

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYOLOJİ ANABİLİM DALI



**L-NAME (N-Nitro-L-Arginin Metil Ester
Hidroklorid) UYGULAMASI ARDINDAN
ENDOTELYAL DİSFONKSİYON MODELİ
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA, ENDOTEL
DİSFONKSİYONUNUN ULTRASONOGRAFİK
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. MUHAMMET KÜRŞAT ŞİMŞEK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYOLOJİ ANABİLİM DALI



**L-NAME (N-Nitro-L-Arginin Metil Ester
Hidroklorid) UYGULAMASI ARDINDAN
ENDOTELYAL DİSFONKSİYON MODELİ
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA, ENDOTEL
DİSFONKSİYONUNUN ULTRASONOGRAFİK
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. MUHAMMET KÜRŞAT ŞİMŞEK

TEZ DANIŞMANI: MUSTAFA SEÇİL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2020

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından 2019.KB.SAG.035 numaralı proje kapsamında yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ.....	VI
DENKLEMLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR	VIII
TEŞEKKÜR.....	XI
ÖZET.....	1
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 ATEROSKLEROZ	6
2.1.1 Ateroskleroz Tanımı.....	6
2.1.2 Aterosklerozun Epidemiyoloji	7
2.1.3 Ateroskleroz Oluşumu ve Patogenezi	7
2.1.4 Risk Faktörleri.....	9
2.1.5 Ateroskleroz Tanısında Görüntüleme	10
2.1.6 Ateroskleroz Hayvan Modelleri	12
2.2 ENDOTEL	12
2.2.1 Endotel Fonksiyon.....	13
2.2.2 Nitrik Oksit.....	15
2.2.3 Endotel Disfonksiyonu.....	16
2.2.4 ED'nin Tanınması	17
2.2.5 Deneysel Hipertansiyon Modelleri.....	18
2.2.5.1 Genetik İndüklü Hipertansiyon	19

2.2.5.2	Çevresel İndüklü Hipertansiyon	19
2.2.5.3	Farmakolojik İndüklü Hipertansiyon	19
2.2.5.3.1	DOCA-Tuz İndüklü Hipertansiyon	19
2.2.5.3.2	NOS İnhibisyonu ile Oluşturulmuş Hipertansiyon	19
2.2.5.4	Renal İndüklü Hipertansiyon.....	20
2.3	ULTRASONOGRAFİ	20
2.3.1	Renkli Doppler Ultrasonografi.....	21
2.3.1.1	Temel Kavramlar.....	21
2.3.1.2	Doppler Yöntemleri.....	22
2.3.1.2.1	Sürekli Dalga Formu Doppler (Continuous wave = CW).....	22
2.3.1.2.2	Puls Dalga Formu Doppler (Pulsed Wave=PW).....	22
2.3.1.3	Renkli Doppler Ultrasonografi (RDUS).....	22
2.3.2	Endotel Disfonksiyonu ve Ateroskleroz Tanısında Ultrasonografi	22
2.3.2.1	Akım Aracılı Dilatasyon (Flow Mediated Dilatation = FMD).....	23
2.3.2.2	Karotis İntima Media Kalınlığı	23
2.3.2.2.1	CIMT Ölçüm Tekniği.....	24
2.3.2.2.2	CIMT ile ED ve AS İlişkisi	26
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1	GEREÇ	27
3.1.1	Kullanılan Malzemeler.....	28
3.2	YÖNTEM	29
3.2.1	Araştırmanın Tipi	30
3.2.2	Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	30
3.2.3	İş Akış Planı	31
3.2.4	Deney Hayvanı Grupları	31
3.2.5	Sıçanlarda Sistemik Endotel Disfonksiyonunun Oluşturulması	33

3.2.6	Sıçanlarda Sevoflurane Anestezisi	33
3.2.7	Sıçanlarda Sistemik Endotel Disfonksiyonun Ultrasonografik Olarak Değerlendirilmesi.....	35
3.2.8	Plazma Örneklerinin Analizi.....	38
3.2.9	Farelerin Feda Edilmesi ile Organ ve Dokuların Toplanması.....	39
3.2.10	Histopatolojik Değerlendirmeler	40
3.2.10.1	Doku Takip Prosedürü.....	40
3.2.10.2	Vasküler Yapılarda IMT Ölçümleri	40
3.2.10.3	İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü.....	41
3.2.11	Plazma ADMA, eNOS ve VEGF'nin ELİSA ile Değerlendirilmesi	43
3.2.11.1	Örneklerin Çalışmaya Hazırlanması	43
3.2.11.1.1	Asimetrik Dimetiltarjinin Ölçümü	43
3.2.11.1.2	VEGF Ölçümü.....	44
3.2.11.1.3	eNOS Ölçümü	45
3.2.12	Etik Kurul Onayı ve Projelendirme.....	46
3.2.13	Verilerin Değerlendirilmesi.....	46
4.	BULGULAR	46
4.1	Korelasyon Analizleri	46
4.2	Gözlemciler Arası Güvenilirlik.....	47
4.3	Kontrol Grubu Bulguları.....	48
4.3.1	Kontrol Grubu Tanımlayıcı Veriler.....	48
4.4	Sham Grubu Bulguları	49
4.4.1	Sham Grubu Tanımlayıcı Veriler	49
4.4.2	Sham Grubu Karşılaştırmaları.....	50
4.5	L-NAME Erken Etki Grubu Bulguları	51
4.5.1	L-NAME Erken Etki Grubu Tanımlayıcı Veriler	51

4.5.2	L-NAME Erken Etki Grubu Karşılaştırmaları	53
4.6	L-NAME Geç Etki Grubu Bulguları	56
4.6.1	L-NAME Geç Etki Grubu Tanımlayıcı Veriler	56
4.6.2	L-NAME Geç Etki Grubu Karşılaştırmaları	57
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	62
5.1	Deney Başlangıç Verileri	62
5.2	Uygulayıcılar Arası Uyum	62
5.3	Başlangıç Ultrasonografi Verileri	62
5.4	Gruplar Arası Karşılaştırmalar	63
5.4.1	Sham Grubu Karşılaştırmalar	63
5.4.2	Erken Etki Grubu Karşılaştırmalar	63
5.4.3	Geç Etki Grubu Karşılaştırmalar	64
5.5	Literatür ile Karşılaştırma	65
5.6	Serum ve Doku İmmünohistokimya Karşılaştırmaları	67
5.7	Çalışmanın Üstünlükleri	68
5.8	Çalışmanın Kısıtlılıkları	69
5.9	Sonuç	70
6.	KAYNAKLAR	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Aterom Plağı Oluşumu (*Kaynak: https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/PH/PH709_Heart/PH709_Heart3.html*)

Şekil 2: Arter Endotel Duvar Katmanları (*Kaynak: <https://www.shutterstock.com/tr/search/endothelium>*)

Şekil 3: Ultrasonografik Endotel Katmanları

Şekil 4: Sıçan Anestezi Sistemi

Şekil 5: Sıçan Tablası ve Vevo Görüntüleme Sistemi

Şekil 6: Monitörizasyon

Şekil 7: Ön Ayarlar, a: B-mod USG Ön Ayarları, b: Doppler USG Ön Ayarları

Şekil 8: USG Monitörizasyon

Şekil 9: Vevo 2100 USG Ölçümleri

Şekil 10: Sakrifikasyon

Şekil 11: HP IMT

Şekil 12: ADMA Optik Dansite Eğrisi

Şekil 13: VEGF Optik Dansite Eğrisi

Şekil 14: eNOS Optik Dansite Eğrisi

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Ateroskleroz Risk Faktörleri

Tablo 2: Vasküler Hemostazla Alakalı Endotelyal Moleküller

Tablo 3: Endotelyal Fonksiyon Belirteçleri

Tablo 4: İş Akış Şeması

Tablo 5: Deney Grupları

Tablo 6: Immunreaktivite Skorlama Sistemi (IRS)

Tablo 7: Tüm grupların USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

Tablo 8: Kontrol Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

Tablo 9: Sham Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

Tablo 10: Kontrol ve Sham Grubu Son Gün Değerleri

Tablo 11: EE Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

Tablo 12: Kontrol ve EE Grubu İlk Gün Değerleri

Tablo 13: Sham ve EE Grubu İlk Gün Değerleri

Tablo 14: Sham ve EE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

Tablo 15: Kontrol ve EE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

Tablo 16: GE Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

Tablo 17: Kontrol ve GE Grubu İlk Gün Değerleri

Tablo 18: Sham ve GE Grubu İlk Gün Değerleri

Tablo 19: Sham ve EE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

Tablo 20: Kontrol ve GE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

DENKLEMLER LİSTESİ

Denklem 1: Doppler Eşitliği



KISALTMALAR

AS: Ateroskleroz

ED: Endotel Disfonksiyonu

CCA: Ana Karotis Arter

PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

IL-1: İnterlökin-1

TNF-a: Tümör Nekrozis Faktör Alfa

VCAM-1: Vasküler Hücresel Adezyon Molekülü-1

ICAM-1: Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1

TGF-b: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

MMP: Matriks Metalloproteinazlar

MRA: Manyetik Rezonans Anjiyografi

CTA: Bilgisayarlı Tomografi Anjiyografi

IVUSG: Damar İçi Ultrasonografi

NO: Nitrik Oksit

ET-1: Endotelin-1

ROS: Reaktif Oksijen Ürünleri

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

sGC: Çözünebilir Guanilat Siklaz

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

HIF: Hipoksi ile İndüklenebilir Transkripsiyon Faktörü

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

SHR: Spontan Hipertansif Rat
DOCA: Deoksikortikosteron Asetat
USG: Ultrasonografi
F: Frekans
Hz: Hertz
MHz: Megahertz
Z: Dokunun Akustik Direnci
RDUS: Renkli Doppler Ultrasonografi
RDDUS: Renkli Dupleks Doppler Ultrasonografi
IMT: İntima-media Kalınlık
CIMT: Karotis İntima-media Kalınlığı
FMD: Akım Aracılı Dilatasyon
ICA: İnternal Karotis Arter
FH: Ailesel Hiperlipidemi
LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HP: Histopatolojik
HK: Histokimyasal
IHK: İmmünohistokimya
IP: Periton İçerisine (Intraperitoneal)
AA: Abdominal Aorta
İA: İliak Arter
SF: %0,09 Sodyum Klorür (Serum fizyolojik)
cm: Santimetre
mL: Mililitre
nm: Nanometre
mm: Milimetre
µm: Mikrometre
pg: Pikogram

dk: Dakika

MAC: En Düşük Alveolar Konsantrasyon (Minimal Alveolar Konsantrasyon)

IRS: Immunreaktivite Skorlama

HRP: Horseradish Peroksidaz (Yabancurpu Peroksidaz)

ABC-HRP: Avidin-Biyotin-Peroksidaz Kompleksi

n: Sayı

SS: Standart Sapma

Min: En Küçük

Max: En Büyük

Prob: Çevirteç (Transducer)

L-NAME: N-Nitro-L-Arginin Metil Ester Hidroklorid

ADMA: Asimetrik Dimetilarjinin

ELİSA: Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemi

H&E: Hematoksilen Eozin

VEGF-A: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A

TBS: Tris Tamponlu Salin

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

TMB: Tetrametilbenzidin

RI: Rezistif İndeks

TdT: Deoksinükleotidil Transferaz

DAB: Diaminobenzidine

OD: Optik Yoğunluk (Dansite)

Rat: Sıçan

EE: Erken Etki

GE: Geç Etki

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgi ve deneyimlerinden her zaman faydalanma olanağı tanıyan, tez çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen değerli hocam, tez ve akademik danışmanım **Prof. Dr. Mustafa SEÇİL**'e;

Tez çalışmamın planlanması ve uygulanmasının her aşamasında tecrübesiyle yol gösterici olan ve fikirleriyle beni yönlendiren **Uzm. Dr. Mustafa Mahmut BARIŞ**'a, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri gerçekleştiren **Prof. Dr. Zekiye SULTAN ALTUN** ve **Uzm. Dr. Yasemin ÇAKIR**'a, deney hayvanlarındaki eşsiz bilgisi ile katkılarını esirgemeyen **Prof. Dr. Osman Yılmaz**'a, deneydeki katkıları nedeniyle **Merve TÜTÜNCÜ** ve **Prof. Dr. Safiye AKTAŞ**'a, deney sırasında yardımlarını esirgemeyen deney hayvanları personeline;

Eğitim süresince gerekli olan tüm bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, iyi bir radyoloji uzmanı olmam için desteğini esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam **Prof. Dr. Handan GÜLERYÜZ** olmak üzere Radyoloji Anabilim Dalı'nda görevli tüm öğretim üyelerine;

Tanımdan ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Bölümümüzde birlikte çalıştığım hemşire, teknisyen, sekreter ve personel çalışma arkadaşlarıma;

Hayatımın her anında sevgi, hoşgörü ve bilgelikle bana güç veren ve varlıklarıyla gurur duyduğum; başta rahmetli babam **Hakkı ŞİMŞEK** olmak üzere, annem **Mükerrem ŞİMŞEK**, kardeşlerim **Tuğba ŞİMŞEK**, **Selcen ŞİMŞEK** ve **Gökcenur ŞİMŞEK**'e;

Tanıdığım andan itibaren sabrı ve iyi niyetiyle hayatıma renk katıp beni doğruya yönlendiren, canım eşim, hayat arkadaşım **Fatma Bilgecan ŞİMŞEK**'e

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Muhammet Kürşat ŞİMŞEK

ÖZET

L-NAME (N-Nitro-L-Arginin Metil Ester Hidroklorid) UYGULAMASI ARDINDAN ENDOTELYAL DİSFONKSİYON MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA, ENDOTEL DİSFONKSİYONUNUN ULTRASONOGRAFİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Muhammet Kürşat ŞİMŞEK, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyoloji
Anabilim Dalı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, 35340, Balçova/İzmir

Amaç

Bu çalışmada N-Nitro-L-Arginin Metil Ester Hidroklorid (L-NAME) ile endotel disfonksiyonu (ED) oluşturulan sıçan modelinde, ED'nin ve ED'ye bağlı gelişebilecek aterosklerozun (AS) ultrasonografi (USG) ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma 23 adet Wistar Albino (300-350 g) türü dişi sıçan ile gerçekleştirilmiştir. Deneyde, sıçanlar rastgele seçilerek dört gruba ayrılmıştır [kontrol, sham, L-NAME erken etki (EE), L-NAME geç etki (GE)]. Sham grubuna, bir hafta boyunca 12 saat arayla günde iki defa 0,5mL %0,09 sodyum klorür (SF) periton içerisine (IP) uygulanmıştır. Deneyin 28. gününde denekler feda edilmiştir. L-NAME gruplarına, bir hafta boyunca 12 saat arayla günde iki defa 0,5mL 185 µMol/kg L-NAME IP yolla uygulanmıştır. EE grubu deneyin 10. gününde, GE grubu deneyin 28. gününde ED'nin erken ve geç etkilerinin saptanması için feda edilmiştir. Doku ve kan örnekleri histopatoloji (HP) ve immünohistokimya (IHK) yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

Tüm sıçanlarda; sağ ana karotis arter (CCA), sol CCA, abdominal aorta (AA) ve iliyak arter (İA) intima-media kalınlıkları (IMT) ile sağ böbrek rezistif index (RI) değerleri USG kullanılarak deney başlangıç ve sonunda ölçülmüştür. ED gelişimini teyit etmek için deney başlangıç ve sonunda plazma örneklerinde endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), asimetrik dimetil arjinin (ADMA) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) seviyeleri bakılmıştır. ED'nin arterler üzerine etkisini tayin etmek için sağ CCA, sol CCA, AA ve sağ İA dokularında

eNOS ve endotelin 1 (ET-1) seviyeleri deney sonunda ölçülmüştür. Deney sonunda feda edilen sıçanlarda HP olarak IMT hesaplanmıştır.

Bulgular

USG değerlendirmesinde EE grubunda sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT ölçümlerinde sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,018$, $p=0,008$). Bu grupta HP olarak da sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT ölçümleri sham grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır (sırasıyla $p=0,035$, $p=0,001$, $p=0,014$, $p=0,008$). GE grubunda USG değerlendirmesinde sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT ölçümlerinde sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,003$, $p=0,001$). GE grubunda HP olarak ölçülen sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT’de sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,005$, $p=0,005$, $p=0,008$). Bu bulgulara ek olarak GE grubunda deney sonunda böbrek RI istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p=0,038$). Serumda bakılan eNOS, ADMA ve VEGF’ye ilaveten dokuda bakılan eNOS ve ET-1’de ilaç gruplarında anlamlı değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç

Çalışmamız göstermiştir ki, deney hayvanlarının görüntülenmesinde pratik ve non-invaziv bir yöntem olan USG, L-NAME yoluyla oluşturulan ED ve AS modellerinin tanı ve takibinde oldukça etkili ve tutarlı bir şekilde kullanılabilir. Çalışmamız, literatürdeki ED ve AS modellerindeki USG bulgularını farklı anatomik bölgelerde kapsamlı olarak teyit etmiş olup modellenecek hastalık ve doku tahribatı bölgesine göre deney yöntemlerinin değiştirilebilmesine olanak sağlayacak USG ölçüm bölgeleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca literatür verilerine ek olarak böbrek RI değerinin ED ve AS modellerinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: ultrasonografi, endotelial disfonksiyon, ateroskleroz, intima-media kalınlığı, L-NAME, sıçan

ABSTRACT

ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF L-NAME (N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride) INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN RAT

Muhammet Kürşat ŞİMŞEK, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Radiology

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Radiology, 35340, Balçova/İzmir

Purpose

In the rat model in which endothelial dysfunction (ED) was induced by N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride (L-NAME) administration, it was aimed to evaluate ED and atherosclerosis (AS) using ultrasonography (USG).

Material and Method

This study was carried out with 23 Wistar Albino (300-350 g) female rats. The rats were randomly assigned into four groups [control, sham, L-NAME early effect (EE), L-NAME late effect (GE)]. In the sham group, 0.5mL of 0.09% sodium chloride (SF) was administered intraperitoneally (IP) twice a day, for one week and the subjects was sacrificed on the 28th day. In the L-NAME groups; 0.5mL 185 µMol/kg L-NAME was administered IP twice a day for a week. EE and GE group rats were sacrificed on the 10th and 28th day of the experiment, respectively. Tissue and blood samples were evaluated by histopathological (HP) and immunohistochemistry (IHC) methods.

Intima-media thickness (IMT) and right kidney resistive index (RI) values were measured at the beginning and at the end of the experiments. IMT evaluation were performed by USG in the right common carotid artery (CCA), left CCA, abdominal aorta (AA) and iliac artery (IA) of each rat. To confirm ED, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), asymmetric dimethyl arginine (ADMA) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were measured in plasma samples at the beginning and at the end of the experiment. eNOS and endothelin 1 (ET-1) levels were measured at the end of the experiment in right CCA, left CCA, AA and right IA tissues to confirm development of ED. Also HP IMT measurements were performed at the end of the experiments for verification.

Results

In the EE group, statistically significant increase was found in the USG measurements of right CCA, left CCA, AA and IA IMT ($p = 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.018$, $p = 0.008$, respectively), compared to the sham group. In EE group, HP evaluation of IMT in the right CCA, left CCA, AA and IA also showed statistically significant increase, compared to the sham group ($p=0,035$, $p=0,001$, $p=0,014$, $p=0,008$, respectively). In the GE group, statistically significant increase was found in IMT measurements performed by USG in the right CCA, left CCA, AA and IA ($p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,003$, $p=0,001$, respectively), in comparison to the sham group. In the GE group, statistically significant increase was found in the right CCA, left CCA, AA and IA IMT measurements performed by HP, compared to the sham group ($p=0,008$, $p=0,005$, $p=0,005$, $p=0,008$, respectively). In addition to these findings, renal RI increased significantly in GE group at the end of the experiment ($p = 0.038$). In the EE and GE groups, there was no statistically significant increase or decrease in serum eNOS, ADMA, VEGF levels and tissue eNOS and ET-1 levels at the beginning and end of the experiment ($p > 0.05$).

Conclusion

Our study has shown that USG, which is a practical and non-invasive method for imaging experimental animals, can be used quite effectively and consistently in the diagnosis and follow-up of ED and AS models induced by L-NAME administration. Our study has comprehensively confirmed the USG findings in the ED and AS models in the literature in different anatomical regions and revealed that there are USG measurement regions that will allow the experimental methods to be changed according to the disease and tissue destruction area to be modeled. In addition to the literature, we have showed that renal RI evaluation could also be used to evaluate ED and AS in rat models.

Keywords: ultrasonography, endothelial dysfunction, atherosclerosis, intima-media thickness, L-NAME, rat

1. GİRİŞ VE AMAC

Ateroskleroz (AS), hiperlipidemi ve lipit oksidasyonu sonucunda damar duvarında lipit birikimi, inflamasyon, hücre ölümü ve tromboz süreçlerini içeren dejeneratif bir damar hastalığıdır [1]. AS’de klinik bulgular ortaya çıkmadan önce damar duvarında birçok değişiklik olmaktadır. Hastalığın erken dönemindeki en önemli değişiklikler endotel disfonksiyonu (ED) ve vasküler intima-media kalınlık (IMT) artışıdır [2]. Çevresel risk faktörleriyle birlikte basınç, çevresel gerilim ve mekanik etkilere yanıt olarak adaptif intimal kalınlaşmalar artarak AS için zemin oluşturur [3, 4]. Erken yaşlarda başlayan ve yıllar boyunca devam eden bu süreç başlangıçta bulgu göstermeyip ilerleyen dönemde damar lümeninde daralmaya neden olarak kan akımını engellemeye başlar. Plakların parçalanması veya üzerine pıhtı oturması ile damar tıkanır ve akut koroner olaylar gelişir [5, 6]. AS değişiklikleri; ana karotis arter (CCA), koroner arter, aorta ve periferik arterler gibi vücuttaki tüm arterial sistemde görülebilir [7, 8]. AS, aynı bireyde farklı arterial segmentlerde farklı derece etkilenmelere neden olabilmektedir [3, 9, 10]. AS’ye bağlı gelişen miyokard infarktüsü, inme, aorta ve periferik arter hastalığı gibi hastalıklar tüm dünyada mortalite ve morbiditenin en önemli sebebidir.

Periferik arterlerde saptanan ED ile koroner arter ED ve anjiyografik olarak kanıtlanmış koroner arter hastalığı anlamlı benzerlik göstermektedir [11-13]. Bu nedenle ED’nin tanınması asemptomatik aşamada vasküler hastalığın tanınması anlamına gelip medikal ve invaziv tedavilerin planlanmasında önemli bir belirteçtir [14].

Ultrasonografi (USG), AS’nin erken evresinde görülen damar duvar kalınlaşması ve bozulmuş arterial vazodilatasyonu non-invaziv yöntemlerle saptayabilir. ED olan erişkin ve çocuklarda, koroner arter ve periferik arter duvarlarında IMT artışı olduğu saptanmıştır [15]. Çok sayıda çalışma, IMT artışının erken evre AS’nin tanısında mükemmel bir belirteç olduğunu göstermiştir [16]. AS’nin erken dönemlerinde arter duvarında IMT’de artış olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, ED ve AS’de klinik bulgular ortaya çıkmadan hastalığın tanısını koyup müdahalede bulunmak için USG oldukça önemlidir.

AS gelişim sürecini anlamak, tanı ve tedavisindeki basamakları aydınlatmak için hayvan deneyi modelleri araştırmalarda çok önemli rol oynamaktadır. Tarih boyunca pek çok çalışmada sıçan AS modelleri uygulanmıştır [17-19]. Sıçanlarda hiperlipidemiye olan direnç, AS model gelişimini kısıtlamaktadır. Rodentlerde ED modelleme çalışmalarında en etkili yöntemlerden biri, N-Nitro-L-Arginin Metil Ester Hidroklorid (L-NAME) aracılığıyla oluşturulan hipertansif rodent modelidir. Sıçanlarda deneysel hipertansiyon oluşturmak için

kullanılan L-NAME, hücrelerde nitrik oksit (NO) sentezinin hammaddesi olan L-Arginin'in yerine geçer ve NO sentazı baskılar [20, 21]. L-NAME uygulaması, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini bozup NO sentezini azaltarak arterlerin genişlemesini engeller ve sonucunda hipertansiyona sebep olur [22]. Azalan NO yüzünden başta vazodilatasyon olmak üzere endotel fonksiyon kaybı ve aterosklerotik değişiklikler olur [23]. L-NAME ile hipertansif ED modeli birçok çalışmada tanımlanmıştır [24, 25]. Sıçanlarda ED ve AS modelleri kan alma, anjiyografi ve sıçanların feda edilmesi gibi invaziv yöntemler gerektirmektedir. ED ve AS'i değerlendirmede USG oldukça yararlıdır. Çalışmamızda L-NAME ile ED modeli oluşturulan sıçanlarda, ED ve AS'nin USG ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ATEROSKLEROZ

2.1.1 Ateroskleroz Tanımı

Ateroskleroz (AS), hiperlipidemi ve lipit oksidasyonu sonucunda damar duvarında lipid birikimi, inflamasyon, hücre ölümü ve trombozu içeren dejeneratif bir damar hastalığıdır. Damar duvarındaki lipid birikiminin ilerleyerek kan akımını mekanik olarak engellemesiyle veya mevcut lezyonların üzerine trombüs oturmasıyla klinik bulgular olur [1]. Lipid birikimine bağlı oluşan intimal plaklar; ana karotis arterler (CCA), koroner arterler, aorta ve periferik arterler gibi vücuttaki tüm arterial sistemde görülebilir [7, 8]. AS en sık aorta ve dalları, iliofemoral, koroner ve karotis arterlerde görülmekle birlikte, aynı bireyde farklı arterial segmentlerin farklı etkileneşine neden olabilen büyük ve orta çaplı arterlerin tamamını ilgilendirebilen fokal intimal hastalıktır [3, 9, 10]. AS'de klinik bulgular ortaya çıkmadan önce damar duvarında birçok değişiklik olmaktadır. AS'nin erken tanısında bu değişiklikler bize yardımcıdır. Hastalığın erken döneminde, subklinik zamanda, en önemli değişiklikler ED ve vasküler IMT artışıdır [2]. Vasküler intima; içerisinde düz kas, makrofaj, mast hücreleri ve kollojen, elastin, proteoglikan, fibronektin, laminin, plazma proteinleri gibi hücre dışı matriks barındıran endotel hücreleriyle örtülü bir yapıdır. Vasküler bifurkasyon alanları gibi bazı bölgelerde, aterojenik uyarılardan bağımsız olarak intimal kalınlaşmalar vardır. Çevresel risk faktörleriyle birlikte basınç, çevresel gerilim ve mekanik etkilere yanıt olarak adaptif intimal kalınlaşmalar artar ve AS için zemin oluşturur [3, 4].

