

**Reinišova cena za nejlepší publikaci pro autora do 35 let České angiologické společnosti
pro rok 2002**

Šejda T, Jedličková V, Švandová E, Poledne R. The effect of fluvastatin on cICAM-1 as a

biomarker of endothelial dysfunction in patients with dyslipidemia. Int Angiol

2006;25(4):414-418. **IF 0,678**

8. Publikace č. 1

Cévní endoteliální dysfunkce, možnosti detekce a ovlivnění

Šejda T.

III. interní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha, přednosta prim. MUDr. L. Kotík, CSc.

Souhrn

Základními fyziologickými funkcemi endotelu jsou funkce semipermeabilní membrány, kontrola optimální cévní průchodnosti a zajištění integrity cévy. Endoteliální dysfunkce lze považovat za první, funkčně významné stadium aterosklerózy. K nejčastějším vyvolávajícím faktorům řadíme hyperlipoproteinémii, arteriální hypertenzi, kouření a diabetes mellitus. Klinicky nejdůležitější projevy poruchy endoteliální funkce jsou poruchy v oblasti koronárního řečiště a při transitorních mozkových ischemiích. Mezi možnostmi detekce endoteliální dysfunkce patří invazivní metody, neinvazivní ultrazvukové metody a je možný i laboratorní průkaz, kdy jako marker endoteliální dysfunkce slouží vzestup plazmatických hladin adhezivních molekul. Léčba endoteliální dysfunkce je založena na ovlivnění základních rizikových faktorů aterosklerózy, tzn. odstranění aktivního i pasivního kouření, v indikovaných případech důsledná dietní a farmakologická hypolipidemická léčba, účinná antihypertenzní terapie a kompenzace cukrovky.

Klíčová slova: Fyziologická funkce endotelu - Endoteliální dysfunkce - Ultrazvuk periferních tepen - Rizikové faktory aterosklerózy - Léčebné možnosti.

Summary: Šejda T.: Vascular Endothelial Dysfunctions, Possible Detection and Treatment

The basic physiological functions of the endothelium are functions of a semipermeable membrane, control of optimal vascular patency and safeguarding of the vascular integrity. Endothelial dysfunction may be considered the first functionally important stage of atherosclerosis. The most frequent evoking factors include hyperlipoproteinaemia, arterial hypertension, smoking and diabetes mellitus. The clinically most important manifestations of impaired endothelial function are disorders in the coronary circulation and transient cerebral ischaemias. Ways of detection of endothelial dysfunctions include invasive methods and at present non-invasive ultrasonic methods. Treatment of endothelial dysfunction is based on elimination of the basic risk factors of atherosclerosis, i.e. elimination of active and passive smoking, in indicated cases strict dietetic and pharmacological hypolipidaemic treatment, effective antihypertensive treatment and compensation of DM.

Key words: Endothelium - Endothelial dysfunction - Ultrasonography of peripheral arteries - Risk factors of atherosclerosis.

Vnitř. Lék., 46, 2000, No. 7, p. 403 - 407

O.

ÚVOD

Snahou následujícího přehledného článku je podat základní informace o fyziologické funkci endotelu, možnostech detekce, klinickém významu a terapeutickém ovlivnění endoteliální dysfunkce.

Porucha funkce endotelu, nazývaná endoteliální dysfunkce, je postižení endotelu, které ve své lokalizované či generalizované formě vede ke zvýšení propustnosti cévní stěny a následnému vzniku nerovnováhy mezi vazoaktivními mechanismy a hemokoagulačními působky. Výsledkem je pro-aterogenní účinek a převaha vazokonstrikčních a protrombotických pochodů [5, 18, 20].

K nejčastějším vyvolávajícím faktorům řadíme:

- hyperlipoproteinémie,
- arteriální hypertenzi,

- kouření,
- diabetes mellitus,
- hyperhomocysteinémii,
- méně časté příčiny, jako mechanické poškození endotelu (angioplastika), poškození léčiv (cytostatika), imunokomplexy či lokálním zánětem.

FUNKCE ENDOTELU

Mezi základní fyziologické funkce endotelu patří:

1. funkce semipermeabilní membrány mezi tekutým intravaskulárním prostředím a okolními tkáněmi,
2. kontrola optimální cévní průchodnosti,
3. zajištění integrity cévy.

V prvním případě se zvýšení propustnosti aktivovaných endotelií pro organické molekuly (lipoproteiny) a pro krevní elementy uplatňuje v aterogenezi i při zhoršení místních cirkulačních poměrů, při vzniku edému. Řada podnětů, jako například oblenění krevního proudu, aterogenní lipoproteiny, kouření, hypertenze či cytokiny (TNF, IL-1), aktivují endotelie. Ty poté přitahují leukocyty a umožní jim průnik cévní stěnou pomocí vazoadhezivních molekul (selektiny, integriny, imunoglobulinové molekuly) [5, 8, 11, 19, 20], které váží na své ligandy a na povrch leukocytů. Zvýšená propustnost pro lipoproteiny, zejména pro LDL částice, vede k jejich zvýšené koncentraci v cévní stěně, vazbě na proteoglykan matrix. Dalším působením volných kyslíkových radikálů tyto částice oxidují, či při hyperglykémii jsou glykosylovány - vzniká aterogenní ox-LDL či gly-LDL [5, 8, 10, 11, 13].

Druhá významná úloha endotelu je zajištění a kontrola optimální cévní průchodnosti. Na povrchu jsou vázány stovky enzymů, v jejichž blízkosti jsou receptory k navázání příslušného substrátu s cílem maximálního zefektivnění celého pochodu. Takto je například degradována řada vazoaktivních metabolitů kyseliny arachidonové či serotoninu, nebo naopak štěpen angiotenzin I na aktivní angiotenzin II. V endoteliích je také syntetizována celá řada vazoaktivních a hemokoagulačních látek. Z vazodilatačních faktorů je pravděpodobně nejdůležitější endoteliální relaxační faktor - EDRF (NO), některé prostaglandiny (prostacyklin PGI₂ a prostaglandin E₂) a endoteliální hyperpolarizující faktor (EDHF) [8, 26]. Jsou-li endotelie intaktní, tak řada stimulů (serotonin, acetylcholin) vede k uvolnění EDRF či prostacyklinu a k následné vazodilataci. Při dysfunkci naopak takové podněty vedou k vazokonstrikci [5, 11, 17]. Vedle vazodilatačně působících látek jsou v endotelu syntetizovány i látky s vazokonstrikčním účinkem, především endotelin (ET-1), a některé mitogeny. Endotelin je vazokonstriktor o řád silnější než angiotenzin II, dále jako komitogen stimuluje proliferaci a hypertrofii cévní hladké svaloviny. Vedle přímého působení na myocyt zasahuje do hemodynamiky nepřímo stimulací EDRF a PGI₂ [4, 5, 8, 17, 18, 21, 26].

Třetím úkolem endotelu je zajištění integrity cévy. Tuto funkci plní hemostatické a reparační pochody. Regulace homeostázy (souhra hemokoagulace a fibrinolýzy) je životně důležitou funkcí. Intaktní endotel je dokonalým nesmáčivým povrchem. Tato vlastnost je zajištěna povrchovým negativním elektrostatickým nábojem, dále sekrecí EDRF, který dysagreguje shluky trombocytů, brání adhezi trombocytů a leukocytů na povrch cévy a brání spolu s prostacyklinem agregaci trombocytů. Fibrinolýza je endotelem kontrolována prostřednictvím tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) a jeho inhibitoru (PAI-1). Vedle PAI-1 může být fibrinolýza také blokována lipoproteinem Lp(a), který obsahuje apolipoprotein (a), jehož část řetězce je shodná s plazminogenem, a tak působí jako kompetitivní inhibitor generace plazminu, a tím fibrinolýzy. Dojde-li akutně k porušení endo-

telu (ruptura plátu), tak se na obnažené subendoteliální komponenty okamžitě váže von Willebrandův faktor. Ten dále váže destičkový glykoprotein (GPIb), a tak stimuluje adhezi trombocytů. Tato iniciální reakce vyvolá aktivaci dalších destičkových receptorů IIb/IIIa, destičky se váží pomocí fibrinu, agregují. Agregované destičky uvolňují řadu látek s proagregačním či vazokonstrikčním účinkem - tromboxan A₂, serotonin, ADP, či destičkový růstový faktor (PDGF). Endotel s normální funkcí zajistí v oblasti léze svými vazodilatačními a antiagregačními působky rovnováhu, při endoteliální dysfunkci převažuje prokoagulační aktivita a vazospasticita [5, 8, 11, 26].

KLINICKÉ PROJEVY ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE

Mezi klinicky nejdůležitější projevy endoteliální dysfunkce patří poruchy v oblasti koronárního řečiště. Zde vedou ke změně tonu hladké svaloviny cévní stěny a převaze protrombotických mechanismů. V epikardiální oblasti se podílí na cirkadiální variaci myokardiální ischemie a infarktu myokardu, dále stenokardii navozené chladem či změnou počasí. Vedle koronárního řečiště se s projevy endoteliální dysfunkce pravděpodobně setkáváme například při tranzitorních mozkových ischemiích či Raynaudově fenoménu [4, 5, 18].

MOŽNOSTI DETEKCE

Řada experimentálních prací prokázala těsný vztah mezi endoteliální funkcí v koronárním a periferním cévním řečišti [3, 4]. Měření endoteliální funkce v koronárním řečišti lze pomocí nových zobrazovacích metod, kdy je možno přesné změření intraluminálního průměru koronární cévy a jeho změny před a po podání vazoaktivních substancí, jako např. acetylcholinu a nitroglycerinu [26]. Pomocí intrakoronárního dopplerovského vyšetření je možno měřit rychlost krevního proudu v hlavních koronárních tepnách i jejich větvích [18]. Několik studií prokázalo, že infuze s acetylcholinem způsobí střední vazodilataci a vzestup rychlosti krevního proudu u pacientů bez onemocnění koronárních tepen, zatímco u pacientů s prokázanou ischemickou chorobou srdeční docházelo k paradoxní vazokonstrikci na hlavních koronárních tepnách a velmi omezené vazodilataci v periferním řečišti [3, 15]. Vazodilatační kapacitu hladkého svalstva cév lze určit po intrakoronární či systémové aplikaci nitroglycerinu. Pro nemožnost opakovaného využití těchto invazivních metod u zdravých osob byla v roce 1992 zavedena neinvazivní metoda využívající periferní tepny pro ultrazvukové vyšetření s vysokou rozlišovací schopností. Při tomto vyšetření jsou namísto koronárních tepen vyšetřovány a. brachialis či a. femoralis superficialis. Infuze vazomotorických látek indukující endotel dependentní va-

zodilataci je nahrazena tzv. reaktivní hyperémií a nitroglycerin podaný s.l. ovlivňuje endotel independentní vazodilataci. Dilatace způsobená zvýšeným průtokem jako důsledek reaktivní hyperémie je závislá na intaktním endotelu, který uvolňuje EDRF (NO) [24, 25, 26]. Reproducibilita těchto vyšetření byla ve studiích zaměřených na snížení hladiny cholesterolu ve vztahu k endoteliální dysfunkci velmi dobrá. Těsná korelace mezi endotel dependentní vazomotorickou odpovědí v koronárním řečišti na podání acetylcholinu a vazodilataci při reaktivní hyperémii měřené na a. brachialis dává předpoklad ve využití této neinvazivní metody k detekci a sledování aterosklerózy u pacientů se zvýšeným rizikem vzniku kardiovaskulárního onemocnění [3, 4, 9, 21, 25]. Mezi celou řadou stavů, které mohou aktuálně ovlivnit endoteliální funkci (tzn. i v průběhu vyšetření), patří hormonální a postprandiální vlivy, fyzická aktivita, kouření (i pasivní) a mnoho metabolických abnormalit [7, 21, 25]. Mezi další možnosti detekce endoteliální dysfunkce patří sledování plazmatických hladin látek syntetizovaných endotelem. Mezi specifické markery vhodné ke sledování endoteliálního poškození se řadí von Willebrandův faktor, P a E selektiny a imunoglobulinové adhezivní molekuly (ICAM, VCAM). Zvýšené hladiny těchto látek mohou být vhodným markerem iniciální fáze aterosklerózy i její progresu [8, 19, 20, 26].

DYSFUNKCE ENDOTELU A DYSLIPIDÉMIE

Řada studií se zabývá vztahem mezi endoteliální dysfunkcí a dyslipidemiemi, které patří k hlavním rizikovým faktorům rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. U těchto metabolických poruch byla prokázána porucha endotel dependentní vazodilatace, již v období před strukturálními změnami cév či klinickými symptomy ischemické nemoci koronárních či periferních tepen. Porucha endoteliální funkce má zde především vztah k vysokým hodnotám LDL, a to především jeho oxidované formě (Ox-LDL). Studie in vitro prokázaly vliv Ox-LDL na sníženou tvorbu EDRF a jeho zvýšenou inaktivaci, především generováním superoxidových radikálů. Při podání specifického inhibitoru syntézy EDRF - L-NMMA (L-N-monomethyl-1-arginin) dochází u pacientů bez prokázané poruchy lipidového metabolismu k podobné redukci krevního průtoku v a. brachialis, jako u pacientů s hypercholesterolemií. Tento fenomén již neplatí při podání acetylcholinu a L-NMMA, kdy vazodilatace u pacientů s hypercholesterolemií je výrazně snížena. Tento fenomén vede k úvaze o obdobné bazální sekreci EDRF u obou skupin a poruchou tvorby a uvolnění EDRF při stimulaci acetylcholinem. Řada studií prokázala vztah mezi hypolipidemickou léčbou a úpravou porušené endoteliální funkce [10, 16, 26]. Terapie, která u pacientů s hypercholesterolemií vede především ke snížení LDL chole-

terolu, zlepšuje odpověď endotel-dependentní cévní vazodilatace po podání acetylcholinu. Tento efekt byl prokázán při terapii statiny (inhibitory HMG koenzymA-reduktázy), kdy v průběhu 6 až 12 měsíců dochází k postupné úpravě endoteliální funkce [10, 17, 23]. Význam statinů byl prokázán ve dvou velkých studiích sledujících jejich vliv na primární (WOSCOPS) [22] a sekundární prevenci (4S) [1] koronární aterosklerózy přibližně v 5letých periodách. Obě studie prokázaly souvislost snížení celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a vzestup poměru HDL/LDL s významným poklesem úmrtnosti na ischemickou chorobu srdeční.

