

Har flavinoidrik juice positiv effekt på endotelfunksjonen?

En pilotstudie

Jens Aksel Nilsen - V06, Profesjonsstudiet Medisin, UiO.

Introduksjon

Hjerte-karsykdom er den vanligste dødsårsaken i vestlige land¹. Til tross for stor nedgang i dødeligheten de siste tiår er hjertekarsykdom fortsatt et stort problem for folkehelsen. Rundt 1970 snudde den negative utviklingen, og særlig i 1990-årene var nedgangen i hjertedødsfall stor blant menn. Etter år 2000 har dødeligheten av hjerteinfarkt og andre karsykdommer falt ytterligere². Likevel består hjerte-karsykdommer som den største dødsårsaken i vesten. Enkle kostråd som med bevist effekt kan redusere forekomsten og dødeligheten av hjerte-karsykdom er derfor av stor interesse.

Det er vist at forholdet mellom etanolkonsum og mortalitet har en U-formet kurve^{3,4}. I 1979 skrev St. Leger et al. om rødvins beskyttende egenskaper mot hjerte-karsykdom⁵. De viste til epidemiologiske data fra WHO som avslørte en diskrepans mellom hjertekar-mortalitet i en kohort i et område rundt Toulouse i Frankrike sammenliknet med kohorter i andre områder i 17 vestlige land. Den franske kohorten hadde lavere risiko til tross for høyere inntak av mettet fett⁶. Dette overraskende funnet som ble kalt "the french paradox", banet veien mot hypotesen om at det høyere inntaket av rødvin var den forklarende faktoren. Senere har flere studier vist at rødvin gir en større risikoreduksjon enn andre alkoholholdige drikker^{7,8}.

Men hva er det ved rødvin som utgjør denne forskjellen? Det er dette spørsmålet som forsøkes belyst i denne oppgaven (gjennom beskrivelsen av en gjennomført pilotstudie). Det er ikke bevist hvilke komponenter i rødvin som utgjør forskjellen, men den rådende forklaringen ligger i rødvins høye innhold av polyfenoler – som er en gruppe antioksidanter. Antioksidanter defineres slik i Halliwell og Gutteridge bok - *Free Radicals in Biology and Medicine: "any substance that, when present at low concentrations compared with that of an oxidizable substrate, significantly delays or inhibits oxidation of that substrate"*⁹. Bærene fra plantene *Sambucus Nigrans* og *Aronia melanocarpa* har et svært høyt innhold av polyfenoler¹⁰. I Østerrike hvor studien fant sted, brukes disse plantene mye som supplement i kosten, blant annet som juice. Disse bærene har tiltrukket vitenskapelig interesse på grunn av den nesten svarte pigmenteringen som

stammer fra det høye innholdet av polyfenoler, nærmere bestemt antocyaniner og proantocyaniner.

Målet med denne pilotstudien var å undersøke hvilken effekt daglig inntak av juice med høyt polyfenol - innhold over 8 uker hadde på endotelfunksjonen. Endotel dysfunksjon er en reversibel prosess og kan derfor bli helt borte med gunstig intervensjon. Det er et viktig poeng ved denne studien at polyfenolene kan i teorien snu en patologisk utvikling i endotelcellene.

Endotel danner etter monolag av endotelceller som dekker hele menneskekroppens kartre. Det danner en enorm barriere på flere hundre kvadratmeter mellom blod og vev¹¹. En av endotelets hovedoppgaver er å danne en semipermeabel membran som tillater passasje av næringsstoffer, mens store molekyler holdes tilbake i blodet. Videre secernerer endotelcellene vasoaktive substanser, viktigst er nitrogenoksid (NO), prostacyclin I₂ (PGI₂) og endotelin. Substansene slippes ut av endotelcellen både som respons på skjærekrefter og ved stimulering av reseptorer. De vasoaktive stoffene virker på det underliggende laget av glatte muskelceller og regulerer således kartonus. NO virker ikke bare vasodilaterende, men også hemmende på trombocyttaggregering, det hemmer transkripsjonen av leukocytbindende adhesjonsmolekyler og hemmer vaskulær myocytproliferasjon. NO er det viktigste vasodilaterende stoffet i kroppen og er derfor svært viktig for normal karfunksjon.

