

# Endotelfunksjon målt med FMD – metoden hos pasienter med revmatoid artritt

Av: stud.med. Njål Tage Gjerdalen

Veiledere: dr. philos Jonny Hisdal

og

Lege og stipendiat Gard Filip Gjerdalen



Mars 2011

Det Medisinske Fakultet

Universitet i Oslo

## Abstract (engelsk)

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is a known chronic inflammatory disease. It has been reported that this inflammation can affect the endothelium of blood vessels and induce a dysfunction. We wanted to examine patients with rheumatoid arthritis and whether they have an impaired flow-mediated dilation (FMD), as a measure of endothelial dysfunction.

**Methods:** In this study 27 patients with rheumatoid arthritis were selected from a larger study. We measured FMD response and compared them with a group of 33 healthy controls. We also studied the time from ended occlusion to maximum dilation (time to peak).

**Results:** There was a significant difference in FMD between the group of RA patients compared with healthy controls ( $p = 0.008$ ). RA patients display a FMD of  $6.3 \pm 4.2\%$  while our healthy controls had an FMD of  $10.5 \pm 6.7\%$ .

There was no significant difference between groups in the "time to peak". RA group reached the maximum dilation after  $68 \pm 28$  seconds, and the controls had the highest diameter of  $61 \pm 22$  seconds.

**Discussion:** We found a significantly lower FMD response in the group of RA patients than healthy controls. This may indicate that patients with rheumatoid arthritis have an inflammatory response, resulting in a endothelial dysfunction, measured by an impaired FMD response.

## Innholdsfortegnelse

Abstract (engelsk) .....	2
Forord.....	4
Abstrakt (norsk).....	5
Introduksjon.....	6
Endotel.....	7
Endotelfunksjon og blodstrøm.....	7
Nitrogen oksid (NO) .....	7
Endotelfunksjon og revmatoid artritt .....	8
Måling av endotelfunksjon .....	11
FMD-metoden.....	11
FMD variasjoner .....	14
Mitt prosjekt .....	16
Metode.....	17
Protokoll.....	17
Resultater.....	19
Diskusjon.....	21
Referanser.....	23

## Forord

Jeg vil gjerne takke dr. philos Jonny Hisdal ved sirkulasjonsfysiologisk seksjon, Oslo Univeristetspsykehus, Aker for hans hjelp, veiledning, kritiske vurdering, bidrag og inspirasjon i oppgaveskrivingen.

Jeg vil også takke lege og stipendiat Gard Filip Gjerdalen som og har støttet meg i utformingen av denne oppgaven.

## Abstrakt (norsk)

**Introduksjon:** Revmatoid artritt (RA) er en kjent kronisk inflammatorisk sykdom. Det er tidligere rapportert at denne inflammasjonen kan påvirke endotel i blodårene til å gi en endret respons/dysfunksjon. Vi ønsket å undersøke pasienter med revmatoid artritt og om de har en svekket flow-mediert dilatasjon (FMD), som mål på endotel dysfunksjon.

**Metoder:** I denne studien plukket vi ut 27 pasienter med revmatoid artritt av en større studie. Hos disse målte vi FMD responsen og sammenlignet med en gruppe på 33 friske kontroller. Vi studerte også tiden fra man slapp okklusjonen til maksimal dilatasjon (time to peak).

**Resultater:** Det var en signifikant forskjell i FMD mellom gruppen med RA-pasienter sammenlignet med friske kontroller ( $p=0,008$ ). RA pasientene viste en FMD på  $6,3 \pm 4,2$  % mens våre friske kontroller hadde en FMD på  $10,5 \pm 6,7$  %

Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene i "time to peak". RA gruppen nådde maksimal dilatasjon etter  $68 \pm 28$  sekunder, og kontrollene hadde høyest diameter etter  $61 \pm 22$  sekunder.

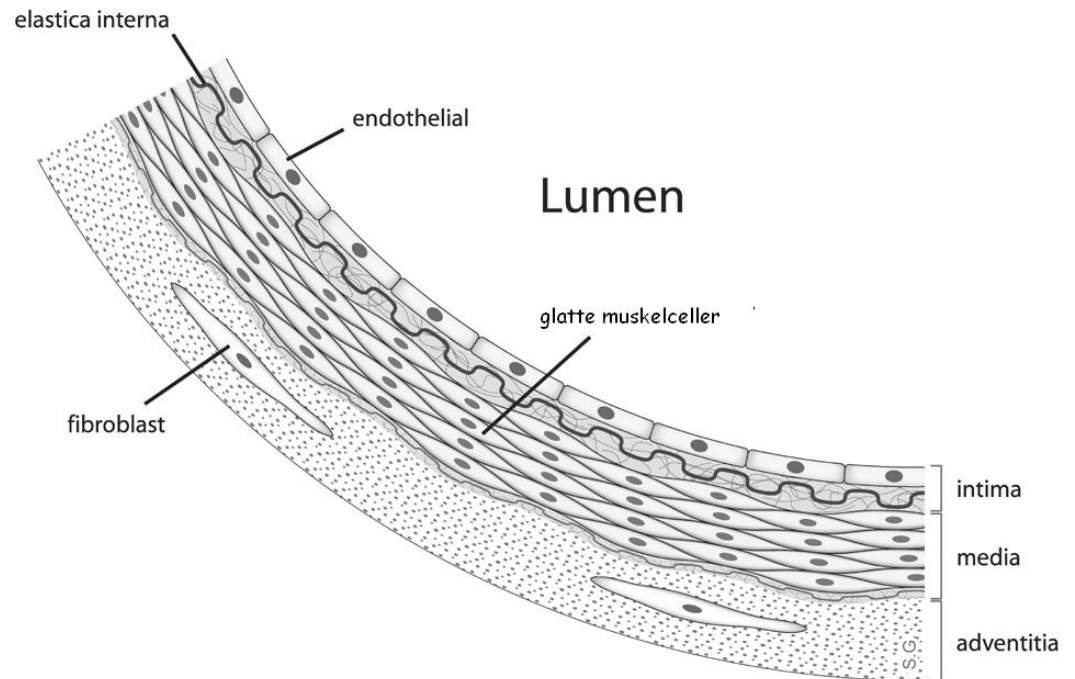
**Diskusjon:** Vi fant en signifikant lavere FMD respons i gruppen med RA pasienter enn friske kontrollene. Dette kan tyde på at pasienter med revmatoid artritt har en inflammatorisk respons, som gir en endotel dysfunksjon, målt ved en svekket FMD respons.

## Introduksjon

Kroppens sirkulasjonssystem er et organsystem som alltid har vært i menneskers fasinasjon.