DYSFUNKCE ENDOTELU A SUPEROXIDOVANÉ IONTY

Dalším činitelem v patogenezi porušené endoteliální funkce je vznik superoxidových iontů, které se podílejí na tvorbě Ox-LDL a urychlují inaktivaci EDRF. Jejich vznik je dávan do souvislosti s poraněním cévní stěny, vznikem ischemie, dále při aktivaci leukocytů či hladké cévní svaloviny a také v přítomnosti Ox-LDL. Mezi antioxidanty patří především vitaminy E a C. Snižují celkové množství volných radikálů a inhibují oxidaci LDL částic. V řadě studií byly s úspěchem kombinovány s výše uvedenou hypolipidemickou terapií [2, 21, 25, 26].

ENDOTELOVÁ DYSFUNKCE A ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE

Arteriální hypertenze jako další z hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění je také provázena redukovanou endotel dependentní relaxací cév. V experimentální hypertenzi byla potlačena NO-syntéza a tím snížena tvorba EDRF, způsobující jeho sníženou bazální sekreci, dále dochází ke zvýšené expresi vazoadhezivních molekul [12, 20]. Inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) upravují funkci endotelu především inhibicí ACE a tím snížením hladiny angiotenzinu II. Ten způsobuje vazokonstrikci, hypertrofii svalové vrstvy cév v myokardu, sekreci endotelinu 1 a sekreci aldosteronu. Dále inhibice ACE zvyšuje hladinu bradykininu (uvolňuje NO a prostacyklin z endotelových buněk), snižuje tvorbu superoxidových iontů a potlačuje procesy degradace NO. Tímto širokým protektivním efektem na cévy mohou ACE inhibitory dlouhodobě zlepšit endoteliální koronární dysfunkci i u pacientů bez závažné hypertenze či dyslipidémie [12, 17, 23]. Léčba kalciovými antagonisty u pacientů s arteriální hypertenzí zvyšuje účinky NO, snižuje vliv endotelinu-1 a má protektivní vliv před poškozením endotelu volnými radikály [20]. U beta-blokátorů je uváděna možnost snížené oxidability ovlivněním charakteru LDL částic. Jeden z metabolitů carvedilolu má prokázáný výrazný antioxidační účinek.

ENDOTELOVÁ DYSFUNKCE A DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus je spojený s progresivní vaskulární dysfunkcí, a to nejen v mikrocirkulaci, ale také v systémových arteriích. Na zvířecích modelech s tímto onemocněním byla demonstrována porucha endotel-dependentní vazodilatace. V klinické studii byla srovnána vaskulární odpověď diabetiků I. typu a nediabetiků, kdy u první skupiny byla zjištěna porucha vaskulární endotel-dependentní i independentní odpovědi. Naopak u diabetiků II. typu dominovalo pouze snížení endotel-dependentní dilatace. V literatuře se uvádí vztah vyšší inzulinémie a glykémie k poruše endotelální funkce [8, 14, 25].

MOŽNOSTI LÉČBY PORUŠENÉ ENDOTELIÁLNÍ FUNKCE

Mezi možnostmi léčby porušené endotelální funkce tedy patří ovlivnění klasických rizikových faktorů aterosklerózy. Důsledná dietní a farmakologická hypolipidemická léčba, odstranění aktivního i pasivního kouření, antihypertenzní terapie - především ACE inhibitory, kompenzace cukrovky podání antioxidantů a nitrátů. Nitráty uvolňují 1-

3 molekuly NO dle typu přípravku, molstidomin uvolňuje NO spontánně, a proto je z důvodu nevznikání tolerance organismu vhodnější. Další pokusy, jak ovlivnit endotelální funkci, je použití antagonisty ET-receptoru nebo zvýšení produkce NO podáním L-argininu, který je prekurzorem NO. V prvním případě byl zcela potlačen vazokonstrikční efekt endotelinu 1, ve druhém podání argininu zlepši endotel dependentní průtok krve koronárním řečištěm. Další možné využití antagonistů receptorů pro endotelin či prekursorů EDRF je ve fázi výzkumu [2, 9, 17, 23, 25].

ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že endotelální dysfunkci můžeme považovat za první, funkčně významné stadium aterosklerózy, které je možno prokázat ještě před přítomností morfologických změn, tedy proliferací hladké svaloviny a akumulací aterogenních hmot s následnou dezintegrací cévní architektury. I u pacientů s pokročilou obliterující aterosklerózou se postižení endotelu podstatnou měrou podílí na výsledném klinickém obrazu navozením cévních spasmů či trombotických komplikací [5, 17, 18, 25].

LITERATURA

1. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, 1994, 344, s. 1383-89.
2. Anderson, T. J., Meredith, I. T., Yeung, A. C et al.: The effect cholesterol - lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N. Eng. J. Med.*, 1995, 332, s. 488-93.
3. Anderson, T. J., Uehata, A., Gerhard, M. D. et al.: Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1995, 26, s. 1235-41.
4. Anderson, T. J., Gerhard, M. D., Meredith, I. T. et al.: Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, 1995, 75, 71B-74B
5. Bultas, J., Karetová, D.: Od endotelální dysfunkce k uzavěru tepny. *Medica revue* 3/1998: s. 18-20.
6. Celermajer, D. C., Adams, M. R., Clarkson, P. et al.: Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N. Eng. J. Med.*, 1996, 334, s. 150-4.
7. Celermajer, D. C., Sorensen, K. E., Gooch, V. M. et al.: Non invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 1992, 340, s. 1111-15.
8. Cines, B. D., Pollak, E. S., Buck, A. C. et al.: Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 1998, Vol. 91, No 10: s. 3527-3561.
9. Egashira, K., Hirooka, Y., Kai, H. et al.: Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patient with hypercholesterolemia. *Circulation*, 1994, 89, s. 2519-2524.
10. Galle, J., Oschler, M., Schollmeyer, M. et al.: Oxidized lipoproteins inhibit endothelium dependent vasodilatation. *Hypertension* 1994, 23, s. 556-564.
11. Holvoet, P., Collen, D.: Thrombosis and atherosclerosis: *Curr Op in Lip.* 1997, 8, s. 320-328.
12. Iiyama, K., Nagano, M., Yo, Y. et al.: Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am. Heart. J.* 1996, 132, s. 779-82.
13. Jessup, W.: Oxidized lipoproteins and nitric oxide: *Curr. Op. in Lip.*, 1996, 7, s. 274-280.
14. Lehman, E. D., Riley, W. A., Clarkson, P. et al.: Non invasive assesment of cardiovascular disease in diabetes mellitus: *Lancet*, 1997, 350 (Suppl. I): s. 14-19.
15. Lekakis, P. J., Papamichael, M. Ch., Vemos, C. N. et al.: Peripheral vascular endothelial dysfunctions in patient with angina pectoris and normal coronary arteriogram. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1998, 31, s. 541-6.
16. Lingeung, W. H., Lau, Ch. P., Wong, Ch. K. et al.: Beneficial effect of cholesterol lowering therapy on coronary dependent relaxation in hypercholesterolemic patients. *Lancet*, 1993, 341, s. 1496-500.
17. Luscher, T. F., Tanner, F. C., Noll, G.: Lipids and endothelial function: effects of lipid lowering and other therapeutic interventions. *Curr. Opinion lip*, 1996, 7, s. 234-240
18. Luscher, T. F., Noll, G.: Endothelial function as an endpoint in interventional trials: concept, methods and current data: *J. Hypertens.*, 1996, 14 (Suppl. 2), s. S111-S121.
19. Marečková, Z., Heller, S., Horký, K.: Buněčné adhezivní molekuly a jejich úloha v patofyziologických dějích. *Vnitř. Lék.*, 1999, 45, No 1, s. 46-60.
20. Marečková, Z., Heller, S., Horký, K.: Endotelální dysfunkce a arteriální hypertenze. *Vnitř. Lék.*, 1999, 45, No 4, s. 232-237.
21. McGorick, G. M., Treasue, B. Ch.: Endothelial dysfunction in coronary heart disease. *Curr opinion in Cardiology* 1996, 11, s. 341-50

22. Scheperd, J., Cobbe, M. Ford, I. et al.: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Eng. J. Med.*, 1995, 333, s. 1301-07.
23. Schmieder, R. E., Schobel, H. P.: Is entotelial dysfunctions reversible? *Am. J. Cardiol.*, 1995, 76, 117A-121A.
24. Sorensen, K. E., I. B. Kristensen, D. S. Celermajer: Atherosclerosis in the human brachial artery: *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1997, 29, s. 318-22.
25. Sorensen, K. E., Celermajer, D. S., Spiegelhalter, D. J.: Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br. Heart J.*, 1995, 74, s. 247-253.
26. Vogel, R. A., Corretti, M. C., Gellman, J.: Cholesterol, cholesterol lowering and endothelial function. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 1998, 41, No. 2: s. 117-138.

Došlo do redakce: 12. 7. 1999
Přijato: 1. 2. 2000

MUDr. Tomáš Šejda
III. interní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice
Vítězská 800
140 00 Praha 4

NEW TITLES OF THE CZECH MEDICAL ASSOCIATION JEP

ENDOSCOPY

Published in Czech/Slovak with English Summaries

4 x 20 printed pages per year, format A4, Volume 9, ISSN 1211-1074, Indexed in EMBASE/ExcerptaMedica

Subscription 2000: DM 120,-, USD 80,- incl.surface mail

The journal is focused on endoscopic problems of gastroenterology, urology, surgery, orthopaedics, gynaecology and pneumology. It publishes original papers, review articles, case reports, reviews, a congress calendar and further current professional information.

TRANSFUSION TODAY

Published in Czech /Slovak with English Summaries
4 x 24 printed pages per year, format A4, Volume 6
ISSN 1212-9887

Subscription 2000: DM 84,-, USD 56,- incl.surface mail

The journal is concerned with special problems of transfusion medicine and related areas for physicians and other medical staff. The journal devotes as much space as possible to original papers. In addition, it contains news from Czech and foreign congresses, informative lectures, current news about the Czech Transfusion Service, as well as minutes from the meetings of the Society for Transfusion Medicine CzMA. Occasionally, an appendix on current clinical problems is included.

In case of your interest please send your order to:

Czech Medical Association JEP
Publishing Division
Sokolská 31
120 26 Prague 2
Czech Republic

Fax +4202-249 11 420
E-mail: nts@iol.cz

9. Publikace č. 2

Limitations of non-invasive endothelial function assessment by brachial artery flow-mediated dilatation

Tomáš Šejda¹, Jan Pit'ha^{1,2}, Eva Švandová³ and Rudolf Poledne⁴

¹Department of Internal Medicine I, Thomayer Memorial University Hospital, Prague, ²Postgraduate Medical School, Prague, ³National Health Institute, Prague, and ⁴Center for Experimental Cardiovascular Research, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Summary

Correspondence

Tomáš Šejda, MD, Department of Internal Medicine I, Thomayer Memorial University Hospital, Vládkinská 800, Prague 4, 140 59, Czech Republic
E-mail: tomas.sejda@fmn.cz

Accepted for publication

Received 23 July 2004;
accepted 1 October 2004

Key words

atherosclerosis; endothelium; nitric oxide; ultrasonography; vasodilatation

A non-invasive technique using high-frequency ultrasound brachial artery imaging to assess endothelium-dependent flow-mediated vasodilatation is a widely used test, but interpretation of results is not consistent. This study was designed to assess the method of non-invasive endothelial function determination of a brachial artery. Endothelial function was assessed by two physicians in 18 young, healthy volunteers. Each volunteer was examined by both physicians on the same day using an identical protocol; a second assessment was carried out at an interval of 6–7 days. When comparing arterial dilatation at first and second measurements by one physician, there were no statistically significant differences (first physician: $5.95 \pm 2.93\%$ versus $7.63 \pm 4.3\%$; $P = 0.21$; second physician: $4.23 \pm 1.6\%$ versus $4.94 \pm 2.69\%$; $P = 0.22$). Further, we found statistically significant differences in artery dilatation when comparing measurements made separately by both physicians on the same day ($5.95 \pm 2.93\%$ versus $4.23 \pm 1.6\%$; $P = 0.03$, and $7.63 \pm 4.3\%$ versus $4.94 \pm 2.69\%$; $P = 0.003$). Our results suggest a large inter-individual variability of measurements within the whole group, if made on the same day and at the same time by two physicians. On the contrary, no significant differences were noted when comparing measurements of the whole group by the one physician at an interval of 1 week. It can be concluded that the degree of brachial artery flow-mediated dilatation is difficult to evaluate on the basis of a predefined cut-off point as a single-measurement screening test.

Introduction

The basic physiological functions of the endothelium are to ensure an optimal vessel diameter, to mediate inflammatory and immunological responses, to maintain a balance of the coagulation processes, and to ensure the integrity and structure of the vessel wall (Vogel *et al.*, 1998). Endothelial dysfunction is used when referring to impaired endothelial-dependent vasodilatation; however, it probably includes conditions leading to endothelial activation where abnormal interaction with leucocytes, blood platelets and regulatory substances occur (Harrison, 1997; Anderson, 1999). The factors most often implicated in the development of impaired endothelial function include dyslipidaemia, arterial hypertension, smoking, non-insulin dependent diabetes mellitus, hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction caused by inflammation, immunocomplexes, or medication. Endothelial dysfunction can be considered the first, functionally significant stage of atherosclerosis (Anderson *et al.*, 1995; Šejda *et al.*, 2002).

