TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SAĞLIKLI GÖNÜLLÜLERDE FARKLI MANŞON OKLÜZYON POZİSYONLARININ AKIMA BAĞLI DİLATASYON ÖLÇÜMLERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Çiğdem KOCA

KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa KILIÇKAP

Ankara
2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr. Çiğdem Koca	**Tarih:** 31/ 07 / 2014
Anabilim/Bilim Dalı	: Kardiyoloji ABD	
Tez Danışmanı	: Prof.Dr.Mustafa Kılıçkap	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı: Sağlıklı Gönüllülerde Manşon Pozisyonunun Akıma Bağlı Dilatasyon Ölçümlerine Etkisi

Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi

Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı

Unvanı, Adı, Soyadı

Prof.Dr. Nail Çağlar
Kardiyoloji Anabilim Bilim Dalı
Başkan Vekili

Jüri Üyesi(Tez Danışmanı)

Unvanı, Adı, Soyadı

Prof.Dr.Mustafa Kılıçkap
Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi

Unvanı, Adı, Soyadı

Doç.Dr.Telat Keleş
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Kardiyoloji uzmanlık eğitimimde destekleri ve ilgileri ile önemli katkıları olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Çetin EROL ve tüm Kardiyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmanın keyfine vardığım, yardımları ve desteklerine minnettar olduğum değerli asistan arkadaşlarım, hemşire, sağlık görevlisi, teknisyen ve sekreterlere de teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında ve bundan da öte kardiyoloji uzmanlık eğitimimde, akademik perspektifi, klinik bakış açısı ve sabırlı eğitmenliği ile çok şey borçlu olduğum değerli hocam, Prof. Dr. Mustafa KILIÇKAP'a minnettarlığımın küçük bir kısmını gösteren teşekkürlerimi sunuyorum. Akıma bağlı dilatasyon ölçümlerini gerçekleştirebilmemde, güleryüzlü ve sabırlı desteğini benden esirgememiş Doç. Dr. Cansın TULUNAY KAYA'ya içtenlikle teşekkür ediyorum. Sevgili çalışma hemşiremiz Selda YILDIRIM'ın desteği ve ilgisi olmasaydı bu çalışmanın sürdürülebilmesi oldukça güç olurdu. Selda Yıldırım ve onun yardımlarının da katkısıyla çalışmamda gönüllü olmuş tüm Ankara Üniversitesi Kardiyoloji ve Geriatri çalışanları ve değerli intörn arkadaşlarıma da içtenlikle teşekkür ederim.

Uluslararası Yaz Okulu (ISSS) insiyatifi bünyesinde beraber çalışma fırsatı bulduğum değerli Prof.Dr. Ljuba BACHAROVA, Prof.Dr. Galen WAGNER, Prof.Dr. Gulmira KUDAİBERDİEVA'ya ilham verici bilimsel destekleri için minnettarım.

İyi bir hekim ama daha önemlisi iyi bir insan olma çabamda, anne ve babamın nadir rastlanan zihinsel açıklıklarıyla, sahip olduğum özgürlük, saygı ve neşeden oluşan ve aldığım ilk nefesimden beri yararlanmakta olduğum o karışımla beni destekledikleri için bana katkılarına, kelimelerle ifade edilemeyecek denli minnettarım. Sevgili kardeşim Gizem KOCA ve teyzem Yasemin GÖDEKOĞLU da hem hayatta hem de bu zorlu tez maceramda destekleri ile her zaman yanımdaydılar. Hekimlik ve tüm hayat yolunda, güleryüzlü, sabırlı, sevgi dolu dostlukları ile beni yalnız bırakmayan sevgili Erkil Onur TARI, Dr.İrem ŞERİFOĞLU, Dr.Türkan Seda TAN KÜRKLÜ de teşekkürü hak ediyorlar. Tüm uzmanlık sürecimde benimle

beraber çaba gösteren ve desteklerini esirgemeyen değerli öğretim üyelerine, asistan arkadaşlarıma, Ana Bilim Dalımız çalışanlarına, aileme ve tüm dostlarıma teşekkürü borç bilirim.

Dr. Çiğdem KOCA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY i

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iv

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ vi

ŞEKİLLER DİZİNİ viii

TABLOLAR DİZİNİ ix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. ATEROSKLEROZ VE ÖNEMİ 3

2.1.1. Ateroskleroz: Sıklığı ve Klinik Önemi 3

2.1.2. Ateroskleroz: Patofizyoloji 4

2.1.3. Ateroskleroz: Klinik 7

2.1.4. Ateroskleroz: Endotel Disfonksiyonunun Rolü 10

2.1.5. Endotel Disfonksiyonunun Belirlenmesi 14

2.2. AKIMA BAĞLI DİLATASYON (ABD) 17

2.2.1. Akıma Bağlı Dilatasyon: Klinik Uygulamalar 18

2.2.2. Akıma Bağlı Dilatasyon: Mekanizma 23

2.2.3. Akıma Bağlı Dilatasyon: Teknik 31

3. GEREÇ VE YÖNTEM 42

3.1. Çalışmaya Hasta Alımı 42

3.2. Akıma Bağlı Dilatasyon 42

3.3. İstatistiksel Analiz 44

4. BULGULAR 45

4.1. Genel Özellikler 45
4.2. Akıma Bağlı Dilatasyon ile İlgili Ölçümler 46
4.3. Proksimal ve Distal ABD Değerlerinin Karşılaştırılması 48
5. TARTIŞMA 50
6. SONUÇLAR 57
ÖZET 58
SUMMARY 59
KAYNAKLAR 60

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABD	Akıma Bağlı Dilatasyon
AF	Atriyal fibrilasyon
BH4	Tetrahidro-L-biyopterin
BT	Bilgisayarlı Tomografi
B-mod	2 boyutlu parlaklık modu (*2-dimensional brightness mode)*
Ca^{++}	Kalsiyum iyonu
CaM	Kalmodulin
Ca^{++}-CaM	Kalsiyum kalmodulin kompleksi
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	Siklik guanilaz monofosfat
COX	Siklooksijenaz
CRP	C-reaktif protein
DKB	Diyastolik kan basıncı
DM	Diyabetes mellitus
EDHF	Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör
EDRF	Endotel aracılıklı relakse edici faktör
EKG	Elektrokardiyografi
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononükleodid
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HL	Hiperlipidemi
HT	Hipertansiyon
IMK	İntima media kalınlığı
iNOS	İndükte edilebilir nitrik asit sentetaz
IVUS	İntravasküler ultrasonografi
K^{+}	Potasyom iyonu
KAH	Koroner arter hastalığı
LAD	Sol ön inen koroner arter

LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
L – NMMA	N^G- Monometil L- arjinin
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MHz	Megahertz
MI	Miyokard infarktüsü
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO	Nitrik oksit
NTG	Nitrogliserin
OCT	Optikal koherans tomografi
PAT	Periferik arteriyal tonometri
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PGI_2	Prostasiklin
PW Dopler	Pulse wave dopler
SD	Standart deviasyon/sapma
SKB	Sistolik kan basıncı
TEA	Tetraetil- amonyum
TGF – β	Dönüştürücü büyüme faktörü β
t_{max}	Oklüzyon sonrası maksimum çapa ulaşma süresi
VCAM – 1	Vasküler hücre adezyon molekülü – 1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VKİ	Vücut kitle indeksi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. ABD ölçümü için dikkate alınması gereken temel faktörler..... 32

Şekil 2. Brakiyal arter çapının zamana göre değişimi..... 47

TABLOLAR DİZİNİ

Safya No:

Tablo 1. Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerin genel özellikleri 45

Tablo 2. Proksimal ve distal oklüzyon pozisyonlarında bazal çap, bazal akım ve maksimum çapa ulaşma sürelerinin karşılaştırılması..... 46

Tablo 3. Rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili modelde kullanılan parametreler için elde edilen ortalama ABD değerleri 48

Tablo 4. Rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model kullanılarak elde edilen kestirim değerleri..... 49

1. GİRİŞ

Ateroskleroz ve ilişkili klinik durumlar tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (1, 2). Kardiyovasküler hastalıklar açısından tanımlanan pek çok risk faktörünün önlenebilir oluşu, bu önemli toplum sağlığı sorununda koruyucu sağlık önlemleri alınmasının önemini ortaya koyar. İyi bilinen diyabetes mellitus (DM), hipertansiyon (HT), hiperlipidemi (HL), sigara kullanımı ve aile hikâyesi gibi risk faktörleri, ateroskleroz ve koroner arter hastalığı gelişimini öngördürücü olmakla birlikte, sürecin başlangıcının tespit edilmesinde ve klinik durumlar oluşmadan önce önlem alınmasını yönlendirmede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle klinik olayların çok öncesinde başlayan aterosklerotik süreci belirleyebilmek, önleyici tedavinin daha yoğun uygulanması gereken bireylerin tanınmasını sağlayacaktır.

Aterosklerotik süreç çok erken yaşlarda başlar. Pek çok farklı etkenin ortak sonucunda, ortaya çıkan ilk patolojik olay endotel disfonksiyonudur (3). Endotel disfonksiyonunun belirlenmesi için kullanılan farklı yöntemler mevcuttur (4). Çoğu yaygın klinik kullanıma henüz girememiş olan bu yöntemlerden en iyi bilineni akıma bağlı dilatasyon (ABD- *flow mediated dilatation, FMD*) yöntemidir (5). 1992 yılında Celermajer ve arkadaşları tarafından tanımlandıktan sonra ABD yönteminin mekanizması, tekniği ve klinik olaylarla ilişkisine dair pek çok çalışma yürütülmüştür (5). Ancak hâlihazırda literatürde birbiriyle çelişen sonuçları ve farklı uygulamaları olması nedeni ile yöntemin bulunuşundan sonra geçmiş olan 20 yılda halen ABD, klinik uygulamalarda yaygın olarak yer bulamamıştır.

ABD yöntemi, konduit arterlerde oklüzyon oluşturularak bunu takiben gelişen akım ve shear stres artışının endotel aracılığıyla arterde oluşturacağı vazodilatasyon cevabının değerlendirilmesine dayanır (5). Seçilecek konduit arter, meydana getirilecek oklüzyon, kullanılacak görüntüleme yöntemi ve uygulanışı, bireylerin çalışmaya alınışı, verilerin elde edilişi ve yorumlanışı çalışmalar arasında farklılık gösterdiği için halen standart bir uygulama metodu geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

ABD çalışmaları ve sonuçlarındaki farklılığın, tekniğin uygulamasında, veri toplanmasında ve yorumlanmasındaki çeşitlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir.

Corretti ve arkadaşları ilk olarak 2002 yılında ABD uygulaması için standart oluşturmak amacıyla bir kılavuz yayınlamışlardır (6). Bunu takip eden yıllarda, pek çok yeni metodolojik ve klinik çalışma yapılmış, ABD yöntemi ile ilgili bilgiler artmış ve uygulama için yeni öneriler yapılmıştır (7). Ancak halen, ABD metodolojisine ilişkin kontrollü çalışmalar yapılarak, metodun standardilize edilmesi gereklidir. Bu nedenle, bu çalışmada oklüzyon pozisyonunun ABD verileri üzerine olan etkisinin incelenerek, metodolojiye dair önemli bir noktanın aydınlatılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz ve Önemi

2.1.1. Ateroskleroz: Sıklığı ve Klinik Önemi

Ateroskleroz damar duvarındaki inflamasyon ve lipid hücre birikimi ile izlenen, gelişimi hayatın erken döneminde başlayan ve uzun bir latent dönem sonrasında klinik sonuçların gözlendiği patolofizyolojik bir tanımdır. Yaşam süresince sessizce gelişen ateroskleroz, semptomların ortaya çıkışında genellikle oldukça ileri evrededir (1). Ateroskleroz, klinik olarak koroner arter hastalığı, serebral arter hastalığı ve periferik arter hastalığı ve ilişkili durumlar olarak karşımıza çıkar. Aterosklerotik sürecin yol açtığı bu klinik durumlar kardiyovasküler hastalıklar başlığında incelenir. Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Dünya sağlık örgütü verilerine göre, 2008 yılında tüm dünyada gerçekleşen 57 milyon ölümün 17.3 milyonundan (%30) kardiyovasküler hastalıklar sorumludur (2). Beklenen yaşam süresinin uzaması ile dünya nüfusunun yaşlanması sonucunda kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklı ölümlerin 2030 yılında 6 milyon artış göstereceği öngörülmektedir (8).

Kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet kaynaklı ölümlerin %80'i, bu hastalıkların gelişmiş ülkelerde sık olduğuna dair eski kanının aksine, düşük-orta gelirli ülkelerde izlenmektedir (1). Toplumda işgücü açısından önemli bir kesim olan 70 yaş altındaki bireylerde ölümlerin %39'undan kardiyovasküler hastalıklar sorumludur (1). Dünya ölçeğinde değerlendirildiğinde kardiyovasküler hastalıklar sebep oldukları morbidite ve mortalite oranları ile ekonomik olarak hem işgücünde önemli bir kayba yol açmakta, hem sağlık harcamalarında önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu iki faktörün etkileri, kardiyovasküler hastalıkların giderek daha sık görüldüğü (Afrika bölgesi dışında yer alan) düşük ve orta gelirli ülkelerde çok daha ciddi ekonomik sonuçlara yol açmaktadır (1). Aterosklerotik süreç başladıktan sonra gösterdiği ilerleme tanımlanmış olan kardiyovasküler risk faktörleri ile yakın ilişki içerisindedir (9). Hepsi önlenebilir olan sigara kullanımı, fiziksel inaktivite ve sağlıksız diyet alışkanlıkları kardiyovasküler nedenlerden kaynaklanan ölümlerin %80'inden sorumludur (1). Bunların yanı sıra, hipertansiyon, dislipidemi ve diyabet

de ateroskleroz sürecinin ivmelenmesinde önemli risk faktörleridir (4). Bu hastalıkların önlenebilir doğası, yol açtıkları önemli sonuçlar da dikkate alındığında tedavi ile birlikte erken tanı ve uygun koruyucu önlemlerin alınmasının öneminin altını çizmektedir. Geçtiğimiz son iki yüzyılda kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan ölüm oranları gelişmiş ülkelerde belirgin şekilde azalmıştır (2). Gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan mortalitenin azalmasının nedenlerine ışık tutabilecek, İngiltere ve Wales bölgesindeki epidemiyolojik verilerinden derlenen bir makalede; tedavideki gelişmelerin payı %42 (%11 sekonder koruma, %13 kalp yetmezliğinin etkin tedavisi, %8 akut miyokard infarktüsünün başlangıç tedavisi ve %3 hipertansiyonun etkin tedavisi) iken toplumdaki risk faktörlerinin kontrol altına alınmasının payı %58 (%48 sigara içiminin azaltılması, %9.5 hipertansiyonun kontrolü, %9.5 hiperlipideminin tedavisi) olarak belirlenmiştir (10). Düşük ve orta gelirli ülkeler de bu önemli sağlık sorunu için benzer önlemleri almak durumundadır.