Organsystemets oppgave er å transportere blodet med dets innhold rundt i kroppen, og fordele det til de ulike organer. Oppbygningen og reguleringen av dette systemet har vært mye i forskernes søkelys, og kunnskaper rundt dets anatomi og fysiologi blir stadig bedre. Blodet transporteres fra hjertet, gjennom aorta og ut til de ulike arteriene. Herfra strømmes blodet ut i forgreninger til arterioler og kapillærer, før det samler seg i venyler, så i vener som transporterer blodet tilbake til hjertet. De ulike blodåretypene er bygget opp ganske likt, delt opp i *tunica intima*, *tunica media* og *tunica adventitia* (fig. 1). *Tunica adventitia* består av bindevev og stabiliserer blodåren. *Tunica media* består av glatte muskelceller, mens *tunica intima* består av endotelceller og basalmembran. Endotelcellene ligger an mot lumen av blodåren. Tidligere trodde man at dette laget først og fremst skulle sørge for liten friksjon mellom blodet og blodårene, men i

den senere tid har man oppdaget at dette laget også spiller en viktig rolle når det gjelder; regulering av perfusjon, væske og stoffutveksling, hemostase og koagulasjon, inflammatorisk respons, vaskulogenese og angiogenese<sup>1</sup>.



**Figur 1.** Hentet fra: *Anatomy overview of a human artery 2005 Stijn A.I.Ghesquiere*

## Endotel

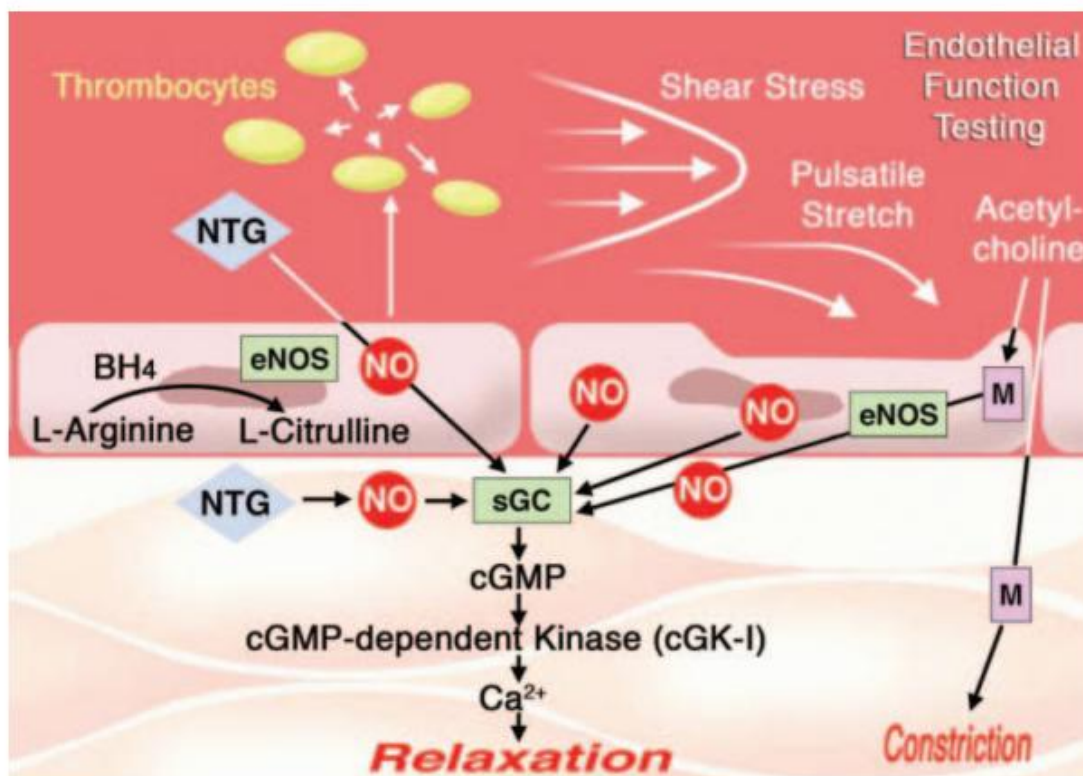
Endotelet er et enlaget epitelcellelag som danner det innerste laget mot lumen i blodkar og lymfesystem. Tidligere mente man disse cellene var kun fungerte som en passiv barriere mellom blod og blodkar, men med tiden har endotelet vist seg å være et organ med mange vitale funksjoner i det kardiovaskulære system. Endotelet har et samlet areal på opp mot 350 m<sup>2</sup> med en relativt lav vekt på 110g<sup>2</sup>.

## Endotelfunksjon og blodstrøm

I løpet av de siste tiår har det blitt gjort store fremskritt i klarlegging av de molekylære mekanismene i den endotel- avhengige reguleringen av vaskulær tonus og blodstrøm. Kroppens vev må kunne tilpasse seg metabolske forandringer hele tiden, og det sirkulatoriske system har mange kontrollmekanismer for å opprettholde riktig blodstrøm til hvert organ. Riktig blodstrøm reguleres ut i fra sentrale og lokale mekanismer som påvirker glatt muskulatur i blodåreveggen. Endotelcellene har en viktig rolle i denne reguleringen av vaskulær tonus og hemostase, spesielt i arterier. Endotelcellenes utslipp av nitrogen oksid (NO), har en vasodilaterende effekt som spiller en viktig rolle i denne reguleringen. Påvirkning av luminalsiden av endotelcellene i form av endret blodstrøm og den sykliske belastningen på åreveggen gir et utslipp av NO<sup>3</sup>. Nitrogen oksid er imidlertid ikke den eneste vasodilaterende substans, skjære kreftene (shear stress) er også kjent for å stimulere dannelsen av prostasyklin (PG<sub>2</sub>) og endothel derived hyperpolariserende factor (EDHF). Den sykliske belastningen på åreveggen kan også stimulere dannelsen av endothelin-1 (ET-1) som er en kjent vasokonstriktor<sup>4</sup>.

## Nitrogen oksid (NO)

NO er en svært flyktig gassforbindelse, som blir dannet av endotelial NO syntase (eNOS) (fig.2). Dette reguleres både av Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> avhengige og Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> uavhengige prosesser<sup>1,4</sup>. Dannelsen av NO stimuleres for eksempel av hypoksi, acetylcholin, bradykinin, serotonin, eller en økning i skjære krefter forårsaket av økt blodstrøm<sup>5</sup>. Det viktigste stimulus er imidlertid skjærekreftene og det viskøse drag som blodet utgjør på endotelet<sup>6</sup>. Ved stimulering kan NO produksjon øke 2-4 ganger og vil holde seg på dette nivået så lenge stimuleringen pågår<sup>6</sup>. eNOS produserer også L-citrulline fra L-arginin og O<sub>2</sub>, som respons fra de ulike reseptoravhengige agonistene (bradykinin, acetylcholin, adenosin trifosfat-ATP) og fysiokjemiske stimuli<sup>7</sup>. Det er i tillegg vist at man kan få en økning i aktiviteten av eNOS ved fysisk aktivitet<sup>8</sup>.



**Figur 2.** Når nitrogenoksid (NO) binder seg til løselig guanyl cyclase (sGC) vil dannelsen av syklisk guanosin monofosfat (cGMP) øke vesentlig. cGMP vil så aktivere cGMP – avhengi kinase 1 (cGK-1) som vil øke strømmingen gjennom Ca<sup>2+</sup> aktiverte K<sup>+</sup> (Bk)-kanaler som induserer en hyperpolarisering av de glatte muskelcellene og hemning av agonist-indusert Ca<sup>2+</sup> innfluks. Dette gjør at de glatte musklene slapper av og derav en vasodilatasjon<sup>9</sup>. Figur hentet fra: Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction(Munzel T 2008).

