

Investigación científica básica

El tabaquismo afecta a la función endotelial de la vena safena humana en un modelo *ex vivo*

M.A. Sharif¹, U. Bayraktutan², N. Arya¹, M.E. O'Donnell¹, S.A. Badger¹, I.S. Young² y C.V. Soong¹, Belfast, Reino Unido

El objetivo del presente estudio experimental *ex vivo* fue evaluar el efecto del tabaquismo, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial sobre la función endotelial en la vena safena humana, un conducto usado habitualmente para cirugía mediante *bypass* coronario y de arterias periféricas. Durante intervenciones de *bypass* infrainguinal, se obtuvieron segmentos de vena safena interna que se prepararon en un baño de órganos para los estudios de tensión isométrica. Los anillos venosos se sometieron a una precontracción con concentraciones crecientes de fenilefrina hasta una contracción submáxima, seguido de relajación dependiente de endotelio con acetilcolina. Los segmentos de vena safena interna se obtuvieron de 26 pacientes, incluidas cinco mujeres, con una edad media de 66,4 años (límites 48-92). En fumadores actuales se identificó un deterioro de la relajación dependiente de endotelio, comparado con ex fumadores y no fumadores (10,2%, n = 13, comparado con 32,9%, n = 13; p < 0,010). No obstante, en ex fumadores y no fumadores no se observó una diferencia significativa en las respuestas de relajación a acetilcolina (29,1%, n = 8, comparado con 24,6%, n = 5; p = no significativo [NS]). De forma parecida, en pacientes diabéticos y no diabéticos, no se demostró una diferencia significativa en la relajación dependiente de endotelio (23,1%, n = 10, comparado con 15,6%, n = 16; p = NS). Las respuestas de relajación en pacientes hipertensos y normotensos no fueron diferentes (20,4%, n = 12, comparado con 22,5%, n = 14; p = NS). El tabaquismo produce un efecto lesivo sobre la función endotelial de la vena safena, y el abandono del hábito puede mejorar la permeabilidad a largo plazo de esta vena usada como injerto de *bypass* en pacientes sometidos a reconstrucción arterial.

INTRODUCCIÓN

La revascularización quirúrgica de la circulación coronaria y arterial periférica con vena safena interna (VSI) ha sido el procedimiento quirúrgico

estándar durante las tres últimas décadas. Sin embargo, la principal preocupación de la cirugía mediante *bypass* siempre ha sido la de su permeabilidad a medio y largo plazo. Incluso con los progresos de las técnicas quirúrgicas, las tasas actuales de

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2008.04.006.

La dirección actual de U. Bayraktutan es: Division of Stroke Medicine, University of Nottingham, Nottingham City Hospital Campus, Nottingham, NG5 1PB, Reino Unido.

Presentado en la Reunión de la Vascular Society of Great Britain and Ireland, Manchester, Reino Unido, 28-30 de noviembre de 2007, y publicado en forma de resumen (Sharif MA, Bayraktutan U, Young IS, Soong CV. Cigarette smoking is associated with impaired endothelial function in human saphenous vein. *Br J Surg.* 2008;95[Suppl.]:2).

¹Department of Vascular and Endovascular Surgery, Belfast City Hospital, Belfast, Reino Unido.

²Department of Medicine, Queens University of Belfast, Reino Unido.

Correspondencia: Muhammad Anees Sharif, FRCS, Department of Vascular and Endovascular Surgery, Belfast City Hospital, Lisburn Road, Belfast, BT9 7AB, Irlanda del Norte, Reino Unido. Correo electrónico: aneessharif@yahoo.co.uk

Ann Vasc Surg 2009; 23: 116-121

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.04.032

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Publicado en la red: 21 de julio de 2008

permeabilidad primaria a los 5 años para el injerto venoso de *bypass* arterial femorocrural y coronario siguen siendo del 64,8% y del 78%, respectivamente^{1,2}. El fracaso del injerto venoso puede ser consecuencia de una trombosis precoz, hiperplasia neointimal y progresión del proceso aterosclerótico³.

