

# **Endoteldysfunksjon hos barn og unge**

*- en litteraturstudie*

Obligatorisk studentoppgave  
for 11. semester ved det  
Medisinske fakultet UIO mars 2006

Stud. med. Ragnhild Røysland  
Kull V01

Veileder: Professor Dr. med. Torbjørn Omland  
Akershus Universitetssykehus

## **Abstract**

This review highlights the subject endothelial dysfunction in the paediatric population. Endothelial dysfunction is recognized as an independent risk factor of atherosclerotic disease. Even before macroscopic evidence of the disease, endothelial dysfunction may be present. It is believed that one major mechanism underlying the phenomenon of endothelial dysfunction is decreased bioavailability of endothelium-derived nitric oxide (NO), due to reduced production or increased degradation. This article reviews different methods for evaluating endothelial function, which are believed to reflect the bioavailability of NO, and addresses methods particularly suitable for childhood studies.

Many risk factors for atherosclerosis in adults are well established (e.g. hyperlipidemia, hypertension, cigarette smoking, diabetes mellitus), and new ones are emerging. Evaluation of endothelial dysfunction in children provides a means to investigate the impact of these risk factors at an early age. This article also reviews the available literature on studies of endothelial function in children with both conventional and novel risk factors for atherosclerosis.

Endothelial dysfunction may be a reversible phenomenon. Much work has been performed to evaluate potential management strategies to reduce the risk of future cardiovascular events. This article reviews interventional studies aiming to improve endothelial function in children.

## Innholdsfortegnelse

Innledning.....	4
Endotelets oppbygning og funksjon.....	4
Hovedmål.....	6
Delmål 1.....	6
Delmål 2.....	7
Delmål 3.....	7
Metode.....	8
Kliniske metoder for måling av endotelfunksjon.....	9
Metoder som måler endotelfunksjon i koronararterier.....	9
Måling med angiografi på koronar makrosirkulasjon.....	9
Måling med ”Doppler-wire” på koronar mikrosirkulasjon.....	10
Metoder som måler endotelfunksjon i perifere arterier.....	11
Måling på perifer arterie med ultralyd.....	11
Metoder som måler endotelfunksjon i perifer mikrosirkulasjon.....	12
Måling på arterioler i underarmen med pletysmografi.....	12
Måling på arterioler i fingeren med pletysmografi.....	13
Vaskulær anatomi, intima media tykkelse (IMT).....	13
Risikofaktorer for aterosklerose og for endoteldysfunksjon hos barn og unge.....	14
Klassiske risikofaktorer.....	14
Hyperlipidemi.....	14
Hypertensjon.....	14
Aktiv og passiv røyking.....	14
Diabetes mellitus.....	15
Aldring.....	15
Nye risikofaktorer.....	15
Overvekt.....	15
Inflammasjon.....	16
Infeksjon.....	16
Prenatal programmering:.....	17
Homocystein.....	17
Genetisk predisposisjon.....	18
Kroniske sykdommer.....	18
Intervensjoner som forbedrer endotelfunksjonen hos barn og unge.....	19
Farmakologisk intervensjon:.....	19
Statiner.....	19
ACE-hemmere.....	19
Antioksidanter.....	19
Omega-3 fettsyrer.....	19
Folsyre.....	19
L-arginin.....	20
Ikke-farmakologisk intervensjon.....	20
Fysisk aktivitet.....	20
Diett og diett kombinert med fysisk aktivitet.....	20
Avsluttende bemerkninger.....	21
Referanser.....	22

## Innledning

### *Om aterosklerose hos barn.*

Hjerte- og karsykdom er fortsatt den viktigste årsakene til sykkelighet og dødelighet i den vestlige verden, og skyldes vanligvis åreforkalkning eller aterosklerose. Selv om sykdommen først blir klinisk manifest i voksen alder, er aterosklerose resultatet av en langvarig prosess som starter tidlig i livet. Undersøkelser gjort *post mortem*, viser at fibrøse plakk kan være tilstede allerede ved to års alder. I 5-10 % av koronararterier på barn mellom 2-15 år finner man fibrøse plakk (1), som trolig er en videreutvikling av såkalte "fatty streaks," den første makroskopisk synlige aterosklerotiske forandringen man kjenner. "Fatty streaks" består av lipidfylte skumceller og ekstracellulære lipidansamlinger, og kan påvises i aorta på barn allerede i neonatalperioden (2).

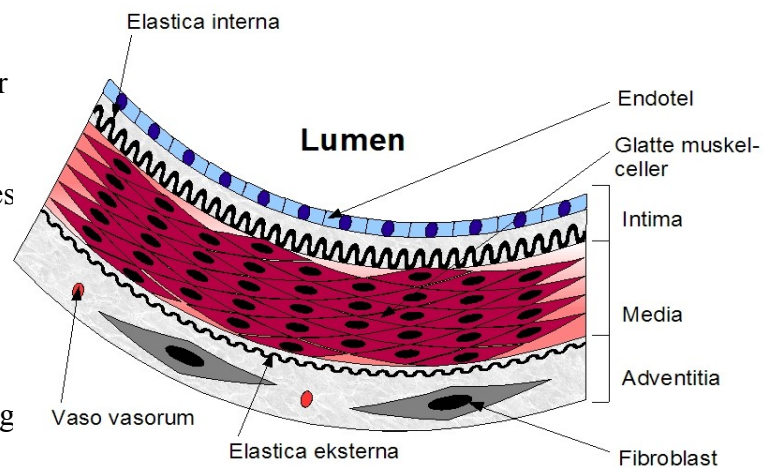
### *Endotel dysfunksjon ved tidlig aterogenese.*

Den økende forståelsen av mekanismer ansvarlige for aterogenese har ført til utvikling av konseptet endotel dysfunksjon (3). Endotelskade blir sett på som en viktig initial hendelse i aterogenesen, som etter hvert forårsaker endrede egenskaper, eller dysfunksjon, hos endotelcellene. Mange studier har vist at denne dysfunksjonen kan være av stor betydning for senere utvikling av aterosklerose (4). Undersøkelser har vist at endotel dysfunksjon er til stede hos barn allerede i 7 års alder (5) og at den er assosiert med utvikling av strukturell arteriell sykdom hos barn og unge (6, 27, 39).

## Endotelets oppbygning og funksjon

### *Endotelets beliggenhet.*

Endotelet er bygd opp av et enlaget cellelag, som kler den lumenale overflaten av alle blodkar (se illustrasjon 1). Arterier er oppbygd av tre lag, intima, media og adventitia. Intima ligger nærmest lumen, og består av endotelceller med et tynt underliggende bindevevslag. Media består i hovedsak av muskelceller og elastiske fibre (i de elastiske arteriene) og er atskilt fra intima og adventitia av elastiske laminae. Adventitia er det ytterste bindevevslaget som omringer



Illustrasjon 1: Oppbygningen av en arterie.

arterien, og som i tillegg til bindevev inneholder nerver og små blodkar, vaso vasorum, som ernærer arterieveggen. Endotelet fungerer som en sperre mellom sirkulerende blod og underliggende vev og har oppgaver både når det gjelder opprettholdelse av lokal homeostase og intakt sirkulasjon (7).

Arterien, og som i tillegg til bindevev inneholder nerver og små blodkar, vaso vasorum, som ernærer arterieveggen. Endotelet fungerer som en sperre mellom sirkulerende blod og underliggende vev og har oppgaver både når det gjelder opprettholdelse av lokal homeostase og intakt sirkulasjon (7).

### *Endotelets mange oppgaver.*

Lenge trodde man at endotelet kun var en semipermeabel barriere mellom blod og interstitium som lettet utvekslingen av vann og små molekyler. I løpet av de siste 30 årene har man derimot påvist en lang rekke andre funksjoner som reguleres av endotelet. Disse innbefatter koagulasjon, fibrinolyse, arteriell tonus og vaskulær vekst. Det har vist seg at endotelet

produserer og frigjør en hel rekke bioaktive substanser. I tillegg til disse ”universale” egenskapene, finnes også ulike organspesifikke egenskaper. I lungene er endotelet ansvarlig for gassutvekslingen, i lever og milt er det ansvarlig for fagocytose og i hjertet modulerer det myokardiell kontraktile funksjon (4).

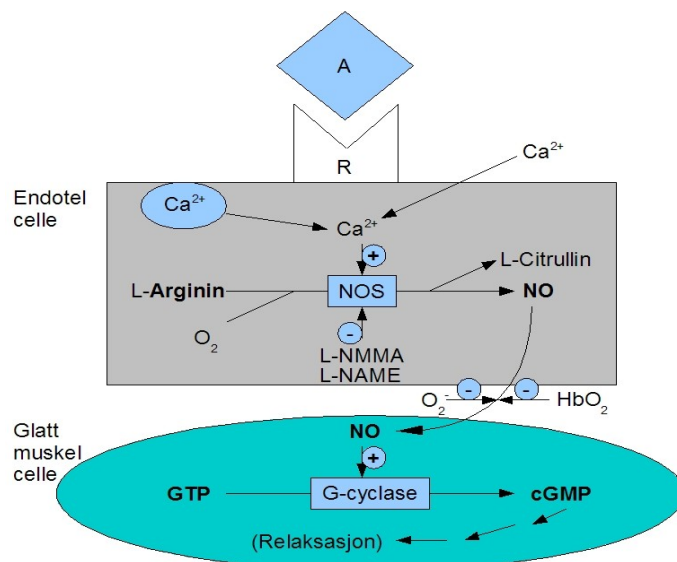
#### Regulering av vaskulær tonus.

Gjennom frigjøring av signalsubstanser regulerer endotelceller, som en respons på ulike farmakologiske og fysiologiske stimuli, tonus til underliggende vaskulære glatte muskelceller (8). Endotelcellene har selv evnen til å produsere vasodilatatorer som nitrogen monoksid (NO), prostaglandiner og endotel-derivert hyperpolariserende faktor(EDHF) og vasokonstriktorer som endotelin-1(ET-1), superoksid( $O_2^-$ ) og tromboksan (9). I tillegg formidler eller inaktiverer endotelceller signaler fra sirkulerende vasomodulerende stoffer som trombin, bradykinin, ADP og ATP (10). Forsøk har vist at i normalt fungerende endotel er NO viktig for å bevare en lav arteriell tonus (11). I tillegg har NO viktige funksjoner når det gjelder aktivering og aggregering av plater og monocytter (12). Intens forskning har vært utført for å klarlegge NO's virkningsmekanismer.