### Endotelfunksjon og revmatoid artritt

Atherosklerose er kjent som en inflammatorisk tilstand med likheter til den inflammatoriske responsen man ser hos pasienter med revmatoid artritt (RA). Studier har vist at dødeligheten er økt med mellom 1,13 – 2,98 ganger hos pasienter med revmatoid artritt (RA) (positiv revmatoid faktor)<sup>10</sup>. Studier har videre vist at forventet levetid er redusert med 10-15 år hos RA pasienter sammenlignet med friske kontroller<sup>11</sup>. Det har også nylig blitt publisert data som tyder på at den kardiovaskulære dødeligheten hos RA-pasienter er økt med ca 50 %, sammenlignet med befolkningen generelt<sup>12</sup>. Pasienter med RA har høyere prevalens av hypertensjon<sup>13</sup> og har ofte en unormal lipidprofil, med relativt lav konsentrasjon av

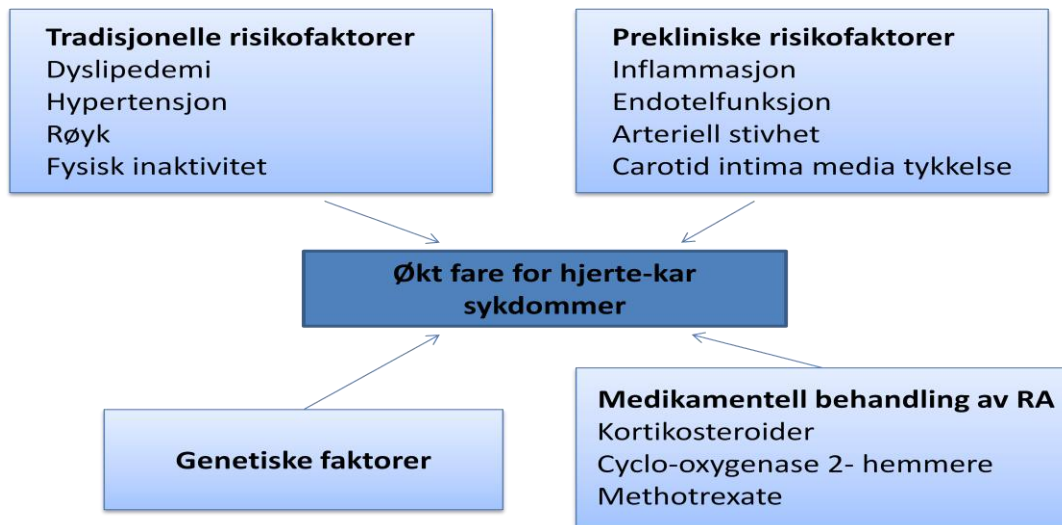


HDL-kolesterol, mens normal total og LDL-kolesterol<sup>14</sup>. Fysisk aktivitet er kjent for å redusere risiko for hjerte-karsykdommer og denne betydningen syntes å se enda større ut hos pasienter med RA enn befolkningen generelt<sup>15</sup>. Røyking derimot ser ut til å ha en mindre påvirkning av risiko for hjerte-karsykdommer hos pasienter med RA, enn befolkningen generelt<sup>16</sup>.

Studier har vist at personer som er genetisk disponerte for en kronisk høy inflammatorisk respons har økt risiko for kardiovaskulære hendelser og død<sup>17</sup>. Atherosklerose er kjent som en inflammatorisk tilstand, og likheter i denne inflammatoriske responsen er funnet hos pasienter med revmatoid artritt. Molekyler som CRP og tumor nekrose faktor (TNF) har en viktig rolle i dannelsen av atherosklerose og kardiovaskulær dødelig hos pasienter med RA<sup>18</sup>. Systemisk inflammasjon og pro-inflammatoriske cytokiner kan føre til lavere utslipp av nitrogenoksider<sup>19</sup>. I en ny studie blir det foreslått at inflammasjon gir en endotel-dysfunksjon gjennom aktivering av induserbart nitrogenoksidase (eNOS) og oksidativt stress, som igjen medfører mindre utslipp av endotelialt eNOS og derav en lavere biotilgjengelig NO<sup>20</sup>.

Dette forholdet mellom RA og endotelfunksjon er vist i flere studier der de har funnet en svekket FMD, selv i tidlig stadier av sykdommen<sup>21</sup>. Grad av svekket FMD varierer også i korrelasjon til grad av inflammasjon. Studier har også vist at FMD kan øke signifikant hos pasienter med revmatoid artritt fra  $3.7 \pm 2.2\%$  til  $6.7 \pm 3.8\%$  med statinbehandling<sup>22</sup>.

Så det er mange ulike årsaker til at pasienter med revmatoid artritt har økt forekomst av hjerte- kar sykdommer. Vi deler de i tradisjonelle risikofaktorer, prekliniske risikofaktorer, genetiske faktorer og den medikamentelle behandlingen av RA (figur3). I denne oppgaven skal vi se mer på endotelfunksjon/dysfunksjon hos RA-pasienter.



**Figur 3.** Ulike riskofaktorer for hjerte-kar sykdom hos pasienter med RA<sup>19</sup>.

## Måling av endotelfunksjon

Endotelfunksjon kan måles på mange måter både direkte og indirekte, invasive og non-invasive metoder (tabell 1). Koronar angiografi har lenge vært hjørnesteinen i vurderingen i aterosklerose og endotelfunksjon. Senere har mer skånsomme og non-invasive metoder kommet til og representerer presise mål på endotelfunksjon.

Tabell 1. Viser ulike metoder for å måle endotelfunksjon.

Metode	Teknikk	Stimulus	Karnivå
Intrakoronar infusjon	Kvantitativ koronar angiografi	Infusjon av vasoaktive agonister (f.eks.acetylkolin)	Epikardial koronararterie
Intrabrachial infusjon	Venøs okklusjon pletysmografi	Infusjon av vasoaktive agonister (f.eks.acetylkolin)	Underarms arterioler
Flow-mediert dilatasjon	Ultralyd	Arteriell okklusjon for å indusere hyperemi	Arteria brachialis
Laser doppler flowmetri	Doppler undersøkelser av blodceller i bevegelse	Iontoforese av vasoaktiv agonister (f.eks.acetylkolin)	Hudens mikrosirkulasjon
Pulsbølge analyser	Tonometri	B <sub>2</sub> -reseptoragonist (f.eks.salbutamol)	Arteria radialis
Pulskontur analyser	Fotopletysmografi	B <sub>2</sub> -reseptoragonist (f.eks.salbutamol)	Digital puls volum
Biomarkører	Enzym-bundet immunosorbent, radioimmuno undersøkelse	Endotelial aktivering og/eller dysfunksjon	Plasma

Tabell fra: *The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis Khan F.( 2010)*