Los cambios sustanciales de la biología vascular contribuyen al inicio y progresión de la aterosclerosis⁴. Se ha descrito con detalle el papel esencial del endotelio en la patogenia de la enfermedad⁵. La disfunción endotelial con la afectación del tono vasomotor actúa como desencadenante de una serie de eventos que dan lugar a los cambios morfológicos de esta enfermedad, con sus complicaciones clínicas⁶. Aunque en los estudios de experimentación en animales y los efectuados en seres humanos se han documentado los efectos adversos del tabaquismo, la diabetes mellitus, y la hipertensión arterial sobre la función endotelial arterial, todavía no se ha aclarado su papel en la regulación de la función endotelial venosa. Higman et al⁷ describieron los efectos adversos del tabaquismo a dicho nivel. No obstante, en su estudio, la mayoría de las muestras se obtuvieron de pacientes con venas varicosas, lo que podría implicar una disfunción endotelial preexistente⁸. Además, este estudio no examinó el efecto de otros factores de riesgo vascular sobre la función endotelial venosa.

Por esta razón, el presente estudio *ex vivo* investigó los efectos del tabaquismo, diabetes mellitus e hipertensión arterial sobre la función endotelial en vena safena humana, usada en general para la cirugía de *bypass* coronario y de arterias periféricas.

PACIENTES Y MÉTODOS

Inclusión de los pacientes y criterios de inclusión

La presente investigación cumple con los principios definidos en la Declaración de Helsinki⁹. Aprobó el protocolo de este estudio el comité de investigación de la Queens University de Belfast, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes antes de la participación. Desde abril de 2005 a marzo de 2007 se incluyeron a todos los pacientes sometidos a cirugía de *bypass* arterial para isquemia de la extremidad inferior de grados 2 y 3 según la clasificación de Fontaine y Rutherford utilizando como conducto vena safena interna. No se excluyó a ninguno de los pacientes en función de factores de riesgo cardiovascular, que incluyeron la hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia y tabaquismo.

Obtención de las muestras

A partir del extremo inferior de la VSI se obtuvo una muestra de vena que medía 2-3 cm de longitud e inmediatamente después se sumergió en 50 ml de una solución neutralizante de Krebs (en mM): NaCl 118,3, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,22, CaCl₂ 2,5, NaHCO₃ 25, y glucosa 11,1 (pH 7,4). La muestra se transportó hasta el laboratorio en una nevera. El *tiempo de isquemia fría* se definió como el intervalo desde la obtención de la muestra de vena hasta la preparación del baño de órganos oxigenado.

Estudios de la reactividad vascular

La técnica usada para los estudios de reactividad vascular se ha validado para la evaluación de las curvas de respuesta a la contracción/relajación^{10,11}. Se disecó la grasa circundante de cada segmento de vena obtenido, y se cortó un anillo de 3-5 mm que se fijó horizontalmente en ganchos de acero inoxidable. Acto seguido, éstos se sumergieron en un baño de órganos de 25 ml, lleno de una solución neutralizante de Krebs a 37°C, que burbujeaba con un 95% de oxígeno y un 5% de CO₂. Los anillos se sometieron a contracción hasta una tensión óptima de reposo de 1,5 g y equilibrada durante 90 min. Los cambios de la tensión isométrica se determinaron mediante un transductor de fuerza (LE-TR201; AD Instruments, Bella Vista, Australia) y se registraron a través de un sistema de adquisición de datos de ocho canales (PowerLab/8S, AD Instruments). Después del período de equilibrio inicial, los anillos se contrajeron con concentraciones crecientes de fenilefrina (PE, 0,003-10 µM) para obtener curvas de respuesta a la concentración y, acto seguido, se lavaron y se equilibraron. Más tarde, los anillos se sometieron a contracción con una concentración submáxima de PE, que produjo aproximadamente un 80% de la respuesta máxima, como se ha descrito previamente¹². En la meseta de la contracción, se efectuaron relajaciones dependientes de la concentración con acetilcolina (Ac, 0,03-10 µM) para evaluar las relajaciones dependientes del endotelio.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los anillos de vena safena que no se contrajeron como respuesta a dosis incrementales de fenilefrina o produjeron una respuesta contráctil a acetilcolina.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el programa Prism 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados

Unidos). Las curvas de respuesta a la concentración se ajustaron mediante una regresión no lineal con un algoritmo simple. Se calcularon los valores pD_2 . pD_2 indica $-\log CE_{50}$ y define la sensibilidad del tejido. Las respuestas contráctiles se expresaron como miligramos de tensión desarrollada, mientras que las respuestas relajantes se representaron como los cambios porcentuales a partir de la precontracción PE. La comparación de las curvas de respuesta a la contracción se evaluó mediante un análisis de la varianza para medidas repetidas (dos vías), seguido de un análisis *post hoc* de Bonferroni. Los resultados se expresan como medias \pm error estándar de la media (EEM). Se consideró significativo un valor de $p < 0,050$.