Clinically, vasoregulation has been measured in both the coronary and peripheral circulation, using changes in vessel diameter as an index of conduit vessel endothelial function. The three most common clinically used techniques include (i) quantitative angiographic measurement of changes in the coronary artery diameter or blood flow in response to intracoronary acetylcholine or serotonin infusions, (ii) ultrasound measurement of changes in the brachial artery diameter after hyperemia induction with blood pressure cuff occlusion and flow-mediated dilatation (FMD), (iii) and forearm blood flow measurement by venous plethysmography using intra-arterial infusion of a cholinergic stimulus. These methods utilize various stimuli, which enhance the release of endothelial nitric oxide (NO) causing artery dilatation (Celermajer *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 1999).

A disadvantage of angiography and plethysmography (after the intra-arterial infusion of a stimulus) is its invasive nature, which generally makes it unsuitable for studies involving asymptomatic subjects. It was for this reason that non-invasive

evaluation of endothelial function with high-resolution ultrasound has been developed. The most widely used ultrasound-based test involving measurement of the arterial diameter in response to shear stress and NO release, which causes endothelium-dependent dilatation, is brachial artery FMD. This test is non-invasive, non-radioactive, and offers a good cost-benefit ratio; however, interpretation of results is not consistent, because of problems with reproducibility (include image variability and variability in measurements) (Corretti et al., 2002; de Roos et al., 2003). Some authors suggested its use in clinical settings, but methodology is not standardized to allow clinical use (Lind, 2001; Corretti et al., 2002).

We undertook this study to assess variability and reproducibility of a simple technique of brachial artery FMD measurement in young healthy volunteers by two physicians on same day and the time, and repeat the measurement at a 1-week interval. The aim of this study was to compare measurements of brachial artery vasoreactivity by two physicians at the same time, and to compare measurements by the same physician in an interval of 1 week.

Methods

Experimental protocol

Ultrasound measurements of brachial artery vasoreactivity were carried out between 7:00–8:30 hours, after a 12-h fast. Measurements were made by two physicians on the same day in only three to four volunteers, i.e. 18 volunteers in the course of 1 week. Each volunteer was examined by both physicians within a 13–15-min interval (it means interval between measurement FMD), the order of the physicians was randomized. The same protocol was applied in the second week, with the interval between taking measurements in the same volunteer being 6–7 days. The volunteers were asked to adhere to the same day/night routine of activities before both examinations (including no smoking before measurement). None developed an acute disease throughout the study. Both physicians had adequate experience with FMD measurement (over the 60 or 90 scans performed over a period of 1.5 years). The volunteers were asked to sign their informed consent before joining the study.

Volunteer characteristics

A total of 18 healthy volunteers (nine men and women each) with a mean age of 27.8 ± 2.8 years, and a body mass index (BMI) of 22.8 ± 2.8 kg m⁻² took part in the study. Five of the volunteers were cigarette smokers; none of the volunteers were taking chronic medication except for two women using hormonal contraception (low-dose contraception, 'micropills'). The women joined the study near the same period of their menstrual cycle.

Ultrasound technique and hyperaemic phase evaluation

Brachial artery vasoreactivity was measured non-invasively using the method developed by Celermajer et al. (1992). Endothelial

flow-dependent brachial artery dilatation was determined using an Accuson 128 XP/4 ultrasound system (Mountain View, CA, USA) with a linear-array 7 MHz transducer. In brief, brachial artery diameters were measured on B-mode ultrasound images. Continuous video recordings were obtained on VHS Sony-V PRO-X videocassettes throughout the investigation. Investigations were carried out with the subject in the supine position, in a dark room at a stable room temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$. After a 10-min rest, blood pressure and heart rate were measured twice using an automatic oscillometer (Boso Oscillomat, Bosch + Sohn, GmbH, Jungingen, Germany). The brachial artery was located about 5 cm above antecubital fossa of the right arm, and was identified by means of a Doppler pulse. After the start of the video recording, two reference points were assigned making it possible to keep the transducer in the same position during the entire investigation. On completion of the recording at rest, arterial occlusion was applied on the right forearm by means of a cuff attached to a conventional mercury sphygmomanometer inflated to a pressure of 50 mmHg above systolic pressure. After 4-min arterial occlusion, the cuff was deflated and another video recording was obtained for an additional 2 min in the subsequent hyperaemic phase. Image analysis was performed off-line using an Autocont Pentium PC (Autocont, Prague, Czech Republic) with 'Image Pro Plus' software (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA). The required portion of the recording was transferred from the videocassette to the PC monitor where the artery diameter was repeatedly measured from longitudinal images in which the lumen-intima interface is visualized on the near (anterior) and far posterior walls in separated sequences by means of callipers. As a rule, artery diameter measurements were made at 5-s intervals at the end of diastole (i.e. at maximum dilatation), six times in the resting phase and six times within 30–60 s after cuff deflation. All measurements and computer-assisted analyses were performed by one physician (T.S.) without visual control ('blind analyses'). The change of the arterial diameter in the hyperaemic phase was expressed as a percentage of the original value (Šejda et al., 2002).

Statistical methods

Results were expressed as mean \pm SD. Statistical testing of the differences between measurements by the two physicians on the same day, and differences of measurements of one physician between two examinations at a 1-week interval was performed using paired Student's *t*-test.

Results

Table 1 shows the mean values of systolic and diastolic blood pressure levels and heart rate before ultrasound measurements. There were no significant differences between the first and second measurements. Brachial artery dilatation in the hyperaemic phase (expressed as a percentage of original values) is shown in Table 2. Compared with the resting phase, highly significant artery dilatation in the hyperaemic phase was observed separately by both physicians at each single measurement of the whole group.

	First ultrasound examination			Second ultrasound examination		
	SBP	DBP	HR	SBP	DBP	HR
First physician	114 ± 11.3	70 ± 5.6	67 ± 13.7	114 ± 11.9	67 ± 5.1	63 ± 11.3 NS
Second physician	113 ± 11.1	70 ± 5.5	66 ± 8.7	113 ± 11.3	67 ± 6.2	63 ± 11 NS

NS, not significant.

	First physician	Second physician	Differences between
			physicians on the same day (%)
Changes in diameter (%) day one	5.95 ± 2.93***	4.23 ± 1.6***	1.72 ± 3.1*
Changes in diameter (%) after 1 week	7.63 ± 4.3***	4.94 ± 2.69***	2.71 ± 3.3**
Differences between measurements after 1 week (%)	1.7 ± 5.5 NS	0.69 ± 2.3 NS	

*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; NS, not significant.

The intra-observer coefficient of variation (the size of the variance of a measure relative to the mean value of what is being measured) of our measurements was 4.6% and 5.5%. A comparison of arterial dilatation at first and second measurements (first measurement and that made after 1 week) by one physician revealed no significant differences (first physician: 5.95 ± 2.93% versus 7.63 ± 4.3%; P = 0.21, and second physician: 4.23 ± 1.6% versus 4.94 ± 2.69%; P = 0.22) (Table 2). Finally, when comparing measurements made by both physicians on the same day, significant differences were demonstrated in artery dilatation (first physician: 5.95 ± 2.93% versus 4.23 ± 1.6%; P = 0.03, and second physician: 7.63 ± 4.3% versus 4.94 ± 2.69%; P = 0.003) (Table 2). Our study did not confirm the hypothesis under which the differences change depending on the baseline artery diameter. The baseline diameter was not inversely related to the per cent change of brachial artery FMD (P = 0.43).

Discussion

Our results suggest high inter-individual variability of measurements within the whole group on the same day and at the same time by two physicians. On the contrary, no significant differences were noted when comparing measurements within the whole group by the one physician at the 1-week interval. Reproducibility of single-physician measurements was good, as FMD values at the 1-week interval were within 2% for each physician (Sorensen et al., 1995). The intra-observer coefficient of variation of our measurements is acceptable; both physicians had sufficient experience with FMD measurement. The hypothesis of an effect of baseline artery diameter on the ability of the brachial artery to dilate in the hyperaemic phase was not confirmed. FMD values within the whole group of young, healthy volunteers ranged from 4.23 ± 1.6% to 7.63 ± 4.3%. The number of volunteers doubtlessly represents a smaller

Table 1 Mean values of systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) before ultrasound measurements (mean ± SD), whole group (n = 18).

Table 2 Changes in the brachial diameter (% ± SD) and a comparison of measurements by two physicians on the same day, and comparison of measurements by the same physician at the 1-week interval, whole group (n = 18).

limitation to the study, whereas an advantage of this study was the possibility of exact brachial artery diameter measurements using a computer with special software.

This study was designed to assess the method of non-invasive endothelial function determination of a brachial artery. Endothelial function determination varies depending on the technique of measurement and artery location. In conduit vessels, including coronary circulation, distal arteries tend to be more vasoactive compared with the more proximal large vessels. It is particularly in the presence of atherosclerosis, that endothelium-dependent responses tend to vary regionally, even in the same vessels (Vogel et al., 1998). The brachial ultrasound technique seems to be gaining in popularity, as judged by the number of recently published papers. This is probably because of its non-invasive character. However, while good reproducibility has been reported with the invasive forearm technique (Vogel, 1993; Lind et al., 1998), both good and poor reproducibility has been reported with the ultrasound technique (Sorensen et al., 1995; Hardie et al., 1997). It should be emphasized that the invasive method is intended for evaluation of smaller arteries, while the ultrasound technique is intended for endothelium-dependent vasodilatation in conduit arteries, suggesting that these two methods need not yield comparable results (Redberg et al., 2003).

Schroeder et al. (1999) defined endothelial dysfunction as FMD ≤ 4.5%. The findings of their study can be summarized as follows: (i) non-invasive endothelial dysfunction determination was found to be a sensitive and specific screening test in patients with clinically suspected coronary artery disease (CAD); (ii) the extent of measurable endothelial dysfunction does not correlate with the severity of CAD; and (iii) by defining a low cut-off point for endothelial dysfunction, reliable test results can be obtained despite the presence of cardiovascular risk factors. Limitations to data interpretation included a bias because of study group preselection and the fact that the cut-off point for endothelial dysfunction was

defined retrospectively. According to the study authors, a prospective study is needed to re-evaluate this cut-off point of FMD $\leq 4.5\%$.

The main limitation to this method, is its inherent biological variability of measurement. The vasodilator response to forearm ischaemia varies largely within an individual in response to many different variables (dietary patterns, woman's menstrual cycle) (Redberg et al., 2003).

Agewall et al. (2002) report that adding ischaemic handgrip exercise during occlusion of the brachial artery increases the postocclusion brachial artery flow velocity and dilatation, this increases vasodilatation is at least partly NO mediated.

Herrington et al. (2001) published data, which quantify the performance characteristics of an automated analysis method for measuring brachial vasodilator responses in population based research. Despite the very small changes in the diameter, good intra-observer and inter-observer reproducibility was reported. However their database combines cohorts from several studies, several centres, and used different ultrasound machines.

The role of this method as a screening test in the diagnosis of CAD must be further evaluated before it can be accepted as part of a new diagnostic algorithm in patients with suspected CAD. This is a non-invasive, non-radioactive approach with a reasonable cost-benefit ratio, it warrants further evaluation in the clinical setting in a large, prospective randomized study. As there is no single ideal measurement to assess the reproducibility of this technique, rigorous attention to protocol standardization, training and ongoing improvement is critical to generating valid, reproducible data.

It can be concluded that the degree of brachial artery flow endothelium-dependent dilatation is difficult to evaluate on the basis of a predefined cut-off point as a single-measurement screening test to indicate endothelial dysfunction. On the contrary, the variation of endothelial function after a defined stimulus (dietary, medication) examined at a predetermined interval using an identical protocol can help to assess enhanced or reduced efficacy of endothelium-dependent dilatation. Additional studies are needed to determine whether or not the methodology is sufficiently reproducible and whether or not the biological variability is sufficiently low to make exact FMD assessment. The methodology will need to be further refined, with formal opportunities for certification and continuing medical education, such as those that are currently available for other medical modalities of examination.

Acknowledgments

This project was supported by research grants CEZ L17/98/00023001 and NK 7374-3 awarded by the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

Agewall S, Hulthe J, Fagerberg B, Gottfridson B, Wikstrand J. Post-occlusion brachial artery vasodilatation after ischaemic handgrip exercise is nitric oxide mediated. *Clin Physiol Funct Imaging* (2002); **22**: 18–23.

Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* (1999); **34**: 631–638.

Anderson TJ, Uehata A, Gerhard M, Meredith IT, Knab S, Delagrande D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC. Close relationship of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* (1995); **26**: 1235–1241.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* (1997); **340**: 1111–1115.

Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilatation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interactions. *J Am Coll Cardiol* (1994); **24**: 1468–1474.

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* (2002); **39**: 257–265.

Hardie KL, Kinlay S, Hardy DB, Włodarczyk J, Silberberg JS, Fletcher PJ. Reproducibility of brachial ultrasonography and flow mediated dilatation (FMD) for assessing endothelial function. *Aust N Z J Med* (1997); **27**: 649–652.

Harrison DG. Nitric oxide and nitric oxide synthases. *J Clin Invest* (1997); **100**: 2153–2157.

Herrington DM, Fan L, Drum M, Riley WA, Pusser BE, Crouse JR, Burke GL, McBurnie MA, Morgan TM, Espeland MA. Brachial flow-mediated vasodilator responses in population-based research: methods, reproducibility and effects of age, gender and baseline diameter. *J Cardiovasc Risk* (2001); **8**: 319–328.

Lind L. Evaluation of endothelium-dependent vasodilatation in humans. *Blood Press* (2001); **10**: 124–130.