Den tidligste indikatoren på hjerte-karsykdom er endotelial dysfunksjon. Endotelial dysfunksjon menes å spille en nøkkelrolle i utviklingen av aterosklerose og prederer klinisk karpatologi med lang tid¹². Dette fordi endotelial dysfunksjon er assosiert med reduserte antikoagulerende egenskaper sammen med økt ekspresjon av leukocytadhesjonsmolekyler (tabell 1). Endotelial dysfunksjon har blitt vist å ha prognostisk signifikans for å forutsi vaskulære hendelser inkludert slag og hjerteinfarkt.

Tabell 1 Endotelcellens funksjonstap ved endotel dysfunksjon ¹³ .
1. Redusert produksjon, aktivitet eller økt nedbrytning av NO.
2. Økt produksjon av vasokonstriktorene eicosanoider, endotelin og angiotensin II.
3. Økt produksjon eller redusert nedbrytning av oksygenderiverte frie radikaler.
4. Proteinkinase C (PKC) aktivering.

Aterosklerose karakteriseres av lesjoner i tunica intima som kalles ateromer. Utviklingen av ateromer tar flere tiår. Ateromene buker inn i karlumen og svekker samtidig tunica media. Karfunksjonen reduseres dermed dramatisk. Den tidlige manifestasjonen av aterosklerose kalles "fatty streaks" og består av opphopning av lipider i tunica intima. Disse lipidene er derivert fra kolesterolbæreren Low density lipoprotein (LDL)¹⁴. Både fritt og esterifisert kolesterol er tilstede som lipiddråper i cytoplasma på det som på grunn av utseende kalles skumceller. Skumcellene er monocytære fagocytter (blir til vevsmakrofager i karveggen) som kjemotaktisk invaderer karveggen inn i tunica Intima og der fagocytterer LDL via scavenger-reseptoren. Høyt plasmainnhold av LDL og gunstig oksidativt miljø kan akselerere utviklingen av "fatty streak" lesjonen¹⁵.

Oksidasjon av LDL danner oksidert LDL (oxLDL). OxLDL forsterker den allerede negative innvirkningen LDL har på utviklingen av aterosklerose. OxLDL gjenkjennes av scavenger-reseptoren på makrofager og fagocytteres. Denne prosessen er ikke regulert, derfor kan makrofagene ta opp store mengder om det er nok substrat. Oksidasjonen av LDL er en negativ prosess som framskynder den aterosklerotiske prosessen. Partasathy skriver i sin oppsummeringsartikkel om oxLDL sin rolle i den aterosklerotiske utviklingen (tabell 2):

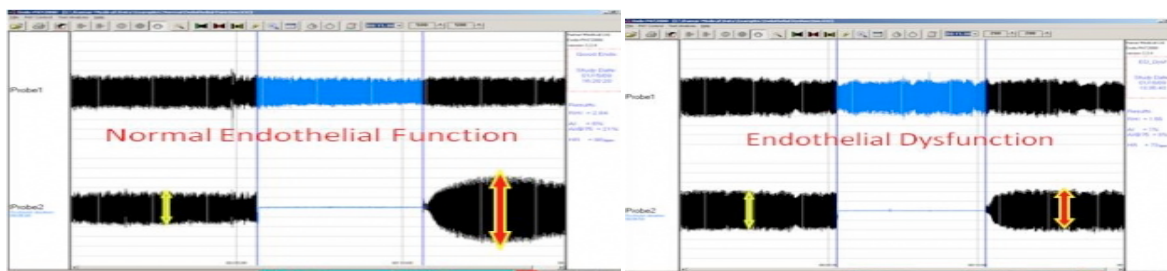
Tabell 2 Aterogene effekter av oxLDL ¹⁶ (MM-LDL= minimally modified LDL)
1. OxLDL nedbrytes raskere enn nativt LDL av makrofager og fører til akkumulering av kolesterolestere i makrofagene.
2. OxLDL virker kjemotaktisk for monocytter.
3. OxLDL inhiberer makrofag kjemotakse.
4. OxLDL er cytotoxisk for celler.
5. OxLDL hemmer endotelindusert relaksasjon av karet.
6. MM-LDL øker monocyttadhesjon til endotelceller.
7. MM-LDL induserer endotelial ekspresjon av granulocyt – og makrofag-kolonistimulerende faktor.
8. MM-LDL stimulerer makrofag- kjemotaktisk peptid I fra endotelceller og glatte muskeceller