## FMD-metoden

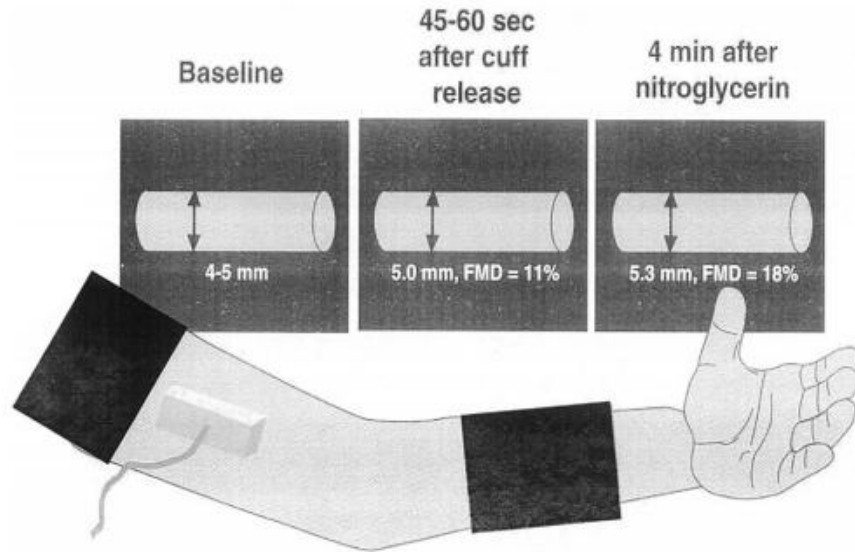
Når en blodåre blir utsatt for økt blodgjennomstrømning og derav økte skjære krefter vil den, slikt omtalt tidligere, reagere ved å utvide seg. Dette kalles flow mediert dilatasjon (FMD) (fig. 4). FMD-metoden går ut på å måle endring i diameter av *a.brachialis* ved hjelp av ultralyd. Diameteren blir målt før og etter underarmen blir utsatt for hyperemi ved hjelp av en mansjett.

FMD-metoden er svært operatørvhengig, og det kreves en viss grad av ekspertise for å undersøke vasodilatasjon ved hjelp av ultralyd av arteria brachialis. Hos godt trente undersøkere viser testen en enstemmig vasodilatasjon hos unge friske med normal endotelfunksjon (FMD)<sup>23</sup>.

Dette fenomenet ble aller først oppdaget av Schretzenmayer i 1933 da de observerte at hyperemi, eller oksygenmangel av hundens bakben ga en reaktiv dilatasjon av dens femoralis arterier i bakbena<sup>24</sup>. Senere har fenomenet blitt gjentatt i ulike dyreforsøk, men de første til å demonstrere denne flow-medierte dilatasjonen i store arterier hos mennesker var Anderson i 1989<sup>25</sup>. De okkluderte underarmen med en mansjett på 200 mmHg i 10 min og målte deretter dilatasjonen av *a.brachialis* ved ultralyd . De målte venstre arm i midtthorakalt nivå, med stabil temperatur og fant en signifikant økning i diameter.

Furchgott og hans medarbeidere viste i 1980 at endotelcellene har en viktig rolle for avslapningen av blodårer, stimulert av muskarinresptorer<sup>26</sup>. Murad viste i 1977 at glycerylnitrat frigjør NO og fremsatte en hypotesen om at NO kan fungere som et signalmolekyl<sup>27</sup>. Senere fant Furchgott og Ignarro uavhengi av hverandre i 1986 at gassen NO fungerte som et signalmolekyl, og hadde samme effekt som "endothelial derived relaxing factor" (EDRF). Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro og Ferid Murad studier av nitrogenoksid og dens rolle som signalmolekyl i det kardiovaskulære system resulterte i Nobelprisen i Medisin i 1998.

Senere har FMD metoden blitt brukt i mange forsøk, men grunnet veldig forskjellig mange målemetoder og prosedyrer ble det lagd retningslinjer for bruk av FMD i "Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial- Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery" av Corrett med fler<sup>28</sup>.



**Figur 4.** Plasseringen av mansjett og ultralydprobe ved måling av endotelfunksjon med FMD-metoden. *A.brachialis* måles over den anticubitale fossa i longitudinalplanet<sup>28</sup>. Figur hentet fra: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery Corretti MC (2002)

Mansjetten blåses minst opp til minst 50mm Hg over systolisk trykk over en periode på 5 minutter. Det longitudinale bildet blir målt kontinuerlig fra 30 sek før man slipper trykket til 2 minutter etter. Plassering av blodtrykksmansjetten er enten på overarmen proksimalt for ultralydproben, eller på underarmen distalt for ultralydproben. Ved mansjetten plassert proksimalt for proben får man en større dilatasjon, men da er det ikke helt klart hvilke aspekt av endotelfunksjon som måles<sup>29</sup>, man kan da få en ekstra iskemisk (ikke NO-avhengi) vasodilatasjon<sup>30</sup>. Man tar opp et kontinuerlig UL-bilde og finner anatomiske landemerker for å måle samme sted i blodåren. Avstanden måles i endesystole<sup>28</sup>. Det er viktig å gjøre målinger relativt ofte. Hvis man måler distansen kun hvert 60. sekund mister man peak dilatasjon i ca 70% av tilfellene<sup>31</sup>. For friske personer er det vanlig å se en økning i FMD på 5-15%<sup>29</sup> der man har normalt finner størst dilatasjon (peak) etter ca 45-50 sekunder. Til tross for at FMD er så hyppig brukt viser litteraturen store variasjoner i gjennomsnittlig FMD mellom studier i samme populasjon<sup>32</sup>.

## FMD variasjoner

Forandringer i FMD har blitt beskrevet ikke bare i forhold til de klassiske risikofaktorene. Man ser også andre endogene, eksogene, miljøavhengige og familiære faktorer som spiller inn<sup>33</sup>. Tidligere studier har vist at det er mange faktorer som påvirker FMD, de viktigste er:

- Alder
- Kjønn
- Arteriell hypertensjon
- Diabetes mellitus
- Kolesterol
- Fedme
- Hyperhomocysteinemi
- Kardiovaskulær sykdom
- Hormonelle (katekolaminer, østrogen)
- Daglige variasjoner
- Lav fødselsvekt
- Hereditet (kardiovaskulær sykdom og diabetes)
- Røyking (passiv og aktiv)

Større studier har vist at eldre har dårligere dilatasjon og forholdet til FMD er omvent relatert til alder<sup>34</sup>; <sup>35</sup>. Man finner også at hos kvinner at den absolutte endringen var 5 % mindre enn hos menn<sup>34</sup>. Arteriell hypertensjon er også en faktor som gir svekket FMD respons<sup>36</sup>. Denne sammenhengen er imidlertid ikke fullt forstått. Pasienter med diabetes mellitus viser en glukose-mediert endotelial dysfunksjon. Dette mener man skyldes reaktive oksygenradikaler som reduserer NO-biotilgjengeligheten<sup>37</sup>. Dette kan også påvirkes ved inntak av antioksidanter.

