動脈脈波速度の運動負荷応答を利用した血管内皮機能評価法の開発

独立行政法人
産業技術総合研究所　菅原　順

Evaluation of Endothelial Function with Exercise-related Change in Pulse Wave Velocity

by

Jun Sugawara
Institute for Human Science and Biomedical Engineering,
the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

ABSTRACT

There is an increasing recognition that pulse wave velocity (PWV), an index of arterial stiffness, changes transiently via alteration of vascular smooth muscular tone. The aim of this study was to determine whether acute change in leg PWV after a low- intensity exercise bout reflects endothelial function. Apparent healthy 6 young (21 ± 1 years) and 10 older (69 ± 3 years) adults male subjects were studied. Each subject was measured both leg PWV before and after a low-intensity single-leg pedaling exercise (20 watt, 5 min). Young subjects demonstrated a significant reduction in the exercised leg PWV (-8.0%), whereas the non-exercised leg PWV did not change significantly (+2.2%). These results suggest that the decrease in PWV in the exercised leg was induced mainly by exercise-related regional factors (e.g., endothelium-derived vosoactive substance). In older subjects, on the other hand, no significant changes in PWV were observed either in the exercised leg or the non-exercised leg. These results might indicate the aging-related impairment of endothelial function. Together, response of leg PWV to the single-leg pedaling might be a screening tool of endothelial dysfunction. In young subjects, however, responses of leg PWV to the single-leg pedaling did not change significantly after 8 weeks

of endurance exercise training intervention. Further study to determine the sensitivity of this index is warranted.

要　旨

動脈脈波速度（Pulse wave velocity: PWV）は臨床領域で普及している動脈スティフネスの指標であるが，血管平滑筋の制御を受けダイナミックに変化することが明らかにされている．本研究では，低強度運動に対するPWVの応答が血管内皮機能の指標になり得るかどうかを検討した．明らかな心血管径疾患を有さない若年男性6名（21±1歳）および中高年男性10名（69±3歳）を対象に，両下肢PWVを低強度片脚ペダリング運動（20 watt，5分間）の前後で測定した．若年者では，運動後，運動脚PWVが有意に低下し（-8.0%），非運動脚PWVに有意な変化は認められなかった（+2.2%）．それゆえ，血流変化に伴う血管内皮細胞由来の血管拡張物質の産生増大が関与していると考えられる．一方，中高年者では運動脚，非運動脚ともPWVに有意な変化は認められなかった．これらの結果は，下肢動脈における血管内皮機能の低下を反映しているのかもしれない．以上の結果を踏まえると，運動に伴う下肢PWVの応答を評価する事で血管内皮機能低下の有無を判別することが出来るかもしれない．ただし，若年者のこの応答は持久性運動トレーニング前後で変化しなかったことから，今後，本法の測定精度についての更なる検討が必要と思われる．

緒　言

血管内皮機能は，血管作動性物質を放出して血管平滑筋の緊張性を調整し，血流調節に寄与するとともに，血管平滑筋細胞の分化抑制，炎症抑制，血栓生成抑制などに寄与する[1-3]．しかし，この機能は加齢とともに低下し[4, 5]，アテローム性動脈硬化症を引き起こし，ひいては心筋梗塞，脳卒中，末梢動脈疾患（peripheral arterial disease）へとつながる[1-3]．それゆえ，心血管系疾患の一次予防として，近年，血管内皮機能低下の早期発見が重要視されている．

現在，血管内皮機能の有用な評価法として認知されているのが，血流依存性血管拡張応答（Flow-mediated vasodilation: FMD）である[3, 6]．通常，FMD法では，安静時（ベースライン）の上腕動脈内径を測定した後，5分間，血圧測定用カフを用いて前腕の血流を遮断する．5分後に駆血を開放し，その後に見られる最大血管拡張応答から血管内皮機能を評価する．この方法では，血流が再冠流することでシェアストレスが増し，一酸化窒素[7]，プロスタサイクリン[8]，血管内皮由来過分極因子（endothelium-derived hyperpolarizing factor EDHF）[9]などの血管拡張物質が産生される事で，血管径が拡張すると考えられている．通常，血管径は超音波エコー装置を用いて測定するが，適切な評価には測定者の熟練した超音波画像の測定技術が不可欠である．被験者のわずかな動きによって画像に乱れが生じる場合も少なくない．加えて，画像解析にもかなりの時間を要するという問題点を抱えている．このような現状を考えると，超音波エコー法によるFMD測定に代わる簡便かつ高精度な血管内皮機能評価法の開発が必要といえる．