2.1.2 Aterosklerozun Epidemiyoloji

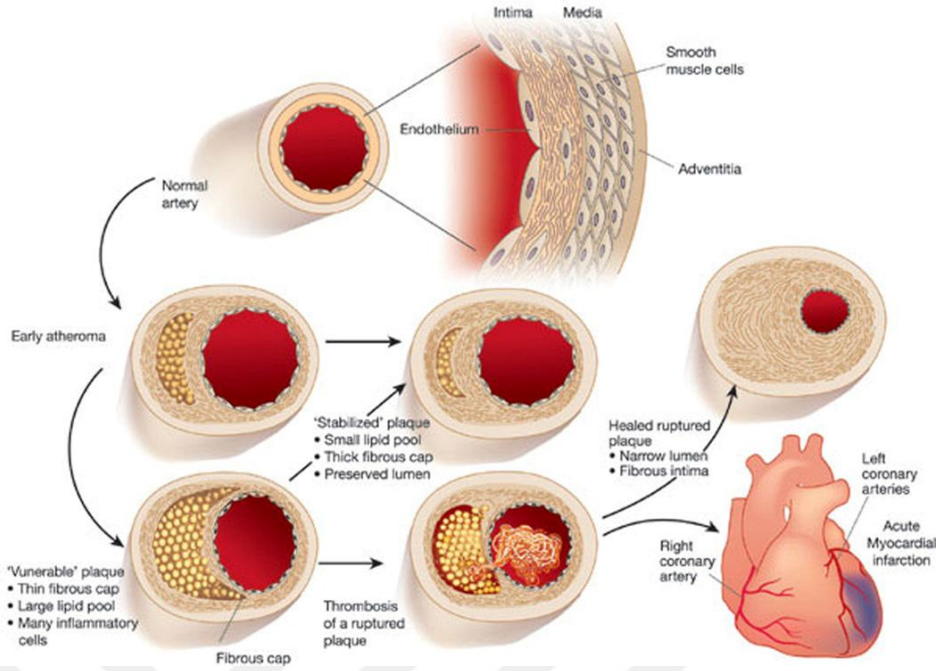
AS'ye bağılı gelişen miyokard infarktüsü, inme, aorta ve periferik arter hastalıkları gibi hastalıklar, gelişmiş ölkelerde mortalite ve morbiditenin en önemli sebebidir. AS ve AS ile ilişkili hastalıklar 45 yaş altı nüfusta en sık ikinci, 45 yaş üstü nüfusta en sık ölüm nedeni olmakla birlikte tüm yaş gruplarına bakıldığında morbiditenin en önemli nedenidir. Koroner arter tutulumu, mortalite ve morbiditenin en önemli sebebidir [2]. AS ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklara bağılı ölüm sıklığı giderek artmaktadır [26]. Amerika Birleşik Devletleri'nde, kesitsel olarak bakıldığında, yaklaşık 60 milyon kişi aterosklerotik kalp hastalığı tanısıyla izlenmekte ve yıllık ölümlerin %42'si bu sebeple olmaktadır [1]. Ölkemiz için yıllık ölümlerin %42'sinin koroner kalp hastalığına bağılı olduğu bildirilmiştir [27]. Onat ve arkadaşlarının 1545 kişilik örneklem üzerinde yaptıkları bir çalışma ile ölkemizde yıllık tüm ölüm oranı bin erişkinde 10,5; koroner mortalite binde 9,8 olarak bulunmuştur. Ayrıca 45-74 yaş grubunda toplam mortalite binde 9,8; koroner arter hastalığından ölüm oranı binde 4,6 olarak saptanmıştır [28].

2.1.3 Ateroskleroz Oluşumu ve Patogenezi

AS gelişimini açıklamak için öne sürölmüş hipotezlerden en kabul gören yaklaşım zedelenmeye yanıt ve ED hipotezidir [29-31]. Bu yaklaşıma göre, risk faktörleri olan kişilerde lipitler gibi aterojenik ajanlarla intimal hasar oluşur. Bu hasar yüzünden endotelin antitrombotik özelliğini kaybolur ve büyüme faktörleri başta olmak üzere birçok faktör salgılanmaya başlar [32-34]. Aterojenik uyarılar yüzünden endotel yapı ve fonksiyonu bozulması AS'nin başlaması, ilerlemesi ve klinik bulguların oluşmasında önemli rol oynar.

AS için belirtilen majör ve minör risk faktörlerinin varlığı klinik olarak tanımlanan ED'ye eşlik eder [34-36]. ED zemininde bazı genler aktive olur, Ayrıca çok sayıda büyüme faktörü (trombosit kaynaklı büyüme faktörü: PDGF, fibroblast büyüme faktörü: FGF, interlökin 1: IL-1, tümör nekrozis faktör a: TNF-a) ve adhezyon molekülü (vasküler hücresel adezyon molekülü-1: VCAM1, intersellüler adezyon molekülü-1: ICAM-1 ve selektinler) salgılanması artar. Bu salgılar yüzünden endotel; prokoagulan, büyüme faktörü ve adhezyon molekülü salgılayan, aktive endotel halini alır [37]. Aktive endotel monositlerin yapışmasına zemin hazırlar. AS gelişiminde ilk lezyon yağlı çizgilenmedir. Yağlı çizgilenmenin gelişimi, kan monositlerinin endotel hücrelerine yapışması ve monositlerin hücreler arasından intimaya göçleriyle başlar. Monositler arter duvarı içinde makrofajlara dönüşürler. İntima içerisinde

makrofajlar; başta kolesterol olmak üzere, lipid biriktiren köpük hücrelerini (foam cell) meydana getirirler. Bu köpük hücrelerinin çoğu dolaşımdan gelen monositlerden köken almakla birlikte, düz kas hücreleri de lipid biriktirerek köpük hücrelerini oluşturabilir [38]. Köpük hücresine dönüşen hücreler koloni uyarıcı faktör etkisiyle bölünme gösterebilirler. Bu şekilde sayısal artış gösteren monositlerin de aterosklerotik plak gelişimine katkısının bulunduğu saptanmıştır [39]. Yağlı çizgilenme aşamasında lipidlerin çoğu hücre içerisindedir ve bu lezyonlar geri dönebilir [40, 41]. Monositlerin migrasyonu ve sitokinlerin etkisi ile tunica media tabakasından düz kas hücrelerinin gelmesi, bu hücrelerin çoğalması, hücre dışında lipid birikimi ve matriks yapımının artması ile lezyon büyür. Düz kas hücrelerinin bu sürece katılmasıyla aterom plakları daha karmaşık yapı kazanır. Düz kas hücreleri; elastin, kollajen ve proteoglikan sentezleyip kasılma özelliğini kaybeder [41, 42]. Göç eden düz kas hücreleri, az da olsa bölünme yeteneğine sahiptirler [43]. Plak bütünlüğünde kayıp, trombus ve trombin gibi uyaranlar, düz kas hücrelerinde bölünme artışına ve lezyonda ani ve hızlı büyümelere neden olabilir. Olgun bir aterom plağının büyük kısmını hücre dışı matriks oluşturur. Bu plakta bulunan hücre dışı matriks elemanlarının başında tip I ve III kollajen ve proteoglikanlar gelir. Düz kas hücreleri tarafından PDGF ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) etkisiyle bu elemanlar üretilir. Hücre dışı matriks elemanlarının yıkımında matriks metalloproteinazlar (MMP) denen bir grup enzim rol oynar. Bu elemanların yapımı ve yıkımı arasında hassas bir denge söz konusudur. Aterom plağının gelişimi sırasında bir başka göç eden hücre endotel hücreleridir. Plak içerisinde aşırı miktarda eksprese edilen anjiogenik faktörler sayesinde yeni damarların oluşmasına yol açar [44, 45]. Yaşlanan plaklar çoğunlukla kalsifikasyon içerirler. Bu kalsifikasyonlar, bazı düz kas hücresi gruplarının salgıladığı kemik proteinleri ve kalsiyum salgılayan karboksillenmiş glutamik asit artıkları içeren proteinlerdir [46]. Bu süreç genellikle yıllar sürer ve bu süre içinde birey klinik bulgu göstermez. Plak hacmi, arter duvarının dışarıya doğru yeniden şekillenme kapasitesini aşınca, damar lümeninde daralma başlayarak ilerleyen dönemde kan akımını engellemeye başlar. Plakların parçalanması veya üzerine pıhtı oturması ile damar tıkanır ve akut koroner olaylar gelişir [5, 6]. Aterosklerotik süreç, erken yaşlarda başlayan ve hayat boyu devam eden bir süreçtir. Klinik bulgular, lezyonun oluşmaya başlamasından on yıllar sonra ortaya çıkar. Bu nedenlerden dolayı AS'nin erken tanınması, organ tutulumunun tanımlanması ve yaygınlığının saptanması için birçok yöntem geliştirilmiştir.



Şekil 1: Aterom Plağı Oluşumu (Kaynak: https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/PH/PH709_Heart/PH709_Heart3.html)

2.1.4 Risk Faktörleri

AS gelişiminde dislipidemi, sigara, hipertansiyon, fiziksel aktivite azlığı, obezite, aile öyküsü, diabetes mellitus, psikososyal ve davranışsal faktörler, erkek cinsiyet, enfeksiyon (herpes simpleks virus-I, sitomegalovirus, hepatit virüsü gibi virüsler, klamidy pneumonia, helicobacter pylori ve porphromonus gingivalis gibi bakteriler), aşırı alkol alımı, çinko fazlalığı, hiperkalsemi, menopoza yaşının hem erken (35-40 yaşları arası) hem de geç (55 yaşından sonra) olması, fibrinojen, faktör VII ve antitrombin III aktivitesindeki azalmalar, vazektomi, kahve tüketimi, yükselmiş ürik asit seviyelerinin etkili olduğu gösterilmiştir [28]. AS için majör ve minör risk faktörleri belirlenmiştir (Tablo 1) [47].

Tablo 1: Ateroskleroz Risk Faktörleri

Majör Risk Faktörleri
<u>Değiştirilebilir</u>
• Hiperlipidemi • Hipertansiyon • Diabetes mellitus • Sigara
<u>Değiştirilemez</u>
• Yaş • Erkek cinsiyet • Aile öyküsü
Minör Risk Faktörleri
• Hematolojik faktörler (lökosit sayısı, fibrinojen, faktör 7) • Hiperhomosisteinemi • Obesite/insülin direnci • Lipoprotein (a) • Hipertrigliseridemi • Fizik aktivite azlığı

2.1.5 Ateroskleroz Tanısında Görüntüleme

Aterosklerotik süreç erken yaşlarda başlayan ve hayat boyu devam eden bir süreçtir. Bu nedenle AS'nin klinik bulgu göstermeden tanınması büyük önem taşımaktadır. AS'nin tanı ve takibinde kullanılan pek çok görüntüleme yöntemi vardır. Koroner anjiyografi, intravasküler USG ve optik koherans tomografi gibi invaziv yöntemlere ilaveten USG, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve sintigrafi gibi pek çok non-invaziv görüntüleme yöntemi AS tanısında kullanılır [48].

AS'nin direk tanısında X-ışını anjiyografi, manyetik rezonans anjiyografi (MRA) veya bilgisayarlı tomografi anjiyografi (CTA) gibi lümenografik teknikler mevcuttur. X-ışını anjiyografinin invaziv yapısı, radyasyon içermesi, kontrast madde kullanılması ve potansiyel

zararları nedeniyle kullanımı sınırlanmaktadır. CTA, invaziv bir işlem olmamasına rağmen radyasyon ve iyotlu kontrast madde kullanımı gibi dezavantajları vardır. Son çalışmalar CTA'nın koroner arter duvarını görüntüleyip, kalsifiye plakları kalsifiye olmayan fibröz plaklardan ayırabileceğini göstermiştir. CTA kalsifiye olmayan plakların içeriği hakkında ileri yorum yapmakta oldukça başarısızdır [49, 50]. MRA'nın invaziv olmaması, radyasyon içermemesi, iyotlu olmayan ve iyi tolere edilebilen kontrast madde (şelat formda gadolinyum) kullanılması gibi avantajları vardır. Tüm bunlara karşın, tüm anjiyografik teknikler gibi, damar duvarını görüntülenmesinde oldukça sınırlı bilgi verir. Tüm anjiyografik incelemeler, damar duvarını hakkında yeterince bilgi vermemesi nedeniyle AS'nin erken aşamada tanınması ve toplam plak yükünün saptanmasında yetersiz kalmaktadır. Ayrıca anjiyografik incelemelerin kalsifiye olmamış plakları karakterize edememesi nedeniyle kararlı (stabil) olmayan ülsere plakların tespiti imkansızdır [50, 51].

Karotis ve periferik arterlerde, AS tanısında, USG yaygın olarak kullanılmaktadır. USG, darlık bölgesini incelerken, hem lümendeki darlık derecesini görsel olarak değerlendirir hem de Doppler USG ile ilgili damar bölgelerinden akım hızını ölçerek fonksiyonel değerlendirme yapar [52]. USG, CTA'da olduğu gibi kalsifik ve kalsifik olmayan plağı ayırabilir. Ayrıca plakların içyapısını (homojen/heterojen) ve yüzey yapısını (düzgün/düzensiz/ülsere) değerlendirerek anatomik olarak darlık yaratmayan ancak yapı itibarıyla tehlikeli olabilecek plakları saptar [53]. Ucuz, tekrarlanabilir ve taşınabilir olması, radyasyon içermemesi, invaziv olmaması gibi avantajları vardır. Kullanıcıya bağlı değişiklik göstermesi, anatomik sınırları olması ve kalsifikasyonların arkasını görmedeki yetersizlik gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Yüksek çözünürlüklü MRG, AS zemininde lümeni, plak yükünü ve plak bileşenlerini değerlendirme gelecek vadeden, invaziv olmayan bir görüntüleme yöntemidir [54]. Plak içeriğini karakterize etmedeki yetkinliği giderek artmaktadır. Yüksek çözünürlüklü cihaz gereksinimi ve pahalı bir inceleme olması dezavantajlarıdır.

AS'nin erken tespitinde damar duvarının ve plakların karakterize edilmesi için yeni teknikler geliştirilmektedir. Damar içi ultrasonografi (IVUSG), ex vivo ile karşılaştırıldığında, damar duvarını doğru bir şekilde görüntüleyen ve karakterize eden bir yöntemdir [55, 56]. Akut koroner sendrom ile gelen hastalarda plağın karakterizasyonunda IVUS'un kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [57, 58]. İnvaziv doğası ve artefaktlar nedeniyle ISUS'un kullanımı oldukça sınırlıdır. Optik koherans, plak termografi ve anjiyoskopi gibi hala geliştirilmekte olan, rutin kullanımda bulunmayan teknikler de bulunmaktadır [59].

2.1.6 Ateroskleroz Hayvan Modelleri

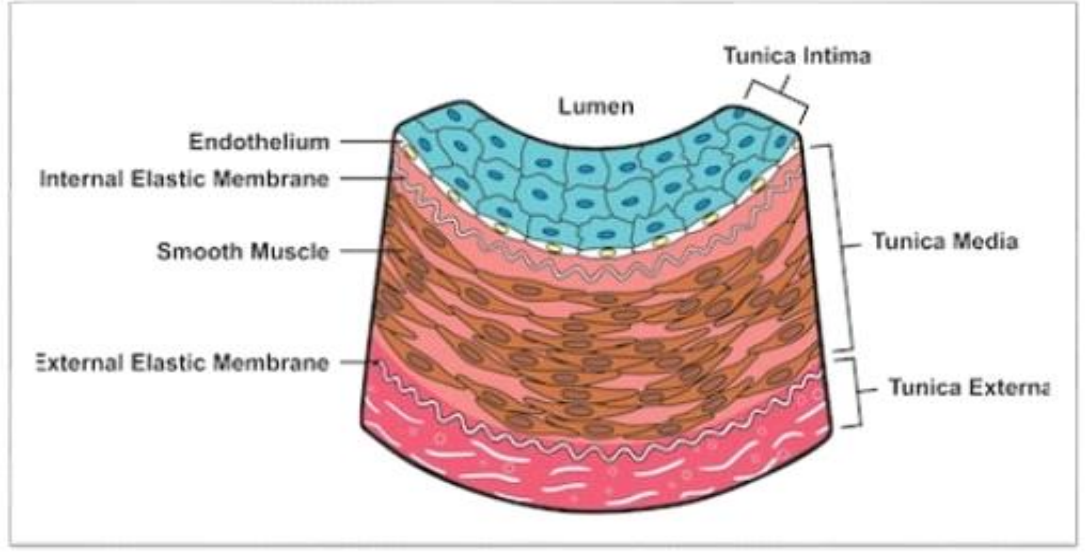
AS gelişim sürecini anlamak, tanısında ve tedavisindeki basamakları aydınlatmak için hayvan modelleri araştırmalarda çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu alandaki çalışmaların tarihteki ilk örneği, 1908 yılında, Rus bilim adamı Alexander Ignatowski tarafından, süt ve yumurta sarısı ile beslediği tavşanlarda AS'nin indüklenebildiğini göstermesiyle olmuştur. O zamandan beri, hayvan modelleri ile AS ve damar duvarında meydana gelen değişiklikler pek çok çalışma ile araştırılmıştır. Bu araştırmalarda kemirgenler (fare, sıçan, hamster gibi), tavşanlar, kuşlar, kediler, köpekler, domuzlar ve insan olmayan primatlar kullanılmıştır. Günümüzde AS modellerinde fare, sıçan, hamster, kobay (guinea pig) ve tavşanlar sıklıkla kullanılmaktadır [17].

Tarih boyunca pek çok sıçan türünde AS modelleri çalışılmıştır. Spontan hipertansif sıçan türlerinde fazla yağlı diyet ile AS indüklenebildiği gibi doğuştan aterogeneze yatkın sıçan türleri de vardır [18]. Ayrıca kolik asit ve tiourasil içeren fazla yağlı diyetlerle de sıçanlarda AS indüklenebilir [19].

2.2 ENDOTEL

Endotelyum 0.2-4 mikrometre boyutlarında, skuamöz hücre morfolojisinde, tek katlı özelleşmiş yassı epitelyum yapısındadır. Altı trilyon hücre içeren bu tabaka vücudumuzun en büyük organı sayılabilir (Şekil 2). Endotelyum vasküler tabakalar ile plazma arasındaki etkileşimi düzenler. Otokrin, parakrin ve endokrin işlevleri ile arteriyel tonusu, fibrinolizisi, hücre büyümesini ve inflamatuvar reaksiyonları düzenler [14]. Bu denli büyük bir organın fonksiyonları hayati önem taşımaktadır.

Endotelyum vasküler tonusu, hücre çoğalmasını, trombositlerin ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimini düzenleyen, tromboregülatör molekülleri ve büyüme faktörlerini sentezleyebilen, fiziksel ve kimyasal uyarılara yanıt verebilen vasküler düz kas ile damar lümeni arasında uzanan bir yapıdır. Bariyer görevi görürken salgıladığı birçok madde ve içerdiği kanallarla endotelial geçirgenliği düzenler. Vasküler tonusun ayarlanmasında da birçok karmaşık işlevi olan maddeler salgılayarak görev alır. Bu sayılan fizyolojik fonksiyonlar düşünüldüğünde endotel, vücut dengesinde (hemostaz) anahtar rol oynar.



Şekil 2: Arter Endotel Duvar Katmanları (Kaynak:
<https://www.shutterstock.com/tr/search/endothelium>)

2.2.1 Endotel Fonksiyon

Endotel, farklı kimyasal ve fiziksel uyarılara tepki olarak bazı moleküller salgılar. Endotel hücreleri vasküler dengesini (hemostaz) sağlamak için kritik öneme sahip vazodilatatör [NO, prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarizasyon 5 faktörü] ve vazokonstrüktör [endotelin-1 (ET-1), anjiotensin 2, tromboksan A2 ve reaktif oksijen ürünleri (ROS)] bunlardan bazılarıdır [14, 60]. Bu moleküllerden en önemlilerinden biri NO'dur. Hipoksi, asetilkolin, bradikinin, serotonin ve artmış gerilim stresi gibi pek çok uyarı ile endotel hücreleri, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-arjininden NO sentezler [61]. NO salınımı, vazodilatasyon yapar ve ET-1 gibi vazokonstrüktör faktörlerin salınımını, düz kas proliferasyonunu, enflamasyonu, lökosit adezyonunu, platelet agregasyonunu ve doku faktörü üretimini engeller [61, 62].

Tablo 2: Vasküler Hemostazla Alakalı Endotelyal Moleküller

Vasküler Tonus

- Nitrik oksit (NO)
- Endotelin-1 (ET-1)
- Endotel ilişkili hiperpolarizan faktör (EDRF)
- Tromboksan A2 (TX-A2)
- Prostosiklin
- Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE)
- Anjiotensin 2 reseptörü

Enflamasyon

- Intraselüler adezyon molekülleri (ICAMs)
- Vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAMs)
- İntegrinler
- Selektinler
- Sitokinler

Tromboz

- Doku faktörü (TF)
- Doku plazminojen aktivatörü (t-PA)
- Von Willebrand faktör (vWF)
- Plazminojen aktivasyon inhibitörü-1 (PAI-1)

Büyümü Faktörleri

- Platelet ilişkili büyüme faktörü (PDGF)
- İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF)
- Dönüştürücü büyüme faktör (TGF)
- Temel fibroblast büyüme faktör (BFGF)

2.2.2 Nitrik Oksit

Endotel, farklı kimyasal ve fiziksel uyarılara tepki olarak bazı moleküller salgılar. Bu moleküllerden en önemlilerinden biri NO'dur. Hipoksi, asetilkolin, bradikinin, serotonin ve artmış gerilim stresi gibi pek çok uyarı ile endotel hücreleri, NOS enzimi ile L-arjininden NO sentezler [61]. NO, NOS enzim ailesi tarafından sentezlenir. Reaksiyon sırasında substrat olan L-arjinin moleküler oksijenle oksitlenir. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, flavin adenin dinükleotit ve tetrahidrobiopterin ise kofaktör olarak kullanılır [63]. NOS enzim ailesi içerisinde nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) çeşitleri vardır. nNOS öncelikle beyin, spinal kord, periferik nöronlar gibi sinir sistemi bölümlerinde bulunur. Ayrıca solunum fonksiyonlarında, gastrointestinal sistem hareketinde, tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde de görev alır. Bu enzimin çalışabilirliği kalsiyum-kalmoduline bağlıdır. Aktivitesi hücre içi kalsiyum düzeyindeki değişikliklerle ayarlanabilir. İndüklenebilir izoform olan iNOS makrofajlarda, dalak pulpası, kalın barsak ve karaciğerdeki bazı hücrelerde bulunur; interlökin-1, interferon- γ , endotoksin ve tümör nekrozis faktör- α gibi sitokinlerce hücrelerde ve ayrıca bakteriyel lipopolisakkaritler tarafından da uyarılabilir. Aktif hale geçmesi için kalsiyum ve kalmoduline bağlı olmadığından, eNOS ve nNOS'tan farklı olarak aktivitesi uzun sürer ve NO üretimi sağlar [64]. NOS enzim ailesinin vasküler dokuda baskın izoformu olan eNOS ilk olarak endotel hücrelerinde tespit edilmiştir. Sonrasında arteriyel ve venöz endotelin bulunduğu böbrek tübül epitelinde, plasenta sinsitiotrofoblastlarında ve beyin gibi bazı dokularda da eNOS bulunduğu saptanmıştır. NO sentezi damarda başlıca akım stresi (shear stress) denilen kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu endotel yüzeyinde oluşturduğu mekanik sürtünme etkisi ile olur. Endotel hücreleri bu mekanik etki ile şekil değişikliğine zorlanırken aynı zamanda hücre içi sinyaller de gönderir. Bu uyarı ile protein kinaz B aktive olur ve eNOS'u fosforile eder. Böylece endotelden NO üretimi gerçekleşir. Bu şekilde NO üretimi için kalsiyuma gerek yoktur. Ancak membrana bağlı bulunan eNOS, hücre içi kalsiyumun artmasını sağlayan asetilkolin, bradikinin ve noradrenalin gibi bazı maddelerle de indüklenebilir [65].

NO, bilinen en güçlü endojen vazodilatör, aynı zamanda çeşitli fizyolojik görevleri olan, difüzyonla biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen bir sinyal molekülüdür. NO salınımı, vazodilatasyon yapar ve ET-1 gibi vazokonstriktör faktörlerin salınımını, düz kas proliferasyonunu, enflamasyonu, lökosit adezyonunu, platelet agregasyonunu ve doku faktörü üretimini engeller [61, 62]. Çok düşük konsantrasyonlarda dahi NO α ve β subunitleri bulunan

çözünebilir guanilat siklaz (sGC) enzimi aktivasyonu ile etkisini oluşturur. Aktif sGC, hücre içi ikincil haberci olan siklik guanozin monofosfat (cGMP) artışını uyarır. Böylece cGMP bağımlı protein kinaz G'nin katıldığı bir reaksiyon sonucu hücre içi kalsiyum miktarında azalmaya neden olur ve düz kas hücrelerinde gevşeme meydana gelir. Düz kas hücresinde relaksasyon ve vasküler rezistansın azalması doku perfüzyonunun artması ile sonuçlanır [66].