#### Oppdagelsen av endotelderivert NO.

Tilstedeværelsen av en endotelderivert relaksasjonsfaktor ble første gang påvist i et klassisk eksperiment utført av Furchgott og Zawadzki på begynnelsen av 1980-tallet (13). De viste at acetylcholins vasodilaterende virkning på aortaringer fra kaniner var avhengig av intakte endotelceller. På bakgrunn av dette postulerte de at stimulering av de muskarinerge reseptorene på endotelcellene, førte til frigjøring av et stoff som hadde vasodilaterende effekt på de glatte muskelcellene i aorta. Stoffet ble den gangen kalt ”endothelium derived relaxing factor” (EDRF). Allerede i 1977 hadde en annen forsker, Ferid Murad, oppdaget at NO har

evnen til å relaksere glatte muskelceller. I 1986 foreslo Luis Ignarro at EDRF er identisk med NO. For disse viktige oppdagelsene ble Robert Furchgott, Ferid Murad og Luis Ignarro belønnet med nobelprisen i fysiologi og medisin i 1998 (9).



Illustrasjon 2: Molekylære mekanismer for endotelavhengig dilatasjon ved hjelp av NO.

frigjøring stimuleres av økt blodstrøm som medfører økte skjærekrefter (”shear stress”) på endotelcellene (14), og av sirkulerende stoffer som virker på endotelcellenes membranreseptorer, for eksempel bradykinin, trombin og acetylcholin (8). Nydannet NO diffunderer over plasmamembranen og inn i den underliggende vaskulære glatte muskelcellen. Her stimulerer NO enzymet guanylyl cyclase som omdanner GTP til cGMP. Økte konsentrasjoner av cGMP fører til relaksasjon av den glatte muskelcellen.

### *Sammenheng mellom endoteldysfunksjon og aterosklerose.*

Redusert biotilgjengelighet av NO er i en lang rekke studier blitt forbundet med tilstander som disponerer for ateroskleroeseutvikling som hypertensjon, hyperkolesterolemi, aldring, røyking, diabetes og hjertesvikt (15). Det har derfor blitt postulert at redusert biotilgjengelighet av NO nettopp utgjør den patofysiologiske sammenheng mellom endotelskade og aterosklerose.

### *Molekylære mekanismer for nedsatt NO.*

Redusert nivå av NO kan skyldes mange ulike mekanismer. Nedsatt mengde substrat for eNOS enzymet, for eksempel i form av mangel på L-arginin kan være en mekanisme. Selv om både sirkulerende nivåer av L-arginin og intracellulært nivå av L-arginin i endotelcellene er høyere enn  $K_m$  for eNOS, har forsøk vist at tilskudd av L-arginin reduserer utviklingen av aterosklerose både i menneske og i dyreforsøk. Om dette skyldes en direkte virkning i endotelcellene, eller har indirekte årsaker er fortsatt uklart. Forandringer i eNOS ekspresjon eller struktur kan være en annen mekanisme, som kanskje kan skyldes polymorfismer i genet for eNOS. Denne polymorfismen er funnet hos japanere med hypertensjon, men ikke i andre populasjoner. Forandringer i signalveien til NO, for eksempel på grunn av endringer i mekanismer for aktivering av eNOS enzymet, kan være en tredje mekanisme. Forsøk har vist at ekspresjonen av det membranbundete G-proteinet  $G_{ia}$  er nedsatt i koronararterier hos personer med hypertensjon, hyperkolesterolemi og høy alder. Forandring i tilgjengelighet av tetrabiopterin kan være en fjerde mekanisme. Tetrabiopterin er en kofaktor for eNOS, og mangel kan derfor medføre at omdannelsen til NO går seinere. En femte mekanisme kan være at man får økt degradering av NO pga reaktive oksygen radikaler. NO og  $O_2^-$  reagerer lett med hverandre. Økte nivåer av reaktive oksygen radikaler finnes blant annet hos røykere. Vaskulære NADH/ NADPH oksidaser, som er viktige kilder til superoksid in vivo, kan være en sjette mekanisme. Ved å indusere hypertensjon hos rotter ved hjelp av angiotensin II infusjon, økte man nivået av NADH/ NADPH oksidase i blodårene, samtidig som endotelfunksjonen ble dårligere (12).

## **Hovedmål**

Hovedmålet med denne litteraturstudien er å gi en oversikt over temaet endoteldysfunksjon hos barn og unge.

### **Delmål 1**

Beskrive metoder for måling av endoteldysfunksjon og biotilgjengelighet av NO.

### *Kommentar*

Ulike metoder kan benyttes for å måle endotelfunksjon hos menneske. I denne oppgaven har jeg valgt å konsentrere meg om metoder som gir et mål på biotilgjengelighet av NO. Fordi halveringstiden til NO er svært kort er det vanskelig å måle NO-nivå direkte. Metodene som vil bli diskutert gir derfor indirekte informasjon om NO-biotilgjengelighet, dvs de er såkalte "bioassays" for NO-biotilgjengelighet. Videre vil jeg diskutere hvilke av disse metodene som egner seg best for evelauering av endotelfunksjon hos barn.

Siden endotelcellen har mange andre funksjoner enn NO-produksjon og vasodilatasjon, kan selvsagt begrepet endotelfunksjon og dysfunksjon tolkes videre enn NO-biotilgjengelighet. Sirkulerende biomarkører som endotelderiverte adhesjonsmolekyler, koagulasjonsmolekyler og vasoaktive mediatorer kan også gi informasjon endotelets funksjon og dysfunksjon. Fordi redusert NO-biotilgjengelighet står særlig sentralt som en sannsynlig fellesnevner for

risikofaktorer for aterosklerose, vil jeg i denne litteraturstudien avgrense diskusjonen til studier som på ulik måte måler NO-biotilgjengelighet og ikke drøfte sirkulerende biomarkørers betydning.

### **Delmål 2**

Diskutere ulike risikofaktorerens betydning for nedsatt endotelfunksjon og for aterosklerose hos barn og unge.

#### *Kommentar*

Risikofaktorer for aterosklerose, som hyperkolesterolemi, fedme, hypertensjon og diabetes er assosiert med akselerert ateroskleroseutvikling hos barn (16). Allikevel viser det seg at disse risikofaktorene kan forklare mindre enn halvparten av prevalensen av koronarsykdom i voksen alder. Det arbeides derfor hardt for å identifisere nye risikofaktorer for aterosklerose og koronarsykdom (17). Som nevnt innledningsvis, oppfattes endotelskade som en initierende faktor i aterogenesen. Kanskje reflekterer nettopp endotelfunksjonen nettoeffekten av den biologiske mottakeligheten for aterosklerose (3). Det å undersøke individer tidlig i livet, er viktig for å minimere påvirkningen fra akkumulerte risikofaktorer i voksne alder. Et av målene med denne litteraturstudien er derfor å beskrive ulike studier som identifiserer risikofaktorer for endoteldysfunksjon hos barn og unge.

### **Delmål 3**

Belyse strategier for å bedre endotelfunksjon hos barn og unge

#### *Kommentar*

Endoteldysfunksjon anses i dag å være et reversibelt fenomen (4). Mange forskere har derfor vært interessert i å finne strategier for å bedre endotelfunksjon og derved å redusere risikoen for hjerte-karsykdommer på lengre sikt. Ved å intervensere i ung alder, vil sannsynligvis ateroskleroseprosessen kunne bremses mer effektivt enn ved sen intervensjon. Et mål med denne oppgaven er derfor å identifisere intervensjoner som kan bremse, og i beste fall normalisere endotelfunksjonen hos barn.

## Metode

I denne litteraturstudien ønsker jeg å se nærmere studier som har belyst problemstillingen endotelfunksjon hos barn og unge. Barn og unge er her definert som personer mellom 0-20 år. For å finne litteratur har jeg brukt søkemotorene PubMed og Cochrane. De fleste artiklene har jeg funnet ved å bruke søkeordene "endothelial dysfunction" og "child". I tillegg har jeg brukt mer spesifikke søkeord som "flow mediated dilatation (FMD)", "nitric oxide", "atherosclerosis", "L-arginine", "folate" osv. En del av artiklene har jeg funnet ved systematisk å gå gjennom noen utvalgte oversiktsartikler og deres referanselister. Jeg har også benyttet medisinske lærebøker som Robbins: Pathologic basis of disease (Cotran, Kumar, Collins, Sixth edition) for å få bedre oversikt over de mer generelle temaene endotel og aterosklerose.



## Metoder for måling av endotelfunksjon in vivo hos menneske

### *Endotelavhengig vasodilatasjon.*

Endotelets funksjon undersøkes vanligvis enten i den koronare eller den perifere sirkulasjon. Før slike teknikker ble utviklet, fant man kun anatomisk bevis på aterosklerose ved invasiv hjertekateterisering og ved obduksjon (2). Et typisk endotelfunksjonsforsøk går ut på at man måler endringen i diameter på en arterie eller på arterioler før og etter bestemte stimuli. Stimuli kan være endotelavhengige vasodilaterende medikamenter slik som acetylcholin, bradykinin eller substans P som infunderes i arterien. Disse stoffene fører til lokal frigjøring av NO og dermed vasodilatasjon. Et annet mye brukt stimulus er såkalt reaktiv hyperemi som kan induseres ved midlertidig avklemming av arteriell blodstrøm. Etter at okklusjonen opphører, vil økt blodstrøm gi sterkere skjærekrefter mot endotelcellenes overflate, som igjen fører til frigjøring NO. Dette fenomenet omtales ofte som blodstrømsmediert dilatasjon, ”flow-mediated dilatation” eller FMD. Ved tilstander kjennetegnet ved redusert NO-biotilgjengelighet, vil blodårens evne til vasodilatasjon være redusert. I visse situasjoner vil man også kunne få paradoks vasokonstriksjon. (Se avsnittet om angiografi på koronararterier)

### *Endoteluavhengig vasodilatasjon.*

Endoteluavhengig vasodilatasjon kan måles ved tilførsel av vasoaktive medikamenter som nitrater, calsiumkanalblokkere, adenosin og papaverin. Dette er stoffer som virker vasodilaterende ved at de virker direkte på den glatte muskulaturen. Infusjon av slike medikamenter resulterer altså i en endoteluavhengig dilatasjon. Slike metoder brukes ofte i kontrollleksperimenter, for å vise at manglende vasodilatasjon ikke skyldes defekt i selve den glatte muskulaturen. Man måler endoteluavhengig vasodilatasjon også for å se om man kan oppnå en tilsvarende eller bedre respons med denne metoden enn med den endotelavhengige metoden. Måling av endotelavhengig og endoteluavhengig vasodilatasjon kan altså brukes for å lokalisere nivået for en observert vasomotorisk defekt.