動脈脈波速度（Pulse wave velocity: PWV）は，動脈上の離れた2点間における中枢側から末梢側への脈波の伝播時間とその間の距離から計算される指標で，動脈壁硬化度（スティフネス）が高いほどその速度は速くなる[10, 11]．測定が非常に簡便であり，臨床領域で最も普及している動脈ステ

ィフネスの指標である．近年ではPWVが急性のメンタルストレス[12]，カフェイン摂取[13, 14]，喫煙[14]，一過性運動[15, 16]などによって短時間で変化する事から，動脈壁の硬化度のみならず，血管平滑筋の緊張性（トーヌス）も反映していると考えられるようになっている．

そこで本研究では，まず通常行われている5分間の前腕血流遮断および血流開放に伴う血管拡張応答をPWVによって評価し得るかどうかを検証した．次いで，血流遮断－開放による充血を運動性充血に置き換え，低強度運動に対するPWVの応答が血管内皮機能の指標になり得るかどうかを検討した．前者では上肢PWVを，後者では下肢PWVを対象として，検証を進める事とした．

1．方　法

実験1：上腕動脈におけるFMDとPWVとの比較

1．1　対　象

幅広い年代の明らかな疾患を有さない成人28名（19-68歳，男性20名）を対象とした．高血圧者，肥満者，喫煙習慣を有する者は事前に対象から除外した．実験期間中に服薬をしている者はいなかった．本研究の内容はテキサス大学オースティン校倫理委員会の承認を受けたもので，実験に先立ち，被験者には，実験目的と内容を説明し，書面によりインフォームドコンセントを得た．

1．2　方　法

被験者は，実験24時間前からアルコールの摂取と激しい身体活動を禁じた．また，実験4時間前から絶食とし，カフェイン摂取も禁止した．実験は，室温調節（25℃）された実験室で，午前中の時間帯（8:00-12:00）に実施した．身体計測を行った後，被験者は十分なベッドレストをとった．その後，5分間の前腕血流遮断－開放刺激を40分以上のインターバルをはさんで2回行い，それぞれの刺激の前後での血管拡張応答測定（超音波エコー法）とPWV測定を行った．超音波エコー診断とPWV測定はランダムな順番で行った．

1．3　測定項目

1）FMD法．リニアアレイトランスデューサー（7.5MHz）を備えた超音波エコーシステム（HDO5000CV, ALT Instruments社, Bothel, WA）を使用し上腕動脈内径を測定した．カスタムメイドの上腕およびプローブ固定器具に上腕を乗せ，肘関節から5-10cm近位部でBモードで撮像し，上腕動脈前壁側外膜の内縁（内腔側）および後壁側内中膜複合体が鮮明に見える場所およびプローブ角度でプローブを固定した．前腕駆血用カフを肘関節にかからないようにしながら前腕近位部に巻いた．駆血用カフは急速加圧減圧装置（E20 Rapid Cuff Inflator, Hokanson社，Bellevue，WA）に接続した．駆血圧は仰臥位安静時の上腕収縮期血圧よりも100mmHg高い圧とした．ベースラインの上腕動脈内径を測定した後，5分間の前腕駆血を施した．解放後は135秒後まで画像を記録した．超音波エコー画像記録中は心電図（ECG）を同時記録した．画像はDICOM形式で保存し，画像解析ソフトウェア（Vascular Research Tool Brachial analyzer, Medical Imaging Applications, Coralville, IA）によりオフライン解析を行った．上腕動脈内径は上腕動脈前壁側外膜内縁から後壁側内中膜複合体と内腔との間までの垂直距離とし，ベースライン（駆血前）の値は連続10拍の心拡張期内径の平均値，駆血解放後の最大内径は最大内径とその前後1拍の計3拍の平均値とした．駆血解放後の最大内径とベースラインとの差をベースラインの値で除し，変化率（%FMD）を求めた[6]．