Lind L, Sarabi M, Millgard J. Methodological aspects of the evaluation of endothelium-dependent vasodilatation in the human forearm. *Clin Physiol* (1998); **18**: 817.

Redberg RF, Vogel RA, Criqui MH, Herrington DM, Lima JA, Roman MJ. Task force. No. 3 – what is the spectrum of current and emerging techniques for the noninvasive measurement of atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol* (2003); **41**: 1855–1917.

de Roos NM, Bots ML, Schouten EG, Katan MB. Within-subject variability of flow-mediated vasodilatation of the brachial artery in healthy men and women: implication for experimental studies. *Ultrasound Med Biol* (2003); **29**: 401–406.

Schroeder S, Enderle MD, Ossen R, Meisner CH, Baumbach A, Pfohl M, Herdeg CH, Oberhoff M, Hauerling HU, Karsch KR. Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilatation as a screening test for coronary artery disease: pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging. *Am Heart J* (1999); **138**: 731–739.

Šejda T, Kovář J, Pit'ha J, Cífková R, Švandová E, Poledne R. The effect of an acute fat load on endothelial function after different dietary regimen in young healthy volunteers. *Physiol Res* (2002); **51**: 99–105.

Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of endothelium dependent arterial response in man: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* (1995); **74**: 247–253.

Vogel RA. Endothelium-dependent vasoregulation of coronary artery diameter and blood flow. *Circulation* (1993); **88**: 325–327.

Vogel RA, Corretti MC, Gellman J. Cholesterol, cholesterol lowering, and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* (1998); **41**: 117–136.

10. Publikace č. 3

The Effect of an Acute Fat Load on Endothelial Function after Different Dietary Regimens in Young Healthy Volunteers

T. ŠEJDA¹, J. KOVÁŘ², J. PÍTHA³, R. CÍFKOVÁ⁴, E. ŠVANDOVÁ⁵,
R. POLEDNE²

¹Third Department of Internal Medicine, Thomayer Memorial University Hospital, ²Laboratory for Atherosclerosis Research, and ⁴Department of Preventive Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, ³Postgraduate Faculty of Medicine, ⁵National Health Institute, Prague, Czech Republic

Received February 2, 2001

Accepted June 6, 2001

Summary

Attention has recently been focused on endothelial function after a single high-fat meal, i.e. on the anticipated direct atherogenic effect of triglyceride-rich lipoproteins. Our study was designed to investigate the effect of a low-fat diet given for four weeks followed by a high-fat diet for another four weeks. At the end of each dietary period, a non-invasive ultrasound investigation of endothelial function of the brachial artery was performed along with laboratory tests. Endothelial function was measured immediately before the dietary load and after three and six hours in 11 healthy volunteers. The results were expressed as percentage of the changes in artery diameter at rest and during hyperemia; the data were processed using computer technology. When compared to the low-fat regimen, the total cholesterol content rose after the high-fat diet from 4.28 mmol/l to 5.15 mmol/l ($p < 0.05$) in the whole group of volunteers. There was no difference between both dietary regimens in baseline triglycerides. The brachial artery dilatation under basal conditions was 5.26 ± 2.88 mm after the high-fat diet compared with the value of 3.13 ± 3.01 mm ($p < 0.05$) after the low-fat diet. When measured individually endothelial function in the whole group of volunteers in the course of the day, the degree of arterial dilatation after one month on low-fat diet was 3.13 ± 3.0 %, 3.88 ± 2.5 % and 5.23 ± 3.3 % at single measurement. When comparing arterial dilatation at two closest measurements, a non-significant trend, $p > 0.05$ was seen in either case. The following values were obtained after one month on the high-fat diet: 5.26 ± 2.9 %, 4.47 ± 1.7 %, and 6.2 ± 3.6 %; again showing a non-significant trend of $p > 0.05$. In this study, a single high-fat meal at the different dietary regimen did not significantly influence the vasoreactivity of the brachial artery in young volunteers.

Key words

Postprandial lipemia • Hypertriglyceridemia • Endothelial dysfunction • Diet

Introduction

The endothelium is the largest endocrine organ weighing about 1.5 kg. It forms the inner lining of all

vessels in the human body. One of its basic physiological functions is to ensure an optimal vessel diameter, to maintain the equilibrium of the coagulation processes, and mediate inflammatory and immunological responses, and

to ensure the integrity and structure of the vessel wall. Endothelial function impairment is a basic factor implicated in the origin and development of blood vessel diseases (Vogel *et al.* 1998). Endothelial dysfunction can be considered the first, functionally significant stage of atherosclerosis. It is used to indicate the impairment of endothelial-dependent vasodilatation; however, it probably includes conditions leading to endothelial activation where abnormal interactions with leukocytes, blood platelets, and regulatory substances occur (Anderson 1999). The factors most often implicated in the development of impaired endothelial function include hyperlipoproteinemia, arterial hypertension, smoking, non-insulin dependent diabetes mellitus, hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction caused by inflammation, immunocomplexes, or medication (Šejda 2000).

Triglyceride-rich lipoproteins are now recognized as a risk factor for the development of ischemic heart disease (IHD), associated primarily with low HDL-cholesterol levels, the presence of small dense LDL particles, hyperinsulinemia, and insulin resistance (Gotto *et al.* 1998). Triglyceride-rich lipoproteins have been shown to be an independent risk factor for the development of IHD in a specific patient group (Gotto and Phil 1998). A number of publications deal with hypotheses concerning the atherogenic effect of triglyceride-rich lipoproteins resulting from a single high-fat meal, or after the intravenous application of "Intralipid". In this case, the mechanism of the atherogenic effect is based on inducing endothelial dysfunction as an early manifestation of atherosclerosis. The reactive hyperemia affecting the vasoreactivity e.g. of the brachial artery, is a sensitive, nitric oxide (NO)-dependent index of endothelial function correlating with coronary arterial vasoreactivity after acetylcholine administration (Anderson *et al.* 1995). Recent studies have demonstrated comparable impairment of the endothelial function of coronary and brachial arteries associated with risk factors of atherosclerosis (Celermajer *et al.* 1994).

The aim of this study was to determine the vasoreactivity of the brachial artery after a high-fat (HF) load using two different dietary regimens, each of them used for a one-month period. A low-fat (LF) diet was given to healthy volunteers for four weeks, followed by HF diet for the next four weeks. To determine whether the employed dietary regimen and a single dietary load would cause endothelial function impairment of the brachial artery, a non-invasive, high-resolution ultrasound

method was used to assess the extent of arterial dilatation in the course of reactive hyperemia.

Table 1. Structure of low-fat (LF) and high-fat (HF) diet

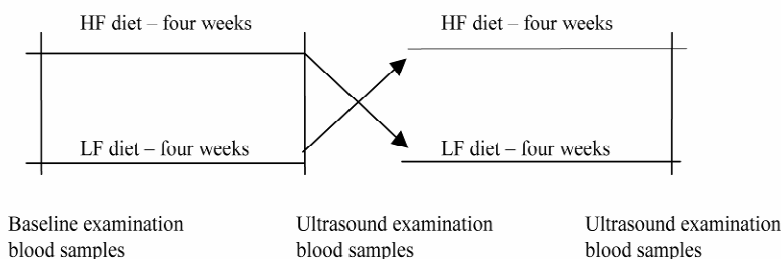
	LF diet	HF diet
<i>Energy</i>		
<i>kJ/70 kg of weight</i>	10 525	10 525
<i>Fats</i>		
<i>g/70 kg of weight</i>	70.2	120.1
<i>Saccharides</i>		
<i>g/70 kg of weight</i>	402.9	279.5
<i>Proteins</i>		
<i>g/70 kg of weight</i>	84.1	84.1
<i>Fats</i>		
<i>energy portion in %</i>	26	44.5
<i>Cholesterol</i>		
<i>mg/70 kg of weight</i>	204	611

Methods

The experimental protocol

The volunteers were given the LF diet for four weeks and the HF diet for the ensuing four weeks. The composition of the diets was close to that designed for preventing cardiovascular diseases (LF diet), and to that typical for the Czech population (HF diet), see Table 1. The order of the diets was randomized, the study was run in a "cross-over" manner (for the schedule see Fig. 1). The decision to use both diets for four weeks each was made on the basis of a pilot study demonstrating that the diets were isocaloric, that they were associated with no weight gain after 6 weeks, and that cholesterolemia increased after 4 weeks compared with the baseline. Nevertheless, its level no longer tended to rise does not change further (Kovář *et al.* 1999, Kovář and Poledne 2000). At the end of each dietary period, ultrasound measurements of brachial artery vasoreactivity were carried out at 7:00 h, after a 12-hour fast. Half an hour after the ultrasound examination, the volunteers received a dietary load (cream cake, doughnut, and cocoa) containing 57.5 kJ /Kg (44.8 % fats, 46.8 % saccharides, 25.1% proteins). Three and six hours after the dietary load, the ultrasound investigation was repeated with blood samples obtained at an interval of 90 min over a 9-hour period. The volunteers were allowed to drink only water or coffee and sugar-free beverages during the investigation. The volunteers were asked to sign their informed consent before joining the study.

Fig. 1. Study schedule



Characteristics of volunteers

A total of 11 healthy volunteers (six men and five women) 24 ± 4.6 years old with BMI 22.8 ± 1.7 kg/m², mean systolic and diastolic blood pressure 112 ± 6.2 and 74 ± 8.1 mm Hg, respectively, took part in the study. Their mean total cholesterol level was 4.6 ± 0.86 mmol/l, triglycerides 1.4 ± 0.85 mmol/l, HDL-cholesterol 1.3 ± 0.26 mmol/l, and glycemia 5.15 ± 0.45 mmol/l. One of the volunteers was a cigarette smoker (7 cigarettes per day), three women used hormonal contraception (low-dose contraception, "micropills"). The apolipoprotein (apo) genotype E 3/3 was identified in eight cases, while the apo E 3/4 form was found in the other cases (as determined using PCR). The women joined the study at the same period of their menstrual cycle, between days 5 and 12. Body weight was monitored throughout the study so that the energy intake could be adjusted accordingly in the case of body weight changes.

Ultrasonography technique and evaluation of hyperemic phase

Brachial artery vasoreactivity was measured non-invasively using the method developed by Celermajer *et al.* (1992). Endothelial flow-dependent brachial artery dilatation was determined using an Accuson 128 XP/4 ultrasound system (Mountain View, California, USA) with a linear-array 7 MHz transducer. In brief, the brachial artery diameter was measured on B-mode ultrasound images. Continuous videorecordings were obtained on VHS Sony-V PRO-X videocassettes throughout the investigation. The investigations were carried out with the patient in the supine position, in a quiet dark room at room temperature. After a 10-min rest, blood pressure and heart rate were measured using an automatic oscillometer (Boso Oscillomat, Bosch + Sohn, GmbH, Jungingen, Germany). The brachial artery was located about 5 cm above the antecubital fossa of the

right arm and was identified by means of pulse Doppler. After starting the video recording, two reference points were assigned making it possible to keep the transducer in the same position during the entire investigation. On completion of the recording at rest, arterial occlusion was applied on the right forearm by means of a cuff attached to a conventional mercury sphygmomanometer inflated to a pressure of 50 mm Hg above systolic pressure. After a 4-min arterial occlusion, the cuff was deflated and, a video recording was obtained for an additional 2 min in the subsequent hyperemic phase. Image analysis was performed off-line using an Autocont Pentium PC (Autocont, Prague, Czech Republic) with "Image Pro Plus" software (Media Cybernetics, Silver Springs, Maryland, USA). The required portion of the recording was transferred from the videocassette to the PC monitor where artery diameter was repeatedly measured in separated sequences by means of calipers. The artery diameter measurement was always made at the end of the diastole (representing maximum dilatation) at 5-second intervals, six times in the resting phase and six times within 30-60 seconds after cuff deflation. All material measurements and computer-assisted analyses were performed by the same physician without optical control. In a separate study (Pit'ha *et al.* 2002), coefficient of variation (3.21 %) was calculated in 10 individuals, repeatedly evaluated at seven-day intervals. The change of the arterial diameter in the hyperemic phase was expressed as percentage.

Lipid determination

A venous catheter was introduced into the left forearm at the end of either dietary regimen before the LF or HF diet, and baseline blood samplings were withdrawn. The samples were used to determine total cholesterol, triglycerides, and HDL-cholesterol by enzymatic methods (Boehringer, Mannheim, Germany).

LDL-cholesterol was calculated using Friedewald's formula. Blood sampling was performed at 90-min intervals for nine hours every day. Postprandial hypertriglyceridemia was assessed as part of postprandial lipidemia studies.

Statistical methods

The results were expressed as means \pm SD. Statistical testing of the differences between the resting values and those determined during reactive hyperemia was performed using Student's paired t-test.

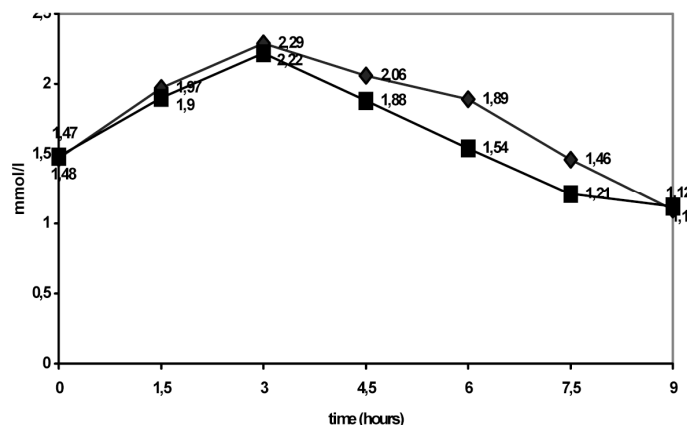


Fig. 2. Values of serum triglycerides in the course of the day on dietary load after HF and LF regime.