Antioksidanter spiller teoretisk en viktig rolle for endotel og således karfunksjonen. Flavinoider kan binde frie radikaler og slik redusere konsentrasjonen av oxLDL i blodet. Om polyfenoler inntas regelmessig kan de begrense oksidasjonen av lipoprotein 16-18 og minke trombotiske fenomener¹⁷. På den måten kan polyfenoler bidra til begrensningen av aterosklerose og mortalitet fra hjerte-karsykdom. Polyfenolene inhiberer også cyklooxygenase og lipooxygenase som ytterligere reduserer trombotisk tendens in vivo¹⁷.

Metode

Det ble rekruttert 32 friske kvinner og menn fra sykehuset LKH-Universitätsklinikum – Graz, Østerrike. Alle deltakerne i forsøket var friske, normotensive, ikke diabetikere og ikke klinisk overvektige. Eksklusjonskriteriet var kjent sykdom. Studiedeltakerne ble rekruttert internt på sykehuset, deltakelsen var frivillig, og ble godtgjort med 100 euro.

I dette forsøket benyttes perifer arteriell tonometri (PAT)-teknologi med maskinen endoPAT 2000™, utviklet av Itamar medical. En invasiv vurdering av den koronare endotelfunksjonen regnes som gullstandarden for endotelfunksjon¹⁸. Fordi endotelial dysfunksjon ikke oppstår eksklusivt i koronare karsenger, kan en også bruke perifere arterielle karsenger for å vurdere endotelfunksjonen. Perifer arteriell tonometri er en ikke - invasiv måte å vurdere perifer endotelfunksjon på, ved å måle forandringer i fingerens arterielle pulsamplitude under reaktiv hyperemi. Det plasseres en fingercuff (pletysmograf) på hver pekefinger. Disse blåses opp til subdiastolisk trykk og vil da omslutte fingeren. De fortløpende arterielle pulsatile volumendringene i den arterielle karsengen registreres før, under og etter en okklusjonsperiode på fem minutter¹⁹. Videre vil maskinen som driver cuffene registrere volumendringene i et dataprogram som også beregner en testverdi etter testslutt. Testverdien (vedlegg2) er et uttrykk for den arterielle vasodilatasjonen etter okklusjonen – den reaktive hyperemi. Friskt endotel reagerer med vasodilatasjon på metabolitter som hoper seg opp under de iskemiske forhold som skapes under den fem minutter lange okklusjonsperioden. Sykt endotel har ikke samme evne til å reagere på disse metabolittene og den pulsatile volumendringen blir mindre hos individer med sykt endotel (figur 1). PAT teknologien er vist å være en god test for å vurdere endotelfunksjon²⁰.



Figur 1 Normal arteriell respons på reaktiv hyperemi vs endotel dysfunksjon (itamar-medical.com)