RESULTADOS

Durante un período de 2 años, se estudiaron los segmentos de VSI de 32 pacientes. Los anillos venosos de dos pacientes no se contrajeron con PE, y, en otros cuatro, se obtuvieron respuestas contráctiles a acetilcolina tras alcanzar una meseta con una dosis submáxima de fenilefrina. Del análisis posterior, se excluyeron los anillos venosos de estos seis pacientes. De estos segmentos excluidos, tres procedían de pacientes hipertensos, dos de diabéticos y dos de fumadores actuales.

En el presente estudio se incluyó un anillo venoso de cada uno de los 26 pacientes restantes. Entre ellos, 23 se sometieron a cirugía mediante *bypass* por isquemia crítica de la extremidad y los otros tres experimentaban claudicación para distancias cortas. En la *tabla I* se muestran las características de los pacientes y en la *tabla II* se resumen sus factores de riesgo. La mayor parte de los pacientes presentaban múltiples factores de riesgo (en 15 de 26 se identificó más de un factor de riesgo aterosclerótico). El tiempo medio de isquemia fría fue 32,3 min (límites, 22-55). Durante los estudios de tensión isométrica, se evaluó el efecto del tabaquismo, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial sobre la relajación dependiente del endotelio.

Tabaquismo

En fumadores actuales se evidenció un deterioro de la relajación dependiente del endotelio (10,2%, $n = 13$) comparado con ex fumadores y no fumadores (32,9%, $n = 13$; $p < 0,010$) (*fig. 1a*). No obstante, en ex fumadores y no fumadores no se observó una diferencia significativa en las respuestas de relajación a acetilcolina (29,1%, $n = 8$, y 24,6%, $n = 5$, respectivamente; $p =$ no significativo [NS]) (*fig. 1b*).

Tabla I. Demografía de los pacientes ($n = 26$)

Características	Pacientes
Edad media, años (límites)	66,4 (48-92)
Sexo	
Hombres	21
Mujeres	5
Tratamiento farmacológico	
Antiagregantes plaquetarios	22
Estatinas	20
Antihipertensivos	12
Warfarina	1

Diabetes mellitus e hipertensión arterial

En pacientes diabéticos y no diabéticos no se demostró una diferencia significativa en la relajación dependiente del endotelio (23,1%, $n = 10$, y 15,6%, $n = 16$, respectivamente; $p =$ NS) (*fig. 2a*). De forma parecida, las respuestas de relajación en pacientes hipertensos (20,4%, $n = 12$) y normotensos (22,5%, $n = 14$) no fueron significativamente diferentes ($p =$ NS) (*fig. 2b*).

DISCUSIÓN

El término “disfunción endotelial” implica una disminución de las funciones del endotelio concernientes a la coagulación, inflamación y regulación de la proliferación de células vasculares^{13,14}. Sin embargo, en buena parte de los estudios publicados, la vasorrelajación dependiente del endotelio se usa como variable indirecta de disfunción endotelial. Su causa es la pérdida de la biodisponibilidad de óxido nítrico (ON) como consecuencia de un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), en particular de radical superóxido O_2^{-15} . Este fenómeno es la causa principal de disfunción endotelial en muchos procesos patológicos, incluida la diabetes, hipertensión arterial y aterosclerosis, al igual que el tabaquismo^{16,17}. En último término, una exposición prolongada del endotelio vascular a estos factores de riesgo puede agotar el efecto protector de las defensas antiinflamatorias endógenas dentro del endotelio. Como consecuencia, las células endoteliales no sólo son disfuncionales sino que también pierden su integridad, lo que se traduce en la senescencia y desprendimiento en la circulación¹⁸.

Los resultados del presente estudio demuestran que los fumadores actuales presentan una disfunción endotelial sustancial comparado con ex fumadores y no fumadores. Estos hallazgos coinciden con los de otros estudios que demuestran una

Tabla II. Distribución de los factores de riesgo vascular en los grupos de estudio (n = 26)