◆ HF - high-fat diet, ■ LF - low-fat diet

Table 2. The lipid parameters after different dietary regimens

	LF diet	HF diet
Total cholesterol	4.28 \pm 1.28	5.16 \pm 1.3*
HDL cholesterol	1.21 \pm 0.21	1.53 \pm 0.37
LDL cholesterol	2.41 \pm 0.88	2.97 \pm 1.05•
Triglyceride	1.46 \pm 1.52	1.52 \pm 0.67

LF low-fat; HF high-fat diet, * $p < 0.05$; • $p = 0.05$, in mmol/l \pm S.D.

Results

The mean values of individual lipid parameters obtained after different dietary regimes are listed in Table 2. Cholesterol levels were after HF diet higher by 20.5 % compared with the LF diet in all subjects; no significant differences in triglyceride or HDL-cholesterol levels were observed at baseline blood sampling after either dietary regimen. After the dietary load, plasma triglyceride concentration peaked within 3 to 4 hours (56 % to HF, 50 % to LF), returning to baseline within 6 to 7 hours (Fig. 2).

The brachial artery diameters at rest and during hyperemia in the whole group of volunteers at individual

points of time (i.e. before dietary load administration and 3 and 6 hours after the load) are shown in Table 3. The brachial artery dilatation in the hyperemic phase (expressed as percentage) is also shown in Table 3. Compared with the resting phase, a statistically significant artery dilatation in the hyperemic phase was always found at single measurements.

Furthermore, the degree of arterial dilatation at baseline was compared with that determined 3 h after the dietary load and between the dilatation, as determined 3 h and 6 h after the load. The test was performed separately for both dietary regimens (see Tab. 3). In the course of the day, no statistically significant difference in arterial dilatation in the hyperemic phase was observed on either dietary regime. Similar results were obtained in a subgroup of women showing no significant difference in the degree of arterial dilatation during the day with both dietary regimens. In a subgroup of men, when comparing baseline dilatation with that three hours after the dietary load, a $p = 0.06$ was calculated (i.e. at the limit of statistical significance); other results are similar to those determined for the entire group.

When comparing total cholesterolemia at baseline blood samples, there was a significant increase from 4.28 \pm 1.08 mmol/l after LF to 5.16 \pm 1.3 mmol/l after HF ($p < 0.05$). On the other hand, arterial dilatation at basal measurements was 5.26 \pm 2.88 after HF in contrast to

from them, and IDL-cholesterol as a remainder of VLDL-cholesterol-ensuing particles are considered highly atherogenic (Brewer 1999). In some studies, the degree of postprandial lipemia has been associated with insulin resistance, hyperinsulinemia, and it has also been indicated as a risk factor for the development of IHD independent of whether or not LDL-cholesterol increases (Gotto and Phil 1998).

Isolated hypertriglyceridemia was identified as an independent risk factor in women aged 50 to 69 years in the Framingham study (Castelli 1992), in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus in the Paris Prospective study (Fontbonn *et al.* 1989), and in men in the Copenhagen study with medium and higher degree hypertriglyceridemia determined as an independent predictor for the development of IHD (Jeppesen *et al.* 1998). This conclusion was confirmed in a meta-analysis of 17 prospective population-based studies (Hokanson and Austin 1996). Hypertriglyceridemia is classified as a metabolic condition associated with an increased risk for the development of atherosclerosis. The above conditions include postprandial lipemia, insulin resistance, hyperinsulinemia, small dense LDL particles, increased LDL particles oxidability, and central obesity (Gotto and Phil 1998, Brewer 1999).

The number of volunteers doubtlessly represents a limitation to this study; however, it did not differ from that reported in the above studies. An advantage of this study was the possibility of exact measurement of the brachial artery diameter using a computer. The slight difference in triglyceridemia in basal blood sampling after both dietary regimens can be due to the isocaloric diet characteristics (Table 1). The reason for comparing two nearby measurements was whether the current changes in triglyceridemia would result in a change in endothelial function, which was to be related to the nature of the dietary load and, subsequently, monitoring the plasma triglyceride concentration in the course of the day (Fig. 2)

References

- ANDERSON TJ: Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* **34**: 631-638, 1999.
- ANDERSON TJ, UEHATA A, GERHARD M, MEREDITH IT, KNAB S, DELAGRANGE D, LIEBERMAN EH, GANZ P, CREAGER MA, YEUNG AC: Close relationship of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* **26**: 1235-1241, 1995.

After a four-week HF regimen, brachial artery dilatation under basal conditions was significantly higher, the same as the increase in total cholesterolemia, compared with the LF regimen. It should be emphasized again that young, healthy volunteers took part in the study, and there was an intraindividual difference in the results obtained at individual measurements in one-month intervals. There is no doubt that numerous factors act in synergy to affect endothelial function (Celermajer *et al.* 1992), and there is variability between individual examinations on different days (Anderson 1999). Schnell *et al.* (1999) did not demonstrate impaired brachial artery dilatation in patients with moderately increased LDL-cholesterol but without other risk factors of atherosclerosis compared with individuals with normal LDL-cholesterol levels.

The reason for the different findings obtained when monitoring the effect of a single dietary load on brachial artery vasoreactivity in the above studies remains unclear. The group of volunteers, the dietary load, and postprandial triglyceridemia in these studies are comparable. Further study of endothelial function and the effect of individual lipid fractions on the development of endothelial dysfunction as the first functionally significant stage of atherosclerosis should be carried out. It can be concluded that a HF load applied in a single dose does not significantly influence brachial artery vasoreactivity in young, healthy volunteers after four weeks of low and high-fat diet regimes.

Acknowledgements

The author would like to extend his special thanks to Jan Kovář, M.Sc., Ph.D. for his excellent coordination of the dietary periods. Thanks are also due to Petr Bubeníček M.D., and Jana Lálová, M.D., for the complete baseline physical examination.

This project was supported by grant No. NA 5301-3 and NJ 6361-3 awarded by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

- BREWER H.B: Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* **83**: 3F-12F, 1999.
- CASTELLI W: Epidemiology of triglycerides: a view of Framingham. *Am J Cardiol* **70**: 3H-9H, 1992.
- CELERMAJER DS, SORENSEN KE, BULL C, ROBINSON J, DEANFIELD JE: Endothelium-dependent dilatation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interactions. *J Am Coll Cardiol* **24**: 1468-1474, 1994.
- CELERMAJER DS, SORENSEN KE, GOOCH VM, SPIEGELHALTER DJ, MILLER OI, SULLIVAN ID, LLOYD JK, DEANFIELD JE: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* **340**: 1111-1115, 1992.
- DE MAN FH, WEVERLING-RIJNSBURGER AW, VAN DER LAARSE A, SMELT AH, JUKEMA JW, BLAUW GJ: Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 744-750, 2000.
- DJOUSSE L, ELLISON RC, MCLENNAN CE, CUPPLES LA, LIPINSKA I, TOFLER GH, GOKCE N, VITA JA: Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* **84**: 660-664, 1999.
- FONTBONNE A, ESCHWEGE E, CAMBIEN F, RICHARD JL, DUCIMETIERE P, THIBULT N, WARNET JM, CLAUDE JR, ROSSELIN GE: Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes: results from 11-year follow-up of Paris Prospective Study. *Diabetologia* **32**: 300-304, 1989.
- GOTTO M, PHIL D: Triglyceride. The forgotten risk factor. *Circulation* **97**: 1027-1028, 1998.
- HOKANSON J, AUSTIN M: Plasma triglyceride levels is a risk factor for cardiovascular diseases independent of high-density lipoprotein cholesterol level: meta analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* **3**: 213-229, 1996.
- JEPPESEN J, HEIN HO, SUADICANI P, GYNTELBERG F: Triglyceride concentration and ischemic heart disease. An eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* **97**: 1029-1036, 1998.
- KOVÁŘ J, LÁNSKÁ V, MENGEROVÁ O, POLEDNE R: The sex difference in postprandial lipemia is explained by the difference in LPL activity measured by the intravenous fat tolerance test. *Cor Vasa* **41**: K125-126, 1999.
- KOVÁŘ J, POLEDNE R: Sex differences in the response of postprandial lipemia to a change from a low-fat low-cholesterol diet to a high-fat high-cholesterol diet. *Physiol Res* **49**: 233-239, 2000.
- LUNDMAN P, ERIKSSON M, SCHENK-GUSTAFSSON K, KARPE F, TORNVALL P: Transient triglyceridemia decreases vascular reactivity in young healthy men without risk factors for coronary heart disease. *Circulation* **96**: 3266-3268, 1997.
- PIŤHA J, ROZTOČIL K, ČÍFKOVÁ R, LÁNSKÁ V: Endothelial dysfunction and its evaluation (in Czech). *Cor Vasa*, accepted for publication (2002)
- RAITAKARI OT, LAI N, GRIFFITHS K, MCCREDIE R, SULLIVAN D, CELERMAJER DS: Enhanced peripheral vasodilatation in humans after a fatty meal. *J Am Coll Cardiol* **36**: 417-422, 2000.
- SCHNELL GB, ROBERTSON A, HOUSTON D, MALLEY L, ANDERSON TJ: Impaired brachial artery endothelial function is not predicted by elevated triglycerides. *J Am Coll Cardiol* **33**: 2038-2043, 1999.
- ŠEJDA T: Vascular endothelial dysfunctions, possible detection and treatment. *Vnitř. Lék.* **46**: 403-407, 2000.
- SPÁČIL J, ČEŠKA R: Non-invasive assessment of endothelial vasomotor function. *Cor Vasa* **41**: 408-410, 1999.
- VOGEL A, CORRETI C, GELLMAN J: Cholesterol, cholesterol lowering and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* **41**: 117-136, 1998.

Reprint requests

Tomáš Šejda, MD, Department of Internal Medicine III, Thomayer Memorial University Hospital, Vídeňská 800, 140 59 Prague 4, Czech Republic, e-mail: tomas.sejda@ftn.cz

11. Publikace č. 4

The effect of fluvastatin on cICAM-1 as a biomarker of endothelial dysfunction in patients with dyslipidemia

T. ŠEJDA¹, V. JEDLIĚKOVÁ¹, E. ŠVANDOVÁ², R. POLEDNE³

¹Department of Internal Medicine I, Thomayer University Hospital, Prague, Czech Republic

²National Health Institute, Prague, Czech Republic

³Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Aim. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression has been suggested to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. Lipid-lowering therapy with 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors reduces the incidence of atherosclerosis-related cardiovascular events. The aim of this study was to establish the effect of a 3-month treatment of fluvastatin on circulating (c)ICAM-1 and standard lipid parameters.

Methods. A total of 14 patients (6 men and 8 women), 59.7±11 years old, with mean systolic and diastolic blood pressure 135±16.3 and 81±9.3 mmHg, respectively, fasting plasma cholesterol 6.2±1 mmol/L and plasma triglycerides 2.6±1 mmol/L, took part in the study. The observed parameters were measured before and after 3 months of therapy.

Results. When comparing total cholesterolemia, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and apolipoprotein B, there were significant decreases after a 3-month treatment. By contrast, no significant difference was observed when we compared the values of triglycerides, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, apolipoprotein A1 and, especially, of cICAM-1. Our results demonstrate the well-known capacity of fluvastatin to lower LDL- and total cholesterol; however, it failed to reduce cICAM after a 3-month treatment.

Conclusions. It can be concluded that a 3-month therapy with fluvastatin does not decrease cICAM-1 levels, despite normalization of cholesterol levels. The implication is that cholesterol may not induce endothelial activation by the initial upregulation of this adhesive molecule.

[Int Angiol 2006;25:414-7]

Key words: Atherosclerosis - Fluvastatin - Endothelium - Intercellular adhesion molecule-1.

The endothelium is a functional barrier between the vessel wall and blood stream, which has long been regarded as a relatively inert container for

This project was supported by grant No. LN00A069 awarded by the Ministry of Education, Youth and Sports.

Acknowledgements. The author would like to extend his thanks to the staff at the outpatient department of the First Department of Internal Medicine of Thomayer University Hospital for their valuable service.

Received June 30, 2006; acknowledged September 14, 2006; accepted for publication September 28, 2006.

blood. It is now clear that endothelial dysfunction disturbs the physiological protective regulatory balance, which is a critical factor in atherosclerosis progression.¹ One of its basic physiological functions is to ensure an optimal vessel diameter, to maintain the equilibrium of the coagulation processes, to mediate inflammatory and immunological responses, and to ensure the integrity and structure of the vessel wall.² Endothelial dysfunction is a basic factor implicated in the origin and development of blood vessel diseases.³

Hypercholesterolemia is a well-known cardiovascular risk factor. Large clinical trials with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) have shown that lowering cholesterol levels decreases the incidence of cardiovascular events and progression of atherosclerosis.⁴

Animal studies of hyperlipidemia have indicated a pivotal role of leukocyte adhesion molecules (AMs) in propagation of atherosclerosis.⁵ Low-density lipoprotein (LDL) has been shown to upregulate expression of vascular cell AM-1 (VCAM-1) and intercellular AM-1 (ICAM-1). These molecules facilitate the diapedesis of leukocytes into plaques.⁶ Pathological studies have also demonstrated increased AM expression in human atherosclerosis plaques;⁷ it is, however, difficult to determine whether or not hypercholesterolemia directly increases AM expression in humans because of the inability to readily assess the levels of AM expression of the vascular endothelium. As circulating (c)AMs have been used as a marker of atherosclerosis,⁸ clinical trials have sought to discover a potential association between hypercholesterolemia and AM expression by measur-

ing these AMs: elevated AMs have been found in hypercholesterolemic patients in some studies.⁹

Leukocyte AMs, regulating interactions between vascular and circulating cells, may play a central role in the pathogenesis of atherosclerosis and related complications.¹⁰ Endothelial dysfunction can be characterized by the upregulation of leukocyte AMs including ICAM-1. Upregulation of ICAM-1 has also been suggested to play an important role in the pathogenesis of vascular remodeling.¹¹ Increased levels of ICAM-1 have been found on the endothelium of atherosclerotic plaques and ICAM-1 has been identified in early fatty streaks in many studies.¹² Endothelial dysfunction can be considered as the first stage of atherosclerosis.¹³

The purpose of this study was to determine whether the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin decreases cICAM-1 release into circulation. Clearly, the aim of this study was to establish the effect of a 3-month treatment of fluvastatin on cICAM-1 and standard lipid parameters.