Dünya ölçeğinde önemli morbidite ve mortalite nedeni olan kardiyovasküler hastalıklar ile ilgili etkin tedavi ve koruma için öncelikle aterosklerotik sürecin başlangıcı ve ilerleyişini bilmek, klinik olarak aşikâr evreye geçmeden hastalığı tanımak ve uygun önlemleri alabilmek gereklidir. Risk faktörlerine devamlı maruziyetin ateroskleroz sürecinin ilerlemesinde etkisi göz önüne alınarak bireylerin temsil ettikleri risk grubuna göre alınacak önlemlerle klinik sonuçların gelişiminden korunması önerilen yaklaşımdır (4). Kardiyovasküler hastalıklarla ilgili önemli ilerleme kaydetmiş olan ülkelerden öğrendiklerimiz, hastalık klinik olarak aşikâr olmadan önce yapılan toplum temelli koruma stratejilerinin bu önemli sağlık sorunu ile mücadelede daha yararlı olacağını göstermiştir.

2.1.2. Ateroskleroz: Patofizyoloji

Ateroskleroz, izlerine Mısır'daki mumyalarda da rastlanmış olan insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır. Vücutta aterosklerotik sürecin klinik olarak bulgu vermeden çok önce başladığı da artık bilinmektedir. On beş ila 34 yaş arasında başka nedenlerle gerçekleşmiş olan ölümler sonrası yapılan post-mortem analizlerden elde edilen veriler doğrultusunda; 15-19 yaş grubunda dahi tüm

bireylerde aortada fibroz-yağlı çizgilenme ve %50 oranında sağ koroner arterde aterosklerotik lezyon varlığı gösterilmiştir (11). Hatta 15-19 yaş grubunda aortada %7, sağ koroner arterde %12 oranında komplike lezyona rastlanmış; lezyon progresyonunun yaş, sigara kullanımı, dislipidemi, obezite, diyabet/ prediyabet ve hipertansiyonla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (6). Orta ve ileri yaşlarda klinik bulgu vermekle beraber, aterosklerotik süreç hemen tüm bireylerde ergenlik döneminde başlamaktadır.

Ateroskleroz sürecini başlatan etmenler çoğunlukla gözlemsel çalışmalar ve hayvan deneylerinden elde edilmiş olan sonuçlar ile belirlenmeye çalışılmış ise de, son yıllarda inflamasyonun öneminin de anlaşılması ile ateroskleroz patofizyolojisine dair öngörülerimiz artmıştır. Daha önceleri lipid birikimine bağlı olduğu düşünülmekte olan aterosklerozun, damar duvarında yol açtığı stenozdan farklı mekanizmalarla da klinik sendromlara yol açan bir inflamatuar süreç olduğu anlaşılmıştır (12,13). Ateroskleroz ilişkili klinik sendromların çoğundan plak yırtılması veya erozyonunun sorumlu olması, akut koroner sendromlarda genellikle birden fazla ülsere plak ile inflamasyon belirteçlerinin yüksek seviyelerde izlenmesi patofizyolojik açıdan damar lümenindeki daralma yüzdesinden ziyade inflamasyonun rolünün daha önemli olduğunu düşündürmektedir (8).

Aterosklerotik plak; cinsiyet, etnisite ve yaşanan bölgeden bağımsız olarak tüm dünyadaki bireylerde benzer patofizyolojik mekanizma ile gelişim gösterir (14). Ancak plakların ilerleme hızı risk faktörleri ile bağlantılı olarak farklı olabilmektedir. Hipertansiyon, dislipidemi, obezite ve sigara kullanımı gibi bilinen risk faktörlerine sahip bireylerde plak gelişimi daha hızlı olabilmektedir (9). Ateroskleroz tanı ve tedavisinde yeni bir belirteç olarak gündeme gelen micro-RNA 155 aktivitesinin plak gelişim hızı üzerine etkili olabileceği düşünülmekle beraber, henüz kesin rolü belirlenememiştir (15). Plak gelişim hızından daha önemli olarak değerlendirilen plak karakterini ise ön planda inflamasyonun belirlediği ve "hassas plak" aracılığı ile klinik sendromlara yol açtığı bilinmektedir (7).

Arter duvarında bulunan endotel, düz kas hücreleri ile ekstraselüler matriksin oluşturduğu; tunica intima, tunica media ve tunica adventitia aterosklerotik plak gelişiminde de farklı roller alır (16). Ateroskleroz gelişimini başlatan olay lipoprotein

parçacıklarının damarın intimaya tabakasına geçişi ve burada birikmesidir (11). LDL molekülleri, intimada yer alan proteoglikanlara bağlanarak hem daha uzun süre intimal tabakada kalırken hem de oksidatif ve diğer kimyasal değişimlere daha duyarlı hale gelirler (11). Fokal intimal lipid birikimi, LDL'nin burada geçirdiği modifikasyonun da etkisi ile fosfolipid salınması ve hemodinamik stresin mevcut olduğu noktalarda endotelin aktive olması sonucunu doğurur. Bu sayede arter duvarında inflamasyon döngüsü başlatılmış olur (13). İnflamasyonun başladığı arter bölgesine ilk ulaşan hücre plateletlerdir ve yüzey glikoproteinleri aracılığı ile endotel aktivasyonuna katkıda bulunarak, endotelin lökosit adezyon molekülleri oluşturmasına sebep olurlar (8). Hiperkolesteroleminin kendisi de endotelde vasküler hücre adezyon molekülü -1 (VCAM-1) miktarını arttırır (8). Bunun sonucunda; normal koşullarda lökositlerin intimaya geçişine izin vermeyen endotelin lipid birikiminin izlendiği bölgelerde lökosit adezyonunu sağladığı görülür (11). İnflamasyon gelişimi olan arter bölgesine ulaşan T hücre ve monositlerin adezyon sonrası migrasyonları da, aktive olmuş endotel ve düz kas hücrelerinin salgıladığı kemoatraktan moleküller ile gerçekleşir (8, 11).

İntimaya ulaşan monositlerin makrofajlara farklılaşması ateroskleroz patogenezinin önemli basamaklarından birini teşkil eder. Oksidize olmuş LDL moleküllerini fagosite etme amacı ile intimaya geçen makrofajlar; fagosite etmiş oldukları lipid moleküllerini hücreden uzaklaştırmada başarılı olamazlarsa, sitoplazmada bu moleküllerin birikimi sonucu köpük hücrelere dönüşürler (8, 11). Makrofajlar lipid fagositozu için klasik LDL reseptörünü değil, inflamatuar süreçte farklı etkinlikleri de olduğu düşünülen çöpçü (scavenger) reseptörünü kullanırlar. (8,11,12) Köpük hücrelere dönüşen makrofajlar, aterosklerotik plaklarda bulunan makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) aracılığı ile bölünüp çoğalmaya başlarlar (11). Bu aşamada oluşmuş olan lezyon, kompleks aterosklerotik plağın fibrozis, trombozis, kalsifikasyon gibi özelliklerini göstermeyen "yağlı çizgilenme"dir (11). Henüz mikroskopik düzeyde olan bu erken değişimler gerileyebilir. Aterosklerozun ekstraselüler lipid havuzları oluşup, lezyondaki hücreselliğin azalmasının ardından ilerlediği düşünülmektedir (9).

İntimaya ulaşan özel bir monosit grubu da dendritik hücrelere dönüşerek, T hücrelerine antijen sunar ve doğuştan gelen immünitenin yanı sıra edinilmiş

immünitenin de sürece dâhil olmasına neden olur (17). Dendritik hücrelerin T hücrelere sunduğu antijenler arasında, ısı-şok proteinleri, plazma lipoproteinleri ve muhtemelen bazı mikroorganizmalara ait proteinler vardır (12). T hücrelerin de uyarılması ve salgıladıkları mediatörler aracılığıyla inflamasyon daha da artar ve hümoral immunite de sürece dâhil olur (12).

Aterom plağı oluşumundaki olayların başlangıcında belirgin etkisi olmasa da, lezyonların ilerlemesinde arter duvarındaki düz kas hücrelerinin de önemli rolü vardır. Aktive makrofajlardan salınan ve insan aterosklerotik plağında yoğun olarak bulunan platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) düz kas hücreleri için kemoatraktandır ve hücreleri intimal tabakaya çeker. Düz kas hücreleri intimaya geçtiklerinde morfolojik olarak farklı, daha az matür hücrelere dönüşürler ve bölünmeye başlarlar (11). Bölünme ile beraber apoptoz da gerçekleşir ve plağın ilerlemesi, düz kas hücrelerinin bu iki farklı davranışı arasındaki dengeye göre şekillenir (11).

Normal vasküler biyolojide arter duvarındaki ekstraselüler matriksin yapım ve yıkımından; denge halinde kalmasından sorumlu olan düz kas hücreleri; aterosklerotik plaklardaki artmış ekstraselüler matriksin de oluşumundan sorumludur (11). PDGF, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF-β) gibi uyaranlar aracılığı ile düz kas hücreleri artmış kolajen ve ekstraselüler matriks üretirler (11). Bu da oluşmuş bir aterosklerotik plaktaki az miktarda hücre ile fazla miktardaki ekstraselüler matriks oranına yol açan etmenlerden biridir. Düz kas hücrelerinin normal koşullarda da ekstraselüler matriks yıkımı için kullandıkları metalloproteinazlar ise, aterosklerotik süreçte; düz kas hücrelerinin intimaya göçlerinde ve arter duvarının pozitif yeniden şekillenmesi, anevrizma gelişiminde rol oynarlar (11).

Aterosklerotik plak gelişimi ilerledikçe, plak içinde anjiogenez ve kalsifikasyon da gözlenebilir. Plak içindeki anjiogenez ve ince cidarlı damar yapıları plak içi kanamaya yol açabilir (11).

2.1.3. Ateroskleroz: Klinik

Kronik, sistemik tutulumlu ve uzun bir latent periyodu olan ateroskleroz, klinik sonuçlarını genellikle fokal gelişen komplikasyonlar ile gösterir.

Aterosklerotik lezyonlar, klinik olarak kronik veya akut tablolarla bulgu verebilirler. Her iki tabloda da plak benzer patofizyolojik gelişim göstermesine karşın, trombüs oluşumuna yol açan mekanizmalar akut koroner sendromlara yol açarken, lüminal daralma ve damar duvarında yeniden şekillenmenin eşlik ettiği durumlar kronik koroner arter hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Trombüs gelişiminin eşlik ettiği akut tablolara yol açan lezyonların çoğunun, lümende %50'den az daralma yapan, ince fibröz başlıklı "hassas plaklar" olduğunu ve altta yatan temel mekanizmaların; plak yırtılması, erozyonu ile daha az oranda plak içine kanama, kalsifik nodül varlığı olduğunu biliyoruz. Plak içeriğindeki düz kas hücrelerinin bölünme ve ekstraselüler matriks salgılama davranışları da sabit bir hızla ilerlemekten ziyade yaşam boyunca dalgalanmalar göstererek gerçekleşmekte ve bu da plak içeriği/hassasiyetine etki etmektedir (11). Kronik tablolara yol açan lezyonlar ise, zamanla progrese olmakta, klinik olarak bulgu veren veya vermeyen plak yırtılmalarını takiben trombüs oluşumu ve iyileşme süreçleri ile ilerlemektedir. Pek çok yeni görüntüleme yöntemi de, bize aterosklerotik hastalık yükünün lüminal daralmaya yol açan plaklardan çok plak içeriği ile tanımlanması gerektiğini göstermektedir (12). Tüm bu bilgiler ışığında koroner arter hastalığının tedavisinin yalnızca revaskülarizasyonla sınırlanamayacağı, inflamasyon aracılıklı bu patolojide plak gelişim mekanizmaları üzerinde etkili tedavilere ihtiyacımız olduğu son yıllarda gündeme gelmiştir (12).

