

lek. Paweł Grzegorz Lewandowski

**Nieinwazyjna ocena parametrów naczyniowych i funkcji śródbłonka
u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Marcin Gruchała, prof. ndzw. GUMed



I Katedra i Klinika Kardiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2011



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Krajowe Centrum Diagnostyki i Leczenia Hipercholesterolemii Rodzinnej

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego

Rozprawa Doktorska powstała w ramach projektu:

Krajowe Centrum Diagnostyki i Leczenia Hipercholesterolemii Rodzinnej

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską
z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013

„Dotacje na innowacje”

„Inwestujemy w Waszą przyszłość”

Dedycja:

*Publikację tę dedykuję mojej ukochanej żonie Małgosi,
która jest dla mnie niezastąpionym wsparciem
oraz moim Drogim Rodzicom*

Paweł Lewandowski

Podziękowanie:

*Wyrażam wdzięczność
Panu Profesorowi Marcinowi Gruchale
za jego wkład i pomoc podczas powstawania tej publikacji.
Dziękuję również Kierownikowi Kliniki
Panu Profesorowi Andrzejowi Rynkiewiczowi,
który umożliwił powstanie tej pracy.*

Paweł Lewandowski

SPIS TREŚCI	str. 5
WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	str. 7
I. WSTĘP	str. 8
1.1 Hipercholesterolemia rodzinna	str. 8
1.1.1 Patomechanizm hipercholesterolemii rodzinnej	str. 8
1.1.2 Obraz kliniczny hipercholesterolemii rodzinnej	str. 12
1.1.3 Rozpoznanie hipercholesterolemii rodzinnej	str. 14
1.1.4 Czynniki ryzyka w hipercholesterolemii rodzinnej	str. 16
1.2 Śródbłonek naczyniowy	str. 17
1.2.1 Budowa i funkcja śródbłonka	str. 17
1.2.2 Dysfunkcja śródbłonka	str. 19
1.3 Nieinwazyjne metody oceny funkcji śródbłonka i parametrów naczyniowych	str. 22
1.3.1 Wazodylatacja tętnicy ramiennej indukowana niedokrwieniem	str. 24
1.3.2 Metody oceny sztywności tętnic i fali tętna	str. 27
II. CEL BADAŃ	str. 33
III. MATERIAŁ I METODY	str. 34
3.1 Grupa badana	str. 34
3.2 Technika wykonywania badań naczyniowych	str. 35
3.2.1 Ocena wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem oraz pod wpływem egzogennie podanej nitrogliceryny	str. 35
3.2.2 Ocena sztywności tętnic przy pomocy metody <i>e-Tracking</i>	str. 40
3.2.3 Analiza fali tętna przy pomocy fotopletyzmografu	str. 42
3.2.4 Ocena powtarzalności wykorzystanych metod	str. 44
3.3 Analiza statystyczna	str. 45
IV. WYNIKI	str. 46
4.1 Charakterystyka badanej grupy	str. 46
4.2 Ocena wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem	str. 49
4.3 Ocena fali tętna przy pomocy metody <i>e-Tracking</i>	str. 51
4.4 Ocena fali tętna przy pomocy fotopletyzmografu	str. 55

4.5	Ocena zależności między funkcją śródbłonna i parametrami sztywności naczyniowej	str. 58
4.6	Powtarzalność wykorzystanych metod	str. 62
4.6.1	Powtarzalność FMD oraz metody <i>e-Tracking</i>	str. 62
4.6.2	Powtarzalność metody fotopletyzmograficznej	str. 63
V.	DYSKUSJA	str. 66
VI.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	str. 78
VII.	STRESZCZENIE	str. 80
VIII.	PIŚMIENNICTWO	str. 85
IX.	ANEKSY	str. 97

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

FH	hipercholesterolemia rodzinna
LDL-R	receptor dla lipoproteiny o niskiej gęstości
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości (frakcja cholesterolu całkowitego)
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości (frakcja cholesterolu całkowitego)
FMD	wazodylatacja tętnicy ramiennej indukowana niedokrwieniem
EID	wazodylatacja tętnicy ramiennej pod wpływem egzogennej nitrogliceryny
RR	ciśnienie tętnicze
SBP	skurczowe ciśnienie tętnicze
DBP	rozkurczowe ciśnienie tętnicze
NO	tlenek azotu
NTG	nitrogliceryna
PWV	prędkość fali tętna
PWA	analiza fali tętna
IMT	grubość kompleksu błony wewnętrznej i środkowej tętnicy szyjnej
BMI	współczynnik masy ciała
PPT	czas przejścia fali tętna przez duże naczynia
SI	wskaźnik sztywności
RI	wskaźnik odbicia
AC	wskaźnik podatności naczyń
PWV-β	lokalna jednopunktowa szybkość fali tętna
β	wskaźnik sztywności beta
Ep	moduł Younga
AI	wskaźnik wzmocnienia

I. WSTĘP

1.1 Hipercholesterolemia rodzinna

Choroby układu sercowo-naczyniowego są najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. W drugiej połowie XX wieku pojawiły się wyniki pierwszych dużych badań epidemiologicznych, które dowiodły, że jednym z najważniejszych czynników powodujących zachorowania na schorzenia sercowo-naczyniowe związane z miażdżycą tętnic, jest wysoki poziom cholesterolu całkowitego w surowicy krwi [1]. Ponadto w wielu badaniach klinicznych wykazano, iż obniżenie poziomu cholesterolu istotnie redukuje śmiertelność całkowitą i liczbę zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych w prewencji pierwotnej i wtórnej. Dlatego redukcja poziomu cholesterolu stała się jednym z najważniejszych celów w walce o zdrowie i życie wielu pacjentów. Jednak w populacji ogólnej istnieje grupa osób, u których wartości cholesterolu całkowitego, a w szczególności cholesterolu LDL (*LDL- low density lipoproteins*), osiągają dużo wyższe poziomy niż w populacji ogólnej, a reakcja na leczenie hipolipemizujące jest często niezadawalająca. Brown i Goldstein w swojej pracy opublikowanej w *Science* wykazali, że to wątroba dzięki obecnym na powierzchni hepatocytów receptorom bierze podstawowy udział w metabolizmie cholesterolu [2]. Za pracę tą w 1985 roku otrzymali Nagrodę Nobla. Po tym odkryciu udowodniono, że właśnie brak lub obniżona aktywność tychże receptorów powoduje patologicznie wysokie stężenia cholesterolu we krwi. Schorzenie to występujące rodzinnie i uwarunkowane genetycznie nazwano hipercholesterolemią rodzinną (*FH- familial hipercholesterolemy*) [3].

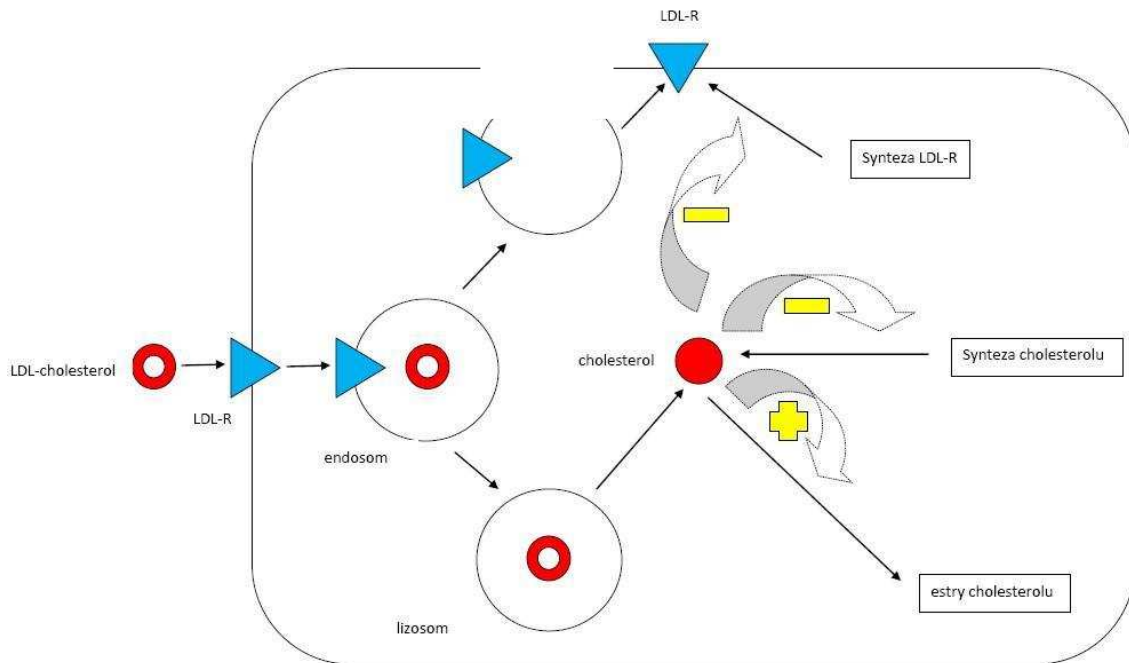
1.1.1 Patomechanizm hipercholesterolemii rodzinnej

Obserwacje wielu populacji wskazują, że hipercholesterolemia rodzinna dotyka około 0.2% populacji ogólnej. Na świecie żyje około 10 milionów ludzi obciążonych hipercholesterolemią rodzinną. Szacuje się, że w Polsce liczba chorych może sięgać od 80 do 160 tysięcy [4].

FH jest chorobą jednogenową, dziedziczną w sposób autosomalnie dominujący. W związku z tym wyróżniamy dwie postacie tego schorzenia: postać heterozygotyczną występującą w populacji z częstotliwością 1:500-700 urodzeń oraz homozygotyczną z częstotliwością 1: 1 000 000 urodzeń. Stąd można założyć, że każdy lekarz rodzinny ma najprawdopodobniej w swojej praktyce kilku pacjentów chorujących na hipercholesterolemię rodzinną.

Za genezę hipercholesterolemii rodzinnej dziedziczonej autosomalnie dominująco odpowiada najczęściej mutacja genu dla receptora cholesterolu LDL (*LDL-R- low density lipoproteins receptor*), który w hepatocytach wiąże napływający do wątroby cholesterol LDL. Mutacja ta powoduje zaburzenie funkcji lub zmniejszenie liczby tychże receptorów (w postaci heterozygotycznej) lub ich zupełny brak (u homozygot), co uniemożliwia sprawne wychwytywanie i transport cholesterolu LDL do komórek wątroby.

Receptory cholesterolu LDL znajdują się na powierzchni hepatocytów we wgłębieniach pokrytych od strony cytoplazmatycznej błony komórkowej białkiem klatryną. Po połączeniu receptora z cholesterolem LDL, jest on na drodze endocytozy wchłaniany do komórki i rozkładany w lizosomach. W kolejnym etapie cholesterol przemieszczany jest do cytoplazmy komórki. Receptory nie są rozkładane, lecz wracają na jej powierzchnię. Natomiast napływ cholesterolu do komórki hamuje aktywność reduktazy HMG-CoA (*reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A*), enzymu determinującego syntezę endogennego cholesterolu. Ponadto liczba *LDL-R* na powierzchni hepatocyta jest regulowana zgodnie z zapotrzebowaniem komórki na cholesterol [5]. Cykl ten schematycznie ukazuje Rycina 1.



Rycina 1. Wchłanianie cholesterolu w hepatocytach (wg Goldstein J, Brown M. Familial hypercholesterolemia) [2].

Do tej pory opisano ponad 800 różnych mutacji, które występują w obrębie genu receptora LDL. W zależności od zmiany budowy receptora, jakie te mutacje powodują, można je podzielić na 6 klas funkcjonalnych, które przedstawia Tabela 1.

Klasa mutacji	Mechanizm mutacji receptora	Efekt fenotypowy
1	Mutacja <i>null</i> Zaburzenie syntezy białka receptora	Brak receptora LDL na powierzchni hepatocyta
2	Skrócenie białka, nieprawidłowe składanie białka receptora	Niedojrzały lub nieprawidłowy receptor LDL na powierzchni hepatocyta

3	Synteza, dojrzewanie oraz transport prawidłowe, nieprawidłowości budowy części końcowej receptora.	Upośledzenie interakcji receptor-ligand Brak połączenia z ligandem
4	Upośledzenie osadzania receptora na zewnętrznej części błony cytoplazmatycznej hepatocytu	Receptory uwalniane poza komórkę Brak internalizacji kompleksów receptor- ligand
5	Upośledzenie odłączania receptora od błony endosomu	Degradacja receptorów w endosomach
6	Upośledzenie osadzania receptora na wewnętrznej części błony cytoplazmatycznej hepatocytu	Receptor nie dociera do błony cytoplazmatycznej hepatocytu. Degradacja w cytoplazmie

Tabela 1. Klasy mutacji receptora LDL [6].

Fenotyp hipercholesterolemii rodzinnej powodować mogą także mutacje genów innych niż genu *LDL-R*: genu *ApoB* (*apolipoprotein B*) i genu *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*). Do chwili obecnej opisano tylko siedem mutacji genu *ApoB*. Zmieniają one układ przestrzenny apolipoproteiny B-100 w cząsteczce LDL, przez co zaburzają proces przyłączania się cząsteczki LDL do receptora. Trzy do tej pory opisane mutacje genu *PCSK9* powodują wzrost aktywności proteazy seryny kodowanej przez ten gen. Białko odpowiada za zmniejszanie liczby *LDL-R* w hepatocycie, w skutek czego wzrasta poziom cholesterolu LDL w surowicy krwi [7].

Cechą charakterystyczną hipercholesterolemii rodzinnej są duże różnice między pacjentami, nawet w ramach jednej rodziny, w stopniu ekspresji objawów klinicznych. Niestety na razie nie udało się ustalić dokładnych zależności między typem mutacji, poziomem lipidów w surowicy krwi a ryzykiem przedwczesnego wystąpienia choroby wieńcowej i innych powikłań sercowo-naczyniowych.

Hipercholesterolemia rodzinna skatalogowana została w bazie OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) jako OMIM #143890. Na chwilę obecną możemy stwierdzić, że jest to choroba jednogenowa dziedziczona w sposób autosomalny dominujący, a u jej podłoża molekularnego leżą:

- mutacje genu *LDL-R* (hipercholesterolemia, AD, typ IIA/FH),
- mutacje genu *ApoB* (hipercholesterolemia, AD, typ IIB/ FDB)
- mutacje genu *PCSK9* (hipercholesterolemia, AD, 3/FH3) [8]

Wszystkie te mutacje skutkują podwyższonym poziomem cholesterolu całkowitego we krwi, co prowadzi do rozwoju przedwczesnego procesu miażdżycowego, a w szczególności choroby wieńcowej.

1.1.2 Obraz kliniczny hipercholesterolemii rodzinnej

Wspólną charakterystyczną cechą dla wszystkich mutacji powodujących hipercholesterolemię rodzinną jest znacznie podwyższony poziom cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL w surowicy krwi. Waha się on zazwyczaj w granicach od 200 do 500 mg/dl u heterozygot, a u homozygot od 600 do 1000 mg/dl. Towarzyszy temu zazwyczaj prawidłowy poziom trójglicerydów. Wraz z mutacjami powodującymi hipercholesterolemię rodzinną, współwystępować mogą czasem także te, które powodują hipertriglicydemię. W związku z tym, poziom trójglicerydów może być również podwyższony. Ponadto, analizując lipidogramy chorych czasem mamy do czynienia również z obniżonym poziomem cholesterolu HDL (*HDL- high density lipoproteins*) [9].

Tak wysoki poziom aterogennych frakcji cholesterolu ma dla pacjentów poważne implikacje kliniczne. Proces miażdżycowy jest znacznie przyspieszony, co powoduje często przedwczesną chorobę niedokrwinną serca. Osoba obciążona FH ma 50% prawdopodobieństwo zachorowania na ostry zespół wieńcowy przed 50 rokiem życia.

Hipercholesterolemia rodzinna to przede wszystkim proces miażdżycowy, dotykający naczynia wieńcowe, rzadziej zaś tętnice obwodowe i mózgowie. Przebieg kliniczny hipercholesterolemii rodzinnej modyfikowany jest dodatkowo wieloma innymi czynnikami genetycznymi, metabolicznymi oraz środowiskowymi [9]. Podkreśla się tu przede wszystkim znaczenie palenia tytoniu oraz współistnienia cukrzycy i nadciśnienia tętniczego.

Wysokie poziomy cholesterolu u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną skutkują nie tylko rozwojem procesu miażdżycowego, ale także odkładaniem się go w tkankach pod postacią kępek żółtych w skórze i ścięgnach oraz charakterystycznych pierścieni rogówkowych (Rycina 2).



Rycina 2. Rąbek rogówkowy (A) i kępki żółte powiek (B) (zdjęcie z zasobów I Katedry i Kliniki Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

Wyróżniamy 5 rodzajów kępek żółtych. Kępki żółte **wysiewne** to małe żółto i żółtobrazowe zmiany otoczone czerwoną obwódką, pojawiające się nagle na pośladkach, kolanach i łokciach. Kępki żółte **guzowate** występują jako płasko-wypukłe, okrągłe, pomarańczowe guzki skórne nad stawami. Kępki żółte **powiek** to żółtawe plamki lub guzki tkanki podskórnej około oczodołowej, częściej występujące u młodych pacjentów z hipercholesterolemią. Kępki żółte **płaskie** to płaskie plamki najczęściej obecne w fałdach skórnych dłoni. Najbardziej jednak patognomiczne dla hipercholesterolemii rodzinnej są kępki żółte **ścięgien**. Są to ruchome guzki w ścięgnach, więzadłach, powięziach i okostnej okolic dłoni, palców, łokci, kolan i pięt. Najczęściej lokalizują się w ścięgnach Achillesa, następnie w ścięgnach prostowników

palców dłoni. Są one jednym z podstawowych klinicznych objawów diagnostycznych hipercholesterolemii rodzinnej, szczególnie przy współistnieniu z wysokim poziomem cholesterolu w surowicy. Odkładanie lipidów w ścięgnach może spowodować także proces zapalny [2].

1.1.3 Rozpoznanie hipercholesterolemii rodzinnej

Rozpoznanie hipercholesterolemii rodzinnej na podstawie badań laboratoryjnych czy objawów klinicznych może być trudne. Wysokie poziomy cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL mogą występować także w przebiegu chorób nerek, cukrzycy, niedoczynności tarczycy, chorób wątroby lub w trakcie farmakoterapii progestagenami, sterydami anabolicznymi czy glikokortykosteroidami. Istotne jest więc wykluczenie przyczyn hipercholesterolemii wtórnej [10].

Narzędziem pomocnym dla postawienia rozpoznania w praktyce klinicznej mogą być zmodyfikowane kryteria diagnostyczne hipercholesterolemii rodzinnej zaproponowane przez *Dutch Lipid Network, Simone Broome Register*. Jest to skala punktowa oparta na badaniu podmiotowym, stężeniu cholesterolu LDL oraz obecności objawów klinicznych (kępki żółte ścięgien czy rąbek rogówkowy). Na podstawie liczby punktów możemy określić prawdopodobieństwo rozpoznania jako pewne, wysoce prawdopodobne lub prawdopodobne [4]. Pełną skalę punktową *Dutch Lipid Network, Simone Broome Register* przedstawia Tabela 2.

Badanie podmiotowe:

- | | |
|--|-------|
| 1. Przedwczesna choroba wieńcowa (<55 rż. mężczyźni, <65 rż kobiety) | 2 pkt |
| 2. Przedwczesna choroba naczyń mózgowych lub obwodowych | 1 pkt |

Wywiad rodzinny:

- | | |
|--|-------|
| 1. Krewni I-ego stopnia z przedwczesną chorobą wieńcową lub naczyniową | 1 pkt |
| 2. Krewni I-ego stopnia z cholesterolem LDL powyżej 190 mg/dl | 2 pkt |
| 3. Krewni I-ego stopnia z kępkami żółtymi i/lub rąbkiem rogówkowym | 2 pkt |
| 4. Dzieci i młodzież poniżej 18 r.ż. z cholesterolem LDL powyżej 155 mg/dl | 2 pkt |

Badanie przedmiotowe:			
1. Kępi żółte ścięgien			6 pkt
2. Rąbek rogówkowy			4 pkt
Badania laboratoryjne:			
1. Cholesterol LDL	>8.5 mmol/l	(325 mg/dl)	8 pkt
2. Cholesterol LDL	6.5-8.4 mmol/l	(250-324 mg/dl)	5 pkt
3. Cholesterol LDL	5.0-6.4 mmol/l	(190-249 mg/dl)	3 pkt
4. Cholesterol LDL	4.0-4.9 mmol/l	(155-189 mg/dl)	1 pkt
Badanie genetyczne:			
1. Mutacja genów odpowiedzialnych za hipercholesterolemię rodzinną			8 pkt
Rozpoznanie hipercholesterolemii rodzinnej			
Pewne			> 8 pkt
Wysoce prawdopodobne			6-8 pkt
Prawdopodobne			3-5 pkt

Tabela 2. Zmodyfikowane kryteria rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej wg *Dutch Lipid Network*.

W codziennej praktyce rozpoznanie hipercholesterolemii rodzinnej powinno się rozważyć u każdego pacjenta ze stężeniem cholesterolu całkowitego w surowicy powyżej 300 mg/dl i cholesterolu LDL >190 mg/dl, przy współistniejącym prawidłowym lub nieznacznie podwyższonym poziomie trójglicerydów i wywiadzie rodzinnym w kierunku przedwczesnej choroby wieńcowej [11]. Niestety najczęściej rozpoznanie stawiane jest zwykle późno, dopiero w momencie ostrego zespołu wieńcowego lub udaru niedokrwienego mózgu. Identyfikacja na podstawie obrazu klinicznego jest często trudna i niepewna zwłaszcza u bezobjawowych dzieci i osób młodych. Ponadto, znane są także przypadki heterozygotycznej postaci hipercholesterolemii rodzinnej u dzieci z prawidłowymi poziomami cholesterolu całkowitego w surowicy krwi. Dlatego jedyną pewną metodą rozpoznania hipercholesterolemii rodzinnej są badania molekularne, potwierdzające obecność mutacji genu *LDL-R*, *ApoB* lub *PCSK9*. Stają się one na świecie uznanym standardem rozpoznania tej choroby. Z powodu dużej różnorodności mutacji genu *LDL-R*,

a także pozostałych genów, których mutacje powodują hipercholesterolemię rodzinną, w celach diagnostycznych analizie genetycznej należy poddać całe sekwencje kodujące i promotorowe tych genów.

Badanie genetyczne przeprowadzone zostaje zwykle na materiale genetycznym wyizolowanym z limfocytów krwi pacjenta. W diagnostyce molekularnej hipercholesterolemii rodzinnej wykorzystywana jest najczęściej technika sekwencjonowania oraz MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Amplifikacja metodą MLPA odbywa się za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (*PCR- Polymerase chain reaction*). Wykorzystywane do niej są startery zaprojektowane na podstawie sekwencji *LDL-R* dostępnej w bazie *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Badania takie choć kosztowne, są całkowicie uzasadnione, gdyż prawdopodobieństwo dziedziczenia przez krewnych pierwszego stopnia pacjenta, u którego wykryto mutacje, wynosi aż 50%. Wczesna identyfikacja i leczenie istotnie obniża śmiertelność z powodu chorób sercowo-naczyniowych [12]. A zatem diagnostyka molekularna pozwala objąć rodziny obciążone hipercholesterolemią rodzinną poradnictwem genetycznym i wczesną profilaktyką, co może je uchronić w wysokim stopniu przed wczesnym wystąpieniem konsekwencji klinicznych hipercholesterolemii rodzinnej.

1.1.4 Czynniki ryzyka choroby wieńcowej w hipercholesterolemii rodzinnej

Zaawansowanie miażdżycy i rozwój choroby wieńcowej u osób z hipercholesterolemią rodzinną uwarunkowane są dodatkowo wieloma czynnikami genetycznymi, metabolicznymi i środowiskowymi [11]. Do czynników sprzyjających bardziej zaawansowanej miażdżycy tętnic wieńcowych należą:

- Wiek: mężczyźni > 30 lat, kobiety > 45 lat lub po menopauzie
- Palenie tytoniu
- Dodatni wywiad rodzinny w kierunku przedwczesnej choroby wieńcowej u krewnych pierwszego stopnia – u kobiet <65 lat, u mężczyzn <55 lat.
- Wysoki poziom cholesterolu LDL > 330 mg/dl

- Niski poziom cholesterolu HDL < 40 mg/dl
- Nadciśnienie tętnicze, RR > 140/90 mmHg
- Cukrzyca
- Poziom lipoproteiny A > 30-60 mg/dl

Na podstawie obecności wyżej wymienionych czynników ryzyka przyjęto, iż można określić 10-letnie ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej u danego pacjenta z FH, jako:

- **Niskie 10 letnie ryzyko** - bez czynników ryzyka
- **Średnie 10 letnie ryzyko** - 1 czynnik ryzyka
- **Wysokie 10 letnie ryzyko** - 2 i więcej czynników ryzyka, subkliniczna miażdżyca [13].

1.2 Śródbłonek naczyniowy

Przełomowe znaczenie dla zrozumienia patogenezy chorób sercowo-naczyniowych miało odkrycie, że śródbłonek jest organem endokrynnym i parakrynnym, a jego czynność odgrywa niezbędną rolę w regulacji napięcia mięśni gładkich ściany naczyniowej [14, 15], procesów krzepnięcia [16] oraz procesów zapalnych i immunologicznych, a także w adhezji monocytów i leukocytów. Komórki *endothelium* stanowią barierę między krwią a komórkami mięśni gładkich naczyń. To właśnie zaburzenia jego funkcji odpowiadają za inicjację procesu miażdżycowego na poziomie komórkowym [17] i poprzedzają rozwój blaszki miażdżycowej [18]. Uszkodzenie jego struktury i funkcji zaburza wieloczynnikową równowagę, którą zapewniają komórki śródbłonka.

1.2.1 Budowa i funkcja śródbłonka

Śródbłonek to pojedyncza warstwa płaskich komórek ściśle przylegających do siebie przy pomocy złączy katedrynowych, zazwyczaj słabo widoczna w rutynowych barwieniach histologicznych. Od strony światła naczynia śródbłonek

wycięła warstwa glikokaliksu, nadająca ujemny ładunek elektrostatyczny i uczestnicząca w procesie transportu przez błonowego. Glikokaliks tworzy osłonę przed wolnymi rodnikami, aktywuje antytrombinę, inhibitor układu krzepnięcia, czynnik płytkowy 4, II kofaktor heparyny oraz lipazę lipoproteinową. Na powierzchni luminalnej znajdują się ponadto liczne cząsteczki adhezyjne odpowiadające za oddziaływanie międzykomórkowe. W części podstawno-bocznej *endothelium* umiejscowione są receptory integrynowe, wiążące komórki śródbłonka włóknami kolagenu i glikozoaminoglikanami. Ponadto błona komórkowa śródbłonka zawiera antygeny HLA (*human leukocyte antigens*), czynnik tkankowy oraz kininazę II- enzym konwertujący angiotensynę I i degradujący bradykininę.