Materials and methods

The experimental protocol

The study design was to establish the effect of a 3-month treatment with fluvastatin (80 mg; Lescol XL[®], Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) on cICAM-1 and standard lipid parameters in patients with dyslipidemia in our lipid outpatient department. The study medication was taken once daily after the evening meal and patient's compliance was verified by pill counts. The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) and patients were asked to sign their informed consent before joining the study.

Characteristics of volunteers

At an initial screening visit, patients completed a detailed questionnaire about their medical and treatment histories, with body mass index (BMI) and waist/hip ratio (WHR) values. Blood pressure was recorded and venous fasting blood samples were drawn for overall cholesterol analysis. A total of 14 patients (6 men and 8 women), 59.7±11 years old, with mean systolic and diastolic blood pressure 135±16.3 and 81±9.3 mmHg, respectively,

and fasting plasma glycemia 5.56±0.76 mmol/L, took part in the study.

Patients with fasting plasma cholesterol 5.4-7.9 mmol/L, triglyceride levels below 3 mmol/L and in whom dietary fat restriction did not result in a decrease in lipid parameters were enrolled into the study. All patients gave a medical history and underwent a physical examination and laboratory testing. Exclusion criteria were still unknown thyroid disease, pregnancy or lactation, malignancy, serious impaired hepatic or renal function (aspartate aminotransferase [AST] and alanine aminotransferase [ALT] >3 times the upper normal level and creatinine >200 μmol/L), consumption of >40 g/day of ethanol, and/or the intake of lipid-lowering drugs. Smokers were requested not to smoke for at least 2 h before blood sampling. All patients had to undergo dietary intervention with low-fat diet designed for cardiovascular disease prevention.

Laboratory analysis

The blood samples were taken in the morning after a 12-h fast because of the potential circadian variations in AM levels. The samples were used to determine total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL)- and LDL-cholesterol, apolipoprotein A1 and B by enzymatic methods (Boehringer, Mannheim, Germany) in the Laboratory Department of Thomayer University Hospital (Prague, Czech Republic). cICAM-1 levels were measured from frozen citrated plasma stored at -80 °C as duplicated with a single batch of enzyme immunoassays (R&D systems, McKinley Place, Minneapolis, MN, USA).

Statistical analysis

The results were expressed as mean±SD. Statistical testing of the differences of cICAM-1 and lipid parameters between the first and second examination (after 3 month treatment with statin) was performed using paired Student's t-test.

Results

Mean values of cICAM-1 and individual lipid parameters before and after 3-month treatment with fluvastatin are listed in Table I, as are BMI and WHR. When comparing total cholesterolemia,

TABLE I.—Mean values of monitored parameters at first and second (after 3-month treatment) examination (\pm SD) (whole group: n=14).

	First examination	Second examination	P values
cICAM (ng/mL)	250.9 \pm 37.6	240.7 \pm 51.7	0.355 NS
Total cholesterol (mmol/L)	6.21 \pm 1.02	5.05 \pm 1.17	0.002*
LDL-cholesterol (mmol/L)	4.02 \pm 1.06	2.94 \pm 0.01	0.007*
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.13 \pm 0.18	1.36 \pm 0.31	0.5 NS
Triglycerides (mmol/L)	2.56 \pm 1.01	2.18 \pm 0.72	0.22 NS
Apo B (mmol/L)	1.23 \pm 0.23	0.94 \pm 0.22	0.002*
Apo A1 (mmol/L)	1.36 \pm 0.16	1.44 \pm 0.11	0.157 NS
BMI (kg/m ²)	27.7 \pm 3.3	28.1 \pm 3.6	0.616 NS
W/H ratio (cm/cm)	0.93 \pm 0.07	0.90 \pm 0.07	0.04**

cICAM: circulating intracellular adhesion molecule-1; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; apo: apolipoprotein; BMI: body mass index, W/H: waist/hip; NS: statistically not significant; *P<0.01; **P<0.05.

LDL-cholesterol and apolipoprotein B, there were significant decreases after a 3-month treatment. By contrast, no significant difference was observed when we compared values of triglycerides, HDL-cholesterol, apolipoprotein A1 and, especially, cICAM-1. In the whole group, total cholesterol levels decreased by 19%, LDL levels by 27%, and apolipoprotein B levels by 24%. sICAM levels decreased by only 4.9%. A decrease in WHR was on the limit of statistical significance and BMI levels remained unchanged.

Discussion

This study was designed to assess the effect of fluvastatin on a biomarker of endothelial dysfunction, adhesive molecule cICAM-1, and lipid parameters in patients with dyslipidemia. Our results demonstrated the well-known capacity of fluvastatin to lower LDL- and total cholesterol; however, fluvastatin failed to reduce cICAM levels after a 3-month treatment. Another analysis showed borderline significant reduction of WHR, likely due to dietary intervention in our lipid outpatient department.

The same effect was described in a study, where 3 months of treatment with 3 different statins (atorvastatin, simvastatin, and pravastatin) did not reduce cAM levels (include cICAM-1) in patients with moderate hypercholesterolemia.⁸ In another study 10 hypercholesterolemic patients were treated with atorvastatin or simvastatin without any changes in the plasma levels of cICAM-1 or cVCAM-1.¹⁴

These findings seem to contradict data emerging from previous trials. It has been reported that a 12-week treatment with fluvastatin significant-

ly reduces the serum levels of P-selectin, ICAM-1 and von Willebrand factor.¹⁰ Other studies have demonstrated a 24% reduction in cICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients with peripheral artery disease after therapy with pravastatin and inhibition of the production of the superoxide anion (O₂⁻) and ICAM-1 by fluvastatin in a rat model with aortic remodeling.^{11, 15}

Atherosclerotic plaques are characterized by high-expression adhesive molecules including sICAM.¹⁶ In contrast with atherosclerosis, the effect of hypercholesterolemia on cAM levels has been a source of controversy.^{9, 10}

A likely explanation for the divergent findings could be the different patient groups studied, probably with varying degrees of (sub)clinical atherosclerosis. An alternative explanation could be differences in the intake of antioxidants among subjects in these studies. It is probable that cholesterol does not induce proinflammatory reactions when sufficient antioxidants are present in the vessel wall.⁸

In our study, we did not intend to assess whether long-term statin therapy may lower cICAM-1, because a late decrease in the level of this adhesive molecule is unlikely to be attributed to a decrease in cholesterol levels.

Conclusions

It can be concluded that a 3-month therapy with fluvastatin does not decrease cICAM-1 levels, despite normalization of cholesterol levels. The implication is that cholesterol may not induce endothelial activation by the initial upregulation of this adhesive molecule.

References

1. Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation: is there a link? *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1968-71.
2. Šejda T, Kovář J, Piňha J, Cífková R, Švandová E, Poledne R. The effect of an acute fat load on endothelial function after different dietary regimens in young healthy volunteers. *Physiol Res* 2002;51:99-105.
3. Vogel A, Corretti C, Gellman J. Cholesterol, cholesterol lowering and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;41:117-36.
4. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
5. Dong ZM, Wagner DD. Leukocyte-endothelium adhesion molecules in atherosclerosis. *J Lab Clin Med* 1998;132:369-75.
6. Smalley DM, Lin JH, Curtis ML, Kobari Y, Stemberman MB, Pritchard KAJ. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:585-90.
7. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D *et al.* The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-9.
8. Jilma B, Joukhadar CH, Derhasching U, Rassoul F, Richter V, Woltz M *et al.* Levels of adhesion molecules do not decrease after 3 months of statin therapy in moderate hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:189-93.
9. Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, Ciardia A, Marzocini P, Prontera C *et al.* Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecules expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997;96:1381-5.
10. Romano M, Mezzeti A, Marulli C, Ciabattini G, Febo F, Di Ienno S *et al.* Fluvastatin reduces soluble P-selectin and ICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide. *J Investig Med* 2000;48:183-9.
11. Katoh M, Kurosawa Y, Tanaka K, Watanabe A, Doih H, Narita H: Fluvastatin inhibits O₂⁻ and ICAM-1 levels in a rat model with aortic remodeling induced by pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H655-H660.
12. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996;93:672-82.
13. Šejda T, Piňha J, Švandová E, Poledne R. Limitation of non-invasive endothelial function assessment by brachial artery flow-mediated dilatation. *Clin Physiol Funct Imaging* 2005;25:58-61.
14. Hackman A, Abe Y, Insull W, Pownall H, Smith L, Dunn K *et al.* Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 1996;93:1334-8.
15. Blann AD, Gurney D, Hughes E, Buggins P, Silverman SH, Lip GY. Influence of pravastatin on lipoproteins, and on endothelial, platelet and inflammatory markers in subject with peripheral artery disease. *Am J Cardiol* 2001;88:89-92.
16. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risk of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88-92.

Address reprint requests to: T. Šejda, M.D., Department of Internal Medicine I, Thomayer University Hospital, Vídeňská 800, 140 59 Prague 4, Czech Republic. E-mail: tomas.sejda@ftn.cz

12. Diskuse na základě publikovaných dat

Publikované práce podávají popis současných poznatků o cévním endotelu, o možnostech detekce normální a porušené endoteliální funkce, hodnotí řadu různých faktorů, které ovlivňují endoteliální funkci, jak ve smyslu její poruchy, tak i možné úpravy porušené funkce endotelu.

Na základě dostupných poznatků o cévní endoteliální funkci i dysfunkci, které jsou sumarizovány v prvním přehledném článku, je endoteliální dysfunkce považována za první funkčně významné stadium aterosklerózy, které lze prokázat ještě před přítomností morfologických změn cévní stěny. Postižení endotelu se dále také různým mechanismem významně podílí i na klinickém obrazu u pacientů s obliterující aterosklerózou (23).

Cílem následujícího článku bylo zhodnocení nejčastěji používaného neinvazivního ultrazvukového vyšetření detekujícího poruchu vazomotorické funkce endotelu, tzn. měření dilatace tepny zprostředkované průtokem – FMD. Zde jsme se snažili nalézt odpověď na otázku, jak je tato metoda detekce endoteliální funkce klinicky či experimentálně využitelná.

V dalším článku byl posuzován vliv akutní vysokotukové zátěže na činnost cévního endotelu, kdy předpokladem poruchy endoteliální funkce je aterogenní působení lipoproteinů bohatých na triglyceridy.

V poslední práci je popisována rozšířená laboratorní metoda, která stanoví koncentraci určených adhesivních molekul v séru. Sledován byl vliv tříměsíční léčby statinem na dynamiku koncentrace ICAM-1 ve spojitosti s dynamikou standardních lipidových parametrů u pacientů s poruchou lipidového metabolismu.

Zobrazovací metody, jež stanovují endoteliální dysfunkci na základě reakce cévní stěny, lze rozdělit na invazivní a neinvazivní (25,26). Přímou v koronárním řečišti lze využít kvantitativní koronarografii či intrakoronární dopplerovskou ultrasonografii. Vzhledem k invazivitě a náročnosti na prostorové a přístrojové vybavení jsou častěji využívány neinvazivní metody k posouzení vazomotorických funkcí endotelu, kam řadíme ultrazvukové měření dilatace tepny zprostředkované průtokem (FMD) (31) a měření změn krevního průtoku nejčastěji v oblasti předloktí okluzní pletyzmografií (32). Nejčastěji používané ultrazvukové vyšetření detekující poruchu vasomotorické funkce endotelu je měření dilatace tepny pomocí FMD, jedná se o endotel-dependentní dilataci (28). Naše práce měla za cíl stanovit variabilitu a reprodukcibilitu u této ultrazvukové metody. Měření vazoreaktivity a. brachialis byla prováděna u mladých, zdravých dobrovolníků dvěma lékaři v intervalu jednoho týdne. Porovnáním arteriální dilatace při prvním a druhém měření jedním lékařem v odstupu jednoho týdne nebyly zjištěny statisticky významné změny (první lékař: $5,95 \pm 2,93$ % versus $7,63 \pm 4,3$ %; $p = 0,21$; druhý lékař: $4,23 \pm 1,6$ % versus $4,94 \pm 2,69$ %; $p = 0,22$). Naopak statisticky významné změny byly zjištěny při arteriální dilataci při srovnání měření prováděném odděleně oběma lékaři v tentýž den (první lékař: $5,95 \pm 2,95$ % versus $4,23 \pm 1,6$ %; $p = 0,03$; druhý lékař $7,63 \pm 4,3$ % versus $4,94 \pm 2,69$ %; $p = 0,003$). Výsledky ukazují vysokou inter-individuální variabilitu při měření prováděném ve stejné době odlišnými lékaři. Naopak nebyly pozorovány rozdíly při měření za identických podmínek jedním lékařem v odstupu jednoho týdne. Reproducibilita jednotlivých měření byla dobrá, hodnoty FMD se pohybovaly v intervalu 2 % pro jednotlivého lékaře (59). Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že rozsah měření při FMD je velmi variabilní (32). Je tedy velmi obtížné stanovit předem definované, referenční hodnoty, které by při jednorázovém screeningovém testu indikovaly poruchu endoteliální funkce (39). Dosud je metoda FMD předmětem rozsáhlých diskusí, které ji na jedné straně považují za spolehlivou a přesnou metodu, a na druhé straně,

jak ukazují naše závěry, za metodu, která má svá výrazná omezení a je dobře využitelná za zvlášť definovaných podmínek (58,80,81).