Aterosklerotik lezyonlar toplumda bu kadar yaygın görülmekte iken, koruyucu sağlık önlemleri Geoffrey Rose'un tanımlamış olduğu gibi iki farklı kola ayrılabilir: tüm bireyleri kapsayan toplum temelli önlemler ve kardiyovasküler hastalık tanısı almış veya henüz asemptomatik olan ancak kardiyovasküler hastalıklar için yüksek riskli bireylere yönelik yüksek-riskli grup için önlemler (1). Yapılan çalışmalar bu iki yöntemin birlikte kullanımı ile en yüksek başarının elde edileceğini göstermektedir. (1) Bilinen kardiyovasküler hastalığı olan bireyler, yeni olay gelişimi açısından hâlihazırda yüksek riskli iken, asemptomatik bireylere uygun tedavi ve risk faktör modifikasyonu yapılabilmesi için kardiyovasküler risk yüzdelerinin (belirli bir zaman aralığında kardiyovasküler hastalık yaşama olasılığı) hesaplanması; birey için gerekli olandan az veya çok tedavi verilmesini önleyebilmek için geliştirilmiş bir stratejidir (1). 1996 yılında düzenlenen 27. Bethesda Konferansından bu yana, önleyici kardiyoloji ile ilgilenen tüm gruplar, toplum sağlığı için alınan önlemler

dışında kliniğe başvurmuş olan bireylerde risk analizi yapılmasını önermektedir. Bireylere uygun risk modifikasyonu yapılması, gerekli tedavilerin başlanması ve uygun aralıklarla yeniden risk değerlendirilmesi gibi birincil korumaya yönelik önlemlerin risk analizi sonuçlarına göre şekillendirilmesi günümüzde kabul gören yaklaşımdır (18).

Risk faktör analizleri, kronik aterosklerotik süreci ve uzun dönemli riski belirlemede toplum ölçeğinde yararlı olsa da akut koroner sendromlar, ani ölüm gibi tabloların gelişimini öngördürücülükleri sınırlı kalmaktadır (19). Kardiyovasküler olayların çoğu, risk faktör analizlerinin "orta riskli" olarak belirlediği grupta gerçekleşmektedir. Hastanın ani ölüm, akut koroner sendrom gibi klinikle başvurmasında, hassas plak, hassas miyokard ve hassas dolaşımın etkin olduğu düşünülmektedir (20). Hassas plak; bir kısmı halen deneysel olan optikal koherans tomografi (OCT), intravasküler ultrasonografi (IVUS), arterioskopi, termografi, floro-deoksiglukoz pozitron emisyon tomografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi yöntemlerle belirlenen ve plak yırtılması, erozyonu sonucunda trombüs gelişimine eğilimli olan plakları tanımlamak için kullanılmaktadır (15). Bu plakların, yoğun inflamasyon gösterdiği, ince fibröz başlık ve bol lipid içeriklerinin olduğu, üzerindeki endotelin hasarlanmış veya plağın başlığının yırtılmış olduğu, bazılarının da ciddi stenoza yol açtığı belirlenmiştir (15). Hassas miyokard, altta yatan farklı nedenler dolayısı ile (kardiyomiyopati, otonomik disregülasyon, iskemi, kanalopatiler gibi) ölümcül aritmi veya iskemik hasara daha duyarlı olan miyokardı tanımlamak için kullanılmaktadır (14). Hassas dolaşım ise sistemik inflamasyon belirteçlerini taşıyan ve trombojenitesi altta yatan farklı mekanizmalarla artmış kan akımını tanımlanmaktadır (14). Tüm bu faktörlerin bir araya gelmesi de "hassas hasta"yı oluşturmakta ancak bu grup risk faktör analizlerinde kesin olarak belirlenememektedir (14). Risk faktör analizleri toplum temelli yaklaşımda değerli olmaya devam etmesine karşın, son yıllarda gelişen bir kavram olan "hassas hasta"yı tanıyabilmek, kısa dönemde kardiyovasküler olay yaşayabilecek bireyleri belirleyip, uygun önlemleri almada yararlı olacaktır.

Risk faktörlerinin damar duvarına etkilerine karşı organizmanın geliştireceği yanıtı belirleyen önemli faktörlerden biri endotel fonksiyonlarıdır (21). Aterosklerotik sürecin gelişiminde temel mekanizmalardan biri olan endotel

disfonksiyonu, yakın takip ve tedaviye aday bireylerin belirlenmesi için risk analizine ek olarak kullanılabilecek bir belirteç olabilir. Endotel disfonksiyonunun hem aterosklerozu başlatan hem de ilerlemesinde, akut klinik tablolara yol açmasında rol alan bir mekanizma oluşu; özellikle kesin önerilerin yer almadığı orta riskli grup ile tedavinin başlanmasının önerilmediği ancak olay gelişim olasılığı bulunan düşük riskli grubun daha sağlıklı olarak belirlenmesinde kullanışlı olabilecektir (16).

2.1.4. Ateroskleroz: Endotel Disfonksiyonunun Rolü

Ateroskleroz, daha önce değinildiği gibi çocukluk çağlarında başlayan ve endotel fonksiyonlarının kaybı ile ilerleyip, morfolojik değişikliklere yol açan kronik, sistemik, inflamatuar bir patofizyolojik süreç olup orta yaşlarda fokal etkilerinin ortaya çıkışı ile kardiyovasküler morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (22). Bu süreçte, daha önce sadece intima ile kan dolaşımı arasında basit bir bariyer görevi gördüğü düşünülmekte olan endotelin normal fonksiyonlarının kaybının önemli bir rolü olduğu artık bilinmektedir (3). Endotel pasif bir bariyer olmaktan ziyade vazodilatör, anti-inflamatuar ve anti-trombotik özellikleri ile vasküler homeostaz üzerine etkili rolü olan bir düzenleyicidir. Risk faktörlerinin bileşik etkileri; endotelde kimyasal veya mekanik travmaya yol açarak ve sinyal yolaklarını aktive ederek endotel disfonksiyonuna neden olur (4). Endotelin fonksiyonlarında bozulma gelişiminin hem erken ateroskleroz sürecinde hem de hastalığın ileri evrelerinde plak davranışı, gelişimi ve klinik sonuçları üzerinde etkin rolü vardır. (3) Endotelin normal fonksiyonlarını ve temelde NO aracılıklı gerçekleştirdiği düzenleyici rolü kaybederek aktive olması; ateroskleroz sürecinin temel taşlarından olan oksidasyon ve inflamasyonu başlatır (20). Ateroskleroz için merkezi rolü düşünüldüğünde, endotel fonksiyonlarını izlemenin bize hem erken hastalığın tespiti, hem erken hastalık için alınan koruma önlemlerinin etkinliğinin belirlenebilmesi, hem riskin değerlendirilmesi, hem de gelecekteki olumsuz sonuçların önlenmesi için yol gösterebileceği sonucuna varılabilir (23).

Endotel damar duvarlarının yüzeyini oluşturmanın yanı sıra, organizmanın karşılaştığı pek çok uyarana salgıladığı mediatörler aracılığı ile cevap veren dinamik bir yapıdır. Aynı zamanda akciğerde gaz değişimi, karaciğerde fagozitoz gibi organa

özel etkinliği de olduğu bilinmektedir. Endotel fonksiyonlarından ilk belirleneni, organ perfüzyonu üzerinde düzenleyici rolünü mümkün kılan vazomotor tonus üzerindeki etkisi olmuştur. Furchgott ve Zawadzki'nin yaptığı çalışmada, tavşan aorta preparatı hazırlanırken endotel yüzeyi hasar gördüğünde asetilkolin ile muskarinik reseptörler aracılığı ile vazokonstriksiyon izlenirken, endotelin intakt kalması halinde vazodilatasyon cevabı gözlenmiştir (24). Bu ilk gözlemsel çalışmanın ardından endotel varlığındaki dilatasyonun nitrik oksit (NO) aracılıklı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Endotelin koruyucu etkinliğinde önemli olan NO'nun, L-arjininin (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterin (BH4)'in kofaktörü olduğu endotelyal nitrik oksit sentetaz (eNOS) aracılığı ile L- sitrilun ve NO'ya çevirilmesi ile elde edildiği gösterilmiştir (25). Vücutta eNOS aracılıklı NO sentezinin en önemli uyaranı shear strestir (26). Laminar akımın bozulduğu ve duvarda küçük titreşimlerle, azalmış shear stres uyguladığı bölgelerde, hem endotel hasarı daha fazla olmakta, endotel hücreleri poligonal şekil kazanmakta hem de NO sentezinde artış izlenmektedir (27). NO sentezindeki artışın bifazik olduğu ve kısa süreli ilk yanıtta enzim fosforilasyonu gibi bir mekanizmayla artış izlenirken, uzun süreli yanıta eNOS enziminin transkripsiyonunun artışının neden olduğu düşünülmektedir (26-28). Bu laminar shear stresin etkisinin bir diğer önemli sonucu da süperoksit dismutaz enzim aktivitesini arttırarak, reaktif oksijen radikallerinin oluşumunun azaltıp, NO'nun oksidasyonunu engellemektir (28). Bu sayede vasküler homeostaz korunmuş olur. eNOS enzimi bradikinin, adenozin, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve serotonin gibi sinyal molekülleri ile de aktive olabilir (29). NO üretildikten sonra damar duvarına difüze olarak düz kas hücrelerinde siklik guanilat mono fosfat (cGMP) aracılıklı dilatasyona ve organ perfüzyonunun devamına aracılık eder. NO aynı zamanda pek çok proteindeki sistein moleküllerinin S-nitrozilasyonu ile aktivasyonlarını azaltır (30). Bu nitrozilasyonun hedefinde transkripsiyon faktörü NFκB,hücre döngüsü proteinleri, doku faktörü yer alır. NO mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu da sınırlar (23). Bu etkileri sonucunda NO hem vazodilatasyon sağlar hem de anti-inflamatuar, anti-trombojenik ve anti-mitojenik etkisi ile endoteli ateroskleroz sürecindeki önemli koruyuculardan biri yapar (23).

Kan akımının ve risk faktörlerinin uzun süreli etkilerinin neden olduğu endotel hasarı, hem endotel disfonksiyonuna hem de endotel tabakasının

devamlılığının bozulması, hücrelerin ayrılarak kan akımına karışması veya yaşlanmasına neden olur. Aterosklerotik kalp veya periferik damar hastalığında; dolaşımda, apoptoz sonucu endotel hücre parçaları veya dökülmüş endotel hücrelerine artmış oranda rastlanmaktadır (31). Özellikle titreşimli düşük shear stresin olduğu, laminar akımın bozulduğu bölgelerde, lipid molekülleri ve monositler endotelle daha uzun süre temas halinde kalmakta ve yine bu bölgelerde daha sık olan endotel hasarının tamir edilememesi kaçınılmaz olarak aterosklerotik süreci ivmelendirmektedir (27). Bu hasar ya lokal olarak endojen endotelin kendini tamiri ile ya da dolaşımda bulunan kemik iliği kaynaklı endotel progenitor hücrelerin yardımı ile onarılır. Burada dikkat çekici olan nokta bu endotel progenitör hücrelerin kemik iliğinden mobilize olmasında da NO'nun etkinliği bulunuşudur (23).

Endotel, NO aracılıklı olmayan prostasiklin ve endotel ilişkili hiperpolarize edici faktör (EDHF) yolakları ile de vazodilatasyon sağlayabilir. EDHF kesin olarak belirlenememiş olup, vasküler yatağa göre farklılıklar gösterdiği düşünülmektedir. EDHF, NO biyoavalibilitesinin azaldığı durumlarda özellikle mikrodolaşıma etki ederek vazodilatör tonusun korunmasına aracılık eder. Prostasiklinin vazodilatör etkisinin ise insanlarda sınırlı olduğu düşünülmektedir (4, 23).

Endotel disfonksiyonu olarak tanımlanan durum endotelin bu ateroprotektif etkinliğinin kaybedilmesi ve aktivasyonu ile ateroskleroz patofizyolojisinin önemli basamaklarından inflamasyonu başlatıp, arttırarak devam ettirmesidir. Endotel disfonksiyonunun olmazsa olmazı NO aktivitesinin kaybıdır. Normal koşullarda NO üretimini sağlayan eNOS, tetrahidrobiyopterin veya L-arjinin eksikliğinde NO yerine süperoksitleri yani serbest oksijen radikallerini üretir. Bu durum eNOS enziminin hem koruyucu NO üretimi hem de süperoksitlerin ve endotel aktivasyonun gelişimi ile zıt yönde çalışabilen ikili etkinliğini gösterir (23). Endotelin koruyucu etkinliğini kaybederek aktive olması, bazı çocukluk çağı infeksiyonları sonrası da görülebilen temel amacı koruyuculuk olan geçici fizyolojik bir durum olmakla beraber, olumsuz çevresel koşulların devamlılığı bu mekanizmayı ateroskleroz sürecinin tetiği çeken önemli basamaklarından birine dönüştürebilir (23). Serbest oksijen radikallerinin endojen antioksidanlarca inaktive edilebilecek kapasiteyi aşması, koruyucu NO'nun azalmasının; genetik ve çevresel faktörlerce devamlı hale gelmesiyle, geri dönüşlü

olabilen damar duvarındaki lipid birikimi kaçınılmaz olarak aterosklerotik plak gelişimi yönünde ilerleyecektir (20).