Høyt kolesterol ser også ut til å svekke FMD-responsen<sup>38</sup>. Derimot i forsøk hos pasienter som har en svak forhøyet verdi av triglyserider eller LDL-kolesterol, uten andre risikoer for kardiovaskular sykdom, viste ikke noen vesentlig demping på FMD<sup>39</sup>. Kvinner med fedme ble matchet med hensyn til alder, røyking, blodtrykk, blodsukker, insulin konsentrasjoner og hyperhomocysteinemi. Man fant da uavhengig av disse kjente risikofaktorene, at pasienter med fedme viser en signifikant dårligere FMD<sup>40</sup>.

Hyperhomocysteinemi blir alene sett på som en risikofaktor for hjerte-kar sykdommer. Disse får en svekket endotelavhengi vasodilatasjon, og selv pasienter med mild hyperhomocysteinemi kan indusere endotel dysfunksjon<sup>41</sup>. Pasienter med kardiovaskulær sykdom er vist flere steder å ha en svekket FMD respons<sup>42</sup>. Det viser seg også at plasmanivå av CRP er assosiert med FMD, noe som bekrefter sammenhengen mellom inflammasjon og endotelfunksjon.

Den flow-medierte dilatasjonen ser også ut til å bli påvirket av hormonale faktorer. Det har visst seg at mentalt stress<sup>43</sup>, og i hvilke fase man er i menstruasjonssyklus<sup>44</sup> kan ha betydning for FMD.

Friske unge, både menn og kvinner har stor FMD variasjon gjennom døgnet<sup>45;46;47</sup>. Her fant de blant annet at FMD var signifikant lavere kl 08:00 og 12:00 enn kl 17:00 hos unge friske menn<sup>45</sup>. Lav fødselsvekt er også assosiert med svekket endotelfunksjon i barndommen. Lav FMD korrelerer godt med lav fødselsvekt<sup>48</sup>. Svekket FMD er også vist å kunne være arvelig. I en gruppe friske unge med prematur kardiovaskulær sykdom, uten andre risikofaktorer, viste å ha en nedsatt endotelavhengi dilatasjon<sup>49</sup>. Det er godt kjent at røyking påvirker det vaskulære systemet. De frie oksygenradikalene som røyken inneholder skader endotelcellene og flere studier har vist et dose-avhengi forhold mellom røyk og nedsatt endotelavhengi vasodilatasjon i koronare kar<sup>50</sup>. Selv passiv røyk ser ut til å kunne påvirke FMD<sup>51</sup>.

For å minimere grad av forstyrrelser fra miljøet under en FMD undersøkelse er det satt opp ulike kriterier for å standardisere faktorer som kan påvirke målingene<sup>33</sup>.

- Stille rom, med jevn temperatur
- Undersøkelse om morgenen 07:00
- Fastende (inkludert kaffe) i 8 timer
- Ingen røyking passiv eller aktiv
- Ingen fysisk aktivitet eller natteskiift
- Ikke mentalt stress
- Seponere vasoaktiv medisin i minst 4 halveringstider
- Man bør også tenke på endringer i blodtrykk, kolesterol nivå og vekt forsøk som følger pasienter over tid. Fase i menstruasjonssyklus bør også noteres.

Da målingene krever god trening og godt håndarbeid, er det viktig at undersøker er godt kjent med ultralyd- apparat og fått flere måneder med trening i bruk av dette. Man skal helst ha minst 100 målinger med veiledning og deretter minst 100 i året for å opprettholde kompetanse<sup>28</sup>.

Variasjonene mellom forsøk viser seg også å bli minst ved godt trente operatører og godt utstyr<sup>42</sup>. Til tross for variasjoner mellom undersøkere og påvirkende miljøfaktorer er FMD er en av de mest brukte noninvasive metodene for å vurdere endotelfunksjon og korrelerer godt med kardiovaskulær risiko<sup>52</sup>.

Selv om FMD metoden i dag først og fremst brukes i forskning, er det godt mulig at metoden i fremtiden kan benyttes som et klinisk screening verktøy<sup>23</sup>.

### **Mitt prosjekt**

I denne delen av oppgaven har jeg fått tatt del i et pågående forskningsprosjekt der FMD metoden benyttes for å undersøke endotelfunksjon hos pasienter med revmatoid artritt (RA). Dette er et stort samarbeidsprosjekt mellom forskere på Diakonhjemmet sykehus og Oslo universitetssykehus, Aker. Studien er ennå ikke avsluttet men målet med studien er å undersøke om statinbehandling bedrer endotelfunksjon hos RA pasienter. Jeg har undersøkt ultralydbildene av 27 av pasientene med revmatoid artritt og studert deres *a.brachialis* diameter etter 0, 15, 30, 45, 60, 75 90, 105 og 120 sekunder etter endt okklusjon.



## Metode

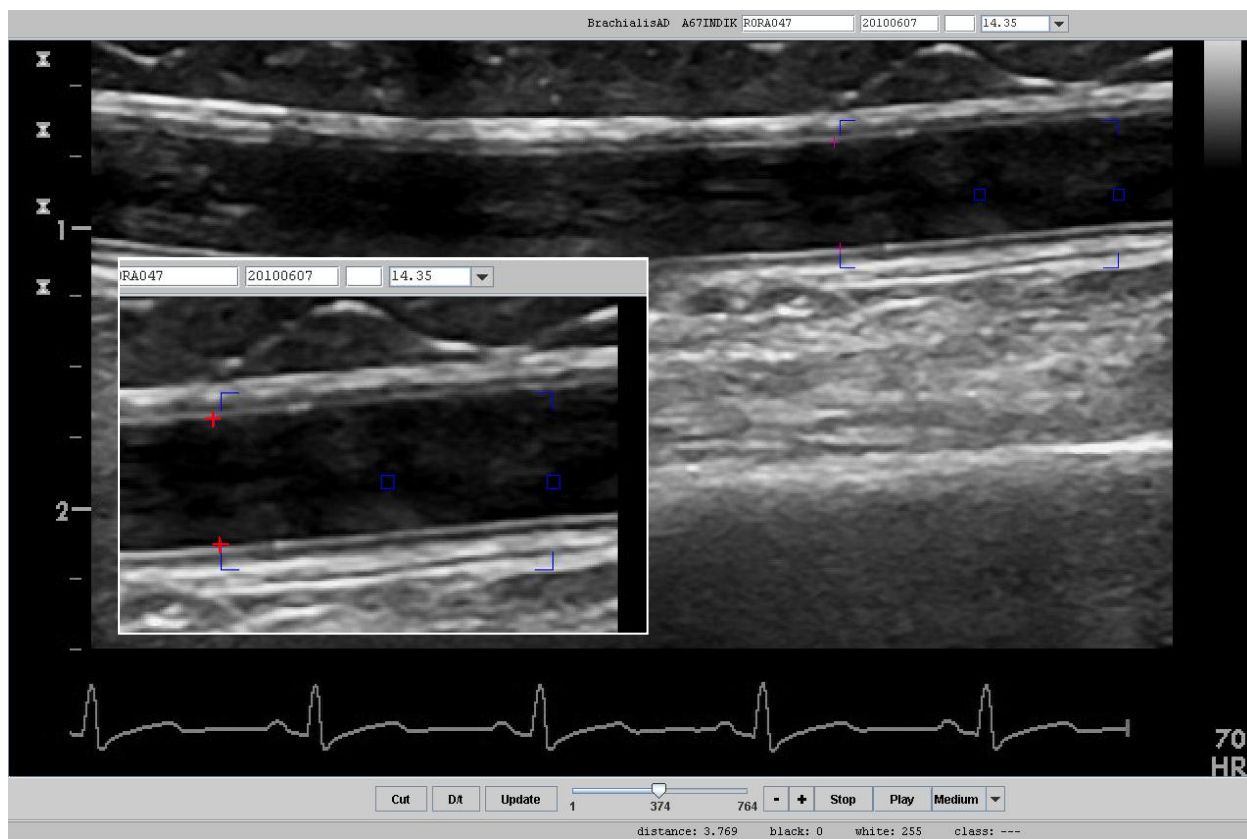
Inkludert i min del av studien var 27 pasienter med revmatoid artritt ved Diakonhjemmet Sykehus. FMD-målingene ble utført av min veileder dr. philos Jonny Hisdal ved FMD. Pasientene var mellom 35 og 80 år, alle hadde påvist plakk ved ultralyd i carotidene. Alle pasientene hadde informert samtykke. Eksklusjonskriterier i studien var atrieflimmer eller andre med kronisk uregelmessig hjerterytme. Pasienter med kontraindikasjoner for statinbehandling og med sekundær hyperlipidemi ble også ekskludert. Samt pasienter med sykdommer eller behandlinger som reduserer sikkerheten eller behandlingen med rosuvastatin.