Factor de riesgo analizado	Factores de riesgo asociados en el mismo grupo		
	Hipertensión arterial	Diabetes mellitus	
Fumador actual (n = 13)	6	3	
Ex/no fumador (n = 13)	6	7	
	Hipertensión arterial	Diabetes mellitus	
Ex fumador (n = 8)	3	5	
No fumador (n = 5)	3	2	
	Hipertensión arterial	Fumador actual	Ex fumador
Diabetes mellitus (n = 10)	7	3	5
No diabético (n = 16)	5	10	3
	Diabetes mellitus	Fumador actual	Ex fumador
Hipertensión arterial (n = 12)	7	6	3
Normotensión (n = 14)	3	7	5

disminución de la relajación arterial dependiente del endotelio como respuesta al tabaquismo^{19,20}. En éste, la causa principal de disfunción endotelial es la disminución de los niveles de ON, el vasodilatador más potente derivado de las células endoteliales. Además, el tabaquismo se asocia con una disminución de las células progenitoras endoteliales circulantes, lo que se traduce en el deterioro de la diferenciación y función de las células endoteliales²¹. El humo de los cigarrillos también puede modular la liberación de endotelina 1 (ET-1), que se sabe que es un péptido vasoconstrictor endógeno potente. Originalmente, se aisló de un cultivo *in vitro* de células endoteliales vasculares. Estudios recientes han confirmado que la mayor liberación de ET-1 en el tabaquismo se asocia con un aumento del tono arterial y una disminución de la vasorrelajación²².

El presente estudio no demostró una diferencia significativa de la función endotelial de la vena safena entre ex fumadores y no fumadores. Los estudios previos que han evaluado la función endotelial de la vena safena en la vascularización pulmonar han demostrado un resultado similar con un restablecimiento de la función endotelial tras el abandono del hábito^{23,24}. Aunque no hemos demostrado directamente un efecto beneficioso del abandono del hábito sobre la función endotelial, el hecho de que los ex fumadores y no fumadores no presenten diferencias significativas en comparación con una disfunción endotelial sustancial en fumadores actuales podría significar que la disfunción endotelial venosa es potencialmente reversible.

En nuestro modelo *ex vivo* de vena safena, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial no se asociaron con diferencias significativas de la vasorrelajación inducida por acetilcolina. Estos hallazgos son diferentes de los descritos por Sessa et al²⁵, que documentaron que, en pacientes diabéticos

e hipertensos, disminuye la relajación de la vena safena inducida por acetilcolina *in vitro*. De hecho, estos investigadores pudieron demostrar una respuesta contráctil en algunas de las venas de pacientes diabéticos, lo que indica una disfunción endotelial sustancial. Otros autores han demostrado que la diabetes no sólo afecta a la vasorrelajación de la vena safena por acetilcolina sino que también puede dar lugar a una variedad de lesiones histológicas del endotelio venoso incluida hiperplasia de la íntima, degeneración de la célula endotelial y depósito de calcio²⁶. Sin embargo, otros investigadores no respaldan este concepto de lesión endotelial inducida por la diabetes. Aunque en arterias coronarias de perros diabéticos se observa un deterioro de la respuesta vasodilatadora *in vivo* a la acetilcolina, la respuesta *in vitro* utilizando anillos de arteria coronaria de perros diabéticos y no diabéticos no es diferente²⁷. Más interesante resulta el estudio de Hicks et al²⁸, que describieron que la relajación de la vena safena dependiente del endotelio no es diferente en anillos venosos de pacientes diabéticos y no diabéticos. Además, no se observaron diferencias morfológicas en el microscopio óptico y electrónico entre el endotelio de vena safena obtenida de dichos pacientes. También documentaron que la diabetes no fue un factor de riesgo de estenosis del injerto venoso en la población estudiada. Los resultados del presente estudio coinciden con estos hallazgos, y hay algunas posibles explicaciones de la imposibilidad de que la diabetes y la hipertensión arterial induzcan disfunción endotelial. En primer lugar, es posible que el endotelio venoso no sea tan sensible a los efectos lesivos de ambos procesos como a los del tabaquismo. En segundo lugar, la respuesta *in vitro* del lecho vascular podría ser diferente de la respuesta *in vivo*: la reactividad vascular *in vivo* representa una función de