Gdy w 1976 roku Gryglewski i Szczeklik wyjaśnili mechanizm uwalniania prostacykliny przez komórki śródbłonka, rozpoczęła się era badań nad działaniem i funkcją *endothelium*. W 1980 roku pionierskie eksperymenty Furchgott'a i Zawadzkiego wykazały obecność w śródbłonku nieznanego do tej pory czynnika odpowiadającego za relaksację mięśniówki gładkiej, który nazwali śródbłonkowym czynnikiem rozluźniającym (*EDRF- endothelial derived relaxing factor*) [19]. Sześć lat później okazało się, że tą substancją jest tlenek azotu (*NO- nitric oxide*). Tlenek azotu powstaje w śródbłonku z L-argininy dzięki obecności enzymu syntazy tlenku azotu (*e-NOS- endothelial nitric oxide synthase*) w obecności takich kofaktorów jak tetrahydrobiopteryny [20]. NO jest substancją bardzo nietrwałą, z okresem półtrwania około kilku sekund. Gaz ten dyfunduje do komórek mięśni gładkich naczyń i powoduje aktywację cykazy guanylowej, która prowadzi do rozszerzenia naczyń za pośrednictwem 3'5'cyklicznego monofosforanu guanozyny. Powoduje on zmniejszenie stężenia wapnia wewnątrz komórek mięśni gładkich oraz hamuje czynność białek kurczliwych. W warunkach fizjologicznych siły ścinania są głównym aktywatorem *eNOS*, a jej aktywność dostosowuje się do zmian przepływu krwi [21]. Ponadto enzym ten może być aktywowany w odpowiedzi na niedotlenienie oraz przez bradykininę, adenozyne i czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego oraz serotoninę wydzielaną w trakcie agregacji płytek [22]. Tlenek azotu działa ponadto parakrynnie hamując agregację i adhezję płytek krwi, działa antyproliferacyjnie na komórki mięśni gładkich oraz wpływa antyoksydacyjnie, ograniczając utlenienie lipoprotein o małej gęstości [23].

Śródbłonek pośredniczy także w relaksacji naczyń przez ścieżki niezależne od tlenu azotu, takie jak produkcja prostacyklin przy udziale cyklooksygenazy [24]. Innym tego typu procesem jest hiperpolaryzacja komórek mięśni gładkich naczyń mediowana przez śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (*EDHF- endothelium derived hyperpolarizing factor*), proces ten jednakże nie jest do końca wyjaśniony [25].

Śródbłonek naczyniowy nie tylko odpowiada za procesy wazodylatacyjne, ale także wydziela substancje zwężające naczynia takie jak: endoteliny, tromboksan, czynnik aktywujący płytki, leukotrieny [26] oraz prostanoidy. Pośredniczy również w przekształcaniu angiotensyny I w angiotensynę II [27]. Działania te choć lokalne, mogą również wywierać pewne ogólnoustrojowe skutki i odgrywać rolę w regulacji oraz przebudowie struktury naczyń tętniczych.

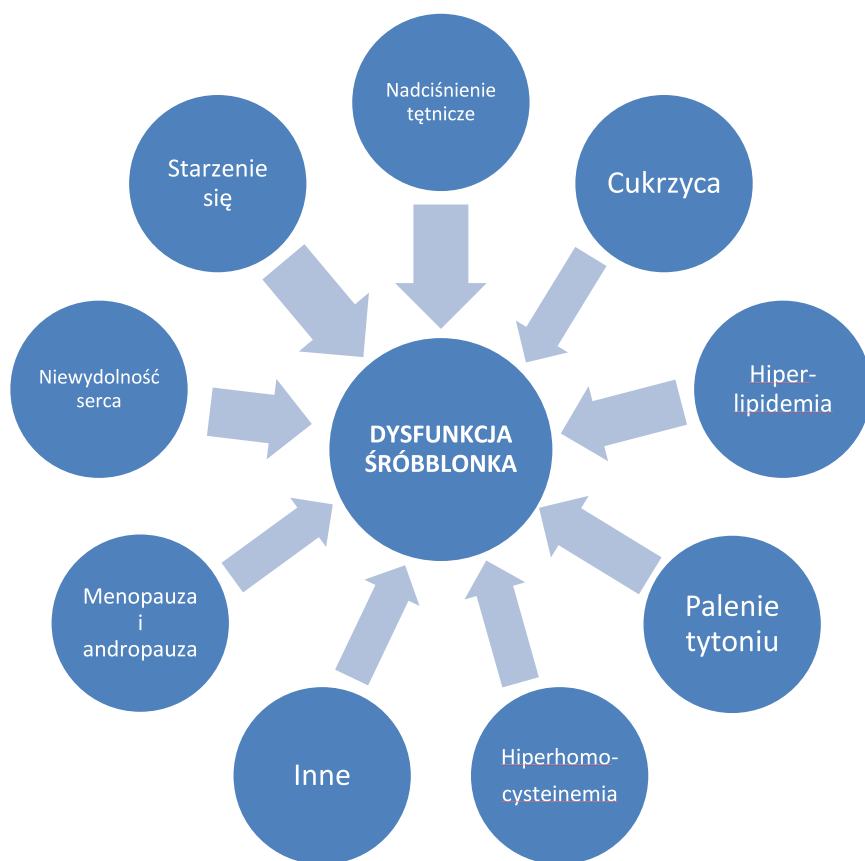
W warunkach fizjologicznych śródbłonek odgrywa ponadto ważną rolę w utrzymaniu ściany naczyń w stanie równowagi przez hamowanie proliferacji komórek, procesów zapalnych i procesów krzepnięcia. Powoduje to s-nitrozylacja cysteiny w wielu białkach. Proces ten ogranicza ich aktywność biologiczną [28]. Hemostatyczna czynność śródbłonka polega na zapobieganiu niekontrolowanego powstawania skrzeplin i ograniczeniu skrzepliny tylko do miejsca uszkodzenia lub przerwania *endothelium*. Zwykle zapewnia to przewaga aktywności mechanizmów antykoagulacyjnych nad prokoagulacyjnymi. Działanie antykoagulacyjne wykazują tlenek azotu i prostaglandyna 2 oraz produkowane przez śródbłonek antytrombina III i kofaktor II heparyny, czynnik Xa i białka C i S. Śródbłonek naczyniowy odgrywa także istotną rolę w angiogenezie, produkując liczne czynniki wzrostu [29].

1.2.2 Dysfunkcja śródbłonka

Stan określany jako „dysfunkcja śródbłonka” powinien być nazwany właściwie aktywacją śródbłonka. Stan taki w sprzyjających temu warunkach może prowadzić do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [30]. Większość czynników ryzyka sercowo-naczyniowego prowadzi właśnie do dysfunkcji śródbłonka. Często czynniki te aktywują mechanizmy molekularne, powodujące ekspresję chemokin, cytokin, molekuł adhezji, aktywację leukocytów i trombocytów, a w konsekwencji uruchomienie procesu zapalnego [31].

Zasadniczą zmianą w procesie zapalnym jest „przełączenie sygnalizacji” śródbłonna z zależnej od tlenku azotu inhibicji w kierunku aktywacji powodowanej przez reaktywne formy tlenu. Reaktywne formy tlenu w obecności dysmutazy ponadtlenkowej prowadzą do wytwarzania nadtlenu wodoru, który tak jak tlenek azotu może szybko dyfundować z komórki i reagując z grupą cysteinową białek, zmieniać ich funkcję [32]. Konsekwencje tej reakcji są jednakże diametralnie różne. Dochodzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych oraz fragmentów genomu a także aktywacji proteaz. Sama *eNOS* utrzymująca homeostazę śródbłonna może „przełączać się” do wytwarzania reaktywnych form tlenu. Stan ten określany jest jako rozprężanie *eNOS* i może prowadzić do wytwarzania nadtlenu wodoru, zwłaszcza w warunkach niedoboru L-argininy czy tetrahydrobiopteryny [20].

Intrygujące jest, że aktywacja śródbłonna, która stanowi część prawidłowego systemu obrony organizmu, może przyczyniać się do rozwoju miażdżycy w zależności od rodzaju i charakteru bodźców prozapalnych. W patogenezie miażdżycy takimi czynnikami prozapalnymi mogą być hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, a także inne stany, które mogą wywołać przewlekłe zaburzenia przemiany tlenku azotu, produkcje reaktywnych form tlenu i wystąpienie stresu oksydacyjnego (Rycina 3) [33]. Niezależnie od pochodzenia reaktywnych form tlenu i tlenku azotu powstaje „błędne koło”, które powoduje dalszą aktywację śródbłonna i stanu zapalnego.



Rycina 3. Procesy prowadzące do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego.

Wszystkie etapy dysfunkcji śródbłonna modulowane są przez czynniki genetyczne. Przedłużające się narażenie na czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego może ostatecznie uszkodzić ochronny system czynników przeciwzapalnych generowanych przez śródbłonek. W skutek tego działania powstają markery uszkodzenia śródbłonna [34], których obecność wykazano nie tylko u chorych z miażdżycą tętnic obwodowych i chorobą wieńcową, ale także w schorzeniach zapalnych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów czy toczeń rumieniowaty [35].

Wykazano, że śródbłonek podlega dwóm mechanizmom naprawy. Potrafi zastępować uszkodzone komórki nowymi własnymi, pochodzenia szpikowego [36], a także wykorzystuje do tego celu komórki progenitorowe krążące w krwi obwodowej, które mają zdolność różnicowania się w dojrzałe komórki *endothelium* [37]. Mobilizacja komórek progenitorowych ze szpiku jest częściowo zależna od tlenu azotu, w związku z czym jasne jest, że ich wykorzystanie jest ograniczone w warunkach obecności czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [38]. Udowodniono natomiast,

że czynniki poprawiające funkcje śródbłonna i sprzyjające syntezie NO, takie jak ćwiczenia fizyczne [39] czy leczenie statynami [40, 41], mają również silny pozytywny wpływ na mobilizację komórek progenitorowych.

Początkowy proces miażdżycowy rozpoczynający się od dysfunkcji śródbłonna i nacieku komórek zapalnych stopniowo postępuje. Do błony wewnętrznej migrują wykazujące cechy fenotypu embrionalnego komórki mięśni gładkich. Mogą one ulegać proliferacji, produkują cytokiny i syntezują składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, będącej podstawowym składnikiem czapeczki włóknistej blaszki miażdżycowej. Na początku blaszka wzrasta na zewnątrz, zwiększając średnicę całego naczynia bez zmiany przekroju jego światła. Dopiero na późniejszym etapie następuje zwężenie światła, gdy wielkość zmiany przekracza 40% powierzchni przekroju tętnicy [42].

1.3 Nieinwazyjne metody oceny funkcji śródbłonna i parametrów naczyniowych

Prewencja sercowo-naczyniowa jest oparta przede wszystkim na oszacowaniu indywidualnego ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. W oparciu o wyniki dużych badań epidemiologicznych, takich jak badanie *Framingham Study* zidentyfikowano tradycyjne czynniki ryzyka takie jak płeć, wiek, wysoki poziom cholesterolu, palenie tytoniu, cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze [43]. Nie wszystkie czynniki ryzyka mają taką samą wartość predykcyjną i nie zawsze wystarczają one do pełnej oceny ryzyka. Fakt ten można uzasadnić tym, że zwykle dla wielkości ryzyka nie pojedyncze czynniki są ważne, ale przede wszystkim wzajemne interakcje między nimi oraz oddziaływanie z czynnikami środowiskowymi czy podłożem genetycznym. Współczesna medycyna poszukuje jednak wciąż nowych parametrów, dzięki którym, w jak najprostszy sposób ocenić będzie można ryzyko wystąpienia zawału serca czy innych incydentów sercowo-naczyniowych. Niezwykle pomocne mogą okazać się tu nowe obrazowe metody oceny zaawansowania procesu miażdżycowego umożliwiające wykrywanie zmian miażdżycowych jeszcze w okresie bezobjawowym [44] oraz oceniające zaawansowanie procesu miażdżycowego na różnych jego stopniach rozwoju.

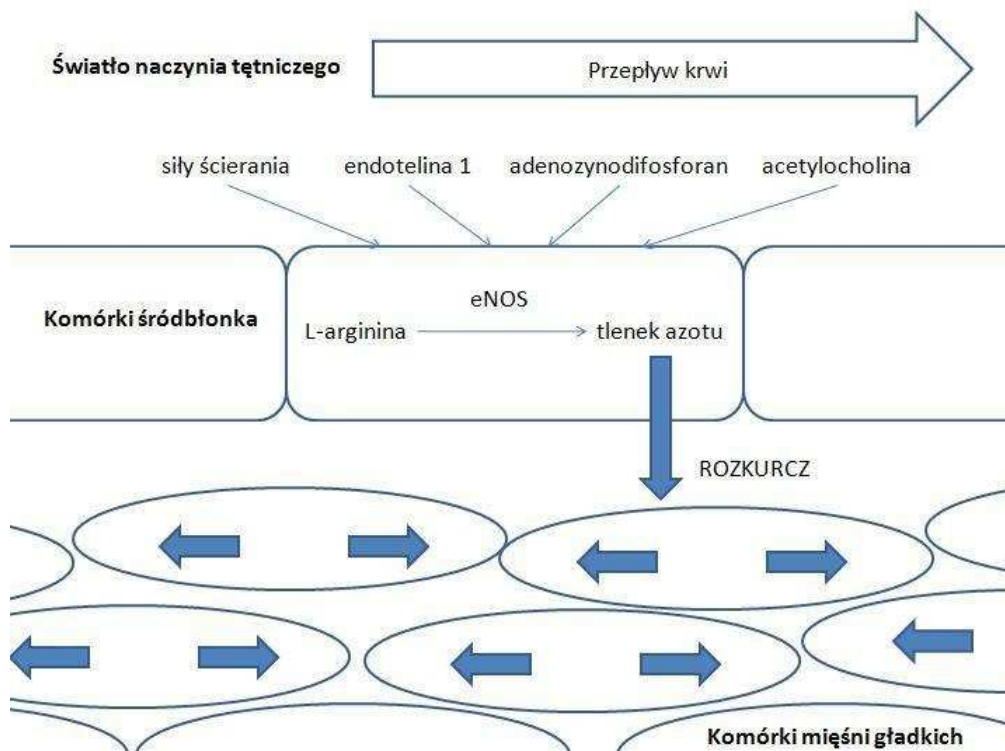
Przełomowe znaczenie dla zrozumienia patogenezy chorób sercowo-naczyniowych miało odkrycie, że śródbłonek jest organem endokrynnym

i parakrynnym, a jego czynność odgrywa niezbędną rolę w regulacji napięcia mięśni gładkich, adhezji monocytów i leukocytów oraz procesów krzepnięcia. To właśnie zaburzenia jego funkcji odpowiadają za inicjację procesu miażdżycowego na poziomie komórkowym. Lepsze zrozumienie biologii śródbłónka pozwoliło na rozwój testów i metod oceniających funkcje *endothelium* [45]. Badanie takie powinno być bezpieczne, nieinwazyjne, powtarzalne i tanie. Wyniki testów powinny także odzwierciedlać dynamikę biologii *endothelium* w całej historii naturalnej rozwoju procesu miażdżycowego, od etapów przebiegających subklinicznie po klinicznie jawne postaci choroby. Obecnie żadna z dostępnych metod nie spełnia w pełni tych wymagań, więc aby scharakteryzować całokształt funkcji śródbłónka, konieczne jest zwykle wykonanie panelu badań.

Wczesne zaburzenia funkcji śródbłónka można zmierzyć za pomocą oceny wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem (*FMD- flow mediated dilatation*) [46, 47, 48]. Postępujący proces miażdżycowy prowadzi do zmian strukturalnych i funkcjonalnych ściany naczynia, a przez to do zwiększenia sztywności naczyniowej. Zmiany te można we wczesnym okresie oszacować przy pomocy parametrów oceniających podatność naczyń tętnicznych (*PWV- pulse wave velocity*, *PWA- pulse wave analysis*) [49, 50, 51, 52]. Nieco późniejsze zmiany strukturalne możemy analizować dzięki takim technikom obrazowania jak: rezonans magnetyczny (*MRI- magnetic resonance imaging*) [53], tomografia komputerowa (*CT- computer tomography*) oraz pomiar grubości kompleksu błona wewnętrzna- błona środkowa tętnicy (*IMT- intima media thickness*) [60, 61]. Znaczenie tych metod dla oceny ryzyka sercowo-naczyniowego zostało już potwierdzone wieloma badaniami obserwacyjnymi i klinicznymi [56, 57, 58]. Badania MRI oraz TK są rzadziej wykorzystywane w ocenie ryzyka sercowo- naczyniowego, ze względu na ich małą dostępność, wysokie koszty i pracochłonność lub jak w przypadku TK także ze względu na narażenie na promieniowanie rentgenowskie. Szerzej wykorzystywaną metodą może stać się ultrasonografia naczyniowa, będąca metodą stosunkowo niedrogą i powtarzalną, która dzięki zastosowaniu przetworników ultrasonograficznych o dużej częstotliwości pozwala na uzyskanie dokładnych obrazów światła oraz struktury badanych naczyń krwionośnych [59].

1.3.1 Wazodylatacja tętnicy ramiennej indukowana niedokrwieniem

Pierwszy raz fizjologiczną odpowiedź naczynia tętniczego na niedokrwienie opisał już w 1933 roku Schretzenmayer, zaś pierwszy pomiar FMD wykonany został w 1989 roku przez Andersona i Marka [60]. Istotę pomiaru stanowi ocena zmiany średnicy tętnicy ramiennej pod wpływem mediatorów, głównie tlenku azotu, uwalnianych po zatrzymaniu i przywróceniu przepływu krwi w naczyniu [15]. Dokładny mechanizm nie jest nadal w pełni poznany. Uważa się jednak, iż na skutek zwiększonego przepływu krwi po ustąpieniu niedokrwienia, dochodzi do hyperpolaryzacji komórek śródbłonka, zwiększenia napływu wapnia [61, 62, 63] do ich wnętrza i aktywacji śródbłonkowej *eNOS* [15, 64]. Długotrwałe zaś zamknięcie przepływu przez naczynie powoduje zmiany ekspresji genów przez fosforylację genu *eNOS* i w konsekwencji zwiększenie aktywności tegoż enzymu [65, 66]. Oby dwa te procesy prowadzą do zwiększenia syntezy NO i w konsekwencji do rozszerzenia naczynia. Uproszczony schemat aktywacji *eNOS* i działania tlenku azotu przedstawia Rycina 4.



Rycina 4. Uproszczony schemat aktywacji *eNOS* i działania tlenku azotu.

Upośledzenie funkcji śródbłonna we wczesnym stadium miażdżycy powoduje spadek stężenia NO. Prowadzi to do zmniejszenia przepływu w mikrokrążeniu i w mechanizmie „błędnego koła” do dalszego spadku produkcji NO i zmniejszenia zdolności naczyń do wazodylatacji.

Badanie FMD jest nieinwazyjne i bezpieczne dla pacjenta. Jego przeprowadzenie zajmuje około 30 minut. Jednak należy pamiętać o ograniczeniach tego testu. Na jego wynik ma wpływ szereg parametrów, z których najistotniejsze to doświadczenie badającego i współpraca ze strony pacjenta, miejsce założenia mankieta na kończynie górnej (ramię, przedramię), czas trwania okluzji, czas od deflacji do pomiaru oraz metoda pomiaru średnicy tętnicy [67, 68, 69].

Przed badaniem pacjent powinien pozostać na czczo przez 8-12 godzin. Powinien być badany w cichym pomieszczeniu o stałej temperaturze. Wszystkie leki rozszerzające naczynia krwionośne powinny zostać odstawione na okres ich półtrwania jeśli to możliwe, badany nie powinien uprawiać aktywności fizycznej a także spożywać substancji mogących upośledzić FMD, takich jak kofeina, witamina C [70] w ciągu 8 godzin oraz nie powinien palić tytoniu przez przynajmniej 4-6 godzin przed testem [33].

Przed badaniem pacjent powinien odpocząć w pozycji leżącej 10 minut, po czym na ramię kończyny dominującej nałożony zostaje mankieta do mierzenia ciśnienia. Mankieta może zostać założony także na przedramię, jednakże wykazano, że w przypadku umieszczenia go na ramieniu badanego, odpowiedź na niedokrwienie jest większa [71].

Do badania wykorzystywany jest aparat ultrasonograficzny wyposażony w naczyniową głowicę ultrasonograficzną o częstotliwości 7-10 MHz, i oprogramowanie do oceny tętnic obwodowych. W trakcie badania monitorowane jest EKG. Pomiar średnicy tętnicy wykonuje się na szczycie załamka R, czyli w maksymalnym rozkurczu naczynia. Miejsce pomiaru lokalizuje się zwykle 5-10 centymetrów proksymalnie od prawego dołu łokciowego. W pierwszym etapie dokonywany jest pomiar wyjściowej średnicy tętnicy ramiennej w rozkurczu, między bliższą a dalszą linią *m*, stanowiącą granicę pomiędzy błoną środkową a przydanką w ultrasonograficznej prezentacji dwuwymiarowej. Tętnica ramienna powinna zostać zobrazowana w przekroju podłużnym [72]. Wartość średnicy obliczona zostaje przez uśrednienie co najmniej pomiarów z 3 cykli pracy serca. Następnie na okres

5 minut napompowany zostaje mankiet ciśnieniomierza do wartości wyższej co najmniej o 50 mmHg od wartości skurczowej ciśnienia tętniczego. Po 5 minutach wykonuje się szybką deflację mankieta, przywracając krążenie w tętnicy ramiennej. Po 20-30 sekundach od deflacji ponownie wykonywane są pomiary w tym samym miejscu jak na początku badania. Maksymalna średnica naczynia obserwowana jest około 1 minuty po opróżnieniu mankieta sfigmomanometru [73, 74]. Otrzymane wartości pozwalają obliczyć wg poniższego wzoru rozszerzalność tętnicy ramiennej zależną od funkcji śródbłonna [75].

Gdzie:

Dd1-

Dd2-

Uzupełnieniem informacji uzyskanych w badaniu FMD jest ocena wazodylatacji tętnicy ramiennej pod wpływem egzogennie podanej nitrogliceryny. Po 10 minutach odpoczynku po teście FMD zostają wykonane ponowne wyjściowe pomiary jak w teście FMD. Następnie podawane jest 400 µg nitrogliceryny (*NTG- nitroglycerin*) w aerosolu pod język. Po 3-4 minutach powtórzone zostają pomiary, uzyskując wg poniższego wzoru rozszerzalność tętnicy niezależną od śródbłonna (*EID- endothelium independent dilatation*) [76, 77].

Gdzie:

Dd1'-

Dd2'-

U ludzi zdrowych stwierdza się wartości FMD powyżej 7-10% [78]. Nie wyznaczono normy dla EID.

1.3.2. *Metody oceny sztywności tętnic i fali tętna*

Tętnice w organizmie człowieka spełniają dwie zasadnicze funkcje. Przewodzą krew z serca do tkanek i pełnią rolę amortyzującą, która polega na zamianie pulsacyjnego charakteru przepływu krwi w aorcie na przepływ stały w naczyniach włosowatych. Już w drugiej połowie XVIII wieku Stephan Hales porównał funkcje aorty do wypełnionej powietrzem kopyły zbiornika wodnego w gaśnicy strażackiej. Kopyła ta, zwana powietrzną, zmienia przerywany strumień wody pompowanej przez pompę strażacką na strumień ciągły, wylewający się z końcówki węża pożarniczego. W modelu tym pompą nazwać można serce, aorta jest odpowiednikiem owej powietrzni, wąż gaśnicy to przewodzące krew tętnice, zaś sama końcówka węża to w organizmie ludzkim naczynia oporowe [79]. Krew wyrzucana w okresie skurczu przez mięsień serca powoduje rozciągnięcie aorty. Gdyby nie posiadana przez aortę zdolność do zmiany swojej objętości i elastyczność jej ścian, krew krążyłaby w sposób przerywany. Przedstawiony powyżej model jest pewnym uproszczeniem, gdyż jednocześnie funkcję amortyzującą i transportującą posiadają także wszystkie odgałęzienia aorty, ale możliwości amortyzacji w przebiegu naczyń stopniowo ulegają zmniejszeniu [80].

Aby uzupełnić powyżej przedstawiony obraz, należy także przytoczyć model dystrybucyjny układu tętniczego, który odzwierciedla rozchodzenie się fali tętna poprzez układ naczyń tętniczych [81]. Krew pompowana przez serce staje się początkiem fali ciśnienia, nazwanej falą tętna, przewodzoną wzdłuż układu tętniczego z prędkością zwaną prędkością fali tętna. W rzeczywistości znacznie przewyższa ona wartość prędkości przepływu krwi w tętnicach. Zależy ona w pierwszym rzędzie od własności ścian naczynia: podatności i elastyczności oraz gęstości cieczy. Zależność tą przedstawia równanie zaproponowane przez Moensa i Kortewega [82]:

$$PWV = \frac{v}{\Delta t}$$

Gdzie:

PWV- prędkość fali tętna

E- zmiana ciśnienia potrzebna do rozciągnięcia naczynia o 100% w stosunku do wyjściowej średnicy przy zachowanej długości podzielona przez jednostkę powierzchni, czyli moduł Younga

h- grubość ściany naczynia

r- promień światła naczynia

q- gęstość cieczy

W warunkach fizjologicznych wywołana skurczem fala tętna płynnie przemieszcza się od zapobiegającej nadmiernemu wzrostowi ciśnienia skurczowego aorty do tętniczek oporowych, od których odbija się, by w okresie rozkurczu wrócić do aorty wstępującej. Za elastyczność naczynia odpowiada zbudowana z licznych sprężystych włókien kolagenowych oraz komórek mięśni gładkich błona środkowa tętnicy. Wraz z przemieszczaniem się w kierunku dystalnym wzdłuż drzewa naczyniowego sztywność naczyń zwiększa się, co spowodowane jest zmianą proporcji składników ściany naczyniowej. Do zasadniczych zmian fali tętna dochodzi w stanach patologicznych, kiedy to struktura elastycznych ścian ulega zmianie, zwiększa się ich średnica i grubieje ściana. Jednocześnie wzrasta sztywność i maleje elastyczność, czyli cechy determinujące zdolność naczynia do zmian średnicy pod wpływem ciśnienia krwi [83]. Dochodzi do fragmentacji włókien elastycznych pod wpływem utrzymujących się przewlekłe zmiany napięcia tętnic i wysokiego ciśnienia tętniczego. Ma miejsce także glikacja i tworzenia wiązań poprzecznych w wzrastającej ilości włókien kolagenowych. Ściana z czasem grubieje i wapnieje.

Oceny sztywności można dokonać na różnych poziomach drzewa tętniczego. Najczęściej wykorzystywana do pomiarów jest aorta. Wykazano bowiem prognostyczną wartość pomiarów sztywności tętnicy głównej [84]. Zwiększenie sztywności aorty skutkuje wzrostem ciśnienia skurczowego, szybkim powrotem fali odbitej tętna, zmniejszeniem ciśnienia rozkurczowego. Ta niekorzystna sytuacja wzrostu wartości ciśnienia tętna prowadzi do spadku perfuzji naczyń wieńcowych, wzrostu obciążenia lewej komory i przerost jej mięśnia.

Złotym standardem w ocenie sztywności naczyń jest pomiar prędkości fali tętna [85]. Prędkość mierzy się za pomocą tonometru aplanacyjnego na dobrze

dostępnych tętnicach, najczęściej między tętnicami szyjną i udową (*cfPWV*- *carotid-femoral pulse wave velocity*) oraz między tętnicą ramienną i promieniową (*baPWV*- *brachial-radial pulse wave velocity*). Badanie wykonywane jest w pozycji leżącej, po przynajmniej pięciominutowym okresie odpoczynku badanego. Prędkość fali tętna opisywana jest wzorem:

—

Gdzie:

PWV- prędkość fali tętna

- odległość między punktem bliższym i dalszym na przebiegu tętnicy
- czas upływający między początkiem fali ciśnienia w punkcie bliższym i dalszym na przebiegu tętnicy

Najczęściej jest to średnia z dziesięciu kolejnych pomiarów. Na wynik pomiaru wpływają czynniki takie jak: nieprawidłowy pomiar drogi przebytej przez falę, wiek oraz kręta anatomia naczyń [86]. Wykazano, że prędkość aortalna powyżej 13 m/s jest szczególnie silnym wskaźnikiem ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych, a każdy wzrost wartości PWV w aorcie o 5 m/s wiąże się z dalszym zwiększeniem śmiertelności ogólnej. Zaobserwowano także, że wzrost wartości PWV towarzyszy takim czynnikom ryzyka chorób sercowo-naczyniowych jak: starszy wiek, wysoki poziom cholesterolu, cukrzyca typu 2 i nadciśnienie tętnicze [87, 88].