2）PWV法．PWVは上腕動脈上の2点間の距離と，脈波がその間を通過する時間（伝播時間）から算出した[17]．距離は布製メジャーを使用し，

ランダムゼロ法にて2回測定し，その平均値を用いた．伝播時間の計測には2台のドップラーフローメータ（810-A, Parks Medical社, Aloha, OR）を使用した．2人の験者がそれぞれ肘関節より20-25cm近位部の上腕動脈上と手首付近の橈骨動脈上で，動脈ドップラー波形を同時記録した．signal-processing software（WINDAQ，DATAQ Instruments Inc.，Akron，OH）を使用し，foot-to-foot法で伝播時間を求めた[17]．PWVは駆血前（ベースライン）および駆血開放中に測定し，駆血開放中のPWVの最低値とベースラインとの差をベースラインの値で除し，変化率を求めた．PWVもFMDと同様にベースライン（駆血前）の値は連続10拍のPWVの平均値，駆血解放後のPWV最低値は最小PWVとその前後1拍の計3拍の平均値とした．

1．4　統計処理

FMDとPWV変化率との関連性をピアソンの相関係数を用いて評価した．統計学的有意水準は5％とした．

実験2：一過性運動に伴う下肢PWV応答と加齢との関係

1　対　象

明らかな心血管系疾患を有さない若年男性6名（年齢21±1歳，身長168±1cm，体重62.3±1.3kg）および中高年男性10名（年齢69±3歳，身長164±2cm，体重57.7±2.2kg）を対象とした．本研究は，筑波大学体育科学系の倫理委員会の承認を受けた．実験に先立ち，被験者には，実験目的と内容を説明し，書面によりインフォームドコンセントを得た．

2．方　法

PWV測定は8時間の絶食後，午前中の時間帯に実施した．被験者には24時間以内のアルコール摂取および激しい運動を避けるよう指示した．被験者は実験室入室後，測定機器の装着された後，10分以上の仰臥位安静をとった．次に，両下肢（大腿動脈－後脛動脈間）のPWVを測定し，その後で仰臥位のまま5分間の片脚ペダリング運動を行った．片脚ペダリング運動は電動負荷式自転車エルゴメータ（232C-XL，Combi社製）を使用し，負荷は若年者，中高年者者とも30wattとした．ペダリング回転数は60回/分とし，メトロノームを使用しピッチを提示した．運動終了2分後に，両下肢PWVを再度測定した．

3．測定項目

下肢PWV．動脈脈波速度測定器（formABI/PWV，コーリンメディカルテクノロジー社製）を使用し，両下肢（大腿動脈－後脛動脈間）のPWVを測定した[15, 16]．センサ間の距離は布製メジャーを使用し，ランダムゼロ法にて2回測定し，その平均値を用いた．大腿動脈圧波形はトノメトリセンサを用いて記録した．後脛動脈圧波形は，エアプレスチモグラフィーにて記録した．両動脈波形の心収縮期の急峻な立ち上がりを，4次微分法を用いたアルゴリズムを使って自動検出し，圧の伝播時間を計算した．

心拍数および血圧．PWV測定中の心拍数と血圧は，動脈脈波速度測定器（form PWV/ABI，コーリンメディカルテクノロジー社製）に備えられた心電図および自動血圧計（オシロメトリック法）により測定した．

1．5統計処理

ANOVAおよびMANOVAを用いて，下肢PWVの応答を運動脚と非運動脚との間で，また若年者と中高年者との間で比較した．統計学的有意水準は5％とした．

実験3：一過性運動に伴う下肢PWV応答と持久性トレーニング

1．対　象

実験2に参加した若年男性6名を対象とした．本研究は，筑波大学体育科学系の倫理委員会の承認を受けた．実験に先立ち，被験者には，実験目的と内容を説明し，書面によりインフォームドコンセントを得た．