Som kontrollgruppe har vi alderskorrelerte pasienter uten kjent kardiovaskulær sykdom. Disse FMD-målingene ble også utført av min veileder.

## Protokoll

Pasientene ble undersøkt på et stille rom med jevn temperatur. Undersøkelsene ble gjort om ettermiddagen og pasientene kom fastende. Pasientene hadde heller ikke bedrevet fysisk aktivitet, vært på natteski eller bedrevet natteskiarbeid før undersøkelsen. Pasientene var seponert for vasoaktiv medikasjon i over 4 halveringstider før undersøkelsen ble foretatt.

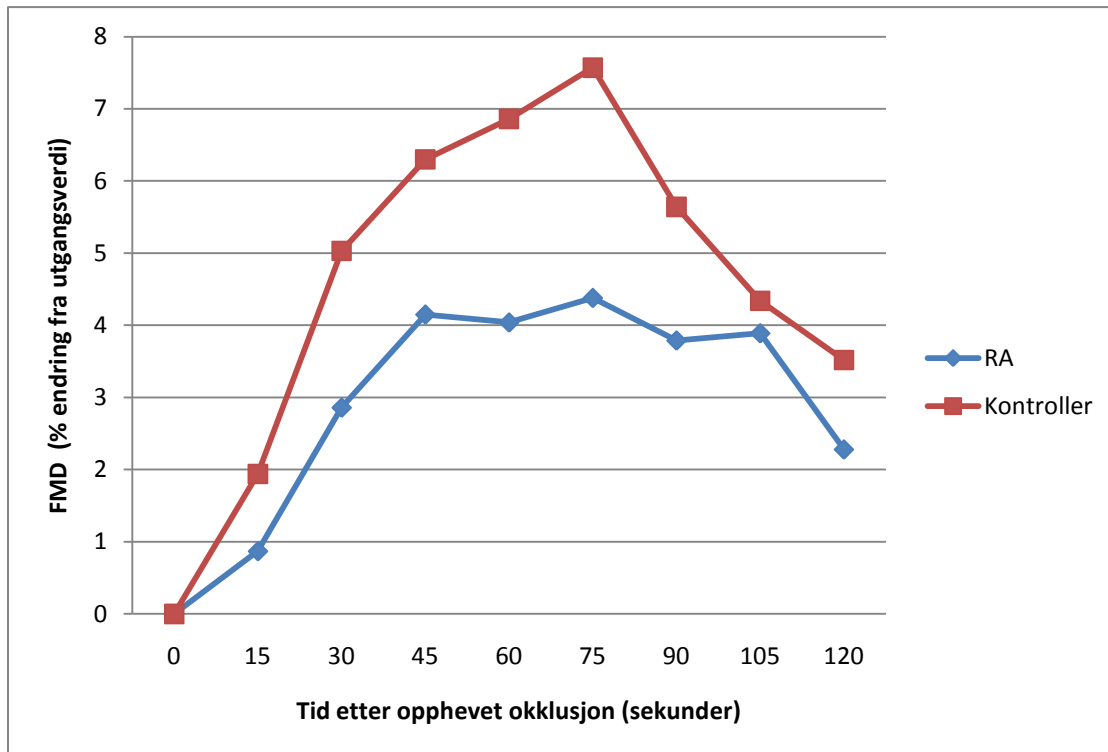
Etter noen minutter hvile i sengen fikk pasientene en blodtryksmansjett på underarmen pumpet opp på 220mmHg (godt over 50mmHg over systolisk trykk høyere enn det arterielle blodtrykk). Mansjetten satt på i 5 minutter, slik at man hadde skaffet tilstrekkelig hyperemi i underarmen. Ultralyd apparatet var da innstilt på *a.brachialis* og målingene registrert fra like før man slapp opp trykket på mansjetten. Bildeopptak ble gjort med en todimensjonal ultralydmaskin hvor det ble gjort et kontinuerlig filming av *a.brachialis* (Vingmed GE Vivid 7). EKG registrering er også med i bildet slik at man kunne følge med hvor i hjertesyklus man befant seg. Opptakene ble så lagt over fra ultralydapparatet og over på pc hvor programmet AMS (utviklet av Thomas Gustafson) ble brukt for å tolke bildene. I dette programmet ble diameteren i karet målt ved hjelp av distansemålinger ved ca 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 og 120 sekunder etter deflasjon av blodtryksmansjetten. Alle målingene ble gjort i endesystole. Statistikk av resultatene ble regnet ut ved hjelp av SPSS. Vi regner vi ser en signifikant forskjell dersom sannsynligheten er under 5 % for at observasjonen vi gjør skyldes tilfeldige feil, det vil si en p-verdi  $< 0,05$ .



**Figur 5.** Illustrerer måling av *a.brachialis* diameter ved hjelp av dataprogrammet AMS (Thomas Gustavsson, Sverige). Intima-intima målingene ble gjort i endesystole i blodårens lengdeakse.