Ocena sztywności tętnic może dotyczyć nie tylko samej aorty, ale także innych, dowolnych odcinków łożyska tętniczego. Ocena sztywności naczyniowej tętnic informuje o zintegrowanym wpływie poszczególnych czynników uszkodzających układ krążenia, będąc niejako ich wypadkową. Obrazuje przebudowę ściany naczyń tętnicznych w skutek dysfunkcji śródbłonna, zwiększonego napięcia mięśniówki naczyniowej, w przebiegu procesu miażdżycowego, wzrostu ciśnienia tętniczego i systemowej oporności naczyniowej czy przyspieszonego rytmu serca.

Analizę fali tętna można wykonywać przy pomocy metod ultrasonograficznych oraz tonometrycznych i fotopletyzmograficznych. Ultrasonograficzna analiza fali tętna

metodą *e-Tracking* polega na śledzeniu przy pomocy specjalistycznego oprogramowania komputerowego, ruchu ściany naczyniowej oraz zmian wymiarów naczynia w rozkurczu i w czasie wyrzutu lewej komory. Pozwala ona uzyskać następujące parametry sztywności naczyń:

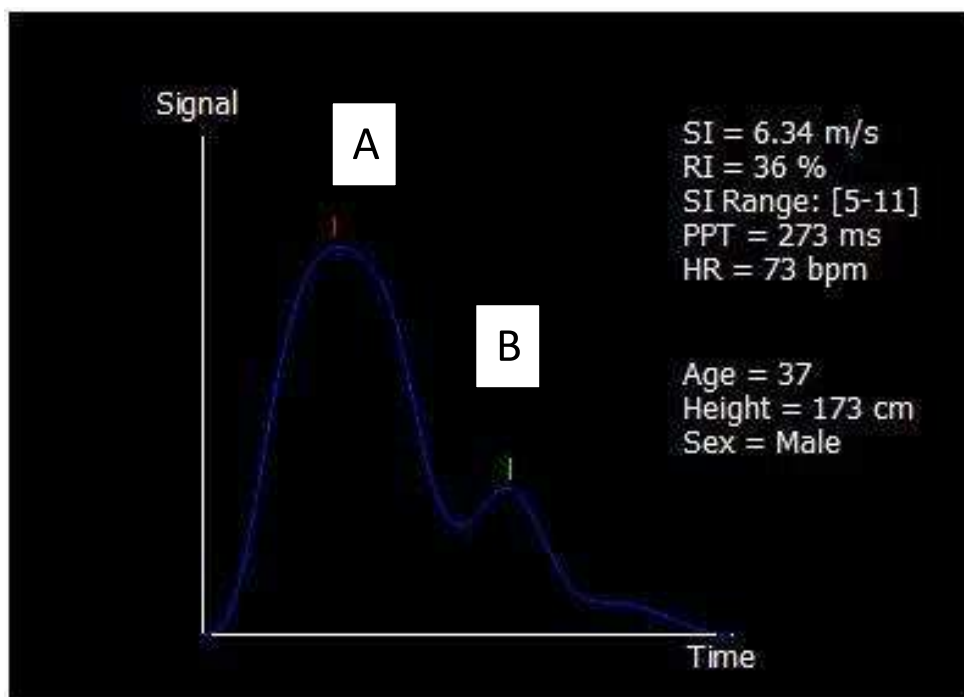
- **β** - wskaźnik sztywności beta (*stiffness parametr*) będący stosunkiem logarytmu naturalnego zmian ciśnienia do zmian średnicy naczynia,
- **E_p** - moduł Younga, opisany już wcześniej wskaźnik elastyczności naczyń. Moduł Younga to zmiana ciśnienia (dP), przypadająca na 1 cm² grubości naczynia (h) potrzebna do zwiększenia średnicy naczynia o 100%. (dPxD)/(dDxh). Jest on wyrażany w kPa.
- **AC** – wskaźnik podatności naczyń (*arterial compliance*), obliczany ze zmian pola przekroju poprzecznego naczynia i ciśnienia krwi. Jest to zmiana średnicy naczynia (dD) pod wpływem określonego wzrostu ciśnienia (dP). Wskaźnik ten wyrażany jest w mm²/kPa.
- **PWV β** – lokalna jednopunktowa szybkość fali tętna (*one point pulse wave velocity*). Konwencjonalne metody oceniające PWV są oparte na pomiarach prędkości w dwóch punktach. Tymczasem parametr ten związany jest z elastycznością tętnicy na danym jej odcinku. Może być on różny, w różnych miejscach pomiaru, stąd jego nazwa- jednopunktowy. Wskaźnik ten wyrażany jest w m/s.
- **AI** – wskaźnik wzmocnienia (*augmentation index*), który określa różnice ciśnienia w aorcie w skutek nakładania się fal tętna- pierwotnej, skurczowej lewej komory i wtórnej odbitej. Wskaźnik ten wyrażany jest w procentach.

Parametry te mogą mieć zastosowanie dla oceny zmian czynnościowych, które obrazują wzrost sztywności naczyń, zanim pojawią się morfologiczne zmiany miażdżycowe [89].

Metody tonometryczne wykorzystują fakt, że fala tętna to tak naprawdę fala ciśnienia centralnego, a u chorych ze zwiększoną sztywnością ścian dużych naczyń tętnicznych dochodzi do przyspieszenia przechodzenia fali ciśnienia. Najczęściej wykorzystywaną metodą rejestracji ciśnienia centralnego jest zapis krzywej ciśnienia

na tętnicy promieniowej. Wykazano również, że uzyskane w trakcie powyższych pomiarów wyniki silnie korelują z PWV [90, 91].

Prostsza metodą oceny sztywności naczyniowej i funkcji śródbłonna jest ocena przy pomocy przenośnego fotopletyzmo grafu, który mierzy objętość fali tętna na dystalnej części palca. Zapis ciśnienia na tętnicy promieniowej i zapis objętości fali tętna na opuszcze palca nie są tożsame. Udowodniono natomiast, że informacje jakie niosą ze sobą, są podobne [92]. Fale te są rezultatem nakładania się fali wytworzonej przez skurcz serca i fali odbitej. Parametry wyliczane w trakcie pomiaru na tętnicy promieniowej powstają pod koniec skurczu serca i zależą od sztywności naczyń, czynności tętnic oporowych, ale także od częstości rytmu serca oraz czynności skurczowej. Natomiast parametry oceniane przy pomocy fotopletyzmo grafu powstają w czasie fazy rozkurczu, więc nie zależą tak bardzo od czynności skurczowej i częstości rytmu serca. Zapis fali tętna przy pomocy przenośnego fotopletyzmo grafu ukazuje Rycina 5.



Rycina 5. Zapis fali tętna uzyskany przy pomocy przenośnego fotopletyzmo grafu *Puls Trace PCA 2* firmy *MicroMedical*. (A- szczyt pierwszy stanowiący skurczową składową fali tętna, B- szczyt drugi- składowa rozkurczowa fali tętna).

Pierwsza część fali (składowa skurczowa) jest rezultatem przenoszenia ciśnienia od aorty do tętnic palców ręki. Druga część (składowa rozkurczowa) utworzona jest przez ciśnienie odbite przenoszone od naczyń obwodowych wzdłuż aorty. Przy pomocy fotopletyzmografu wyznaczamy następujące wskaźniki:

- **PPT**- czas przejścia fali tętna przez duże naczynia. To czas upływający od szczytu składowej skurczowej do szczytu składowej rozkurczowej. Wynik podawany jest w milisekundach (ms). Koreluje on silnie z czasem przejścia fali tętna przez aortę [90].
- **SI**- wskaźnik sztywności (*stiffness index*). Jest to iloraz wzrostu badanego do czasu przejścia przez duże naczynia. Wynik podawany jest w metrach na sekundę (m/s).
- **RI**- wskaźnik odbicia (*reflection index*). Jest to iloraz wysokości fali rozkurczowej do wysokości fali skurczowej. Wynik przedstawiany jest w procentach (%).

Wskaźnik sztywności (SI) jest związany ze sztywnością dużych tętnic i może być wykorzystywany do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego. Wykazano jego istotną korelację z szyjno-udową PWV [91]. Oszacowana w taki sposób sztywność dużych tętnic może być jednym z ważniejszych czynników, przepowiadających incydenty sercowo-naczyniowe. Wskaźnik odbicia (RI) odzwierciedla wielkość odbicia fali ciśnienia. Ta z kolei ma związek z napięciem małych tętnic i może być wykorzystana do testowania funkcji śródbłonna [90].

II. CEL BADAŃ

Celem pracy jest ocena i porównanie:

- funkcji śródbłonna oszacowanej przy pomocy wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem,
- parametrów sztywności naczyniowej mierzonych przy pomocy metody *e-Tracking* oraz fotopletyzmografu,
- zależności między oszacowaną przy pomocy wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem funkcją śródbłonna i parametrami sztywności naczyniowej

u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną potwierdzoną badaniem molekularnym z wynikami otrzymanymi u osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL, bez mutacji powodującej hipercholesterolemię rodzinną i z grupą kontrolną zdrowych ochotników z poziomem cholesterolu LDL niższym niż 130 mg%.

III. MATERIAŁ I METODY

3.1 Grupa badana

Badaniem objęta została grupa 60 osób:

- **20 pacjentów z wysokim poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi i potwierdzoną w badaniach molekularnych hipercholesterolemią rodzinną** (mutacja genu *LDL-R* lub *ApoB*) pozostających pod opieką Poradni Hipercholesterolemii Rodzinnej przy I Klinice i Katedrze Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- **20 osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi bez mutacji powodujących hipercholesterolemię rodzinną,**
- **20 zdrowych ochotników z poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi niższym niż 130 mg%.**

W każdej z badanych grup było 10 mężczyzn i 10 kobiet. Wszyscy badani nie wykazywali klinicznych cech chorób sercowo-naczyniowych. Do badania włączeni zostali kolejni pacjenci Poradni w wieku 30-55 lat, którzy wyrazili zgodę na udział w badaniu oraz ochotnicy spośród pracowników Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Przed włączeniem do badania, każdy badany wyraził pisemną zgodę na udział po zapoznaniu się z protokołem badania. Wzór informacji o badaniu i zgody na badanie zamieszczono w Aneksie 1. Z badanymi zebrano wywiad w kierunku występowania objawów chorób sercowo-naczyniowych. Poproszono ich o przedstawienie wyniku lipidogramu z występującymi maksymalnymi wartościami cholesterolu LDL oraz ostatniego wyniku lipidogramu wykonanego w ciągu 6 miesięcy przed badaniem. Ponadto badanych zważono i zmierzono celem wyliczenia wskaźników BMI (*body mass index*) i BSA (*body surface area*) oraz zbadano fizykalnie.

Badanie molekularne potwierdzające występowanie mutacji powodującej hipercholesterolemię rodzinną wykonane zostało w Katedrze i Zakładzie Biologii

i Genetyki GUMed kierowanej przez prof. dr hab. n. med. Janusza Limona. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Rozprawa Doktorska powstała w ramach projektu Krajowe Centrum Diagnostyki i Leczenia Hipercholesterolemii Rodzinnej współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.

3.2 Technika wykonania badań naczyniowych

3.2.1 Ocena wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem oraz pod wpływem egzogennie podanej nitrogliceryny

Każdemu badanemu wykonano przy pomocy aparatu ultrasonograficznego *Aloka SSD- Alpha 10- Miro* badanie rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem niedokrwienia (FMD) i pod wpływem egzogennie podanej nitrogliceryny (EID).

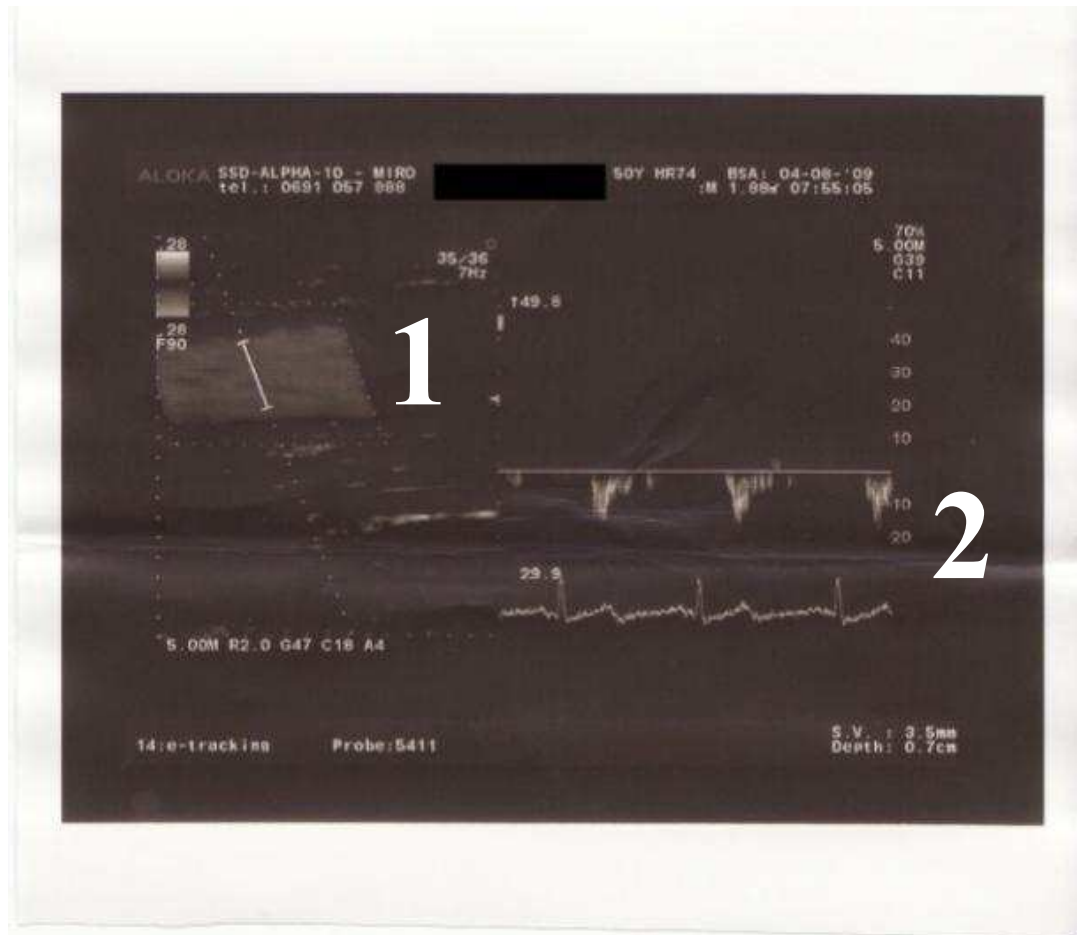
Badani pozostawali na czczo oraz powstrzymywali się od palenia tytoniu przez minimum 8 godzin przed badaniem. Żaden z badanych nie przyjmował leków naczyniorozszerzających. Badanym zalecono ponadto ograniczenie aktywności fizycznej oraz niespożywanie pokarmów zawierających kofeinę w ciągu 24 godzin przed badaniem. Bezpośrednio przed testem pacjenci odpoczywali w pozycji leżącej 10 minut, po czym na ramię kończyny dominującej (we wszystkich przypadkach była to kończyna górna prawa) nałożony został mankiet do mierzenia ciśnienia. Badanie wykonywane było w cichym pomieszczeniu odsuniętym od głównych ciągów komunikacyjnych. Temperatura w pokoju wynosiła 21-23 stopnie Celcjusza. Do badania użyto naczyniową głowicę ultrasonograficzną o częstotliwości 7-10 MHz i oprogramowanie do oceny tętnic obwodowych. W trakcie badania monitorowane było EKG. Pomiar tętnicy ramiennej wykonywany był na szczycie załamka R, czyli w maksymalnym rozkurczu naczynia. Miejsce pomiaru znajdowało się 5-10 cm proksymalnie od prawego dołu łokciowego (Rycina 6).



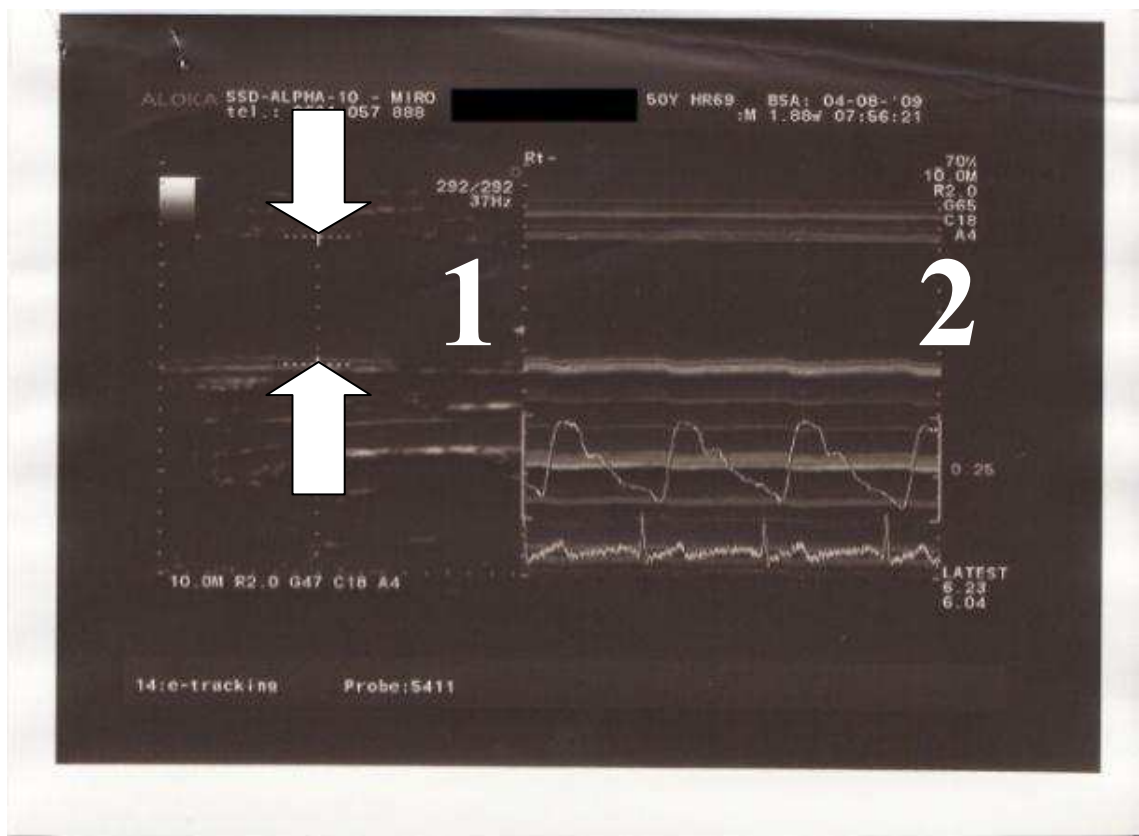
Rycina 6. Ocena wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem przy pomocy aparatu echokardiograficznego *Aloka SSD- Alpha 10- Miro*

Badanie wykonano wg protokołu zaproponowanego przez Celermajera [46]. W pierwszym etapie dokonano pomiaru wyjściowej średnicy tętnicy ramiennej w rozkrczu między bliższą a dalszą linią *m*, stanowiącą granicę pomiędzy błoną środkową a przydanką w ultrasonograficznej prezentacji dwuwymiarowej. Tętnica została zobrazowana w przekroju podłużnym. Przepływ tętniczy w naczyniu potwierdzono, ustawiając w jego świetle bramkę dopplerowską w prezentacji Doppler PW (*Doppler PW- Doppler Pulse Wave*). Wartość średnicy obliczono przez automatyczne uśrednienie pomiarów z co najmniej 3 kolejnych cykli pracy serca. W dalszym etapie na okres 5 minut pompowano mankiet ciśnieniomierza do wartości 200 mmHg. Czas odmierzano był stoperem marki *Seiko*. Po 5 minutach wykonano szybką jego deflację przywracając krążenie w tętnicy ramiennej. Po 20-30 sekundach od deflacji ponownie przykładano głowicę. Pomiary wykonywano w tym samym miejscu jak przed inflacją mankieta, po uzyskaniu porównywalnego obrazu

ultrasonograficznego. Maksymalna średnica naczynia obserwowana była około 1 minuty po opróżnieniu mankietu sfigmomanometru. Wartość średnicy obliczono ponownie przez automatyczne uśrednienie pomiarów z co najmniej 3 cykli pracy serca.



- a. Zapis przepływu w tętnicy ramiennej przed założeniem mankietu sfigmomanometru. (1- światło tętnicy ramiennej z widocznym przez nią przepływem, 2- zapis widma dopplerowskiego).



- b. Pomiar wyjściowej średnicy tętnicy ramiennej. (1- światło tętnicy ramiennej, strzałka ustawiona na dystalnej i proksymalnej linii m stanowiącej granicę między błoną środkową a przydanką, 2- ultrasonograficzna prezentacja M-mode światła tętnicy ramiennej).

Rycina 7. Etapy oceny wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem przy pomocy głowicy naczyniowej ultrasonografu *Aloka SSD-Alpha 10- Miro*.

Otrzymane wartości pozwoliły obliczyć wg poniższego wzoru rozszerzalność tętnicy ramiennej zależną od śródbłonna (FMD):

Gdzie:

Dd1-

Dd2-

W drugim etapie oceniono wazodylatację tętnicy ramiennej pod wpływem egzogennie podanej nitrogliceryny. Po przeprowadzeniu pomiarów średnicy tętnicy po przekrwieniu, badany pozostawał nadal w pozycji leżącej. Po 10 minutach odpoczynku od ostatniego pomiaru wykonano ponownie wyjściowe pomiary, jak na początku badania. Tętnica ponownie została zobrazowana w przekroju podłużnym. Przepływ tętniczy w naczyniu potwierdzono, ustawiając w jego świetle bramkę dopplerowską w prezentacji Doppler PW. Wykonano ponowny pomiar wyjściowej średnicy tętnicy ramiennej w rozkurczu między bliższą a dalszą linią *m*, stanowiącą granicę pomiędzy błoną środkową a przydanką w ultrasonograficznej prezentacji dwuwymiarowej. Wartość średnicy obliczono przez automatyczne uśrednienie pomiarów z co najmniej 3 kolejnych cykli pracy serca. Następnie podano każdemu badanemu 400 µg NTG w aerosolu pod język. Po 3-4 minutach powtórzono pomiary, ponownie przykładając głowicę w tym samym miejscu, jak przed podaniem leku, uzyskując porównywalny obraz ultrasonograficzny. Wartość średnicy po podaniu NTG obliczono także przez automatyczne uśrednienie pomiarów z co najmniej 3 cykli pracy serca. Następnie wg poniższego wzoru wyliczono rozszerzalność tętnicy niezależną od śródbłonna (EID).

Gdzie:

Dd1'-

Dd2'-

Przeprowadzenie całości badania zajmowało około 30 minut.

3.2.2 Analiza fali tętna przy pomocy metody *e-Tracking*

U wszystkich badanych dokonywano analizy fali tętna tętnicy ramiennej prawej przy pomocy metody *e-Tracking*. Badanie wykonano przy pomocy aparatu ultrasonograficznego *Aloka SSD- Alpha 10- Miro*, wyposażonego w zautomatyzowany system oceny ultrasonograficznej naczyń. Przed badaniem wykonano pomiar ciśnienia tętniczego na tętnicy ramiennej prawej przy pomocy aparatu firmy *Omron*. Po otrzymaniu stabilnego obrazu zarówno, przedniej jak i tylnej ściany naczynia, ustawiono między bliższą a dalszą linią *m* ściany naczynia bramkę *e-Tracking* dla ciągłej oceny zmian średnicy tętnicy. Ultrasonograficzna analiza fali tętna metodą *e-Tracking* polega na śledzeniu przy pomocy specjalistycznego oprogramowania komputerowego, ruchu ściany naczyniowej oraz zmian wymiarów naczynia w rozkurczu i w czasie wyrzutu lewej komory. Aparat automatycznie przeprowadzał konwersję fali zmian średnicy naczynia do fali ciśnienia tętniczego. Konwersja miała miejsce przez kalibrację najwyższych i najniższych wartości średnicy naczynia do skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi mierzonego przed badaniem. Wartości ciśnienia wprowadzono do pamięci aparatu przed rozpoczęciem wykonywania badania. Pomiary wykonywane były automatycznie w trakcie wykonywania wyjściowych pomiarów do oceny FMD.

Oszacowano następujące parametry sztywności naczyniowej:

- β - wskaźnik sztywności beta będący stosunkiem logarytmu naturalnego zmian ciśnienia do zmian średnicy naczynia

Gdzie:

ln- logarytm naturalny

Ps- ciśnienie skurczowe

Pd- ciśnienie rozkurczowe

Ds- średnica tętnicy podczas skurczu serca

Dd- średnica tętnicy podczas rozkurczu serca

- **Ep** - moduł Younga, wskaźnik elastyczności naczyń. Moduł Younga to zmiana ciśnienia przypadająca na 1 cm^2 grubości naczynia potrzebna do zwiększenia średnicy naczynia o 100%.
-

Gdzie:

Ps- ciśnienie skurczowe

Pd- ciśnienie rozkurczowe

Ds- średnica tętnicy podczas skurczu serca

Dd- średnica tętnicy podczas rozkurczu serca

- **AC** – wskaźnik podatności naczyń, obliczany ze zmian pola przekroju poprzecznego naczynia i ciśnienia krwi. Jest to zmiana średnicy naczynia pod wpływem określonego wzrostu ciśnienia.
-

Gdzie:

Ps- ciśnienie skurczowe

Pd- ciśnienie rozkurczowe

Ds- średnica tętnicy podczas skurczu serca

Dd- średnica tętnicy podczas rozkurczu serca

- **PWV β** – lokalna jednopunktowa szybkość fali tętna
-

Gdzie:

Pd- ciśnienie rozkurczowe krwi

ρ - gęstość krwi (1050 Kg/m^3)

- **AI** – wskaźnik wzmocnienia, który określa różnice ciśnienia w aorcie w skutek nakładania się fal tętna- pierwotnej, skurczowej lewej komory i wtórnej odbitej.

Gdzie:

P1- pierwszy szczyt wychylenia skurczowego fali tętna

P2- drugi szczyt wychylenia skurczowego fali tętna

PP- ciśnienie tętna

3.2.3 Analiza fali tętna przy pomocy fotopletyzmo grafu

Analiza fotopletyzmo graficzna fali tętna przeprowadzona została przy pomocy aparatu *Pulse Trace 2* firmy *Micro Medical* jednocześnie z badaniem rozszerzalności tętnicy ramiennej. Badani pozostawali na czczo oraz powstrzymywali się od palenia tytoniu przez minimum 8 godzin przed badaniem. Żaden z badanych nie przyjmował leków naczyniorozszerzających. Badanym zalecono ponadto ograniczenie aktywności fizycznej oraz niespożywanie pokarmów zawierających kofeinę w ciągu 24 godzin przed badaniem. Przed badaniem pacjenci odpoczywali w pozycji leżącej 10 minut. Badanie wykonywane było w cichym pomieszczeniu odsuniętym od głównych ciągów komunikacyjnych. Temperatura w pokoju wynosiła 21-23 stopnie Celcjusza.

Objętość tętna mierzona była przy pomocy czujnika pletyzmofotograficznego na palcu wskazującym kończyny górnej dominującej. We wszystkich przypadkach była to kończyna górna prawa. Po założeniu czujnika na opuszcze palca pacjent pozostawał w pozycji leżącej 10 minut przed rozpoczęciem badania.

Przy pomocy fotopletyzmo grafu każdemu pacjentowi oszacowano następujące wskaźniki:

- **PPT** - czas przejścia fali tętna przez duże naczynia. To czas upływający od szczytu składowej skurczowej do szczytu składowej rozkurczowej. Wynik podawany jest w milisekundach (ms).