2．方　法

被験者は8週間の持久性運動トレーニングプログラムを実施し，8週間のプログラムの前後で，多段階最大運動負荷試験による最大酸素摂取量測定と片脚ペダリング運動負荷試験を実施した．片脚ペダリング運動負荷試験については，24時間以内のアルコール摂取および激しい運動を避けさせ，実験前8時間の絶食の後，午前中の時間帯に実施した．

3．測定項目

最大酸素摂取量．体重を測定した後，自転車エルゴメータを使用した多段階最大運動負荷試験（初期負荷量30watt，漸増率+30watt/min）を行い，疲労困憊に至るまで運動を継続させた．運動中は心電図を記録するとともに，酸素摂取量ならびに二酸化炭素排出量を呼気ガス分析器（AE-310S，ミナト医科学社製）により測定した．呼気ガスは30秒毎の平均値を算出し，運動中の最高値を最大酸素摂取量とした．

下肢PWV，心拍数，血圧．実験2と同様の方法を用いた．

4．運動トレーニング

被験者は，トレーニング監視下で，1回60分間，週3～4回，8週間（計28セッション）の両脚サイクリング運動トレーニングプログラムを施行した．運動強度はトレーニングプログラム開始前の最大酸素摂取量の70%相当の強度とした．

5．統計処理

MANOVAを用いて，トレーニング前後における下肢PWVの応答を比較した．統計学的有意水準は5%とした．

2．結　果

実験1

被験者の身体特性を表1に示す．5分間の前腕駆血－開放に伴う上肢PWVの変化量，変化率とも，FMDと有意な相関を示さなかった（図1）．

表1　Subjects characteristics

N, male/female	20 / 8
Age, years	33 ± 14
Height, cm	172 ± 10
Body mass, kg	74 ± 16
Body mass index, kg/m^2	25 ± 4
Systolic blood pressure, mmHg	119 ± 12
Diastolic blood pressure, mmHg	76 ± 7
Mean arterial pressure, mmHg	90 ± 7
Flow-mediated vasodilation, %	5.8 ± 2.1
Change in pulse wave velocity, %	-18.0 ± 10.7

Data are mean and SD.

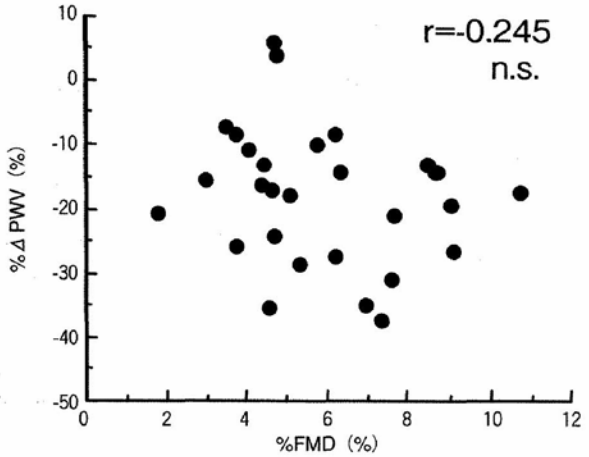

図1　Relation between flow-mediated vasodalation (%FMD) and relative change in pulse wave velocity (%Δ PWV) after a 5-minute forearm blood flow occlusion.

実験2

被験者の心拍数および血圧の応答を表2に示す．

表 2　Responses of heart rate and blood pressure to the single-leg pedaling exercise test in young and older subjects

		Baseline	Exercise	2min after
Heart rate, bpm	Young	53 ± 4	78 ± 3*	55 ± 3
	Older †	68 ± 5	83 ± 4*	67 ± 5
Systolic blood pressure, mmHg	Young	111 ± 3	121 ± 2	112 ± 3
	Older †	120 ± 4	140 ± 5*	121 ± 4
Diastolic blood pressure, mmHg	Young	65 ± 2	70 ± 1*	67 ± 1
	Older †	76 ± 3	80 ± 3*	74 ± 3
Mean arterial pressure, mmHg	Young	83 ± 2	91 ± 2	83 ± 2
	Older †	93 ± 3	104 ± 4*	90 ± 3