### *Ulike målemetoder på ulike karavsnitt.*

Endring i blodårenes diameter eller økning i blodårens blodstrøm, kan måles på mange måter. I teksten under gjennomgås metoder som bruker angiografi, høyoppløselig ultralyd og pletysmografi. I tillegg nevnes en metode hvor økningen i blodstrøm måles indirekte ved å måle endret blodstrømhastighet. Dette gjøres ved hjelp av et kateter med mulighet for doppler-måling. Til tross for en del felles prinsipper, varierer metodikken i de ulike studier betydelig. Dette kapittelet beskriver metoder for måling av endotelfunksjon i ulike karavsnitt.

## Metoder som måler endotelfunksjon i koronararterier

### **Måling med angiografi på koronar makrosirkulasjon**

#### *Historie.*

Koronar endoteldysfunksjon hos menneske ble første gang påvist på midten av 1980-tallet i et klassisk forsøk utført av Ludmer og medarbeidere (18). Koronar arteriediameter ble målt med kvantitativ angiografi, før og etter intrakoronar infusjon av acetylcholin (en endotelavhengig vasodilatator). I normale arterier gav infusjon av acetylcholin vasodilatasjon, men i arteriene hvor man fant avansert stenose (større en 50%) fikk man vasokonstriksjon. I tillegg fikk man vasokonstriksjon i fem av seks årer med minimale sykdomsforandringer. Etterpå målte man responsen på nitroglyserin, som gav vasodilatasjon i alle arteriene. På bakgrunn av disse funn ble det postulert at den paradoksale effekten av acetylcholin kan skyldes defekt endotelavhengig vasodilatatorfunksjon, både i arterier med tidlige sykdomsforandringer og i arterier med avansert aterosklerose.

### *Detaljer i metodologi.*

Ved denne metoden blir det innledningsvis tatt angiografiske bilder av koronararteriene i normaltilstanden som en basismåling. Et kateter for infusjon av medikamenter plasseres så i en av koronararteriene, og dette brukes til å infundere vasoaktive mediatorer som f. eks acetylcholin. Den vasoaktive mediators infunderes så i ulike mengder, og etter hver infusjon tar man nye angiografiske bilder. Spesielle teknikker brukes så for å måle endringene i diameter på de angiografiske bildene. Blant annet er det viktig at reaksjonen på infusjon måles på samme arteriekaliber hos de ulike forsøkspersonene. Resultatene oppgis f.eks som prosentvis endring i arteriens diameter i forhold til basismålingen (19).

### *Styrker og svakheter.*

Dette er den første metoden som ble brukt for å måle endotelfunksjon, og den blir av mange sett på som en gullstandard. Derfor har mange av de andre metodene blitt sammenlignet med denne. Styrken til denne metoden er at målingene gjøres direkte på koronarkar. Man får altså et direkte mål på den koronare endotelfunksjon, i motsetning til metodene som brukes i den perifere sirkulasjon. Svakheten med metoden er den høye graden av invasivitet og at metoden krever dyrt utstyr og høy kompetanse for å gjennomføres. I tillegg innebærer inngrepet risiko for komplikasjoner som slag, hjerteinfarkt, infeksjon og generell karskade (20). Invasiviteten i denne typen forsøk gjør det vanskeligere å forsvare en utstrakt bruk på ”friske” mennesker, og spesielt på barn. De fleste slike forsøk gjøres i forbindelse med diagnostisk angiografi. Metoden har for eksempel vært brukt på barn som skal gjennomgå hjertekirurgi (21).

## **Måling med ”Doppler-wire” på koronar mikrosirkulasjon**

### *Historie.*

Bare fem år etter at metoden for endotelfunksjonstesting i epikardiale koronararterier ble utviklet, ble testing på den koronare mikrosirkulasjon utført (22). I motsetning til fordelingsarterier (”conduit vessels”), hvor vasodilasjonsevne evalueres ved hjelp av kvantitative angiografi, måles endotelfunksjon i motstandskar eller arterioler (”resistance vessels”) ved hjelp av en såkalt ”Doppler-wire” eller doppler-kateter. Ved å infundere endotelavhengige og endoteluavhengige vasodilatorer og deretter måle økningen i den koronar blodstrøm, får man opplysninger om endotelfunksjon. En ”Doppler-wire” er et spesiallaget kateter hvor det sitter en ”doppler krystall” på tuppen. Katetre kan derfor måle blodstrømmens hastighet til enhver tid, ved å gjøre kontinuerlige målinger som lagres på VHS eller lignende lagringsverktøy. Kateteret kan f. eks plasseres i ”left anterior descending artery” (LAD), ”left circumflex artery” (CX) eller venstre hovedarterie (a. coronaria sinistra). Det er viktig at kateteret plasseres slik at Doppler signalet blir sterkest mulig. Først gjør man en basalmåling av den koronare blodstrømhastigheten. Deretter innføres et vasoaktivt stoff f.eks acetylcholin i ulike mengder samtidig som blodstrømhastigheten måles. Koronar angiogram tas i begynnelsen av forsøket som en basismåling, og ved hver gradert infusjon av medikamenter, slik at diameteren på den epikardielle blodåren kan måles samtidig (23).

### *Blodstrømsmåling.*

Den koronare arterielle blodstrømmen (fysikk: volumstrøm) beregnes, ved å regne ut produktet av gjennomsnitts blodstrømhastighet og tverrsnittsarealet av koronararterien på samme sted som ”Doppler-wire” hastigheten ble målt (fysikk:  $\text{volumstrøm} = \text{Volum} / \text{tid} = \text{fart} * \text{Areal}$ ). Resultatene kan f. eks oppgis som prosentvis endring i blodstrøm etter infusjon av acetylcholin i forhold til basismålingen (23). Resultatene kan også oppgis som endring i koronar vaskulær resistans (coronary vasculare resistance = CVR) som ut fra målingene over kan beregnes ved hjelp av Ohms lov ( $\text{motstand} = \text{trykk} / \text{strøm}$ ). Altså er  $\text{CVR} =$

*gjennomsnittlig arterielt trykk/ koronar arteriell blodstrøm* (24). Siden man tror CVR i hovedsak bestemmes av arterioler med diameter mindre enn 200 micrometer (25), vil endring i CVR være et mål på endring i arteriolenes diameter, og derfor et måle på funksjon i hjertets mikrosirkulasjon.

*Styrker og svakheter.*

I likhet med målingsmetoden på koronar makrosirkulasjon, er denne metoden invasiv. Den har derfor mange av de samme styrker og svakheter som den første. Metoden har også vært brukt på barn (26).

## **Metoder som måler endotelfunksjon i perifere arterier**

### **Måling på perifer arterie med ultralyd.**

*Historie.*

Ikke invasiv testing av endotelfunksjon i a.brachialis og a.femoralis ble første gang beskrevet i 1992 (27). I dette forsøket ble endringen i arteriens diameter undersøkt med høyoppløselighets ultralyd under tre ulike betingelser: ved grunntilstand, i reaktiv hyperemifase og deretter og etter inntak av nitroglyserin sublingvalt. Reaktiv hyperemi ble induisert ved hjelp av en blodtrykksmansjett på overarmen som ble blåst opp til 300 mmHg. Etter 4-5 min ble okklusjonen opphevet og man fikk en reaktiv hyperemi med økt blodstrøm og vasodilatasjon ("flow-mediated dilatation" eller FMD). Resultatet ble oppgitt som prosentvis endring i arteriediameter ved FMD og ved nitroglyserinindusert dilatasjon, i forhold til basismålingen.

*Detaljer i metodologien.*

Denne metoden er blitt en av de kanskje aller mest brukte måten å måle endotelfunksjon i dag. I en oversiktsartikkel fra 2000 (31), har Raitakari og Celermajer (sistnevnte en av de som utviklet metoden i 1992) oppsummert gjennomføringen av et slikt forsøk. Den ideelle størrelsen på arterien som måles er 2,5-5mm. Denne metoden måler altså endotelfunksjon i fordelingsarterier ("conduit arteries"). Arterier under 2,5mm er vanskelige å framvise nøyaktig med ultralyd, og arterier større en 5mm tenderer til å ikke dilatere signifikant selv ved normal endotelfunksjon. 90 % av normale individer har brachialarterie diameter mindre enn 5mm (henvis), så det er relativt uvanelig at denne er for stor til at forsøket kan utføres. Femoral arterien er for stor, bortsett fra hos prepubertale barn, og radialis arterien er ofte mindre enn 2.5 mm. Ultralydapparat med frekvens høyere enn 7.0 MHz må brukes for å få tilfredsstillende oppløsning i bildet.

Før forsøket starter, må man finne det optimale sted å plassere ultralydproben. Deretter må dette stede merkes, og armen må holdes i ro slik at samme sted brukes i resten av forsøket. Først gjøres målinger av den basale blodstrøm. Man bruker mellom 1-10 min på å få gode bilder. Så blåses blodtrykksmansjetten opp til ett trykk høyere enn systolisk blodtrykk, og holdes slik i 5 min. (Kortere avklemmingstid gir ikke en optimal FMD og lengre avklemming er ubehagelig for forsøkspersonen.) En vanlig skanning periode er 30 sek før avklemming av åren, og 90 sek etter avklemming. Så venter man i 15 min for at arterien skal gjenoppta normaltilstanden. Til slutt gis sublingval nitroglyserin, og ny skanning gjøres 3-4 min etterpå.