- **SI** - wskaźnik sztywności. Jest to iloraz wzrostu badanego do czasu przejścia przez duże naczynia. Wynik podawany jest w metrach na sekundę (m/s).
- **RI**- wskaźnik odbicia. Jest to iloraz wysokości fali rozkurczowej do wysokości fali skurczowej. Wynik przedstawiany jest w procentach (%).



Rycina 8. Analiza fali tętna przy pomocy aparatu *Pulse Trace PCA 2* firmy *MicroMedical*

Pomiar wykonywano wg *PCA Protocol*- protokołu zaproponowanego przez producenta aparatu, przed wykonaniem badania rozszerzalności tętnicy ramiennej zależnej od śródbrłnka. Oszacowania wyżej wymienionych parametrów dokonywano na podstawie uśrednienia wyników 3 kolejnych pomiarów. Czujnik fotopletyzmo grafu pozostawał na palcu wskazującym chorego przez cały okres trwania badania rozszerzalności tętnicy ramiennej.

3.2.4 Ocena powtarzalności wykorzystanych metod

Do oceny powtarzalności wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem wykorzystano wartości średnicy tętnicy, zanotowane w skurczu i rozkurczu naczynia przed wykonaniem badania wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem oraz po 10 minutowym odpoczynku po zakończeniu badania, tuż przed przeprowadzeniem badania wazodylatacji indukowanej egzogenną nitrogliceryną.

Do oceny powtarzalności metody *e-Tracking* wykorzystano wartości parametrów sztywności naczyniowej, uzyskane przy pomocy tej metody (β , E_p , AC , $PWV-\beta$, AI) przed wykonaniem badania wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem oraz po 10 minutowym odpoczynku po zakończeniu badania, tuż przed przeprowadzeniem badania wazodylatacji indukowanej egzogenną nitrogliceryną.

Celem oceny powtarzalności fotopletyzmoграфicznej analizy fali tętna wykonano dodatkowe pomiary na innej grupie pacjentów. Wykorzystując ten sam protokół badania trzykrotnie w ciągu doby (o godzinie 7.00, 14.00 oraz 18.00), wykonano pomiar parametrów SI , RI i PPT u 27 pacjentów (26% kobiet) w wieku 60.5 ± 9.8 lat z potwierdzoną w badaniu angiograficznym chorobą wieńcową hospitalizowanych w I Klinice Kardiologii GUMed celem wykonania planowej koronarografii.

3.3. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne oraz odchylenie standardowe. Weryfikację hipotezy zgodności między wartościami próby badanej i rozkładem normalnym wykonano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Weryfikację istotności statystycznej różnic występujących między średnimi dwóch niezależnych grup, wykonano przy pomocy testu T-Studenta dla zmiennych o rozkładzie normalnym lub U Manna-Whitneya dla zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego. Współzależność między zmiennymi oceniano przy pomocy współczynnika korelacji R Spearmana. Ocenę współzależności zmiennych skategoryzowanych wykonano przy pomocy testu chi-kwadrat. W przypadku małych liczebności (<10) wykorzystano poprawkę Yatesa. Przyjęto istotność statystyczną wykonanych analiz dla $p < 0.05$. Do wykonywania wszystkich obliczeń wykorzystano oprogramowanie *Statistica 9.1* firmy *StatSoft*.

IV. WYNIKI

4.1 Charakterystyka badanej grupy

Oszacowano funkcję śródbłonna i parametry sztywności naczyniowej u 60 osób. Średni wiek w całej badanej grupie wyniósł 41.9 ± 7.7 lat. Badana grupa obejmowała 3 grupy osób:

- **FH (+)** - 20 chorych z potwierdzoną w badaniu molekularnym mutacją powodującą hipercholesterolemię rodzinną (średnia wieku 38.1 ± 7.2 lat),
- **FH (-)** - 20 osób z wysokimi poziomami cholesterolu LDL w surowicy krwi i wykluczoną w badaniu molekularnym mutacją powodującą hipercholesterolemię rodzinną (średnia wieku 45.9 ± 6.1 lat)
- **Zdrowi**- 20 zdrowych ochotników (średnia wieku 41.6 ± 7.8 lat).

Dla celów dalszej analizy wyodrębniono grupę „wysoki LDL”, w skład której wchodziły wszystkie osoby z wysokim poziom cholesterolu LDL w surowicy krwi bez względu na obecność bądź brak mutacji potwierdzającej hipercholesterolemię rodzinną. Charakterystykę badanych grup przedstawia Tabela 3.

	FH (+) n=20	FH (-) n=20	wysoki LDL n=40	zdrowi n=20	FH (+) vs FH (-)	FH(+) vs zdrowi	FH (-) vs zdrowi	wysoki LDL vs zdrowi
					p			
Wiek (lata)	38.1 ± 7.2	45.9 ± 6.1	42.0 ± 7.7	41.6 ± 7.8	<0.001	NS	NS	NS
Płeć (kobiety)	50% (10)	50% (10)	50% (20)	50% (10)	NS	NS	NS	NS

Mutacja LDL-R	85% (17)	0% (0)	42.5% (17)	0% (0)	-	-	-	-
Mutacja ApoB	15% (3)	0% (0)	7.5% (3)	0% (0)	-	-	-	-
TC max (mg/dl)	338 ±74.4	293.9 ±46.0	314.8 ±64.3	176.7 ±22.4	<0.05	<0.0001	<0.0001	<0.0001
LDL max (mg/dl)	251 ±71.3	202.4 ±49.3	225.4 ±64.8	105.9 ±21.1	<0.05	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HDL max (mg/dl)	54.5 ±14.0	62.7 ±35.3	58.8 ±27.4	53.2 ±11.1	NS	NS	NS	NS
TG max (mg/dl)	132.1 ±55.0	143.9 ±61.1	138.3 ±58.0	93.8 ±44.9	NS	<0.05	<0.001	<0.001
TC ostatni (mg/dl)	244.3 ±76.1	228.1 ±44.2	236.0 ±61.5	177.1 ±22.7	NS	<0.001	<0.0001	<0.0001
LDL ostatni (mg/dl)	165.4 ±66.4	147.6 ±41.3	156.3 ±55.0	106.0 ±21.1	NS	<0.001	<0.0001	<0.001
HDL ostatni (mg/dl)	55.3 ±11.6	55.8 ±14.0	55.5 ±12.7	53.2 ±11.1	NS	NS	NS	NS
TG ostatnie (mg/dl)	120.1 ±50.1	120.9 ±46.1	120.5 ±47.4	93.8 ±44.9	NS	NS	NS	<0.05
Nadciśnienie tętnicze	25% (5)	35% (7)	30% (12)	0% (0)	NS	<0.05	<0.01	<0.01
Palenie tytoniu	10% (2)	20% (4)	15% (6)	0% (0)	NS	NS	<0.05	NS
Cukrzyca	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	NS	NS	NS	NS
SBP (mmHg)	120.0 ±12.6	121.0 ±8.5	120.5 ±10.6	114.7 ±6.4	NS	NS	<0.05	<0.05
DBP (mmHg)	73.0 ±8.0	76.5 ±8.1	74.7 ±8.2	70.0 ±6.3	NS	NS	<0.05	<0.05

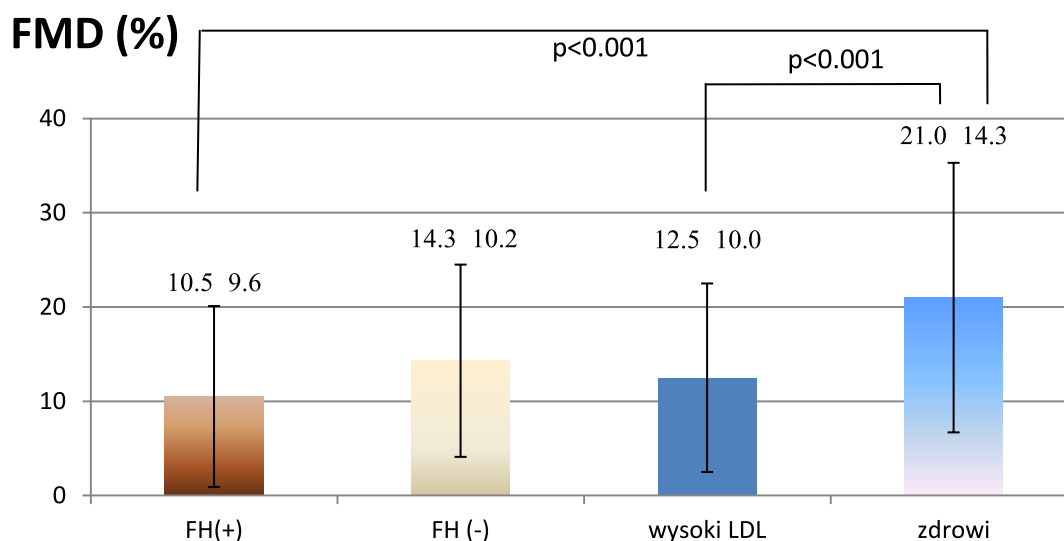
Wzrost (m)	1.7 ±0.1	1.7 ±0.1	1.7 ±0.1	1.7 ±0.1	NS	NS	NS	NS
Waga (kg)	72.7 ±14.5	76.2 ±14.3	74.5 ±14.3	75.1 ±18.1	NS	NS	NS	NS
BMI	25.9 ±4.1	26.2 ±3.3	26.1 ±3.7	24.6 ±4.3	NS	NS	NS	NS

Tabela 3. Charakterystyka badanych grup.

Grupa chorych z wysokim poziomem cholesterolu LDL bez mutacji powodującej hipercholesterolemię rodzinną była istotnie starsza od grupy pacjentów z potwierdzoną mutacją (46.9 ± 6.1 vs 38.1 ± 7.2 , $p < 0.001$). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych różnic średniej wieku badanych osób. Wszystkie badane grupy różniły się od siebie istotnie statystycznie maksymalnymi stwierdzonymi poziomami cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL oraz ostatnio stwierdzonymi poziomami cholesterolu całkowitego w surowicy krwi. Najwyższe wartości charakteryzowały pacjentów z FH(+). Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach cholesterolu HDL w surowicy krwi między grupami. U 5 chorych (25%) w grupie FH (+) oraz 7 chorych (35%) w grupie FH (-) rozpoznano wcześniej nadciśnienie tętnicze. U wszystkich pacjentów stwierdzono obecnie dobrze uregulowane wartości ciśnienia tętniczego na podstawie pomiarów domowych. Zaobserwowano niewielkie, ale istotne statystycznie różnice wartości SBP (*systolic blood pressure*) między grupą FH (-) i osobami zdrowymi oraz między grupą z wysokim LDL i osobami zdrowymi (odpowiednio 121.0 ± 8.5 vs 114.7 ± 6.4 $p < 0.05$; 120.5 ± 10.6 vs 114.7 ± 6.4 $p < 0.05$). Między tymi samymi grupami zanotowano także istotne różnice w DBP (*diastolic blood pressure*) (odpowiednio 76.5 ± 8.1 vs 70.0 ± 6.3 $p < 0.05$; 74.7 ± 8.2 vs 70.0 ± 6.3 $p < 0.05$). Wartości ciśnienia tętniczego pozostawały we wszystkich badanych grupach w granicach wartości ciśnienia prawidłowego. Ponadto 2 osoby w grupie FH (+) (10%) i 4 osoby w grupie FH (-) (20%) były czynnymi palaczami tytoniu. Wśród osób grupy kontrolnej nie było palaczy tytoniu. Żaden z badanych nie chorował na cukrzycę. Badani nie różnili się istotnie wzrostem, masą ciała oraz wartością BMI.

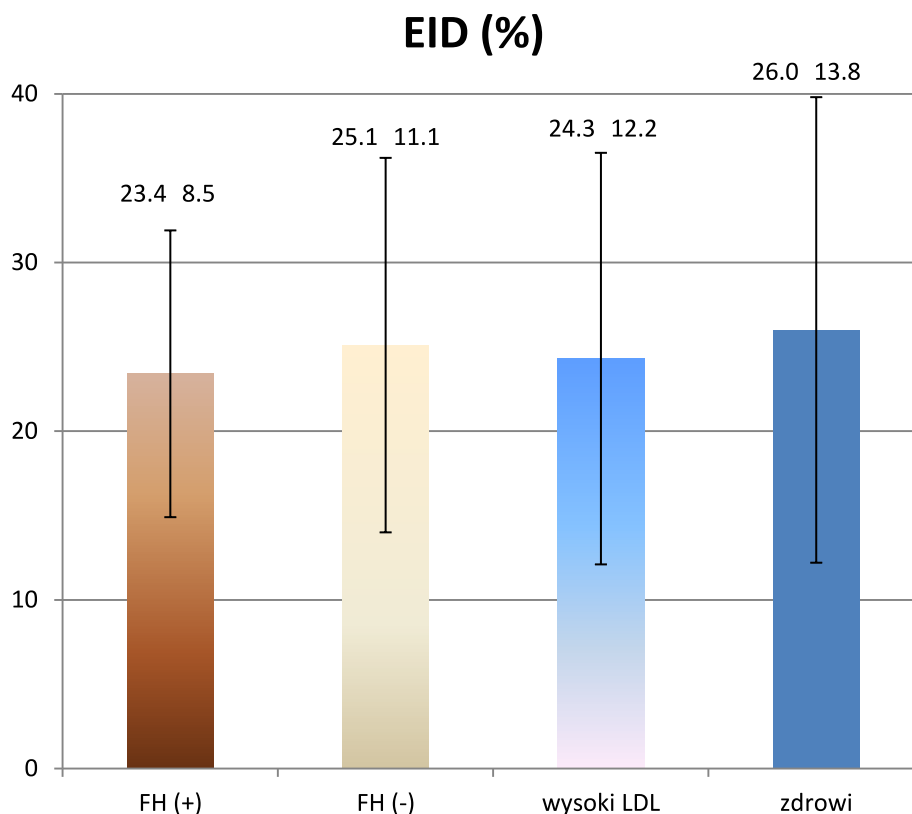
4.2 Ocena wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem

Oszacowano wszystkim badanym wazodylatację tętnicy ramiennej indukowaną niedokrwieniem. Wartość FMD nie różniła się istotnie między grupą FH (+) i FH (-) ($10.5 \pm 9.6\%$ vs $14.3 \pm 10.2\%$, $p=NS$) oraz między grupą FH (-) i grupą zdrowych ($14.3 \pm 10.2\%$ vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p=NS$). FMD było istotnie niższe u pacjentów z hipercholesterolemią rodziną i u wszystkich pacjentów z podwyższonym poziomem cholesterolu LDL w surowicy w porównaniu do grupy osób zdrowych (odpowiednio $10.5 \pm 9.6\%$ vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p<0.001$; 12.5 ± 10 vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p<0.001$). Porównanie otrzymanych średnich wartości wazodylatacji tętnicy ramiennej między badanymi grupami przedstawia Rycina 9.



Rycina 9. Średnie wartości wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach wazodylatacji tętnicy ramiennej po podaniu 400 μg egzogennej nitrogliceryny między badanymi grupami. Otrzymane wartości EID przedstawia Rycina 10.

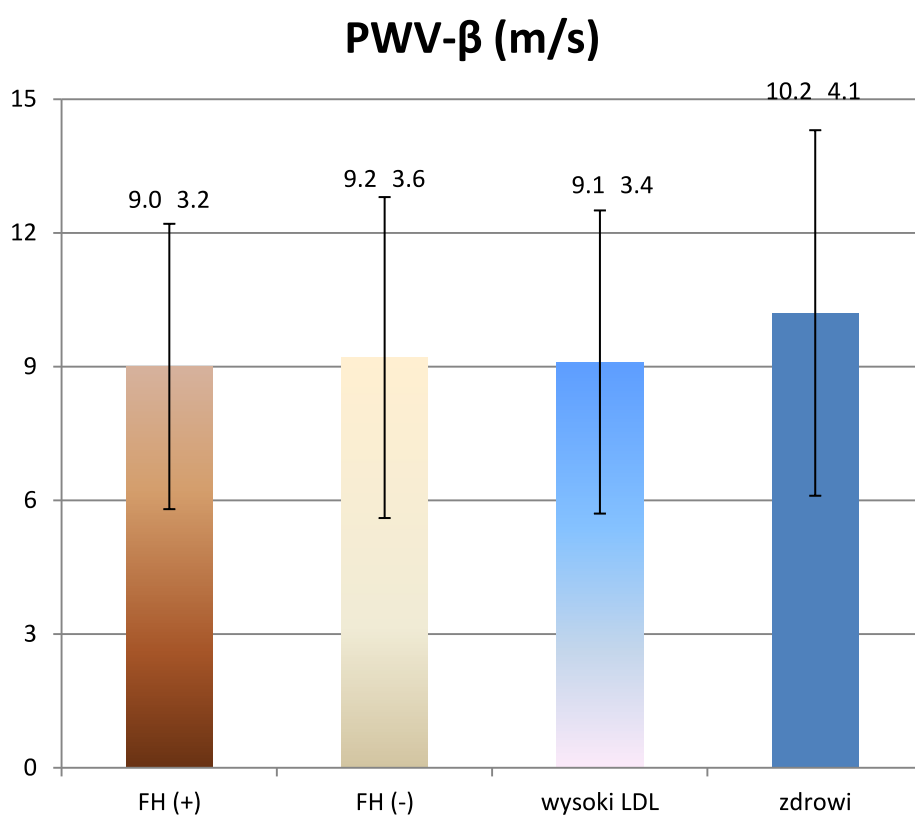


Rycina 10. Średnie wartości wazodylatacji tętnicy ramiennej po podaniu egzogennej nitrogliceryny. Brak istotnych różnic.

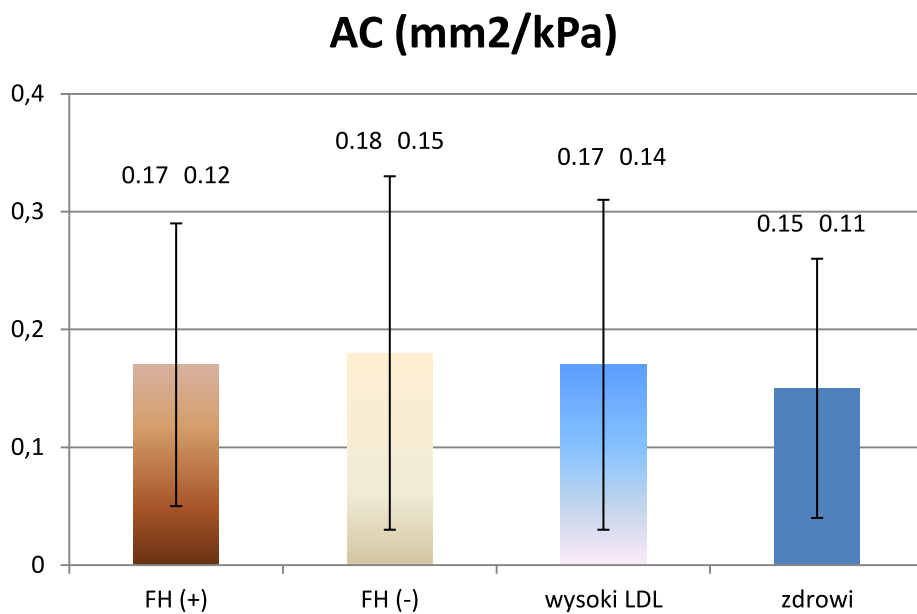
Przeprowadzono również analizę zależności między FMD a podstawowymi danymi charakteryzującymi badanych (wiek, wartości lipidogramu, częstość rytmu serca, wartości SBP i DBP, wzrost, waga, BMI). Zaobserwowano dodatnie korelacje między FMD a maksymalnym stwierdzonym poziomem cholesterolu całkowitego w grupie pacjentów FH(+), FH(-) oraz u wszystkich osób z wysokim poziomem cholesterolu (odpowiednio $r=0.49$, $p<0.05$; $r=0.48$, $p<0.05$; $r=0.32$, $p<0.05$), a także między FMD a SBP w grupie pacjentów FH(+) ($r=0.56$, $p<0.05$). Analizując wszystkich badanych stwierdzono ujemne korelacje między FMD a masą ciała i BMI (odpowiednio $r=-0.27$, $p<0.05$; $r=-0.29$, $p<0.05$). Ujemne korelacje zaobserwowano również w grupie pacjentów FH(-) między FMD a wzrostem, masą ciała i BSA (odpowiednio $r=-0.45$, $p<0.05$; $r=-0.51$, $p<0.05$, $r=-0.52$, $p<0.05$). Wszystkie korelacje przedstawione zostały w formie tabelarycznej w Aneksie 2.

4.3 Ocena fali tętna przy pomocy metody *e-Tracking*

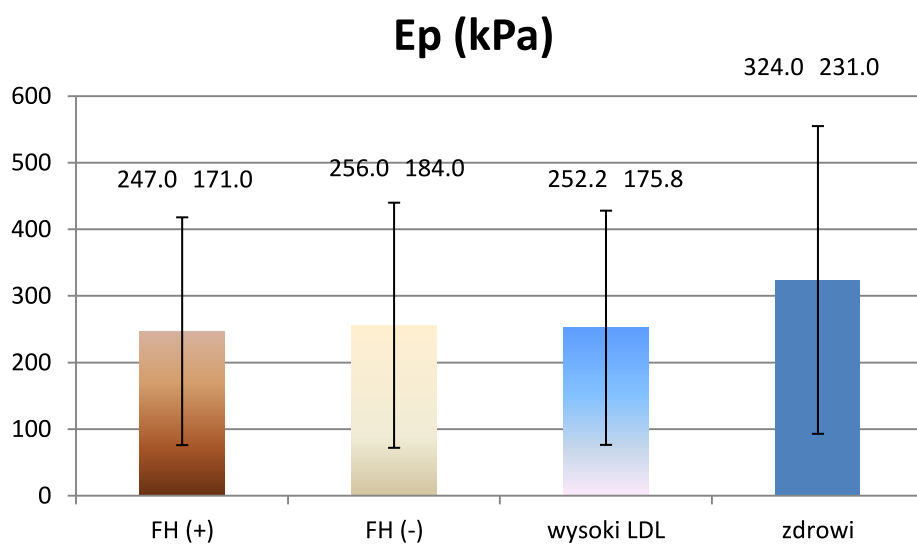
Wszystkim badanym oszacowano przy pomocy ultrasonograficznej metody *e-Tracking* parametry sztywności naczyniowej tętnicy ramiennej: PWV- β , AC, Ep, współczynnik β oraz AI. Nie znaleziono istotnych statystycznie różnic wartości parametrów sztywności naczyniowej ocenianych metodą *e-Tracking* między badanymi grupami. Otrzymane wartości parametrów sztywności naczyniowej we wszystkich badanych grupach przedstawiają Ryciny 11-15.



Rycina 11. Średnie wartości PWV- β . Brak istotnych różnic.

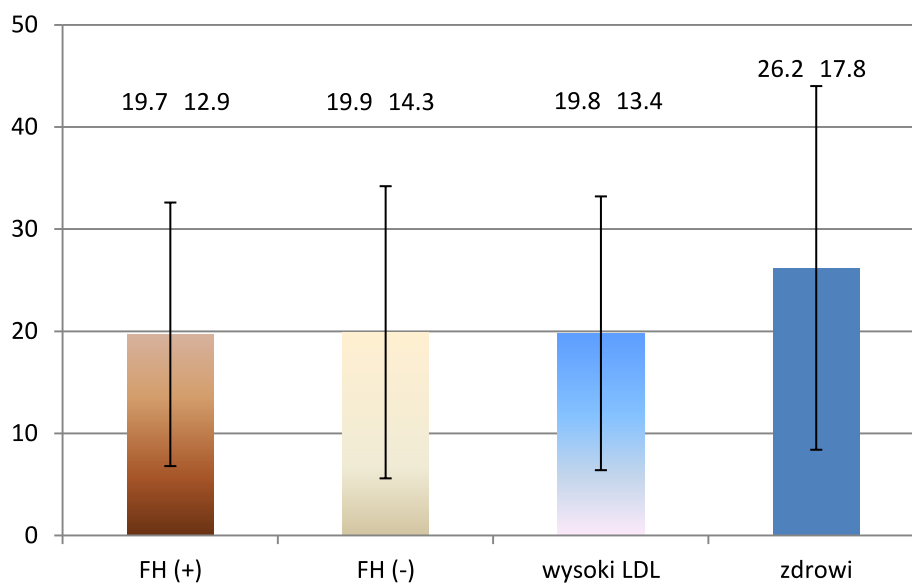


Rycina 12. Średnie wartości AC. Brak istotnych różnic.



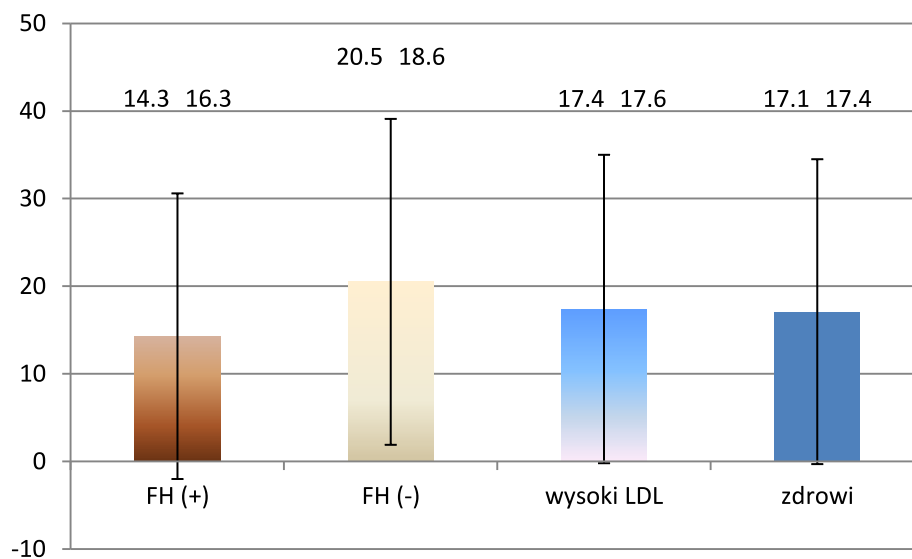
Rycina 13. Średnie wartości Ep. Brak istotnych różnic.

Współczynnik β



Rycina 14. Średnie wartości współczynnika β . Brak istotnych różnic.

AI (%)



Rycina 15. Średnie wartości współczynnika AI. Brak istotnych różnic.

Przeanalizowano ponadto korelacje między wszystkimi uzyskanymi przy pomocy metody *e-Tracking* parametrami. Znotowano silne dodatnie korelacje między współczynnikiem β i E_p ($r=0.99$, $p<0.001$), współczynnikiem β i $PWV-\beta$ ($r=0.97$, $p<0.001$) oraz między E_p i $PWV-\beta$ ($r=0.98$, $p<0.001$). Zaobserwowano również ujemne korelacje między współczynnikiem β i AC ($r=-0.70$, $p<0.001$), E_p i AC ($r=-0.68$, $p<0.05$), a także $PWV-\beta$ i AC ($r=-0.77$, $p<0.001$). Nie znotowano korelacji między powyższymi parametrami a AI . Korelacje między parametrami uzyskanymi przy pomocy metody *e-Tracking* przedstawia Tabela 4.