Endoteliální dysfunkce je základním faktorem podmiňujícím vznik a další rozvoj cévních onemocnění (4). Lipoproteiny bohaté na triglyceridy patří mezi nezávislé rizikové faktory při rozvoji ischemické choroby srdeční (82,83). Řada publikací pracuje s hypotézou, která popisuje možný aterogenní účinek těchto lipoproteinů spočívající ve vlivu jednorázové vysokotukové zátěže (2,84). Mechanismem aterogenního efektu by zde mělo být navození endoteliální dysfunkce jako časně manifestace aterosklerózy (85). Cílem další studie bylo tedy sledování vazoreaktivity a. brachialis po podání vysokotukové zátěže po zavedených dvou odlišných dietních režimů. Určit, zda podaná akutní vysokotuková zátěž ovlivní endoteliální funkci bylo zjišťováno pomocí ultrazvukové metody FMD. Endoteliální funkce byla měřena před podáním dietní zátěže a následně po 3 a 6 hodinách, v souvislosti s koncentrací triglyceridů v plazmě, která kulminovala po 3-4 hodinách a navracela se k původním hodnotám po 6-7 hodinách. Ve srovnání s klidovou fází byla dokumentována statisticky významná dilatace tepny v hyperemické fázi u všech jednotlivých měření ($p < 0,001$). Při určení endoteliální funkce pro celou skupinu dobrovolníků v průběhu dne byly hodnoty arteriální dilatace po třech jednotlivých měření po měsíci nízkotukové diety podané jednorázové dietní zátěže následující: $3,13 \pm 3,0$ %, $3,88 \pm 2,5$ % a $5,23 \pm 3,3$ %. Byl zjištěn nesignifikantní trend ($p > 0,05$) při srovnání vždy dvou sousedních měření. Hodnoty získané po podání dietní zátěže po měsíci vysokotukové diety jsou následující: $5,25 \pm 2,9$ %, $4,47 \pm 1,7$ % a $6,2 \pm 3,6$ %. Opět byl zjištěn nesignifikantní trend ($p > 0,05$) při porovnání dvou sousedních měření. V průběhu dne po podání dietní zátěže nebyly tedy shledány statisticky významné změny v dilataci a. brachialis po obou zavedených dlouhodobých dietních režimech, které by odpovídaly dokumentovaným významným změnám v koncentraci

triglyceridů v krevní plazmě. Výsledky další práce prokázaly, že akutní jednorázová vysokotuková zátěž podaná po zavedených měsíčních zcela odlišných dietních režimech neovlivnila signifikantně významně vazoreaktivitu a. brachialis u mladých, zdravých dobrovolníků, a že tedy předpoklad, že porucha endoteliální funkce je založena na aterogenním působení lipoproteinů bohatých na triglyceridy, není oprávněný (2,73,84). Tento závěr se zpočátku jevil jako velmi kontroverzní, protože studie publikované do té doby spíše uváděly opak, ale další publikované práce různých autorů jsou převážně v souladu s našimi závěry (86,87).

Leukocytární vazoadhezivní molekuly, které jsou odpovědné za interakci mezi buňkami endotelu a cirkulujícími buňkami, mají významnou roli v patogenezi aterosklerózy a jejich souvisejících komplikacích (34). Charakteristická pro endoteliální dysfunkci je porucha regulace těchto adhezivních molekul a jejich vyšší sérová koncentrace. Mezi tyto nejčastěji sledované částice se řadí ICAM-1, který se podílí na adhezi a následnou transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostor (88). Zvýšená koncentrace ICAM-1 byla opakovaně nalézána na aterosklerotických plátech i v tukových proužcích, a to ve spojitosti s vyšší koncentrací LDL-cholesterolu, který má vliv na zvýšenou expresi ICAM-1 (15). V následující studii jsme sledovali, zda terapie pomocí inhibitoru hydroxy-metylglutaryl-koenzym A reduktázy (statinu) ovlivní sérovou koncentraci ICAM-1. Výsledky prokázaly známou schopnost statinu významně snížit LDL-cholesterol ($4,02 \pm 1,06$ na $2,4 \pm 0,01$ mmol/l; $p = 0,007$) a celkový cholesterol ($6,21 \pm 1,02$ na $5,05 \pm 1,17$ mmol/l; $p = 0,002$). Bohužel zavedená terapie statinem selhala ve vlivu na předpokládané snížení koncentrace ICAM-1 ($250,9 \pm 37,6$ na $240 \pm 51,7$ ng/ml; $p = 0,355$) po 3 měsíční léčbě. Naše výsledky (89) se tak zařadily do skupiny prací, které neprokazují výše uvedenou hypotézu, že aktivace endotelu způsobená vyšší

hladinou cholesterolu neprobíhá na základě porušené regulace, která ovlivňuje a zvyšuje sérovou koncentraci ICAM-1 (90,91).

13. Souhrn

Na základě našich výsledků lze uzavřít, že rozsah ultrazvukově detekované dilatace tepny zprostředkované průtokem je velmi variabilní (92). Je tedy velmi obtížné předem stanovit referenční hodnoty, které by při jednorázovém screeningovém testu indikovaly poruchu endoteliální funkce. Naopak změna dilatace tepny po přesně definovaném stimulu (dietní zátěž, medikace), která je vyšetřena v odstupu, v přesně určeném intervalu a za použití identického protokolu může odhalit zvýšenou či sníženou schopnost tepny dilatovat a tím odhalit přítomnost porušené či normální endoteliální funkce u vyšetřované osoby (93).

Naše další výsledky prokázaly, že akutní jednorázová vysokotuková zátěž podaná po zavedení měsíčních, zcela odlišných dietních režimů signifikantně neovlivní vazoreaktivitu a. brachialis u mladých zdravých dobrovolníků, a že tedy předpoklad, že porucha endoteliální funkce je založena na aterogenním působení lipoproteinů bohatých na triglyceridy, není oprávněný (82).

Další publikovaná data neprokázala pozitivní vliv tříměsíční terapie statinem na snížení sérové hladiny ICAM-1, i když současně došlo k úpravě původně zvýšených parametrů lipidového metabolismu. Jako implikaci těchto výsledků, můžeme uvést, že aktivace endotelu způsobená vyšší hladinou cholesterolu neprobíhá na základě porušené regulace, která ovlivňuje hladinu této adhezivní molekuly (94).

Endoteliální dysfunkci můžeme považovat za první, funkčně významné stadium aterosklerózy, které je možno prokázat ještě před přítomností morfologických změn (95), tedy před proliferací hladké svaloviny a akumulací aterogenních hmot s následnou dezintegrací cévní architektury. U pacientů s pokročilou obliterující aterosklerózou se postižení endotelu podstatnou měrou podílí na výsledném klinickém stavu navozením cévních spasmů či trombotických komplikací (96).

Mezi předpokládané možnosti léčby porušené endoteliální funkce patří ovlivnění známých rizikových faktorů aterosklerózy (97). K těmto řadíme důslednou dietní léčbu, odstranění aktivního i pasivního kuřáctví. Mezi farmakologické možnosti léčby endoteliální dysfunkce řadíme léčbu hypolipidemiky- statiny (snížení LDL-cholesterolu, snížení aktivace endotelu, nižší tvorba ox-LDL, ↑ aktivita NOs a dostupnost NO, úprava zánětlivých a koagulačních parametrů, snížení adhesivních molekul, CRP a hladiny fibrinogenu a PAI-1), fibráty-(stimulace specifických receptorů (PPARs) - ↑apo AI (HDL-cholesterolu), ↓apo CIII (LDL-cholesterolu), ↓ tvorbu cytokinů a adhesivních molekul) dále antihypertenzní terapii – především ACE-inhibitory (blokáda konverze ATI na ATII, zábrana odbourávání bradykininu), dále antagonisté AT-1 receptorů pro ATII, antagonisté receptorů pro ET-1 (zvýšení produkce NO, zvýšením aktivity NOs), Ca-blokátory (redukce oxidativního stresu, ↑NOs), důsledná kompenzace cukrovky, možné je i podání antioxidantů a nitrátů. Další možností je příznivý účinek protizánětlivé léčby na endoteliální funkci při zjištěné vysoké koncentraci C-reaktivního proteinu. Dosud však stále chybí přímý důkaz, že léčbou navozené zlepšení endoteliální funkce se odrazí v nižší kardiovaskulární mortalitě a morbiditě.

V dnešní době máme k dispozici několik možností, jak detekovat a eventuálně i kvantifikovat endoteliální dysfunkci. Jsme ale v situaci, kdy není znám význam vyšetření

funkce endotelu u jednotlivých pacientů. Neinvazivní technika je vhodná pro vyšetření skupin v laboratořích se zkušenostmi v jejich použití a vyhodnocení (98,99). I v těchto laboratořích je však vysoká variabilita mezi vyšetřeními v různé dny, může se pohybovat okolo 10-20% (stejně jako u jiných technik měření endotheliální dysfunkce). V laboratořích, kde se vyšetření neprovádí často bude variabilita dvojnásobná. U FMD není shoda v délce ischemie, vyšetřovaném segmentu, typu sondy, způsobu výpočtu, nebo umístění ischemizační manžety (100). Proto se na prvním místě bude nutno věnovat zavedení standardní metodologie. Dále bude nutno stanovit vztah mezi vazomotorickými odpověďmi a dalšími kritérii aktivace endotelu (destičkové a leukocytární markery). Konečně bude zapotřebí provést intervenční studie ke zjištění zda je rozumné a účinné provádět intervenci u pacientů se zvýšeným rizikem vaskulární dysfunkce. Je třeba zjistit zda lze v primární prevenci populace použít endoteliální dysfunkci jako markeru vyššího rizika pro rozvoj aterosklerozy (101,102). Teprve další výzkum ukáže, do jaké míry lze tato data aplikovat na obecnou populaci, jaký bude jejich podíl na určení individuálního kardiovaskulárního rizika, jak budou jednotlivá vyšetření v praxi nákladná a dostupná a zda některé z nich bude odbornými společnostmi přijato do doporučených vyšetřovacích algoritmů jako součást preventivních programů. Stanovení kteréhokoli z ukazatelů endoteliální dysfunkce, včetně FMD, dosud zůstává cennou výzkumnou metodou a jeho využití v běžné klinické praxi zatím nelze doporučit.

14. Poděkování

Speciální poděkování patří mé rodině a přátelům za jejich dlouhodobou podporu a trpělivost v průběhu mého postgraduálního studia.

Děkuji svému školiteli prof. ing. Polednemu, CSc. za kritické připomínky a kvalifikované konzultace v průběhu mých výzkumných projektů.

Poděkování patří mému dalšímu školiteli doc. MUDr. Renatě Cífkové, CSc. za výjimečnou pomoc a cenné rady při realizaci mé disertační práce.

Poděkování patří také mému blízkému spolupracovníkovi MUDr. Janu Piřhovi, CSc. za příkladnou spolupráci a pomoc v průběhu jednotlivých projektů a při publikaci jejich výsledků.

Děkuji MUDr. Evě Švandové za statistickou analýzu dat z uvedených studií.

Děkuji René Prahlovi za jeho vynikající práci při překladech a korekturách textů umožňujících jejich publikaci v mezinárodních časopisech.

Nakonec bych rád poděkoval všem spolupracovníkům v Institutu klinické a experimentální medicíny a Fakultní Thomayerově nemocnici, kteří participovali v jednotlivých projektech.

15. Seznam publikací

Publikace in extenso

1. **Šejda T.** Vascular endothelial dysfunctions, potential for detection and treatment. Vnitř lék 2000;46:403-407.
2. **Šejda T.** Plant Sterols and Stanols in Prevention of Ischemic Heart Disease. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 2001;4:140-144.
3. **Šejda T**, Kovář J, Piřha J, Cífková R, Švandová E, Poledne R. The effect of an acute fat load on endothelial function after different dietary regimens in young healthy volunteers. Physiol Res 2002;51:99-105. **IF 0,984**
Reinišova cena za nejlepší publikaci pro autora do 35 let České angiologické společnosti pro rok 2002
4. **Šejda T**, Piřha J, Švandová E, Poledne R. Limitations of non-invasive endothelial function assessment by brachial artery flow-mediated dilatation. Clin Physiol Funct Imaging 2005;25:58-61. **IF 0,973**
5. **Šejda T**, Jedličková V, Švandová E, Poledne R. The effect of fluvastatin on cICAM-1 as a biomarker of endothelial dysfunction in patients with dyslipidemia. Int Angiol 2006;25:414-418. **IF 0,678**

Abstrakta

1. **Šejda T**, Piřha J, Švandová E, Poledne R. Limitations of non-invasive endothelial function assessment by brachial artery flow-mediated dilatation. Atherosclerosis Supplements 2005;146(1):130.
2. Cífková R, Stávek P, Poledne R, Piřha J, Škodová Z, Lánská V, Červenka L, **Šejda T.** High prevalence of small, dense LDL particles in the Czech population. Eur Heart J Abstract Supplement (August) 1997;18:219 (abstr. P1266). **IF 2,137**

3. **Šejda T**, Kovář J, Piřha J, Cífková R, Švandová E, Poledne R. Vliv vysokotukové zátěže na endoteliální funkci po zavedených odlišných dietních režimech u mladých dobrovolníků. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 2001;Supplementum 4:39.
4. Cífková R, Piřha J, Červenka L, **Šejda T**, Lánská V, Škodová Z, Stávek P, Poledne R. An improvement in CVD risk factors in a Czech district. Irish J Med Science 1998;167 (Suppl. 7):11. **IF 0,307**
5. Cífková R, Widimský J Jr, Piřha J, Červenka L, **Šejda T**, Lánská V, Škodová Z. Does it make sense to screen for primary aldosteronism in random population sample? J Hypertens 1998;16 (Suppl. 2):308. **IF 3,066**

Přednášky a postery

Šejda T, Kovář J, Piřha J, Cífková R, Švandová E, Poledne R. Vliv akutní vysokotukové zátěže na endoteliální funkci po zavedených odlišných dietních režimech u mladých dobrovolníků.