*Styrker:*

Den kanskje aller største fordelen med denne metoden er at den ikke er invasiv, i motsetning til de koronare metodene. I tillegg er den tryggere og raskere å gjennomføre. Disse to tingene gjør at den egner seg godt til bruk hos barn. Det at metoden baserer seg på FMD som er

etfysiologisk endotelavhengig stimulus, er også en fordel. Resultater av forsøk gjort med brachial FMD viser god korrelasjon med forsøk gjort på koronar makrosirkulasjon (28, 29). Brachial FMD ser og ut til å kunne forutsi kardiovaskulære hendelser hos voksne (30).

#### *Svakheter:*

En ulempe ved ultralydteknikken er at den er krevende og veldig operatørvhengig. I tillegg til erfaring med bruk av ultralyd, er det nødvendig med spesifikk opplæring i bruk av denne metoden. Mange forskningsgrupper har hatt problemer med å oppnå reproduserbare data. Dette er antakelig en av grunnene til at metoden per i dag ikke brukes i klinisk rutine, men kun i klinisk forskningssammenheng (31). Brachial FMD er allikevel den metoden som har vært aller mest brukt i forsøk med barn.

## **Metoder som måler endotelfunksjon i perifer mikrosirkulasjon**

### **Måling på arterioler i underarmen med pletysmografi.**

#### *Historie.*

Mange forsøk har undersøkt endotelfunksjon i underarmens mikrosirkulasjon ved å infundere endotelavhengige og endoteluavhengige vasodilatorer eller ved bruk av FMD. Responsen har man målt ved hjelp av pletysmografiske teknikker. Forsøk hvor denne metoden er brukt, i den hensikt å måle endotelfunksjon, er beskrevet så tidlig som på begynnelsen av 1990-tallet (32, 33). Teknologien disse forsøkene benytter seg av, er allikevel utviklet så tidlig som på midten av 1970-tallet (34).

#### *Detaljer i metodologi.*

Et kateter plasseres i a.brachialis for måling av blodtrykk og infusjon av medikamenter. Så plasseres en kalibrert "mercury-in-silastic strain gauge" rundt begge underarmene, for måling av endring i diameter pga endring i blodstrøm. Man bruker den ene armen, uten kateter som kontrollarm, for å forsikre seg om at systemisk påvirkning av blodstrømmen ikke er tilstede under forsøket. En blodtrykksmansjett plasseres over hvert håndledd og blåses opp til suprasistolisk blodtrykk. Dette er for å minimere feilkilder ved å stoppe sirkulasjonen til hendene. Man starter først med å gjøre en måling av normaltstanden i underarmen, altså en basalmåling. Deretter kan man gi medikamenter eller bruke FMD (indusert ved avklemming av a.brachialis med en blodtrykksmansjett på samme måte som i ultralydmetoden beskrevet over), og måle endringen i blodstøm som disse stimuli gir.

#### *Beregning av resultatet.*

Resultatet av pletysmografimålingen, altså målingen av underarmens blodstrøm, oppgis som milliliter per 100 milliliter av vev per minutt (ml/100 ml/ min). Underarms vaskulær resistens kan ut fra dette kalkuleres som ratioen av gjennomsnittlig blodtrykk i forhold til underarmens blodstrøm og oppgis som mmHg per ml/ 100 ml av vev per minutt (Ohms lov: resistans = trykk/ strøm).

#### *Styrker og svakheter.*

Fordeler med denne metoden er for det første at målingene blir gjort på en del av sirkulasjonen som er lettere tilgjengelig enn koronararteriene. I tillegg har man muligheten til å kartlegge dose-respons sammenhengen mellom endoteliale agonister og antagonister, i likhet med testene på koronarkar. Hovedulempen er selvsagt invasiviteten, med risiko for skade av n. medianus, infeksjoner og kar skade. Dette gjør at metoden har begrenset nytte når det gjelder bruk i store kliniske studier (20). Metoden kan også brukes kun i kombinasjon med FMD, og er da ikke invasiv. Metoden kan dermed, i teorien, være egnet i forsøk på barn.

Under arbeide med denne studien har det allikevel ikke vært mulig å finne forsøk på barn utført på denne måten.

### **Måling på arterioler i fingeren med pletysmografi**

Reaktiv hyperemi perifer arteriell tonometri (RH-PAT) er en ikke-invasiv teknikk for å bestemme perifer endotelfunksjon ved å måle forandringer i digitalt puls volum under reaktiv hyperemi. Prinsippet bak denne metoden er at lokal iskemi i hånden vil medføre en reaktiv hyperemi som igjen gir en NO-avhengig vasodilatasjon i fingrenes blodkar. Denne volumendringen kan måles ved hjelp av pletysmografisk tenikk, ved at man bruker spesiellagde fingerprober (35). Probene består av oppblåsbare latexluftputer med et hardt ytre skall, og er disignet slik at putene blåses opp til nær diastolisk blodtrykk i armen. Dette er for å øke sensitiviteten, og for å unngå oppsamling av venøst blod i fingeren som kan gi en venoarteriell reflektorisk vasokonstriksjon. Den pulserende volumendringen i fingertuppen oppfattes av en trykktransformator som forsterker, og omgjør det til et digitalt signal. Signalet lagres på en datamaskin og det gjøres kontinuerlig, i minst 15 minutter. Metoden er beskrevet i tidligere studier (36-38).

#### *Styrker og svakheter.*

I likhet med brachial FMD er denne metoden ikke-invasiv. Den er også tryggere og raskere å gjennomføre enn de invasive metodene. En av fordelene sammenlignet med brachial FMD metoden er den lave operatørvhengigheten. Ulemper med denne metoden er at den forløpig er lite utprøvd, og at den kanskje påvirkes av strukturelle aspekter i blodåren utover endotelet (20). Selv om denne metoden har potensialet til å brukes på barn, finnes det foreløpig ingen slike forsøk beskrevet i litteraturen.

### **Vaskulær anatomi, intima media tykkelse (IMT)**

Intima-media tykkelses målinger gjøres i en del forsøk. Metoden går ut på å måle tykkelsen av arteriers intima- og media lag ved hjelp av høyoppløselig ultralyd. Dette kan i prinsippet gjøres i mange arterieavsnitt, så lenge arterien er tilstrekkelig overfladisk til å gi gode ultralydbilder. Et vanlig valgt målingssted er deler av a. carotis. Metoden måler ikke endotelfunksjon, men er i stedet en ikke-invasiv måte å visualisere endret karanatomi på. Metoden nevnes allikevel her fordi den i mange forsøk brukes i kombinasjon med brachial FMD (39-41).

#### *Styrker og svakheter*

Måling av IMT representerer direkte visualisering av karanatomi, og den brukes for visualisering av makroskopiske ateroskleroseforandringer. Metoden er ikke invasiv og er derfor veldig anvendelig i barneforsøk. Ulemper relatert til bruk av ultralyd innbefatter operatørvhengighet og begrensninger når det gjelder oppløselighet. Disse ulempene er mindre uttalt enn ved funksjonsmåling av arteria brachialis. På den annen side vil IMT målinger ikke kunne påvise endringer i NO biotilgjengelighet i tidlige stadier hvor det ikke foreligger strukturelle forandringer.

## **Risikofaktorer for aterosklerose og for endotel-dysfunksjon hos barn og unge**

Hos voksne kjenner man klassiske risikofaktorene for aterosklerose som hyperlipidemi, hypertensjon, røyking, diabetes mellitus og aldring (20). Ikke overraskende viser det seg at disse faktorene ikke bare gir nedsatt endotelfunksjon hos voksne, men også hos barn. I tillegg til disse tradisjonelle risikofaktorene finnes en del nye risikofaktorer som er mer eller mindre etablerte. I dette avsnittet vil en del av forskningen på de klassiske og de nye risikofaktorene for endotel-dysfunksjon og aterosklerose, hos barn og unge, bli gjennomgått.

### **Klassiske risikofaktorer**

#### **Hyperlipidemi**

En viktig årsak til hyperlipidemi hos voksne er et usunt kosthold. Men hyperlipidemi henger også sterkt sammen med genetiske tilstander som gir hyperlipoproteinemi. Mange forsøk er gjort på barn med en slik genetisk predisposisjon. Allerede i 1992 fant Celermajer og medarbeidere en sammenheng mellom nedsatt endotelfunksjon og familiær hyperkolesterolemi (FH) (27). I forsøket inkluderte han 10 barn, 2 homozygote og 8 heterozygote for tilstanden og 16 kontrollbarn. Forsøket viste at brachial FMD var signifikant dårligere hos barna med FH sammenlignet med kontrollene. Andre forsøk har vist at barn med familiær hyperkolesterolemi (FH) har økt risiko for utvikling av aterosklerose, og man har funnet endotel-dysfunksjon hos barn så tidlig som i 7 års alder (5).

I en studie fra 1997 gjort på 333 barn (42), fant man en sammenheng mellom brachial FMD og HDL-kolesterol. Jo lavere HDL verdier desto større grad av endotel-dysfunksjon. Det er derimot uenighet om "low density lipoprotein" (LDL) er forbundet med nedsatt brachial FMD og dermed nedsatt endotelfunksjon. I en studie fra 2000 (43), gjort på 57 barn 27 med FH og 30 kontrollbarn, fant man en svak negativ sammenheng. Men i to eldre studier, den ene fra 1994 (5) og den andre fra 1998 (44), fant man derimot ingen signifikant slik sammenheng. I den førstnevnte studien, hvor man inkluderte 58 barn med 28 med FH og 30 kontrollbarn, fant man at det var kun lipoprotein(a) som korrelerte med nedsatt brachial FMD blant alle lipidfraksjonene som ble testet. I følge en oversiktsartikkel fra 2004 (2), overensstemmer dette med mange studier gjort på voksne med familiær hyperkolesterolemi. Dette er av spesiell interesse fordi man kanskje ville forventet en sterkere sammenheng, siden nivået av LDL kolesterol gis så stor betydning klinisk.