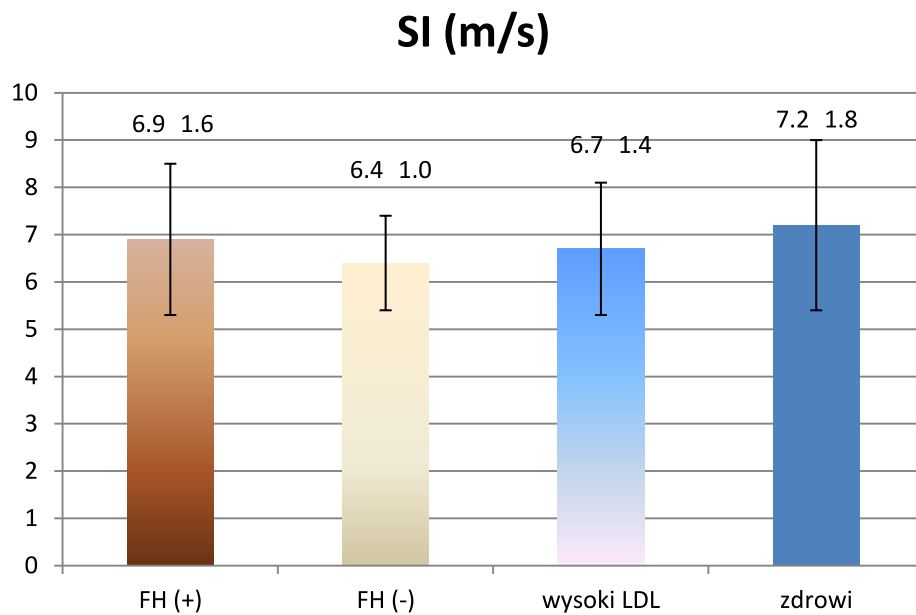
	β		E_p		$PWV-\beta$		AC		AI	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
β	-	-	0.99	<0.001	0.97	<0.001	-0.70	<0.001	0.16	NS
E_p	0.99	<0.001	-	-	0.98	<0.001	-0.68	<0.001	0.20	NS
$PWV-\beta$	0.97	<0.001	0.98	<0.001	-	-	-0.77	<0.001	-0.11	NS
AC	-0.70	<0.001	-0.68	<0.001	-0.77	<0.001	-	-	0.17	NS
AI	0,16	NS	0.20	NS	-0.11	NS	0.17	NS	-	-

Tabela 4. Wzajemne korelacje między parametrami sztywności naczyniowej uzyskanymi przy pomocy metody *e-Tracking*

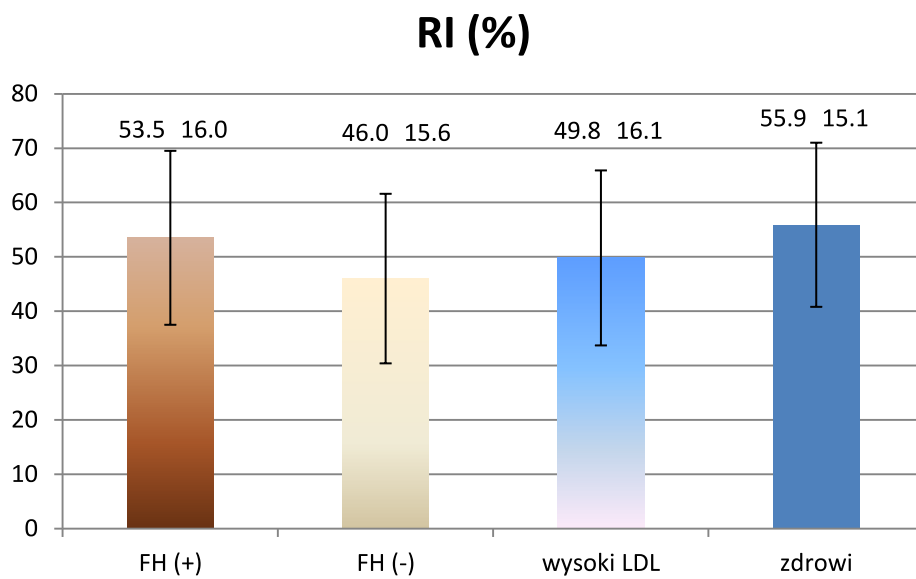
Przeprowadzono również analizę zależności między parametrami sztywności naczyniowej uzyskanymi przy pomocy metody *e-Tracking* a podstawowymi danymi charakteryzującymi badanych (wiek, wartości lipidogramu, częstość rytmu serca, wartości SBP i DBP, wzrost, waga, BMI, BSA). W kontrolnej grupie pacjentów zdrowych znaleziono dodatnie korelacje między współczynnikiem β , E_p oraz $PWV-\beta$ a DBP (odpowiednio $r=0.52$, $p<0.05$; $r=0.57$, $p<0.05$; $r=0.58$, $p<0.05$). W grupie pacjentów z wysokim poziomem cholesterolu LDL bez mutacji wywołującej hipercholesterolemię rodzinną znotowano dodatnią korelację między E_p a częstością rytmu serca ($r=0.47$, $p<0.05$). Nie znaleziono innych istotnych korelacji w pozostałych grupach oraz dla pozostałych parametrów. Wszystkie korelacje przedstawione zostały w formie tabelarycznej w Aneksie 3.

4.4 Ocena fali tętna przy pomocy fotopletyzmo grafu

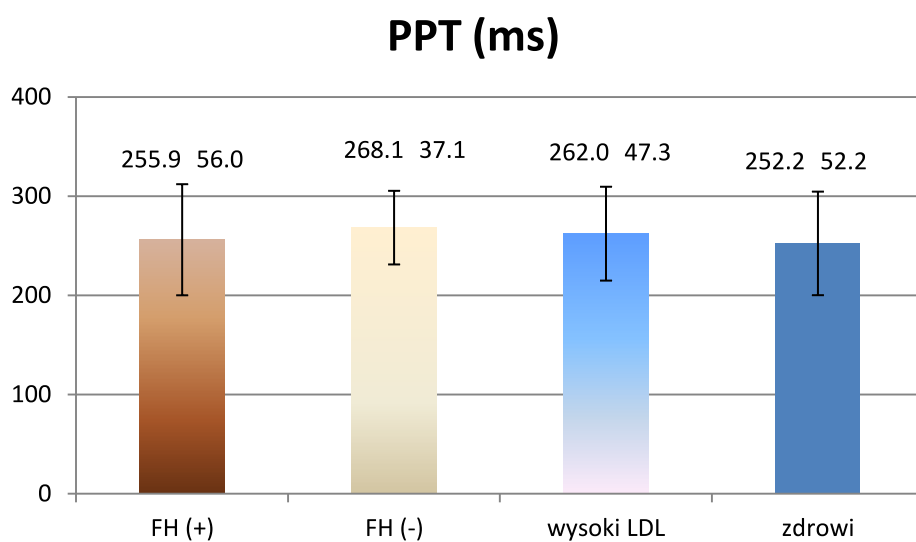
Wszystkim badanym oszacowano przy pomocy fotopletyzmo grafu *Pulse Trace PCA 2* parametry: SI, RI oraz PPT. Nie znaleziono istotnych statystycznie różnic wartości powyższych parametrów ocenianych metodą fotopletyzmo graficzną między badanymi grupami. Otrzymane wartości parametrów sztywności we wszystkich badanych grupach przedstawiają Ryciny 16-18.



Rycina 16. Średnie wartości współczynnika SI. Brak istotnych różnic.



Rycina 17. Średnie wartości współczynnika RI. Brak istotnych różnic.



Rycina 18. Średnie wartości PPT. Brak istotnych różnic.

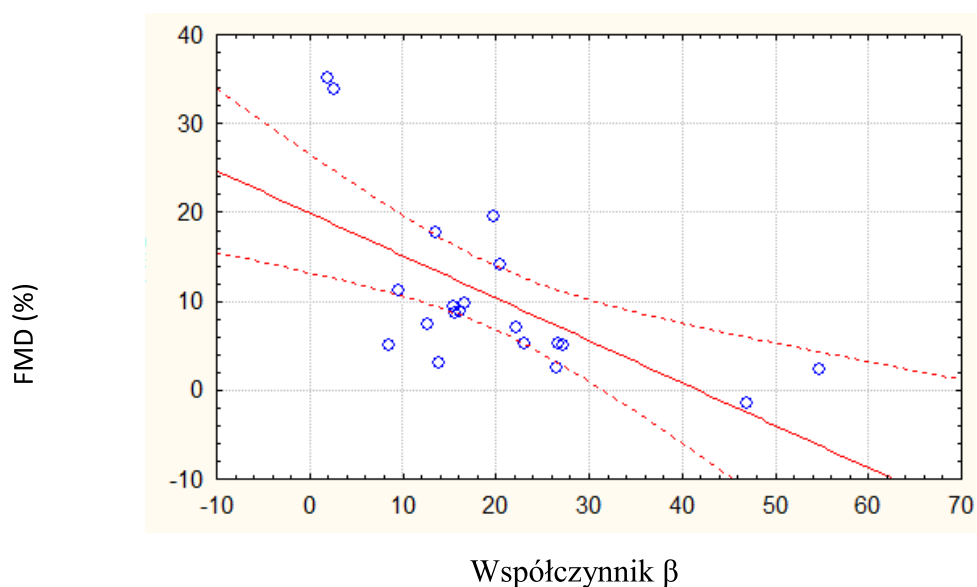
Przeprowadzono również analizę korelacji między parametrami uzyskanymi z analizy fali tętna metodą fotopletyzmograficzną a podstawowymi danymi charakteryzującymi badanych (wiek, wartości lipidogramu, częstość rytmu serca, wartości SBP i DBP, wzrost, waga, BMI, BSA). We wszystkich badanych grupach zaobserwowano istotne dodatnie korelacje między parametrem SI a masą ciała, BMI i BSA. Ponadto, w grupie zdrowych badanych, zanotowano dodatnie korelacje między parametrem SI a wiekiem ($r=0.47$, $p<0.05$), maksymalnym poziomem trójglicerydów ($r=0.47$, $p<0.05$) oraz ostatnio zanotowanym poziomem trójglicerydów ($r=0.49$, $p<0.05$). Analizując korelacje wartości RI, znaleziono ujemne korelacje z częstością rytmu serca u wszystkich badanych ($r=-0.50$, $p<0.001$), a także w grupie pacjentów FH (-) ($r=-0.53$, $p<0.01$), u pacjentów z wysokim poziomem cholesterolu LDL ($r=-0.42$, $p<0.05$) i w grupie kontrolnej zdrowych ochotników ($r=-0.72$, $p<0.001$). Ponadto, w grupie zdrowych ochotników, znaleziono dodatnie korelacje między RI a wiekiem ($r=0.52$, $p<0.05$), maksymalnym poziomem cholesterolu całkowitego w surowicy krwi ($r=0.61$, $p<0.05$) i ostatnio zanotowanym poziomem cholesterolu całkowitego ($r=0.62$, $p<0.05$). We wszystkich badanych grupach wykazano ujemne korelacje wartości PPT z BMI. Ponadto, u wszystkich pacjentów, wykazano ujemne korelacje z masą ciała ($r=-0.41$, $p<0.01$) i BSA ($r=-0.30$, $p<0.05$); w grupie FH (-) ujemne korelacje z maksymalnym poziomem cholesterolu HDL ($r=-0.48$, $p<0.05$); wśród chorych z wysokim poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi ujemne korelacje z masą ciała ($r=-0.38$, $p<0.05$), a w grupie zdrowych ochotników ujemną korelację z wiekiem ($r=-0.54$, $p<0.05$) oraz dodatnią korelację z częstością rytmu serca ($r=0.51$, $p<0.05$). Wszystkie uzyskane wyniki korelacji przedstawione zostały w formie tabelarycznej w Aneksie 4.

4.5 Ocena zależności między funkcją śródbłonna i parametrami sztywności naczyniowej

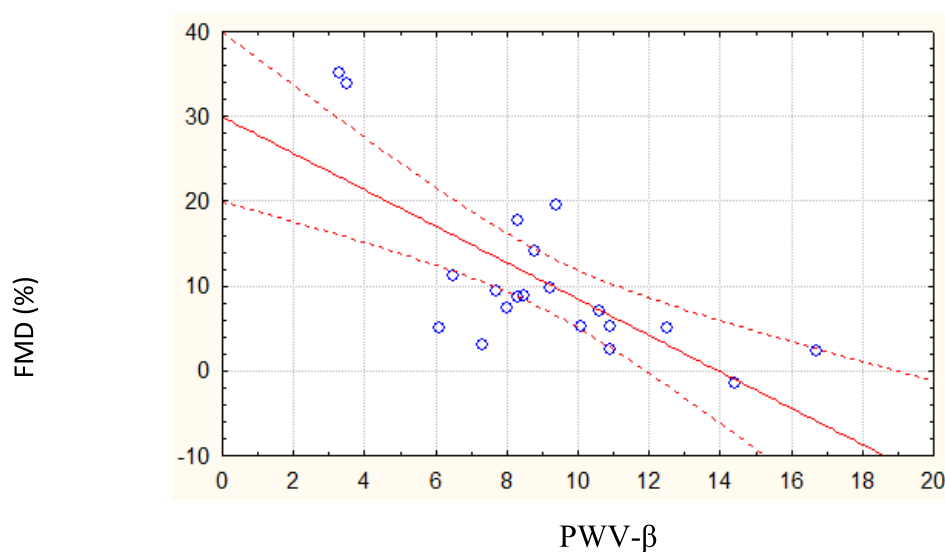
Przeprowadzono analizę zależności między funkcją śródbłonna oszacowaną przy pomocy wazodylatacji tętnicy ramiennej a parametrami sztywności naczyniowej uzyskanymi przy pomocy ultrasonograficznej metody *e-Tracking* oraz fotopletyzmografu. Stwierdzono istotne statystycznie dodatnie korelacje między FMD i AC oraz istotne ujemne korelacje między FMD a współczynnikiem β , Ep i PWV we wszystkich analizowanych grupach. Najsilniejsze korelacje występowały w grupie pacjentów z potwierdzoną w badaniu molekularnym mutacją genu powodującą hipercholesterolemię rodzinną. Nie stwierdzono istotnych korelacji między FMD a parametrami sztywności naczyniowej oszacowanymi przy pomocy fotopletyzmografu. Tabela 5 przedstawia korelacje między analizowanymi parametrami. Ryciny 19-20 przedstawiają wykresy najsilniejszych korelacji między wazodylatacją tętnicy ramiennej indukowaną niedokrwieniem a parametrami sztywności naczyniowej uzyskanymi przy pomocy metody *e-Tracking*.

	wszyscy n=60		FH (+) n=20		FH (-) n=20		wysoki LDL n=40		zdrowi n=20	
	FMD									
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
β	-0.42	<0.001	-0.64	<0.01	-0.43	<0.05	-0.51	<0.001	-0.53	<0.05
Ep	-0.41	<0.001	-0.61	<0.01	-0.45	<0.05	-0.51	<0.01	-0.51	<0.05
PWV β	-0.53	<0.0001	-0.71	<0.0001	-0.57	<0.01	-0.62	<0.0001	-0.62	<0.001
AC	0.20	<0.05	0.42	<0.05	0.43	<0.05	-0.42	<0.01	-0.42	<0.05
AI	0.39	NS	0.23	NS	-0.25	NS	-0.17	NS	-0.17	NS
SI	-0.09	NS	0.01	NS	-0.23	NS	-0.09	NS	-0.09	NS
RI	-0.04	NS	-0.17	NS	0.37	NS	0.09	NS	0.09	NS
PPT	0.00	NS	-0.18	NS	0.05	NS	-0.01	NS	-0.01	NS

Tabela 5. Korelacje między FMD a parametrami sztywności naczyniowej oszacowanymi przy pomocy ultrasonograficznej metody *e-Tracking* oraz fotopletyzmo grafu.



Rycina 19. Korelacje między FMD a współczynnikiem β w grupie pacjentów z potwierdzoną w badaniu molekularnym mutacją powodującą hipercholesterolemię rodzinną ($r=-0.64$, $p<0.001$).



Rycina 20. Korelacje między FMD a PWV- β w grupie pacjentów z potwierdzoną w badaniu molekularnym mutacją powodującą hipercholesterolemię rodzinną ($r=-0.71$, $p<0.0001$).

Oceniono zależności między parametrami sztywności naczyniowej oszacowanymi metodą *e-Tracking* i metodą fotopletyzmograficzną. Nie znaleziono istotnych korelacji między parametrami sztywności naczyniowej oszacowanymi przy pomocy metody *e-Tracking* a parametrami wyznaczonymi z użyciem fotopletyzmografu we wszystkich badanych grupach. Uzyskane korelacje między wyżej wymienionym parametrami przedstawia Tabela 6.

		β		E_p		$PWV-\beta$		AC		AI	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
wszyscy	SI	0.03	NS	0.03	NS	0.09	NS	-0.01	NS	0.02	NS
FH (+)		0.08	NS	0.15	NS	0.17	NS	0.07	NS	-0.13	NS
FH (-)		-0.04	NS	-0.04	NS	0.03	NS	-0.01	NS	0.17	NS
wysoki LDL		0.02	NS	0.06	NS	0.03	NS	0.03	NS	-0.04	NS
zdrowi		-0.05	NS	-0.07	NS	-0.04	NS	0.02	NS	0.12	NS

wszyscy	RI	0.05	NS	0.04	NS	0.02	NS	0.22	NS	-0.09	NS
FH (+)		0.25	NS	0.28	NS	0.25	NS	0.14	NS	-0.10	NS
FH (-)		-0.30	NS	-0.34	NS	-0.39	NS	0.05	NS	-0.32	NS
wysoki LDL		-0.04	NS	-0.05	NS	-0.09	NS	0.30	NS	-0.16	NS
zdrowi		0.10	NS	0.10	NS	0.15	NS	0.05	NS	0.05	NS
wszyscy	PPT	0.02	NS	0.01	NS	-0.04	NS	0.00	NS	-0.08	NS
FH (+)		-0.04	NS	-0.1	NS	-0.12	NS	-0.06	NS	0.09	NS
FH (-)		0.00	NS	0.02	NS	-0.03	NS	0.09	NS	-0.15	NS
wysoki LDL		-0.02	NS	-0.05	NS	-0.08	NS	0.01	NS	-0.25	NS
zdrowi		0,11	NS	0,13	NS	0,07	NS	-0.05	NS	-0.25	NS

Tabela 6. Korelacje między parametrami sztywności naczyniowej oszacowanymi przy pomocy ultrasonograficznej metody *e-Tracking* a parametrami uzyskanymi przy pomocy fotopletyzmo grafu.

4.6 Powtarzalność wykorzystanych metod

4.6.1 Powtarzalność FMD oraz metody *e-Tracking*

Porównano wartości średnicy tętnicy ramiennej zanotowane w skurczu i rozkurczu naczyń przed wykonaniem badania wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem oraz po 10 minutowym odpoczynku po zakończeniu testu, tuż przed przeprowadzeniem badania wazodylatacji indukowanej egzogenną nitrogliceryną. Średnia średnica naczyń w trakcie skurczu serca wynosiła odpowiednio 4.23 ± 0.80 mm przed FMD oraz 4.28 ± 0.80 mm przed EID. Średnia średnica naczyń w rozkurczu serca wynosiła odpowiednio 4.08 ± 0.80 mm przed FMD oraz 4.16 ± 0.08 mm przed EID. Nie znaleziono istotnych statystycznie różnic między powyższymi wartościami. Zaobserwowano istotne i silne korelacje między uzyskaną średnią średnicą naczyń przed FMD i przed EID (współczynnik korelacji w skurczu: $r=0.92$; $p<0.001$; współczynnik korelacji w rozkurczu: $r=0.90$; $p<0.001$). Przeanalizowano również powtarzalność wartości parametrów sztywności naczyniowej uzyskanych ultrasonograficzną metodą *e-Tracking* przed FMD oraz przed EID. Nie znaleziono istotnych statystycznie różnic między współczynnikami β , AC, PWV- β , Ep, AI przed FMD i przed EID. Wykazano istotne statystycznie korelacje między β , AC, PWV- β , Ep przed FMD i przed EID. Tabela 7 przedstawia uzyskane wyniki.

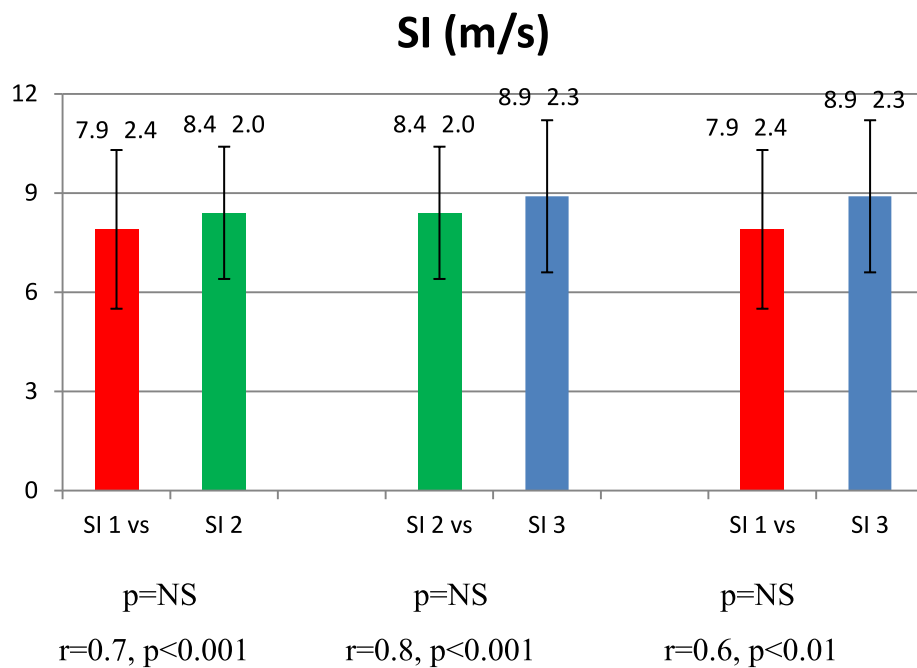
	Przed FMD	Przed EID	p	r	p dla korelacji
średnica w skurczu (mm)	4.23 ± 0.80	4.28 ± 0.80	NS	0.92	<0.001
średnica w rozkurczu (mm)	4.08 ± 0.80	4.16 ± 0.80	NS	0.90	<0.001
współczynnik β	21.9 ± 15.2	23.0 ± 14.7	NS	0.30	<0.05
AC (mm²/kPa)	0.16 ± 0.12	0.14 ± 0.11	NS	0.76	<0.001

PWV-β (m/s)	9.5±3.6	10.1±3.7	NS	0.46	<0.001
Ep (kPa)	276.0±197.0	290.0±190.5	NS	0.31	<0.05
AI (%)	17.3±17.3	9.7±28.9	NS	0.20	NS

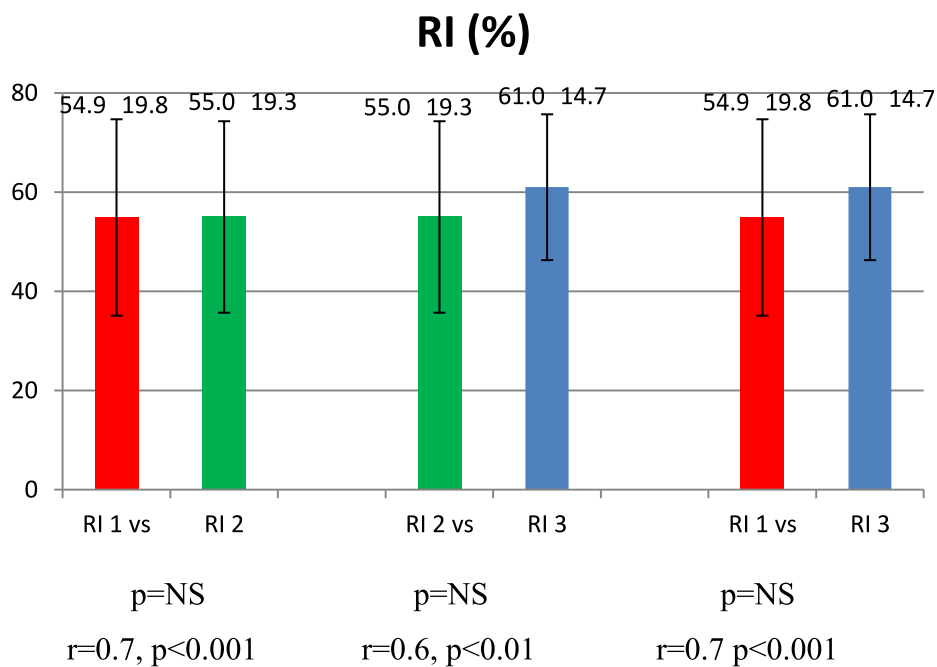
Tabela 7. Powtarzalność pomiarów sztywności naczyniowej wykonanych metodą *e-Tracking* przy użyciu ultrasonografu *Aloka SSD Alpha 10 Miro*.

4.6.2 Powtarzalność metody fotopletyzmoграфicznej

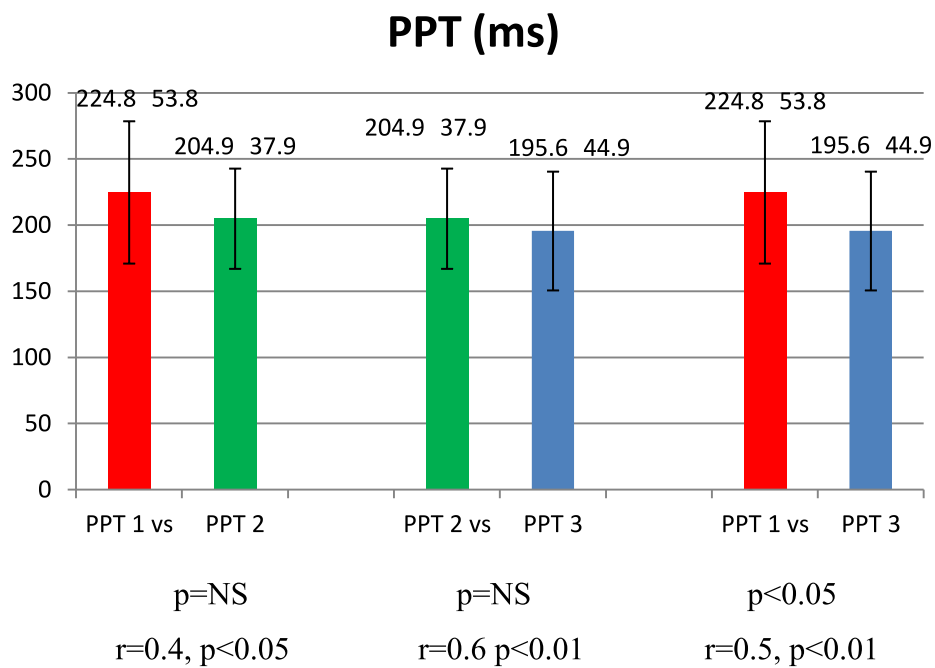
Poddano analizie porównawczej uzyskane w trzykrotnych pomiarach parametry sztywności naczyniowej otrzymane przy pomocy metody fotopletyzmoграфicznej u pacjentów, poddawanych planowej koronarografii w I Katedrze i Klinice Kardiologii GUMed. Nie znaleziono istotnych różnic wartości parametrów SI i RI uzyskanych podczas poszczególnych pomiarów. Zanotowano istotne dodatnie korelacje między wartościami poszczególnych pomiarów. Zarejestrowano jedynie istotną różnicę między pomiarem 1 i pomiarem 3 czasu PPT (224.8 ± 53.8 ms vs 195.6 ± 44.9 ms, $p < 0.05$). Porównanie uzyskanych wartości SI, RI oraz PPT podczas poszczególnych pomiarów przedstawiają Ryciny 21-23.



Rycina 21. Porównanie uzyskanych wartości SI podczas poszczególnych pomiarów.



Rycina 22. Porównanie uzyskanych wartości RI podczas poszczególnych pomiarów.



Rycina 23. Porównanie uzyskanych wartości PPT podczas poszczególnych pomiarów.