Vazodilatasyondaki birincil rolünün yanında NO, miyokardın kasılması ve mikrovasküler permeabilite üzerine etkisi ile kardiyovasküler sistemde, öğrenme, hafıza, ağrı, epilepsi ve nörodejenerasyon üzerine etkileri ile sinir sisteminde ve bronkodilatasyon etkisi ile de solunum sisteminde rol alır [67].

2.2.3 Endotel Disfonksiyonu

Sağlıklı bir endotel, uyarılara cevap olarak damar direncini düşüren güçlü vazodilatatörler salgılar. Bu moleküller içerisinde en önemlilerinden biri NO'dur. NO, e-NOS tarafından L-arginin'den sentezlenir [68]. Normal endotelde; antitrombotik, vazodilatatör, antinflamatuar faktörlerle protrombotik, vazokonstriktör, proinflamatuar moleküller denge halindedir. Bu dengenin bozulmasındaki ana faktörlerden olan NO'nun bozulan yapım ve fonksiyonu, ED'ye sebep olur. ED ortaya çıkması sonrasında hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörü (HIF) tarafından vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonu indüklenir. Bu aşamada VEGF-A, anjiyogenez fazının progresyonunun düzenlenmesi ve endotel hücrelerinin migrasyon, proliferasyon ve sağ kalımını sağlar. VEGF-B ise eNOS ilişkili yoldan üzerinden etkilerini gösterir. ED ve hipertansiyon birbirini tetikleyen olaylardır. Bununla birlikte hipertansiyonun erken dönem karakteristik patofizyolojilerinden olan ED ve beraberinde NO biyoyararlanımının bozulması ile vazodilatasyonda azalma ve vazokonstriktörlere artmış cevap süreci yaşanır [69]. ED'nun kardiyovasküler hastalıklar ve kollagen doku hastalıkları ve vaskülitler gibi pek çok sistemik hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir [70]. ED'nin AS gelişimindeki erken dönem basamaklarından biri olduğu düşünülmektedir.

Arterlerin normal fonksiyonu endotel kaynaklı moleküller ile vasküler ortam arasındaki karmaşık etkileşime bağlıdır. ED olarak adlandırılan normal endotelial fonksiyonun kaybı, AS gelişiminin ilk adımı olarak düşünülmektedir ve arteriyel duvardaki herhangi bir yapısal değişiklikten önce ortaya çıkar. ED'nin birincil mekanizmaları arasında azalmış NO mevcudiyetine bağlı NO'nun reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından inaktivasyonunda ve vazokonstriktörlerde (ET-2, anjiyotensin 2) artış yer alır [71]. ED değişen vazodilatatif, antikoagülan, antienflamatuar özelliklere ve endotelde NO biyoaktivite kaybından

kaynaklanan, vasküler büyüme faktörleri ve yeniden şekillenmenin düzenlenememesi olarak ifade edilir [14].

Periferik arterlerde saptanan ED, koroner arter ED ve anjiyografik olarak kanıtlanmış koroner arter hastalığı ile anlamlı korelasyon göstermektedir [11-13]. Ayrıca anjiyografik olarak koroner arter hastalığı saptanmayan ancak ED olan hastalarda miyokard enfarktüsü, koroner revaskülarizasyon ve kardiyak ölüm riski artmıştır [72, 73]. Bu nedenle ED'nin tanınması, asemptomatik aşamada vasküler hastalığın tanınması, medikal ve invaziv tedavilerin planlanmasında önemli bir belirteçtir [14].

2.2.4 ED'nin Tanınması

Endotel fonksiyonu literatürde çeşitli invaziv ve non-invaziv yöntemlerle değerlendirilmiştir (Tablo 3). Serum belirteçlerinin yükselmesi (adezyon molekülleri, selektinler, C-reaktif protein) ED ile ilişkilendirilmiştir, ancak endotelial uyarılma veya endotel hasarı ayırımını yapmak zordur [74]. NO, plazma ve idrardan ölçülebilmekle birlikte diyetten oldukça etkilenmektedir [75]. Sonuç olarak, endotel fonksiyonunun ölçülmesi çeşitli tekniklerle sıklıkla kullanılır [14]. Asetikoline koroner arterlerin dilatasyon yanıtının anjiyografik olarak değerlendirilmesi ve brakial arterde çeşitli vazodilatör ajanların verilmesi ile endotel fonksiyonunu değerlendiren pletihismografi gibi yöntemler invaziv incelemeler olmaları nedeniyle yaygınlaşmamıştır [74]. Adenozin veya dipiridamol verilmesi ile yapılan pozitron emisyon tomografisi (PET) koroner endotel akımın değerlendirilebildiği gösterilmiştir ancak bu işlem pahalıdır ve radyasyon etkileri riski içermektedir [76].

Brakial arterin NO uyarılarına yanıt olarak ultrasonografi olarak değerlendirilmesi iyi tolere edilir ve tekrarlanabilen bir yöntemdir [14].

Tablo 3: Endotelyal Fonksiyon Belirteçleri

<u>Serum belirteçleri</u> ➤ Endothelin-1 (ET-1) ➤ Von Willebrand faktör (vWF) ➤ Doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ➤ Plazma aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ➤ Hücre içi adezyon molekülleri (ICAMs) ➤ Vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAMs) ➤ E-selektin ➤ P-selektin ➤ Asimetrik dimethylarginine (ADMA) <u>Nitrik oksit ürünleri analizi</u> ➤ İdrar NO₃ ➤ İdrar cGMP <u>Fonksiyonel testler</u> ➤ İnvaziv provakatif testler • Koldan pletihismografi • Koroner anjiyografi ➤ Pozitron emisyon tomografi ➤ Akım aracılı dilatasyon • Koldan pletihismografi • Brakial arter ultrasonografi
--

2.2.5 Deneysel Hipertansiyon Modelleri

Deney hayvan modellerinde hipertansiyon temel olarak genetik, çevresel, farmakolojik ve renal indüklü modeller ile yapılır.

2.2.5.1 Genetik İndüklü Hipertansiyon

Bu modellerde sıklıkla ‘spontan hipertansif sıçan’ (SHR) ve Dahl tuzuna duyarlı sıçanlar kullanılır.

Wistar cinsi ratların yakın akraba çiftleştirmesi ile oluşturulan SHR’de, doğumdan sonra 4-6. haftada hipertansiyon olur. Dahl tuza duyarlı sıçanlar ise Sprague-Dawley cinsidir. Diyetlerinde hayatlarının erken döneminden itibaren tuz eklenen sıçanlar, oluşan cevaba göre hipertansif ve hipertansif olmayan olarak ikiye ayrılırlar. Hipertansif olan grup kendi içinde çiftleştirilerek, tuz diyetine hipertansif cevabı olan Dahl sensitif hipertansiyon modeli oluşturulur. SHR ve Dahl tuzuna duyarlı sıçanlarda böbrek yetmezliği ve kalp yetmezliği gibi hastalıklar mevcuttur. Genetik indüklü model, deneysel hipertansiyon modelleri içinde en sık tercih edilenidir [77].

2.2.5.2 Çevresel İndüklü Hipertansiyon

Yüksek kolestrollü, yağlı, şekerli gibi diyetle veya soğuk, sıcak gibi stresle indüklenmiş hipertansiyon modelleri bu grupta incelenir.

2.2.5.3 Farmakolojik İndüklü Hipertansiyon

2.2.5.3.1 DOCA-Tuz İndüklü Hipertansiyon

Farmakolojik indüklemenin önemli örneklerinden biri olan DOCA-Tuz indüklü hipertansiyon modelidir. Deneklere günde 300-1000 mg/kg deoksikortikosteron asetat (DOCA) verilerek oluşturulur. Bu modelde hipertansiyon oluştururken içme suyu olarak yalnızca salin solüsyonu verilir ve çoğunlukla patolojiyi oluşturmak için böbrek cerrahisinden de faydalanılır. Bu model başlangıçta tuza bağlı iken sonrasında damar içi volüm artışı, reninin azalması, arjinin vazopressin ve ve sempatik sinir sistemi gibi karmaşık ilişkiler oluşur [78].

2.2.5.3.2 NOS İnhibisyonu ile Oluşturulmuş Hipertansiyon

Tarihte ilk defa 1992 yılında NOS inhibitörleriyle deneysel hipertansiyon modeli oluşturulmuştur. Sıçanlarda deneysel hipertansiyon modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılan L-NAME, hücrelerde L-Arginin’in yerine geçip NOS’u baskılayarak NO sentezini engeller [20, 21]. Sıçanlarda ED modellerinde kullanılan etkili yöntemlerinden biri, L-NAME aracılığıyla oluşturulan hipertansif modeldir. NO miktarını azaltan L-NAME modelinde, arterlerin genişlemesi engellenir ve bu sayede hipertansiyon meydana gelir [22]. Hipertansiyon etkisine ek olarak gelişen ED ile birlikte aterosklerotik değişiklikler olur [23]. Gavaj, intraperitoneal

(IP) enjeksiyon ve içme suyu ile ad libitum şeklinde kullanılabilen L-NAME ile hipertansif ED modeli birçok çalışmada tanımlanmıştır [24, 25]. L-NAME'nin farklı dozları ile farklı sürelerde kullanılmasının farklı düzeylerde hipertansiyon yaptığı ve bu etkinin doz ve süre bağımlı olduğu bilinmektedir [79].

2.2.5.4 Renal İndüklü Hipertansiyon

Tansiyonun düzenlenmesinde en önemli organlardan biri böbreklerdir. Goldblatt tarafından oluşturulan bu model tek böbreğin fonksiyon dışı bırakılması sonrası plazma renin aktivitesinin eşlik ettiği sodyum retansiyonu sonucu hipertansiyon gelişmesi prensibine dayanır.

2.3 ULTRASONOGRAFİ

Ultrasonografi (USG), ses dalgalarının kullanıldığı, radyasyon riski bulunmayan, non-invaziv bir görüntüleme yöntemidir.

Elektrik enerjisini mekanik titreşime, bu titreşimi de elektrik sinyallerine dönüştürme olayına “piezo-elektrik olay” denmektedir. Bu amaçla kurşun-zirkonat-titanat gibi seramiklerden üretilmiş transducer adı verilen çeviriciler “probe” (prob) adı verilen bir hazneye yerleşmiştir [80]. Sesi oluşturan birim zaman içerisindeki titreşim sayısına frekans (F), birimine ise Hertz (Hz) denilir. Görüntüleme alanında kullanılan ses dalgasının frekansı 1-20 megahertz (MHz) arasında değişmektedir [53]. Ultrasonografide kullanılan yüksek frekanslı ses dalgalarının kaynağı prob içerisinde yer alan transducerlardır. Ses demeti, içerisinde yol aldığı doku ile yansıma, kırılma, saçılma ve soğrulma gibi etkileşime girer. Ses ile doku arasındaki etkileşimi, dokunun akustik direnci (Z) belirler. Dokunun akustik direnci dokunun dansitesi ile sesin o dokudaki hızının çarpımıdır [81]. USG’de demetler halinde dokuya ses dalgaları verildikten sonra dokudan yansıyan sesin dönüş süresi (t) ve şiddetine (amplitüdüne) göre görüntü oluşturulur. Yansıyan sesin gelmiş olduğu derinlik ses dalgasının kısa atımlar (pulsar) şeklinde gönderilmesi ve geri alınmasıyla hesaplanır [81].

Prob tarafından gönderilen ve geri yansıyan ses dalgası sinyalinin şiddetine göre görüntüler oluşturulur. A-modda (Amplitüd-Şiddet modu) USG’de toplanan sinyal grafikler şeklinde gösterilir. B-modda (Brightness-Parlaklık modu) USG’de gönderilen ve toplanan eko sinyallerinin şiddeti hesaplanıp, en güçlü şiddete beyaz en zayıf şiddete siyah olacak şekilde, 256 farklı parlaklık tonu tanımlanır ve zaman da bu hesaba katılarak görüntü oluşturulur. Yansıyan dalgaının şiddetini tanımlamak için ekojenite kavramı kullanılır. Diğer dokulara göre

beyaz görünen yapılar hiperekojen, siyah görünen yapılar hipoekojen olarak tanımlanır. M-modda (Motion- Hareket modu) USG’de alınan sinyaller şiddet-zaman eğrisi şeklinde hareketli görüntü oluşturulur [53].

2.3.1 Renkli Doppler Ultrasonografi

2.3.1.1 Temel Kavramlar

USG’de probdan salınan ses dalgaları, farklı ara yüzlerden yansıyarak geri dönmektedir. Doppler USG’de, B-mod USG’ye ek olarak faz, dalga boyu ve frekans gibi veriler de kullanılarak görüntü oluşturulmaktadır. Kan, içerisindeki farklı büyüklükteki yapılardan ve farklı çaplardaki eritrositlerden oluşan heterojen bir ortamdır. Gönderilen ses dalgasının dalga boyu yansıtıcı yüzeyden çok büyük olduğunda, gerçekleşen temel olay saçılma değildir. Bu “Rayleigh-Tyndall saçılması” olarak adlandırılır ve bu saçılmanın miktarı ses frekansının 4. dereceden üssü ile doğru orantılıdır. Transduserin frekansı bu nedenlerden dolayı önemlidir. Hareketsiz dokularda ultrasonografik ses dalgasının dalga boyu (λ) ve frekansı (F), yansımadan sonra proba ulaşan dalga boyu ve frekansı ile aynıdır. Hareketli dokularda ise, yansıtıcı yüzey hareket ettiği için, geri dönen ses dalgalarında frekans farklılığı meydana gelir. Bu frekans farklılığı Christian Johann Doppler tarafından tanımlanan “Doppler Etkisi (Doppler Kayması)” ile açıklanmaktadır. Doppler Etkisi’ne göre, ses dalgası kaynağı ve yansıtıcı yüzey birbirlerine yaklaşıyorlarsa yansıyan ses dalgaları birbirine yaklaşır, dalga boyu kısalır ve alıcıya yüksek bir frekansta ulaşır. Ses dalgası kaynağı ve yansıtıcı yüzey birbirlerinden uzaklaşıyorlarsa yansıyan ses dalgaları birbirinden uzaklaşır, dalga boyu artar ve alıcıya düşük bir frekansta ulaşır. Değişen bu frekans farklılığının miktarı (ΔF), kan akım hızına (V_o), ses dalgasının kaynaktan çıktığı andaki frekansına (F_t), sesin doku içerisindeki hızına (c), ultrasonografik ses dalgasının damarın uzun eksenine olan açısına (θ) bağlı olarak değişir. Tüm bu etkiler Doppler Eşitliği adı verilen denklem ile açıklanmıştır (Denklem 1) [82].

Denklem 2: Doppler Eşitliği

$$\Delta F = \frac{2 \times F_t \times V_o \times \cos \theta}{c}$$

2.3.1.2 Doppler Yöntemleri

2.3.1.2.1 Sürekli Dalga Formu Doppler (Continuous wave = CW)

Ses dalgalarını sürekli olarak gönderen ve alan iki adet transdüser vardır. Bu yöntem akımın varlığını ve yönünü saptamakla birlikte bu akımın kaynağı ve derinliğini saptamada yetersizdir [82].

2.3.1.2.2 Puls Dalga Formu Doppler (Pulsed Wave=PW)

Tek transduser, ses dalgasını hem gönderir, hem alır. Öncelikle B-mod görüntüden yararlanılarak üzerinde inceleme yapılacak örnekleme alanı işaretlenir. Ses dalgası probdan vurular şeklinde gönderilir. Bir ses vurusu gönderildikten sonra cihazın tüm verici ve alıcı devreleri susturulur. Yansıyan sinyalin transdusere ulaşmasından sonra cihaz tekrar açılır ve sinyal aldıktan sonra tekrar kapatılır. Ardından cihazın işlemcisi geri dönen ses dalgasının Doppler kaymasını tespit eder [83].

2.3.1.3 Renkli Doppler Ultrasonografi (RDUS)

Bu yöntem, PW şeklinde gönderilen ses dalgalarıyla alınan Doppler bilgileri ve gerçek zamanlı B-mod görüntülerin birleştirilmesi ile oluşur [83]. RDUS, görüntülenen hareketli yapıların frekans kaymalarının oluşturduğu bir renk haritasıdır ve kan akımının proba uzaklığı, akımın yönü ve hızı gibi bilgiler verir. RDUS'un verdiği akımın niteliksel bilgileri ile grafik şeklinde akımın niceliksel bilgilerinin birlikte kullanılmasına Renkli Dupleks Doppler Ultrasonografi denir (RDDUS) [53].

2.3.2 Endotel Disfonksiyonu ve Ateroskleroz Tanısında Ultrasonografi

Aterosklerotik süreç erken yaşlarda başlayan ve hayat boyu devam eden bir süreçtir. Arterlerin intimasında yağlı çizgilenmelerle başlayan yağ depolanması, ileri dönemlerde miyokardiyal enfarkt ve inme gibi kardiyovasküler hastalıklara neden olmadan önce sinsice artar. Son yıllarda AS lezyonların asemptomatik dönemde saptanmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

USG, AS'nin erken evresinde görülen damar duvar kalınlaşması ve bozulmuş arterial vazodilatasyonu erken dönemde non-invaziv olarak saptayabilir. ED olan erişkin ve çocuklarda IMT artışı olduğunu saptanmıştır [15]. IMT ölçümü, erken evre AS'nin mükemmel bir belirletecedir [16]. AS'nin erken dönemlerinde arter duvarında IMT'de artış olmaktadır. Ayrıca IMT artışı, diyabetes mellitus, obezite, hiperkolestrolemi, homosistinüri, hipertansiyon gibi AS

risk faktörü olan hastalarda gösterilmiştir [84-88]. Hiperkolesterolemili çocuklarda yapılan bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla IMT’de artış olduğu bulunmuştur [89]. Bu kalınlaşmalar hem koroner arter hem de periferik arterlerde gözlenmektedir. CCA incelemesi periferik arter sisteminin değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılan yöntemdir. Karotis intima-media kalınlığı (CIMT), ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişki pek çok çalışmada gösterilmiştir [90, 91]. Bu nedenlerden dolayı ED ve AS’de klinik bulgular ortaya çıkmadan tanıyı koyup müdahalede bulunmak için USG ölçümleri oldukça yararlıdır.

2.3.2.1 Akım Aracılı Dilatasyon (Flow Mediated Dilatation = FMD)

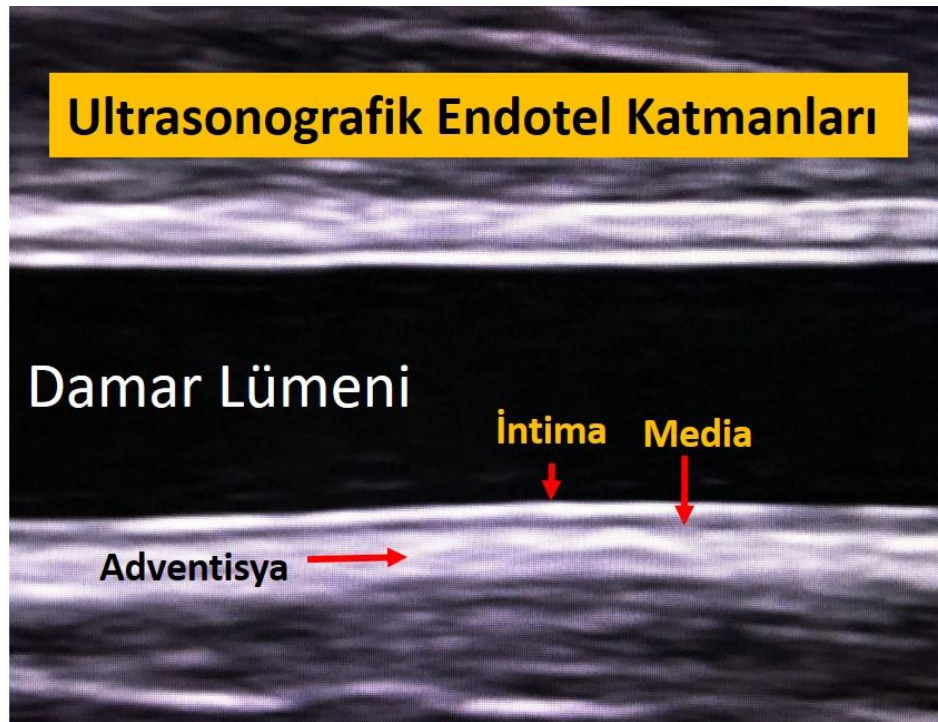
Brakial arterden yapılan, akım aracılı dilatasyon (FMD) ölçümü, Anderson ve Mark tarafından 1989 yılında tanımlanmış olup bu süreden itibaren ED ve ilişkili koroner arter hastalığının saptanmasında çok sayıda araştırmada kullanılmıştır [92]. Bu teknik, B-mod USG kullanılarak, brakial arterden daha distal kesimde oluşturulan geçici iskemi sonrası brakial arterin lümen çapının genişleme miktarı ölçümü prensibine dayanır. Ultrason probu, brakial arterin uzun aksına paralel olacak şekilde ayarlandıktan sonra, damarın ön ve arka duvarının netlikle izlenebildiği görüntüde sabitlenir ve uygun ayarlar yapıldıktan sonra arter çapı ölçülür. Ön kola manşon bağlanır ve arterial basıncı aşacak seviyeye ulaşınca dek şişirilerek bir süre beklenir ve manşon indirilir. Brakial arter çapı işlem öncesi ile aynı seviyeden tekrar ölçülerek geçici iskemiye bağlı FMD cevabı saptanır. Sağlıklı arterlerin çapında ve akım hacminde belirgin artış olur [93]. Bu genişlemenin, endotelial NO salgılanmasının ve artmış damar gerilim ile eNOS’un fosforilasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir [94]. Çok sayıda çalışma göstermiştir ki FMD, koroner arterlerde ED’yi göstermede başarılıdır. Ayrıca kardiyovasküler hastalık ve risk faktörleri ile doğrudan ilişkilidir [12, 95]. Prosedürün uzun zaman alması, uygulama tekniğinin tecrübe istemesi, brakial arter çapının hasta özelliklerine göre değişkenliği, obezite gibi hasta ile ilgili fiziksel kısıtlılıklar ve endotelial fonksiyonu için karşılaştırılabilir bir altın standart tekniğin olmaması FMD’nin klinikte yaygın kullanımını kısıtlamaktadır [96-98].

2.3.2.2 Karotis İntima Media Kalınlığı

Arter duvarı temel olarak intima, media ve adventisya adı verilen üç tabakadan oluşur. AS’nin en erken histolojik bulgusu fokal intimal kalınlaşmadır. İlerleyen süreçlerde bu intimal kalınlaşmalara media tabakası da dâhil olur. Bu aşamada oluşan IMT artışı USG ile ölçülebilir hale gelir. IMT, intimal lümenal kenardan, media tabakasının adventisyal kenarına kadar olan

mesafedir. USG ile intima tabakası hiperekojen, media tabakası hipoekojen ve adventisya tabakası hiperekojen görünümündedir. IMT'nin B-mod USG ile ölçümünün patolojik örneklerle güvenilir bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir [99]. CIMA, ana karotis arterin intima ve media tabakasının B-mod ultrasonografi ile ölçülmesiyle saptanır [100].

Literatürde bulunan derlemeler, CIMA ile geleneksel ve yeni kardiyovasküler risk faktörleri arasındaki ilişkinin kanıtlarını sunmaktadır. Bu kanıtlar CIMA ölçümünün, AS'nin tanısında iyi bir klinik öngörücü yöntem olduğunu göstermektedir [101].



Şekil 3: Ultrasonografik Endotel Katmanları

2.3.2.2.1 CIMA Ölçüm Tekniği

B-Mode USG, non-invaziv, ucuz, erişilebilir ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması nedeniyle AS'nin değerlendirilmesinde ilk kullanılan yöntemdir. USG ile vücudun farklı bölgelerindeki damar duvarları görüntülenebilir. Damar duvarındaki intima ve media tabakasının toplam kalınlığının ölçülmesi, erken dönem AS'yi saptamada en sık kullanılan yöntemdir. CCA yüzeysel yerleşimli olması, kolay ulaşılabilir ve uygun anatomisi, koroner ve beyin içerisindeki damarları benzer örnekleme, çok hareketli bir bölgede olmaması ve standardize edilmiş ölçüm protokolleri nedeniyle en sık kullanılan damarlardır.

CIMT muayenesine başlamak için, uygulayıcıya göre hasta supin pozisyonda uzanmalı, hastanın başı yatağın başına gelecek şekilde pozisyonlanmalıdır. Hasta ve uygulayıcı muayenede yaralanma olasılığını en aza indirmek için güvenli, verimli ve ergonomik tarama pozisyonlarına özen göstererek rahat olmalıdır. Kapsamlı ve eksiksiz bir inceleme için gereken süre, protokole ve USG deneyimine bağlı olup ortalama 15-60 dakikadır. Tarama sırasında en iyi görüntülemenin yapılabilmesi için, karotis arteri en uygun konumlandırarak boyun ekstansiyonu ve rotasyonuna yardımcı olacak boyun altı desteği sağlanmalıdır. Ölçümlerde en uygun olarak, 8-12 MHz frekans aralığında linear problar tercih edilir. CIMT’de oluşacak yalancı kalınlığı engellemek için doku harmonik ve bileşik görüntüleme kullanılmamalıdır. CIMT ölçümünde öncelikle, CCA seyri, dallanma bölgesi ve internal karotis arter (ICA) seyri boyunca olabilecek plaklar B-Mod USG ile görüntülenir. Saptanan plaklar B-Mod USG’de tanımlandıktan sonra fonksiyonel olarak anlamlı darlık potansiyeli olan plakların saptanması için karotis RDDUS incelemesi yapılır. Prob CCA uzanımına paralel olacak şekilde ayarlanarak, damar arka duvarından, lümen-intima ve media-adventisya ara yüzlerini temsil eden çift çizgi aralığı görüntülenmeli ve ölçülmelidir. USG ses dalgalarının damar duvarına dik geldiği açıda en iyi çözünürlük elde edileceğinden, uygulayıcının hassas el ayarlamalarıyla bu görüntüyü optimize etmesi gerekir. Toplam kazanç, zaman-kazanç telafisi ve işlem sonrası düzeltilmeler (dinamik aralık, açı gibi) kullanılarak USG odağının karotisin arka duvarına ayarlanması görüntü kalitesini daha da artıracaktır.