#### **Hypertensjon**

Flere artikler antyder at det er en sammenheng mellom endotel-dysfunksjon og høyt blodtrykk hos barn (3, 45). Under arbeidet med denne teksten har det allikevel vært umulig å finne studier som kun ser direkte på denne sammenhengen. Noen studier har derimot sett på sammenhengen mellom hypertensjon og IMT i arteria carotis hos barn. En studie fra 1998 (46) bekrefter at det er en sammenhengen mellom økt systolisk blodtrykk og økt karotis IMT. I en annen studie fra 2003 (47), fant man derimot ingen slik sammenheng.

#### **Aktiv og passiv røyking**

Røyking har lenge vært en velkjent risikofaktor for hjerte og kar sykdom. Allerede i en studie fra 1993 (27), ble det vist at brachial FMD er nedsatt hos voksne røykere. I en annen studie fra 1996 gjort på barn og unge voksne i alderen 15-30 år (48), fant man at endotelfunksjonen også er nedsatt hos passive røykere, og at det er en dose-relatert sammenheng mellom

eksponeringen for røyk og størrelsen på den endotel avhengige dilatasjonen, målt med brachial FMD. I en studie fra 1999 gjort på unge voksne fra 15-39 år (49), demonstrerte de at endoteladyfunksjon pga passive røyking er delvis reversibel. Dette gjorde de ved å vise at endotel avhengig dilatasjon var signifikant bedre i en gruppe med tidligere passive røykere i forhold til en gruppe nåværende passive røykere. Allikevel hadde begge gruppene signifikant dårligere endotelavhengig vasodilatasjon enn gruppen som aldri hadde røyket, verken aktivt eller passivt.

### **Diabetes mellitus**

I en studie fra 2004 gjort på 75 barn, 45 med diabetes mellitus type 1 (DM 1) og 30 friske kontroll barn (50), var målet å teste om DM 1 var forbundet med endoteladyfunksjon, målt med brachial FMD, og om barna hadde tidlige strukturelle aterosklerotiske forandringer, målt med karotis IMT. De konkluderte med at barna med DM 1 hadde både nedsatt endotelfunksjon og begynnende ateroskleroseforandringer i karotis. Litt av bakgrunnen for denne studien var at kun en gruppe tidligere både hadde testet brachial FMD og karotis IMT hos barn DM. I denne studien hvor man undersøkte 66 barn, 35 med DM 1 og 31 friske kontroller (51), fant man også nedsatt endotelfunksjon, men normal karotis IMT. Begge disse studiene illustrerer at barn med DM 1 har redusert endotelfunksjon. Om utviklingen av aterosklerose har kommet så langt at man finner strukturelle forandringer allerede hos tenåringer synes usikkert.

### **Aldring**

Aldring er i seg selv en kjent risikofaktor for aterosklerose (20). I en studie, gjort på voksen mennesker i alderen fra 26 til 83 år, viste de at brachial FMD er omvendt korrelert med alder og brachial arterie diameter hos personer med lav kardiovaskulær risiko (målt med verktøy som SCORE, FRAMINGH, PROCAM). Den eneste studien jeg har funnet på dette området, når det gjelder barn, omhandlet arteriell stivhet (52). Denne studien viste at den arterielle stivheten øker med økt alder hos barnet. Barna som ble undersøkt var i alderen 6 mnd til 20 år. Under arbeidet med denne studien har det ikke vært mulig å finne artikler, hvor sammenhengen mellom alder og endotelfunksjon hos barn blir undersøkt.

## **Nye risikofaktorer**

### **Overvekt**

Flere nyere studier viser en sammenheng mellom overvekt, redusert endotelfunksjon og begynnende ateroskleroseutvikling. Om overvekt er en uavhengig risikofaktor for aterosklerose er kontroversielt, fordi det ofte koeksisterer med andre kardiovaskulære og metabolske forstyrrelser som hypertensjon, dyslipidemi og insulin resistens. I en australsk studie fra 2004, hvor de undersøkte 14 overvektige barn og 7 normale barn, viste de at overvektige barn har nedsatt endotelfunksjon sammenlignet med jevngamle (53). Endotelfunksjonen ble her målt med brachial FMD.

I en kinesisk studie fra 2004 (40), hvor 36 overvektige og 36 ikke overvektige barn ble undersøkt, ble det vist at overvekt hos ellers friske barn, selv i mild til moderat grad, er assosiert med nedsatt endotelfunksjon, målt med brachial FMD. I tillegg er det assosiert med begynnende ateroskleroseforandringer, målt med økt karotis IMT. Siden barn med moderat overvekt ofte ikke har koeksisterende risikofaktorer, er nettopp de et naturlig valg når man skal gjøre en slik type studie. Dataene antyder at til og med mild overvekt kan være en uavhengig risikofaktor for aterosklerose.

Det er usikkert hva som er sammenhengen mellom overvekt og arteriell dysfunksjon. Men fettvev er kjent for å slippe ut vasokative komponenter som leptin (54). I tillegg er økt mengde fettvev assosiert med insulin resistens, økt asymmetrisk dimetylarginin (ADMA) en endogen eNOS inhibitor, økte triglyseridnivåer etter måltid og økt grad av kronisk inflammasjon (påvisk ved økte nivåer av C-reaktivt protein og interleukon 6 (55)). Økt nivå av leptin er blitt assosiert med nedsatt vaskulær funksjon i eksperiment på musemodeller (56), og på overvektige ungdom (54), uavhengig av metabolske og inflammatoriske tilstander. I den sistnevnte studien fant de allikevel ingen signifikant sammenheng mellom endotelfunksjon, målt med brachial FMD, og konsentrasjonen av leptin.

### **Inflammasjon**

Både eksperimentelle og kliniske studier har bekreftet at inflammasjon har en fundamental rolle i ateroskleroseprosessen. Forøkning av C-reaktivt protein (CRP) og andre inflammasjonsmarkører er uavhengig av hverandre forbundet med økt risiko for kardiovaskulære hendelser (3). Sammenhengen mellom inflammasjon, endotel dysfunksjon og strukturell arteriell sykdom kommer til syne forholdsvis tidlig i barndommen. I en finsk studie av 79 friske 10 år gamle barn (39), viste det seg at til og med en lett forøket CRP var assosiert med nedsatt brachial FMD. I tillegg var den forbundet med en forøkt karotis IMT. Viktige proinflammatoriske tilstander som man ser i barndommen inkluderer blant annet fedme og eksponering for infeksiose agens.

### **Infeksjon**

Muligheten for at infeksjon spiller en rolle ved tidlig utvikling av aterosklerose, har vært debattert i mer enn 200 publiserte artikler i løpet av det siste tiåret (17). Allikevel vet man lite om hvilke innvirkning infeksjon har på endotelcellene. En studie fra 2005 (57), gjort på 600 barn, viste at akutt infeksjon hos barn er assosiert med nedsatt endotelfunksjon, målt med brachial FMD. I en annen studie fra 2002 (58), undersøkte man 48 barn, 28 med alvorlig akutt infeksjon (definert som kroppstemperatur > 38 grader celsius og C-reaktivt protein > 15 mg/ml) og 20 friske kontroll barn. Studien viste at alvorlig akutt infeksjon er assosiert med økt karotis IMT.

I en ovesiktsartikkel fra 2004 (17), har man sett på flere mulige hypoteser for hvordan infeksjon kan gi endoteldysfunksjon. Her gjengis et kort sammendrag. Hypotese 1: Infeksjon promoterer en systemisk inflammasjon som videre gir skadet endotel, og dermed initierer eller forverrer aterosklerose. Hypotese 2: Sirkulerende mikrobielle komponenter forårsaker en direkte skade på endotelet. (En klassisk illustrasjon er representert ved Gram negativ bakteriell sepsis, hvor massive utslipp av bakterielle komponenter i blodsirkulasjonen initierer skader, med alvorlighetsgrad fra forstyrrelse av vanlige regulatoriske mekanismer til endotelial nekrose.) Hypotese 3: En autoimmun response mot endoteliale proteiner kan etterfølge infeksjon pga strukturell homogenitet mellom menneskelige verts proteiner og patogene proteiner. Hypotese 4: Man får lokal endotelial skade etter mikrobiell kolonisering av arterieveggen.

Selv om man regner med at det er en årsakssammenheng mellom infeksjon og endoteldysfunksjon hos barn og unge, er det debatt om denne dysfunksjonen utvikler seg videre til aterosklerose i voksen alder. Noen forskere tror, på en annen side, at infeksjonsrelatert endoteldysfunksjon er viktig ved klinisk manifest aterosklerose. De første studiene som viste en sammenheng, mellom infeksjon og akutt hjerteinfarkt, ble utført på 1980-tallet. En gruppe forskerne oppdaget en økt prevalens av seriopositivitet for *C. pneumoniae* hos pasienter med gjennomgått hjerteinfarkt sammenlignet med kontrollpersoner



(59). Andre har vist at man finner økt forekomst av kardiovaskulære hendelser i forbindelse med influensaepidemier (60).

### **Prenatal programmering**

Det har vært mye diskusjon omkring temaet prenatal ”programmering” av langtids risiko for hjerte og karsykdom. Epidemiologiske studier i mange land har vist at lav fødselsvekt er assosiert med økt kardiovaskulær risiko. Dette kan delvis forklares med den økte prevalensen av nedsatt glukosetoleranse, diabetes type 2 og økt blodtrykket som man finner hos voksne personer født med lav fødselsvekt (3). Flere studier har vist en sammenheng mellom lav fødselsvekt og endotel-dysfunksjon. I en studie fra 1997 (42), utført på 333 barn mellom 9 og 11 år, ble endotelfunksjonen undersøkt med brachial FMD. Informasjon om fødselsvekt, maternelle faktorer og risiko faktorer (inkluder blodtrykk, lipid fraksjoner, glukose toleranse nivåer, eksponering for røyk og sosioøkonomisk status) var tilgjengelig hos alle barna. Studien viste en signifikant sammenheng mellom lav fødselsvekt og nedsatt endotelfunksjon. Av andre risikofaktorer fant man kun en signifikant sammenheng med HDL kolesterol og endotelfunksjon, jo lavere HDL verdier og desto større grad av endotel-dysfunksjon.