Endotel disfonksiyonu ateroskleroz patofizyolojisini ayrıntılı olarak aydınlatmanın yanı sıra, klinik olaylarla ilgili öngörülerimizi de güçlendirmiştir. Risk faktörleri olan ancak kardiyovasküler hastalık tanısı almamış bireylerdeki ve hâlihazırda tanısı olan ve tedavi almakta olan hastalarda gelişecek olumsuz klinik sonuçlarla ilgili ipucu sağladığı ortaya konmuştur (32). Yapılmış çalışmaların bir analizinde, 2500 hastaya ait 1 ila 92 aylık takip sonuçları değerlendirildiğinde endotel disfonksiyonunun; kardiyak mortalite, miyokard infarktüsü ve revaskülarizasyon için öngördürücü olduğu izlenmiştir (33). Üstelik endotel disfonksiyonu ile klasik risk faktörleri arasında ilişki olmasına karşın, direkt bağlantı yoktur. Endotel disfonksiyonu risk faktörlerinin ve organizmanın ateroprotektif mekanizmalarının tüm etkinliklerinin ortak sonucu hakkında fikir veren ve klasik değerlendirmeye ek bilgi sağlayan konumu ile tedavi hedeflerinin yöneltileceği hassas hastanın tespitinde önemli rol oynayabilir (34, 35). Akut koroner sendrom ve ani kardiyak ölüm gelişimindeki plak yırtılması ve erozyonu, vazokonstriksiyon, plak ilerlemesi, neovaskülarizasyonu ve plak içi kanama, revaskülarizasyon sonrası akım sağlanamaması, platelet aggregasyonu aşamalarında endotel disfonksiyonunun önemli rolü olduğu bilinmektedir (33). Lavi ve arkadaşlarının sanal histoloji- IVUS ile yaptığı bir çalışmada, endotel disfonksiyonun vazodilatör yanıtın kaybolması ile belirlendiği sol ön inen koroner arter bölgesindeki plakların, diğer bölgelerle kıyaslandığında daha geniş bir nekrotik zona sahip oldukları gösterilmiştir (36). Bu da endotel disfonksiyonu ile hassas plak gelişimi arasındaki bağlantıya dikkat çekmektedir. Akut koroner sendromun egzojen tetikleyicileri olan sigara ve mental stresin de endotel aktivasyonu üzerinden etkili oldukları düşünülmektedir (33). Obstrüktif koroner aterosklerotik lezyonu olmayan bireylerde de talyum sintigrafisinde, endotel disfonksiyonu varlığının egzersiz ilişkili perfüzyon bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir (37). Asemptomatik veya semptomatik evrede kalp yetmezliği hastalarında da endotel disfonksiyonunun varlığı gösterilmiştir (38, 39). Bu iki gözlem kalp yetmezliği patogenezinde de endotel disfonksiyonunun yeri olabileceğini düşündürtmektedir.

Endotel disfonksiyonu ile ilgili tüm bu bilgiler, ateroskleroz için uygun gerek primer gerek sekonder koruyucu önlemlerin yönlendirilmesi, lüzumu halinde arttırılması için daha büyük hassasiyetle seçim yapmamızın gerekli olduğu, kardiyovasküler olay gelişimi açısından riskli bireyleri tanımada tarama testi olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

2.1.5. Endotel Disfonksiyonunun Belirlenmesi

Endotel disfonksiyonu olan bireyleri tanımanın önemi ortaya koyulduktan sonra, bu tarama işleminin nasıl yapılabileceği ile ilgili soruya cevap verilmesi gerekmektedir. Patofizyolojik mekanizmalarla ilgili bilgilerimiz, endotelin vazomotor, inflamatuar ve trombojenik yönleriyle ilgili farklı testlerin geliştirilmesini sağlamıştır.

Endotel fonksiyonları ile ilişkili uygulanacak testlerin, asemptomatik bir popülasyonda tarama, aterosklerotik hastalığı olan bireylerde klinik öngördürücülük ve tedavi takibi amacı ile de kullanılacağı düşünüldüğünde bazı özelliklere sahip olması gereklidir. Test aterosklerotik hastalığın varlığı ve gelişimini yansıtmalıdır ve risk belirlemede bize ek bilgi sağlayabilmelidir. Non-invaziv, tekrarlanabilir, maliyeti düşük, operatör bağımlılığı az, kolay uygulanabilir ve özellikle koroner endotel fonksiyonu yansıtabilir olması da bu testlerden beklenen özelliklerdir (22).

Bu amaçla geliştirilmiş olan testleri sınıflamak gerekirse, başlangıç olarak; endotel disfonksiyonunu yansıtan moleküler testler ve endotelin vazomotor aktivitesini gösteren fonksiyonel testler şeklinde iki grup tanımlayabiliriz (23, 40). Vazomotor fonksiyonları yansıtan testler de uygulandığı yere göre; arteriyel ve venöz gruplarına ayrılabilir (4). Arteriyel vazomotor fonksiyonlar da incelemenin yapıldığı arter yatağına göre, koroner arterlerde veya periferik arterlerde uygulanan endotel fonksiyon testleri olarak gruplanabilir (22).

a. Sistemik Dolaşımda Endotel Aktivasyon Belirteçleri

Endotel aktivasyonu ile salınan moleküllerin veya hasarlanmış endotele ait parçaların sistemik dolaşımda taranması henüz klinik kullanım kazanmamış, daha

çok araştırma amacı ile uygulanan yöntemlerdendir. Bu testler kapsamında; NO biyoyararlanımı, sitokinler, adezyon molekülleri, tromboz gelişimi üzerinde düzenleyici etkinliği olan moleküller ve endotel hasarı sonucu sistemik dolaşımda bulunabilen endotel hücreler veya bunlara ait mikroveziküller taranır (23). Bu yöntemlerin pahalı olmaları, diğer sistemik faktörlerden etkilenebilmeleri ve sonuçların direkt olarak endotele atfedilememesi dezavantajlarıdır (20,37). Ancak sonuçların diğer testlerle birlikte değerlendirilmesi, endotel fonksiyonları gibi çok yönlü bir konuda elde edilebilecek verilerin güvenilirliğini arttırmaya katkıda bulanabilecektir.

b. Endotelin Vazomotor Aktivitesinin Belirlendiği Testler

Endotel fonksiyonlarıyla ilgili testlerin en yaygın kullanılanları, endotelin çeşitli fizyolojik ve farmakolojik ajanlara verdiği yanıtın incelendiği vazomotor aktivite ile ilgili olanlardır. Bu testler temel olarak, çeşitli uyaranlara endotel tarafından verilen NO cevabını ve sonuçlarını incelemek üzere tasarlanmıştır. Uyaranlara cevabının ön planda NO aracılıklı vazomotor aktivite üzerinden yürütülmesi bu testlerin endotel fonksiyonlarını değerlendirmedeki kullanışlılıkları sınırlanmamaktadır. Bilakis, NO'nun bu aktivite yanında anti-inflamatuar, anti-trombojenik etkileri de olduğu göz önüne alındığında, bu testler ile aslında endoteldeki NO aktivitesinin belirlendiğini ve bunun da endoteldeki aterojenik-antiaterojenik etkinliğin sonucunu ortaya koyduğunu söylemek mümkündür.

Cox ve arkadaşlarının tarafından yapılan; koroner anjiografi sırasında asetil kolin infüzyonu ile LAD'de ateroskleroz izlenen segmentlerde dilatasyon izlenmezken, normal damar segmentinde izlendiği ve her iki segmentin de nitrogliserin gibi egzojen bir dilatöre yanıtının normal olduğu çalışma endotelin vazomotor aktivitesi ile ilgili ilk incelemelerden sayılabilir (41). Bunu takip eden yıllarda ise endotel fonksiyon testleri için çığır açan bir gelişme yaşandı. Celermajer ve arkadaşlarının, periferik arterlerde non-invaziv olarak NO biyoyararlanımını göstermek için buldukları yeni yöntem "akıma bağlı dilatasyon" (*flow mediated dilatation,* ABD) tanımlandı (5). Periferik arterlerde ve koroner arterlerde yapılan endotel fonksiyon testleri arasında uyumluluk olduğunun gösterilmesi de klinik

kullanım için daha avantajlı olan periferik inceleme yöntemlerinin ilerleyen yıllarda geliştirilmesine zemin hazırladı (42).

Koroner arterlerdeki endotel fonksiyon testleri, koroner anjiografi sırasında çeşitli mediatörlerin veya stresörlerinin damar çapına etkilerinin konvansiyonel olarak veya IVUS ile tespit edilmesine dayanır (4, 22). Günümüzde koroner endotelyal fonksiyonun belirlenmesinde anjiografi sırasında asetilkolin infüzyonu yapılarak izlenen damar çapı değişiklikleri altın standart olarak değerlendirilmektedir (40). Ancak bu işlemlerin invaziv yapıları ve vazokonstriksiyon aracılıklı iskemiye neden olabilmeleri nedeni ile endotel fonksiyonlarını belirlemede kullanımları yaygınlaşmamıştır (4).

Periferik arterlerde endotel fonksiyonlarını ölçmede yaygın olarak kullanılan teknik ABD'dir (39). Bu teknik kısaca ön koldaki kan akımının sistolik kan basıncı üzerindeki basınçlarda şişirilen manşon ile 5 dakika süreyle engellenmesinin ardından, hiperemi sırasında lokal NO salınımı aracılığı ile gelişen arteriyel dilatasyonun belirlenmesine dayanır.

ABD yaygınlık kazanmadan önce geliştirilen ancak arteriyel kanülasyon gerektirmesi nedeni ile yaygın kullanıma giremeyen bir diğer teknik de venöz pletismografidir (43). Bu yöntemle brakial arter kanülasyonu sonrası asetilkolin gibi çeşitli mediatörler verilmekte, işlem öncesi ve sonrası ön koldaki kan akımı ile vasküler rezistans ölçülüp, kontrol olarak karşı taraftaki önkol akımı ile kıyaslanarak endotelin cevabı değerlendirilmektedir (22, 44). Bu test ile elde edilen akım değerlerinin ve bazal ölçümlerin tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, iki kol arasındaki dinlenimde de mevcut olan farklılıkların karşılaştırmayı güçleştirmesi, mikrodolaşım ile ilgili elde edilen verilerin NO'ya spesifik olmayıp EDRF'ten de etkileniyor olması ile beraber arter kanülasyonu gerektirmesi geniş çalışmalarda ve takipte kullanımını engellediği için yaygınlık kazanamamıştır (17, 41, 42).

Periferik endotelyal fonksiyon değerlendirmesinde kullanılan bir diğer yöntem de periferik arteriyel tonometridir (PAT). (4, 22) PAT, parmak probu ile nabız dalgalarının ölçümü aracılığıyla pulsatil akım değişikliklerinin belirlenmesine dayanır. ABD'ye benzer şekilde hiperemik akım yaratılır ve oklüzyon öncesi ila sonrası elde edilen akım değerleri karşılaştırılır (19). ABD ile PAT sonuçları

arasında kesin bir korelasyon tespit edilememiş ve PAT'ın ABD'nin temeli olan NO'dan farklı ancak henüz bilinmeyen birtakım mekanizmalarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (19). Ancak yapılan çalışmalar PAT sonuçlarının da ateroskleroz öngördürücülüğü açısından anlamlı olduğunu ortaya koymuştur (45, 46). Kullanılan probların pahalı oluşu nedeni ile henüz yaygınlık kazanmamış olan bu testin gelecekte kendine daha yaygın kullanım bulabileceği düşünülmektedir.

Arteriyel sistemde olduğu gibi venöz sistemde de endotel; vazomotor, koagülasyon, fibrinoliz ve platelet aktivasyonu üzerindeki etkinliği ile vasküler homestaza katkıda bulunur. Dolaşımdaki kanın %70'ini içeren venöz sistemdeki vasküler aktivitenin kardiyovasküler fizyolojiye yapacağı etki ve endotel disfonksiyonunun venöz tromboz gelişimine katkısı da düşünülerek venöz endotelyal fonksiyon ile ilgili araştırmalar yapılmıştır (4). Ancak venöz endotel fonksiyon ölçümü için geliştirilen teknikler hem oldukça karmaşık hem de tekrarlanabilirliği düşük olmaları itibariyle yaygınlık kazanamamıştır (19). Genel görüş, arteriyel endotel disfonksiyonu ölçümlerinin venöz sistemdeki endotelyal disfonksiyonu da yansıtıyor olması nedeni ile venöz endotel spesifik yöntemler yerine tercih edilmesi şeklindedir (47).

2.2. Akıma Bağlı Dilatasyon (ABD)

Endotel disfonksiyonunun ateroskleroz patofizyolojisindeki öneminin anlaşılması ile beraber endotel fonksiyonlarını belirlemek amacıyla bilim dünyasında pek çok önemli çalışma yapılmıştır. Geliştirilmiş olan tüm bu farklı teknikler arasında, non-invaziv akıma bağlı dilatasyon 1992'de Celermajer ve arkadaşları tarafından tanımlandığından beri en yaygın olarak kullanılan yöntem oldu (5). Celermajer yıllar sonra bu tekniğin keşfine dair yaptığı açıklamada, 1990'ların başında ultrasonografi ile koroner arterleri görüntüleyemedikleri için benzer çapta olduğunu düşündükleri brakial arteri tercih ettiklerini belirtir. Öncelikle karotid arterler ile çalışmak istedilerse de, hiperemi oluşturmanın uygun bir yöntemini bulamamaları brakial arteri tercih etmelerinin bir diğer nedeni olmuştur. İskemiyi ön kolda oluşturmalarının nedeni brakial arterin iskemik bölgede bulunması halinde, salgılanacak NO dışı mediyatörlerin de cevabı etkileyebilecek olmasıdır. Celermajer,

uzun yıllardır kullanılan ve daha sonra etkin süre olduğu gösterilen 5 dakikalık oklüzyon süresini de hastaların iskeminin oluşturduğu rahatsızlığı tolere edebildiği en uzun zaman olduğu için tercih etmiştir (48). Celermajer ve arkadaşlarının tesadüflerin de katkısı ile geliştirdiklerini belirttiği bu yöntem yıllar içinde pek çok farklı klinik durumda ve farklı metodoloji ile test edilmiş olmakla beraber, standart bir protokol oluşturulamamıştır (6,48). Bu nedenle klinikte endotel disfonksiyonunun belirlenmesi amacıyla akıma bağlı dilatasyon kullanımının yaygınlaşabilmesi için bu yöntemin bazı yönlerden geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.1. Akıma Bağlı Dilatasyon: Klinik Uygulamalar

ABD'nin tanımlandığından beri yapılan çalışmalarda, farklı risk faktörlerinin endotel üzerindeki etkilerinin ortak sonuçlarını ölçen, endotel sağlığını değerlendiren bir sayaç olduğu bilinmektedir. Bu bilgiden hareketle ABD, hem bazı patofizyolojik yolların aydınlatılmasında hem de klinik olarak hastaların değerlendirilmesinde öngördürücülüğü açısından kullanılmıştır. Çalışmalarda ortak bir protokolün kullanılmayışı farklı sonuçlar ortaya çıkmasına yol açmışsa da, ABD'nin klinik kullanışlılığına dair önemli veriler elde edilmiştir.