Normal ve normal olmayan CIMT değerleri arasında çok küçük farklar olabilir. Genel kaygı, tecrübesiz uygulayıcılarda bu ölçümlerin doğru ve tekrarlanabilir olup olmadığıdır. Pek çok çalışmada CIMT ölçümlerinin ölçüm bölgesi farklılıklarına, ölçüm sayısına, ortalama veya ortanca değer kullanılmasına bağlı olarak değişebildiği gösterilmiş olmakla birlikte; deneyimli merkezlerde oldukça güvenilir ve tekrar edilebilir ölçümler yapıldığı gösterilmiştir. Daha az deneyimli merkezlerde bu sıkıntıları gidermek için bilgisayar destekli otomatik sınır tanıma programları kullanılabilir. Bilgisayar destekli programlar ile yapılan ölçümlerde, manuel ölçümlerde saptanan uygulayıcılar arası ve uygulayıcı içi farklılıklar daha az bulunmuştur [102]. Bilgisayar destekli programlar, deneyimli ve deneyimsiz uygulayıcı arasındaki bu farkları oldukça azaltmaktadır [100]. Karotis arterlerine ek olarak abdominal aorta, iliak ve femoral arterler IMT ölçümünde kullanılabilir.

2.3.2.2.2 CİMT ile ED ve AS İlişkisi

CİMT ölçümü, kardiyovasküler hastalık riskini ve AS'yi önceden belirlemede kullanılan, koroner arter bilgisayarlı tomografi anjiyografi, konvansiyonel anjiyografi, myokardiyal perfüzyon sintigrafisi ve elektrokardiyogram gibi testlerle benzer güvenilirlikte olduğu gösterilen, invaziv olmayan bir yöntemdir [103, 104]. Ultrasonografik olarak CİMT ölçümünü, asemptomatik hastalarda AS'nin saptanmasında koroner arter kalsifikasyon skorundan daha duyarlı ve subklinik AS'nin gösterilmesinde kolay ve güvenilirdir [105, 106].

Karotiste plakları olan hastalarda CİMT artmıştır. Bu artış subklinik “end organ” hasarının bir göstergesi olmakla birlikte kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların bağımsız bir belirteçidir [107].

Yaş, cinsiyet, ırk, sigara ve alkol tüketimi gibi standart risk faktörlerinin hesaplanmasının uygun olmadığı 45 yaş altı yetişkinlerde CİMT ölçümü kardiyovasküler risk için önemli bir belirteçtir [108]. Pek çok potansiyel risk faktörü ile CİMT ilişkisi çalışmalarla incelenmiştir. Gestasyonel yaş ile CİMT arasında bir ilişki bulunmamıştır [109]. Yaşa bağlı CİMT artışı sadece kardiyak diastolik fonksiyon düşüklüğü olan kadınlarda ilişkili bulunmuştur [110]. CİMT Güney Asya ve Avrupalı sağlıklı erkeklerde benzer bulunmuştur [111]. Erkekler ve kadınlar arasında, CİMT’de istatistiksel anlamlı bir farklılık mevcut değildir [112]. Erkeklerde sigara ve alkol kullanımı CİMT ile ilişkilidir [113, 114]. Aerobik egzersiz ile CİMT arasında ters ilişki mevcuttur [115, 116].

Hipertansiyon, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. CİMT ile yüksek kan basıncı korelasyon göstermektedir ancak farklı popülasyonlarda farklı tip kan basıncı yüksekliğinin CİMT ile ilişkisi net değildir [117]. Sistolik hipertansiyon, diastolik hipertansiyon, gündüz hipertansiyonu, çocukluktan erişkinliğe devam eden sürekli hipertansiyon, normotansif hastalarda diastolik hipertansiyon ve değişken sistolik hipertansiyon ile CİMT korelasyon göstermektedir [118-125]. Sistolik hipertansiyon, hemodinamik yoldan dolayı olarak CİMT artışını etkileyen ana patolojik mekanizmadır [126]. Çocukluk çağında saptanan ve erişkinliğe kadar düzeltilebilen hipertansiyon durumunda CİMT, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalık riskinde azalma olduğu saptanmıştır [123]. CİMT artışının uzun süreli kontrolsüz hipertansiyona bağlı arterial yeniden şekillenmenin tespitinde, erken dönem AS'ye kıyasla daha iyi bir belirteç olduğu Kongo popülasyonunda yapılan bir çalışmada tanımlanmıştır [127]. Tüm hipertansiyon tiplerinin preklinik AS'nin ana nedenlerinden biri olduğu anlaşılmaktadır [128].

Genç yetişkinlik döneminde, sağlıklı ve sağlıksız yaşam tarzı değişiklikleri, orta yaşta subklinik AS için sırasıyla azalmış ve artmış risklerle ilişkilidir [129]. CIMT ile doğrudan ilişkisi saptanmış olan dislipidemi, AS'nin önemli bir risk faktörüdür [117].

Hiperkolesterolemik çocuklar ve ailesel hiperlipidemili (FH) hastalarda CIMT anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [130, 131]. Dolaşımda saptanan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) konsantrasyonları CIMT ile ilişkilidir ve oksitlenmiş LDL konsantrasyonu artışı, CIMT artışıyla korelasyon gösterir [132-136]. Azalmış yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) konsantrasyonu veya göreceli HDL 3b alt sınıfı ve küçük HDL partiküllerinin dağılımındaki değişiklikler CIMT'deki artışla önemli ölçüde ilişkilidir [119, 137]. Kadınlarda CIMT, HDL konsantrasyonu ile negatif korelasyon gösterir [138]. Apolipoproteinler AS için risk faktörüdür. Düşük seviyelerde eritrosite bağlı apolipoprotein B (apo B), klinik ve subklinik AS ile ilişkili olmakla birlikte özellikle Apo B ve ApoB/ApoA1 seviyeleri CIMT ile anlamlı ilişkilidir [132, 139, 140]. Bu görüşün aksine Apo E genotipleri ve CIMT'nin ilişkili olmadığını ve ApoA1'in CIMT ile ters bir ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [139, 141].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇ

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 14.7.2018 tarihli, 14 numaralı toplantıdaki üç numaralı gündemde alınan onay sonrası, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan tedarik edilen 5-6 haftalık 23 adet Wistar Albino (300-350g) türü dişi sıçan ile gerçekleştirilmiştir. Bu sıçan türü Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nda bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle seçilmiştir. Tüm denekler Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nda 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda, 20-24°C'lik oda sıcaklığı koşulları altında tutulmuş, dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pelet yeme serbest ulaşimleri sağlanmıştır. Deneklerin yem ve su ihtiyaçları günde bir defa (her sabah saat yedide) kontrol edilmiştir. Çalışmanın deneysel ve radyolojik ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nda; histopatolojik (HP), histokimyasal (HK) ve immünohistokimyasal (IHK) boyama ve değerlendirme ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Kullanılan Malzemeler

- Hayvanların barınması için;
 - 23 adet dişi Wistar Albino sıçanın barınması için polikarbon malzemeden yapılmış şeffaf kafesler
- Görüntüleme Çalışması için;
 - FUJIFILM Hayvan deneyleri için üretilmiş yüksek çözünürlüklü Visualsonics Vevo 2100 Linear Görüntüleme Sistemi ve MS500D (22-55 MHz) MicroScan Transducer
 - Aquasonic USG jeli
- Anestezi uygulaması için:
 - Sevoflurane ve indüksiyon seti
- Sıçanların feda edilmesi için;
 - Enjektör
 - Cerrahi seti
 - Fiksasyon için kullanılan doku saklama kabı
 - Petri kabı
- Biyokimyasal ve histopatolojik analizler için;
 - Hassas terazi
 - pH metre
 - Karıştırıcı
 - Santrifüj
 - Vorteks
 - Derin dondurucu
 - Buzdolabı
 - ELISA Sistemi
 - Mikrotom Cihazı
 - Distile Su Cihazı
 - Su Banyosu Cihazı
 - Çeker Ocak
 - Etüv
 - Mikroskop
 - Kamera

- Bilgisayar
- Cam Pipetler
- Otomatik Pipetler
- Pastör pipeti
- Ependorf Serum Örnek Saklama Tüpleri
- Doku Takibi Kaseti
- Parafin
- Lam
- Lamel
- Mape
- Lam çizir
- Analiz programları
- Histokimyasal inceleme boyaları (Hemotoksilen&Eozin, Van Gieson)
- İmmünohistokimyasal inceleme boyaları (ET-1, eNOS)
- L-NAME
- ELISA kitleri (ADMA, VEGF, eNOS)

3.2 YÖNTEM

Bu çalışmada, hipertansiyona bağlı gelişen ED'nin ultrasonografik, histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeleri ile vasküler endotel hücreleri ve böbrek dokusu üzerine etkisi araştırılmış ve literatürde tanımlanan hayvan deneyi modelleriyle karşılaştırılmıştır. Sıçanlara IP yolla verilen L-NAME sonrası ED modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan bu ED'nin erken ve geç etkilerini saptamak için farklı anatomik bölgelerdeki arterlerde IMT ve sağ böbrek dokusunda rezistif indeks (RI) değerleri ultrasonografik olarak ölçülmüştür. ED gelişimini teyit etmek için plazma örneklerinde eNOS, asimetrik dimetil arjinin (ADMA) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) seviyeleri bakılmıştır. ED'nin arterler üzerine etkisini tayin etmek için sağ ve sol CCA, abdominal aorta (AA) ve sağ iliak arter (İA) dokularında eNOS ve ET-1 seviyeleri ölçülmüştür.

Deney başlangıcında, USG ölçümleri yapıldıktan sonra, tüm sıçanların kan örnekleri sevoflurane anestezisi altında kuyruk veninden (vena caudalis) yaklaşık 0,25 mL olacak şekilde alınmıştır. Birinci grup ilk USG ölçümleri yapıldıktan sonra; üçüncü grup 10. günde, ikinci ve dördüncü grup 28. Günde, USG ölçümleri yapıldıktan sonra, deneyin sonlanması ile teker teker sevoflurane anestezisi ile uyutulmuştur. Uyutulan denekler cerrahi işlem masasına alınmış ve

supin pozisyonunda ekstremitelerinden masaya sabitlenmiştir. Cerrahi makas yardımıyla deneklere göğüs kafesinden alt karın bölgesine uzanan kesi atılarak batın açılmıştır. Ardından boyun bölgesinde, mandibula altından, suprasternal çentiğe uzayacak şekilde kesi atılmıştır.

Biyokimyasal incelemeler için, insülin enjektörü kullanılarak, intrakardiyak 1mL kan alınmıştır. Plazma örnekleri biyokimyasal analizlere dek -80°C’de saklanmıştır. Plazma örneklerinde ELISA yöntemi ile eNOS, ADMA ve VEGF konsantrasyonları ölçülerek ED gelişimi değerlendirilmiştir. Ardından HP incelemeler için sırasıyla sağ CCA, sol CCA, AA ve sağ İA çıkarılıp formol dolu kaplara konulmuştur. Elde edilen doku örneklerine rutin doku takip yöntemi uygulanmıştır. İnce kesitleri alınarak çeşitli HK, HP ve IHK uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada HK değişiklikleri için Hematoksilen&Eozin ve Van Gieson; IHK değişiklikleri için ET-1 ve eNOS primer antikoru ve ELISA ile ADMA, eNOS ve VEGF değerlendirmesi yapılmıştır.

3.2.1 Araştırmanın Tipi

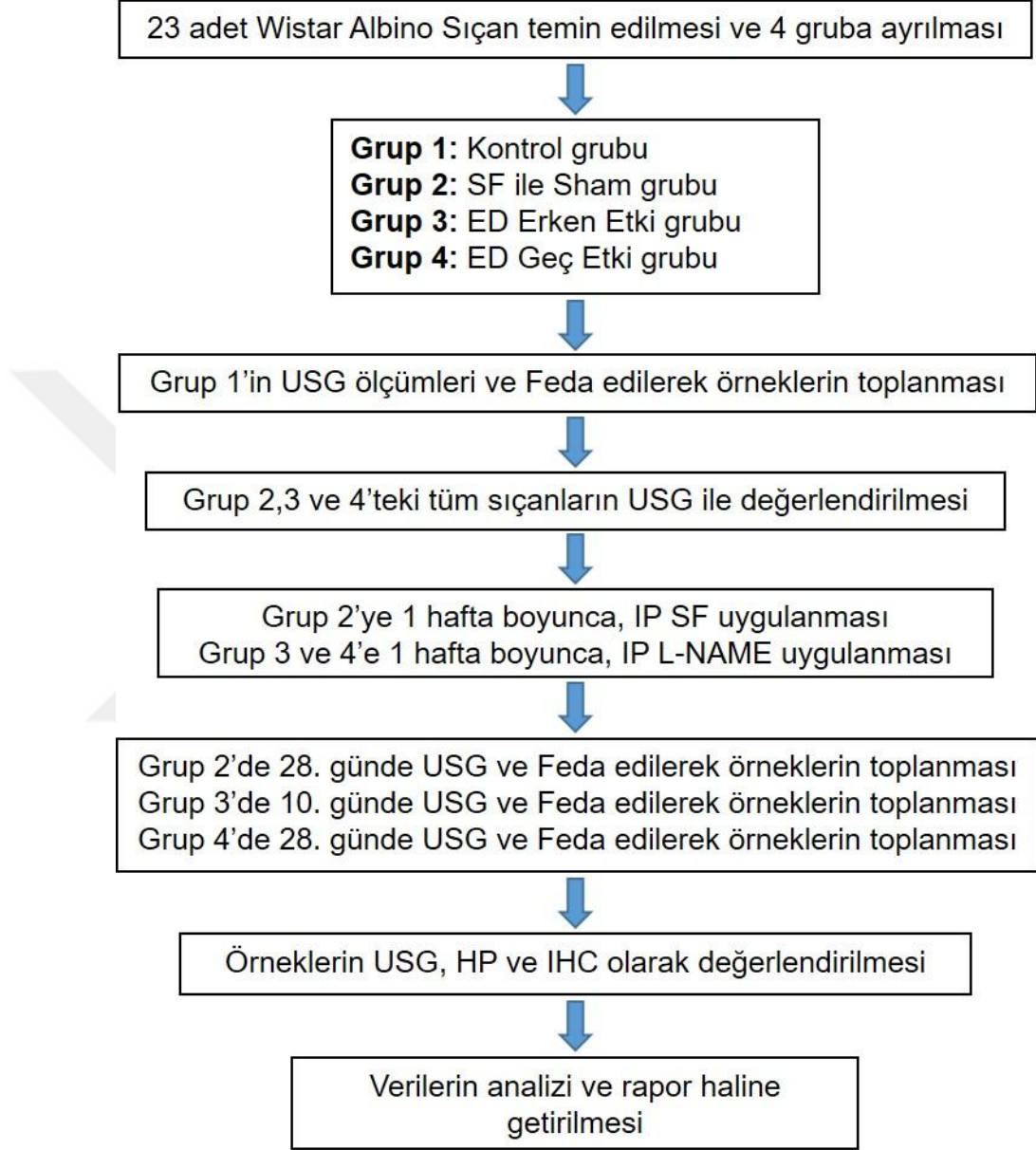
Araştırma deneysel hayvan çalışmasıdır.

3.2.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu deney, Ocak 2020-Haziran 2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında ve Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 İş Akış Planı

Tablo 4: İş Akış Şeması



3.2.4 Deney Hayvanı Grupları

Deneyde, sıçanlar rastgele seçilerek dört gruba ayrılmıştır. İlk grup değerlendirilecek doku ve organların sıçanlardaki normal değerlerinin tayini için kullanılmıştır. Bu gruptaki üç sıçan USG ölçümleri yapıldıktan sonra feda edilmiş, doku ve kan örnekleri HK, HP ve IHC yöntemleriyle değerlendirilmiştir. İkinci grup sham grubu olup yaşlanma ve IP enjeksiyon gibi

stres değişkenlerinin deneye etkisini incelemek amacıyla oluşturulmuştur. Bu grupta bulunan altı sıçan rastgele seçilerek iki ayrı kafese konulmuş, bir hafta boyunca ortamlarına alışmaları beklenmiştir. USG ölçümleri yapıldıktan sonra bir hafta boyunca 12 saat arayla günde iki defa 0,5 mL %0,09 sodyum klorür (SF) IP yolla uygulanmıştır. 28. günde USG ölçümleri yapıldıktan sonra sıçanlar feda edilmiştir. Dokular ve kan örnekleri HK, HP ve IHK yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Üçüncü ve dördüncü grup ilaç grubudur. Bu grupta bulunan 14 sıçan rastgele seçilerek iki kafeste üçer, iki kafeste dörder sıçan olacak şekilde ayrılmış ve bir hafta boyunca ortamlarına alışmaları beklenmiştir. USG ölçümleri yapıldıktan sonra ED oluşturmak için bir hafta boyunca 12 saat arayla günde iki defa 0,5 mL 185 µMol/kg L-NAME IP yolla uygulanmıştır. Üçüncü grup erken etki (EE) grubu olup bu gruptaki yedi sıçan deneyin 10. gününde ED'nin erken etkilerinin saptanması için USG ölçümleri yapıldıktan sonra feda edilmiştir. Doku ve kan örnekleri HK, HP ve IHK yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Dördüncü grup geç etki (GE) grubu olup bu gruptaki yedi sıçan deneyin 28. gününde ED'nin geç etkilerinin saptanması için USG ölçümleri yapıldıktan sonra feda edilmiştir. Doku ve kan örnekleri HK, HP ve IHK yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

- **Grup 1 (Kontrol):** Araştırma başlangıcında USG ölçümleri yapıp feda edilen grup (Kontrol grubu, n=3)
- **Grup 2 (Sham):** Araştırma başlangıcında ve 28. günde USG ölçümleri yapılan, yedi gün boyunca 12 saat arayla günde iki defa IP yolla 0,5 mL SF verilen grup (Sham grubu, n=6)
- **Grup 3 (EE):** Araştırma başlangıcında ve 10. günde USG ölçümleri yapılan, yedi gün boyunca 12 saat arayla günde iki defa IP yolla 185 µMol/kg 0,5 mL L-NAME verilen grup (ED erken etki grubu, n=7)
- **Grup 4 (GE):** Araştırma başlangıcında ve 28. günde USG ölçümleri yapılan, yedi gün boyunca 12 saat arayla günde iki defa IP yolla 185 µMol/kg 0,5 mL L-NAME verilen grup (ED geç etki grubu, n=7)

Tablo 5: Deney Grupları

Deney Takvimi				
	İlk Gün	1-7 Gün	10. Gün	28. Gün
Kontrol (n=3)	USG + Kan Alma + Feda			
Sham (n=6)	USG + Kan Alma	2x1 IP SF	Takip	USG + Kan Alma + Feda
EE (n=7)	USG + Kan Alma	2x1 IP L-NAME	USG + Kan Alma + Feda	
GE (n=7)	USG + Kan Alma	2x1 IP L-NAME	Takip	USG + Kan Alma + Feda

3.2.5 Sıçanlarda Sistemik Endotel Disfonksiyonunun Oluşturulması

ED oluşturulacak 14 sıçan rastgele seçilmiştir. İki kafeste üçer, iki kafeste dörder sıçan olacak şekilde ayrılmış ve bir hafta boyunca ortamlarına alışmaları beklenmiştir. Deney başlangıcında sevoflurane anestezisi altında sıçanların kuyruk veninden 0,25 mL kan alınmıştır. USG ölçümleri yapıldıktan sonra ED oluşturmak için bir hafta boyunca 12 saat arayla günde iki defa 0,5 mL 185 μ Mol/kg L-NAME IP yolla uygulanmıştır. ED'nin erken etkilerini saptamak için yedi sıçan deneyin 10. gününde; geri kalan yedi sıçan ED'nin geç etkilerini saptamak için 28. günde feda edilmiştir. Sıçanlar feda edilirken intrakardiyak 1 mL kan alınmıştır. Plazma örneklerinde ELISA yöntemi ile ADMA, eNOS ve VEGF düzeyleri ölçülerek ED gelişimi değerlendirilmiştir.

3.2.6 Sıçanlarda Sevoflurane Anestezisi

Anestezi derinliğini daha iyi kontrol edebilmek için volatil anestezi olan sevoflurane ile genel anestezi tercih edilmiştir. Bu anestezi türü hızlı başlangıç, yeterli analjezi ve sedasyon relaksasyonu sağlamaktadır. Sıçanlar USG ölçümü yapılacak odaya işlemiden 30 dakika önce getirilip ortama uyum sağlamaları için beklenmiştir. Anestezi volatil ajan olarak seçilen sevoflurane ajana özel bir cihaz yardımı (sevoflurane vaporizatörü) ile sıvı halden yüksek basınçla gaz haline getirilerek uygulanmıştır. Laboratuvar hayvanları sertifikası olan aynı anestezi uzmanı tarafından sıçanların genel anestezi indüksiyonu sevoflurane ile bağlantı sağlanan indüksiyon kafesinde yapılmıştır (Şekil 4). Yeterli anestezi derinliği sağlandıktan sonra sıçanlar özel tasarlanmış USG tablasına alınıp dört ekstremitelerinden bant ile tespit edilmiştir (Şekil 5). USG cihazının özelliği ile solunum ve hemodinamik (nabız, ateş, elektrokardiyografi) özellikleri monitörize edilmiştir (Şekil 6). Anestezi idamesi iki en düşük

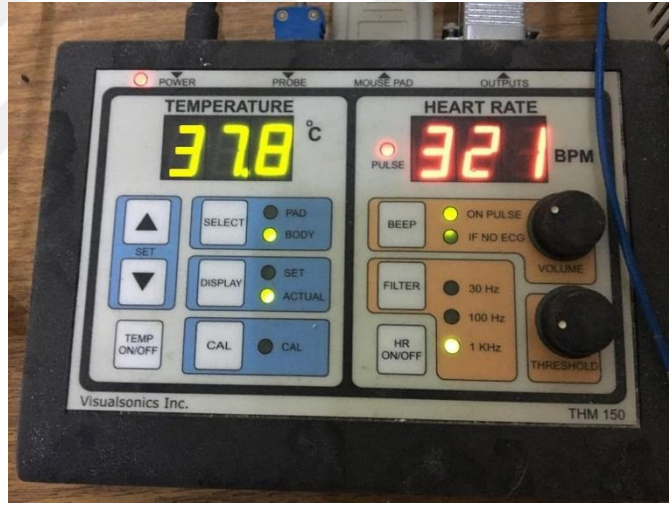
alveolar konsantrasyon (MAC) sevoflurane ve %100 oksijen ile 10 cc enjektörden yapılmış maske yardımıyla USG ölçümleri boyunca devam ettirilmiştir. Ölçüm işlemleri boyunca anestezi uzmanı sıçanın hemodinamik ve anestezi monitörizasyonunu takip edip ve stabil tutmak için anestezik ajan ve cihaz ayarlarını değiştirmiştir. Ölçüm işlemleri bitiminde uyandırılması gereken sıçanlar inhalasyon anesteziği sonlandırılarak %100 oksijenle uyandırılıp derlenme kafesine alınmıştır. Ölçüm işlemi ağırlı bir işlem olmadığı için analjezi planı yapılmamıştır. Motor fonksiyonlarını tamamen kazanıp derlenmeleri için 45 dakika derlenme kafesinde tutulup kendi işaretli kafesine konulmuştur. Kendi kafesindeki diğer sıçanlarla uyumu, bulantı, kusma ve solunum takibi yarım saat süresince yapıldıktan sonra hayvan bakıcılarına devredilmiştir. Ölçüm sonrası feda edilecek sıçanlar anestezi altında iken inhalasyon anestezi ile ötanaziye edilmiştir.