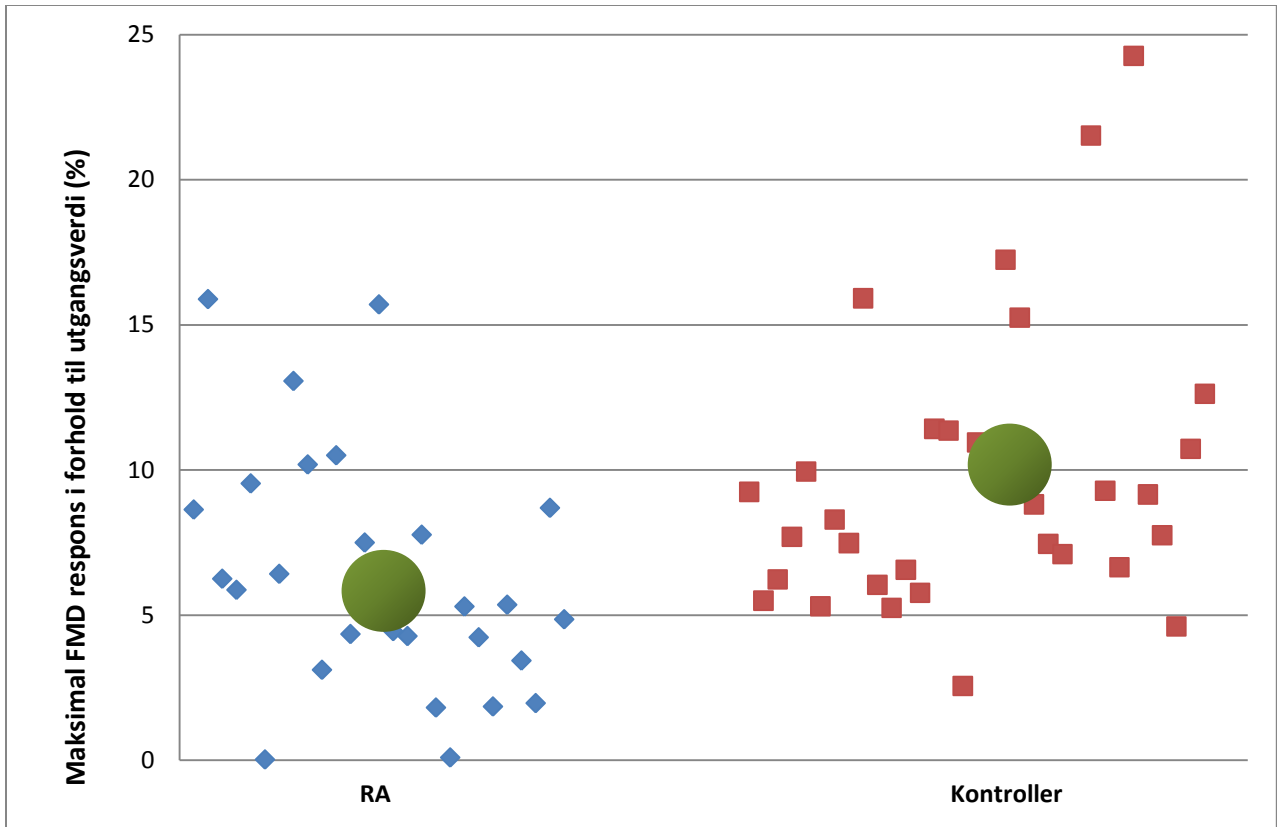
## Resultater

Statistiske analyse av demografiske data har ikke kunne bli utført da de er fra en pågående blindet studie og tallene ikke er frigjort enda.



**Figur 6.** Viser den prosentvise endringen i a.brachialis diameter hos RA gruppen og kontrollgruppen etter opphevet okklusjon. Kontrollgruppen har en signifikant større økning ( $p=0,008$ ) sammenlignet med RA pasientene.

Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene i "time to peak" mellom gruppene, der RA gruppen nådde maksimal dilatasjon etter  $68 \pm 28$  sekunder. Kontrollene hadde størst diameter etter  $61 \pm 22$  sekunder.



**Figur 7.** Viser FMD målingene hos alle RA pasientene og de friske kontrollene. De grønne store sirkene viser den gjennomsnittlige FMD hos henholdsvis RA-pasientene og kontrollene.

## Diskusjon

Hovedfunnet i dette prosjektet er at pasienter med RA hadde en signifikant lavere FMD respons sammenlignet med en gruppe friske kontrollpersoner.

I gjennomsnitt hadde RA pasientene i denne studien en FMD respons på 6,3%. FMD respons hos RA pasienter er tidligere beskrevet av andre forskergrupper. De fant de FMD responser fra 3,7 til 7,6%<sup>22;53;54</sup>. I den ene studien var målet var å se på FMD og atherosklerotiske risikofaktorer hos RA pasienter. Denne studien hadde 52 pasienter med RA og de fant en signifikant lavere ( $p=0,001$ ) FMD respons hos RA pasientene matchet med sine friske kontroller<sup>53</sup>. Det ble også funnet signifikante forskjeller i FMD mellom pasienter med tidlig RA og friske kontroller i en studie der pasientene var under behandling av statiner<sup>22</sup>. En mindre studie med 25 RA pasienter og 10 friske kontroller fant derimot ingen signifikant forskjell i FMD<sup>54</sup>.

Våre resultater støtter hypotesen om at revmatoid artritt gir en inflammatorisk respons som gir en endotel dysfunksjon som igjen vi kan måles ved en svekket FMD respons.

Vi fant en "time to peak" etter ca 68 sekunder hos RA gruppen og ca 61 sekunder i kontrollgruppen. Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene. Normal "time to peak" kan variere i blant annet plasseringen av mansjett. I en studie fant de, ved mansjett på underarmen, en "time to peak" på 49 sekunder. Mens ved mansjett på overarmen en peak etter 71 sekunder<sup>29</sup>. En annen studie fant peak etter 53 sekunder ved 5 minutter okklusjon. Mens ved 10 minutters okklusjon var "time to peak" noe senere, og kom etter 68 sekunder<sup>55</sup>. Disse variasjonene kan, som beskrevet over, komme av ulike prosedyrer under opptak av FMD målingene. Ferdigheten til operatør, utstyr og hvor ofte målingene blir gjort er også avgjørende for hvor presis man finner "time to peak".

Tiden kan variere ut i fra når man får satt sin utgangsverdi. Vi hadde tydelige bilder og fikk satt utgangsverdi i endesystole rett etter endt okklusjon. Vi fulgte standard prosedyrer, med okklusjon i 5 minutter og mansjetten plassert på underarmen<sup>28</sup>. Vi gjorde også registreringer hvert 15 sekund, da det er vist at man mister peak dilatasjon i 70% av tilfellene hvis man måler distansen kun hvert 60. sekund<sup>31</sup>.

FMD har vist seg å være det beste noninvasive målet vi har av endotelfunksjon. Det korrelerer også godt med risiko for hjerte kar sykdommer<sup>52</sup>. Det er svært ulikt hva litteraturen sier om hva som er normal FMD, da dette varierer mellom undersøkere, utstyr, prosedyrer og målinger. En normal endotelfunksjon kan gi en FMD respons på mellom 5 og 15 %<sup>29</sup>. Disse variasjonene blir imidlertid minst ved å bruke standard prosedyrer, godt utstyr og erfaren undersøker<sup>28;42</sup>. I vårt forsøk ble alle opptak gjort av erfaren undersøker, med godt utstyr. I tillegg ble godt kjente og standard internasjonale prosedyrer benyttet<sup>28</sup>. Vi fikk en gjennomsnittlig FMD hos kontrollgruppen på 10,5 %.