Det ble satt opp to oppmøtedager, første dag ble basalmålinger foretatt av blodtrykk og PAT verdi. Blodtrykket ble målt manuelt, med gjennomsnitt av siste to av totalt tre målinger som gjeldende verdier. PAT verdien ble målt med EndoPAT 2000™ som er beskrevet tidligere. Deltakerne hvilte på en benk i 15 minutter før målingene ble foretatt. Blodtrykksverdiene ble først målt på motsatt arm av den som senere skulle okkluderes under PAT målingen. PAT målingene ble foretatt i liggende posisjon. En fingerprobe ble festet til 2. finger på hver hånd. En blodtrykksmansjett ble festet til høyre overarm. Underarmene hvilte på en behagelig skinne for å optimalisere målingene. Målingen ble innledet med fem minutter i liggende posisjon, med 2. finger omsluttet av den luftfylte proben. Fingeren med proben måtte ikke berøre noe for å sikre gode målinger, og deltakeren måtte ligge stille under forsøket. Etter fem minutters måling ble blodtrykksmansjetten blåst opp til 60mmHg over systolisk blodtrykk for å skape arteriell okklusjon. Etter fem minutters okklusjon ble luften sluppet raskt ut og en postokklusjonsmåling ble foretatt i ytterligere fem minutter. (Etter forsøkslutt ble det tatt blodprøver av studiedeltakerne, som en annen del av studiet, som ikke er beskrevet nærmere i denne oppgaven.)

Etter endt forsøk beregnet programvaren endoPAT -verdien.

Deltakerne fikk to forskjellige typer juice. En gruppe fikk juice laget av bæret fra *Sambucus nigra* (gruppe H), og en gruppe fikk en juice laget av en blanding av *Aronia melanocarpa* og *Sambucus nigra* (gruppe A). Juicen var på flasker a 1/8L, deltakerne drakk en flaske daglig i 8 uker. Begge typer juice hadde et høyt innhold av polyfenoler, det ble ikke foretatt analyse av de to typene juice i forkant. Det var derfor ingen forventning om hvilken som ville ha sterkest antioksidanteffekt. Studiets status som

pilotstudie gjorde det viktig å få svar på hvilken type juice som ville ha sterkest effekt til eventuelle senere studier. Hypotesen (H_A) var at begge juicene ville ha effekt på grunn av det høye innholdet av polyfenoler. Studiet var ikke blindet. Beregninger ble foretatt både med hensyn på gruppeforskjell og alle deltakerne samlet da det er samme gruppe virkestoffer som undersøkes. Nye målinger ble foretatt på samme måte som beskrevet over etter 8 uker.

Data ble plottet og bearbeidet i Excel. Det ble beregnet en paret student t-test. Alle testene var tosidige og $p < 0,05$ ble regnet som statistisk signifikant.

Resultat

Tabell 3 Informasjon om studiedeltakere ved oppstart (n=32)			
	Alle deltakere	Gruppe H	Gruppe A
Alder (år)	38 (11,3)	38 (11,2)	38 (11,6)
Kjønn mann/kvinne	16/16		
Systolisk blodtrykk	120 (9,6)	120 (10,0)	120 (9,6)
Diastolisk blodtrykk	70 (7,6)	70 (8,1)	70 (7,5)
Puls (slag *min⁻¹)	65 (7,8)	62 (7,1)	66 (8,1)
Medianverdier (Standardavvik)			

32 deltakere deltok i studien, median alder var (tabell 3). Det ble ikke funnet patologiske verdier ved oppstart av studien under baseline - målingene. Alle var normotensive med normal pulsfrekvens (tabell 3).

Det var ikke signifikant forskjell på blodtrykk, puls eller PAT verdi mellom gruppene ved baseline. Den videre presentasjonen av resultatene legger vekt på PAT verdien som ble målt under forsøket.

Etter intervensjonsperioden var det en økning av PAT verdien, men den var ikke signifikant, verken på gruppenivå eller alle deltakerne samlet (tabell 4). PAT verdi før

mot etter intervensjon for gruppe H og gruppe A var ikke signifikant med $p=0,18$, $p=0,56$ respektivt. Gruppe H hadde en sterkere effekt enn gruppe A. 17 deltakere hadde en økning på 5% eller mer, 12 deltakere hadde en reduksjon på -5% eller mer mens 3 deltakere hadde PAT – verdi som ikke endret seg mer enn -5% - 5%.

Deltakerne tolererte endoPAT målingene bra, og pulsen var uforandret under perioden hvor blodtrykksmansjetten var inflatert.