Şekil 4: Sıçan Anestezi Sistemi



Şekil 5: Sıçan Tablası ve Vevo Görüntüleme Sistemi



Şekil 6: Monitörizasyon

3.2.7 Sıçanlarda Sistemik Endotel Disfonksiyonun Ultrasonografik Olarak Değerlendirilmesi

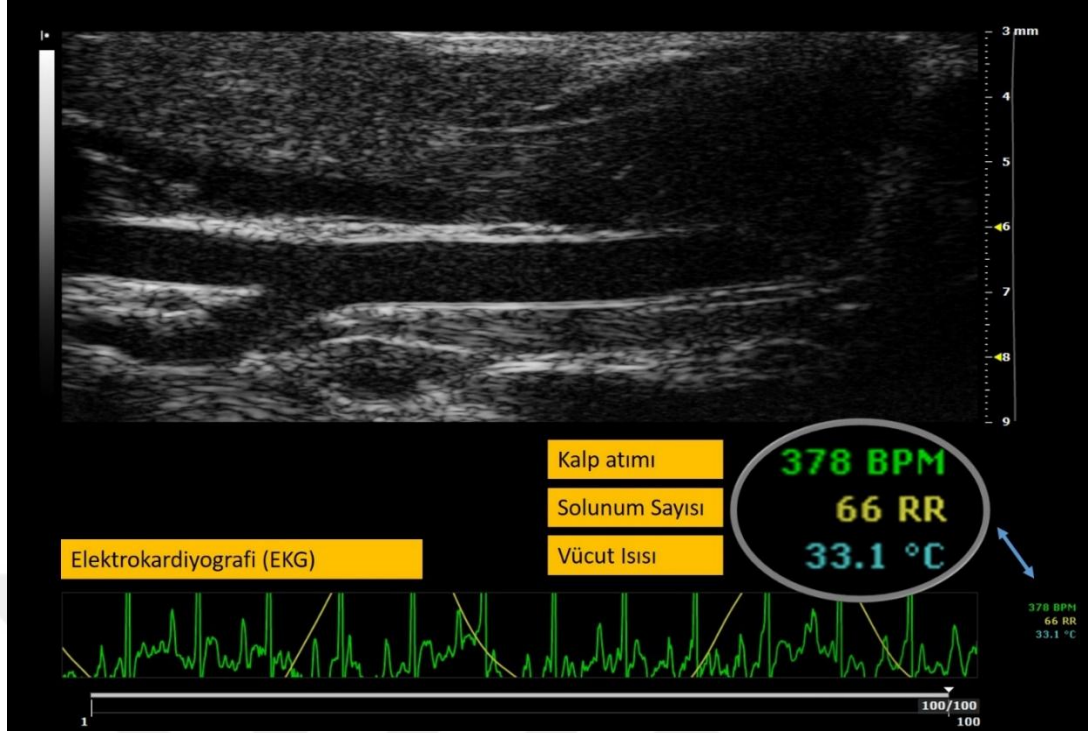
ED gelişiminin non-invaziv yöntemlerle değerlendirilmesi için sağ ve sol CCA, AA ve sağ İA'dan IMT ölçümleri yapılmıştır. Görüntüleme modalitesi olarak VisualSonics Vevo 2100 ultra yüksek frekanslı, yüksek çözünürlüklü, küçük hayvan çalışmaları için tasarlanmış USG sistemi (Fujifilm VisualSonics, Inc. Toronto, Kanada) kullanılmıştır. Bu sistemin aksial

çözünürlüğü 30 µm ve lateral çözünürlüğü 70 µm'dir. Tüm USG değerlendirmeleri MS550 (22-55 MHz) yüksek frekanslı linear prob ile yapılmıştır. Bu prob seçildikten sonra CCA, AA ve İA için 'carotid', böbrek için 'general imaging' ön ayarları seçilmiştir. Böbrek Doppler ve spektral USG incelemeleri için cihazın otomatik önerdiği 'med flow' ön ayarında incelemeler yapılmıştır (Şekil 7).

Vevo 2100		Vevo 2100	
baris MS-550D		baris MS-550D	
Application Preset	General Imaging Carotid	Application Preset	General Imaging Med Flow
Transmit		Transmit	
Frequency	40 MHz	Frequency	32 MHz
Power	100 %	Power	100 %
		PRF	15 kHz
Acquisition		Acquisition	
Gain	27 dB	Doppler Gain	30 dB
Frame Rate	25	Beam Angle	15 deg
Depth	9.00 mm	Wall Filter	150 Hz
Width	14.08 mm	Simultaneous	Off
Line Density	High		
Persistence	Off	Display	
Sensitivity	High	Dynamic Range	40 dB
ECG/Resp Gate	Off/Off	Display Map	S1
Extended Buffer	Off	Brightness	44
		Contrast	67
Display		Doppler SV	
Dynamic Range	60 dB	Depth	4.64 mm
Display Map	G5	Size	0.36 mm
Brightness	50	Angle	60 deg
Contrast	50		

Şekil 7: Ön Ayarlar, a: B-mod USG Ön Ayarları, b: Doppler USG Ön Ayarları

Sevoflurane anestezisindeki sıçanlar, Vevo Görüntüleme İstasyonu'nun sıçan değerlendirilmesi için tasarlanan tablasına supin pozisyonda yerleştirilmiştir. Deneklerin ekstremiteleri pençe kısımlarından tabla üzerinde sensörlerin olduğu uygun yerlerine bant ile sabitlenip idame anestezisiye devam edilmiştir. Sıçanlara rektal termometre yerleştirilmiştir. Tabla sayesinde sıçanların vücut sıcaklıkları, solunum sayıları ve nabızları izlenerek hayati bulguları takip edilmiştir. Sabitleme ve sensörlerin takılması sayesinde USG görüntüleri ile eş zamanlı elektrokardiyografinin kaydedilmesi sağlanmıştır (Şekil 8). Ardından karın ve boyun bölgesine tüy dökücü krem sürülüp tüyler temizlenmiştir.



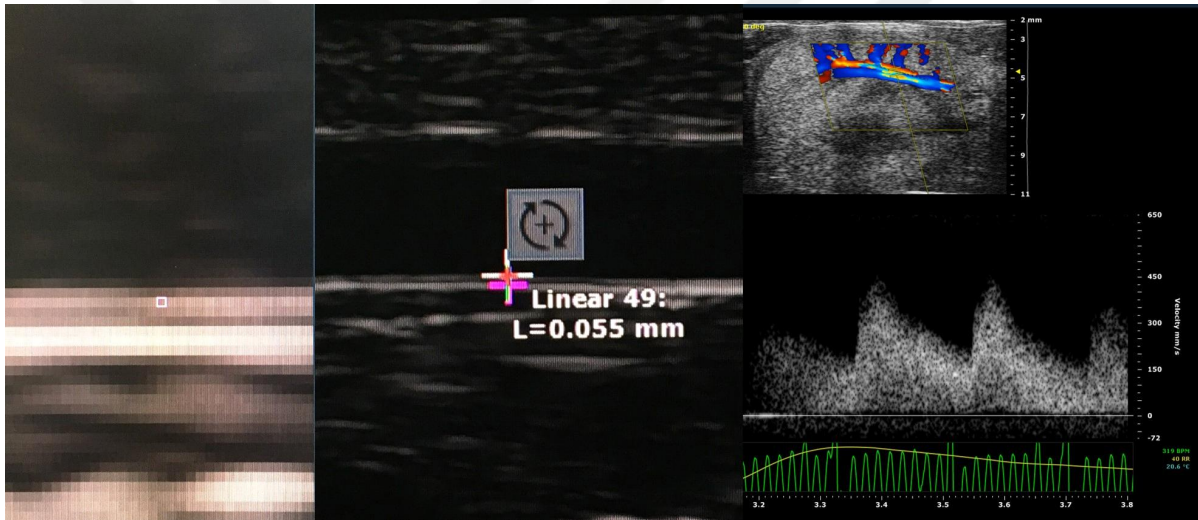
Şekil 8: USG Monitörizasyon

Görüntülemeye hazır olan sıçanlarda sol ve sağ CCA, AA, sağ İA ve sağ böbrek dokuları ultrasonografik olarak manuel olarak taranmıştır. Tariflenen damarlarda prob damar uzun eksenine paralel olacak şekilde konumlandırılmıştır. Damar duvarı üç farklı ekojenitede yüzeyden oluşmaktadır. İntima tabakası hiperekojen, media tabakası hipoekojen ve adventisya tabakası hiperekojen görünümündedir. Damar lümeni ile damar duvarı arasındaki ilk ekojen çizgi lümen-intima yüzeyi; hipoekojen media tabakası ile hiperekojen adventisya tabakası arasındaki çizgi media-adventisya yüzeyi kabul edilerek bu iki yüzey arasından ölçüm yapılmıştır.

IMT ölçümleri için ideal olarak CCA'da dallanma öncesi birinci milimetre (mm), AA'da böbrek damarları çıkımından kaudaldeki birinci mm, İA'da dallanma öncesi birinci mm düzeylerinde, arka duvarın en net görüldüğü görüntüler videoya alınmıştır. Bu lokalizasyonlarda görüntülerin uygun olmaması, artefakt içermesi veya sıçana bağlı anatomik farklılıklar gibi nedenlerden dolayı en iyi görüntünün elde edilememesi durumunda ideal alana en yakın bölgeden görüntüler kaydedilmiştir. Damarların arka duvarından IMT'nin ölçülebileceği en iyi görüntüyü elde etmek için hassas el ayarlamalarıyla en uygun pozisyon sağlanmıştır. Yüksek frekanslı prob Vevo Görüntüleme İstasyonu yardımıyla sabitlenmiştir ve hassas el ayarlamaları yapılmıştır. Sağ böbrek B-mod USG ile taranmıştır. Doppler Modu'na geçildikten sonra intrarenal düzeyden, tercihen interlobar arterlerden, spektral görüntüler

alınmıştır. Tanımlanan bölgelerden en az ikişer seri görüntü alınmıştır. Tüm video görüntüleri ölçümler için kaydedilmiştir. Her seriden üçer ölçüm yapılmış ve bu üç ölçümün ortalama değeri IMT olarak kabul edilmiştir.

Tüm görüntülemeler radyoloji alanında 14 ve beş yıl; laboratuvar hayvanı görüntülemesi alanında sekiz ve üç yıl deneyime sahip iki radyolog (sırasıyla Uygulayıcı 1 ve Uygulayıcı 2) tarafından kaydedilmiştir. Tanımlanan yönteme uygun şekilde görüntüler kaydedilmiştir. Uygulayıcılar arasında ölçümlerin güvenilirliğini saptamak için sham ve geç etki grubunun deney sonu USG görüntüleri, farklı zamanlarda, her iki uygulayıcı tarafından ayrı ayrı ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Gözlemciler arası güvenilirlik istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 9: Vevo 2100 USG Ölçümleri

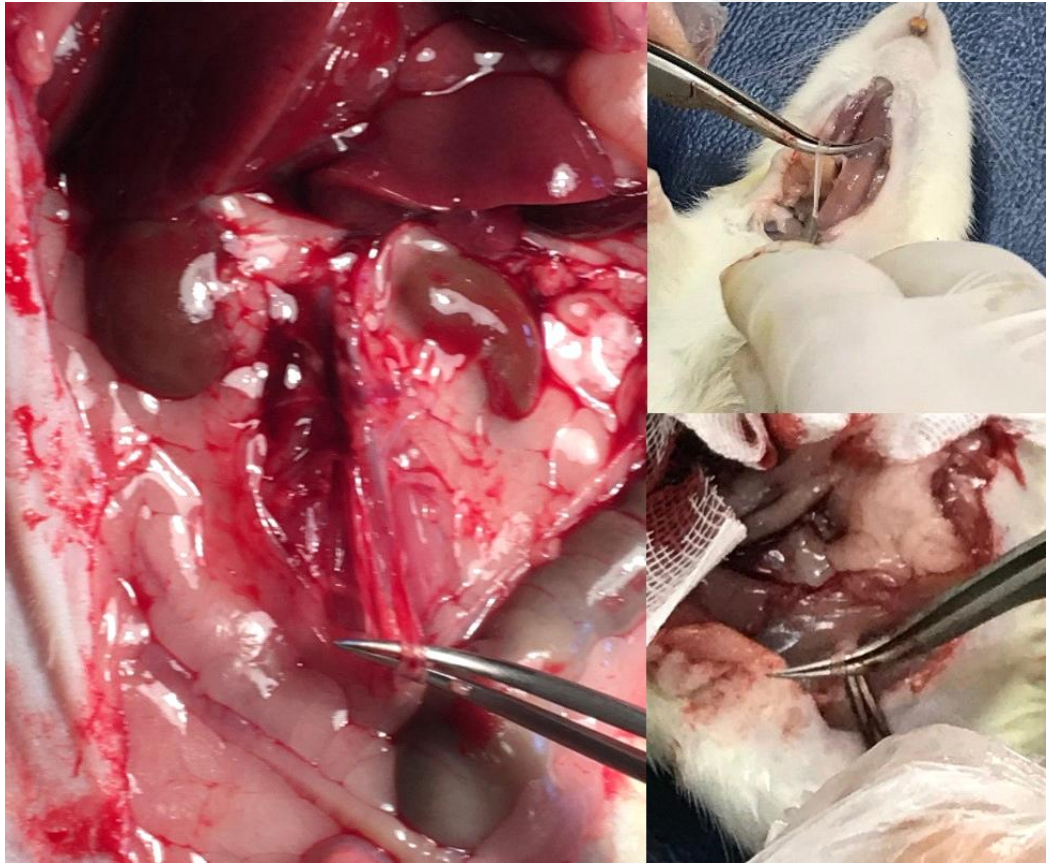
3.2.8 Plazma Örneklerinin Analizi

Deney sonucunda tüm sıçanlar feda edilmiştir. Başlangıçta, ultrasonografik ölçümler yapıldıktan sonra, tüm sıçanların kan örnekleri sevoflurane anestezisi altında kuyruk veninden (vena caudalis) yaklaşık 0,25 mL olacak şekilde alınmıştır. Birinci grup ilk ultrasonografik ölçümlerin ardından, üçüncü grup 10. günde, ikinci ve dördüncü grup 28. günde deneyin sonlanması ile ultrasonografik ölçümler yapıldıktan sonra teker teker sevoflurane anestezisi ile uyutulmuştur. Uyutulan denekler cerrahi işlem masasına alınıp supin pozisyonunda yatırılmıştır. Cerrahi makas yardımıyla deneklere göğüs kafesinden alt karın bölgesine uzanan kesi atılarak batın açılmıştır. Ardından boyun bölgesinde mandibula altından suprasternal

çentiğe uzayacak şekilde kesi atılmıştır. IHK incelemeler için, insülin enjektörü kullanılarak, intrakardiyak 1 mL kan alınmıştır. Plazma örnekleri biyokimyasal analizlere dek -80°C’de saklanmıştır. Plazma örneklerinde ELISA yöntemi ile VEGF, eNOS ve ADMA konsantrasyonları ölçülerek ED gelişimi değerlendirilmiştir.

3.2.9 Farelerin Feda Edilmesi ile Organ ve Dokuların Toplanması

Deney sonucunda tüm sıçanlar feda edilmiştir. Birinci grup ilk ultrasonografik ölçümlerin ardından, üçüncü grup 10. günde, ikinci ve dördüncü grup 28. günde deneyin sonlanması ile ultrasonografik ölçümleri yapıldıktan sonra teker teker sevoflurane anestezisi ile uyutularak feda edilmiştir. Uyutulan denekler cerrahi işlem masasına alınmış ve supin pozisyonunda yatırılmıştır. Cerrahi makas yardımıyla deneklere göğüs kafesinden alt karın bölgesine uzanan kesi atılarak batın açılmıştır. Ardından boyun bölgesinde mandibula altından suprasternal çentiğe uzayacak şekilde kesi atılmıştır. HP ve IHK incelemeler için sırasıyla sağ CCA, sol CCA, abdominal aorta ve sağ iliak arter çıkarılıp formol dolu kaplara konularak fiks edilmiştir.



Şekil 10: Sakrifikasyon

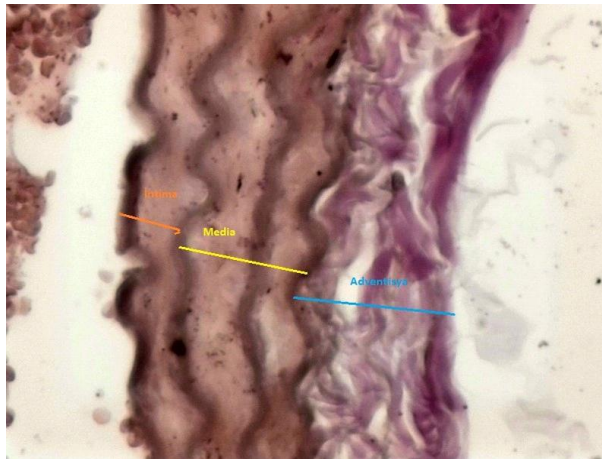
3.2.10 Histopatolojik Değerlendirmeler

3.2.10.1 Doku Takip Prosedürü

Bu işlemten sonra fiksatifin uzaklaştırılması için dokular doku takibi kasetlerine alınarak bir gece akan suyun altında tutulmuştur. Dokular dehidratasyon amacıyla %70, %80, %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika etüvde bekletilmiş, sonrasında yine 20'şer dakikadan dört defa olacak şekilde aseton serilerinden geçirilmiştir. Ardından iki farklı ksilen solüsyonuyla 30'ar dakika etüvde bekletilip şeffaflaşması sağlanmıştır. Birer saatlik iki farklı yumuşak parafinde immersiyonu sağlandıktan sonra etüvden çıkartılarak dispansör aracılığı ile sert parafin bloklar hazırlanacak şekilde doku kaplarına gömülmüştür. Sert parafin bloklar kaplarından çıkartılıp çevresi temizlendikten sonra mikrotoma yerleştirilmiş, 20 µm'lik kesitlerle trim yapıp, dokuya ulaştıktan sonra 5 µm'lik kesitler alınarak su banyosuna koyulmuştur. Bu sayede parafin dokuda bulunan kıvrımlar açılmıştır. Daha sonra bir lam yardımıyla dokular su banyosundan alınarak kurumaya bırakılmıştır.

3.2.10.2 Vasküler Yapılarda IMT Ölçümleri

Preparatlar, hematoxilen-eozin ve Van Gieson ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Her bir deney hayvanında sağ ve sol CCA, AA ile sağ İA'da ölçümler gerçekleştirilmiştir. Transvers olarak alınan damar kesitlerinde, oküler yüksek çözünürlüklü video monitor ve görüntü analiz programı ile donatılmış bir mikroskop (Olympus BX50) kullanılarak intima, media ve adventisya kalınlıkları ölçülmüştür. Üç farklı noktadan yapılan ölçümler sonucu bulunan ortalama değerler kullanılarak IMT değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 11: HP IMT

3.2.10.3 İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

İmmünohistokimyasal analizler, hücre ve dokularda var olan makro moleküllerin işaretlenmesi esasına dayanmaktadır ve üç temel adım ile gerçekleşmektedir. Birinci adımda primer antikor özel antijene bağlanmakta, ardından antikor-antijen kompleksi bir konjugasyon enzimi yardımı ile ikinci antikora bağlanmaktadır. Sonrasında substrat ve kromojen varlığında bu enzim, antikor-antijen bağlanma bölgesinde renkli bir depozite dönüşmektedir. Bu yapılar ışık mikroskobunda histopatolojik olarak değerlendirilmektedir.

Sağ CCA, sol CCA, AA ile sağ İA'da, hipertansiyona bağlı gelişen ED varlığını saptamak için IHK inceleme yöntemi ile eNOS ve ET-1 ekspresyonları değerlendirilmiştir. Poli-L-lizini lamlara hazırlanan damar kesitleri eNOS (Bioss) ve ET-1 (Bioss) (1:200 dilüsyon) immünohistokimyasal boyalarıyla boyanmıştır. Bu immünohistokimyasal boyama işlemi sırasında şu aşamalar uygulanmıştır:

1. Ksilolde bir saat beklet
2. Kurut
3. %100 etanolde beklet
4. Distile su ile yıka
5. %3 H₂O₂ ile 10 dakika (dk) beklet
6. Distile su ile yıka
7. PBS ile yıka
8. Bir damla inhibitör CM damlat, beş dk beklet
9. PBS ile yıka
10. Antikoru damlat, üzerini yayılması için kapat (eNOSve ET-1)
11. 60 dk bekle
12. PBS ile yıka
13. OMap anti-Rb HRP (Multimer HRP) uygula, üzerini kapat
14. 30 dk beklet
15. PBS ile yıka
16. Bir damla DAB CM ve bir damla H₂O₂ CM uygula, üzerini kapat
17. Sekiz dk beklet
18. Çeşme suyu ile yıka
19. Bir damla Copper CM damlat
20. Beş dk beklet

21. PBS ile yıka
22. Hematoksilen damlat, 15 dk beklet
23. Çeşme suyu ile yıka
24. Bir damla Bluing Reagent damlat, beş dk beklet
25. Çeşme suyu ile yıka
26. Distile su ile yıka
27. Artan alkol serisinde ikişer dk beklet
28. Alkol uçunca ksilole al, overnight ya da en az bir saat beklet
29. Lamları çıkar, kurut
30. Mounting medium ile hava kabarcığı olmadan kapat

İmmünohistokimya preperatları, hayvanların dâhil oldukları gruplar bilinmeden, tek gözlemci tarafından ışık mikroskobu (Olympus BX 50) ile değerlendirilmiştir. IHK'sal boyanma sonucunda ekspresyonlar, semikantitatif olarak eNOS veya ET-1 ifade eden hücrelerin oranını ve boyama yoğunluğunu değerlendiren immünoreaktif skora (IRS) göre hesaplanmıştır. Boyama yoğunluğu sıfır (negatif, renk reaksiyonu yok), bir (zayıf), iki (ılımlı) ve üç (güçlü) olarak derecelendirilmiş; incelenen pozitif hücrelerin yüzdesi sıfır (negatif, boyanan hücre yok), bir ($\leq 10\%$), iki ($11-50\%$), üç ($51-80\%$) ve dört ($> 80\%$) olarak puanlanmıştır. İki skor çarpılmış ve IRS (0-12 arası değerler) belirlenmiştir (sıfır=negatif, 1-3=zayıf pozitif, 4-8=ılımlı pozitif ve 9-12= kuvvetli pozitif).

Tablo 6: Immunreaktivite Skorlama Sistemi (IRS)

Pozitif hücre yüzdesi X Evreleme yoğunluğu = Skor (0-12)			IRS Sınıflaması
0 = Hücre yok 1 = $\leq 10\%$ Hücre 2 = $10-50\%$ Hücre 3 = $51-80\%$ Hücre 4 = $> 80\%$ Hücre	0 = RR yok 1 = Hafif RR 2 = Orta RR 3 = Yoğun RR	0-1 = Negatif 2-3 = Hafif 4-8 = Orta 9-12= Kuvvetli (+)	0 = Negatif 1 = Zayıf (+) 2 = Orta (+) 3 = Güçlü (+)
RR: Renk Reaksiyonu			

3.2.11 Plazma ADMA, eNOS ve VEGF'nin ELİSA ile Değerlendirilmesi

3.2.11.1 Örneklerin Çalışmaya Hazırlanması

Derin dondurucuda depolanmış olan plazma örnekleri oda sıcaklığına alınarak yaklaşık 30 dakika çözünmeleri beklenmiştir. Homojen dağılımı sağlamak amacıyla aralıklı olarak örnek tüpleri alt-üst edilmiştir. Tamamen çözünerek çalışmaya hazır hale gelen plazma örneklerinde ADMA, VEGF ve eNOS çalışılmıştır.

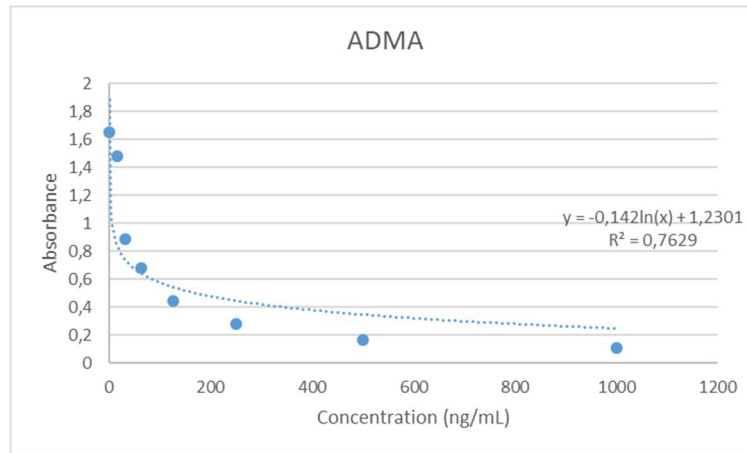
3.2.11.1.1 Asimetrik Dimetilarjinin Ölçümü

Yöntem: ELISA

Test Prensipleri: Kompetitif İmmunoassay

Bu ELISA kiti (Elabscience, Houston, Texas, U.S.A.) kompetitif ELISA prensibini kullanmaktadır. Bu kit içinde sağlanan mikro ELISA plakası ADMA ile önceden kaplanmış. Reaksiyon sırasında numunedeki veya standarttaki ADMA ADMA'ya özgü biyotinlenmiş Algılama Ab sahaları için katı faz destekçisi üzerindeki sabit miktardaki ADMA ile rekabet eder. Fazla konjugat ve bağlanmamış numune veya standart plakadan yıkanıp Horseradish Peroksidaz (HRP) konjuge edilmiş Avidin her mikropilaka kuyusuna eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra her kuyucuğa bir TMB substrat çözeltisi ilave edilir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk değişimi 450±2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Daha sonra numunelerdeki ADMA konsantrasyonu, numunelerin optik dansitesi (OD) standart eğri ile karşılaştırılmasıyla belirlenir.

Ölçüm Aralığı: 15.63-1000 ng/mL, Sensitivite: 9.38 ng/mL, Ölçüm Tekrarlanabilirliği: CV < %10. ADMA ölçümü için her bir örnek bir kez çalışılmıştır.