V. kongres o ateroskleróze, 6-8.12. 2001, Špindlerův Mlýn

Šejda T, Kovář J, Piřha J, Cífková R, Švandová E, Poledne R. The effect of an acute fat load on endothelial function after different dietary regiments in young healthy volunteers.

Days of Angiology 3-5.4. 2003, Prague

Šejda T, Piřha J, Švandová E, Poledne R. Limitations of non-invasive endothelial function assessment by brachial artery flow-mediated dilatation.

75th European Atherosclerosis Society Congress 23.-26.4.2005, Prague a XII. Výroční kongres České internistické společnosti ČLS J.E. Purkyně, 23-25.10. 2005, Praha

16. Literatura

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1986;314:488-500.
2. Vogel RA, Correti MC, Gellman J. Cholesterol, cholesterol lowering and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;41(2):117-138.
3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
4. De Caterina R. Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:9-23.
5. Gimbrone MA Jr, Kume N, Cybulsky MI. Vascular endothelial dysfunction and the pathogenesis of atherosclerosis. In: *Atherosclerosis reviews*. Weber PC, Leaf A. New York: Raven Press, 1993.
6. Holvoet P, Collen D. Thrombosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:320-328.
7. Flavahan NA: Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction: Potential mechanism underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 1992;85: 1927-1938.
8. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:383-389.
9. Luscher TF, Noll G. Endothelial function as an end point in interventional trials: concepts, methods and current data. *J Hypertens* 1996;14 (suppl 2):S111-S121.
10. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235-41.
11. Lingeung WH, Lau CHP, Wonk CHP et al. Beneficial effect of cholesterol lowering therapy on coronary dependent relaxation in hypercholesterolemic patients. *Lancet* 1993; 341:1490-500.

12. Galle J, Oschler M, Schollmeyer M et al. Oxidized lipoproteins inhibit endothelium dependent vasodilatation. *Hypertension* 1994;23:556-564.
13. Cines BD, Pollak ES, Buck AC et al.: Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91(10):3527-3561.
14. Marečková Z, Heller S, Horký K. Buněčné adhezivní molekuly a jejich úloha v patofyziologických dějích. *Vnitř Lék* 1999;45(1):46-60.
15. Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M et al. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecules expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997;96:1381- 1385.
16. Luscher TF, Tanner FC, Noll G. Lipids and endothelial function: effects of lipid lowering and other therapeutic interventions. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:234-240.
17. Bellien J, Thuillez C, Joannides R. Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22(4), 363-377.
18. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;75:71B-74B.
19. McGorisk GM, Treasue BC. Endothelial dysfunction in coronary heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1996;11:341-50.
20. Matz RL, Schott JC, Stoclet R et al. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res* 2000;49:11-18.
21. Tagawa T, Imaizumi T, Endo T et al. Role of nitric oxide in reactive hyperemia in human forearm vessels. *Circulation* 1994;20:2285-2290.
22. Quyyumi AA, Dakak N, Mulcahy D et al. Nitric oxide activity in the atherosclerotic human coronary circulation. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:308-317.

23. Šejda T: Cévní endoteliální dysfunkce, možnosti detekce a ovlivnění. *Vnitř Lék* 2000;46 (7):403-407.
24. Lind L: Evaluation of endothelium-dependent vasodilatation in humans. *Blood Press* 2001;10:124-130.
25. Egashira K, Inou T, Hirooka Y et al. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and prodromal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993;91:29-37.
26. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H et al. Endothelial dysfunction of coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991;84:1984-92.
27. Kawano H, Yoshida T, Miyao Y et al. The relationship between endothelial function in the brachial artery and intima plus media thickening of the coronary arteries in patient with chest pain syndrome. *Atherosclerosis* 2007;195:361-366.
28. Hartus CW, Edwards JL, Baruch A et al. Effects of mental stress on brachial artery flow-mediated vasodilatation in healthy normal individuals. *Am Heart J* 2000;139:405-11.
29. Malik J, Wichterle D, Haas T et al. Repeatability of noninvasive surrogates of endothelial function. *Am J Cardiol* 2004;94:693-696.
30. Jehlička P, Mayer O jr. Pilotní studie nové možnosti neinvazivního hodnocení dysfunkce endotelu pomocí analýzy charakteru postokluzního průtoku a.brachiális. *Čas lék čes* 2005;144:43-46.
31. Lekakis JP, Papamichael CHM, Vemmos CN. Peripheral vascular endothelial dysfunction in patient with angina pectoris and normal coronary arteriograms. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:541-6.

32. Redberg RF, Vogel RA, Criqui MH et al. Task force #3 - What is the spectrum of current and emerging techniques for non-invasive measurement of atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1886-1898.
33. Hladovec J, Prerovsky I. Endothelial lesion in hypertension. *Cor Vasa* 1989;31:51-4.
34. Dong ZM, Wagner DD. Leukocyte-endothelium adhesion molecules in atherosclerosis. *J Lab Clin Med* 1998;132:369-375.
35. Iglarz M, Clozel M. Mechanism of ET-1 induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:621-628.
36. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-15.
37. Schroeder S, Enderle MD, Ossen R: Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilatation as a screening test for coronary artery disease: Pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging. *Am Heart J* 1999;138:731-9.
38. Herrington DM, Liexiang F, Drum M: Brachial flow-mediated vasodilator response in population-based research: methods, reproducibility and effects of age, gender and baseline diameter. *J Cardiovasc Risk* 2001;8:319-328.
39. Correti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelium-dependent flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.
40. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilatation. *Endothelium* 2008; 15(4): 157-163.
41. Craiem D, Chironi G, Simon A et al.: New assessment of endothelium-dependent flow mediated vasodilatation to characterize endothelium dysfunction. *Am J Ther* 2008; 15(4): 340-344.

42. Šejda T, Piřha J, Švandová E et al. Limitation of non-invasive endothelial function assessment by brachial artery flow-mediated dilatation. *Clin Physiol Funct Imaging* 2005;25:58-61.
43. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:985-1002.
44. Karásek D, Vaverková H, Halenka M et al. Brachial endothelial function in subjects with familial combined hyperlipidemia and its relationships to carotid artery intima-media thickness. *Int Angiol* 2006;25:418-426.
45. Jessup W. Oxidized lipoproteins and nitric oxide. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:274-280.
46. Sorensen KE, Kristensen IB, Celermajer DS. Atherosclerosis in the human brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:318-22.
47. Galle J, Oschlen M, Schollmeyer P et al. Oxidized lipoprotein inhibits endothelium-dependent vasodilation. *Hypertension* 1994;23:556-564.
48. Scanu M, Lawn RM, Berg K. Lipoprotein(a) and atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1991;115:209-218.
49. Gibbons GH. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: A new therapeutic target. *Am J Cardiol* 1997;79(5A):3-8.
50. Harrison, DG. Nitric oxide and nitric oxide synthases. *J Clin Invest* 1997;100:2153-2157.
51. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF. The clinical implication of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-60.
52. Liu QM, Zhou SH, Qi SS et al. Sinificance of the lipid profile and endothelium-dependent vasodilatation in the pathogenesis of microvascular angina. *Cardiol J* 2008;15(4): 324-328.

53. Gokce N, Keaney JF, Hunter LM et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1769-75.
54. Vogel RA. Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis: A review. *Clin Cardiol* 1997;20:426-432.
55. Schmieder RE, Shoel H. Is endothelial dysfunction reversible? *Am J Cardiol* 1995;76:117A-121A.
56. Egashira K, Hirooka Y, Kai H. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 1994;89:2519-2524.
57. Scheperd J, Cobbe M, Ford I et al.. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Eng J Med* 1995;333:1301-07.
58. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-89.
59. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995;74:247-253.
60. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC et al. The effect cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Eng J Med* 1995;332:488-93.
61. Boulanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1): 39-49.

62. Iiyama K, Nagano M, Yo Y et al. Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J* 1996;132:779-82.
63. Marečková Z, Heller S, Horký K. Endoteliální dysfunkce a arteriální hypertenze. *Vnitř Lék* 1999;45(4):232-237.
64. Nakamura M, Funakoshi T, Yoshida H et al. Endothelium-dependent vasodilatation is augmented by angiotensin converting enzyme inhibitors in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:949-954.
65. Hirooka Y, Imaizumi T, Masaki H et al. Captopril improves impaired endothelium-dependent vasodilatation in hypertensive patients. *Hypertension* 1992;20:175-180.
66. Ceravolo R, Maio R, Pujia A. Pulse pressure and endothelial dysfunction in never-treated hypertension patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1753-8.
67. Lehman ED, Riley WA, Clarkson P et al. Non-invasive assessment of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Lancet* 1997;350:14-19.
68. Meigs JB, Hu FB, Rifai N et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004;291:1978-1986.
69. Suzuki T, Hirata K, Elkind MS et al. Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular events. *Am Heart J* 2008; 156(2): 405-410.
70. Weili Z, Chongfa Z, Yingjie Y et al. Acute effects of hyperglycaemia with and without exercise on endothelial function in healthy young men. *Eur J Appl Physiol* 2007; 99: 585-591.
71. Feener EP, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 1997;350 (suppl I):9-13.
72. Stroes ES, Koomans HA, de Bruin WA et al. Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet* 1995;346:467-71.

73. Šejda T, Kovář J, Piřha J et al: The effect of an acute fat load on endothelial function after different dietary regimens in young healthy volunteers. *Physiol Res* 2002;51:99-105.
74. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Eng J Med* 1996;334:150-4.
75. Sarkar K, Sinha AK, Mehta J. The role of statins in endothelial dysfunction in hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2006;21:316-321.
76. Malik J, Melenovsky V, Wichterle D et al. Both fenofibrate and atorvastatin improve vascular reactivity in combined hyperlipidaemia (fenofibrate versus atorvastatin trial-FAT) *Cardiovascular Research* 2001;52:290-298.
77. Škrha J, Štulc T, Hilgertová J et al. Effect of simvastatin and fenofibrate on endothelium in Type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol* 2004; 493: 183-189.
78. Warnholtz A, Ostad MA, Heitzer T et al. AT1-receptor blockade with irbesartan improves peripheral but not coronary endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2007;194:439-445.
79. Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation - is there a link? *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1968-1971.
80. Hardie KL, Kinlay S, Hardy DB et al. Reproducibility of brachial ultrasonography and flow-mediated dilatation (FMD) for assessing endothelial function. *Aust N Z J Med* 1997;27:649-652.
81. Lind L, Sarabi M, Millgard J. Methodological aspects of the evaluation of endothelium-dependent vasodilatation in the human forearm. *Clin Physiol* 1998;18:817.

82. Gotto M, Phil D. Triglyceride. The forgotten risk factor. *Circulation* 1998;97:1027-1028.
83. Hokanson J, Austin M. Plasma triglyceride levels is a risk factor for cardiovascular diseases independent of high-density lipoprotein cholesterol level: meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;3:213-229.
84. Lundman P, Eriksson M, Schenk-Gustafsson K et al. Transient triglyceridemia decrease vascular reactivity in young healthy men without risk factors for coronary heart disease. *Circulation* 1997;96:3266-3268.
85. Norata DG, Grigore L, Raselli S et al. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanism and gene expression studies. *Atherosclerosis* 2007;193:321-327.
86. Djousse L, Ellison RC, McLennan et al. Acute effect of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1999;84:660-664.
87. Raitakari OT, Lai N, Griffiths K et al. Enhanced peripheral vasodilatation in humans after a fatty meal. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:417-422.
88. Jilma B, Joukhar CH, Derhasching U et al. Levels of adhesion molecules do not decrease after 3 month of statin therapy in moderate hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:189-193.
89. Šejda T, Jedličková V, Švandová E et al. The effect of fluvastatin on cICAM-1 as a biomarker of endothelial dysfunction in patients with dyslipidaemia. *Int Angiol* 2006;25:414-417.
90. Hackman A, Abe Y, Insull W et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 1996;93:1334-1338.

91. Romano M, Mezzeti A, Marulli C et al. Fluvastatin reduces soluble P-selectin and ICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide. *J Invest Med* 2000;48:183-189.
92. Lockhart CJ, McVeigh GE, Cohn JN. Measuring endothelial function. *Curr Diab Rep* 2006;6:267-273.
93. Faulx MX, Wright AT, Hoit BD. Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. *Am Heart J* 2003;145:943-951.
94. Vogel RA, Nissen SE, Weis RJ. Endothelial function, low-density lipoprotein, and moderate and intensive cholesterol lowering in coronary artery disease: a REVERSAL trial substudy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45 (3 supplA), 412A: 831-836.
95. Meyers MR, Gokce N. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007; 14(5): 365-369.
96. Heitzer T, Baldus S, von Kodolitsch Y et al. Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1174-1179.
97. Miller M, Mangano C, Park Y et al. Impact of cinematic viewing on endothelial function. *Heart* 2006;92(2):261-262.
98. Harris RA, Padilla J, Hanlon KP et al. Reproducibility of the flow-mediated dilatation response to acute exercise in overweight men. *Ultrasound Med Biol* 2007; 33(10): 1579-1585.
99. Harris RA, Padilla J, Rink LD et al. Variability of flow mediated dilatation measurements with repetitive reactive hyperemia. *Vasc Med* 2006; 11(1): 1-6.
100. Gemignani V, Biachini E, Faita F et al. Ultrasound measurement of the brachial artery flow-mediated dilatation without ECG gating. *Ultrasound Med Biol* 2008; 34(3): 385-391.

101. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III-27 – III-32.
102. Landmesser U, Drexler H. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20(6): 547-551.