Figur 6 beskriver funnene våre på en god måte. Man kan her se at kontroll-personene dilaterer arterien raskt og relativt godt og har en fin parabol form. Sammenliknet med RA pasientene som har en litt senere og meget avflatet topp på sin FMD respons. Verdt å bemerke er at disse tallene er relatert til en utgangsstørrelse som er definert til 100 %, og derfor vil kurvene være direkte sammenliknbare. Grafen viser at det er kun målingene ved 60 og 75 sekunder etter opphevet okklusjon som viser signifikant forskjell i diameter. Dette viser at det er kun tiden der arterien dilaterer seg maksimalt at diameteren er signifikant forskjellige. RA pasientene viser også, ut fra våre tall, at de når maksimale dilatasjon noe senere enn kontrollgruppen. Dette kan tyde på at ikke er bare er FMD-responsen svekket i diameter med også forsinket i tid.

Under målingen av diameter fant vi også at det var påfallende ofte at man fikk samme verdi med 3 desimaler. Dette fant vi ut var grunnet at distansemåleren vi brukte baserte seg på pikselstørrelser i skjermen vi brukte slik at det ble enn slags trinnvis endring. Denne trinnvise endringen var dog så liten i forhold til forskjellen i diameter og hadde derfor ingen påvirkning på resultatet.

Denne studien tyder på at pasienter med revmatoid artritt har en redusert endotelfunksjon, som vi kan måle ved en svekket FMD respons. Imidlertid må det mer forskning til for å forstå dette fullt ut. Det skal det blant annet gjøres grundigere i studien jeg har tatt del i.

## Referanser

- (1) Moncada S, Higgs A. *The Vasuclar Endothelium I*. Berlin: Springer, 2006.
- (2) Pries AR. The endothelial surface layer. 2000.
- (3) Busse R. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. 2003.
- (4) Berne R, Levy M. Cardiovascular system IV -. In: Berne R, Levy M, eds. *Principles og physiology*. 3.ed ed. Missouri, USA: Mosby; 1999;246-255.
- (5) Mombouli JV. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. 1999.
- (6) Moncada S, Higgs A. *The Vasuclar Endothelium II*. Berlin: Springer, 2006.
- (7) Fleming I. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. 2003.
- (8) Testa M. Modulation of vascular endothelial gene expression by physical training in patients with chronic heart failure. 2000.
- (9) Munzel T. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. 2008.
- (10) Myllykangas-Luosujarvi RA. Mortality in rheumatoid arthritis. 1995.
- (11) Van DS. Reducing the cardiovascular disease burden in rheumatoid arthritis. 2006.
- (12) vina-Zubieta JA. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. 2008.
- (13) Han C, Robinson DW, Jr., Hackett MV, Paramore LC, Fraeman KH, Bala MV. Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2006;33:2167-2172.
- (14) Dursunoglu D, Evrengul H, Polat B et al. Lp(a) lipoprotein and lipids in patients with rheumatoid arthritis: serum levels and relationship to inflammation. *Rheumatol Int* 2005;25:241-245.
- (15) Sokka T. Physical inactivity in patients with rheumatoid arthritis: data from twenty-one countries in a cross-sectional, international study. 2008.
- (16) Gonzalez A, Maradit KH, Crowson CS et al. Do cardiovascular risk factors confer the same risk for cardiovascular outcomes in rheumatoid arthritis patients as in non-rheumatoid arthritis patients? *Ann Rheum Dis* 2008;67:64-69.
- (17) Gonzalez-Gay MA. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. 2007.

- (18) Dixon WG. What effects might anti-TNF $\alpha$  treatment be expected to have on cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis? A review of the role of TNF $\alpha$  in cardiovascular pathophysiology. 2007.
- (19) Khan F. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. 2010.
- (20) Maki-Petaja KM. Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. 2008.
- (21) Hannawi S, Marwick TH, Thomas R. Inflammation predicts accelerated brachial arterial wall changes in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R51.
- (22) El-Barbary AM, Hussein MS, Rageh EM, Hamouda HE, Wagih AA, Ismail RG. Effect of atorvastatin on inflammation and modification of vascular risk factors in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:229-235.
- (23) Faulx MD. Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. 2003.
- (24) Pohl U. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. 1986.
- (25) Anderson EA. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. 1989.
- (26) Furchgott RF. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. 1980.
- (27) Katsuki S. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. 1977.
- (28) Corretti MC. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. 2002.
- (29) Berry KL. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. 2000.
- (30) Doshi SN. Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. 2001.
- (31) Palinkas A. Temporal heterogeneity of endothelium-dependent and -independent dilatation of brachial artery in patients with coronary artery disease. 2002.
- (32) Bots ML. Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. 2005.
- (33) Moens AL. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? 2005.



- (34) Herrington DM. Brachial flow-mediated vasodilator responses in population-based research: methods, reproducibility and effects of age, gender and baseline diameter. 2001.
- (35) Celermajer DS. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. 1994.
- (36) Duffy SJ. Effect of ascorbic acid treatment on conduit vessel endothelial dysfunction in patients with hypertension. 2001.
- (37) Chowienzyk PJ. Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes. 2000.
- (38) Vogel RA. Cholesterol, cholesterol lowering, and endothelial function. 1998.
- (39) Schnell GB. Impaired brachial artery endothelial function is not predicted by elevated triglycerides. 1999.
- (40) Oflaz H. Determination of endothelial function and early atherosclerotic changes in healthy obese women. 2003.
- (41) Li N. Effects of homocysteine on intracellular nitric oxide and superoxide levels in the renal arterial endothelium. 2002.
- (42) Lane HA. Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis. 2006.
- (43) Ghiadoni L. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. 2000.
- (44) Sorensen KE. Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function. 1998.
- (45) Etsuda H. Morning attenuation of endothelium-dependent, flow-mediated dilation in healthy young men: possible connection to morning peak of cardiac events? 1999.
- (46) Otto ME. Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans. 2004.
- (47) de Roos NM. Within-subject variability of flow-mediated vasodilation of the brachial artery in healthy men and women: implications for experimental studies. 2003.
- (48) Leeson CP. Flow-mediated dilation in 9- to 11-year-old children: the influence of intrauterine and childhood factors. 1997.
- (49) Clarkson P. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. 1997.
- (50) Zeiher AM. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. 1995.
- (51) Hijmering ML. Variability of flow mediated dilation: consequences for clinical application. 2001.
- (52) Kuvin JT. Clinical utility of endothelial function testing: ready for prime time? 2003.

- (53) Kerekes G. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. 2008.
- (54) Van DS. Screening for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: comparison of two in vivo tests of vascular function. 2003.
- (55) Harris RA. The effect of oral antioxidants on brachial artery flow-mediated dilation following 5 and 10 min of ischemia. 2009.