Şekil 12: ADMA Optik Dansite Eğrisi

3.2.11.1.2 VEGF Ölçümü

Yöntem: ELISA

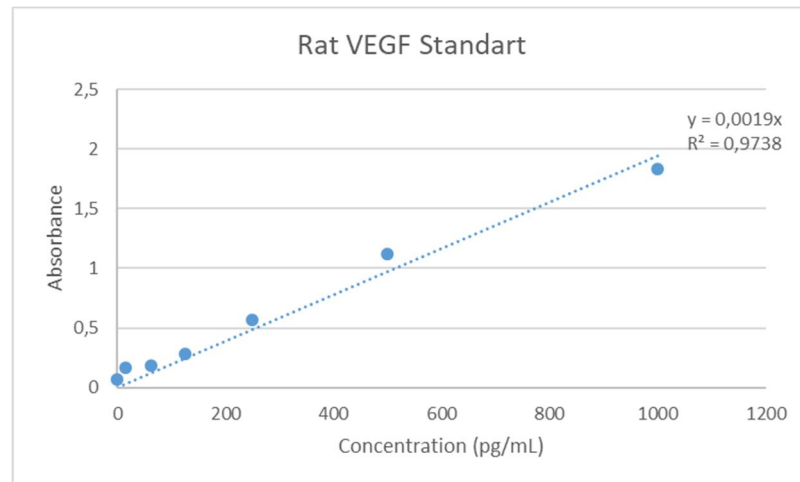
Test Prensipli: Kompetitif İmmünoassay

Bu sıçan VEGF-A ön kaplamalı ELISA kiti (Boster Biological Tec. Pleasanton, USA) özel olarak katı fazlı bir immünoanalizdir. Sıçana ait VEGF-A'yı, VEGF-A'ya özgü bir antikor ile önceden kaplanmış 96 kuyucuklu bir şerit plaka ile ölçmek için tasarlanmıştır. Tespit antikoru VEGF-A'ya özgü biyotinlenmiş bir antikordur, yakalama antikoru fareye ait bir monoklonal antikor, saptama antikoru keçiye ait bir poliklonal antikordur. Sıçana ait VEGF-A'yı ölçmek için, kuyucuklara standartlar ve örnekler eklenir. Sonra biyotinlenmiş saptama antikoru eklenir. Kuyular PBS veya TBS tamponu ile yıkanır ve Avidin-Biyotin-Peroksidaz Kompleksi (ABC-HRP) eklenir. Bağlanmamış ABC-HRP, PBS veya TBS tamponu ile yıkanır ve TMB eklenir. TMB, HRP'nin bir substratıdır ve asidik durdurma çözeltisi ilave edildikten sonra sarıya dönüşen mavi renkli bir ürün üretmek üzere katalizlenir. Sarı ürünün yoğunluğu, numunedeki sıçan VEGF-A ile korelidir. Bir plaka okuyucu kullanarak her kuyucuktaki sarı ürünün yoğunluğu 450±2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Daha sonra numunelerdeki VEGF konsantrasyonu, numunelerin OD'sinin standart eğri ile karşılaştırılmasıyla belirlenir.

Ölçüm Aralığı: 15.6 pg/ml-1000pg/mL, Sensitivite: <1 pg/mL

Ölçüm Tekrarlanabilirliği: CV 6.6%, 7.8%, 4.3%.

VEGF ölçümü için her bir örnek bir kez çalışılmıştır.



Şekil 13: VEGF Optik Dansite Eğrisi

3.2.11.1.3 eNOS Ölçümü

Yöntem: ELISA

Test Prensipli: Sandwich-ELISA

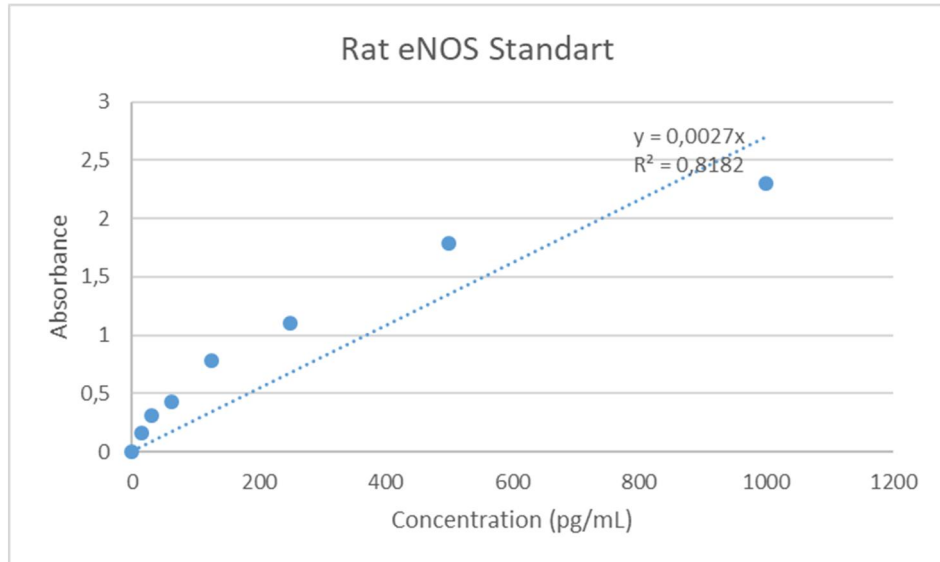
Bu kit içinde sağlanan mikro ELISA (Elabscience, Houston, Texas, U.S.A.) plakası, Rat NOS3/eNOS'a özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler mikro ELISA plaka kuyucuklarına ilave edilir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Daha sonra sıçan NOS3/eNOS ve HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikoru, her bir mikroluka kuyusuna art arda eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa ilave edilir. Sadece sıçan NOS3/eNOS biyotiniyle tespit içeren kuyular antikor ve Avidin-HRP konjugatı mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu durdurma çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk sararır. Optik yoğunluk (OD) 450±2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, sıçan NOS3/eNOS konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'sini standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki sıçan NOS3/eNOS konsantrasyonunu hesaplanır.

Ölçüm Aralığı: 15.63-1000 pg/mL

Sensitivite: 9.38 pg/mL

Ölçüm Tekrarlanabilirliği: CV <%10

eNOS ölçümü için her bir örnek bir kez çalışılmıştır.



Şekil 14: eNOS Optik Dansite Eğrisi

3.2.12 Etik Kurul Onayı ve Projelendirme

Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 14/07/2018 tarih 37/2018 protokol numaralı karar ile çalışmamıza olur vermiştir. Çalışmamız için etik onay alındıktan sonra Bilimsel Araştırma Proje saymanlığına bütçe için başvurulmuş, bütçe ve gerekli materyaller sağlandıktan sonra çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.2.13 Verilerin Değerlendirilmesi

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesi IBM SPSS programı (Versiyon 22.0) kullanılarak yapılmıştır. Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi ile verilerin normallik dağılımı incelenmiştir. p değerinin 0,05'in altında olduğunda verilerin normal dağılmadığı kabul edilmiştir. Normal dağılmayan gruplar için non-parametrik testler yapıp; n (sayı), ortanca (median), en küçük (min) ve en büyük (max) tanımlayıcı bilgileri verilmiştir. Gruplar içerisinde deney başlangıcındaki USG değerlerinin korelasyonu için Spearman's Rho testi kullanılmıştır. Deney gruplarındaki denek sayıları ve verilerin normal dağılmaması nedeniyle bağımsız değişkenlerinin karşılaştırılması için Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi uygulanmış ve ' p ' değerinin 0,05'in altında olması anlamlı kabul edilmiştir. Gözlemciler arası güvenilirlik için sınıf içi korelasyon katsayısı (Intraclass Correlation Coefficient) ile korelasyon testleri kullanılmıştır. Sınıf içi korelasyon katsayısı 5 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar 0-0,2 zayıf, 0,21-0,4 vasat, 0,41-0,6 orta, 0,61-0,8 iyi ve 0,81-1 mükemmel olarak kabul edilmiştir [142].

4. BULGULAR

Deney başlangıcında kontrol grubunun USG ölçümleri ve feda edildikten sonra HP ölçümleri tamamlanmıştır. Diğer üç grupta deney başlangıcında ve tanımlanan süreler sonunda USG ölçümleri yapılmıştır. Ardından denekler feda edilip HP ve IHK ölçümleri tamamlanıp gruplar içerisinde dokulara ait ortanca değer hesaplanmıştır (Tablo 7).

4.1 Korelasyon Analizleri

Deney başlangıcında dört grubun USG ile sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT ve böbrek RI değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer olarak sham grubu ile EE ve GE grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ($p>0,05$).

4.2 Gözlemciler Arası Güvenilirlik

Gözlemciler arası korelasyon 0,99 bulunmuştur.

Tablo 7: Tüm Grupların USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI ve BB RI				
	Kontrol	Sham	Erken Etki	Geç Etki
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)
Sağ CCA 0. Gün (mm)	0,062 (0,056-0,063)	0,062 (0,058-0,067)	0,057 (0,055-0,061)	0,060 (0,055-0,062)
Sağ CCA Son Gün (mm)	-	0,062 (0,055-0,066)	0,072 (0,069-0,072)	0,082 (0,075-0,090)
Sol CCA 0. Gün (mm)	0,060 (0,060-0,062)	0,062 (0,055-0,062)	0,060 (0,057-0,062)	0,062 (0,055-0,067)
Sol CCA Son Gün (mm)	-	0,062 (0,058-0,062)	0,070 (0,066-0,073)	0,082 (0,075-0,083)
AA 0. Gün (mm)	0,082 (0,080-0,083)	0,075 (0,070-0,078)	0,075 (0,068-0,079)	0,069 (0,063-0,075)
AA Son Gün (mm)	-	0,079 (0,075-0,083)	0,090 (0,077-0,098)	0,098 (0,085-0,110)
İA 0. Gün (mm)	0,075 (0,071-0,080)	0,069 (0,067-0,076)	0,070 (0,062-0,076)	0,063 (0,055-0,070)
İA Son Gün (mm)	-	0,070 (0,064-0,075)	0,083 (0,070-0,092)	0,090 (0,082-0,096)
Böbrek RI 0. Gün	0,54 (0,54-0,057)	0,54 (0,43-0,58)	0,52 (0,44-0,57)	0,53 (0,47-0,55)
Böbrek RI Son Gün	-	0,53 (0,43-0,60)	0,50 (0,45-0,55)	0,58 (0,50-0,64)
HİSTOPATOLOJİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI				
	Kontrol	Sham	Erken Etki	Geç Etki
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)
Sağ CCA (mm)	0,044 (0,039-0,045)	0,049 (0,043-0,057)	0,056 (0,051-0,064)	0,059 (0,052-0,084)
Sol CCA (mm)	0,037 (0,027-0,049)	0,045 (0,034-0,052)	0,057 (0,054-0,067)	0,053 (0,051-0,078)
AA (mm)	0,079 (0,065-0,082)	0,071 (0,068-0,087)	0,094 (0,074-0,105)	0,095 (0,083-0,128)
İA (mm)	0,065 (0,061-0,077)	0,058 (0,046-0,083)	0,085 (0,080-0,100)	0,088 (0,072-0,097)

4.3 Kontrol Grubu Bulguları

Birinci grup kontrol grubu olup hiçbir etkiye maruz kalmayan sıçanların normal popülasyondaki değerlerinin saptanması amacıyla oluşturulmuştur. Bu gruptaki deneklerin sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT ve böbrek RI değerleri USG ile değerlendirildikten sonra feda edilerek HP, IHK incelemeleri yapılmıştır.

4.3.1 Kontrol Grubu Tanımlayıcı Veriler

Ultrasonografik olarak ortalama sağ CCA 0,062 mm, sol CCA 0,060 mm, AA 0,082 mm ve İA 0,075 mm bulunmuştur. Böbrek RI değeri ortalama 0,54 hesaplanmıştır.

HP olarak ortalama sağ CCA 0,044 mm, sol CCA 0,037 mm, AA 0,079 mm ve İA 0,065 mm bulunmuştur (Tablo 8).

Tablo 8: Kontrol Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

KONTROL GRUBU VERİLERİ	
Ultrasonografik	
	Median (Min-Max)
Sağ CCA (mm)	0,062 (0,056-0,063)
Sol CCA (mm)	0,060 (0,060-0,062)
AA (mm)	0,082 (0,080-0,083)
İA (mm)	0,075 (0,071-0,080)
Böbrek RI	0,54 (0,54-0,057)
Histopatolojik	
	Median (Min-Max)
Sağ CCA (mm)	0,044 (0,039-0,045)
Sol CCA (mm)	0,037 (0,027-0,049)
AA (mm)	0,079 (0,065-0,082)
İA (mm)	0,065 (0,061-0,077)

4.4 Sham Grubu Bulguları

İkinci grup sham grubu olup yaşlanma, IP enjeksiyon ve el manipulasyonu gibi stres faktörlerinin IMT ve AS'ye etkisini değerlendirmek amacıyla oluşturulmuştur. Deney sonunda bir sıçanın AA görüntüleri uygun şartları sağlayamadığı için değerlendirilmemiştir. Bu gruptaki sıçanların sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT ve böbrek RI değerleri ultrasonografik olarak değerlendirildikten sonra denekler feda edilerek HP, IHK incelemeleri yapılmıştır.

4.4.1 Sham Grubu Tanımlayıcı Veriler

Deney başlangıcında USG ile ortalama sağ CCA 0,062 mm, sol CCA 0,062 mm, AA 0,075 mm ve İA 0,069 mm bulunmuştur. Böbrek RI değeri ortalama 0,54 hesaplanmıştır (Tablo 9). Deney sonunda USG ile ortalama sağ CCA 0,062 mm, sol CCA 0,062 mm, AA 0,079 mm ve İA 0,070 mm bulunmuştur. Böbrek RI değeri ortalama 0,53 hesaplanmıştır. HP olarak ortalama sağ CCA 0,049 mm, sol CCA 0,045 mm, AA 0,071 mm ve İA 0,058 mm bulunmuştur (Tablo 9).

Tablo 9: Sham Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

SHAM GRUBU VERİLERİ			
Ultrasonografik			
		Median (Min-Max)	<i>p</i>
Sağ CCA (mm)	Deney Başında	0,062 (0,058-0,067)	0,937
	Deney Sonunda	0,062 (0,055-0,066)	
Sol CCA (mm)	Deney Başında	0,062 (0,055-0,062)	0,589
	Deney Sonunda	0,062 (0,058-0,062)	
AA (mm)	Deney Başında	0,075 (0,070-0,078)	0,537
	Deney Sonunda	0,079 (0,075-0,083)	
İA (mm)	Deney Başında	0,069 (0,067-0,076)	0,937
	Deney Sonunda	0,070 (0,064-0,075)	
Böbrek RI	Deney Başında	0,54 (0,43-0,58)	0,937
	Deney Sonunda	0,53 (0,43-0,60)	
Histopatolojik			
	Median (Min-Max)		<i>p</i> (Kontrol-Sham)
Sağ CCA (mm)	0,049 (0,043-0,057)		0,095
Sol CCA (mm)	0,045 (0,034-0,052)		0,548
AA (mm)	0,071 (0,068-0,087)		0,905
İA (mm)	0,058 (0,046-0,083)		0,548

4.4.2 Sham Grubu Karşılaştırmaları

Deney başlangıcında kontrol grubu ile deney başlangıç ve sonunda sham grubundaki sıçanların USG ve HP ölçümleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Sham grubundaki deneklerin deney başlangıç ve sonunda ultrasonografik olarak ölçülen sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT'de ve böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Kontrol ve deney sonunda sham grubundaki sıçanların USG ve HP ölçülen IMT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). USG ile yapılan ölçümlerde böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 10: Kontrol ve Sham Grubu Son Gün Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI ve BB RI			
	Kontrol	Sham	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA Son Gün (mm)	0,062 (0,056-0,063)	0,062 (0,055-0,066)	0,714
Sol CCA Son Gün (mm)	0,060 (0,060-0,062)	0,062 (0,058-0,062)	0,548
AA Son Gün (mm)	0,082 (0,080-0,083)	0,079 (0,075-0,083)	0,143
İA Son Gün (mm)	0,075 (0,071-0,080)	0,070 (0,064-0,075)	0,095
Böbrek RI Son Gün	0,54 (0,54-0,057)	0,53 (0,43-0,60)	0,905
HİSTOPATOLOJİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Kontrol	Sham	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA (mm)	0,044 (0,039-0,045)	0,049 (0,043-0,057)	0,095
Sol CCA (mm)	0,037 (0,027-0,049)	0,045 (0,034-0,052)	0,548
AA (mm)	0,079 (0,065-0,082)	0,071 (0,068-0,087)	0,905
İA (mm)	0,065 (0,061-0,077)	0,058 (0,046-0,083)	0,548

Deney başlangıcında ikinci grup ile kontrol grubu arasında serum VEGF, eNOS ve ADMA miktarlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

İkinci grupta deney başlangıcında ve deney sonunda karşılaştırıldığında; deney sonunda serum VEGF miktarı istatistiksel olarak anlamlı fazla saptanmıştır ($p=0,015$). Serum eNOS ve ADMA miktarlarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Deney sonunda ikinci grup ile kontrol grubu arasında serum VEGF, eNOS ve ADMA miktarlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Deney sonunda ikinci grup ile kontrol grubu arasında sağ CCA, sol CCA, AA ve İA'da bakılan eNOS ve ET-1 miktarlarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.5 L-NAME Erken Etki Grubu Bulguları

EE grubu L-NAME'ye bağlı gelişen ED'nin erken etkilerini incelemek için oluşturulmuştur. Bu gruptaki sıçanların sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT ve böbrek RI değerleri ultrasonografik olarak değerlendirildikten sonra feda edilerek HP, IHK incelemeleri yapılmıştır.

4.5.1 L-NAME Erken Etki Grubu Tanımlayıcı Veriler

Deney başlangıcında ultrasonografik olarak ortalama sağ CCA 0,057 mm, sol CCA 0,060 mm, AA 0,075 mm ve İA 0,070 mm bulunmuştur.

Böbrek RI değeri ortalama 0,52 olarak hesaplanmıştır (Tablo 11). Deney sonunda ultrasonografik olarak ortalama sağ CCA 0,072 mm, sol CCA 0,070 mm, AA 0,090 mm ve İA 0,083 mm bulunmuştur.

Böbrek RI değeri ortalama 0,50 hesaplanmıştır. HP olarak ortalama sağ CCA 0,056 mm, sol CCA 0,057 mm, AA 0,094 mm ve İA 0,085 mm bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 11: EE Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

EE GRUBU VERİLERİ			
Ultrasonografik			
		Median (Min-Max)	<i>p</i>
Sağ CCA (mm)	Deney Başında	0,057 (0,055-0,061)	0,001
	Deney Sonunda	0,072 (0,069-0,072)	
Sol CCA (mm)	Deney Başında	0,060 (0,057-0,062)	0,001
	Deney Sonunda	0,070 (0,066-0,073)	
AA (mm)	Deney Başında	0,075 (0,068-0,079)	0,001
	Deney Sonunda	0,090 (0,077-0,098)	
İA (mm)	Deney Başında	0,070 (0,062-0,076)	0,007
	Deney Sonunda	0,083 (0,070-0,092)	
Böbrek RI	Deney Başında	0,52 (0,44-0,57)	0,535
	Deney Sonunda	0,50 (0,45-0,55)	
	Histopatolojik		
	Median (Min-Max)		
Sağ CCA (mm)	0,056 (0,051-0,064)		
Sol CCA (mm)	0,057 (0,054-0,067)		
AA (mm)	0,094 (0,074-0,105)		
İA (mm)	0,085 (0,080-0,100)		

4.5.2 L-NAME Erken Etki Grubu Karşılaştırmaları

Deney başlangıcında kontrol ile EE grubundaki sıçanların USG ölçümleri karşılaştırıldığında; kontrol grubunda EE grubuna göre AA IMT değeri istatistiksel olarak anlamlı fazla bulunmuştur ($p=0,017$). Diğer dokularda IMT ve böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 12: Kontrol ve EE Grubu İlk Gün Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI ve BB RI			
	Kontrol	Erken Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA 0. Gün (mm)	0,062 (0,056-0,063)	0,057 (0,055-0,061)	0,183
Sol CCA 0. Gün (mm)	0,060 (0,060-0,062)	0,060 (0,057-0,062)	0,667
AA 0. Gün (mm)	0,082 (0,080-0,083)	0,075 (0,068-0,079)	0,017
İA 0. Gün (mm)	0,075 (0,071-0,080)	0,070 (0,062-0,076)	0,117
Böbrek RI 0. Gün	0,54 (0,54-0,057)	0,52 (0,44-0,57)	0,267

Deney başlangıcında sham grubu ile EE grubundaki sıçanların USG ölçümleri karşılaştırıldığında; sham grubunda sağ CCA IMT istatistiksel olarak anlamlı fazla bulunmuştur. ($p=0,035$). Diğer dokuların USG ve HP ölçümleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 13: Sham ve EE Grubu İlk Gün Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI ve BB RI			
	Sham	Erken Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA 0. Gün (mm)	0,062 (0,058-0,067)	0,057 (0,055-0,061)	0,035
Sol CCA 0. Gün (mm)	0,062 (0,055-0,062)	0,060 (0,057-0,062)	0,731
AA 0. Gün (mm)	0,075 (0,070-0,078)	0,075 (0,068-0,079)	0,628
İA 0. Gün (mm)	0,069 (0,067-0,076)	0,070 (0,062-0,076)	0,731
Böbrek RI 0. Gün	0,54 (0,43-0,58)	0,52 (0,44-0,57)	0,534

EE grubundaki deneklerin deney başlangıç ve sonunda ultrasonografik olarak ölçülen sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT’de istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,007$). Böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 14: Sham ve EE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI ve BB RI			
	Sham	Erken Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA Son Gün (mm)	0,062 (0,055-0,066)	0,072 (0,069-0,072)	0,001
Sol CCA Son Gün (mm)	0,062 (0,058-0,062)	0,070 (0,066-0,073)	0,001
AA Son Gün (mm)	0,079 (0,075-0,083)	0,090 (0,077-0,098)	0,018
İA Son Gün (mm)	0,070 (0,064-0,075)	0,083 (0,070-0,092)	0,008
Böbrek RI Son Gün	0,53 (0,43-0,60)	0,50 (0,45-0,55)	0,534
HİSTOPATOLOJİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Sham	Erken Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA (mm)	0,049 (0,043-0,057)	0,056 (0,051-0,064)	0,035
Sol CCA (mm)	0,045 (0,034-0,052)	0,057 (0,054-0,067)	0,001
AA (mm)	0,071 (0,068-0,087)	0,094 (0,074-0,105)	0,014
İA (mm)	0,058 (0,046-0,083)	0,085 (0,080-0,100)	0,008

Deney sonunda sham ile EE grubundaki sıçanların USG olarak IMT değerleri karşılaştırıldığında; EE grubunda sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,018$, $p=0,08$). Böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). HP olarak EE grubunda sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,035$, $p=0,001$, $p=0,014$, $p=0,08$).

Tablo 15: Kontrol ve EE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI ve BB RI			
	Kontrol	Erken Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA Son Gün (mm)	0,062 (0,056-0,063)	0,072 (0,069-0,072)	0,017
Sol CCA Son Gün (mm)	0,060 (0,060-0,062)	0,070 (0,066-0,073)	0,017
AA Son Gün (mm)	0,082 (0,080-0,083)	0,090 (0,077-0,098)	0,267
İA Son Gün (mm)	0,075 (0,071-0,080)	0,083 (0,070-0,092)	0,267
Böbrek RI Son Gün	0,54 (0,54-0,057)	0,50 (0,45-0,55)	0,117
HİSTOPATOLOJİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Kontrol	Erken Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA (mm)	0,044 (0,039-0,045)	0,056 (0,051-0,064)	0,017
Sol CCA (mm)	0,037 (0,027-0,049)	0,057 (0,054-0,067)	0,017
AA (mm)	0,079 (0,065-0,082)	0,094 (0,074-0,105)	0,183
İA (mm)	0,065 (0,061-0,077)	0,085 (0,080-0,100)	0,017

Kontrol ile deney sonunda EE grubundaki sıçanların USG olarak IMT değerleri karşılaştırıldığında; EE grubunda sağ ve sol CCA'da istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ($p=0,017$). AA, İA IMT ve böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Kontrol ile deney sonunda EE grubundaki sıçanların HP olarak IMT değerleri karşılaştırıldığında; EE grubunda sağ CCA, sol CCA ve İA'da istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ($p=0,017$). AA IMT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Deney başlangıcında EE ile sham grubu arasında serum VEGF ve eNOS miktarlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Serum ADMA miktarı sham grubunda istatistiksel olarak anlamlı fazla saptanmıştır ($p=0,022$).

EE grubunda deney başlangıcında ve deney sonunda serum VEGF, eNOS ve ADMA miktarlarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Deney sonunda EE ile sham grubu arasında serum VEGF, eNOS ve ADMA miktarlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Deney sonunda EE ile sham grubu arasında sağ CCA, sol CCA, AA ve İA dokularında bakılan eNOS ve ET-1 miktarlarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.6 L-NAME Geç Etki Grubu Bulguları

GE grubu L-NAME'ye bağlı gelişen ED'nin geç etkilerini incelemek için oluşturulmuştur. Bu gruptaki sıçanların sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT ve böbrek RI değerleri ultrasonografik olarak değerlendirildikten sonra feda edilerek HP, IHK incelemeleri yapılmıştır.

4.6.1 L-NAME Geç Etki Grubu Tanımlayıcı Veriler

Deney başlangıcında ultrasonografik olarak ortalama sağ CCA 0,060 mm, sol CCA 0,062 mm, AA 0,069 mm ve İA 0,063 mm bulunmuştur. Böbrek RI değeri ortalama 0,53 hesaplanmıştır. Deney sonunda ultrasonografik olarak ortalama sağ CCA 0,082 mm, sol CCA 0,082 mm, AA 0,098 mm ve İA 0,090 mm bulunmuştur. Böbrek RI değeri ortalama 0,58 hesaplanmıştır. HP olarak ortalama sağ CCA 0,059 mm, sol CCA 0,053 mm, AA 0,095 mm ve İA 0,088 mm bulunmuştur.