Tabell 4 Resultat av 8 uker intervensjon av juice med høyt polyfenolinnhold.		
	Oppstart	Studieslutt
Puls (slag*min⁻¹)	65 (7,8)	66,5 (7,7)
PAT verdi (alle deltagere)	1,85 (0,6)*	1,97 (0,5)**
PAT verdi (gruppe H)	1,83 (0,45)#	1,96 (0,51)##
PAT verdi (gruppe A)	1,86 (0,66)Ω	1,97 (0,59)ΩΩ
Systolisk blodtrykk (begge grupper)	120 (9,6)	115 (7,9)
Diastolisk blodtrykk (begge grupper)	70 (7,6)	67,5 (6,8)
Medianverdier (Standardavvik)		
p=0,15; * vs før intervensjon, ** vs etter intervensjon.		
p=0,18; # vs før intervensjon, ## vs etter intervensjon.		
p=0,56; Ω vs før intervensjon, ΩΩ vs etter intervensjon.		

Diskusjon

Selv om denne studien ikke kan vise til en signifikant bedring av endotelfunksjon, genererer den likevel signaler om polyfenolene som er undersøkt kan ha effekt. Ved å se på studiedeltakerne samlet, viser studien at 59 prosent fikk bedre PAT verdi etter 8 ukers intervensjon med en p-verdi på 0,15. Uten signifikant bedring i endotelfunksjonen må dataene selvsagt tolkes forsiktig. Studiens power er for svak til å kunne trekke noen konklusjoner, det kan foreligge en type II feil (vet ikke om H_0 hypotesen er usann) –

studien forkaster ikke H_0 hypotesen. Etter erfaring fra tidligere studier (vedlegg 1) var det på forhånd en forventning om signifikant effekt.

Da dette var en pilotstudie er det flere faktorer som kan bedres ved en eventuell ny studie. En ser at den rene juicen av *Sambucus nigra* gir sterkest resultat, det vil da være naturlig å sette opp en ny studie med denne juicen som intervensjon. Ved et nytt forsøk kan en med en power - kalkyle beregne gruppens størrelse. En dobbel blindet test med en placebogruppe vil ytterligere styrke designet rundt en ny studie. En enda strammere protokoll med egnet forsøksrom, god tid rundt målingene og nøyaktig informasjon vil være en fordel. Forsøkspersonene bør ideelt være en tilfeldig valgt gruppe.

Når det gjelder denne studiens resultater bidrar den ikke sikkert til å forklare de epidemiologiske data som viser at rødvin har en beskyttende effekt fremfor andre alkoholholdige drikker. De epidemiologiske data som "the french paradox" har opphav fra er også omstridte på grunn av de mange "confounding factors" mellom regionene, som diett og livsstil²¹. I tillegg finner en ikke samme fenomen i Nord Amerikanske epidemiologiske data når det gjelder forskjell mellom hvitvin og rødvin^{22, 23, 24}. Det er i druenes skall at polyfenolene befinner seg, hvitvin til forskjell fra rødvin er laget av avskallede druer og har sådan et lavt polyfenolinnhold. Derfor forventes det å finne den samme signifikante forskjellen i mortalitet mellom rødvinsdrikkere og hvitvinsdrikkere i alle epidemiologiske studier. Inntil det forligger sikrere epidemiologiske data er studiene som viser hvilken effekt de - alkoholisert rødvin har på mennesker det sikreste kortet (vedlegg 1). Her er data relativt entydige til fordel for antioksidanthypotesen – at rødvin har gunstig effekt utover alkohol, og videre at det skyldes antioksidanter – polyfenoler. Agewall et. al har vist at de - alkoholisert rødvin gir signifikant bedret endotelavhengig vasodilatasjon som respons på reaktiv hyperemi i forhold til vanlig rødvin²⁵. Review artikkelen "The red wine hypothesis: from concepts to protective signaling molecules" av Opie og Lecour oppsummerer slik om studier med de -alkoholisert rødvin på mennesker: "*All these human studies are among the most powerful arguing for the benefit of red (but not white) wine beyond alcohol. Supporting data comes from dogs with stenosed coronary arteries, in whom administration of French blended red wine, apparently verging on vintage in age, eliminated cyclic flow reductions*

caused by periodic acute platelet- mediated thrombus formation. This markedly beneficial effect was also achieved by purple grape juice, but about 2.5 times greater volume was required than in the case of red wine. White wine was not protective, so that the explanation must again lie in the effects of red wine beyond alcohol.”