Ateroskleroz varlığı ile ilişkisi bilinen ABD, çeşitli kardiyovasküler risk faktörlerinin mevcudiyetinden de etkilenmektedir (49). Yaşla beraber kardiyovasküler riskin arttığı ve bunun "vasküler yaşlanma" ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (50). Akıma bağlı endotel cevabı da erkeklerde 40 yaştan sonra, kadınlarda ise menapozu takiben yaklaşık 50'li yaşlardan sonra azalmaktadır (51). Bu azalmanın artmış oksidatif stresle ilişkili olduğu ve kadınların östrojenin koruyucu etkisi sayesinde daha ileri yaşlarda etkilendiği düşünülmektedir (51, 52). Kardiyovasküler risk faktörlerinden dislipideminin de akıma bağlı dilatasyonu azalttığı bilinmektedir. Ailevi hiperkolesterolemisi olan 7-17 yaş grubundaki çocuklarda, sağlıklı yaşıtlarına oranla ABD değerinin daha düşük olduğu ve bu etkinin özellikle lipoprotein a seviyeleri ile ilişkili ortaya çıktığı gösterilmiştir (53). Sadece ailevi hiperkolesterolemide değil, erişkinlerde görülen hiperlipidemi tablolarında hatta yüksek normal kolesterol değerlerine sahip bireylerde de endotelin vazodilatör yanıtının bozulduğu gösterilmiştir (54, 55). Bilinen koroner arter

hastalığı olan bireylerde LDL kolesterolün 100mg/dl ve 80mg/dl'nin altında olduğu iki farklı grupta, daha düşük LDL seviyelerinin daha yüksek ABD değerlerine eşlik ettiği görülmüş, LDL'deki düşüşün miktarının endotel fonksiyonları üzerinde artan olumlu etkisi ortaya konmuştur (56). Hipertrigliseridemi hastalarında da küçük yoğun LDL partiküllerindeki artış, endotel bağımlı dilatasyonu olumsuz etkilemiştir (55). Koroner arter hastalığı olan ve olmayan bireylerde yürütülen iki farklı çalışmada da düşük HDL seviyelerinin akıma bağlı dilatasyon yanıtını bozduğu ortaya konmuştur (57,58) .Bu etkinin HDL'nin LDL aracılıklı oksidatif değişiklikleri azaltması ve eNOS aktivitesini arttırması etkinliğinin kaybı sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (55,56). Diyabetik hastalarda mikro ve makrovasküler komplikasyonlardan bağımsız olarak ABD'nin olumsuz etkilendiği ve bunda çeşitli çevresel, genetik faktörlerin de etkisi olduğu gösterilmiştir (59-61). Diyabetik ve diyabetik olmayan sağlıklı bireylerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, yeni tanılı diyabetik hastaların dahi ABD değerlerinin daha düşük olduğu ortaya konmuştur (62). Bu da ateroskleroz sürecinin diyabet klinik olarak aşikâr hale geçmeden önce başladığını düşündürmektedir (62). Açlık plazma glukozunda yükselme olan, diyabetik olmayan bireyler ile normal açlık glukozuna sahip bireylerin karşılaştırıldığı bir çalışmada da ABD değerleri prediyabet aşamasındaki bozulmuş açlık glukozu olan bireylerde düşük bulunmuştur (63). İnsülin direncinin kompansatuar açlık insülin düzeyi artışı ile değerlendirildiği bir çalışmada da bilinen kardiyovasküler risk faktörü olmayan sağlıklı bireylerde ABD seviyelerinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (64). Sağlıklı bireylerde dekstroz infüzyonu ile hiperglisemi oluşturulması ise ABD değerlerinde değişikliğe yol açmamaktadır (65). Bu veriler hipergliseminin direkt etkisinden ziyade insülin direncinden diyabete uzanan patolojik yelpazede endotel fonksiyonlarının olumsuz etkilendiğini ve bunun ABD değerlerindeki düşüşlerle ortaya koyulabileceğini göstermektedir. Hipertansif bireylerde de endotel aracılıklı dilatasyonda azalma olduğu gösterilmiş, azalma miktarının albüminüri ve diğer uç-organ hasarları ile de lineer ilişkisi olduğu ortaya konmuştur (66-70). Aktif veya pasif sigara maruziyetinin de endotel fonksiyonları ve ABD değerleri üzerinde doz bağımlı olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (71-74).

Aterosklerotik sürecin bu önemli bileşenlerinden etkilenen ABD'nin, prognostik öngördürücülüğünü belirlemek için de pek çok çalışma yapılmıştır.

Yeboah ve arkadaşlarının yürüttüğü iki büyük çalışmada ABD'nin klasik kardiyovasküler risk faktörlerinin etkinliklerine ek olarak risk kategorilerini daha net belirlemede katkısı olabileceği gösterilmiştir (75, 76). Yaş ortalaması 54±12 olan 435 sağlıklı bireyin 32±2 aylık takip süresince, ölüm, miyokard infarktüsü (MI), inme, revaskülarizasyon, kalp yetmezliği veya anjina nedeni ile hospitalizasyonunu içeren birleşik kardiyovasküler sonlanım noktaları açısından değerlendirilmesinde ABD değerinin diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak olumsuz olayları öngördürücü olduğu belirlenmiştir (77). Bilinen kalp hastalığı olmayan 618 sağlıklı bireyin 4.2±1.8 yıllık takibinde, ABD'nin çoklu risk faktörlerinin etkileri dışlandığında, olumsuz kardiyovasküler olay yaşama için belirleyici olduğu gösterilmiştir (78). Göğüs ağrısı ile başvuran bireylerde, 5 yıllık izlem süresinde başlangıç ABD değerleri normal olanlarda revaskülarizasyon ve MI sıklığının, diğer faktörlerden bağımsız olarak daha az olduğu ortaya konmuştur (79). Koroner arter hastalığının değerlendirilmesi amacı ile yönlendirilmiş 543 bireyde, intima media kalınlığı (IMK) ve ABD diyagnostik yeterlilik açısından karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemin de kullanışlı olduğu gösterilmekle beraber ABD'nin IMK'ye oranla daha iyi diyagnostik kapasitesi olduğu görülmüştür. Bu çalışmada uygun değerler seçildiğinde ABD'nin KAH varlığı için %89 sensitivite ve %62 spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir (80). Yine aynı gruba ait bir çalışmada, pre-test KAH olasılığı yüksek olan bireylerde ABD'nin egzersiz testine eklendiğinde klinik davranışı etkileyebilecek öngördürücülüğü olduğu ortaya konmuştur (81). MI sonrası ortalama 9.5 ay süresince takip edilen 179 hastada, kardiyovasküler olumsuz olay gelişiminin diyabet varlığıyla yakın ilişkisine ABD değerinin düşük oluşu eklendiğinde öngördürücülüğün arttığı gösterilmiştir (82). ST segment elevasyonsuz MI sonrası ortalama 2 yıl takip edilen 98 hastada; ölüm, MI, inme, kararsız anjina pektorisin ABD değeri düşük olan bireylerde, diğer risk faktörlerinin etkileri dışlandığında dahi daha yüksek olduğu ortaya konmuştur (83). Farklı klinik başvurular sonrası perkütan koroner girişim ve stent uygulanan hastaların takiplerinde, başlangıç ABD değerinin düşük oluşunun geç stent restenozu gelişimini öngördürücü olabildiği de iki farklı çalışmada gösterilmiştir (84, 85). KAH takibinde ABD'nin kullanışlı olduğu bir diğer yön de tedavi ile değişkenliğine dayanmaktadır. 251 koroner arter hastasının optimal medikal tedavi altında 6 ay arayla değerlendirildiği ABD incelemesinde,

başlangıç değerlerine göre artışın olduğu grupta, değişim olmayan gruba oranla 36 aylık takipte olumsuz olay gelişiminin daha az olduğu gözlenmiştir (46). 2014 yılında sonuçları yayınlanmış olan; 618 sağlıklı bireyin 4.6±1.8 yıl takip edildikleri bir çalışmada ise ABD'nin, Framingham risk skoru ile kombine edilmesinin; bu iki testin ayrı ayrı kullanımına kıyasla prognostik öngördürücülüğü arttırdığı gözlenmiştir (78). Tüm bu bilgilerin yanı sıra, literatürde ABD'nin tanı ve tedaviyi yönlendirmede olumlu özelliklerinin izlenmediği çalışmalar da mevcuttur. Fathi ve arkadaşlarının 444 hasta ile yaptığı çalışmada ABD'nin düşük olduğu grupta daha fazla klinik olay yaşanmış ancak ABD'nin sadece yüksek riskli grupta bağımsız bir prognostik değeri olduğu görülmüştür (86). İlginç bir şekilde 617 hastanın sahip oldukları risk faktörlerine göre tekli veya çoklu riski olan gruplar halinde sınıflandığı başka bir çalışmada ise, ABD'nin iki veya daha fazla risk faktörünün mevcudiyetinde ek düşüş göstermeyerek yüksek riskli bireylerin tanımlanmasında yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır (87). Frick ve arkadaşları ise 398 koroner arter hastasının 4 yıla yakın süreyle takibinde belirledikleri ABD değerine göre sınıflandırılan gruplar arasında kardiyovasküler olay gelişiminin farklı olmadığını göstermişlerdir (88). Literatürde ABD kullanışlılığına ilişkin çok sayıda çalışmanın yanı sıra, bu olumsuz sonuçların da eş zamanlı olarak varoluşu çalışmalarda kullanılan ABD tekniği, elde edilen sonuçlar ve buna bağlı olarak oluşturulan grupların heterojenitesine bağlanmaktadır.

Koroner vazospastik anjinası olan 35 hastanın sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslandığı bir çalışmada, brakial arterin nitrogliserine yanıtında fark izlenmezken ABD değerlerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da vazospastik anjina patofizyolojisinde endotel vazomotor disfonksiyonunun etkisi olabileceğini düşündürmektedir (89). Normal koroner arterler ile, göğüs ağrısı ve stres testleri ile ortaya koyulan iskemisi mevcut olan kardiyak sendrom X hastalarının incelenmesinde de ABD kullanımıştır. Bu grubun sağlıklı bireylerle karşılaştırılmasında elde edilen veriler kronik inflamasyon etkisi ile yüksek duyarlıklı CRP artışı ve ABD düşüklüğünü ortaya koymaktadır (90-93). ABD'nin bu grupta hem CRP değeri hem de vücut kitle indeksindeki artış ile negatif korelasyonu mevcuttur (92).

Kronik atriyal fibrilasyonu (AF) olan bireylerde de endotel disfonksiyonu varlığı araştırılmıştır. Kırk AF hastasının, 26 sinüs ritmindeki bireyle karşılaştırılması sonucunda, AF hastalarında hem von Willebrand faktör ve çözünebilir E-selektin gibi endotel hasarı belirteçleri daha yüksek bulunmuş, hem de ABD değerleri daha düşük olarak izlenmiştir (94). Romatizmal mitral kapak hastalarının ABD değerleri, yaş ve cinsiyeti benzer sağlıklı bireylerden oluşan bir grupla karşılaştırıldığında endotel disfonksiyonunun varlığı ortaya koyulmuştur. Bunun nedeni kesin olarak aydınlatılmamış olmakla beraber atriyal kardiyomiyositlerdeki gerilme ve dolaşımdaki bazı sitokinlerin etkileri ile ilişkilendirilmiştir (95).

Aterosklerotik sürecin bir diğer sonucu olan iskemik serebral olaylarla ABD ilişkisi de değerlendirilmiştir. Yakın dönemde inme/geçici iskemik atak öyküsü olan 17 hasta, iki yıl önce inme öyküsü olan grupla kıyaslandığında ABD değerleri benzer bulunmuştur. Akut veya stabil serebrovasküler hastalığı olan bireylerde ABD ve endotel disfonksiyonunda belirgin farklılık olmadığı belirlenmiştir (96). Bir diğer çalışma ise laküner serebral infarktı olan hastaların, benzer risk faktörleri olan veya sağlıklı olan bireylerle kıyaslandığında ABD değerlerinin daha düşük olduğunu ortaya koymuştur (97). Aterosklerotik sürecin bir komplikasyonu olan serebrovasküler olaylarda ABD'nin kullanımına ilişkin elimizdeki bilgiler yetersiz olduğu için herhangi bir tavsiyede bulunmadan önce daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

ABD'nin hem patofizyolojiye dair öngörülerimizi arttırması hem de hastayla ilgili klinik davranışımıza etki edecek verileri sağlaması, non-invaziv, kolay uygulanabilir ve tekrar edilebilir yapısı da düşünüldüğünde bu yöntemin cazibesini arttırmaktadır. Ancak 30 yıla yakın süredir bilinen bu yöntemin, uygulamadaki farklılıkları çalışma sonuçlarının homojen olmayışına, bu da klinik kullanıma yaygın olarak girememesine yol açmıştır. Metodolojik araştırmalar ile düzenlenecek çalışma protokolü ABD'yi bir araştırma yönteminden etkin bir klinik uygulamaya dönüştürebilir. Bunun için hem mevcut pratikteki farklı uygulamaları, hem de yöntemin mekanizmasını gözden geçirerek ABD uygulama ve sonuçlarına dair eksik verilerin olduğu alanlarda çalışmalar yapılması gereklidir.