V. DYSKUSJA

Podłożem choroby niedokrwiennej serca jest miażdżycza uwarunkowana często wysokim poziomem cholesterolu. Grupą pacjentów szczególnie narażonych na jej rozwój są osoby z hipercholesterolemią rodzinną. U tych chorych proces miażdżycowy jest znacznie przyspieszony, co często powoduje przedwczesną chorobę niedokrwinną serca [93]. Wykrycie wczesnych objawów zaburzeń funkcji naczyń pozwala szybciej zapobiegać wystąpieniu ostrych incydentów sercowo-naczyniowych [33, 94]. Pomocne mogą okazać się tu nowe nieinwazyjne metody oceny funkcji śródbłonna i parametrów sztywności naczyń [95]. Wczesne zaburzenia funkcji śródbłonna można zmierzyć za pomocą oceny wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem- FMD [96]. Postępujący proces miażdżycowy prowadzi do zmian strukturalnych i funkcjonalnych ściany naczynia, a przez to do zwiększenia sztywności naczyniowej. Zmiany te można we wczesnym okresie ocenić przy pomocy ultrasonograficznych i pletyzmograficznych parametrów oceniających sztywność i podatność naczyń tętnicznych.

Przełomem w badaniach nad funkcją śródbłonna było wprowadzenie w 1992 roku przez Celermajera badania rozszerzalności tętnicy ramiennej zależnej od przepływu. Wykazano bowiem zbieżność wyników uzyskanych w trakcie badania z wynikami badań inwazyjnych, które oceniały rozszerzalność tętnic wieńcowych, uznawanych wtedy za standard w ocenie funkcji śródbłonna [46, 97]. Prowadzone od lat 90-tych badania obserwacyjne z wykorzystaniem metody FMD potwierdzają prognostyczne znaczenie tego badania w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego [33, 96, 98, 99, 100]. Wykazano istotną korelację zmniejszonej rozszerzalności naczynia w odpowiedzi na niedokrwienie z tradycyjnymi czynnikami ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, takimi jak: płeć i wiek [33], palenie tytoniu [101], nadciśnienie tętnicze [102], podwyższony poziom cholesterolu całkowitego [103], obniżony poziom HDL [104] oraz w obecności choroby wieńcowej [105, 106], cukrzycy typu 2 [107] i miażdżycy tętnic obwodowych [108]. Gokce i wsp. wykazali także znaczenie predykcyjne funkcji śródbłonna tętnicy ramiennej w występowaniu wczesnych i późnych epizodów sercowo-naczyniowych u pacjentów poddanych zabiegom naczyniowym [109]. Badanie FMD wykorzystywane jest również w ocenie funkcji

śródbłonka po leczeniu. Wykazano przy pomocy oceny FMD, iż funkcja śródbłonka poprawia się w skutek zastosowania odpowiedniej diety oraz treningu fizycznego [110], w trakcie leczenia hipolipemizującego [111] lub po zabiegu LDL aferezy u chorych z hipercholesterolemią rodzinną [112].

W badanej przez mnie grupie wartość FMD była istotnie statystycznie niższa u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną i u wszystkich pacjentów z podwyższonym poziomem cholesterolu LDL w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej ($10.5 \pm 9.6\%$ vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p < 0.001$; 12.5 ± 10.0 vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p < 0.001$). Nie znalazłem istotnych różnic między pozostałymi grupami w zakresie FMD. Uzyskane wyniki są zbieżne z przeprowadzonymi wcześniej badaniami oceniającymi ten parametr w grupach pacjentów z hipercholesterolemią. W opublikowanej ostatnio metaanalizie ośmiu badań przeprowadzonych na chorych z rozpoznaną hipercholesterolemią rodzinną Masoura i wsp. wykazali, że pacjenci z FH mają istotnie niższe wartości FMD w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych badanych (5.3% , 95% CI, $p < 0.001$) [113].

Dane na temat prognostycznej roli FMD u pacjentów bezobjawowych są skąpe. W badaniu 444 zdrowych osób ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym zauważono, że liczba występowania epizodów sercowo-naczyniowych oraz całkowita śmiertelność w dwuletniej obserwacji była wyższa u badanych z niskimi wartościami FMD [114]. W dostępnej literaturze nie znaleziono badań, które analizowałyby ten problem u bezobjawowych chorych obciążonych FH.

Wysoki poziom cholesterolu LDL w surowicy krwi skutkuje często wczesnym występowaniem choroby wieńcowej. Tak więc obniżenie wartości FMD u osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi, a przede wszystkim u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną, może skutkować dysfunkcją śródbłonka, inicjującą rozwój procesu miażdżycowego. W dotychczasowych badaniach wykazano, że zmniejszone wartości FMD korelują przede wszystkim ze zwiększonym zaawansowaniem procesu miażdżycowego w tętnicach wieńcowych. Neunteufl i wsp. wykazali istotnie obniżone wartości FMD u pacjentów z dolegliwościami stenokardialnymi i zwężeniami w tętnicach wieńcowych powyżej 30% średnicy naczynia (12.6 ± 6.7 vs 5.7 ± 4.8 , $p < 0.05$) [105]. Schroeder i wsp. taką korelację wykazali w przypadku obecności jakichkolwiek zwężeń w tętnicach wieńcowych, stwierdzanych w obrazie angiograficznym (7.0 ± 3.5 vs 3.8 ± 4.1 , $p < 0.05$) [115]. W badaniach,

które prowadzili Teragawa, Jambrik i Kopec jako istotne zwężenie tętnic wieńcowych przyjęto zmiany powyżej 50%. W tej grupie chorych również zaobserwowano istotność statystyczną (FMD odpowiednio 9.4 ± 0.5 vs 2.9 ± 0.2 , $p < 0.05$; 7.4 ± 5.7 vs 4.6 ± 4.4 , $p < 0.05$ oraz 9.6 ± 3.5 vs 4.8 ± 3.2 , $p < 0.05$) [116, 117, 118]. Reasumując, wszyscy pacjenci, u których w trakcie koronarografii wykazano istotne zmiany miażdżycowe w tętnicach wieńcowych, mieli istotnie obniżone wartości FMD w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto Chan i wsp. wykazali prognostyczną rolę FMD u pacjentów z chorobą wieńcową. W trakcie obserwacji długoterminowej zauważyli, że stopniowy spadek wartości FMD w tej grupie chorych skutkowało zwiększeniem liczby występowania epizodów sercowo-naczyniowych [119]. Warto jednak zauważyć, iż wartości FMD uzyskane przez poszczególnych autorów różniły się znacznie, co mogło wynikać z różnej metodyki badania, wykonywania badań na różnych etapach zaawansowania zmian miażdżycowych tętnic wieńcowych i odsetka pacjentów, którzy stosowali inhibitory konwertazy angiotensyny II oraz statyny poprawiające funkcję śródbłonna. W związku z tym trudno określić jednolitą normę dla wyniku testu FMD, która mogłaby być przyjęta powszechnie w praktyce klinicznej. Wielu autorów przyjmuje jednak jako wartości prawidłowe, wartości FMD powyżej 7-10%. Warto zauważyć, że we wszystkich badanych przez mnie grupach, uzyskane średnie wartości FMD znajdowały się w granicach proponowanych wartości prawidłowych. Ponadto, badana grupa pacjentów była stosunkowo młoda, średnia wieku 41.9 ± 7.7 lat, i nie zgłaszała w wywiadzie żadnych przebytych epizodów sercowo-naczyniowych. Benjamin i wsp. wykazali w grupie 2883 badanych w ramach programu *Framingham Study* istotną ujemną korelację FMD z wiekiem [120]. Mimo różnicy wieku między osobami z wysokimi wartościami cholesterolu LDL z i bez mutacji potwierdzającej FH, zanotowałem niższe wartości FMD w istotnie młodszej grupie pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną (38.1 ± 7.2 vs. 46.9 ± 6.1 , $p < 0.001$). Sugeruje to większe znaczenie hipercholesterolemii uwarunkowanej FH, niż samego wieku dla wartości FMD.

Badacze podkreślają też znaczenie rozszerzalności tętnicy ramiennej niezależnej od śródbłonna (EID), pod wpływem podanej egzogennie nitrogliceryny w ocenie funkcji naczyń. Należy jednak zauważyć, iż większość doniesień wskazuje, że obniżenie wartości EID występuje dopiero na etapie obecnej już choroby sercowo-naczyniowej [121, 122, 123]. Znamienne niższe wartości FMD w badanej przez mnie

grupie pacjentów z FH czy też u osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi oraz brak istotnych różnic między badanymi grupami w zakresie EID sygnalizować może, że w tych grupach proces inicjalizacji uszkodzenia śródbłonna miał już miejsce, ale proces miażdżycowy nie jest jeszcze zaawansowany na tyle, by istotnie wpłynąć na wartość EID.

Atherosclerosis, czyli proces miażdżycowy, może być kompleksowo oceniany w dwóch aspektach. *Atherosclerosis*, który odzwierciedla zmiany w błonie wewnętrznej i środkowej ściany naczynia oraz *sclerosis*, będący odzwierciedleniem zmian sztywności naczyń. Przyjmuje się, że wzrost sztywności naczyń przyczynia się do wzrostu ciśnienia skurczowego i ciśnienia tętna szczególnie w aorcie. W skutek wzrostu wartości tych parametrów zwiększa się zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen [124], dochodzi do przerostu lewej komory [125], przebudowie ulegają ściana naczyniowa oraz blaszki miażdżycowe tętnic szyjnych zwiększając prawdopodobieństwo ich pęknięcia [126]. Reasumując, w skutek zwiększenia sztywności naczyniowej, może dochodzić do zwiększenia ryzyka występowania incydentów sercowo-naczyniowych [126]. Eksperti Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego przyjęli, że złotym standardem w pomiarach sztywności naczyń jest pomiar prędkości fali tętna w odcinku szyjno-udowym, uznając go za ważny czynnik predykcyjny ryzyka sercowo-naczyniowego [126]. W odróżnieniu od ocenianej w oparciu o model propagacji drzewa tętniczego systemowej sztywności tętnic, lokalna sztywność naczyń może być mierzona w różnych miejscach drzewa tętniczego.

Nową metodą, mogącą być użytecznym narzędziem w nieinwazyjnej ocenie lokalnej sztywności poszczególnych elementów drzewa naczyniowego, jest metoda *e-Tracking*, pozwalająca na ciągłe śledzenie ruchu ściany naczyniowej oraz wymiarów naczynia w rozkurczu i w czasie wyrzutu lewej komory. Pomiary najczęściej wykonywane są na tętnicach szyjnych, możliwe jest jednak wykonanie pomiaru także na innych częściach drzewa tętniczego. Metoda *e-Tracking*, ze względu na wysoką precyzję i powtarzalność pomiarów, jest zalecana przez ekspertów Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego do analizy w badaniach patofizjologicznych. Znalazła ona zastosowanie we wczesnym wykrywaniu procesu miażdżycowego. Ocenia zmiany czynnościowe jeszcze przed pojawieniem się zmian morfologicznych, co może umożliwić określenie stanu naczyń u osób zdrowych w strategiach profilaktyki przeciwmiażdżycowej. Może być także wykorzystywana

celem oceny wpływu metod farmakologicznych i nefarmakologicznych na parametry sztywności naczyniowej. *e-Tracking* nie uzyskała jednak na razie szerszej akceptacji w badaniach epidemiologicznych. Może to wynikać ze stosunkowo wysokich kosztów tej metody oraz jej pracochłonności.

W przeprowadzonym przeze mnie badaniu, oszacowałem przy pomocy metody *e-Tracking* parametry sztywności zmierzone na prawej tętnicy ramiennej: PVW- β , AC, Ep, współczynnik β oraz AI. Nie znalazłem między badanymi grupami istotnych statystycznie różnic analizowanych parametrów. W piśmiennictwie spotyka się pojedyncze prace z użyciem metody *e-Tracking*. Avgeropoulou i wsp. stwierdzili, że u chorych na cukrzycę wskaźnik sztywności β , wskaźnik elastyczności Epsilon oraz PWV były podwyższone niezależnie od występowania nadciśnienia tętniczego w grupie chorych z cukrzycą [127]. Jaroch i wsp. zbadali metodą *e-Tracking* 58 osób z prawidłową IMT: 27 zdrowych oraz 31 pacjentów z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego. Wykazali, znamienne wyższe wartości współczynnika β , Ep, PWV oraz znamienne niższe wartości AC tętnic szyjnych w grupie pacjentów z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego. W badaniu tym zanotowali także istotne dodatnie korelacje między współczynnikiem β i Ep a wiekiem, ryzykiem wyliczonym przy pomocy systemu SCORE i IMT oraz istotne ujemne korelacje między współczynnikiem β i Ep a frakcją wyrzutową lewej komory. Ponadto, nie zaobserwowali korelacji między uzyskanymi parametrami sztywności naczyniowej a BMI czy parametrami funkcji rozkurczowej lewej komory [128].

Metoda *e-Tracking* jest nowym narzędziem, a przeprowadzone do tej pory badania wstępnie wskazują na jej przydatność w wykrywaniu zmian czynnościowych tętnic szyjnych. Nie znaleziono w dotychczasowym piśmiennictwie wykorzystania tej metody w badaniu tętnic ramiennych. Producent aparatu podaje jednakże, możliwość wykorzystania tej metody w każdym dostępnym badaniu odcinka drzewa tętniczego. Ponieważ przedmiotem mojego badania była ocena FMD i EID tętnicy ramiennej, dlatego pomiarów parametrów sztywności naczyniowej metodą *e-Tracking* dokonano także w tętnicy ramiennej. Uzyskany przeze mnie brak istotnych różnic między poszczególnymi grupami, wynikać może z młodego wieku badanych. Wskazywać mogą na to wyniki uzyskane przez Jaroch i wsp. W innej swojej publikacji przygotowanej na tej samej, co wcześniej opisana grupie badanych 58 osób z prawidłową IMT: 27 zdrowych oraz 31 pacjentów z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego

Jaroch i wsp. wykazali, znamienne wyższe wartości współczynnika β , Ep, PWV oraz znamienne niższe wartości AC tętnic szyjnych u osób starszych niż 50 lat w porównaniu do badanych przed 50 rokiem życia [89]. Podobne wnioski przedstawili Fan i wsp., badając przy pomocy *e-Tracking* parametry sztywności naczyniowej u 145 zdrowych ochotników. Wykazali, że współczynnik β , Ep, AI and PWV β rosną wraz z wiekiem, zaś AC maleje z wiekiem [129]. Brak istotnych statystycznie różnic wśród parametrów sztywności naczyń w ocenianej przez mnie grupie może świadczyć, że proces miażdżycowy u tych osób nie jest zaawansowany. Co może wynikać głównie ze stosunkowo młodego wieku badanych.

Do tej pory nie określono norm dla parametrów sztywności naczyniowej ocenianych metodą *e-Tracking*, dlatego konieczne są dalsze prace nad ich ustaleniem oraz dalsze badania celem ugruntowania pozycji tego badania w wykrywaniu wczesnych stadiów miażdżycy. Parametry te mogą mieć więc zastosowanie dla oceny zmian czynnościowych, które obrazują wzrost sztywności naczyń, zanim pojawią się morfologiczne zmiany miażdżycowe [89].

Prostsza metodą oceny sztywności naczyniowej i funkcji śródbłonna może być ocena przy pomocy przenośnego fotopletyzmo grafu, który mierzy objętość fali tętna na dystalnej części palca. We wczesnych badaniach z wykorzystaniem tej metody wykazano, że fala tętna rejestrowana na dystalnej części palca przypomina falę tętna na tętnicy szyjnej [130]. Wykazano również, że uzyskane w trakcie powyższych pomiarów wyniki silnie korelują z szyjno-udową szybkością fali tętna [90, 91]. Zapis ciśnienia na tętnicy promieniowej i zapis objętości fali tętna na opuszcze palca nie są jednak tożsame. Udowodniono natomiast, że informacje jakie niosą za sobą, są podobne [92]. Fale te są rezultatem nakładania się fali wytworzonej przez skurcz serca i fali odbitej. Parametry wyliczane w trakcie pomiaru na tętnicy promieniowej powstają pod koniec skurczu serca i zależą od sztywności naczyń, czynności tętnic oporowych, ale także od częstości rytmu serca oraz czynności skurczowej. Parametry otrzymane przy pomocy fotopletyzmo grafu powstają w czasie fazy rozkurczu, więc nie zależą w tak dużym stopniu od czynności skurczowej i częstości rytmu serca. Wyznaczony przy pomocy metody fotopletyzmo graficznej czas przejścia fali tętna przez duże naczynia, koreluje silnie z czasem przejścia fali tętna przez aortę [90]. Wskaźnik sztywności jest związany ze sztywnością dużych tętnic i może być wykorzystywany do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego. Oszacowana w taki sposób sztywność dużych

tętnic, może być jednym z ważniejszych czynników przepowiadających incydenty sercowo-naczyniowe.

Podczas prowadzonego przeze mnie badania, wszystkim badanym oszacowano przy pomocy fotopletyzmo grafu *Pulse Trace PCA 2* parametry: SI, RI oraz PPT. Nie znaleziono istotnych statystycznie różnic wartości powyższych parametrów między badanymi grupami. Należy podkreślić niewielką liczbę prac w dostępnym obecnie piśmiennictwie, które wykorzystują tą metodę. Pionierem jej zastosowania są Chowienzyk i wsp., którzy opublikowali największą liczbę publikacji z jej wykorzystaniem. Zajęli się przede wszystkim wykorzystaniem tej metody w ocenie pacjentów z cukrzycą typu 2. Wykazali oni zmniejszoną odpowiedź naczyń tętnicznych na albuterol, będącą wykładnikiem uszkodzenia funkcji śródbłonna u chorych z cukrzycą typu 2 w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych pacjentów [90]. Oshita i wsp. także wykazali przydatność fotopletyzmo graficznej oceny parametrów sztywności naczyniowej u chorych z upośledzoną tolerancją glukozy oraz u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [131]. Niektórzy autorzy kwestionują jednak przydatność tej metody. Bortolotto i wsp. ocenili falę tętna na opuszcze palca oraz zmierzili aortalną prędkość fali tętna u 524 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Zauważyli, że aortalna prędkość fali tętna ocenia lepiej od metody fotopletyzmo graficznej funkcje drzewa naczyniowego w powiązaniu z wiekiem, wartością ciśnienia tętniczego i obecnością zmian miażdżycowych [132].

W obecnie dostępnej literaturze nie znaleziono prac, w których oceniano sztywność naczyniową przy pomocy metody fotopletyzmo graficznej u chorych z hipercholesterolemią rodzinną czy też hiperlipidemią. Należy także pamiętać o ograniczeniach tej metody. W trakcie mojego badania zauważyłem trudności z uzyskaniem stabilnego zapisu fali tętna. Pomiar utrudniony był zwłaszcza u młodych kobiet z chłodnymi dystalnymi końcówkami palców, na które nakładano czujnik fotopletyzmo grafu.

Brak istotnych statystycznie różnic wśród parametrów sztywności naczyń oszacowanych przy pomocy fotopletyzmo grafu, w ocenianej przeze mnie grupach może świadczyć, że proces miażdżycowy u tych osób nie jest zaawansowany. Potwierdzać to może także brak różnic w przypadku oceny parametrów sztywności przy pomocy metody *e-Tracking*. Wynikać to może przede wszystkim ze stosunkowo młodego wieku badanych.

Dokonano analizy korelacji między uzyskanymi parametrami funkcji naczyń a wiekiem, wartościami lipidogramu, częstością rytmu serca, wartościami ciśnienia tętniczego, wzrostem, masą ciała, BMI i BSA. Podstawowym kryterium, na podstawie którego wysuwane jest podejrzenie obecności mutacji powodującej hipercholesterolemię rodzinną jest lipidogram. Analizując powyższe parametry, zaobserwowałem zaskakujące istotne dodatnie korelacje między FMD a maksymalnym zanotowanym w historii poziomem cholesterolu całkowitego w grupie pacjentów z FH (+), FH (-) oraz u wszystkich z wysokim poziomem cholesterolu. Nie stwierdziłem także korelacji między poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi a wartością FMD we wszystkich badanych grupach. Wyniki te wydają się pozostawać w sprzeczności z informacjami z badań epidemiologicznych, które jasno wskazują, że im wyższy poziom cholesterolu LDL w surowicy krwi, tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia epizodów sercowo-naczyniowych u pacjentów z FH i w populacji ogólnej. Należy także w tym miejscu przytoczyć wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez Masoura i wsp. [113]. Wykazali oni bowiem istotne ujemne korelacje między FMD a poziomem cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL w surowicy krwi, co również różni się z uzyskanymi przeze mnie wynikami. Masour i wsp. podkreślali jednak, że tak jednoznaczne wyniki nie zostały znalezione we wszystkich analizowanych przez ten zespół pracach. Zauważyli również, że nie wszyscy badacze są zgodni co do tego wniosku [133, 134, 135]. Należy się więc zastanowić, jaki byłby patomechanizm, który zaburzałby ujemne korelacje FMD-poziom cholesterolu w badanej przeze mnie grupie. Znaczenie odgrywać może tu czas trwania narażenia na wysoki poziom cholesterolu LDL w surowicy krwi, który może mieć w tym wypadku ważniejszą rolę w uszkodzeniu śródbłonna czy wzroście sztywności naczyń pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną od samej wartości wysokiego poziomu cholesterolu w surowicy krwi. Może też występować w tym wypadku mechanizm progowy, który miałby wywoływać korelacje ujemne tylko do pewnego poziomu cholesterolu, a powyżej tego progu pojawiałyby się zaburzenia tej korelacji. Analizując ten problem należy pamiętać, że osoby badane były w stosunkowo młodym wieku. Dodatkowo pacjenci z hipercholesterolemią przyjmowali przewlekłe statyny, których pozytywny wpływ na funkcję śródbłonna wykazano w wielu badaniach [111]. U wielu z nich pozostających pod opieką Poradni Hipercholesterolemii Rodzinnej maksymalizowano dawki tych leków, by osiągnąć

jak najbliższy zalecanemu poziom cholesterolu. Stąd czas narażenia naczyń na wysokie wartości cholesterolu mógł być u badanych pacjentów stosunkowo krótki. Prawdopodobne jest także, że przyjmowane w momencie badania leki, zwłaszcza statyny oraz inhibitory konwertazy, poprawiały na tyle funkcję śródbłonna, by zaburzyć korelacje między aktualnymi wartościami FMD a poziomem cholesterolu występującym w wywiadzie.

W badanej przeze mnie grupie nie znaleziono korelacji między wartościami FMD a wiekiem badanych oraz między wartościami FMD a poziomem trójglicerydów w surowicy krwi. Taki sam brak korelacji zaobserwował Masour i wsp. We wspomnianej już wcześniej metanalizie [113]. Interesujący może być fakt wystąpienia korelacji między wartością FMD a masą ciała i BMI u wszystkich badanych. W dostępnej obecnie literaturze nie znalazłem analiz zajmujących się tym problemem u chorych z hipercholesterolemią rodzinną, natomiast dostępne są prace analizujące ten fakt u pacjentów z chorobą wieńcową. Istotne ujemne korelacje poziomem FMD a masą ciała i BMI u chorych ze stabilną chorobą wieńcową wykazali Kirma i wsp. [136] oraz Miyazaki i wsp. [137].

Niewielka liczba prac dostępnych w literaturze, dotycząca nowych metod ultrasonograficznych i fotopletyzmo graficznych, powoduje trudności w jednoznacznej ocenie przydatności znalezionych przeze mnie zależności. W tym aspekcie bardzo interesująca wydaje się być wykonana przeze mnie analiza zależności między funkcją śródbłonna i parametrami sztywności naczyniowej. Kobayashi i wsp. wykazali w swej analizie istotne zależności między ocenianymi nieinwazyjnie parametrami zaawansowania procesu miażdżycowego: FMD, IMT, PWV [138]. Nie znalazłem w dostępnej literaturze prac oceniających zależność między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej ocenianymi przy pomocy metody *e-Tracking*. Natomiast w swojej pracy zaobserwowałem istotne dodatnie korelacje między wartościami FMD a AC oraz istotne ujemne korelacje między wartościami FMD a współczynnikiem β , Ep i PWV we wszystkich analizowanych grupach. Najsilniejsze korelacje występowały w grupie pacjentów z potwierdzoną w badaniu molekularnym mutacją genu powodującą hipercholesterolemię rodzinną. Uzyskany wynik może wskazywać na ważną interakcję między dysfunkcją śródbłonna i przebudową strukturalną naczynia. Siła korelacji między wartościami FMD a powyższymi parametrami może wskazywać na wysoką czułość metody *e-Tracking* w wykrywaniu

zmian sztywności naczyń. Co może świadczyć o potencjalnej przydatności tej metody do wczesnego wykrywania remodelingu naczyniowego. Zwraca uwagę brak korelacji między wartościami FMD a AI. Jednak w przeprowadzonym przeze mnie badaniu AI okazał się być parametrem o najniższej powtarzalności, dlatego należy być ostrożnym w analizie i interpretacji uzyskanych danych z udziałem tego parametru.

W dostępnej literaturze nie ma prac oceniających zależność parametrów uzyskanych przy pomocy fotopletyzmo grafu a funkcją śródbłonna ocenianą przy pomocy FMD. W swojej analizie zanotowałem, iż w badanej grupie nie ma istotnych korelacji między wartościami FMD a SI, RI i PPT. Brak korelacji między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej otrzymanymi przy pomocy metody fotopletyzmo graficznej może wynikać z tego, że metody te oceniają inne aspekty procesu miażdżycowego. Metoda fotopletyzmo graficzna może okazać się również metodą o małej czułości, co wynikać może z uwarunkowań technicznych wykonywanych pomiarów.

Porównałem także między sobą parametry sztywności naczyniowej uzyskane przy pomocy metody *e-Tracking* i fotopletyzmo grafu. Nie znalazłem istotnych korelacji między parametrami sztywności oszacowanymi przy pomocy obu metod. Skąd więc takie różnice między tymi dwoma metodami? Pamiętać należy że metoda fotopletyzmo graficzna i ultrasono graficzna nie są z sobą tożsame. Choć odzwierciedlać powinny te same zmiany powodujące wzrost sztywności naczyniowej, to powstają na różnych poziomach drzewa naczyniowego oraz są skutkiem różnych mechanizmów. Dlatego wydaje się, że brak jednoznacznej zależności między wykorzystanymi metodami oceny parametrów sztywności naczyniowej wskazuje na to, że badania te odzwierciedlają różne aspekty wczesnego rozwoju miażdżycy i dostarczają niezależnych od siebie informacji. Prawdopodobnie dopiero wykorzystanie kilku różnych metod może kompleksowo oceniać funkcję drzewa naczyniowego.

Głównym ograniczeniem mojej pracy może być niewielka liczebność badanych grup. Należy w tym miejscu podkreślić, że badanie miało charakter badania doświadczonego, natomiast nie miało na celu epidemiologicznej oceny problemu uszkodzenia funkcji śródbłonna czy też parametrów sztywności naczyniowej w badanych grupach. Niewielka liczba pacjentów zaproszonych do badania, wynika również z małej liczby chorych obciążonych hipercholesterolemią rodziną z potwierdzoną w badaniu molekularnym mutacją genu receptora LDL lub ApoB,

u których jeszcze nie doszło do powstania klinicznie jawnej choroby układu sercowo-naczyniowego. Spowodowane jest to przede wszystkim późną diagnostyką tych chorych, którzy trafiają niestety pod opiekę specjalisty dopiero po wystąpieniu epizodu sercowo-naczyniowego, jakim jest najczęściej w tej grupie pacjentów zawał mięśnia sercowego.