Det faktum at forholdet mellom alkoholinntak og mortalitet har en U-formet kurve tilsier at vinduet for gunstig alkoholinntak er relativt lite. Det er derfor av stor interesse å bekrefte en eventuell økt effekt av rødvin i forhold til andre alkoholholdige drikker. Da kan en identifisere hvilke faktorer som er gunstige og tilby dette uten alkohol. Da vil også personer som ikke drikker alkohol kunne oppnå en beskyttende effekt, samtidig vil noen kunne unngå den økte mortaliteten assosiert med høyt alkoholforbruk. Sterke studier viser denne U-formede kurven slik som Framingham studien²⁶, the British doctors study²⁷ og the Cancer prevention study²⁸.

Det finnes bevis for polyfenolenes beskyttende virkning in vivo (vedlegg 1), men en er fortsatt langt unna konklusive studier som kan fortelle om langtidseffekt, farmakokinetikk, dosering og formulering. Konklusjonen er at mye taler for en gunstig effekt av polyfenoler, men ytterligere forskning er nødvendig for å belyse problemstillingen ytterligere. Denne studien bidrar ikke signifikant til å styrke polyfenolhypotesen, men studien bør gjentas med styrket design da dataene er sterke nok til å anta at funnene ikke er tilfeldige.

Man må også være åpne for at andre typer etanoldrikker kan ha skadelige effekter som rødvin ikke har. Dette er ikke forsket mye på, men denne teorien kan foreløpig ikke forkastes helt da det endelige beviset til fordel for rødvinshypotesen ikke forligger.

Vedlegg 1 Klippet fra en reviewartikkel av Sherene & Shenouda; Effects of Flavonoid-Containing Beverages and EGCG on Endothelial Function.

Table 1. Studies of Flavonoid-Containing Foods and Endothelial Function

First Author	Food/Flavonoid	Cohort	Sample size	Method	Result
Duffy [54]	Black tea	CAD	50	Brachial FMD	Improved
Hodgson [56]	Black tea	Hypercholesterolemia	21	Brachial FMD	Improved
Hirata [58]	Black tea	Healthy volunteers	10	Coronary flow reserve	Improved
Nagaya [59]	Green tea	Smokers	20	Reactive hyperemia	Improved
Agewall [62]	Dealcobolized red wine	Healthy volunteers	12	Brachial FMD	Improved
Matsuo [72]	Red wine and polyphenol extract	Healthy volunteers	6	Plasma nitric oxide	Improved
Stein [49]	Purple grape juice	CAD	15	Brachial FMD	Improved
Chou [60]	Purple grape juice	CAD	22	Brachial FMD	Improved
Lekakis [73]	Red grape extract	CAD	30	Brachial FMD	Improved
Heiss [63]	Flavanol-rich cocoa	At least one risk factor	26	Brachial FMD	Improved
Heiss [64]	Flavanol-rich cocoa	Smokers	11	Brachial FMD	Improved
Schroeter [65]	Flavanol-rich cocoa	Healthy volunteers	16	Brachial FMD & Fingertip tonometry	Improved
Wang-Polagruto [74]	Flavanol-rich cocoa	Post-menopausal hypercholesterolemic women	32	Reactive hyperemia	Improved
Engler [66]	Flavonoid-rich dark chocolate	Healthy volunteers	21	Brachial FMD	Improved
Vlachopoulos [75]	Dark chocolate	Healthy volunteers	17	Brachial FMD Augmentation index	Improved
Widlansky [68]	Acute EGCG	CAD	42	Brachial FMD	Improved

FMD = flow-mediated dilation, CAD = coronary artery disease.