4.6.2 L-NAME Geç Etki Grubu Karşılaştırmaları

Deney başlangıcında kontrol ile GE grubundaki sıçanların USG ölçümleri karşılaştırıldığında; kontrol grubunda L-NAME geç etki grubuna göre AA ve İA IMT istatistiksel olarak anlamlı fazlaydı ($p=0,017$). Diğer dokularda IMT ve böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 16: GE Grubu USG ve HP IMT Median (min-max) Değerleri

GE GRUBU VERİLERİ			
	Ultrasonografik		
		Median (Min-Max)	<i>p</i>
Sağ CCA (mm)	Deney Başında	0,060 (0,055-0,062)	0,001
	Deney Sonunda	0,082 (0,075-0,090)	
Sol CCA (mm)	Deney Başında	0,062 (0,055-0,067)	0,001
	Deney Sonunda	0,082 (0,075-0,083)	
AA (mm)	Deney Başında	0,069 (0,063-0,075)	0,001
	Deney Sonunda	0,098 (0,085-0,110)	
İA (mm)	Deney Başında	0,063 (0,055-0,070)	0,001
	Deney Sonunda	0,090 (0,082-0,096)	
Böbrek RI	Deney Başında	0,53 (0,47-0,55)	0,038
	Deney Sonunda	0,58 (0,50-0,64)	
	Histopatolojik		
	Median (Min-Max)		
Sağ CCA (mm)	0,059 (0,052-0,084)		
Sol CCA (mm)	0,053 (0,051-0,078)		
AA (mm)	0,095 (0,083-0,128)		
İA (mm)	0,088 (0,072-0,097)		

Tablo 17: Kontrol ve GE Grubu İlk Gün Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Kontrol	Geç Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA 0. Gün (mm)	0,062 (0,056-0,063)	0,060 (0,055-0,062)	0,517
Sol CCA 0. Gün (mm)	0,060 (0,060-0,062)	0,062 (0,055-0,067)	0,833
AA 0. Gün (mm)	0,082 (0,080-0,083)	0,069 (0,063-0,075)	0,017
İA 0. Gün (mm)	0,075 (0,071-0,080)	0,063 (0,055-0,070)	0,017
Böbrek RI 0. Gün	0,54 (0,54-0,057)	0,53 (0,47-0,55)	0,117

Deney başlangıcında sham ile GE grubundaki sıçanların USG ölçümleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 18: Sham ve GE Grubu İlk Gün Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Sham	Geç Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA 0. Gün (mm)	0,062 (0,058-0,067)	0,060 (0,055-0,062)	0,138
Sol CCA 0. Gün (mm)	0,062 (0,055-0,062)	0,062 (0,055-0,067)	0,731
AA 0. Gün (mm)	0,075 (0,070-0,078)	0,069 (0,063-0,075)	0,051
İA 0. Gün (mm)	0,069 (0,067-0,076)	0,063 (0,055-0,070)	0,073
Böbrek RI 0. Gün	0,54 (0,43-0,58)	0,53 (0,47-0,55)	0,445

GE grubundaki deneklerin deney başlangıç ve sonunda ultrasonografik olarak ölçülen sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT'de ve böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,038$).

Kontrol ile deney sonunda GE grubundaki sıçanların USG olarak IMT değerleri karşılaştırıldığında; sağ CCA, sol CCA, AA ve İA'da istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ($p=0,017$). Böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Kontrol ile deney sonunda GE grubundaki sıçanların HP olarak IMT değerleri karşılaştırıldığında; sağ CCA, sol CCA, AA ve İA'da istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,017$ $p=0,017$ $p=0,017$ $p=0,033$).

Deney sonunda sham ile GE grubundaki sıçanların USG olarak IMT değerleri karşılaştırıldığında; sağ CCA, sol CCA, AA ve İA'da istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,003$, $p=0,001$). Böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Sham ile GE grubundaki sıçanların HP olarak IMT değerleri karşılaştırıldığında; sağ CCA, sol CCA, AA ve İA'da istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,008$ $p=0,005$ $p=0,005$ $p=0,008$).

Tablo 19: Sham ve EE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Sham	Geç Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA Son Gün (mm)	0,062 (0,055-0,066)	0,082 (0,075-0,090)	0,001
Sol CCA Son Gün (mm)	0,062 (0,058-0,062)	0,082 (0,075-0,083)	0,001
AA Son Gün (mm)	0,079 (0,075-0,083)	0,098 (0,085-0,110)	0,003
İA Son Gün (mm)	0,070 (0,064-0,075)	0,090 (0,082-0,096)	0,001
Böbrek RI Son Gün	0,53 (0,43-0,60)	0,58 (0,50-0,64)	0,234
HİSTOPATOLOJİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Sham	Geç Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA (mm)	0,049 (0,043-0,057)	0,059 (0,052-0,084)	0,008
Sol CCA (mm)	0,045 (0,034-0,052)	0,053 (0,051-0,078)	0,005
AA (mm)	0,071 (0,068-0,087)	0,095 (0,083-0,128)	0,005
İA (mm)	0,058 (0,046-0,083)	0,088 (0,072-0,097)	0,008

Deney başlangıcında GE ile sham grubu arasında serum VEGF ve eNOS miktarlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Serum ADMA miktarı sham grubunda istatistiksel olarak anlamlı fazlaydı ($p=0,022$). GE grubunda deney başlangıcında ve deney sonunda serum VEGF, eNOS ve ADMA miktarlarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 20: Kontrol ve GE Grubu Son Gün USG ve HP Değerleri

ULTRASONOGRAFİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Kontrol	Geç Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA Son Gün (mm)	0,062 (0,056-0,063)	0,082 (0,075-0,090)	0,017
Sol CCA Son Gün (mm)	0,060 (0,060-0,062)	0,082 (0,075-0,083)	0,017
AA Son Gün (mm)	0,082 (0,080-0,083)	0,098 (0,085-0,110)	0,017
İA Son Gün (mm)	0,075 (0,071-0,080)	0,090 (0,082-0,096)	0,017
Böbrek RI Son Gün	0,54 (0,54-0,057)	0,58 (0,50-0,64)	0,383
HİSTOPATOLOJİK İNTİMA-MEDİA KALINLIĞI			
	Kontrol	Geç Etki	<i>p</i>
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Sağ CCA (mm)	0,044 (0,039-0,045)	0,059 (0,052-0,084)	0,017
Sol CCA (mm)	0,037 (0,027-0,049)	0,053 (0,051-0,078)	0,017
AA (mm)	0,079 (0,065-0,082)	0,095 (0,083-0,128)	0,017
İA (mm)	0,065 (0,061-0,077)	0,088 (0,072-0,097)	0,033

Deney sonunda GE ile sham grubu arasında serum VEGF, eNOS ve ADMA miktarlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Deney sonunda GE ile sham grubu arasında sağ CCA, sol CCA, AA ve İA dokularında bakılan eNOS ve ET-1 miktarlarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUC

5.1 Deney Başlangıç Verileri

Sham, EE ve GE ile kontrol gruplarının sıfıncı gün USG ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p>0,05$). Ayrıca sham grubu ile EE ve GE grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu durum, sıçanların USG ölçümlerinin deney başlangıcında farklı olmadığını göstermekte ve L-NAME gruplarında ölçülen farkın sağlanmasını yapmamıza olanak tanımaktadır.

5.2 Uygulayıcılar Arası Uyum

Gözlemciler arası korelasyon 0,99 ile mükemmel olarak bulunmuştur. İki uygulayıcı IMT ölçümleri konusunda deney hayvanlarında oldukça deneyimlidir. Bu çalışma öncesinde yapılan çalışmalarda beraber çalışmış olmaları kullanılan yöntemin oldukça standart hale gelmesini sağlamıştır. Gözlemciler arası korelasyonun oldukça yüksek bulunması tanımlanan yöntem ve yapılan ölçümlerin gözlemciler arasındaki farklılıktan etkilenmediğini göstermektedir.

5.3 Başlangıç Ultrasonografi Verileri

Deney başlangıcında dört deney grubundaki sıçanların USG ölçümleri karşılaştırıldığında;

Sham grubunda sağ CCA IMT değeri EE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fazlaydı ($p=0,035$). Sıçanların bazal değerlerini örneklemesi için oluşturduğumuz kontrol grubunda bu farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Bu farklılığı sham grubu karşılaştırmalarında olup kontrol grubu karşılaştırmalarında olmaması nedeniyle bu farklılığın deney gruplarındaki sıçan sayısının azlığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Diğer gruplar arası karşılaştırmalarda başlangıçta USG ile ölçülen sağ CCA IMT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. USG verilerinin anlamlı değişiklik göstermemesi gruplardaki sıçanların bazal değerlerinde farklılaşma olmadığını göstermektedir.

Sol CCA IMT değerlerinde sham grubu ile ilaç grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca kontrol grubu ile diğer grupların sol CCA IMT değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). USG verilerinin anlamlı değişiklik göstermemesi gruplardaki sıçanların bazal değerlerinde farklılaşma olmadığını ve tüm sıçanlardaki ölçülen doku USG özelliklerinin benzer olduğunu göstermektedir.

AA IMT değerlerinde sham grubu ile ilaç grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). USG verilerinin anlamlı değişiklik göstermemesi gruplardaki sıçanların bazal değerlerinde farklılaşma olmadığını ve tüm sıçanlardaki ölçülen doku USG özelliklerinin benzer olduğunu göstermektedir.

İA IMT değerlerinde sham grubu ile ilaç grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). USG verilerinin anlamlı değişiklik göstermemesi gruplardaki sıçanların bazal değerlerinde farklılaşma olmadığını ve tüm sıçanlardaki ölçülen doku USG özelliklerinin benzer olduğunu göstermektedir.

Sağ böbrek RI değerlerinde sham grubu ile ilaç grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca kontrol grubu ile diğer grupların böbrek RI değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). USG verilerinin anlamlı değişiklik göstermemesi gruplardaki sıçanların bazal değerlerinde farklılaşma olmadığını ve tüm sıçanlardaki ölçülen doku USG özelliklerinin benzer olduğunu göstermektedir.

5.4 Gruplar Arası Karşılaştırmalar

5.4.1 Sham Grubu Karşılaştırmalar

Sham grubundaki deneklerin deney başlangıç ve sonunda USG ile ölçülen sağ CCA, sol CCA, AA, İA IMT değerleri ve böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). HP olarak IMT değerlerinde kontrol grubu ve sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçlar deney gruplarındaki yaşlanma ve enjeksiyon gibi öngörülen ve öngörülemeyen değişkenlere bağlı ED ve AS olmadığını göstermektedir. Sham grubunda bu değişikliklerin gelişmemiş olması ilaç grubundaki değişikliklerin sadece L-NAME etkisinden kaynaklandığını açıklamaktadır.

5.4.2 Erken Etki Grubu Karşılaştırmalar

EE grubundaki deneklerin deney başlangıç ve sonunda USG ölçümleri karşılaştırıldığında; deney sonunda sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT’de istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,007$). USG ölçümleri deney sonunda sham grubuyla karşılaştırıldığında; EE grubunda tüm damar segmentlerinin IMT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,018$, $p=0,008$). Hem grup içerisinde hem de sham grubu karşılaştırmalarında bulunan bu

artış, ED'ye bağlı gelişen IMT artışının non-invaziv yöntem olan USG ile de başarılı bir şekilde gösterilebildiğini kanıtlamaktadır.

EE grubunda HP olarak sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT ölçümlerinde sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (sırasıyla $p=0,035$, $p=0,001$, $p=0,014$, $p=0,008$). USG ile saptanan tüm alanlardaki anlamlı artış, altın standart yöntem olarak kabul edilen HP ile de ispatlanmıştır. Bu sonuçlar, ED modellerindeki IMT artışının tanı ve takibinde tutarlı ve güvenilir bir yöntem olan USG'nin kullanılabileceği kanıtlamaktadır.

EE grubu içerisinde ve sham grubu karşılaştırmalarında böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Bu sonucun hipertansif etkinin kısa süreli olması ve buna bağlı gelişebilecek böbrek hasarının henüz oluşmamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

5.4.3 Geç Etki Grubu Karşılaştırmalar

GE grubundaki deneklerin deney başlangıç ve sonunda gerçekleştirilen USG ölçümleri karşılaştırıldığında; sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT'de ve sağ böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,038$). USG ölçümleri deney sonunda sham grubuyla karşılaştırıldığında; GE grubunda tüm damar segmentlerinin IMT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,003$, $p=0,001$). Hem grup içerisinde hem de sham grubu karşılaştırmalarında bulunan bu artış, ED'ye bağlı gelişen IMT artışının non-invaziv yöntem olan USG ile de başarılı bir şekilde gösterilebildiğini kanıtlamaktadır.

GE grubunda HP olarak sağ CCA, sol CCA, AA ve İA IMT ölçümlerinde sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,005$, $p=0,005$, $p=0,008$). USG ile saptanan tüm alanlardaki anlamlı artış, altın standart yöntem olarak kabul edilen HP ile de ispatlanmıştır. Bu sonuçlar, ED modellerindeki IMT artışının tanı ve takibinde tutarlı ve güvenilir bir yöntem olan USG'nin kullanılabileceği kanıtlamaktadır.

GE grubundaki deneklerin deney sonunda sağ böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ($p=0,038$). Bu sonuç, ED modellerinin takibinde böbrek RI değerinin de IMT ölçümlerine ek olarak kullanılabileceğini göstermektedir. GE grubu ile sham grubu karşılaştırmalarında ise böbrek RI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Grup içindeki bu artış sham grubu karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu sonuç denek sayısı azlığından kaynaklanmış olabilir. ED modellerinde böbrek

RI ölçümünün kullanılabilmesi için daha geniş serilerle yapılacak yeni çalışmalar gerekmektedir.

5.5 Literatür ile Karşılaştırma

Rodentlerde ED ve AS modellerinin görüntüleme yöntemleriyle tanımlandığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Park ve arkadaşları toplam 30 adet sıçan (kontrol ve kolestrol içeren diyetle beslenip L-NAME uygulanan grup) ile yaptığı çalışmada; AA, internal İA ve pudental arter dokuları HP olarak incelenmiştir [143]. Kolestrollü diyetle beslenip iki hafta boyunca L-NAME uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı intimal kalınlaşma ve aterosklerotik değişiklikler saptanmıştır.[143] Bizim çalışmamız ise normal diyet ve bir hafta L-NAME uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. Park ve arkadaşlarının AA dokusunda saptadığı bulgular ile çalışmamızın verileri benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda daha kısa süre L-NAME uygulanıp benzer sonuçlar bulunmuştur. Bununla birlikte bizim çalışmamızda ek olarak sağ ve sol CCA IMT artışının gösterilmesi ve GE grubunda böbrek RI artışının saptanması daha kapsamlı bir değerlendirme sunmaktadır. Böbreklerdeki RI değerinin USG ile değerlendirmesi ED sıçan modelinde “end organ” bulgularının da tanımlanması açısından bir ilktir. Park ve arkadaşları invaziv bir değerlendirme olan HP yöntemini kullanmışlardır. Bizim çalışmamız ise non-invaziv bir değerlendirme olan USG ölçümleri ile ED tanısına odaklanmaktadır. Damar uzun aksında ED değerlendirmeniz gereken deney modellemelerinde HP değerlendirme her zaman mümkün ve uygun olmayabilir. ED değerlendirmesi için non-invaziv alternatif bir yöntem önermesi bizim çalışmamızın bir diğer üstünlüğüdür.

Hua-ting Wang ve arkadaşları 27 adet fare üzerinde AS modeli çalışmıştır. Bu deneklerde HP olarak AA ve CCA dokularında AS gösterilmiştir. Vevo 770 görüntüleme sisteminin 30 MHz’lik probu ile CCA’da FMD yöntemiyle ED gösterilmiştir [144]. Bizim çalışmamızda kullanılan cihaz Vevo 2100 USG sistemi olup daha yeni nesildir ve çözünürlüğü daha gelişmiştir. Hua-ting Wang ve arkadaşlarının kullandığı FMD yöntemi, ölçüm düzeneği laboratuvarımızda mevcut olmadığı için kullanılmamıştır. Öte yandan FMD ile değerlendirme, direkt USG ile IMT ölçümüne göre daha uzun ve zahmetlidir. Bizim çalışmamız pratik, hızlı ve non-invaziv bir değerlendirme alternatifi üzerine yoğunlaşması sebebiyle direkt IMT değerlendirmesini ön planda tutmuştur.

Çalışmamızda USG ve HP olarak IMT ölçümlerini karşılaştırdığımızda; USG ölçümlerinin HP ölçümlere kıyasla daha yüksek çıktığı görülmüştür. Bu bulgu literatür ile

benzerdir. Gan ve arkadaşları bu duruma doku fiksasyon aşamasındaki teknik yöntemlerin neden olduğunu göstermiştir [145].

Razuvaev ve arkadaşlarının Vevo 2100 USG Biyomikroskopi Cihazı ve 30-70 MHz'lik MS700 probunu kullandıkları çalışmada 93 sıçanın CCA dokularında hasarlanma oluşturmuşlardır. Damar hasarının gösterilmesinde sıklıkla kullanılan IHK yöntemlerine alternatif olarak USG ile de intimal hiperplazinin saptanabilir olduğunu gösterilmiştir [146]. Bizim çalışmamızda da Razuvaev ve arkadaşlarının kullandığı Vevo 2100 USG cihazı kullanılmıştır. Benzer şekilde HP ve USG değerleri kendi içlerinde karşılaştırılıp, altın standart olan HP verilerinin USG ile uyumluluğu ortaya konmuştur. Çoğu modelde çalışılan CCA, AA ve İA'da IMT ölçümlerine ek olarak böbrek RI değerinin ED ve AS modellerinde de kullanılabileceği çalışmamızın getirdiği bir yeniliktir. USG ile bulunan böbrek RI artışının , biyokimyasal ve IHK yöntemleriyle gösterilememiş olması çalışmamızın bir kısıtlılığıdır. Bunun sebebi deney verilerinin değerlendirme aşamasının pandemi dönemine denk gelmesi olabilir. Pandemi sebebiyle rutin işleyişin yavaşlaması, laboratuvara ulaşımında yaşanan zorluklar, örneklerin toplanması ve değerlendirmesi arasındaki zamanın uzaması HP sonuçlarını etkilemiş olabilir. Böbrek RI ile ED ve AS süreçleri arasındaki direk ilişkinin HP olarak da gösterilmesi için daha geniş kapsamlı ve daha fazla denek ile yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

İnsanlarda böbrek RI ölçümü, hipertansiyon ve AS'nin “end organ” hasarını göstermede oldukça başarılıdır [147]. Ayrıca böbrek RI ölçümü hayvan deneylerinde üreteropelvik bileşke darlık modellerinde kullanılmaktadır. Karakus ve arkadaşları 30 Wistar Albino sıçan üzerinde böbrek RI değeri ve üreteropelvik bileşke darlıklarında böbrek hasarı üzerine çalışmıştır [148]. Bu çalışma, böbrek hasarı durumunda RI değerlerinin arttığını ve böbrek fonksiyonu tanısında RI ölçümünün kullanılabileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamız da benzer sıçan türünde yapılmıştır. GE grubunda böbrek RI değeri artmıştır. RI artışı olan böbrekler HP olarak incelenememiştir ancak HP ve USG yöntemleriyle ispatlanan ED durumunda böbrek RI değeri artışının gösterilmesi çalışmamızın eşsiz bir bulgusudur. Bu sonuç ED ve AS sıçan modellerinde literatüre yenilik getirmektedir.

Choi ve arkadaşları; Vevo 770 Yüksek Çözünürlüklü USG Biyomikroskopi cihazını kullanarak, 35 sıçan üzerinde intimal kalınlık çalışmışlardır. Normal, hipertansif ve kolestrollü diyetle beslenen hipertansif üç grubun sağ CCA dokuları HP ve USG ile incelenmiştir [149]. Bu çalışmadaki hipertansif gruplarda, HP olarak intimal kalınlık ve IMT'nin kontrol grubuna

göre yüksek olduğu ve bu yüksekliğin USG ile ölçülen IMT ile anlamlı ilişkide olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda Choi ve arkadaşlarının tanımladığı sağ CCA'ya ek olarak sol CCA, AA ve İA dokularında da IMT artışı gösterilmiştir. Çalışmamızda AS sürecindeki erken değişikliklerden olan IMT artışının farklı dokularda gösterilmesi, sıçanlardaki ED ve AS modellenmesine büyük katkıda bulunmaktadır. Bu bulgulara ek olarak GE grubunda saptanan sağ böbrek RI değerindeki artış ile hipertansiyonun böbrek üzerindeki erken etkisinin gösterilebileceğini saptamıştır. Böbrek RI artışı, AS modellerinde damar IMT ölçümü ile birlikte kullanılabilir.

Ochodnik ve arkadaşlarının hipertansif sıçanlar üzerine yaptığı çalışma, hipertansiyona bağlı oluşan böbrek hasarını öngörmede böbrek interlobar arterlerin ve mezenterik arterlerin HP olarak kullanılabileceğini göstermiştir [150]. Bizim çalışmamızda ED modelinde böbrek RI artışı saptanmıştır. Bu sonuç, böbrek RI'nın ED'ye bağlı gelişebilecek böbrek “end organ” hasarının erken belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda böbrek dokusunun HP olarak değerlendirilmemesi bir kısıtlılıktır ve bu konuda daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.6 Serum ve Doku Immünohistokimya Karşılaştırmaları

Deney başlangıcı ve sonunda sham ile kontrol grubu arasında serum VEGF, eNOS ve ADMA; sağ CCA, sol CCA, AA ve İA dokularında eNOS ve ET-1 miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar sham ile kontrol grubunun benzer değerlere sahip olduğu ve sham grubunda deney sürecinde ED gelişmediğini göstermektedir. Sham grubunda deney sonunda VEGF miktarında anlamlı artış saptanmıştır ($p=0,015$). Bu artış bazı kan örneklerinde meydana gelen pıhtılaşma gibi teknik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Kan örneklerinin uygun şekilde korunamaması ise daha önce de belirttiğimiz gibi HP ve biyokimyasal değerlendirmelerin pandemi sebebiyle yaşanan kısıtlılıklardan etkilenmiş olmasıdır.

L-NAME sıçan modellerinde ADMA'nın arttığı gösterilmiştir. ADMA artışının gösterilmesinde yüksek performanslı sıvı kromatografi gibi yöntemler gerekmektedir [151]. Bizim çalışmamızda deney başlangıcındaki serum ADMA miktarı sham grubunda, EE ve GE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fazla saptanmıştır ($p=0,022$). Ayrıca EE ve GE gruplarında ADMA artışı saptanmamıştır. Bu sonuçların kan örneklerinde meydana gelen pıhtılaşma gibi teknik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Kan örneklerinin uygun

şekilde korunamamasının nedeni ise daha önce de belirttiğimiz gibi HP ve biyokimyasal değerlendirmelerin pandemi sebebiyle yaşanan kısıtlılıklardan etkilenmiş olmasıdır.

L-NAME, eNOS üzerinden etki göstererek NO'yu azaltır. NO'nun serumda saptanmasında direk ölçümünün yanında nitrit ve nitrat gibi metabolitlerinin ölçümü gerekmektedir [152]. Dokulardaki eNOS miktarı ve NO salınımındaki azalma vücudun farklı bölgelerindeki damar dokularında farklı seviyelerde olmaktadır ve NO ölçümü ileri teknikler gerektirmektedir [153]. Kij ve arkadaşlarının L-NAME ile yaptığı çalışmada NO'daki azalma aort dokusunda gösterilmiş ancak akciğer damarlarında gösterilememiştir [153]. Bizim çalışmamızda serum ve dokularda NO azalmasının gösterilememesine pandemi dönemindeki tanımlanan kısıtlılıkların neden olduğu düşünülmüştür. Ayrıca serum ve doku saklama koşulları gibi teknik yetersizliklerden kaynaklanan sorunlar sonuçları etkilemektedir. Tüm bu kısıtlılıklara karşı, USG ölçümlerinin tutarlı ve tekrarlanabilir olması bu tür sorunlara bağlı hataları ortadan kaldırmakta oldukça yararlıdır.

Literatürde özellikle diabetik sıçanlarda çalışılan ve endotel hücresi çoğalmasında önemli rolü olan VEGF ile L-NAME arasında doğrudan bir ilişki bulunmamaktadır [154]. Bizim çalışmamızda da L-NAME kullanılan EE ve GE gruplarında, literatürle uyumlu olarak, artış saptanmamıştır.

L-NAME verilen sıçanların damarlarında ET-1 arttığı bilinmektedir. Sohn ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, altı hafta L-NAME uygulanan sıçanların AA'sında HP olarak IMT artışına ek olarak ET-1'in arttığı gösterilmiştir [155]. Bizim çalışmamızda herhangi bir grupta anlamlı ET-1 değişikliği saptanmamıştır. Bu uyumsuzluğun, çalışmamızda L-NAME uygulama süresinin diğer çalışmalara göre daha kısa olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Biyokimyasal ve IHK yöntemleriyle gösterilemeyen ED gelişimi altın standart olan HP ile gösterilmiştir. Biyokimya ve IHK yöntemlerinden üstün olarak USG ED gelişimini non-invaziv ve tutarlı bir şekilde saptamıştır. Bu sonuçlar ED modeli için farklı bir L-NAME modeli uygulamasını bile mümkün kılmaktadır.

5.7 Çalışmanın Üstünlükleri

Bu çalışma ile literatüre ek olarak, ED ve AS'nin USG ile saptanabilirliğini göstermek için farklı damar bölgeleri kapsamlı olarak değerlendirilmiş ve ultrasonografik ED modeli oluşturulmaya çalışılmıştır. Çalışmamız göstermiştir ki; ED'nin belirteci olan IMT değerlendirmesi için non-invaziv bir yöntem olan USG doğru, yeterli ve tutarlı sonuçlar

sunmaktadır. Bu durum HP ya da biyokimyasal değerlendirme gibi invaziv işlemlere olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır.