Mimo, że badanie rozszerzalności tętnicy ramiennej szeroko jest wykorzystywane w badaniach naukowych, a jego znaczenie w określaniu funkcji śródbłonna ugruntowane i poparte wieloma badaniami, nie jest ono generalnie zalecane do rutynowego wykorzystywania w praktyce klinicznej. Związane jest to z faktem, iż badanie powinno być wykonywane przez doświadczonych badaczy, aby uzyskać jak najbardziej powtarzalne wyniki. Do tego celu niezbędna jest standaryzacja pomiaru [139]. Niektórzy autorzy zajmujący się oceną FMD zalecają wykorzystanie w trakcie badania uchwytu, który utrzymywałby głowicę ultrasonograficzną w jednej pozycji, zapobiegając przez to uzyskiwaniu w trakcie badania odmiennych obrazów ultrasonograficznych. Podjąłem wraz z członkami Koła Kardiologicznego przy I Klinice Kardiologii próbę samodzielnego skonstruowania takiego uchwytu. Pierwsi badani w przeprowadzonych przeze mnie pomiarach próbnych, na których testowano wykorzystanie takiego stabilizatora, uskarżali się na niedogodności związane z utrzymywaniem go przez cały okres badania. Badani, poruszając kończyną, powodowali przesuwanie się uzyskanego obrazu, a przez to uzyskiwane początkowo wyniki stawały się niemiernodajne i niepowtarzalne. W związku z tym zrezygnowałem w trakcie realizacji tego projektu z użycia takiego stabilizatora. Wydaje się, że decyzja taka była słuszna. Wskazuje na to wysoka powtarzalność większości uzyskiwanych parametrów, jaką otrzymałem w trakcie całego badania. Podałem analizie porównawczej wartości średnicy tętnicy zanotowane w skurczu i rozkurczu naczynia przed wykonaniem badania wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem oraz po 10 minutowym odpoczynku po zakończeniu badania, tuż przed przeprowadzeniem badania wazodylatacji indukowanej egzogenną nitrogliceryną. Nie zaobserwowałem istotnych różnic średnicy naczynia w skurczu oraz rozkurczu mięśnia sercowego jednakowo przed FMD i przed EID. Zanotowałem istotne i silne korelacje między uzyskaną średnią średnicą naczynia przed FMD i przed EID. Nie znalazłem również istotnych statystycznie różnic między współczynnikami β , AC, PWV- β , Ep, AI przed FMD i przed EID, wykazując

jednocześnie istotne statystycznie korelacje między β , AC, PWV- β , Ep przed FMD i przed EID. Jedynym parametrem, u którego nie wykazałem korelacji przed FMD i przed EID był wspomniany już wcześniej AI. Wyniki tych analiz jednoznacznie wskazują na osiągnięcie przeze mnie wysokiej powtarzalności większości badanych parametrów, z wyjątkiem AI, w trakcie realizacji niniejszego projektu.

Zanotowałem silne dodatnie korelacje między współczynnikiem β i Ep ($r=0.99$, $p<0.001$), współczynnikiem β i PWV- β ($r=0.97$, $p<0.001$) oraz między Ep i PWV- β ($r=0.98$, $p<0.001$). Zaobserwowałem również ujemne korelacje między współczynnikiem β i AC ($r=-0.70$, $p<0.001$), Ep i AC ($r=-0.68$, $p<0.05$), a także PWV- β i AC ($r=-0.77$, $p<0.001$). Nie zanotowałem natomiast korelacji między powyższymi parametrami a AI. Dlatego, tak jak już wspomniałem wcześniej, AI jako parametr o niskiej powtarzalności powinien być ostrożniej brany pod uwagę w analizie i interpretacji uzyskanych wyników.

Mimo sygnalizowanych wcześniej trudności z uzyskaniem stabilnego obrazu wykresu fali tętna u badanych przeze mnie z niską temperaturą dystalnych części palca, zaobserwowałem także dość dobrą powtarzalność metody fotopletyzmoğraficznej. Badanie oceniające powtarzalność metody fotopletyzmoğraficznej przeprowadziłem w grupie pacjentów poddawanych planowej koronarografii w I Katedrze i Klinice Kardiologii GUMed, u których także w trakcie pomiarów zaobserwowałem podobne problemy z uzyskaniem stabilnego obrazu fali tętna. Porównując uzyskane podczas trzykrotnych pomiarów parametry sztywności naczyniowej otrzymane przy pomocy metody fotopletyzmoğraficznej, nie znalazłem istotnych różnic wartości parametrów SI i RI uzyskanych podczas poszczególnych pomiarów. Zanotowałem także istotne dodatnie korelacje między poszczególnymi pomiarami. Jedyną istotną różnicę zaobserwowałem między pomiarem 1 i pomiarem 3 czasu PPT (224.8 ± 53.8 ms vs 195.6 ± 44.9 ms, $p<0.05$).

VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

- Nie stwierdza się istotnych różnic wartości FMD oraz parametrów sztywności naczyniowej między pacjentami z hipercholesterolemią rodzinną i osobami z wysokim poziomem cholesterolu LDL bez mutacji genu odpowiedzialnej za FH bez jawnej choroby układu sercowo- naczyniowego w wywiadzie.
- Obniżone wartości FMD u osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL z i bez mutacji potwierdzającej FH spowodowane jest dysfunkcją śródbłonna. Sugeruje to prawidłowa wazodylatacja tętnicy ramiennej pod wpływem egzogennie podanej nitrogliceryny we wszystkich porównywanych grupach. Ocena FMD może być użyte do wczesnego wykrywania procesu miażdżycowego w postaci dysfunkcji śródbłonna u pacjentów z hipercholesterolemią bez chorób sercowo- naczyniowych w wywiadzie.
- Brak istotnych statystycznie różnic wartości parametrów sztywności naczyń oraz EID w badanych grupach może świadczyć, że proces miażdżycowy u osób z hipercholesterolemią nie jest zaawansowany i dotyczy tylko dysfunkcji śródbłonna.
- Istotne korelacje między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej mierzonymi przy pomocy metody *e-Tracking* występowały we wszystkich badanych grupach. Zależności te mogą wskazywać na interakcje między dysfunkcją śródbłonna i przebudową strukturalną naczyń tętniczych.
- Brak istotnych korelacji między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej otrzymanymi przy pomocy metody fotopletyzmoğraficznej może wynikać z tego, że metody te oceniają inne aspekty procesu miażdżycowego. Metoda fotopletyzmoğraficzna może też być się metodą o niskiej czułości.

- Brak istotnych korelacji między parametrami sztywności oszacowanymi przy pomocy metody *e-Tracking* i metody fotopletyzmoграфicznej może sugerować, że testy te odzwierciedlają różne aspekty wczesnego rozwoju miażdżycy i dostarczają niezależnych od siebie informacji.
- Najsilniejsze korelacje między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej ocenianymi metodą *e-Tracking* zaobserwowano u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną, dlatego nowe ultrasonograficzne metody oceny parametrów sztywności naczyń i dysfunkcji śródbłónka mogą być przydatne do wczesnego wykrywania remodelingu naczyniowego w tej grupie chorych.
- Brak istotnych różnic wartości FMD oraz parametrów sztywności naczyniowej między leczonymi pacjentami z hipercholesterolemią rodzinną i osobami z wysokim poziomem cholesterolu LDL bez mutacji genu odpowiedzialnej za FH może wskazywać, że obecność mutacji nie jest głównym czynnikiem determinującym wystąpienie dysfunkcji śródbłónka i przebudowy strukturalnej naczyń tętniczych w badanej grupie.

VII. STRESZCZENIE

Wstęp:

Podłożem choroby niedokrwiennej serca jest miażdżyca uwarunkowana często wysokim poziomem cholesterolu. Grupą pacjentów szczególnie narażonych na jej rozwój są osoby z hipercholesterolemią rodzinną. U tych chorych proces miażdżycowy jest znacznie przyspieszony, co często powoduje przedwczesną chorobę niedokrwinną serca. Wykrycie wczesnych objawów zaburzeń funkcji naczyń i wdrożenie wczesnej prewencji może pozwolić szybciej zapobiegać wystąpieniu ostrych incydentów sercowo-naczyniowych. Pomocne mogą okazać się tu nowe nieinwazyjne metody oceny funkcji śródbłonna i parametrów naczyniowych. Wczesne zaburzenia funkcji śródbłonna można zmierzyć za pomocą oceny wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem (FMD). Postępujący proces miażdżycowy prowadzi do zmian strukturalnych i funkcjonalnych ściany naczynia, a przez to do zwiększenia sztywności naczyniowej. Zmiany te można we wczesnym okresie ocenić przy pomocy ultrasonograficznych i pletyzmograficznych parametrów oceniających sztywność i podatność naczyń tętnicznych.

Cel pracy:

Celem pracy było porównanie parametrów naczyniowych i funkcji śródbłonna u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną z wynikami otrzymanymi u osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL, bez mutacji powodującej hipercholesterolemię rodzinną i z grupą kontrolną zdrowych ochotników z poziomem cholesterolu LDL niższym niż 130 mg%. Na podstawie uzyskanych wyników oszacowana zostanie przydatność nowych metod oceny dysfunkcji naczyń u chorych z genetycznie potwierdzoną hipercholesterolemią rodzinną.

Material i metody:

Badaniem objęta została grupa 60 osób bez jawnej klinicznie choroby sercowo-naczyniowej: 20 pacjentów z wysokim poziomem LDL cholesterolu i potwierdzoną w badaniach molekularnych wykonanych przez Katedrę Biologii i Genetyki GUMed hipercholesterolemią rodzinną (mutacja genu receptora LDL lub ApoB) pozostających pod opieką Poradni Hipercholesterolemii Rodzinnej przy I Klinice i Katedrze

Kardiologii GUMed, 20 osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL bez mutacji powodujących hipercholesterolemię rodzinną oraz 20 zdrowych ochotników z poziomem cholesterolu LDL niższym niż 130 mg%. Przy pomocy aparatu ultrasonograficznego *Aloka SSD- Alpha 10- Miro* każdemu pacjentowi wykonane zostało zależne od funkcji śródbłonna badanie rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem niedokrwienia (FMD) i niezależne od funkcji śródbłonna badanie rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem nitrogliceryny (EID). Metodą *e-Tracking* szacowane zostały parametry sztywności naczyniowej: wskaźnik sztywności naczyniowej (β), wskaźnik elastyczności naczyń epsilon (Ep), wskaźnik podatności naczyń (AC) i lokalna jednopunktowa szybkość fali tętna (PWV). Analiza fali tętna przeprowadzona została przy pomocy aparatu *Pulse Trace 2* firmy *Micro Medical*. Metodą fotopletyzmograficzną oszacowane zostały ponadto parametry sztywności naczyniowej: wskaźnik sztywności (SI), wskaźnik odbicia (RI) oraz czas przejścia fali tętna przez duże naczynia (PPT). Analiza statystyczna przeprowadzona została przy pomocy oprogramowania *Statistica 9.1* firmy *StatSoft*.

Wyniki

Wartości FMD były istotnie statystycznie niższe u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną i u wszystkich pacjentów z podwyższonym poziomem cholesterolu LDL w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej ($10.5 \pm 9.6\%$ vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p < 0.001$; 12.5 ± 10 vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p < 0.001$). Nie znaleziono istotnych różnic w zakresie wartości FMD między pozostałymi grupami. Wazodylatacja tętnicy ramiennej pod wpływem endogennie podanej nitrogliceryny była porównywalna we wszystkich badanych grupach. Nie znaleziono również różnic wartości parametrów sztywności naczyniowej ocenianych metodą *e-Tracking* oraz metodą fotopletyzmograficzną. Stwierdzono istotne statystycznie dodatnie korelacje między FMD i AC oraz istotne ujemne korelacje między FMD a współczynnikiem β , Ep i PWV we wszystkich analizowanych grupach. Najsilniejsze korelacje występowały w grupie pacjentów z potwierdzoną w badaniu molekularnym mutacją genu powodującą hipercholesterolemię rodzinną. Nie stwierdzono istotnych korelacji między FMD a parametrami sztywności naczyniowej oszacowanymi przy pomocy fotopletyzmo grafu. Nie stwierdzono istotnych korelacji między parametrami sztywności oszacowanymi przy pomocy metody *e-Tracking* i metody fotopletyzmograficznej.

Podsumowanie

Nie stwierdza się istotnych różnic wartości FMD oraz parametrów sztywności naczyniowej między pacjentami z hipercholesterolemią rodzinną i osobami z wysokim poziomem cholesterolu LDL bez mutacji genu odpowiedzialnej za FH bez jawnej choroby układu sercowo- naczyniowego w wywiadzie. Obniżone wartości FMD u osób z wysokim poziomem cholesterolu LDL z i bez mutacji potwierdzającej FH spowodowane jest dysfunkcją śródbłonna. Sugeruje to prawidłowa wazodylatacja tętnicy ramiennej pod wpływem egzogennie podanej nitrogliceryny we wszystkich porównywanych grupach. Ocena FMD może być użyta do wczesnego wykrywania procesu miażdżycowego w postaci dysfunkcji śródbłonna u pacjentów z hipercholesterolemią bez chorób sercowo-naczyniowych w wywiadzie. Brak istotnych statystycznie różnic parametrów sztywności naczyń oraz EID w badanych grupach może świadczyć, że proces miażdżycowy u osób z hipercholesterolemią nie jest zaawansowany i dotyczy tylko dysfunkcji śródbłonna. Istotne korelacje między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej mierzonymi przy pomocy metody *e-Tracking* występowały we wszystkich badanych grupach. Zależności te mogą wskazywać na interakcje między dysfunkcją śródbłonna i przebudową strukturalną naczyń tętniczych. Brak istotnych korelacji między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej otrzymanymi przy pomocy metody fotopletyzmoграфicznej może wynikać z tego, że metody te oceniają inne aspekty procesu miażdżycowego. Brak istotnych korelacji między parametrami sztywności oszacowanymi przy pomocy metody *e-Tracking* i metody fotopletyzmoграфicznej może sugerować, że testy te odzwierciedlają różne aspekty wczesnego rozwoju miażdżycy i dostarczają niezależnych od siebie informacji. Najsilniejsze korelacje między wartościami FMD a parametrami sztywności naczyniowej ocenianymi metodą *e-Tracking* zaobserwowano u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną, dlatego nowe ultrasonoграфiczne metody oceny parametrów sztywności naczyń i dysfunkcji śródbłonna mogą być przydatne do wczesnego wykrywania remodelingu naczyniowego w tej grupie chorych. Brak istotnych różnic wartości FMD oraz parametrów sztywności naczyniowej między leczonymi pacjentami z hipercholesterolemią rodzinną i osobami z wysokim poziomem cholesterolu LDL bez mutacji genu odpowiedzialnej za FH może wskazywać, że obecność mutacji nie jest głównym czynnikiem determinującym wystąpienie dysfunkcji śródbłonna i przebudowy strukturalnej naczyń tętniczych w badanej grupie.

Purpose

Vascular endothelial dysfunction is one of the first markers of atherosclerotic process. The purpose of this study was to assess the potential associations between endothelial function assessed by flow-mediated dilation (FMD) in the brachial artery and arterial stiffness parameters, and hypercholesterolemia in subjects with genetically confirmed familial and non-familial hypercholesterolemia.

Methods

We studied endothelial function and arterial stiffness in 60 subjects (mean age 41.9 ± 7.7 years): in 20 patients with elevated low-density lipoprotein (LDL) cholesterol plasma levels and genetically confirmed familial hypercholesterolemia (FH), in 20 patients with elevated LDL and without mutations causing FH and in 20 healthy controls with normal LDL values. There were 10 men and 10 women in all groups. All study subjects were without previous cardiovascular events and had no clinical symptoms of significant cardiovascular diseases. Mean age was 41.9 ± 7.7 years. High-resolution ultrasound was used to determine flow-mediated dilation in the brachial artery after 5 minutes arterial occlusion and nitroglycerin-induced dilatation. New noninvasive echo-tracking methods (Aloka SSD- Alpha 10- Miro) was used for assessment of the arterial stiffness parameters: beta stiffness parameter (β), epsilon (ϵ), arterial compliance (AC) and one point pulse-wave velocity (PWV). Photoplethysmography technique (Pulse Trace 2, Micro Medical) was used to measure Digit Volume Pulse waveform parameters: stiffness index (SI), reflection index (RI).

Results

Baseline brachial artery diameters were the same across the three study groups. FMD was significantly lower in patients with FH and in all patients with elevated LDL compared with controls ($10.5 \pm 9.6\%$ vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p < 0.001$; 12.5 ± 10 vs $21.0 \pm 14.3\%$, $p < 0.001$). Nitroglycerin-induced dilatation did not differ between all groups. There were no differences in arterial stiffness parameters in all groups either. Significant positive correlation between FMD and AC and significant negative correlations between FMD and β , ϵ and PWV were noted. There were no significant correlations between echo-tracking arterial stiffness parameters and parameters measured with used photoplethysmography.

Conclusions

Preserved nitroglycerin caused dilatation in all subjects suggest that reduced FMD in FH patients is due to endothelial dysfunction. No significant differences in arterial stiffness parameters show that process of atherosclerosis is not advanced in patients with elevated LDL. FMD can be used for early detection of endothelial dysfunction preceding atherosclerotic process in patients with familial hypercholesterolemia without significant cardiovascular disease. There are significant correlations between novel ultrasonographically assessed arterial stiffness parameters and endothelial dysfunction which can be used for early detection of functional and structural arterial remodeling in patients with hypercholesterolemia. Relationship between echo-tracking parameters and FMD reflects interactions between endothelial dysfunction and arterial stiffness.

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Dawber T, Meadors G, Moore F. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health* 1951; 41(3):279-286
2. Goldstein J, Hobbs H, Brown M. Familial hypercholesterolemia. W: Scriver C, Beaudet A, Sly W i wsp.. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill 2001; 120: 2863-2913
3. Brown M, Goldstein J. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47
4. Defesche J. World Health Organization report on familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2001; 154: 242
5. Marais D. Familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem Rev* 2004; 25: 49-68
6. Defesche J. Low density lipoprotein receptor- its structure, function and mutations. *Semin Vasc Med* 2004; 4: 5-11
7. Schmidt R, Beyer T, Bench W i wsp.. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 13: 634-640
8. Chmara M. Mutacje genów LDRL i APOB w hipercholesterolemii rodzinnej. Praca doktorska. Akademia Medyczna Gdańsk 2005
9. Hill J, Hayden M, Frohlich J i wsp.. Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 290-297
10. Defesche J. Familial hypercholesterolemia. W: Betteridge J i wsp.. *Lipids and vascular disease*. London: Martin Dunitz 2000; 6: 65-76
11. Hopkins P, Stephenson S, Wu L i wsp.. Evaluation of coronary risk factors in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2001; 87: 547-553
12. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004; 173: 55-68
13. Scientific steering Committee on behalf of the Simon Broome register Group. Risk of fatal coronary disease in familial hypercholesterolemia. *BMJ* 1991; 303: 893-896

14. Smiesko V, Kozik J, Dolezel S. Role of endothelium in the control of arterial diameter by blood flow. *Blood Vessels* 1985; 22: 247-251
15. Pohl U, Holtz J i wsp.. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986; 8: 37-44
16. Schechter A, Gladwin M. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med* 2003; 34: 1483-1485
17. Ross R. Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–128
18. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801–809
19. Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 28: 373-376
20. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113: 1708–1714
21. Corson M, James N, Latta S i wsp.. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984–999
22. Govers R, Rabelink T. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: 193–206
23. Sanguinetti S, Batthyany C i wsp.. Nitric oxide inhibits prooxidant actions of uric acid on copper-mediated LDL oxidation. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 302-308
24. Moncada S, Higgs E, Vane J. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* 1977; 1: 18–20
25. Halcox J, Narayanan S, Cramer-Joyce L i wsp.. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 2470–2477
26. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M i wsp.. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2001; 104: 1111–1114
27. Saye J, Singer H, Peach M. Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension* 1984; 6: 216–221

28. Stamler J, Lamas S, Fang F. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001; 106: 675–683
29. Wnuczko K, Szczepański M, Śródbłonek- charakterystyka i funkcje. *Pol Merk Lek* 2007; 133: 60-65
30. Gimbrone M. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1–5
31. Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685–1690
32. Rhee S. Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006; 312: 1882–1888
33. Celermajer D, Sorensen K, Bull C i wsp.. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1468–1474
34. Mallat Z, Benamer H, Hugel B i wsp.. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101: 841–843
35. Rajagopalan S, Somers E, Brook R i wsp.. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood* 2004; 103: 3677–3683
36. den Buijs J, Musters M, Verrips T i wsp.. Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing and telomere shortening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: 2651–2658
37. Asahara T, Murohara T, Sullivan A i wsp. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967
38. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C i wsp.. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9: 1370–1376
39. Laufs U, Werner N, Link A i wsp.. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 20: 109: 220–226

40. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K i wsp.. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885–2890
41. Walter D, Rittig K, Bahlmann F i wsp.. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105: 3017–3024
42. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. W: Braunwald E. *Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 2001; 995-1009
43. Dawber T, Kannel W. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation* 1966; 34: 553-555
44. Kathiresan S, Larson M i wsp.. Assessment by cardiovascular magnetic resonance, electron beam computed tomography and carotid ultrasonography of the distribution of subclinical atherosclerosis across Framingham risk strata. *Am J Cardiol* 2007; 99: 310-314
45. Deanfield J, Donald A, Ferri C i wsp.. Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part I. Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23: 7–17
46. Celermajer D, Sorensen K i wsp.. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340 :1111–1115
47. Sorensen K, Celermajer D i wsp.. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 199; 74: 247–253
48. Deanfield J, Halcox J, Rabelink T. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007; 115:1285-1295
49. Naka K, Tweddel A, Doshi S i wsp.. Flow-mediated changes in pulse wave velocity: a new clinical measure of endothelial function. *Eur Heart J* 2006; 27: 302–309
50. Bonetti P, Pumper G, Higano S i wsp.. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 2137–2141

51. Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager M i wsp.. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* 2006; 101: 545–548
52. Donald A, Charakida M i wsp.. Non-invasive assessment of endothelial function: which technique? *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1846-1850
53. Leeson C, Robinson M. Cardiovascular magnetic resonance imaging for non-invasive assessment of vascular function: validation against ultrasound. *J Cardiovasc Magn Reson* 2006; 8: 381-387
54. Avest E, Stalenhoef A, Graaf J. Non-invasive measurement in individual cardiovascular disease risk prediction. *Clinical Science* 2007; 112: 507-516
55. Sankatsing R, de Groot E i wsp.. Surrogate markers for atherosclerotic disease. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 434-441
56. Brunner H, Cockcroft J, Deanfield J i wsp.. Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and disease. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial factors of The European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23: 233-246
57. Davies J, Struthers A. Pulse wave analysis and pulse wave velocity: a critical review of their strengths and weaknesses. *J Hypertens* 2003; 21: 463-472
58. Simon A, Gariépy J, Chironi G i wsp.. Intima media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertens* 2002; 20: 159-169
59. Gąsior Z, Mizia- Stec K, Mizia M. Grubość kompleksu infima- media. W: *Podręcznik Polskiego Forum Profilaktyki. Med Prakt*; 1: 353-361
60. Anderson E, Mark A. Flow Mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. *Circulation* 1989; 79: 93-100
61. Cooke J, Rossitch E i wsp. . Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88: 1663–1671
62. Miura H, Wachtel R i wsp.. Flow-induced dilation of human coronary arterioles: important role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Circulation* 2001; 103: 1992–1998
63. Olesen S, Clapham D. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in endothelial cells. *Nature* 1988; 331: 168–170
64. Joannides R, Haefeli H i wsp.. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91: 1314–1319

65. Corson M, James N i wsp.. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984–991
66. Dimmeler S, Fleming I i wsp.. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601–605
67. Neubauer- Geryk J, Bieniaszewski L. Metody oceny funkcji śródbłonna. Wazodylatacja tętnicy ramiennej po niedokrwieniu. *Choroby Serca i Naczyń* 2007; 4: 190-196
68. Berry K, Skyrme-Jones R, Meredith I. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci* 2000; 99: 261-267
69. Peretz A, Leotta D i wsp.. Flow mediated dilation of the brachial artery: an investigation of methods requiring further standardization. *BMC Cardiovasc Disord* 2007; 7: 11
70. Levine G, Frei B i wsp.. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 93: 1107–1113
71. Vogel R, Corretti M i wsp.. A comparison of the assessment of flow-mediated brachial artery vasodilation using upper versus lower arm arterial occlusion in subjects with and without coronary risk factors. *Clin Cardiol* 2000; 23: 571–575
72. Stadler R, Taylor J i wsp.. Comparison of B-mode, M-mode and echo-tracking methods for measurement of the arterial distension waveform. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23: 879–887
73. Uehata A, Lieberman E i wsp.. Noninvasive assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery. *Vasc Med* 1997; 2: 87–92
74. Corretti M, Plotnick G i wsp.. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol* 1995; 268: 1397–1404
75. Corretti M, Anderson T, Benjamin E i wsp.. Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial Dependent Flow Mediated Vasodilatation of the Brachial Artery. A Report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-265
76. Ducharme A., Dupuis J., et al. Comparison of nitroglycerin lingual spray and sublingual tablet on time of onset and duration of brachial artery vasodilation in normal subjects. *Am J Cardiol* 1999; 84: 952–954 A8

77. Westfal B, Kasprzak J. Zastosowanie kliniczne oceny funkcji śródbłonna i grubości kompleksu błona środkowa- błona wewnętrzna tętnic szyjnych. *Kardiologia Polska* 2005; 63: 685-692
78. Clarkson P, Celermayer D, Powe A i wsp.. Endothelium dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation* 1997; 96: 3378-3383
79. Safar M. *Arterial stiffness in hypertension*. Elsevier 2006.
80. Kopeć G, Podolec M, Dziedzic H i wsp.. Koncepcja sztywności tętnic w prewencji chorób sercowo-naczyniowych. W: Podolec P: *Podręcznik Polskiego Forum Profilaktyki*. *Med Praktyka* 2010; 2: 95-99
81. Laurent S, Cockcroft J i wsp.. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical application. *Eur Heart J* 2006; 27: 2588-2605
82. Mackenzie I, Wilkinson I, Cockcroft J. Assessment of arterial stiffness in clinical practice. *Quebec Journal of Medicine* 2002; 95: 67-74
83. Izzo J. Arterial Stiffness: Clinical relevance, measurement, and treatment. *Rev Cardiovasc Med* 2001; 2: 29-40
84. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R i wsp.. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 37: 1236-1241
85. Hayward C, Kraidly M, Webb C i wsp.. Assessment of endothelial function using peripheral waveform analysis: a clinical application. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 521–528
86. Wilkinson I, Hall I, MacCallum H i wsp.. Pulse-wave analysis: clinical evaluation of a noninvasive, widely applicable method for assessing endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 147–152
87. Asmar R, Benetos A, Topouchian J i wsp.. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995; 26: 485-490
88. Oliver J, Webb J. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 554-566
89. Jaroch J, Łoboz-Grudzień K i wsp. Echo tracking i wave intensity- nowe, nieinwazyjne metody w ocenie funkcji naczyń. *Pol Przegl Kardio* 2008; 10: 137-143

90. Chowieńczyk P, Kelly R, MacCailum H i wsp.. Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection. Blunted response to endothelium-dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 2007-2014
91. Millaseau S, Kelly R, Ritter M i wsp.. Determination of age-related increases in large artery stiffness by digital pulse contour analysis. *Clinical Science* 2002; 103: 371-377
92. Millaseau S, Guigui F, Kelly R i wsp.. Non-invasive assessment of the digital volume pulse: comparison with the peripheral pressure pulse. *Hypertension* 2000; 36: 952-956
93. Skournas I, Massoura C, Pitsavos C i wsp.. Evidence that non-lipid cardiovascular risk factors are associated with high prevalence of coronary artery disease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia or familial combined hyperlipidemia. *Int J Cardiol* 2007; 121: 178-183
94. Halcox J, Schenke W i wsp.. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 653-658
95. Kullo I, Malik A. Arterial ultrasonography and tonometry as adjuncts to cardiovascular risk stratification. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1413-1426
96. Shimbo D, Grahame-Clarke C i wsp.. The association between endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in a population-based multi-ethnic cohort. *Atherosclerosis* 2007; 192: 197-203
97. Takase B, Uehata A, Akima T i wsp.. Endothelium dependent flow mediated vasodilatation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 82: 1535-1539
98. Hashimoto M, Kozaki K, Eto M i wsp.. Association of coronary risk factors and endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. *Hypertens Res* 2000; 23: 233-238
99. Lerman A, Zeiher A. Endothelial function. Cardiac events. *Circulation* 2005; 111: 363-368.
100. Witte D, Westerink J, de Koning E i wsp.. Is the Association Between Flow-Mediated Dilatation and Cardiovascular Risk Limited to Low-Risk Populations? *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1987-1993

101. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C i wsp.. Effects of acute cigarette smoking on endothelium dependent arterial dilatation in normal subjects. *Am J Cardiol* 1998; 81: 1225-1228
102. Jounala M, Viikari J, Ronnema T i wsp.. Elevated blood pressure in adolescent boys predicts endothelial dysfunction: the cardiovascular risk in young Finns study. *Hypertension* 2006; 48: 424-430
103. Jongh S, Lilien M, Bakker H. Familial history of cardiovascular events and endothelial dysfunction in children with familial hipercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2002; 163: 193-197
104. Lupatelli G, Marchesi S, Roscini A i wsp.. Direct association between high density lipoprotein cholesterol and endothelial function in hyperlipidemia. *Am J Cardiol* 2002; 90: 648-650
105. Neunteufl G, Katzenschlager R, Hassan A i wsp.. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997; 129: 111–118
106. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K i wsp.. Flow-mediated, endothelium-dependent dilatation of the brachial arteries is impaired in patients with coronary spastic angina. *Am Heart J* 1997; 133: 263–267
107. Yu H, Sheu W, Lai C i wsp.. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus subjects with peripheral artery disease. *Int J Cardiol* 2001; 78: 19–25
108. Brevetti G, Martone V, de Cristofaro T i wsp.. High levels of adhesion molecules are associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with peripheral arterial disease. *Thromb Haemost* 2001; 85: 63–66
109. Gökce N, Keaney J, Hunter L i wsp.. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 2002; 105: 1567–1572
110. Woo K, Chook P, Yu C i wsp.. Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children. *Circulation* 2004; 109: 1981–1986
111. Puddu P, Puddu G, Muscari A. HMG-CoA reductase inhibitors: is the endothelium the main target? *Cardiology* 2001; 95: 9-13
112. Tamai O, Matsuoka H, Itebe H i wsp.. Single LDL- apheresis improves endothelium dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997; 95: 76-82

113. Masoura C, Pitsavos C, Aznaouridis K i wsp.. Arterial endothelial funkcion and wall thickness in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia and the effects of statins. A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 2011; 214: 129-138
114. Fathi R, Haluska B, Isbel N i wsp.. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 616-623
115. Schroeder S, Enderle M, Ossen R i wsp.. Noninvasive determination of endothelium- mediated vasodilatation as a screening test for coronary artery disease: Pilot study to assess predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography and myocardial perfusion imaging. *A Heart J* 1999; 138: 731-739
116. Teregawa H, Kato M, Kurokawa J i wsp.. Usefulness of flow-mediated dilation of the brachial artery and/ or the intima-media thickness of the carotid artery in predicting coronary narrowing in patients suspected of having coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2001; 88: 1147- 1151
117. Jambrik Z, Venneri L, Varga A i wsp.. Peripheral vascular endothelial function testing for the diagnosis of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 148: 684-689
118. Kopeć G, Podolec P, Cwynar M i wsp.. The role of early markers of atherosclerosis in prediction of critical coronary artery stenosis. *J Hypertens* 2006
119. Chan S, Mancini G, Kuramoto L i wsp.. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1037-1043
120. Benjamin E, Larson M, Keyes M i wsp.. Clinical Correlates and Heritability of Flow Mediated Dilation in the Community. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2004; 109: 613-619
121. Zhang X, Zhao S, Li X i wsp.. Endothelium dependent and independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 149: 19-24
122. Raitakari O, Seale J, Celermayer D. Impaired vascular responses to nitroglycerin in subjects with coronary arterosclerosis. *Am J Cardiol* 2001; 87: 217-219
123. Adams M, Robinson J, McCredie R i wsp.. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 123-127
124. O'Rourke M, Nichols W, Safar M. Pulse waveform analisis and arterial stiffness: realism can replace evangelism and scepticism. *J Hypertens* 2004; 22: 1633-1634

125. Roman M, Saba P, Pini R i wsp.. Parallel cardiac and vascular adaptation in hypertension. *Circulation* 1992; 86: 1909-1919
126. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L i wsp.. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006; 27: 2588-2605
127. Avgeropoulou C, Illmann A, Schum-Draeger P i wsp.. Assessment of arterioventricular coupling by tissue Doppler and wave intensity in type 2 diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2006; 6: 271- 278
128. Jaroch J, Łoboz-Grudzień K, Kowalska A i wsp.. e-Tracking of carotid arteries as a new tool in the evaluation of early functional vascular remodeling. *Eur J Echokardiography Abstract Suppl* 2006; 7: 119
129. Fan Y, Luo Y, Jia Y i wsp.. Quantitative evaluation of carotid elasticity in normal adults by ET technique. *Journal of biomedical engineering* 2008; 25: 1098-1100
130. Takazawa K, Tanaka N, Fujita M i wsp.. Assessment of vasoactive agents and vascular aging by the second derivative of photoplethysmogram waveform. *Hypertension* 1998; 32: 365-370
131. Ohshita K, Yamane K, Ishida K i wsp.. Post-challenge hyperglycaemia is an independent risk factor for arterial stiffness in Japanese men. *Diab Med* 2004; 21: 636–639
132. Bortolotto L, Blacher J, Kondo T i wsp.. Assessment of vascular aging and atherosclerosis in hypertensive subjects: second derivative of photoplethysmogram versus pulse wave velocity. *Am J Hypertens* 2000; 13: 165-171
133. Hoffmann U, Dirisamer A, Haher S i wsp.. Relation of peripheral flow mediated vasodilatation and coronary arterial calcium in young patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2002; 90: 70-73
134. Karasek D, Vaverkova H, Halenka M i wsp.. Brachial endothelial function in subjects with familial combined hyperlipidemia and its relationships to carotid artery intima-media thickness. *Int Angiol* 2006; 25: 418-426
135. Ter Avest E, Holewijn S, van Tits L i wsp.. Endothelial function in familial combined hyperlipidemia. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 381-389
136. Kirma C, Akcakoyun M, Esen A i wsp.. Relationship between endothelial function and coronary risk factors in patients with stable coronary artery disease. *Circ J* 2007; 71: 698-702

137. Miyazaki S, Hiasa Y, Takahashi T i wsp.. Waist circumference reduction is more strongly correlated with the improvement in endothelial function after acute coronary syndrome than body mass index reduction. *J Cardiol* 2010; 55: 266-273
138. Kobayashi K, Akishita M, Yu W i wsp.. Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis: flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis* 2004; 173: 13-18
139. Roman M, Naqvi T, Gardin J i wsp.. Clinical Application of Noninvasive Vascular Ultrasound in cardiovascular Risk Stratification: A Report from the American Society of Echokardiography and the Society of Vascular Medicine and Biology. *J Am Soc Echocardiogr* 2006; 19: 943-954

IX. ANEKSY

Aneks 1

Informacja o badaniu:

Nieinwazyjna ocena parametrów naczyniowych i funkcji śródbłónka u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną

i świadoma zgoda na badanie.

Imię i nazwisko chorego:.....

PESEL:.....

Adres:.....

Telefon:.....

Hipercholesterolemia rodzinna jest genetycznie uwarunkowanym schorzeniem powodującym podwyższony poziom cholesterolu w surowicy krwi. Predysponuje ona do wczesnego wystąpienia miażdżycy, a w szczególności choroby wieńcowej. Z tej przyczyny w ostatnich latach coraz większą rolę odgrywają nieinwazyjne testy wczesnych stanów miażdżycy oparte na technice ultrasonograficznej. Należą do nich ocena zależnej od przepływu rozszerzalności tętnicy ramiennej, ocena subklinicznej miażdżycy na podstawie grubości kompleksu błona wewnętrzna- błona środkowa tętnicy szyjnej oraz wskaźnik sztywności naczyń i wskaźnik odbicia mierzone przy pomocy czujnika pletyzmofotograficznego.

Badanie ma na celu ocenę parametrów naczyniowych i funkcji śródbłónka u chorych na hipercholesterolemię rodzinną nie obciążonych jeszcze chorobą wieńcową, a następnie porównanie tychże parametrów z grupą kontrolną pacjentów bez obciążenia hipercholesterolemią rodzinną.

Badanie jednego pacjenta trwa około 2 godzin. W jego skład wchodzi: ocena echokardiograficzna grubości kompleksu błona wewnętrzna- błona środkowa tętnicy szyjnej, ocena rozszerzalności tętnicy ramiennej, ocena wskaźników naczyniowych mierzonych przy pomocy nakładanego na palec czujnika pletyzmofotograficznego. W trakcie całego badania pacjent będzie ściśle monitorowany przez lekarza.

Badanie wiąże się z pewnymi niedogodnościami i ryzykiem dla pacjenta. W trakcie badania niezbędne jest zamknięcie przepływu krwi do kończyny górnej, poprzez napompowanie na czas 5 minut mankietu ciśnieniomierza. Może to spowodować zaburzenia ucieplenia, uczucia oraz dolegliwości bólowe w badanej kończynie. Niedokrwienie to jest odwracalne i nie powinno przynieść negatywnych dla zdrowia

następstw. Badany otrzyma także 0,4 mg nitrogliceryny pod język oraz salbutamol w dawce 0,4mg. Niekiedy po zażyciu nitrogliceryny występują: zaczerwienienie skóry, zawroty i bóle głowy, nudności i wymioty, odczyny alergiczne, spadek ciśnienia tętniczego, osłabienie, nadmierna potliwość. Podanie w postaci aerozolu może spowodować uczucie krótkotrwałego pieczenia w jamie ustnej. Podanie salbutamolu powodować może: bóle głowy, niepokój, pobudzenie, bezsenność, zaburzenia smaku, drżenia mięśniowe, przemijające rozszerzenie naczyń obwodowych, spadek lub wzrost ciśnienia tętniczego krwi, częstoskurcz, tachyarytmie, zaburzenia metaboliczne (hipokaliemia, w cukrzycy lek może nasilać hiperglikemię i kwasicę ketonową). Po podaniu wziewnym może powodować podrażnienie błony śluzowej jamy ustnej i gardła, a także paradoksalny skurcz oskrzeli. Niekiedy zaburzenia ze strony układu pokarmowego (nudności, wymioty), zwłaszcza po dużych dawkach leku. U osób w starszym wieku możliwe zatrzymanie moczu. Rzadko występuje odczyn anafilaktyczny (pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy, zapaść naczyniowa).

Przy zastosowaniu tych dawek leków działania niepożądane występują rzadko, a badanie przynosi korzyści dla pacjenta. Zostaje on przebadany nowoczesnymi metodami obrazowymi, dzięki czemu może poznać stan swego układu sercowo-naczyniowego, a posiadając tą wiedzę może szybciej i intensywniej przeciwdziałać rozwojowi miażdżycy i związanych z nią chorób.

Pacjent na każdym etapie badania może zrezygnować, z udziału w nim, bez podania przyczyny. Wyniki badań oraz dane osobowe są poufne. Tajemnica lekarska zachowana zostanie także w publikacjach dotyczących badania. Jedyne prawomocna decyzja sądu może spowodować ujawnienie danych osobowych. Udział w badaniu jest bezpłatny, pacjent nie otrzyma także żadnych zwrotów kosztów ani honorarium za udział w badaniu.

Niniejsze badanie zostało przyjęte i zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku, powołaną przez Rektora Uczelni. Kierownikiem badania jest dr Rafał Gałąska. Współbadaczem jest lek. Paweł Lewandowski (tel: 0668440660). Wszelkie informacje na temat badania można otrzymać pod powyższym numerem telefonu. Zachęcamy do zadawania pytań.

Przeczytałem i zapoznałem się z wyżej podaną informacją oraz możliwością uzyskania dodatkowych informacji w każdej chwili. Zapoznałem się z możliwymi niedogodnościami i ryzykiem udziału w badaniu. W pełni rozumiem cel i założenia badania. Zgadzam się na uczestnictwo w badaniu. Oświadczam, że nie jestem w ciąży.

Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych niezbędnych do realizacji projektu badawczego, (zgodnie z Ustawą z dnia 29.08.97r o ochronie danych osobowych. Dziennik Ustaw Nr 133 Poz. 883).

Podpis..... Data.....

Aneks 2

Zależności między FMD a podstawowymi danymi charakteryzującymi badanych.

	FMD									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	0.10	NS	0.30	NS	-0.20	NS	0.24	NS	-0.06	NS
TC max	-0.19	NS	0.49	<0.05	0.48	<0.05	0.32	<0.05	-0.37	NS
LDL max	-0.18	NS	0.48	<0.05	0.26	NS	0.22	NS	-0.14	NS
HDL max	0.09	NS	0.30	NS	0.26	NS	0.29	NS	-0.30	NS
TG max	-0.20	NS	0.05	NS	-0.02	NS	0.04	NS	-0.30	NS
TC ostatni	-0.17	NS	0.04	NS	0.19	NS	0.06	NS	-0.37	NS
LDL ostatni	-0.16	NS	0.01	NS	0.12	NS	0.02	NS	-0.14	NS
HDL ostatni	0.00	NS	-0.08	NS	0.42	NS	0.21	NS	-0.30	NS
TG ostatni	-0.18	NS	0.32	NS	-0.26	NS	0.03	NS	0.30	NS
HR	0.03	NS	0.15	NS	-0.09	NS	-0.09	NS	0.09	NS
SBP	0.01	NS	0.56	<0.05	-0.18	NS	0.20	NS	0.03	NS
DBP	-0.08	NS	0.35	NS	0.08	NS	0.23	NS	-0.32	NS
Wzrost	-0.11	NS	0.12	NS	-0.45	<0.05	-0.14	NS	-0.38	NS
Waga	-0.27	<0.05	-0.05	NS	-0.51	<0.05	-0.27	NS	-0.35	NS
BMI	-0.29	<0.05	-0.16	NS	-0.36	NS	-0.24	NS	-0.27	NS
BSA	-0.24	NS	0.01	NS	-0.52	<0.05	-0.24	NS	-0.39	NS

Aneks 3

Zależności między parametrami sztywności naczyniowej uzyskanymi przy pomocy metody e-Tracking a podstawowymi danymi charakteryzującymi badanych.

	β									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	0.06	NS	0.09	NS	0.01	NS	0.03	NS	0.11	NS
TC max	-0.21	NS	-0.37	NS	-0.24	NS	-0.28	NS	0.27	NS
LDL max	-0.22	NS	-0.35	NS	-0.25	NS	-0.27	NS	0.11	NS
HDL max	-0.02	NS	-0.04	NS	-0.04	NS	-0.04	NS	0.1	NS
TG max	0.09	NS	0.02	NS	0.22	NS	0.14	NS	0.21	NS
TC ostatni	-0.08	NS	-0.1	NS	-0.06	NS	0.27	NS	0.34	NS
LDL ostatni	-0.09	NS	-0.07	NS	-0.07	NS	0.11	NS	0.27	NS
HDL ostatni	-0.02	NS	-0.02	NS	-0.11	NS	0.10	NS	0.11	NS
TG ostatni	-0.05	NS	-0.26	NS	-0.03	NS	0.21	NS	0.10	NS
HR	0.12	NS	-0.19	NS	0.43	NS	0.19	NS	0.21	NS
SBP	0.02	NS	-0.05	NS	0.03	NS	-0.02	NS	0.34	NS
DBP	0.04	NS	0.03	NS	-0.21	NS	-0.10	NS	0.52	<0.05
Wzrost	0.07	NS	-0.15	NS	0.07	NS	-0.04	NS	0.18	NS
Waga	0.04	NS	-0.05	NS	-0.05	NS	-0.05	NS	0.16	NS
BMI	0.01	NS	0.05	NS	-0.15	NS	-0.05	NS	0.15	NS
BSA	0.06	NS	-0.09	NS	-0.01	NS	-0.05	NS	0.18	NS

	Ep									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	0.07	NS	0.14	NS	-0.03	NS	0.05	NS	0.12	NS
TC max	-0.18	NS	-0.34	NS	-0.25	NS	-0.27	NS	0.28	NS
LDL max	-0.20	NS	-0.32	NS	-0.25	NS	-0.26	NS	0.13	NS
HDL max	-0.03	NS	-0.04	NS	-0.05	NS	-0.04	NS	0.09	NS
TG max	0.10	NS	0.06	NS	0.21	NS	0.15	NS	0.19	NS
TC ostatni	-0.07	NS	-0.06	NS	-0.11	NS	-0.08	NS	0.28	NS
LDL ostatni	-0.08	NS	-0.03	NS	-0.11	NS	-0.06	NS	0.13	NS
HDL ostatni	-0.03	NS	-0.04	NS	-0.13	NS	-0.09	NS	0.09	NS
TG ostatni	-0.05	NS	-0.21	NS	-0.07	NS	-0.14	NS	0.19	NS
HR	0.14	NS	-0.14	NS	0.47	<0.05	0.23	NS	-0.01	NS
SBP	0.10	NS	0.04	NS	0.14	NS	0.08	NS	0.38	NS
DBP	0.13	NS	0.13	NS	-0.10	NS	0.01	NS	0.57	<0.05
Wzrost	0.08	NS	-0.12	NS	0.09	NS	-0.01	NS	0.17	NS
Waga	0.07	NS	0.03	NS	-0.05	NS	-0.01	NS	0.17	NS
BMI	0.05	NS	0.12	NS	-0.17	NS	-0.02	NS	0.18	NS
BSA	0.08	NS	-0.03	NS	0.00	NS	-0.01	NS	0.18	NS

	PWV-β									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	0.06	NS	0.03	NS	0.00	NS	0.00	NS	0.15	NS
TC max	-0.16	NS	-0.31	NS	-0.31	NS	-0.27	NS	0.31	NS
LDL max	-0.19	NS	-0.33	NS	-0.31	NS	-0.28	NS	0.15	NS
HDL max	0.01	NS	-0.10	NS	-0.03	NS	-0.03	NS	0.09	NS
TG max	-0.14	NS	0.40	NS	0.18	NS	0.16	NS	0.33	NS
TC ostatni	-0.03	NS	0.01	NS	-0.13	NS	-0.05	NS	0.32	NS
LDL ostatni	-0.05	NS	0.04	NS	-0.13	NS	-0.04	NS	0.15	NS
HDL ostatni	-0.02	NS	0.01	NS	-0.12	NS	-0.07	NS	0.09	NS
TG ostatni	0.01	NS	-0.16	NS	-0.02	NS	-0.09	NS	0.27	NS
HR	0.15	NS	-0.10	NS	0.43	NS	0.23	NS	-0.01	NS
SBP	0.05	NS	-0.10	NS	0.14	NS	0.01	NS	0.33	NS
DBP	0.11	NS	0.08	NS	-0.11	NS	-0.03	NS	0.58	<0.05
Wzrost	0.12	NS	-0.11	NS	0.15	NS	0.03	NS	0.25	NS
Waga	0.15	NS	0.10	NS	0.07	NS	0.08	NS	0.25	NS
BMI	0.12	NS	0.19	NS	-0.05	NS	0.07	NS	0.24	NS
BSA	0.15	NS	0.02	NS	0.10	NS	0.06	NS	0.27	NS

	AC									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	-0.06	NS	0.03	NS	-0.11	NS	-0.02	NS	-0.16	NS
TC max	0.09	NS	0.11	NS	0.21	NS	0.13	NS	-0.28	NS
LDL max	0.14	NS	0.15	NS	0.28	NS	0.18	NS	-0.15	NS
HDL max	-0.06	NS	-0.16	NS	-0.07	NS	-0.08	NS	-0.02	NS
TG max	-0.17	NS	-0.16	NS	-0.15	NS	-0.15	NS	-0.38	NS
TC ostatni	0.00	NS	-0.17	NS	-0.01	NS	-0.01	NS	-0.28	NS
LDL ostatni	0.02	NS	-0.19	NS	0.01	NS	0.01	NS	-0.15	NS
HDL ostatni	0.01	NS	-0.02	NS	0.02	NS	0.02	NS	-0.02	NS
TG ostatni	-0.15	NS	-0.08	NS	-0.10	NS	-0.10	NS	-0.38	NS
HR	-0.25	NS	-0.20	NS	-0.27	NS	-0.27	NS	-0.22	NS
SBP	0.06	NS	0.14	NS	0.00	NS	0.07	NS	-0.06	NS
DBP	0.05	NS	-0.03	NS	0.22	NS	0.12	NS	-0.26	NS
Wzrost	0.11	NS	0.25	NS	0.19	NS	0.22	NS	-0.12	NS
Waga	0.01	NS	0.07	NS	0.04	NS	0.06	NS	-0.08	NS
BMI	-0.06	NS	-0.06	NS	-0.10	NS	-0.08	NS	-0.05	NS
BSA	0.05	NS	0.16	NS	0.10	NS	0.12	NS	-0.09	NS

	AI									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	0.26	NS	0.23	NS	0.04	NS	0.25	NS	0.29	NS
TC max	-0.12	NS	-0.08	NS	-0.08	NS	-0.14	NS	-0.25	NS
LDL max	-0.11	NS	-0.05	NS	-0.06	NS	-0.13	NS	-0.14	NS
HDL max	-0.07	NS	-0.21	NS	0.00	NS	-0.01	NS	-0.38	NS
TG max	0.01	NS	0.21	NS	-0.07	NS	0.06	NS	-0.09	NS
TC ostatni	-0.08	NS	0.04	NS	-0.08	NS	-0.04	NS	-0.26	NS
LDL ostatni	-0.05	NS	0.07	NS	-0.03	NS	-0.01	NS	-0.14	NS
HDL ostatni	-0.26	NS	-0.28	NS	-0.18	NS	-0.21	NS	-0.38	NS
TG ostatni	-0.01	NS	0.06	NS	0.03	NS	0.04	NS	-0.09	NS
HR	0.17	NS	0.08	NS	0.33	NS	0.25	NS	-0.01	NS
SBP	-0.05	NS	-0.01	NS	-0.16	NS	-0.06	NS	0.05	NS
DBP	-0.01	NS	-0.01	NS	-0.02	NS	0.02	NS	-0.07	NS
Wzrost	-0.04	NS	-0.04	NS	0.28	NS	0.08	NS	-0.36	NS
Waga	-0.05	NS	-0.05	NS	0.15	NS	0.07	NS	-0.26	NS
BMI	-0.07	NS	0.04	NS	-0.08	NS	-0.02	NS	-0.14	NS
BSA	-0.05	NS	-0.14	NS	0.22	NS	0.08	NS	-0.32	NS

Aneks 4

Zależności między parametrami sztywności naczyniowej uzyskanymi z fotopletyzmoграфicznej analizy fali tętna a podstawowymi danymi charakteryzującymi badanymi.

	SI									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	0.21	NS	-0.08	NS	0.22	NS	-0.09	NS	0.47	<0.05
TC max	-0.07	NS	0.14	NS	-0.03	NS	0.16	NS	0.27	NS
LDL max	-0.11	NS	0.07	NS	-0.33	NS	0.03	NS	0.23	NS
HDL max	0.04	NS	0.13	NS	0.40	NS	0.20	NS	-0.23	NS
TG max	0.20	NS	0.43	NS	0.11	NS	0.25	NS	0.47	<0.05
TC ostatni	0.12	NS	0.28	NS	0.27	NS	0.29	NS	0.26	NS
LDL ostatni	0.12	NS	0.30	NS	0.19	NS	0.29	NS	0.24	NS
HDL ostatni	-0.14	NS	-0.21	NS	0.16	NS	-0.05	NS	-0.29	NS
TG ostatni	0.22	NS	0.16	NS	0.27	NS	0.19	NS	0.49	<0.05
HR	-0.12	NS	0.05	NS	-0.05	NS	-0.01	NS	-0.45	NS
SBP	0.15	NS	0.26	NS	0.06	NS	0.18	NS	0.06	NS
DBP	0.22	NS	0.38	NS	-0.17	NS	0.11	NS	0.27	NS
Wzrost	0.3	<0.05	0.24	NS	0.29	NS	0.22	NS	0.36	NS
Waga	0.56	<0.0001	0.65	<0.01	0.62	<0.01	0.58	<0.001	0.54	<0.05
BMI	0.53	<0.0001	0.65	<0.01	0.69	<0.01	0.64	<0.001	0.51	<0.05
BSA	0.51	<0.0001	0.55	<0.05	0.54	<0.05	0.49	<0.01	0.51	<0.05

	RI									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	0.05	NS	-0.02	NS	0.08	NS	-0.12	NS	0.52	<0.05
TC max	0.01	NS	-0.13	NS	0.40	NS	0.17	NS	0.61	<0.05
LDL max	-0.01	NS	-0.09	NS	0.19	NS	0.13	NS	0.43	NS
HDL max	0.15	NS	0.28	NS	0.21	NS	0.16	NS	-0.05	NS
TG max	0.19	NS	0.28	NS	0.12	NS	0.16	NS	0.36	NS
TC ostatni	0.06	NS	0.04	NS	0.21	NS	0.13	NS	0.62	<0.05
LDL ostatni	0.05	NS	0.07	NS	0.13	NS	0.13	NS	0.13	NS
HDL ostatni	0.02	NS	-0.18	NS	0.33	NS	0.09	NS	0.09	NS
TG ostatni	-0.01	NS	-0.12	NS	-0.05	NS	-0.09	NS	-0.09	NS
HR	-0.50	<0.001	-0.29	NS	-0.53	<0.01	-0.42	<0.05	-0.72	<0.001
SBP	-0.07	NS	0.05	NS	-0.3	NS	-0.11	NS	-0.05	NS
DBP	0.02	NS	0.08	NS	-0.22	NS	-0.12	NS	0.34	NS
Wzrost	0.12	NS	-0.09	NS	0.12	NS	-0.03	NS	0.2	NS
Waga	0.27	NS	0.28	NS	0.09	NS	0.15	NS	0.35	NS
BMI	0.26	NS	0.44	NS	-0.01	NS	0.22	NS	0.35	NS
BSA	0.24	NS	0.15	NS	0.11	NS	0.09	NS	0.32	NS

	PPT									
	wszyscy		FH (+)		FH (-)		wysoki LDL		zdrowi	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek	-0.25	NS	-0.04	NS	-0.31	NS	-0.02	NS	-0.54	<0.05
TC max	0.04	NS	-0.09	NS	-0.06	NS	-0.15	NS	-0.28	NS
LDL max	0.06	NS	-0.09	NS	0.32	NS	-0.03	NS	-0.27	NS
HDL max	-0.05	NS	-0.02	NS	-0.48	<0.05	-0.28	NS	0.28	NS
TG max	-0.28	NS	-0.39	NS	-0.12	NS	-0.23	NS	-0.45	NS
TC ostatni	-0.19	NS	-0.30	NS	-0.30	NS	-0.32	NS	-0.27	NS
LDL ostatni	-0.19	NS	-0.33	NS	-0.18	NS	-0.03	NS	-0.27	NS
HDL ostatni	0.11	NS	0.24	NS	-0.29	NS	0.0	NS	0.34	NS
TG ostatni	-0.24	NS	-0.17	NS	-0.28	NS	-0.21	NS	-0.46	NS
HR	0.10	NS	-0.03	NS	0.08	NS	0.03	NS	0.51	<0.05
SBP	-0.13	NS	-0.24	NS	0.00	NS	-0.14	NS	-0.05	NS
DBP	-0.21	NS	-0.41	NS	0.24	NS	-0.09	NS	-0.2	NS
Wzrost	0.06	NS	0.03	NS	0.05	NS	0.06	NS	-0.19	NS
Waga	-0.41	<0.01	-0.46	NS	-0.36	NS	-0.38	<0.05	-0.45	NS
BMI	-0.53	<0.001	-0.62	<0.01	-0.63	<0.01	-0.6	<0.001	-0.5	<0.05
BSA	-0.30	<0.05	-0.31	NS	-0.23	NS	-0.24	NS	-0.39	NS