Vedlegg 2

EndoPAT verdene oppgis av produsenten Itamar medical (over 1,68 er tilfredsstillende):

”Red Level EndoScore: A score of 1.67 and lower indicates the need for immediate medical assessment.

Yellow Level EndoScore: A score between 1.68 and 2 indicates that you may not to appear to have additional health risks. Your endothelium is currently fine, but if you don’t take appropriate preventive steps, you may begin moving towards the Red Level and endothelial dysfunction.

Make all efforts to reduce blood cholesterol levels, stop smoking if you do, reduce bodyweight if too heavy, maintain a healthy blood pressure, and manage stress in your life. Managing these risk factors with simple [preventive measures](#) will help you avoid or postpone heart disease.

Green Level EndoScore: A score above 2.1 indicates that the endothelium is offering maximum protection and maintaining a healthy heart. Keep up the good work!”

¹ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>

² fhi.no

³ Bofetta P, Garfinkel L. Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an american cancer society prospective study. *Epidemiology* 1990; 1: 342–8.

⁴ Fuchs CS, Stampfer MJ, Colditz GA et al. *N Engl J Med* 1995; 332: 1245–50.

⁵ St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979;1:1017–20.

⁶ Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339:1523–6

⁷ Klatsky AL, Armstrong MA. Alcoholic beverage choice and risk of coronary artery disease mortality: Do red wine drinkers fare best? *Am J Cardiol* 1993; 71: 467–9.

⁸ Grønbeck M, Deis A, Sørensen TIA, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intake of wine, beer or spirits. *BMJ* 1995; 310: 1165–9.

⁹ Halliwell & Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*.

¹⁰ Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia* and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. 52 (26): 7846-7856.

¹¹ J.R. Levick 2003. An introduction to cardiovascular physiology.

¹² Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:169 –75.

¹³ The Role of Nitric Oxide and Other Endothelium-Derived Vasoactive Substances in Vascular Disease. Richard A. Cohen

¹⁴ Newman, H. A. I. and Zilversmit, D. B. *J. Biol. Chem.* 237, 2078-2084 (1962).

¹⁵ Parthasarathy, Rankin. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Prog.LipidRes*.Vol.31,No. 2,pp. 127-143,1992

¹⁶ Parthasarathy, Rankin. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Prog.LipidRes*.Vol.31,No. 2,pp. 127-143,1992

¹⁷ Frankel EN, Kanmer J, German JB, Parks E, Kinsella JB. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341: 454–7.

¹⁸ Hashdai D, Lerman. The assessment of endothelial function in the cardiac catheterization laboratory in patients with risk factors for atherosclerotic coronary artery disease. *Herz* 1999;24:544-7

¹⁹ http://www.itamar-medical.com/EndoPAT/PAT_Technology.html

²⁰ 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;44:2137– 41.

²¹ Ruidavets JB, Bataille V, Dallongeville J, Simon C, Bingham A, Amouyel P, Arveiler D, Ducimetiere P, Ferrieres J. Alcohol intake and diet in France, the prominent role of lifestyle. *Eur Heart J* 2004;25: 1153– 1162.

²² Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, Camargo CA Jr, Stampfer MJ, Willett WC, Rimm EB. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2003;348: 109– 118.

²³ Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA, Kipp H. Wine, liquor, beer, and mortality. *Am J Epidemiol* 2003;158:585–595.

²⁴ Stampfer MJ, Kang JH, Chen J, Cherry R, Grodstein F. Effects of moderate alcohol consumption on cognitive function in women. *N Engl J Med* 2005;352:245– 253.

²⁵ Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N.

Does a glass of red wine improve endothelial function? *Eur Heart J* 2000;21:74– 78.

²⁶ Gordon T, Kannel WB. Drinking and mortality. The Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1984;120:97–107.

²⁷ Doll R, Peto R, Hall E, Wheatley K, Gray R. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. *Brit Med. J* 1994;309:911– 918.

²⁸ Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N.Engl J. Med* 1997;337:1705– 1714.