I en annen studie fra 1998 (61), utført på 30 ungdommer født med lav fødselsvekt (definert som vekt < 2,5 kg) og 30 ungdom med normal fødselsvekt (definer som vekt mellom 3,0 og 3,8 kg), fant man at endotelfunksjonen var signifikant redusert hos gruppen med lav fødselsvekt i forhold til normalgruppen. Barna var tilfeldig utvalgt fra kohortstudien ”The Cardiff Birth Survey”, og var født i perioden september 1975 til august 1977. Disse studiene tyder altså på at nedsatt føtal vekst øker mottakeligheten for aterosklerose.

Data fra nyere studier antyder at det ikke er den lave fødselsvekten i seg selv, men nedsatt føtal vekst som påvirker blodårene, slik at man senere får dysfunksjon og risiko for aterosklerose (62). Det er også foreslått at tidlig ernæring og ”catch-up” vekst i de første ukene etter fødsel kan spille en vesentlig rolle. I en intervensjonsstudie publisert i 2003 (63), hvor man ga økte mengder ernæringstilskudd, og dermed økt veksten, hos de nyfødte barna, under de første leveukene, fant man at dette medførte økt insulinresistens i ungdomsårene. En annen studie fra 2004 (64), gjort på 216 barn født før termin, og 61 barn født til termin, viste at jo større vektøkning man hadde i løpet av de første 2 ukene av livet, desto lavere brachial FMD målte man i ungdomsårene. Resultatet var uavhengig av fødselsvekt. Dette antyder at det kritiske vinduet for vaskulær og metabolsk programmering skjer etter fødsel heller enn ”in utero”. Det store potensialet for ernæringsintervensjon i løpet av de første ukene hos et nyfødt barn, gjør at denne kunnskapen kan ha stor betydning for folkehelsen på lengre sikt.

### **Homocystein**

#### *Homocysteinuri*

Forsøk har vist at personer med homocysteinuri har nedsatt FMD. I en engelsk studie fra 1993 (65), undersøkte man endotelfunksjonen hos 9 barn med homozygot homocysteinuri, og hos 14 av deres heterozygote foreldrene. For hver forsøksdeltaker fant man to matchende kontrollpersoner. I denne studien målte de endotelfunksjonen ved bruk av brachial FMD. Studien konkluderte med at endotelfunksjonen er nedsatt hos barn med homozygot homocysteinuri, men ikke hos deres heterozygote foreldre.

#### *Hyperhomocysteinemi*

Mange grupper har vist at et tre ganger økt nivå av sirkulerende homocystin, etter oral administrasjon av metionin (derivat av homocystein), gir en forbigående redusert endotelavhengig vasodilatasjon (66). Andre har vist at økt serumnivå av homocystein er

forbundet med redusert brachial FMD hos voksne (67). Allikevel finnes det motstridende resultater når det gjelder mild hyperhomocysteinemi og endotel dysfunksjon, og det er ingen klar enighet omkring hvordan homocystein i så fall inducerer endotel dysfunksjon (68). Uansett viser studier at høyere total plasma konsentrasjon av homocystein er assosiert med økt risiko for koronar sykdom, slag og venøs tromboembolisme (69).

### **Genetisk predisposisjon**

Viktigheten av familiær/ genetisk predisposisjon for aterosklerose er velkjent. En studie fra 1996 gjort på unge voksne (70), viser at det å ha en familiehistorie (første grads slektning) med tidlig hjerteinfarkt (menn 45 år, kvinner 55 år), er en risikofaktor for å ha nedsatt endotelfunksjon. I en studie fra 2000 (71), hvor de undersøkte 40 personer der foreldrene hadde hatt tidlig hjerteinfarkt og 40 kontrollpersoner, fant de at strukturelle og funksjonelle forandringer er til stede allerede i tidlig alder. Alderen på deltakerne i studien var 19+-5,2 år, og metodene de brukte var karotis IMT og brachial FMD.

Bruken av godkjente, standardiserte, ikke-invasive metoder, for å undersøke funksjonell og strukturell karsykdom hos barn gir nå mulighet for å undersøke hvilke betydning visse genetiske variasjoner har. Det å kunne undersøke individer tidlig i livet er viktig for å minimere effekten av de akkumulerte risikofaktorene man gjerne finner senere i livet, spesielt i den vestlige befolkning. Det er klart at store kohort studier er påkrevd for å se på interaksjonen mellom spesifikke gener og miljømessige faktorer, med tilstrekkelig statistisk styrke. Store studier som "Avon Longitudinal Study of Parents and Children" (ALSPAC) vil kanskje kunne gi svar på en rekke slike spørsmål, og undersøke videre hvordan disse faktorene driver den aterosklerotiske prosess gjennom puberteten og inn i voksenlivet.

### **Kroniske sykdommer**

Diabetes mellitus er allerede nevnt som en egen "klassisk" risikofaktor for endotel dysfunksjon og ateroskleroseutvikling. Men det finnes også andre kroniske tilstander hos barn som er forbundet med endotel dysfunksjon. I en oversiktsartikkel fra 2005 (72), fant man at endotel dysfunksjon er til stede hos barn ved alle stadier av nyresvikt, og at kardiovaskulære komplikasjoner er den viktigste årsak til død hos barn med terminal nyresvikt ("end-stage renal failure"= ESRF). I en studie fra 2002 ble 39 barn med gjennomgått Kawasaki sykdom undersøkt (73). Studien viste at barna hadde betydelig nedsatt brachial FMD i forhold til de 17 friske kontrollbarna. Det har vært diskusjon om retroviral terapi hos voksne akselererer ateroskleroseprosessen. En studie fra 2004 gjort på 49 HIV infiserte barn (74), hvor 34 fikk retroviral terapi, og 15 aldri var blitt behandlet og i tillegg 24 kontroller, konkluderte de med at HIV øker endotel dysfunksjonen hos barna, uavhengig av om de har fått retroviral terapi eller ikke. Andre tilstander som er forbundet med endotel dysfunksjon hos barn, er de som har gjennomgått hjerte kirurgi (75) og barn som får parenteral ernæring (76).

# Intervensjoner som forbedrer endotelfunksjonen hos barn og unge

## Farmakologisk intervensjon

### Statiner

Tidligere studier har vist at statiner bedrer endotelfunksjon hos voksne. I flere nyere intervensjonsforsøk gjort på barn med familiær hyperkolesterolemi (FH) finner man en signifikant bedring i endotelfunksjonen. I en studie gjort i Nederland (77), inkluderte man 50 barn med FH og 19 friske barn. Undersøkelser gjort før intervensjonen startet, viste at barn med FH hadde nedsatt brachial FMD i forhold til barn uten FH. Etter en 28 ukers bruk av simvastatin versus placebo, fant man at brachial FMD endret seg signifikant i simvastatingruppen i forhold til placebogruppen. I tillegg fant man at brachial FMD nivået hos intervensjonsgruppen nærmet seg nivået i normalgruppen etter intervensjonen. Man konkluderte ut fra dette at tidlig behandling med statiner kan være gunstig hos barn, siden man tror at ateroskleroseprosessen på dette tidspunkt er reversibel.

Ut fra studien nevnt i avsnittet over vet man allikevel ingenting om langtidsvirkningen statinbehandling vil ha på barn, og hvor effektiv den egentlig vil være på lang sikt. En annen og nyere studie fra Nederland har gått litt nærmere inn på denne problematikken, med en 2-år lang studie (78). Studien er allikevel altfor kortvarig til å kunne si noe om langtidsvirkninger av en slik behandling.

### ACE-hemmere

Mange forsøk viser at ACE-hemmere forbedrer endotelfunksjonen hos voksne (79-81). Under arbeidet med denne litteraturstudien, har det allikevel ikke vært mulig å finne artikler som undersøker om bruk av ACE-hemmere forbedrer endotelfunksjonen hos barn.

### Antioksidanter

Til tross for solide bevis for at oksidativt stress er medvirkende både når det gjelder endoteldysfunksjon (82) og når det gjelder ateroskleroseprosessen (83), har man ifølge flere oversiktsartikkel (3, 20) ikke klart å vise at antioksidant vitamin terapi gir klinisk effekt i store randomiserte studier. De nevner allikevel at det finnes mindre studier gjort på voksne som antyder det motsatte. Det ser ut til at få eller ingen av disse store randomiserte studiene har inkludert barn. En mindre studie av 15 barn med familiær hyperkolesterolemi eller familiær kombinert hyperlipidemi (84), viste imidlertid at antioksidant vitamin terapi (kombinert vitamin C og E), signifikant forbedret brachial FMD. Det samme resultatet fikk man i en eldre studie fra 1998 (44), hvor man gjorde et tilsvarende forsøk på 11 barn med hyperlipidemi.

### Omega-3 fettsyrer

Tilskudd av dokosaheksansyre, DHA, har i forsøk vist seg å bedre endotelfunksjonen hos voksne med blant annet hyperlipidemi. DHA er en omega-3 fettsyre som finnes naturlig i fet fisk og vegetabiliske oljer. I en amerikansk studie fra 2004 (85), gjort på 20 barn med familiær hyperkolesterolem (FH) og familiær kombinert hyperlipidemi (FCH), fant man en signifikant bedring i endotelfunksjonen, etter 6 uker med tilskudd av DHA.

### Folsyre

Folsyre har vist seg å senke blodnivået av homocystein fordi det virker som kofaktorer for et enzym involvert i metionin (derivat av homocystein) metabolismen (69). I en studie fra 2002

gjort på 56 barn (86), 36 med diabetes mellitus type 1 og 20 kontroll barn, viste de at bedret folatstatus er assosiert med bedre endotelfunksjon, målt som høyere brachial FMD. Folat kan kanskje derfor beskytte mot endoteldysfunksjon hos barn med diabetes. I en annen studie derimot, gjort på 25 barn med kronisk nyresvikt fant de ingen bedring i brachial FMD etter 8 ukers tilskudd av folat, selv om totalnivået av homocystein ble senket. Det er fortsatt uklart om administrering av vitaminer som reduserer homocystein nivå, kan senke risikoen for arterielle og/ eller venøse hendelser. Flere nylig avsluttede kliniske studier har ikke kunnet vise gunstig effekt av homocysteinsenkende effekt på kardiovaskulære hendelser (NORVIT, WASP) (69).