Data are mean ± SE. * P<0.05 vs. baseline (via post-hoc test), † P<0.005 vs. young subjects (via ANOVA)

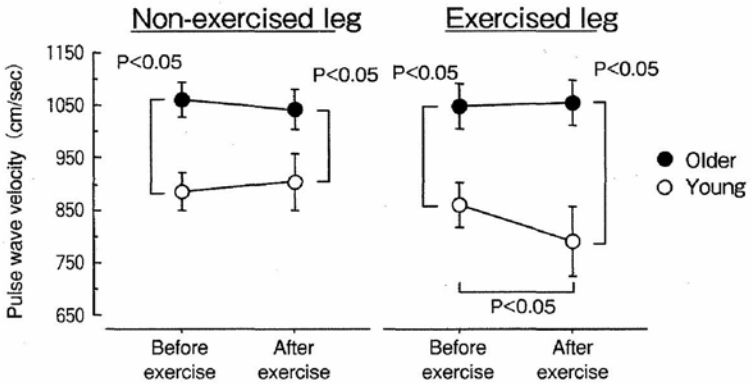

図 2　Responses of leg pulse wave velocity to single-leg pedaling: young vs. older subjects. Open circles are young subjects; closed circles are older subjects

中高年者の心拍数および血圧は若年者よりも有意に高値であった．若年者，中高年者とも運動中に心拍数と上腕血圧が有意に上昇し，運動終了後には安静時水準に戻った．

若年者では，運動後，運動脚PWVが有意に低下し（-8.0%），非運動脚PWVに有意な変化は認められなかった（+2.2%）（図2）．一方，高齢者では運動脚，非運動脚ともPWVに有意な変化は認められなかった（それぞれ+0.7%，-1.8%）（図2）．運動脚PWV変化量と非運動脚PWV変化量との比は，若年者のみ運動後に有意に低下し，中高年者では有意な変化は認められなかった（図3）．

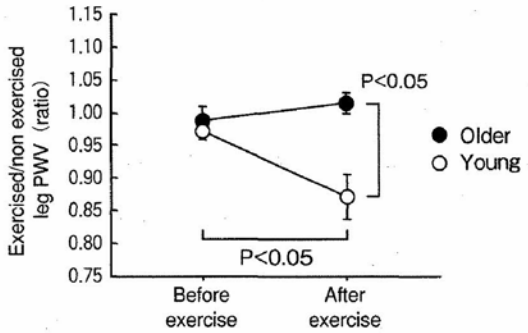

図 3　Normalized exercised-leg pulse wave velocity (PWV) in young and older subjects. Exercised-leg PWV was normalized by non-exercised leg PWV

実験3

被験者のトレーニング実施率は100％だった．トレーニング後，体重は低下し（62.3 ± 1.3 vs. 60.3 ± 1.5kg, P<0.01），最大酸素摂取量は増大した（45.1 ± 1.2 vs. 54.8 ± 1.9ml/kg/min, P<0.01）．

安静時の心拍数および血圧にトレーニング前後で有意な変化は認められなかった（表3）．片脚ペダリング運動時中および回復時の心拍数はトレーニング後に有意に低値だった．片脚ペダリング運動時の血圧はトレーニング前後とも安静時に対し運動中で有意に高値を示し，運動終了後は安静時水準に回復した．この応答にトレーニング前後で有意な違いは認められなかった．

持久性トレーニング前後における片脚ペダリン

表3　Responses of heart rate and blood pressure to the single-leg pedaling exercise test before and after the endurance exercise training (TR)

		Baseline	Exercise	2min after
Heart rate, bpm	Before TR	53 ± 4	78 ± 3*	55 ± 3
	After TR	50 ± 4	71 ± 4*	52 ± 4†
Systolic blood pressure, mmHg	Before TR	111 ± 3	121 ± 2*	112 ± 3
	After TR	108 ± 2	120 ± 1*	111 ± 3
Diastolic blood pressure, mmHg	Before TR	65 ± 2	70 ± 1*	67 ± 1
	After TR	65 ± 2	70 ± 2*	67 ± 2
Mean arterial pressure, mmHg	Before TR	83 ± 2	91 ± 2*	83 ± 2
	After TR	82 ± 1	89 ± 1*	83 ± 2