2.2.2. Akıma Bağlı Dilatasyon: Mekanizma

Endotelin damar duvarını kaplayan bir doku katmanı olmaktan ziyade salgıladığı mediyatörler ile maruz kaldığı stresörlere cevap verebilen, hem fizyolojik hem de histolojik değişimlerin önemli bir aracısı olduğunu biliyoruz. Dinlenim koşullarında, kan akımında herhangi bir değişiklik olmazken dahi, arterler sessiz kalmaktan ziyade belirli bir seviyede vazokonstriksiyona sahip olup, "vasküler tonus" olarak adlandırılan aktif durumdadırlar (98, 99). Artan akım ve shear strese bağlı olarak ise endotel aracılığıyla, normal koşullarda vazodilatasyon cevabı gelişir (100). Akıma bağlı dilatasyon, çalışılmakta olan arter endotelinde, kan akımındaki ve shear stresteki ani artışı takiben oluşan bu dilatasyon cevabının ölçülmesine dayanır. Bu özelliği ile akıma bağlı dilatasyon, endotelin dinlenim halinde shear stres aracılığıyla şekillenen bazal tonusunu değil ancak oluşturulan bir uyarana karşı cevaben geliştirdiği vazomotor yanıtı inceleyen bir yöntemdir (101). Bu yanıtın gelişiminde önceleri "endotel aracılıklı relakse edici faktör" (EDRF) olarak anılan, şimdi ise NO'nun başını çektiği düşünülen pek çok farklı mediatörün etkisi vardır (97, 99). Tavşan aortasında asetilkoline dilatör yanıtın gelişmesinde endotelin mevcudiyetinin ve salgıladığı ilk olarak EDRF olarak tanımlanan faktörün varlığını gösteren Furchgott ve Zawadzki ilerleyen yıllarda, EDRF olarak tanımladıkları molekülün NO olduğunu ortaya koymuşlardır (24, 98). Bu çalışma Furchgott'a Nobel ödülü getirmenin yanı sıra, endotelin temel antiaterojenik etkinliği ve aktivitesini anlamamızda sürdürdüğümüz çalışmaların yönünü belirlemeye de önemli katkılar sağlamıştır. Furchgott'un belirttiği gibi endotel aynı zamanda vazokonstriksiyon için de farklı yolakları kullanabilir (97). Stresörlere karşı bu iki zıt cevabı kullanarak damar çapını belirleyen endotelin bu işlevi, tüm patofizyolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olsa da, vazodilatasyon veya vazokonstriksiyonun oluşumunda temel rol alır (99).

ABD çalışması temelde NO biyoavalibilitesini gösteren bir tekniktir ancak başta EDRF ve prostoglandinler olmak üzere bazı mediyatörler de endotel vazodilatör cevabına farklı düzeylerde katkıda bulunur (102). Bahsedilen diğer moleküllerin ABD yanıtına katkısı, farklı hastalıklar zemininde bireylerde değişen oranda rol alır (101). Endotel aynı zamanda, bir takım konstriktör moleküller de

salgılar. ABD tüm bu farklı yolakların birbirleriyle ilişkilerinin ortak sonucunu yansıtır.

ABD yanıtının temel mekanizması akımın ani artışını takiben endotel üzerindeki shear stresin değişimine dayanır. Arter ağacı, iki farklı basınç etkisi altındadır. Bunlardan ilki kalbin sistol sırasında pompaladığı kan ile artan ve diyastolde de azalarak devam eden akımın oluşturduğu nabız basıncıdır (103). Nabız basıncının etkisi nedeniyle sistol sonunda arterin çapı diyastol sonundakine oranla daha fazladır (102). Endotel üzerinde etkin olan akım kaynaklı bir diğer basınç ise, kanın damar içinde farklı akım hızlarına sahip olmasından kaynaklanan teğet (tangential) shear strestir (102). Shear stres vazoaktif mediyatör salınımı, endotel hücrelerinin morfolojik yapılarında değişim, dairesel strain ile birlikte endotelden aktive olan genlerin düzenlenmesi gibi etkileri ile biyokimyasal yolların yanında biyomekanik faktörlerin de endotel fonksiyonları üzerinde etkin olduğunu kanıtlar. (102). Biyomekanik bu faktörlerin endotel sağlığı üzerindeki önemi, aterosklerotik lezyonların genellikle azalan shear stres noktalarında gelişimiyle anlaşılabilir.(104, 105) 15dyne/cm² üzerindeki shear stres endotelin gen ekspresyonu ve salgıladığı mediyatörlerle ateroprotektif özellik kazanmasını sağlarken, 4 dyne/cm² ve altındaki shear strese maruz kalan bölgeler aterojenik karakter göstermektedir (106). Arter duvarındaki shear stres Poiseuille kuralı ile hesaplanabilir (106):

$$\tau_s = \frac{4\mu Q}{\pi R^3}$$

τ_S: shear stres, μ: kan viskozitesi; Q: kan akımı, R: çap

Denklemden de görülebileceği gibi shear stres kan akımı ve viskozitesi ile doğru, damar çapının 3. dereceden kuvveti ile ters orantılıdır. Arter ağacında shear stres artışına neden olabilecek akım artışı durumunda, shear stresin sabit kalabilmesi için endotel damar çapını arttırarak yanıt verir (106).

Shear stres artışı, mekanotransdüksiyon denilen mekanizmalarla, endotel hücrelerinde bu değişimin fark edilmesini sağlayarak, bir dizi biyoaktif molekülün salınmasına yol açar (107). Endotel hücrelerinin shear stres artışını algılamasında yüzeylerindeki glikokaliks katmanının rolü olduğu yapılmış olan çalışmalarda ortaya konmuştur (106). Glikokaliks, endotele bağlı bir takım makromoleküllerin oluşturduğu tabakadır ve kan akımı ile direkt temas halindedir. Glikokalikste yer alan asidik oligosakkarit ve terminal uçta sialik asit içeren glikoproteinler, glikozaminoglikan içerikleri ile proteoglikanlar; polianyonik yapıları ile bu katmanın net bir negatif yüke sahip olmasını sağlarlar (108). Enzimler, enzim inhibitörleri, plazma proteinleri, sitokinler, büyüme faktörleri gibi pek çok molekül, katyon içeren bölgeleri ile bu negatif yüklü tabaka ile ilişki içindedir (107). Glikozaminoglikan tabakası, mikro çevredeki değişimlerle dinamik olarak şekillenen bir yapıdır (107). Patolojik durumlarda yapısında bozulmanın izlendiği glikozaminoglikan tabakası; endoteli koagülasyon, inflamasyon ve aterogenezden koruyan işleve sahiptir (106). Makromoleküllerin geçişini kontrol etmenin yanı sıra, kan akımının devamlılığında da rol alır, çeşitli enzimlerin aktivitesini düzenler ve endotel homeostazisin sağlanmasında görevlidir (106). Tüm bu önemli etkinliklerinin yanında dikkat çeken bir diğer özelliği ise, kan akımının mekanik etkilerini hissederek bunu endotele iletmesi ve sonucunda salgılanan biyoaktif maddeler aracılığı ile vazomotor fonksiyonların düzenlenmesine yardımcı olmasıdır (106). Endotel hücre kültüründe heparan sülfatın enzimatik yıkımını takiben shear stres uygulanmış ve NO üretiminin gerçekleşmediği gözlenmiştir (109). Aynı şekilde yapılan hayvan deneylerinde glikokaliks tabakasındaki hyalürinik asidin yıkımını takiben, endotelin shear strese verdiği NO cevabının anlamlı oranda azaldığı gözlenmiştir (110). Glikokaliks tabakasının enzimatik olarak yıkılması halinde, endotel hücrelerinin akımı algılayamayarak, akım yokmuşçasına davrandıkları, proliferasyon ve migrasyon özelliklerinin de değiştiği gösterilmiştir (111). Glikozaminoglikanların, bir ağacın dallarının rüzgârı algıladığı gibi shear stresi algıladıkları; çekirdek proteinlerin ağaç gövdesi gibi fonksiyon görerek, bu gücü zemin olarak düşünülebilecek hücre membranına aktararak hücrenin aktivasyonunu sağladıkları düşünülmektedir (106). Bu bilgiler glikokaliks tabakasının shear stresin mekanotransdüksiyonunda ve sonucunda NO üretiminde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir.

Arter ağacında shear stres artışına neden olabilecek akım artışı durumunda, shear stresin sabit kalabilmesi için endotel damar çapını genişleterek yanıt verir (106). Bu yanıtta da en önemli molekül, NO'dur. Küçük ve lipofilik bir molekül olması endotel hücre duvarından geçerek dağılabilmesini sağlar (102). Vasküler dokuda NO başlıca, endotelyal nitrik oksit sentetaz (eNOS) aracılığı ile L-arjininden elde edilir (102). NO üretiminde rol alan diğer enzimler de nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS) ve indükte edilebilir nitrik oksit sentetazdır (iNOS) (112). Bu üç enzim de tüm dokularda farklı oranlarda bulunabilir (111). Ancak vasküler duvarda normal koşullarda en aktif olan enzim, kalsiyum aracılığı ile aktive olabilen eNOS'tur (111). Her üç enzim izoformu da bir redüktaz ve bir oksijenaz bölgesi içerir (112). Yine bu üç enzimin üçünün de fonksiyon görebilmesi için, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), hem ve tetrahidrobiyopterin (BH_4) gibi kofaktörler gereklidir (113, 114). eNOS ve nNOS kalsiyum duyarlı iken iNOS'ta bu özellik izlenmez. (111) Shear stres endotel hücrelerinde sitozolik kalsiyum (Ca^{++}) miktarının artışına neden olur. Artan sitozolik kalsiyum, kalmodulini (CaM) bağlı olduğu inhibitör özellikteki kaveolinden ayırarak, kalmoduline kendisi bağlanır (102). Oluşan bu kalsiyum-kalmodulin kompleksi (Ca^{++}-CaM) eNOS enzim aktivitesini uyararak NO salınımına neden olur (115). NO kolaylıkla düz kas hücrelerine difüze olur ve burada çözünebilir guanilat siklaz tarafından gerçekleştirilen siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini arttır (116-118). cGMP düz kas hücrelerindeki Ca^{++} miktarını ve çeşitli kontraktil proteinleri etkileyerek vazodilatasyon gelişimine yol açar (119, 120). eNOS'un shear stresin yol açtığı sitoplazmik kalsiyum artışı ile uyarılması sonucu vazodilatasyon gelişimini sağlaması, endotel hücrelerindeki temel mekanizma olmakla beraber, başka yolaklar da NO üretiminde rol alır (102). eNOS enzimi olmayan farelerde, nNOS aracılıklı endotel dilatasyonunun gösterilmiş olması bu öngörüyü desteklemektedir (121). Bu durum eNOS'un az miktarda bulunuşunda nNOS tarafından kompansasyon sağlanıyor olmasını göstermekle birlikte, her iki enzim de fonksiyone iken aralarındaki ilişki ve diğer yolakların etkinliğinin aydınlatılması için daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır (102).

NO salınımının ABD gelişimindeki rolü çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Joannides ve arkadaşlarının, 16 sağlıklı gönüllüde radyal arterde

yaptıkları ABD çalışmalarında, NO sentez inhibitörü NG- monometil L- arjinin (L-NMMA) infüzyonu sonrası akımda benzer artış olmasına karşın, hiperemi süresi azalmış ve hiperemiye dilatasyon cevabı konstriksiyon lehine bozulmuştur (122). Lieberman ve arkadaşları, L-NMMA'nın, asetilkolin infüzyonu veya akım artışı (ABD) sonrası dilatör cevabı küntleştirdiğini ancak nitrogliserin verilmesine bağlı (endotel bağımlı olmayan) cevabı etkilemediğini göstermişlerdir (123). Doshi ve arkadaşları da ABD yanıtında NO sentezinin rolünü farklı oklüzyon pozisyonları kullanarak ortaya koymuşlardır (124). Üst kol ve bilek oklüzyonunun karşılaştırıldığı çalışmada, öncesi ve sonrasında yinelenenlere benzer şekilde, brakial arterde, proksimal oklüzyon pozisyonunda (üst kol) ABD yanıtının distal (bilek) oklüzyon pozisyonuna göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (124). Buna ek olarak bu iki grupta NO sentezinin inhibisyonu halinde, bilek oklüzyonu sonrası ABD yanıtı kaybolurken, üst kol oklüzyonu sonrası ise sadece bir miktar azaldığı gösterilmiştir. (124) Bu da distal oklüzyon pozisyonunun temel olarak NO bağımlı yolağı aktive ettiği ancak proksimal oklüzyonda, kendisi de iskemik zonda kalan brakial arterin başka mediyatörlerin etkilerine de maruz kalarak, NO- bağımsız yolaklarla da dilate olduğunu düşündürmektedir (124). Kooijman ve arkadaşları da L-NMMA ile inhibisyon yöntemini kullanarak süperfisyal femoral arterdeki ABD yanıtının da NO bağımlı olduğunu göstermişlerdir (125). ABD mekanizmasının basitçe NO sentezi ile açıklanamayacağını ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Mullen ve arkadaşlarının, kısa süreli reaktif hiperemi (5 dakikalık distal oklüzyon sonrası gelişen hiperemi) ile uzun süreli hiperemi (aralıklı 5 ila 15 dakikalık oklüzyon, elin 22 ila 45 °C'ye ısıtılması, asetikolin infüzyonu ile oluşturulan hiperemi) sonrası, L-NMMA inhibisyonun dilatör yanıta etkilerini incelemişlerdir (126). Uzun süreli hiperemi koşullarında gelişen dilatör yanıt NO sentez inhibisyonundan etkilenmez iken, kısa süreli reaktif hiperemi sonrası beklenen dilatör yanıtın L-NMMA infüzyonu ile kaybolduğu gözlenmiştir (125). Parker ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da, L-NMMA ile NO sentez inhibisyonunun bazı bireylerde ABD yanıtını azaltırken, bazılarında arttırabildiği ortaya konmuştur (127). Pyke ve arkadaşlarının yürüttüğü bir diğer çalışmada ise, L-NMMA ile NO sentez inhibisyonunun 5 ve 10 dakikalık distal oklüzyon sonrası ABD yanıtını etkilemediği gösterilmiştir (128). Bu çalışmalar sonucunda da bireylerde farklı endotel fenotiplerinin mevcut olabileceği

ve bu nedenle ABD yanıtında, endotel fenotipine göre değişen oranlarda başka yolakların katkısı olabileceği öngörülmüştür (127). NO varlığı ve sentezi, ABD çalışmalarının yorumlanmasında temel mekanizma olarak düşünülmekle beraber; başka yolakların da etkili olabileceği dikkate alınmalıdır.