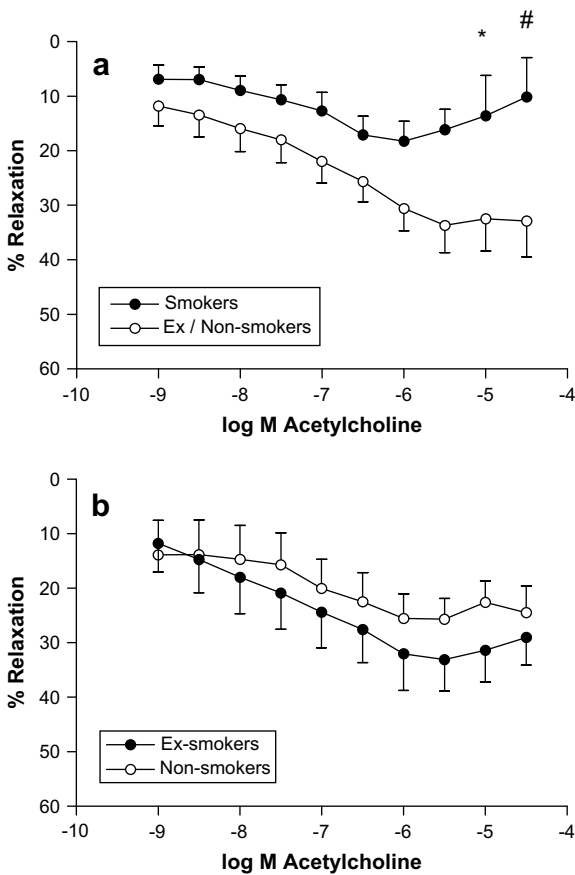


Fig. 1. Relajación inducida por acetilcolina de anillos venosos de vena safena precontraídos con fenilefrina en (a) fumadores comparado con no fumadores o ex fumadores (* $p < 0,050$, # $p < 0,010$) y (b) no fumadores comparado con ex fumadores ($p = NS$). Los resultados se expresan como medias \pm EEM. % Relaxation = Relajación %. log M Acetylcholine = log M de acetilcolina. Smokers = Fumadores. Ex / Non-smokers = Ex fumadores/no fumadores.

toda la circulación, incluida la vascularización resistente distal, mientras que la reactividad *in vitro* demuestra la respuesta de un segmento aislado, del vaso que es objeto de estudio. Por último, la mayoría de los pacientes con diabetes e hipertensión arterial son tratados con fármacos que pueden producir un efecto protector sobre el endotelio, mientras que en la actualidad los efectos del tabaquismo no pueden remediarse con ninguna forma de tratamiento.

Cuando se estudia el efecto de una variable, las otras se distribuyen aleatoriamente entre los grupos de estudio. En vista de ello, es posible una interacción entre estas variables, lo que potencialmente podría afectar a los resultados. No obstante, en la práctica, es difícil disponer de una población de pacientes con un solo factor de riesgo y la

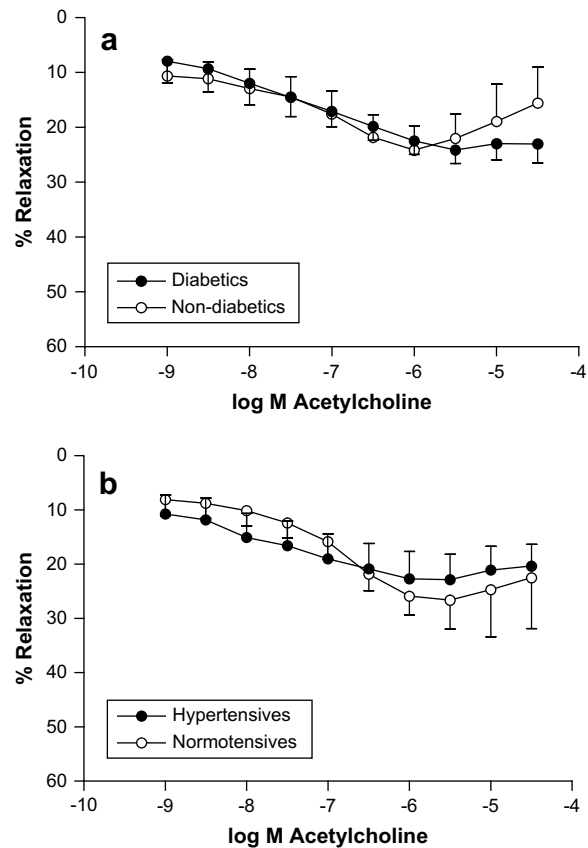


Fig. 2. Relajación inducida por acetilcolina de anillos venosos de vena safena precontraídos con fenilefrina en (a) diabéticos comparado con no diabéticos ($p = NS$) y (b) hipertensos comparado con normotensos ($p = NS$). Los resultados se expresan como medias \pm EEM. % Relaxation = Relajación %. log M Acetylcholine = log M de acetilcolina. Diabetics = Diabéticos. Non-diabetics = No diabéticos. Hypertensives = Hipertensos. Normotensives = Normotensos.

interacción entre factores de riesgo puede afectar por igual a ambos grupos.