Data are mean ± SE. * P<0.05 vs. baseline (via post-hoc test), † P<0.005 vs. before training

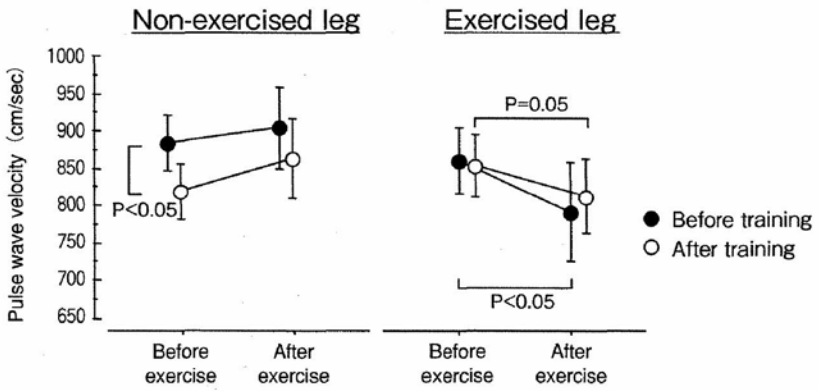

図4　Responses of leg pulse wave velocity to single-leg pedaling: before vs. after endurance exercise training. Closed circles are before the training; open circles are after the training

グ運動に伴うPWV応答を図4に示す．安静時（運動前）の運動脚PWVはトレーニング前後で変化しなかったが，非運動脚PWVはトレーニング後に有意に低下した．片脚ペダリング運動に対する応答については，トレーニング前，運動脚PWVが片脚ペダリング後に有意に低下し（-8.0%, P<0.05），トレーニング後も運動脚PWVは低下した（-4.8%, P=0.05）．非運動脚はトレーニング前後とも，片脚ペダリング前後での有意な変化は認められなかった．片脚ペダリング前後での運動脚PWV変化量と非運動脚PWVの変化量との比は，トレーニング前に比してトレーニング後で有意に高値であったが，応答の程度にトレーニング前後で有意差は認められなかった（図5）．

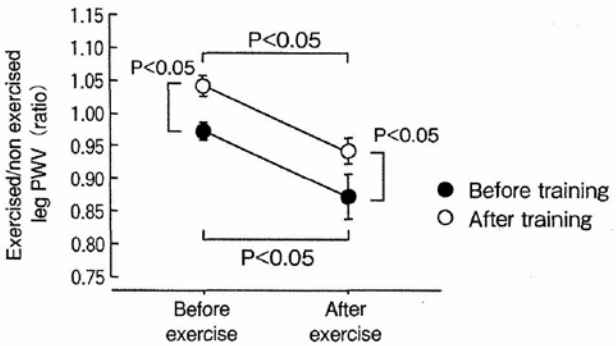

図5　Normalized exercised-leg pulse wave velocity (PWV) before vs. after endurance exercise training. Exercised-leg PWV was normalized by non-exercised leg PWV

3．考　察

実験1では，通常行われている5分間の前腕血流遮断および血流開放に伴う血管拡張応答をPWVによって評価し得るかどうかを検証した．幅広い年齢の対象者において，5分間の駆血および解放後の上腕動脈内径と上肢（上腕動脈－橈骨動脈）PWVとの変化を測定した．PWVは5分間の駆血解放後有意に低下した．PWVは動脈壁の硬化度および壁厚と比例し，動脈内径および血液粘度と反比例するとされる[18]．それゆえ，駆血解放後のPWVの低下は，シェアストレスの増大によって一酸化窒素[7]，プロスタサイクリン[8]，EDHF[9]などの血管拡張物質の産生が増し，血管