Akıma bağlı dilatör yanıtta etkin olduğu düşünülen bir diğer molekül, endotel hücrelerinin artan shear stres koşullarında araşidonik asitten sentezledikleri prostasiklindir (PGI_2) (129). PGI_2, NO'ya benzer şekilde, vazodilatör ve antitrombotik olup; anti-aterojenik etkinliğe sahiptir (130, 131). NO ve PGI_2, şu ana kadar tanımlanmış en önemli kardiyoprotektif mekanizmalardandır (102). Kalsiyum bağımlı bir adımla fosfolipaz A2 tarafından araşidonik asitin serbestleştirilmesini takiben, siklooksijenaz (COX) enzimleri tarafından PGI_2 oluşturulur (102, 132). PGI_2 de, adenilat siklazı uyararak, siklik adenozin monofosfat (cAMP) üretimine ve sonucunda vazodilatasyona yol açar (101, 131). Hem NO hem de PGI_2 sentezinde ortak basamak hücre içinde artan kalsiyumdur (133,134). Aktive olmuş hücrelerden NO devamlı salınırken, PGI_2 oluşumu geçicidir (132,133). Bu durumun temel nedeni de NOS ve fosfolipaz A2'nin kalsiyum duyarlılıklarının farklı oluşudur (132,133). Fosfolipaz A2, aktivasyonun ilk anlarında intraselüler depolardan salınan yüksek düzeydeki kalsiyuma yanıt verirken, NOS hücre içine ekstraselüler alandan giren daha düşük düzeydeki kalsiyum ile aktive olur (134). NO ile PGI_2'nin artan shear stres altında birbirlerinin salınımlarını da etkiledikleri gösterilmiştir (135). NO, sağlıklı konduit arterlerde PGI_2 salınımı üzerine inhibitör olarak etki etmektedir (101,134).

NO ve prostanoidlerin koroner dolaşımda, oluşturulan metabolik uyaranı takiben gelişen akıma bağlı dilatasyon cevabı üzerinde etkin oldukları gösterilmiştir (136). Radyal arterin ABD cevabına PGI_2'nin etkinliği ile ilgili çalışmaların sonuçları ise tutarlı değildir (101). Joannides'in ve Mullen'in yürüttüğü iki farklı çalışmada, COX inhibisyonunun konduit arterlerin ABD yanıtı üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir (122,126). PGI_2'nin ABD yanıtına etkisinin kesin olarak değerlendirilebilmesi için daha fazla çalışmanın yürütülmesi gerekmektedir.

ABD yanıtı üzerinde etkili olduğu düşünülen bir diğer mekanizma da endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörün (*endothelium derived hyperpolarizing factor*,

EDHF) etkinliğidir (102). 1980'lerin sonunda endotelin dilatasyonundan NO ve PGI2'nin yanı sıra sorumlu olan ve vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona yol açan bir mediyatörün varlığına dair araştırmalar başladı (137). Endotel bağımlı relakse edici faktör olarak NO'nun gösterilmesi, 6 yıllık bir çabanın sonucunda gerçekleşmiş olsa da, EDHF tanımlandıktan sonra geçen yıllarda henüz tek bir mediyatör tespit edilememiştir (101, 136). Bunun olası nedeni endotelin vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon yapabilmesini sağlayan birbirinden farklı birkaç mekanizmanın bulunması olabilir (137,138). Dolayısı ile EDHF, endotel hiperpolarizasyonunun veya endotelden salgılanan vasküler aktif moleküllerin aracılık ettiği farklı mekanizmaların, miyositlerde hiperpolarizasyona ve relaksasyona yol açmasını tanımlamak için kullanılan kapsayıcı terimdir (138). Bu farklı yolaklar, değişik K^+ kanallarının aktivasyonunu takiben, miyositlerin hiperpolarize olmasını sağlar (136, 137). EDHF hem bazal tonusun belirlenmesi, hem de shear stres değişimine yanıtın gelişmesinde rol oynar (137, 101). Lokal olarak elin ısıtılması ile gelişen ABD yanıtına, EDHF'nin katkısı non-spesifik K^+ kanal inhibitörü tetraetil-amonyum (TEA) kullanılarak incelenmiştir. EDHF inhibisyonunun insanda radyal arterde hem bazal tonusu hem de ABD yanıtını azalttığı gösterilmiştir (139, 140). EDHF inhibisyonu ile NO inhibisyonunun her ikisinin de ABD yanıtında düşüşe yol açmasına ek olarak, bu iki faktör birlikte inhibe edildiğinde ABD yanıtının daha da fazla azaldığı gösterilmiştir (139, 140). Bu bilgiler, NO ile EDHF arasında karşılıklı etkileşim olduğunu düşündürmektedir (101). Yapılan çalışmalarda NO'nun EDHF oluşumu üzerinde negatif etkisi olduğu gösterilmiştir (141). Bu negatif etki, NO salınımının azaldığı bazı klinik durumlarda ortadan kalkacak ve EDHF'nin oluşumunun artmasına neden olacaktır. Bu durum da EDHF'nin, NO biyoavalibilitesindeki azalmanın yol açacağı azalmış dilatasyon yanıtını yeniden arttıracak şekilde kompansatuar etkinlik gösterdiğini düşündürtmektedir (142). EDHF'nin küçük arterioller üzerinde etkinliği, büyük arterlere kıyasla daha fazla olduğu için periferik vasküler rezistans, organ perfüzyonu ve kan basıncı için; özellikle NO'nun azaldığı durumlarda; önemli bir mediyatördür ve aynı zamanda sağlıklı endotelin varlığı için önemli göstergelerinden biridir. (143, 144) Tüm bu bilgiler, EDHF'nin NO salınımının azalması halinde etkinliği belirginleşen bir "yedek vazodilatör mekanizma" olduğunu düşündürtmekle beraber;

hem sağlıklı endotelde, hem de farklı hastalıklar zemininde ABD yanıtındaki rolünün belirlenebilmesi için yeni çalışmalara gereksinim vardır (101).

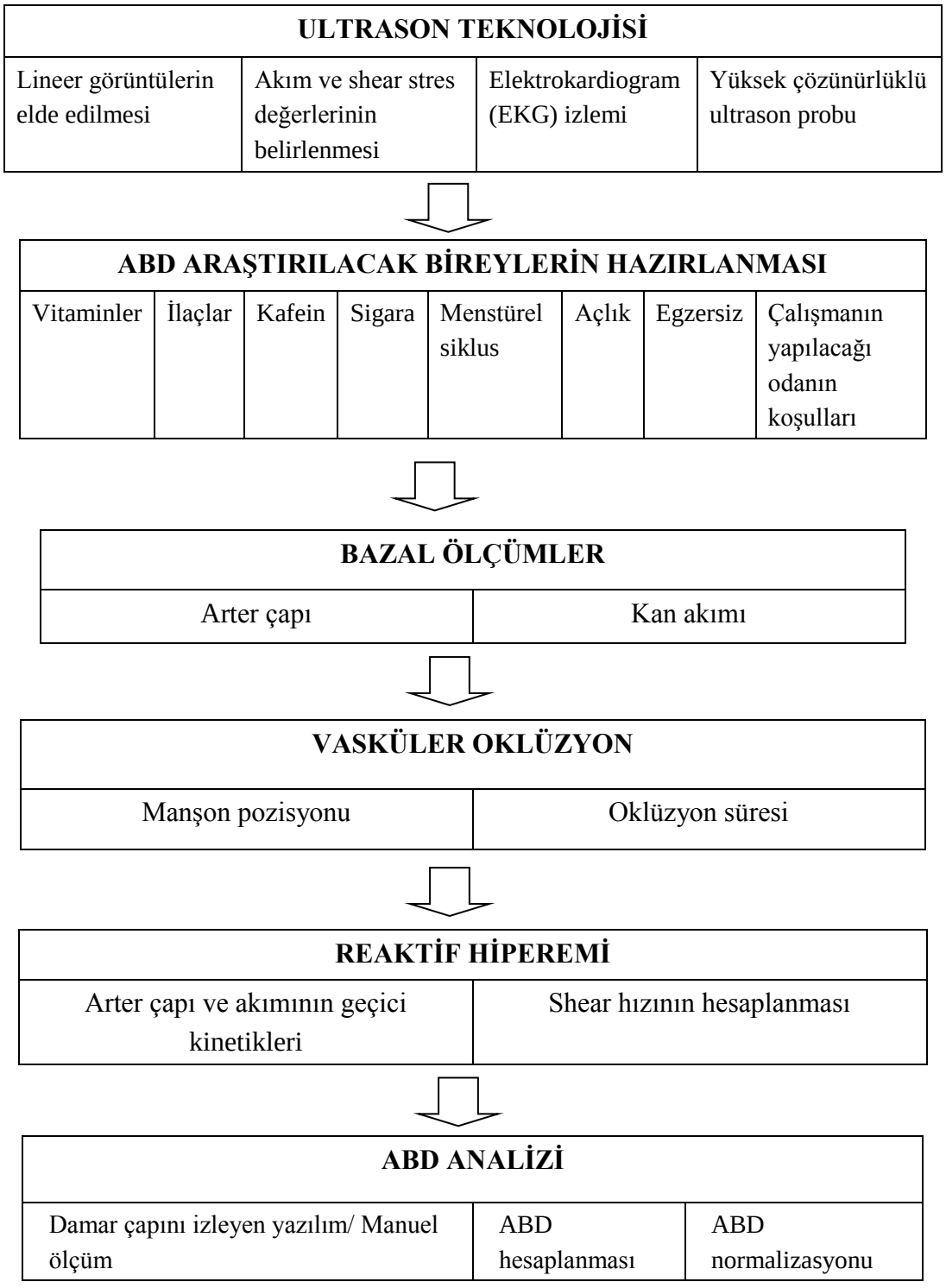
Endotelin shear stres artışına verdiği akut dilatör yanıtın haricinde bazal tonus değişimlerinin de shear stres ile şekillenebileceği düşünülmektedir. Dolayısı ile shear stres ilişkili vasküler-hareketliliğin; hem aktivasyon sonrası dilatasyon hem de dinlemindeki bazal tonus şekillenmesi şeklinde iki farklı veçhesi bulunmaktadır. Endotelin shear stres ile şekillenen bazal tonus yanıtını değerlendirmek üzere geliştirilmiş yeni bir yöntem olan "düşük akım aracılıklı konstriksiyon"un akıma bağlı dilatasyon ile korelasyon göstermeyişi de bu iki yanıtın farklı yolaklarla şekillendiğinin bir kanıtıdır. Düşük akım aracılıklı konstriksiyon flukanazol gibi sitokrom P450 enzim inhibitörleri ve aspirin gibi prostaglandin sentez inhibitörleri ile azalırken bu ajanlar ABD yanıtını değiştirmemektedir (100). Düşük akım aracılıklı konstriksiyon da ABD fizyolojisinin temelinde yer alan NO'nun inhibitörlerinden etkilenmemektedir (100). Düşük akım aracılıklı konstriksiyonun, sitokrom P450 tarafından sentezlenen endotel kaynaklı relakse edici faktör, siklooksijenaz ürünleri ve endotelin-1 varlığından etkilenmesi bu ajanların, akım aracılıklı endotel yanıtının aksine istirahat tonusunda etkili olduklarını ve bu iki yöntemin farklı yolakların etkinliğini incelediğini kanıtlamaktadır (101, 145, 146). ABD'nin bazal çaptan etkilendiği ve sağlıklı bireylerde bazal çapın daha düşük olduğu düşünüldüğünde bu iki farklı yöntemin birlikte değerlendirilmesi, ABD ile elde edilen verileri yorumlamada daha fazla bilgi sağlayabilir. Endotelin bazal durumdaki aktivasyonu ile ilgili bilgiler, uyarılara vereceği yanıtların boyut ve şeklini belirlemede yardımcı olabilir (146).

ABD yanıtının gelişiminde; NO, PGI_2 ve EDHF'nin; incelenen damar çapı ve tipi, çeşitli hastalık durumları ile ilişkili olarak değişen rolü vardır. Bu faktörlerin, farklı klinik durumlardaki etkinlikleri kesin olarak bilinemese de, bu mediyatörlerden özellikle NO'nun ABD yanıtında en belirleyici role sahip olduğu düşünülmektedir (101). Özellikle, sağlıklı bireylerde, 5 dakikayı aşmayan, distal oklüzyon aracılıklı iskemi yaratılması sonrası gelişen ABD yanıtı; temel olarak NO aktivitesini yansıtmaktadır (101). Pek çok farklı metodoloji, farklı damar yatakları ve farklı hastalık durumlarında yürütülen ABD çalışmalarından elde edilmiş bilgiler ve yeni araştırmaların ışığında, mevcut mekanizmaların rolü daha iyi anlaşılabilecektir.