Se excluyeron de este estudio cuatro anillos venosos en vista de su respuesta contráctil a la acetilcolina debido a la activación de los receptores muscarínicos presentes en las células musculares lisas vasculares, lo que, por tanto, confirma la lesión endotelial. Esto podría ser consecuencia de factores de riesgo aterosclerótico subyacentes, un traumatismo mecánico durante la obtención de la muestra de vena o una distensión mecánica excesiva durante la preparación de los anillos venosos en el baño de órganos. La exclusión de estos anillos venosos de un análisis adicional podría haber sesgado los resultados y es la principal limitación del presente estudio. La otra es el número relativamente reducido de pacientes. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, los efectos de los factores de riesgo vascular

sobre la función endotelial venosa son interesantes y merecen una investigación adicional en este campo.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren que el tabaquismo produce un efecto lesivo, que es potencialmente reversible, sobre la función endotelial de la vena safena humana y respaldan la importancia del abandono del hábito en una tentativa de mejorar la permeabilidad a largo plazo de la vena safena usada como injerto de *bypass* en pacientes sometidos a reconstrucción arterial.

La presente investigación se financió con una beca de la Vascular Research Fund del Belfast City Hospital, Reino Unido.

BIBLIOGRAFÍA

- Pereira CE, Albers M, Romiti M, Brochado-Neto FC, Pereira CA. Meta-analysis of femoropopliteal bypass grafts for lower extremity arterial insufficiency. *J Vasc Surg* 2006;44:510-517.
- Cho KR, Kim JS, Choi JS, Kim KB. Serial angiographic follow-up of grafts one year and five years after coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:511-516.
- Loscalzo J. Vascular matrix and vein graft failure. Is the message in the medium? *Circulation* 2000;101:221-223.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:1928-1929.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction. Testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-1295.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
- Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Smoking impairs endothelium-dependent relaxation of saphenous vein. *Br J Surg* 1993;80:1242-1245.
- Schmid-Schonbein GW, Takase S, Bergan JJ. New advances in the understanding of the pathophysiology of chronic venous insufficiency. *Angiology* 2001;52(Suppl. 1):S27-S34.
- World Medical Association. Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc Res* 1997;35:2-4.
- Bayraktutan U. Effects of angiotensin II on nitric oxide generation in growing and resting rat aortic endothelial cells. *J Hypertens* 2003;21:2093-2101.
- Sharif MA, Bayraktutan U, Young IS, Soong CV. *N*-Acetylcysteine does not improve the endothelial and smooth muscle function in the human saphenous vein. *Vasc Endovasc Surg* 2007;41:239-245.
- Ulker S, Onal A, Bolukbasi Hatip F, et al. Effect of nabumetone treatment on vascular responses of thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Pharmacology* 2000;60:136-142.
- Busse R, Flemming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 1996;33:181-194.
- Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153-2157.
- Ogita H, Liao JK. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium* 2004;11:123-132.
- Bayraktutan U. Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabet Obesity Metab* 2002;4:224-228.
- Bayraktutan U. Reactive oxygen species, nitric oxide and hypertensive endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev* 2005;1:201-215.
- Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1728-1730.
- Migliacci R, Gesele P. Smoking and impaired endothelium-dependent dilatation. *N Engl J Med* 1994;334:1674.
- Mays BW, Ripple T, Eginton MT, et al. Smoking cessation reverses arterial endothelium-dependent relaxation injury. *Vasc Endovasc Surg* 1998;32:407-413.
- Michaud SE, Dussault S, Hadda P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 2006;187:423-432.
- Rahman MM, Elmi S, Chang TK, et al. Increased vascular contractility in isolated vessels from cigarette smoking rats is mediated by basal endothelin release. *Vascul Pharmacol* 2007;46:35-42.
- Wanner A, Campos MA, Mendes E. Airway blood flow reactivity in smokers. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20:126-129.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilatation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88:2149-2155.
- Sessa C, Morasch MD, Friedland M, Kline RA. Risk factors of atherosclerosis and saphenous vein endothelial function. *Int Angiol* 2001;20:152-163.
- Lorusso R, De Cicco G, Beghi C, et al. Functional effects of nitric oxide-releasing aspirin on vein conduits of diabetic patients undergoing CABG. *Int J Cardiol* 2007;118:164-169.
- Koltai MZ, Hadhazy P, Posa I, et al. Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovasc Res* 1997;34:157-163.
- Hicks RC, Moss J, Higman DJ, et al. The influence of diabetes on the vasomotor responses of saphenous vein and the development of infra-inguinal vein graft stenosis. *Diabetes* 1997;46:113-118.