平滑筋のトーヌスの低下とそれによる動脈内径の拡張が生じたことに起因すると考えられる．しかしながら，超音波エコー法で測定した血管拡張率（%FMD）とPWV変化率との間には有意な相関は認められなかった．本実験のみからこの理由を明らかにすることは出来ないが，PWVの測定部位が非常に狭い範囲のため，速度を求める際に必要となる時間的要因と距離的要因の双方に測定誤差が含まれてしまったためではないかと推察される．

超音波検査装置によるFMD測定が普及しつつあるが，実験者の熟練した技術が必要とされるため，再現性などの測定精度に問題を抱えているのが現状である．この点に関して，超音波エコー法に比べれば，PWVの測定は格段に簡便である．しかし本研究の結果を踏まえると，5分間の駆血開放による反応性充血前後のPWVの変化から血管内皮機能を評価するには，測定精度が不十分かと思われる．

実験2では，血流遮断－開放による充血を運動性充血に置き換え，低強度運動に対するPWVの応答が血管内皮機能の指標になり得るかどうかを検討した．5分間の片脚ペダリング前後での下肢（大腿動脈－後脛動脈）PWVの変化を若年者と中高年者で比較したところ，我々の先行研究[15, 16]と同様に，若年者では，片脚ペダリング後に運動脚のPWVが有意に低下し，一方，非運動脚のPWVは有意な変化を示さなかった．この結果は，血流変化に伴う血管内皮細胞由来の血管拡張物質の産生増大が関与している可能性を示唆する．他方，中高年者では運動脚，非運動脚とも運動前後でPWVは変化しなかった．Donato et al.[19]は，最大下の膝関節伸展運動中の大腿血流量は，運動負荷量の絶対値を合わせた場合，加齢に伴い減少することを報告している．本研究では，若年者，中高年者とも30 wattの負荷で運動を施行しているため，中高年者の運動性充血応答は若年者よりも小さかったかもしれない．ただし，少なからず下肢血流量は増大しているはずである．それにもかかわらず運動脚のPWVはほとんど変化しなかった．加齢に伴い血管内皮機能は低下することが報告されていること[4, 5]から，中高年者に見られたこれらの結果は，下肢動脈における血管内皮機能の低下を反映しているのかもしれない．

持久性運動トレーニングを行うと血管内皮機能が向上する事が報告されている[4, 5]．そこで実験3では，片脚ペダリングに伴うPWVの応答が持久性トレーニング後に変化するかどうかを調べた．若年健常者を対象に8週間の中強度持久性運動トレーニング（最大酸素摂取量の70％相当）を施行したところ，トレーニング期間後，最大酸素摂取量は有意に増大した．一方，片脚ペダリングに伴う運動脚PWVの応答に有意な差は認められなかった．トレーニングに伴う循環応答の変化も想定された事から，非運動脚PWVで標準化し，全身的な影響を除外したが，その場合も結果に違いは見られなかった．運動脚PWV－非運動脚PWV比はトレーニング後の方が有意に高値であったが，これは持久性運動トレーニング終了後に非運動脚のベースラインのPWVが低下したためと考えられる．我々の仮説どおり，運動に伴う下肢PWVの変化が血管内皮機能を反映しているとすると，これらの結果は8週間の持久性トレーニングでは，下肢血管内皮機能は改善されないという可能性を示唆する．この理由として，対象者が若年健常者であり，血管内皮機能が比較的高い水準にあった[4, 5]ため，トレーニング効果が小さかったのかもしれない．この点に関しては，血管内皮機能が低下している中高年者を対象としたトレーニング実験で検証する事ができるかと思われる．一方，指標自体の問題，すなわち一過性運動に伴うPWVの応答がトレーニング効果を検出できるほど高い精度を有していない可能性も捨てきれない．これについては，薬理実験などによって，詳

細な検討を行う必要があるかもしれない．

4．結　論

片脚ペダリング運動に伴う下肢PWVの応答に，若年者と中高年者との間に明らかな違いが認められた．それゆえ，血管内皮機能低下の有無を評価するスクリーニングツールになり得るかもしれない．ただし，若年者のこの応答は持久性運動トレーニング前後で変化しなかったことから，今後，本法の測定精度についての更なる検討が必要かと思われる．