Çalışmamızın en güçlü yanlarından biri olan böbrek RI değerlendirmesi literatürde bir ilk olup ED ve AS sıçan modellerinde yeni bir tanı ve takip yöntemi sunmaktadır. ED tanısında böbrek RI değerinin de kullanılabilir olduğunun gösterilmesi çalışmamızı diğer çalışmalardan ayırmaktadır. RI değeri değişimi ilaç gruplarında farklılık göstermiş olup bu etkinin süre bağımlı olduğu düşünülmüştür. Böbrek değerlendirmesi üzerine daha geniş seriler ile yapılacak ek çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

5.8 Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır;

- Çalışmamızda 23 sıçan kullanılmış olup sonuçların doğruluğunu artırmak için daha fazla denek ile yapılmış çalışmalara ihtiyaç vardır. Literatürde yapılan deney hayvanı çalışmalarında benzer kısıtlılık olması ve etik kurallar nedeniyle deneyin mümkün olan en az hayvan ile planlanması gerekliliği bu kısıtlılığımızın değiştirilemeyeceğini farketmiştir.
- Deney yapılan merkezdeki sıçanların cinsiyetinin dişi olması ve bu deneklerde cinsiyete bağlı hormonal etkilerin incelenememiş olması bir başka kısıtlılıktır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, ED ve AS'nin cinsiyetten etkilenebilmekle birlikte aşırı farklılık göstermemesi bu kısıtlılığımızı önemsiz kılmaktadır.
- Çalışmamızın özgün olduğu sonuçlardan biri olan böbrek RI değerinin HP karşılığı olan değerlendirmeler yapılamamış olması bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekliliğini doğurmuştur.
- Biyokimyasal ve histolojik yöntemler ile ED tanısının gösterilmesinde eksiklikler yaşanmıştır. Bu durum ilgili laboratuvarın pandemi sürecinde personel ve malzeme tedarikinde yaşadığı zorluklara bağlı gelişmiştir. Ayrıca başlamış olan deneyin pandemi sürecine denk gelen kısımlarında, biyokimyasal testleri uygulayacak araştırmacının laboratuvara ulaşması zorlaşmış ve bazı kan örneklerinde pıhtılaşma meydana gelmiştir.
- L-NAME'in oluşturduğu hipertansiyon, gerekli alet olmadığı için ölçülememiş olup, AS ile hipertansiyon ilişkisi değerlendirilememiştir.

5.9 Sonuç

Teknolojik gelişmelere eşlik eden USG'deki yüksek çözünürlük sayesinde dünya çapında mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biri olan AS hakkında yapılan hayvan deneylerinin değeri artmaktadır.

Günümüzde hayvan deneylerinde en çok kullanılan türlerden biri olan sıçanlarda ED ve AS modellerinin tanı ve takibinde non-invaziv bir tanı yöntemi olan USG oldukça başarılı ve tutarlı sonuçlar vermektedir.

Çalışmamız, ED oluşturulan sıçanlarda AS belirteci olan IMT artışının, farklı anatomik bölgelerdeki damarlarda USG ile saptanabileceğini göstermiştir. ED ve AS modellerinde böbrek RI değerinin kullanılması ümit veren bir yeniliktir ve bu konuda daha geniş serilerle yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Topol, E.J. and R.M. Califf, *Textbook of cardiovascular medicine*. 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
2. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. New England Journal of Medicine, 1987. **316**(22): p. 1371-1375.
3. Stry, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2462-78.
4. Schwartz, S.M., D. deBlois, and E.R. O'Brien, *The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis*. Circ Res, 1995. **77**(3): p. 445-65.
5. Fuster, V., Lewis A. Conner Memorial Lecture. *Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 2126-2146.
6. Fuster, V., *Elucidation off the role of plaque instability and rupture in acute coronary events*. The American journal of cardiology, 1995. **76**(9): p. 24C-33C.
7. Hennekens, C.H. and J.M. Gaziano, *Antioxidants and heart disease: epidemiology and clinical evidence*. Clin Cardiol, 1993. **16**(4 Suppl 1): p. I10-3; discussion I13-5.
8. Baradaran, A., *Lipoprotein(a), type 2 diabetes and nephropathy; the mystery continues*. J Nephrothol, 2012. **1**(3): p. 126-9.
9. Stry, H.C., et al., *A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1992. **85**(1): p. 391-405.
10. Stry, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
11. Playford, D.A. and G.F. Watts, *Special article: non-invasive measurement of endothelial function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1998. **25**(7-8): p. 640-3.
12. Takase, B., et al., *Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease*. Am J Cardiol, 1998. **82**(12): p. 1535-9, a7-8.
13. Schroeder, S., et al., *Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilation as a screening test for coronary artery disease: pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging*. Am Heart J, 1999. **138**(4 Pt 1): p. 731-9.
14. Faulx, M.D., A.T. Wright, and B.D. Hoit, *Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning*. Am Heart J, 2003. **145**(6): p. 943-51.
15. Woo, K., et al., *Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening*. International journal of obesity, 2004. **28**(7): p. 852-857.
16. Järvisalo, M.J., et al., *Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2943-2947.
17. Xiangdong, L., et al., *Animal models for the atherosclerosis research: a review*. Protein & cell, 2011. **2**(3): p. 189-201.
18. John, L.C.S. and F.P. Bell, *Arterial lipid biochemistry in the spontaneously hyperlipidemic Zucker rat and its similarity to early atherogenesis*. Atherosclerosis, 1991. **86**(2): p. 139-144.
19. Joris, I., et al., *Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats*. The American journal of pathology, 1983. **113**(3): p. 341.
20. Furfine, E.S., et al., *Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-nitroarginine*. Biochemistry, 1993. **32**(33): p. 8512-7.

21. Toda, N., et al., *Modulation of opioid actions by nitric oxide signaling*. Anesthesiology, 2009. **110**(1): p. 166-81.
22. Paulis, L., et al., *Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor*. Hypertens Res, 2008. **31**(4): p. 793-803.
23. Kauser, K., et al., *Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(5): p. H1679-85.
24. Khayyal, M.T., et al., *Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (Olea europaea) in L-NAME induced hypertension in rats*. Arzneimittelforschung, 2002. **52**(11): p. 797-802.
25. Pechanova, O., et al., *Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension*. J Hypertens, 2004. **22**(8): p. 1551-9.
26. Fuster, V., *Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges. Presented at the 71st scientific sessions of the American Heart Association. Dallas, Texas*. Circulation, 1999. **99**(9): p. 1132-7.
27. Onat, A., *Risk factors and cardiovascular disease in Turkey*. Atherosclerosis, 2001. **156**(1): p. 1-10.
28. HİPOTİROİDİZM, S., *SUBKLİNİK HİPOTİROİDİZM VE ATEROSKLEROZ*. DENEYSEL BİYOLJİ DERGİSİ, 2004: p. 41.
29. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis*. New England journal of medicine, 1976. **295**(7): p. 369-377.
30. Ross, R. and J. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. The New England journal of medicine, 1976. **295**(8): p. 420.
31. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis—an update*. New England Journal of Medicine, 1986. **314**(8): p. 488-500.
32. Moncada, S., et al., *Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium*. Thromb Res, 1977. **11**(3): p. 323-44.
33. Renkin, E., *Multiple pathways of capillary permeability*. Circulation research, 1977. **41**(6): p. 735-743.
34. Ross, R., *Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry*. The American journal of pathology, 1993. **143**(4): p. 987.
35. Reddy, K.G., et al., *Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis*. Journal of the American College of Cardiology, 1994. **23**(4): p. 833-843.
36. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes*. New England journal of medicine, 1992. **326**(5): p. 310-318.
37. Osborn, L., et al., *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes*. Cell, 1989. **59**(6): p. 1203-1211.
38. Steinberg, D., *Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis*. Circulation, 1987. **76**(3): p. 508-14.
39. Rajavashisth, T., et al., *Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2702-10.
40. Sary, H., *Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults*. Arteriosclerosis (Dallas, Tex.), 1989. **9**(1 Suppl): p. I19-32.
41. Sary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2462-2478.
42. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-809.
43. Nagai, R., et al., *Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **947**: p. 56-66; discussion 66-7.

44. Couffinhal, T., et al., *Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries*. The American journal of pathology, 1997. **150**(5): p. 1673.
45. Ramos, M.A., et al., *Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1998. **18**(7): p. 1188-1196.
46. Doherty, T.M., et al., *Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11201-6.
47. *National Cholesterol Education Program. Second Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II)*. Circulation, 1994. **89**(3): p. 1333-445.
48. Ibañez, B., J.J. Badimon, and M.J. Garcia, *Diagnosis of atherosclerosis by imaging*. The American journal of medicine, 2009. **122**(1): p. S15-S25.
49. Hausleiter, J., et al., *Prevalence of noncalcified coronary plaques by 64-slice computed tomography in patients with an intermediate risk for significant coronary artery disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. **48**(2): p. 312-318.
50. Pasterkamp, G., et al., *Techniques characterizing the coronary atherosclerotic plaque: influence on clinical decision making?* Journal of the American College of Cardiology, 2000. **36**(1): p. 13-21.
51. Yuan, C. and W.S. Kerwin, *MRI of atherosclerosis*. Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2004. **19**(6): p. 710-719.
52. Rose, S.C. and T.R. Nelson, *Ultrasonographic modalities to assess vascular anatomy and disease*. Journal of vascular and interventional radiology, 2004. **15**(1): p. 25-38.
53. Seçil, M., *Temel ultrasonografi ve Doppler*. Meta Basım Matbaacılık, 2008.
54. Corti, R., et al., *New understanding of atherosclerosis (clinically and experimentally) with evolving MRI technology in vivo*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. **947**(1): p. 181-198.
55. Komiyama, N., et al., *Tissue characterization of atherosclerotic plaques by intravascular ultrasound radiofrequency signal analysis: an in vitro study of human coronary arteries*. American heart journal, 2000. **140**(4): p. 565-574.
56. Nissen, S.E. and P. Yock, *Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications*. Circulation, 2001. **103**(4): p. 604-616.
57. Rodriguez-Granillo, G.A., et al., *In vivo intravascular ultrasound-derived thin-cap fibroatheroma detection using ultrasound radiofrequency data analysis*. Journal of the American College of Cardiology, 2005. **46**(11): p. 2038-2042.
58. Rodriguez-Granillo, G.A., et al., *Global characterization of coronary plaque rupture phenotype using three-vessel intravascular ultrasound radiofrequency data analysis*. European heart journal, 2006. **27**(16): p. 1921-1927.
59. MacNeill, B.D., et al., *Intravascular modalities for detection of vulnerable plaque: current status*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2003. **23**(8): p. 1333-1342.
60. Luscher, T.F., L. Raij, and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats*. Hypertension, 1987. **9**(2): p. 157-63.
61. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 61-74.
62. Yang, Y. and J. Loscalzo, *Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide*. Circulation, 2000. **101**(18): p. 2144-8.
63. Ibrahim, M.A., A. Geddawy, and S. Abdel-Wahab, *Sitagliptin prevents isoproterenol-induced myocardial infarction in rats by modulating nitric oxide synthase enzymes*. Eur J Pharmacol, 2018. **829**: p. 63-69.

64. ALADAĞ, M.A., Y. TÜRKÖZ, and İ.H. ÖZEROL, *Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri*. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2000. **20**(2): p. 107-111.
65. Forstermann, U., et al., *Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(9): p. 1321-32.
66. Tsai, E.J. and D.A. Kass, *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. Pharmacol Ther, 2009. **122**(3): p. 216-38.
67. Ozturk, E., et al., *Nitric oxide levels and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Turkish women with idiopathic recurrent miscarriage*. J Turk Ger Gynecol Assoc, 2011. **12**(4): p. 234-8.
68. Behrendt, D. and P. Ganz, *Endothelial function: from vascular biology to clinical applications*. The American journal of cardiology, 2002. **90**(10): p. L40-L48.
69. Gkaliagkousi, E., et al., *Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2015. **17**(11): p. 85.
70. Bacon, P., et al., *Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic diseases*. Autoimmunity reviews, 2002. **1**(6): p. 338-347.
71. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-1295.
72. Schächinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1899-1906.
73. Suwaidi, J.A., et al., *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction*. Circulation, 2000. **101**(9): p. 948-54.
74. Raitakari, O.T. and D.S. Celermajer, *Testing for endothelial dysfunction*. Ann Med, 2000. **32**(5): p. 293-304.
75. Wang, J., et al., *Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997. **24**(6): p. 418-20.
76. Huggins, G.S., et al., *Effects of short-term treatment of hyperlipidemia on coronary vasodilator function and myocardial perfusion in regions having substantial impairment of baseline dilator reverse*. Circulation, 1998. **98**(13): p. 1291-6.
77. Pravenec, M., et al., *Genetic analysis of cardiovascular risk factor clustering in spontaneous hypertension*. Folia biologica, 2000. **46**(6): p. 233-240.
78. Intengan, H.D., J.B. Park, and E.L. Schiffrin, *Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: role of endothelin*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 907-13.
79. Gardiner, S.M., et al., *Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats*. Eur J Pharmacol, 1992. **213**(3): p. 449-51.
80. Oyar, O. and U.K. Gülsoy, *Tıbbi görüntüleme fiziği*. 2003: SDÜ Tıp Fakültesi.
81. Tuncel, E., *Klinik radyoloji*. 2002: Nobel ve Güneş Tıp Kitabevleri.
82. SEÇİL, M., *Doppler ultrasonografi fiziği*. TRD temel radyoloji fiziği: p. 189-191.
83. Zwiebel, W.J. and J.S. Pellerito, *Introduction to vascular ultrasonography*. 2005: Elsevier Saunders Philadelphia.
84. Litwin, M., et al., *Intima-media thickness and arterial elasticity in hypertensive children: controlled study*. Pediatric nephrology, 2004. **19**(7): p. 767-774.
85. Cuomo, S., et al., *Increased carotid intima-media thickness in children-adolescents, and young adults with a parental history of premature myocardial infarction*. European heart journal, 2002. **23**(17): p. 1345-1350.
86. Gaeta, G., et al., *Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(12): p. 840-846.

87. Megnien, J.-L., et al., *Evidence of carotid artery wall hypertrophy in homozygous homocystinuria*. *Circulation*, 1998. **98**(21): p. 2276-2281.
88. Mitsnefes, M.M., et al., *Abnormal carotid artery structure and function in children and adolescents with successful renal transplantation*. *Circulation*, 2004. **110**(1): p. 97-101.
89. Wiegman, A., et al., *Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolaemia*. *The Lancet*, 2004. **363**(9406): p. 369-370.
90. Craven, T., et al., *Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. A case-control study*. *Circulation*, 1990. **82**(4): p. 1230-1242.
91. Geroulakos, G., et al., *Carotid intima-media thickness: correlation with the British Regional Heart Study risk score*. *Journal of internal medicine*, 1994. **235**(5): p. 431-433.
92. Anderson, E.A. and A.L. Mark, *Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans*. *Circulation*, 1989. **79**(1): p. 93-100.
93. Berry, K.L., R.A. Skyrme-Jones, and I.T. Meredith, *Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation*. *Clin Sci (Lond)*, 2000. **99**(4): p. 261-7.
94. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
95. Celermajer, D.S., et al., *Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction*. *J Am Coll Cardiol*, 1994. **24**(6): p. 1468-74.
96. Woodman, R.J., et al., *Improved analysis of brachial artery ultrasound using a novel edge-detection software system*. *J Appl Physiol* (1985), 2001. **91**(2): p. 929-37.
97. Bressler, B., S. Chan, and G.B. Mancini, *Temporal response of brachial artery dilation after occlusion and nitroglycerin*. *Am J Cardiol*, 2000. **85**(3): p. 396-400, a10.
98. van der Heijden-Spek, J.J., et al., *Effect of age on brachial artery wall properties differs from the aorta and is gender dependent: a population study*. *Hypertension*, 2000. **35**(2): p. 637-42.
99. Pignoli, P., et al., *Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging*. *Circulation*, 1986. **74**(6): p. 1399-406.
100. Hurst, R.T., et al., *Clinical use of carotid intima-media thickness: review of the literature*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2007. **20**(7): p. 907-14.
101. Qu, B. and T. Qu, *Causes of changes in carotid intima-media thickness: a literature review*. *Cardiovascular ultrasound*, 2015. **13**(1): p. 46.
102. Seçil, M., et al., *Automated measurement of intima-media thickness of carotid arteries in ultrasonography by computer software*. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 2005. **11**(2): p. 105.
103. Polak, J.F., et al., *Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(3): p. 213-21.
104. Den Ruijter, H.M., et al., *Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis*. *Jama*, 2012. **308**(8): p. 796-803.
105. Corrales, A., et al., *Cardiovascular risk stratification in rheumatic diseases: carotid ultrasound is more sensitive than Coronary Artery Calcification Score to detect subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis*. *Annals of the rheumatic diseases*, 2013. **72**(11): p. 1764-1770.
106. Roxana, O., et al., *Imaging atherosclerosis by carotid intima-media thickness in vivo: how to, where and in whom?* *Maedica*, 2012. **7**(2): p. 153.
107. Morris, E., et al., *High resolution ultrasound assessment of the carotid artery: its relevance in postmenopausal women and the effects of tibolone on carotid artery ultrastructure*. *Climacteric*, 1999. **2**(1): p. 13-20.
108. Eikendal, A.L., et al., *Common carotid intima-media thickness relates to cardiovascular events in adults aged < 45 years*. *Hypertension*, 2015. **65**(4): p. 707-713.

109. Kerkhof, G.F., et al., *Does preterm birth influence cardiovascular risk in early adulthood?* The Journal of pediatrics, 2012. **161**(3): p. 390-396. e1.
110. Han, L., et al., *Gender differences in the relationship between age-related carotid intima-media thickness and cardiac diastolic function in a healthy Chinese population.* Journal of cardiac failure, 2013. **19**(5): p. 325-332.
111. Ghouri, N., et al., *An investigation of two-dimensional ultrasound carotid plaque presence and intima media thickness in middle-aged South Asian and European men living in the United Kingdom.* PloS one, 2015. **10**(4).
112. Dengel, D.R., et al., *Gender differences in vascular function and insulin sensitivity in young adults.* Clinical science, 2011. **120**(4): p. 153-160.
113. Ishihara, K.K., et al., *Effect of plasma fibrinogen, high-sensitive C-reactive protein, and cigarette smoking on carotid atherosclerosis: the Suita study.* Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2015. **24**(10): p. 2385-2389.
114. Zyriax, B.-C., et al., *Association between alcohol consumption and carotid intima-media thickness in a healthy population: data of the STRATEGY study (Stress, Atherosclerosis and ECG Study).* European journal of clinical nutrition, 2010. **64**(10): p. 1199-1206.
115. Ranadive, S.M., et al., *Aerobic Exercise Training and Arterial Changes in African Americans versus Caucasians.* Med Sci Sports Exerc, 2016. **48**(1): p. 90-7.
116. Fearheller, D.L., et al., *Effects of moderate aerobic exercise training on vascular health and blood pressure in african americans.* The Journal of Clinical Hypertension, 2014. **16**(7): p. 504-510.
117. Acevedo, M., et al., *Cardiovascular risk factors among young subjects with high carotid intima media thickness.* Revista medica de Chile, 2011. **139**(10): p. 1322-1329.
118. Breton, C.V., et al., *Carotid artery intima-media thickness in college students: race/ethnicity matters.* Atherosclerosis, 2011. **217**(2): p. 441-446.
119. Ayer, J.G., et al., *HDL-cholesterol, blood pressure, and asymmetric dimethylarginine are significantly associated with arterial wall thickness in children.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2009. **29**(6): p. 943-949.
120. Geraci, G., et al., *Relationship Between Carotid Atherosclerosis and Pulse Pressure with Renal Hemodynamics in Hypertensive Patients.* Am J Hypertens, 2016. **29**(4): p. 519-27.
121. Bosevski, M., L. Georgievska-Ismail, and S. Tosev, *Carotid IMT, in type 2 diabetic patients: a survey on factors of influence.* Prilozi, 2011. **32**(2): p. 289-97.
122. Lee, S.H., et al., *Implications of nocturnal hypertension in children and adolescents with type 1 diabetes.* Diabetes care, 2011. **34**(10): p. 2180-2185.
123. Juhola, J., et al., *Combined effects of child and adult elevated blood pressure on subclinical atherosclerosis: the International Childhood Cardiovascular Cohort Consortium.* Circulation, 2013. **128**(3): p. 217-224.
124. Li, Y., et al., *The association between within-visit blood pressure variability and carotid artery atherosclerosis in general population.* PLoS One, 2014. **9**(5).
125. Chen, Y., et al., *Relationship of short-term blood pressure variability with carotid intima-media thickness in hypertensive patients.* Biomedical engineering online, 2015. **14**(1): p. 71.
126. Dratva, J., et al., *Early detection of subjects at risk for vascular remodelling: results from the Swiss population-based study SAPALDIA.* Swiss medical weekly, 2014. **144**: p. w14052.
127. Järvisalo, M.J., et al., *Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes.* Circulation, 2004. **109**(14): p. 1750-1755.
128. Atabek, M., et al., *Relation of serum leptin and insulin-like growth factor-1 levels to intima-media thickness and functions of common carotid artery in children and adolescents with type 1 diabetes.* Acta Paediatrica, 2004. **93**(8): p. 1052-1057.

129. Spring, B., et al., *Healthy lifestyle change and subclinical atherosclerosis in young adults: Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study*. *Circulation*, 2014. **130**(1): p. 10-17.
130. Giannini, C., et al., *Influence of the Mediterranean diet on carotid intima-media thickness in hypercholesterolaemic children: a 12-month intervention study*. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2014. **24**(1): p. 75-82.
131. Narverud, I., et al., *Markers of atherosclerotic development in children with familial hypercholesterolemia: a literature review*. *Atherosclerosis*, 2014. **235**(2): p. 299-309.
132. Dessein, P.H., et al., *Rheumatoid arthritis is associated with reduced adiposity but not with unfavorable major cardiovascular risk factor profiles and enhanced carotid atherosclerosis in black Africans from a developing population: a cross-sectional study*. *Arthritis research & therapy*, 2013. **15**(4): p. R96.
133. Burgess, J.L., et al., *Risk factors for subclinical atherosclerosis in firefighters*. *Journal of occupational and environmental medicine*, 2012. **54**(3): p. 328-335.
134. Lopes-Virella, M.F., et al., *Levels of oxidized LDL and advanced glycation end products-modified LDL in circulating immune complexes are strongly associated with increased levels of carotid intima-media thickness and its progression in type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2011. **60**(2): p. 582-589.
135. Hunt, K.J., et al., *Oxidized LDL and AGE-LDL in circulating immune complexes strongly predict progression of carotid artery IMT in type 1 diabetes*. *Atherosclerosis*, 2013. **231**(2): p. 315-322.
136. Paim, L.R., et al., *Oxidized low-density lipoprotein, matrix-metalloproteinase-8 and carotid atherosclerosis in spinal cord injured subjects*. *Atherosclerosis*, 2013. **231**(2): p. 341-345.
137. Kim, C.S., et al., *Can increased visceral adiposity without body weight changes accelerate carotid atherosclerosis in South Korean participants with type 2 diabetes? J Diabetes Complications*, 2015. **29**(8): p. 1085-91.
138. Eller, N.H. and B. Netterstrom, *The intima media thickness and coronary risk factors*. *International angiology*, 2001. **20**(2): p. 118.
139. Gruszfeld, D., et al., *Protein intake in infancy and carotid intima media thickness at 5 years-a secondary analysis from a randomized trial*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2015. **66**(1): p. 51-59.
140. Klop, B., et al., *Erythrocyte-bound apolipoprotein B in relation to atherosclerosis, serum lipids and ABO blood group*. *PLoS One*, 2013. **8**(9).
141. Calmarza, P., et al., *Different apolipoprotein E polymorphisms are not associated with different carotid intima-media thickness values in a sample of Spanish general population*. 2015.
142. Aktürk, Z. and H. Acemoğlu, *Tıbbi araştırmalarda güvenilirlik ve geçerlilik*. *Dicle Tıp Dergisi*, 2012. **39**(2): p. 316-319.
143. Park, K., et al., *Initial validation of a novel rat model of vasculogenic erectile dysfunction with generalized atherosclerosis*. *International journal of impotence research*, 2005. **17**(5): p. 424-430.
144. Wang, H.-t., et al., *Guidelines for assessing mouse endothelial function via ultrasound imaging: a report from the International Society of Cardiovascular Translational Research*. *Journal of cardiovascular translational research*, 2015. **8**(2): p. 89-95.
145. Gan, L.-m., et al., *Non-invasive real-time imaging of atherosclerosis in mice using ultrasound biomicroscopy*. *Atherosclerosis*, 2007. **190**(2): p. 313-320.
146. Razuvaev, A., et al., *Noninvasive real-time imaging of intima thickness after rat carotid artery balloon injury using ultrasound biomicroscopy*. *Atherosclerosis*, 2008. **199**(2): p. 310-316.
147. Pontremoli, R., et al., *Increased renal resistive index in patients with essential hypertension: a marker of target organ damage*. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 1999. **14**(2): p. 360-365.

148. Karakus, S., et al., *The effect of enalapril on renal resistive index, urine electrolyte levels and tgf- β 1 levels of kidney tissues in rats with unilateral partial ureteropelvic junction obstruction*. European Journal of Pediatric Surgery, 2011. **21**(06): p. 356-361.
149. Choi, Y.-S., et al., *Measurement of the intimal thickness of the carotid artery: comparison between 40 MHz ultrasound and histology in rats*. Ultrasound in medicine & biology, 2009. **35**(6): p. 962-966.
150. Ochodnický, P., et al., *Renal vascular dysfunction precedes the development of renal damage in the hypertensive Fawn-Hooded rat*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2010. **298**(3): p. F625-F633.
151. Cheng, M.-C., et al., *Renoprotective effects of melatonin in young spontaneously hypertensive rats with L-NAME*. Pediatrics & Neonatology, 2014. **55**(3): p. 189-195.
152. Kij, A., et al., *Simultaneous quantification of PGI₂ and TXA₂ metabolites in plasma and urine in NO-deficient mice by a novel UHPLC/MS/MS method*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2016. **129**: p. 148-154.
153. Smeda, M., et al., *Breast cancer pulmonary metastasis is increased in mice undertaking spontaneous physical training in the running wheel; a call for revising beneficial effects of exercise on cancer progression*. American Journal of Cancer Research, 2017. **7**(9): p. 1926.
154. Khazaei, M., et al., *The effect of L-arginine and L-NAME on myocardial capillary density in normal rats*. Advanced Biomedical Research, 2013. **2**.
155. Sohn, E.J., et al., *Effect of methanol extract of Sorbus cortex in a rat model of L-NAME-induced atherosclerosis*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(7): p. 1239-43.