### **L-arginin**

Som nevnt innledningsvis er L-arginin substrat for dannelse av NO i endotelcellene. Man tror at tilskudd L-arginin kan bedre endotelfunksjon ved å minske virkningen av den endogene eNOS inhibitoren, asymmetrisk dimetylarginin (ADMA), i endotelcellene. Tilskudd av L-arginin har vist seg å gjenopprette den vaskulære funksjonen og forbedre kliniske symptomer ved ulike sykdommer forbundet med vaskulær dysfunksjon som f. eks angina, hjertesvikt og hypertensjon (87). Det ser allikevel ut som at få forsøk er gjennomført for å undersøke effekten av L-arginin hos barn. I en studie fra 2002 (88), gjort på 21 barn med kronisk nyresvikt, fikk barna L-arginin-tilskudd over en 4 ukers periode. Endotelfunksjonen ble målt med brachial FMD før og etter intervensjonen. Konklusjonen ble at L-arginin ikke bedrer endotelfunksjonen hos barn med nyresvikt, og er derfor ikke egnet som en brukelig klinisk behandling av nyresvikt hos barn.

## **Ikke-farmakologisk intervensjon**

### **Fysisk aktivitet**

Flere nyere forsøk er gjort for å undersøke effekten av trening på endotelfunksjon hos fete barn. Som nevnt ovenfor, er det vist at overvektige barn har nedsatt endotelfunksjon sammenlignet med jevnaldrende. I en studie fra 2004 (53), ble 14 overvektige barn inkludert, i tillegg til 7 normalvektige barn som ble brukt som kontroller. Intervensjonen i denne studien var 8 uker med fysisk trening. Resultatene viste at endotelfunksjon, målt med brachial FMD, bedret seg signifikant hos de overvektige barna. I en annen studie fra 2002 (89), hvor 47 normale barn ble undersøkt, ble det vist at til og med "vanlig" nivå av fysisk aktivitet, målt med en anerkjent stabil isotop teknikk, positivt korrelerer med brachial FMD.

### **Diett og diett kombinert med fysisk aktivitet**

En studie fra 2004 (90), hvor 82 overvektige barn (BMI > 23) ble inkludert, viste at et 6 ukers intervensjonsopplegg med enten diett alene eller diett sammen med fysisk aktivitet, ga en signifikant bedring i endotelfunksjon, målt med brachial FMD. Diett pluss fysisk aktivitet var forbundet med en signifikant høyere forbedring av brachial FMD enn diett alene. Hos de barna som fortsatte intervensjonen i et helt år vedvarte denne forbedringen. Hos barna som kun fikk et intervensjonsopplegg i 6 uker, viste kontrollmålingene etter et år, at forbedringen i brachial FMD, kun hadde vært forbigående i diett-alene gruppen. I diett-pluss-fysisk-aktivitet gruppen derimot, hadde man etter ett år, fortsatt en signifikant bedret brachial FMD i forhold til basismålingene.

## Avsluttende bemerkninger

Denne teksten har beskrevet mange ulike risikofaktorer for endoteldysfunksjon hos barn og unge. Når det gjelder de tradisjonelle risikofaktorene har det vært vanskelig å finne litteratur som spesifikt undersøker sammenhengene endoteldysfunksjon og hypertensjon hos barn, og sammenhengen endoteldysfunksjon og aldring, hvor barn er inkludert. Når det gjelder forskningen på de nye risikofaktorene, er det fortsatt mye usikkerhet omkring hvilken betydning endoteldysfunksjonen man finner hos barna vil ha for utvikling av aterosklerotisk sykdom i voksen alder. Kun store langvarige kohortstudier vil kunne gi svar på dette.

Intervensjon for å bedre endotelfunksjon kan være av medikamentell art eller det kan være livsstilsendringer. Farmakologisk behandling av barn krever at man har kunnskap om bivirkninger og langtidsvirkninger som en slik bruk kan ha. I tillegg må det bevises at slik behandling vil gi betydelig bedring av barnets langtidsrisiko for kardovakulære hendelser. Alle studiene nevnt over er relativt små, og de gir få eller ingen svar på verdien av langvarig behandling. Når man tar med i betraktningen, den store innvirkningen langvarig medikamentell behandling har, vil det per i dag kun være høy grad av risiko som er god nok indikasjon for medikamentell behandling av barn.

Livsstilsintervensjon, som regelmessig fysisk aktivitet, har gunstige virkninger for å forebygge hjerte- og karsykdom, både ved å ha en direkte effekt på endotellaget, men også indirekte ved å minske andre risikofaktorer. Som nevnt over er ”vanlig” nivå av fysisk aktivitet positivt korrelerer med brachial FMD. To andre studier, nevnt over, har vist at også antioksidanter bedrer endotelfunksjon hos barn. I den ene studien understrekes det at man kan oppnå et tilsvarende nivå av vitamin C som det som ble brukt i studien, ved å spise fem enheter frukt eller grønnsaker om dagen. I tillegg vil man oppnå et like høyt nivå av vitamin E ved inntak av hel korn og nøtter. Konklusjonen ut fra dette må være at på det nåværende tidspunkt, er de beste rådene man kan gi for å bedre barns endotelfunksjon, kun velkjente råd om kosthold og fysisk aktivitet.

Denne litteraturstudien har gått igjennom mange kliniske forsøk gjort på barn og unge. Det er nevnt to metoder som egner seg til forsøk hos barn. Hovedårsaken til dette, er at disse metodene er ikke-invasive. I tillegg er de raske å gjennomføre, og medfører lite plager for forsøkspersonen. Den ene er brachial FMD. En metode som stort sett er brukt i alle endotelfunksjonsforsøkene gjort på barn, nevnt i denne teksten. Den andre er RH-PAT metoden. En nyere metode som foreløpig ikke er utprøvd hos barn. Men som er interessant spesielt med tanke på at den er lite operatørvhengig. Hver metode nevnt i teksten har allikevel begrensninger som per i dag gjør at ingen er egnet til bruk i klinisk rutinesammenheng verken hos barn eller voksne. Den kanskje viktigste tilnærmingen, for en framtidig bruk av endotelfunksjons måling ved behandling av pasienter, er at metodene standardiseres og understøttes av resultater i store kliniske studier.

## Referanser

1. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998 Jun 4; 338(23): 1650-6.
2. Slyper AH. Clinical review 168: What vascular ultrasound testing has revealed about pediatric atherogenesis, and a potential clinical role for ultrasound in pediatric risk assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul; 89(7): 3089-95.
3. Halcox JP, Deanfield JE. Endothelial cell function testing: how does the method help us in evaluating vascular status? *Acta Paediatr Suppl.* 2004 Dec; 93(446): 48-54.
4. Celermajer DS. Endothelial Dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997 Aug; 30(2): 325-33.
5. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest.* 1994 Jan; 93(1): 50-5.
6. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994 Nov 15; 24(6): 1468-74.
7. Schoen FJ, Cotran RS 1999 Blood vessels. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds Robbins pathologic basis of disease, 6th Ed. Philadelphia: Saunders; 493-541
8. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension.* 1989 Jun; 13(6 Pt 2): 658-67.
9. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina (Kaunas).* 2003; 39(4): 333-41.
10. Ryan JW, Ryan US. Endothelial surface enzymes and the dynamic processing of plasma substrates. *Int Rev Exp Pathol.* 1984;26:1-43.
11. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989 Oct 28; 2(8670): 997-1000.
12. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997 Nov 1; 100(9): 2153-7.
13. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov 27;288(5789):373-6.
14. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension.* 1986 Jan;8(1):37-44.
15. Harrison, D.G. Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. *Cardiol. Clin.* 1996. Feb 14(1): 1-15.
16. Perrone J, Hollander JE, De Roos F. Cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med.* 1998 Oct 8; 339(15) :1083-4.
17. Liuba P. Arterial endothelial injury due to infection in childhood: ticking bomb or innocent bystander? *Acta Paediatr Suppl.* 2004 Dec; 93(446): 55-62.
18. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986 Oct 23; 315(17): 1046-51.
19. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1990 Feb; 81(2): 491-7.
20. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Oct 1; 42(7): 1149-60.
21. Gagliardi MG, Adorisio R, Crea F, Versacci P, Di Donato R, Sanders SP. Abnormal vasomotor function of the epicardial coronary arteries in children five to eight years after arterial switch operation: an angiographic and intracoronary Doppler flow wire study. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Oct 18; 46(8): 1565-72.
22. Drexler H, Zeiher AM. Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension.* 1991 Oct; 18(4 Suppl): II90-9.
23. Houghton JL, Davison CA, Kuhner PA, Torosov MT, Strogatz DS, Carr AA. Heterogeneous vasomotor responses of coronary conduit and resistance vessels in hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Feb; 31(2): 374-82.

24. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO 3rd. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1995 Apr; 95(4): 1747-55.
25. Chilian WM, Eastham CL, Marcus ML. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. *Am J Physiol.* 1986 Oct; 251(4 Pt 2): H779-88.
26. M. Giulia Gagliardi, F. Crea, B. Polletta, C. Bassano, G. La Vigna, L. Ballerini and P. Ragonese. Coronary microvascular endothelial dysfunction in transplanted children. *Eur Heart J.* 2001 Feb; 22(3): 254-60.
27. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992 Nov 7; 340(8828): 1111-5.
28. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26:1235-41.
29. Takase B, Uehata A, Gerhard MD, et al. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilatation in coronary and brachial arteries in suspected coronary disease. *Am J Cardiol.* 1998; 82:1535-39
30. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002 Apr 2; 105(13):1567-72.
31. Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol.* 2000 Nov; 50(5): 397-404.
32. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1990 Jul; 86(1): 228-34.
33. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990 Jul 5; 323(1): 22-7.
34. Hokanson DE, Sumner DS, Strandness DE Jr. An electrically calibrated plethysmograph for direct measurement of limb blood flow. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1975 Jan; 22(1): 25-9.
35. Laget av Itamar Medical Ltd., Caesaerrea, Israel
36. Bonetti PO, Barsness GW, Keelan PC, Schnell TI, Pumper GM, Kuvin JT, Schnall RP, Holmes DR, Higano ST, Lerman A. Enhanced external counterpulsation improves endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003 May 21; 41(10): 1761-8.
37. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelson JE. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J.* 2003 Jul; 146(1): 168-74.
38. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Dec 7; 44(11): 2137-41.
39. Jarvisalo MJ, Harmoinen A, Hakanen M, Paakkunainen U, Viikari J, Hartiala J, Lehtimäki T, Simell O, Raitakari OT. Elevated serum C-reactive protein levels and early arterial changes in healthy children. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Aug 1; 22(8): 1323-8.
40. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C, Celermajer DS. Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004 Jul; 28(7): 852-7.
41. Juonala M, Viikari JS, Laitinen T, Marniemi J, Helenius H, Ronnema T, Raitakari OT. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation.* 2004 Nov 2; 110(18): 2918-23.
42. Leeson CP, Whincup PH, Cook DG, Donald AE, Papacosta O, Lucas A, Deanfield JE. Flow-mediated dilation in 9- to 11-year-old children: the influence of intrauterine and childhood factors. *Circulation.* 1997 Oct 7; 96(7): 2233-8.
43. Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Girardet JP, Brucker E, Polak M, Safar ME, Levy BI. Arterial mechanical changes in children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Sep; 20(9): 2070-5.
44. Mietus-Snyder M, Malloy MJ. Endothelial dysfunction occurs in children with two genetic hyperlipidemias: improvement with antioxidant vitamin therapy. *J Pediatr.* 1998 Jul; 133(1): 35-40.
45. Goonasekera CD, Dillon MJ. Vascular endothelium and nitric oxide in childhood hypertension. *Pediatr Nephrol.* 1998 Oct; 12(8): 676-89.
46. Sass C, Herbeth B, Chapet O, Siest G, Visvikis S, Zannad F. Intima-media thickness and diameter of carotid and femoral arteries in children, adolescents and adults from the Stanislas cohort: effect of age, sex, anthropometry and blood pressure. *J Hypertens.* 1998 Nov; 16(11): 1593-602.

47. Sorof JM, Alexandrov AV, Cardwell G, Portman RJ. Carotid artery intimal-medial thickness and left ventricular hypertrophy in children with elevated blood pressure. *Pediatrics*. 2003 Jan; 111(1): 61-6.
48. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med*. 1996 Jan 18; 334(3): 150-4.
49. Raitakari OT, Adams MR, McCredie RJ, Griffiths KA, Celermajer DS. Arterial endothelial dysfunction related to passive smoking is potentially reversible in healthy young adults. *Ann Intern Med*. 1999 Apr 6; 130(7): 578-81.
50. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, Lehtimäki T, Ronnema T, Viikari J, Raitakari OT. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation*. 2004 Apr 13; 109(14): 1750-5.
51. Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Feb 19; 41(4): 661-5.
52. Senzaki H, Akagi M, Hishi T, Ishizawa A, Yanagisawa M, Masutani S, Kobayashi T, Awa S. Age-associated changes in arterial elastic properties in children. *Eur J Pediatr*. 2002 Oct; 161(10): 547-51.
53. Watts K, Beye P, Siafarikas A, O'Driscoll G, Jones TW, Davis EA, Green DJ. Effects of exercise training on vascular function in obese children. *J Pediatr*. 2004 May; 144(5): 620-5.
54. Singhal A, Farooqi IS, Cole TJ, O'Rahilly S, Fewtrell M, Kattenhorn M, Lucas A, Deanfield J. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? *Circulation*. 2002 Oct 8; 106(15): 1919-24.
55. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppock SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Apr; 19(4): 972-8.
56. Nishina PM, Naggert JK, Verstuyft J, Paigen B. Atherosclerosis in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow. *Metabolism*. 1994 May; 43(5): 554-8.
57. Charakida M, Donald AE, Terese M, Leary S, Halcox JP, Ness A, Davey Smith G, Golding J, Friberg P, Klein NJ, Deanfield JE; ALSPAC (Avon Longitudinal Study of Parents and Children) Study Team. Endothelial dysfunction in childhood infection. *Circulation*. 2005 Apr 5; 111(13): 1660-5.
58. Liuba P, Persson J, Luoma J, Yla-Herttuala S, Pesonen E. Acute infections in children are accompanied by oxidative modification of LDL and decrease of HDL cholesterol, and are followed by thickening of carotid intima-media. *Eur Heart J*. 2003 Mar; 24(6): 515-21.
59. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*. 1988 Oct 29; 2(8618): 983-6.
60. Tillett HE, Smith JW, Gooch CD. Excess deaths attributable to influenza in England and Wales: age at death and certified cause. *Int J Epidemiol*. 1983 Sep; 12(3): 344-52.
61. Goodfellow J, Bellamy MF, Gorman ST, Brownlee M, Ramsey MW, Lewis MJ, Davies DP, Henderson AH. Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovasc Res*. 1998 Dec; 40(3): 600-6.
62. Singhal A, Kattenhorn M, Cole TJ, Deanfield J, Lucas A. Preterm birth, vascular function, and risk factors for atherosclerosis. *Lancet*. 2001 Oct 6; 358(9288): 1159-60.
63. Singhal A, Fewtrell M, Cole TJ, Lucas A. Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet*. 2003 Mar 29; 361(9363): 1089-97.
64. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Deanfield J, Lucas A. Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation*. 2004 Mar 9; 109(9): 1108-13.
65. Celermajer DS, Sorensen K, Ryalls M, Robinson J, Thomas O, Leonard JV, Deanfield JE. Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Sep; 22(3): 854-8.
66. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr*. 2000 Aug; 72(2): 315-23.
67. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*. 1997 Mar 4; 95(5): 1119-21.
68. Moat SJ, McDowell IF. Homocysteine and endothelial function in human studies. *Semin Vasc Med*. 2005 May; 5(2): 172-82.
69. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost*. 2005 Nov; 94(5): 907-15.
70. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation*. 1997 Nov 18; 96(10): 3378-83.



71. Gaeta G, De Michele M, Cuomo S, Guarini P, Foglia MC, Bond MG, Trevisan M. Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2000 Sep 21; 343(12): 840-6.
72. Bonnet D, Aggoun Y, Szezepanski I, Bellal N, Blanche S. Endothelial function in pediatric patients on peritoneal dialysis: the need for data. *Perit Dial Int.* 2005 Feb; 25 Suppl 3: S127-9.
73. Deng YB, Xiang HJ, Chang Q, Li CL. Evaluation by high-resolution ultrasonography of endothelial function in brachial artery after Kawasaki disease and the effects of intravenous administration of vitamin C. *Circ J.* 2002 Oct; 66(10): 908-12.
74. Bonnet D, Aggoun Y, Szezepanski I, Bellal N, Blanche S. Arterial stiffness and endothelial dysfunction in HIV-infected children. *AIDS.* 2004 Apr 30; 18(7): 1037-41.
75. Brix-Christensen V. The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2001 Jul; 45(6): 671-9.
76. Aggoun Y, Szezepanski I, Bonnet D. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events in children. *Pediatr Res.* 2005 Aug; 58(2): 173-8.
77. de Jongh S, Lilien MR, op't Roodt J, Stroes ES, Bakker HD, Kastelein JJ. Early statin therapy restores endothelial function in children with familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Dec 18; 40(12): 2117-21.
78. Wiegman A, Hutten BA, de Groot E, Rodenburg J, Bakker HD, Buller HR, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. Efficacy and safety of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004 Jul 21; 292(3): 331-7.
79. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation.* 1996 Aug 1; 94(3): 258-65. Erratum in: *Circulation* 1996 Sep 15; 94(6): 1490.
80. Prasad A, Husain S, Quyyumi AA. Abnormal flow-mediated epicardial vasomotion in human coronary arteries is improved by angiotensin-converting enzyme inhibition: a potential role of bradykinin. *J Am Coll Cardiol.* 1999 Mar; 33(3): 796-804.
81. Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahham S, Quyyumi AA. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2000 May 23; 101(20): 2349-54.
82. Schulz E, Anter E, Keaney JF Jr. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem.* 2004 May; 11(9): 1093-104.
83. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997 Aug 7; 337(6): 408-16.
84. Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, Stuehlinger M, Lin KY, Cooke JP, Morrow JD, Ridker PM, Rifai N, Miller E, Witztum JL, Mietus-Snyder M. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation.* 2003 Sep 2; 108(9): 1059-63.
85. Engler MM, Engler MB, Malloy M, Chiu E, Besio D, Paul S, Stuehlinger M, Morrow J, Ridker P, Rifai N, Mietus-Snyder M. Docosahexaenoic acid restores endothelial function in children with hyperlipidemia: results from the EARLY study. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2004 Dec; 42(12): 672-9.
86. Wiltshire EJ, Gent R, Hirte C, Pena A, Thomas DW, Couper JJ. Endothelial dysfunction relates to folate status in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002 Jul; 51(7): 2282-6.
87. Boger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev.* 2005 Mar; 10(1): 14-23.
88. Bennett-Richards KJ, Kattenhorn M, Donald AE, Oakley GR, Varghese Z, Bruckdorfer KR, Deanfield JE, Rees L. Oral L-arginine does not improve endothelial dysfunction in children with chronic renal failure. *Kidney Int.* 2002 Oct; 62(4): 1372-8.
89. Abbott RA, Harkness MA, Davies PS. Correlation of habitual physical activity levels with flow-mediated dilation of the brachial artery in 5-10 year old children. *Atherosclerosis.* 2002 Jan; 160(1): 233-9.
90. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C, Celermajer DS. Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children. *Circulation.* 2004 Apr 27; 109(16): 1981-6.