謝　辞

本研究は，財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団の支援を得て行われた．本研究を遂行するに当たり，テキサス大学オースティン校・田中弘文准教授および筑波大学大学院 人間総合科学研究科・前田清司講師の協力を得た．ここに謝意を表する．

文　献

1) Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J., Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.*, 115:1285-1295 (2007)

2) Forstermann U., Munzel T., Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.*, 113:1708-1714 (2006)

3) Katz S.D., Hryniewicz K., Hriljac I., Balidemaj K., Dimayuga C., Hudaihed A., Yasskiy A., Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation.*, 111:310-314 (2005)

4) DeSouza C.A., Shapiro L.F., Clevenger C.M., Dinenno F.A., Monahan K.D., Tanaka H., Seals D.R., Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation.*, 102:1351-1357 (2000)

5) Taddei S., Galetta F., Virdis A., Ghiadoni L., Salvetti G., Franzoni F., Giusti C., Salvetti A., Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation.*, 101:2896-2901 (2000)

6) Corretti M.C., Anderson T.J., Benjamin E.J., Celermajer D., Charbonneau F., Creager M.A., Deanfield J., Drexler H., Gerhard-Herman M., Herrington D., Vallance P., Vita J., Vogel R., 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., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 39:257-265 (2002)

7) Joannides R., Haefeli W.E., Linder L., Richard V., Bakkali E.H., Thuillez C., Luscher T.F., Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo., *Circulation.*, 91:1314-1319 (1995)

8) Okahara K., Sun B., Kambayashi J., Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells., *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 18:1922-1926 (1998)

9) Busse R., Edwards G., Feletou M., Fleming I., Vanhoutte P.M., Weston A.H., EDHF: bringing the concepts together., *Trends Pharmacol. Sci.*, 23:374-380 (2002)

10) Asmar R., Arterial Stiffness and Pulse Wave Velocity: *Clinical application.*, Paris: Elsevier (1999)

11) Bramwell J.C., Hill A.V., The velocity of the pulse wave in man., *Proceedings of the Royal Society of London.*, 93:298-306 (1922)

12) Vlachopoulos C., Kosmopoulou F., Alexopoulos N., Ioakeimidis N., Siasos G., Stefanadis C., Acute mental stress has a prolonged unfavorable effect on arterial stiffness and wave reflections., *Psychosom. Med.*, 68:231-237 (2006)

13) Mahmud A., Feely J., Acute effect of caffeine on arterial stiffness and aortic pressure waveform., *Hypertension.*, 38:227-231 (2001)

14) Vlachopoulos C., Kosmopoulou F., Panagiotakos D., Ioakeimidis N., Alexopoulos N., Pitsavos C., Stefanadis C., Smoking and caffeine have a synergistic detrimental effect on aortic stiffness and wave reflections., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 44:1911-1917 (2004)

15) Sugawara J., Maeda S., Otsuki T., Tanabe T., Ajisaka R., Matsuda M., Effects of nitric oxide synthase inhibitor on decrease in peripheral arterial stiffness with acute low-intensity aerobic exercise., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,* 287:H2666-2669 (2004)

16) Sugawara J., Otsuki T., Tanabe T., Maeda S., Kuno S., Ajisaka R., Matsuda M., The effects of low-intensity single-leg exercise on regional arterial stiffness., *Jpn. J. Physiol.,* 53:239-241 (2003)

17) Tanaka H., DeSouza C.A., Seals D.R., Absence of age-related increase in central arterial stiffness in physically active women., *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.,* 18:127-132 (1998)

18) Nichols W., O'Rourke M.F., *McDonald's Blood Flow in Arteries 5th Ed. Theoretical, experimental and clinical principles.,* London: Arnold (2005)

19) Donato A.J., Uberoi A., Wray D.W., Nishiyama S., Lawrenson L., Richardson R.S., Differential effects of aging on limb blood flow in humans., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,* 290:H272-278 (2006)