2.2.3. Akıma Bağlı Dilatasyon: Teknik

ABD yöntemi; 1992'de Celermajer ve arkadaşları tarafından tanımlandığından beri geçen 20 yılı aşkın sürede, endotel fonksiyonlarına dair önemli bilgi sağlayan non-invaziv bir yöntem olarak pek çok farklı çalışmada kullanılmıştır. (39) Bu çalışmalarda birbirinden farklı bulgular elde edilmiş olması nedeniyle, ABD henüz klinik kullanıma yaygın şekilde girmemiş ve deneysel bir endotel fonksiyon inceleme yöntemi olarak kalmıştır. Bu durumun temel nedeninin ABD uygulamasına ait metodolojik farklılıklar olduğu düşünülmektedir. ABD metodolojisi ile ilgili farklı yaklaşımları, ortak bir pratiğe dönüştürebilmek için ilk olarak 2002 yılında Corretti ve arkadaşları bir kılavuz yayınlamışlardır (6). Bugüne dek 1000'den fazla çalışmada referans olarak gösterilmiş bu kılavuzun içeriği, ilerleyen yıllarda farklı metodolojik yöntemlerin kıyaslandığı çalışmalar ve başka gruplar tarafından yayınlanan kılavuzlarla zenginleştirilmiştir (7, 147). Tüm bu çabalara karşın ABD tekniğinde standardizasyon sağlanabilmesi için, halen yönteme dair cevaplanması gereken sorular mevcuttur.

ABD incelemesinin temel prensibi, akımın oklüzyon sonrası ani artışını takiben gelişen vazodilatasyonun değerlendirilmesidir. Hiperemik uyaranı takiben gelişen dilatör yanıtın belirlenmesi, pek çok farklı fizyolojik ve teknik faktörden etkilenebilmektedir. Bireylerin metabolik durumları, ölçüm için kullanılan teknikler, oklüzyonun yeri ve süresi, elde edilen verilerin yorumlanması basamaklarının her birindeki farklılıklar elde edilecek sonucu değiştirebilmektedir (47, 146, 147). ABD metodolojisine dair bir özet için söz konusu faktörlerin her birini, sistematik şekilde gözden geçirmek yararlı olacaktır.



Şekil 1. ABD ölçümü için dikkate alınması gereken temel faktörler

(*Ryan A. Harris, Steven K. Nishiyama, D. Walter Wray and Russell S. Richardson. Ultrasound Assessment of Flow-Mediated Dilation. [Hypertension. 2010;55:1075-1085]* isimli derlemeden adapte edilmiştir.)

Artan shear strese yanıt olarak gelişen vazodilatasyon; ABD yönteminde vasküler ultrasonografi ile belirlenir (39,47). Pala ve arkadaşları; 40 hastalık bir seride, ultrasonografik olarak belirlenen ABD ve sol brakial arter kanülasyonu sonrası anjiografik olarak belirlenen ABD arasında tutarlıklık olduğunu ortaya koymuşlardır (148). Ultrasonografi kullanımı, tarama amaçlı geliştirilen bu tekniğin non-invaziv ve daha düşük maliyetli olmasını sağlar. ABD ölçümleri, vasküler ultrasonografi konusunda deneyimli operatörlerce uygulandığında dahi, ultrasonografi tekniğine dair bir takım kısıtlılıklar sonucu etkileyebilir. ABD ölçümü için yüksek çözünürlüklü vasküler ultrasonografi probu kullanılması; kullanılacak cihazın vasküler inceleme için uygun yazılım ile donatılmış olması, iki boyutlu ve "pulse wave" (PW) doppler görüntüleme yapabilmesi (veya her iki yöntemi aynı anda kullanabilen dupleks özellikte olması), EKG kılavuzluğundan yararlanılabilmesi gereklidir (6). İşlem için en az 2 cm derinlikteki konduit arterlerin görüntülenmesini sağlayabilecek 7 mHz ila 14 mHz arasında yüksek çözünürlüklü lineer vasküler probların kullanılması önerilmektedir (6, 149). Damar çapı ölçümleri için klasik olarak, 2 boyutlu parlaklık modu (*2-dimentional brightness mode, B-mode*) kullanılır (150). İncelenecek olan konduit arterin, enine kesitinin alınması görüntü artefaktları ve kesit bölgesindeki değişimler sonucu çap ölçümlerinin yanlış hesaplanmasına neden olabileceği için, longitudinal kesitle görüntüleme yapılması uygundur (6, 150). Konduit arterin longitudinal kesitinin B-mod ultrasonografi görüntülenmesi, "Pignoli'nin çift çizgileri"nin belirlenmesini ve böylece incelenen damarın çapının; intimadan intimaya olan mesafenin ölçümü ile hesaplanmasını sağlar (7, 151). Arteriyel çapa sistol ile diyastolün etkileri de ölçüm sırasında dikkate alınmalıdır. Nabız basıncı arter duvarında, sistol sonunda diyastole kıyasla artan damar çapına neden olur (102). Bu nedenle sistol ve diyastol sonunda elde edilecek damar çapı arasında bir farklılık olması beklenir. Bu farklılığın ölçüme etkisinin bertaraf edilebilmesi için; EKG kullanılarak; çap ölçümlerinin diyastol sonunda (R dalgası pikinde) yapılması önemlidir (6, 149, 152). ABD yanıtının yorumlanmasında artan akım hızı ve shear stresin önemi göz önüne alındığında, PW doppler aracılığı ile akımın belirlenmesinin de gerekliliği anlaşılacaktır. Burada dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta mevcuttur. Damar çapının belirlenebilmesi için kullanılan B-modda, ultrasonografik dalgaların yöneliminin damar duvarına dik şekilde (90° açı

ile) olması gereklidir (7). Yüzeyel konduit arterlerin görüntülenmesinde kısmen kolay olarak uygulanan bu açı yönelimi ile akımın incelenebilmesi ise mümkün değildir. Akım görüntülenebilmesi için, örnek alınacak bölgenin akıma (dolayısı ile damar uzun eksenine) paralel olması; ideal olarak 0° açı ile konumlanması gereklidir (147, 149). Modern ultrasonografi yöntemleri, PW doppler örnek kesitinin açısının değiştirilebilmesini sağlar. Akım hızının gerçeğe en yakın şekilde tespit edilebilmesi için, doppler dalgaları ile damar uzun ekseni arasında ≤ 60° açı olmalıdır (147). Bu açının daha yüksek olduğu hallerde elde edilen akım hızı gerçek değerinden daha fazla bulunabilir (149). B-mod ve PW doppler ölçümlerini aynı anda yapabilen dupleks prob kullanılırken de açı düzeltici sistemler aracılığı ile açının 60° veya daha düşük olması sağlanmalıdır (149). PW doppler ile akımın belirlenmesinde dikkat edilecek bir diğer önemli nokta da, örneklem yapılacak genişlik ve bölgedir. Özellikle akımın az olduğu durumlarda daha önemli olan örneklem genişliği ve yerleşimi; laminar akıma sahip arterlerde duvara yakın bölgelerde azalan akım hızının örneklem alanına dâhil edilerek denklemi etkilemesinden kaynaklanır. Örneklemin bölgesinin, merkezdeki hızlı laminar akımdan damar çeperindeki daha yavaş akıma doğru kayması; elde edilen akım hızının daha düşük olmasına neden olur. Aynı şekilde dar ve yalnızca merkezde küçük bir alana yerleştirilmiş örneklem bölgesi kullanılması, akım hızının olduğundan fazla hesaplanmasına yol açabilir. Çok geniş örneklem alanı seçilmesi, olası hareket artefaktlarında yol açabileceği gibi damar dışına uzanarak PW doppler verilerinin sağlıklı olarak elde edilmesini engelleyebilir. Dolayısıyla PW doppler ile akıma ait veriler elde edilirken, damar duvarına kadar uzanmayan (böylece hafif hareket artefaktlarından etkilenmeyecek) ancak çok dar olmayan (akımın olduğundan daha fazla hesaplanmasına yol açmayacak) örneklem bölgesi kullanılmalıdır (149).

ABD ölçümlerinde dikkate alınması gereken bir diğer önemli nokta da ölçüm öncesinde bireylere mahsus faktörlerin kontrol edilmeleridir. Oral antioksidan (vitamin C, vitamin E ve α- lipoik asit) kullanımının endotel fonksiyonları üzerinde rolü olduğu gibi, yapılan çalışmalarda ABD yanıtını etkileyebildikleri de gösterilmiştir (52, 153). Dolayısıyla ABD ölçümü öncesinde ≥ 72 saat süreyle vitamin takviyeleri kullanımına ara verilmesi önerilir (149). Kardiyovasküler sistem ilaçları başta olmak üzere pek çok ilacın direkt veya indirekt olarak vasküler

reaktiviteyi etkilemesi, ABD yanıtının güvenilirliğini azaltabilir. Bu nedenle ABD çalışması yapılacak bireyler, ilaç kullanmakta iseler, söz konusu ilaçların yarı ömürlerinin en az 4 katı kadar öncesinden ara vermeleri önerilir (6). İlaç kullanımına ara verilmesi mümkün olmayacaksa, sonuçlar değerlendirilirken mutlaka bu durum göz önüne alınmalıdır (7). Sigara kullanımının kardiyovasküler hastalıklar ve endotel disfonksiyonu için risk faktörü olduğu bilinmektedir. Sigara kullanımının, hatta pasif maruziyetin akut olarak da ABD yanıtını azalttığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (71, 72, 154). Bireylerin ABD ölçümü öncesi en az 12 saat süreyle sigara kullanımının veya pasif olarak duman maruziyetinin önlenmesi uygundur (149). Kafein kullanımının ise çözünebilir guanilat siklazı inhibe ederek ABD yanıtını azalttığının gösterilmiş olması nedeniyle, çalışma öncesindeki 12 saat boyunca kafein içeren içeceklerin tüketilmemesi önerilir (7,149,155). Östrojen ve progesteronun NO salınımı üzerindeki etkilerine paralel olarak, menstural siklusun hangi aşamasında olunduğunun da ABD yanıtını değiştirebildiği gösterilmiştir (156, 157). Pre-menapozal kadınlarda yapılan ABD ölçümlerinin, menstural siklusun aynı döneminde gerçekleştirilmesine dikkat edilmelidir (6, 149). Akut egzersizin de ABD yanıtı üzerinde etkili olabildiği gösterilmiş olduğu için, bireylerin incelemeden önceki 12 saatlik sürede yoğun fiziksel aktiviteden kaçınması önerilir (149, 158-160). Post-prandial dönemde ABD yanıtının değiştiğine dair çalışmalar mevcuttur. Hem sağlıklı gönüllülerde hem de tip 2 diyabetli hastalarda, yağ ve karbonhidrat içeriği yoğun bir öğünün ardından ABD yanıtının azaldığı gösterilmiştir (161, 162). Bu nedenle ABD'nin en az 6 ila 8 saatlik açlık sonrası gerçekleştirilmesi önerilir. (6, 7) Ancak bu bilgilerden farklı olarak, düşük yağlı bir öğün sonrası ABD'nin etkilenmediğini ortaya koyan bir çalışma da mevcuttur (163). Açlık durumunun sağlanamadığı hallerde de ABD öncesi düşük yağ içerikli öğün alınması tavsiye edilebilir (149). ABD bazal çapa kıyasla gelişen vazodilatör yanıtın değerlendirilmesine dayanan bir tetkik olduğu için, bazal çapın uygun olarak belirlenebilmesi büyük önem taşır. İncelemeyi etkileyebilecek ortostatik ve çevresel koşulların en aza indirilebilmesi için; bireyin 10 ila 20 dakika supin pozisyonda dinlenmesi, ABD ölçümlerinin sessiz, loş ve ortam ısısının 22 ila 24 ° C'de tutulduğu bir odada yapılması gereklidir (149). ABD yanıtının diürnal bir değişim gösterdiği ve sabahın erken saatlerinde daha az olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (164,

165). Ancak sabah saatleri ile erken öğle sonrası arasında gerçekleştirilen ölçümler arasında anlamlı farklılığın olmadığını da gösterilmiştir (163). Bu bilgiler ışığında; gerek aynı bireyde tekrarlanan ölçümleri gerekse farklı gruplarının kıyaslanmasını amaçlayan çalışmalarda, ABD'nin mümkünse günün belirlenmiş bir döneminde gerçekleştirilmesinin uygun olacağı öngörülebilir (149). ABD için ardışık ölçümlerin yapılmasının gerekmesi halinde, akım bazal değerlere daha çabuk dönse de arter çapının bazal ölçüme yaklaşması için bir süre daha beklenmesi gerekebilir. Sağlıklı bireylerde, belirli bir saat aralığında gerçekleştirilen seri ABD incelemelerinde, tekrarlayan hiperemi dönemlerinin; sonuçlarda anlamlı bir farklılığa yol açmadığı gösterilmiştir (166). Dolayısıyla ABD, akım ve damar çapının bazal koşullara dönmesi beklendikten sonra aynı bireyde sonuçlarda anlamlı farklılığa yol açmaksızın tekrarlanabilir. Kılavuzlarda ABD incelemesinde bireylere mahsus bu noktalara dikkat edilmesi önerilirken, son dönemde yapılan çalışmalarda bu faktörlerin sonuca çok dramatik etkisi olmayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle tam olarak ideal koşullar sağlanamayacak olsa dahi, ABD inceleme sonuçları güvenilmez olarak değerlendirilmemelidir (49).

ABD ölçümü yapılacak mekân, ultrasonografi ve bireylere mahsus faktörler uygun olarak hazırlandıktan sonra, incelemeye bazal değerlerin belirlenmesi ile başlanır. Bazal damar çapının ve akımın belirlenmesi, hem bireyin "dinlenim koşullarında" olduğun tespiti hem de oklüzyon sonrası gelişecek shear stres ve çap artışının gözlemlenebilmesini sağlar (149). ABD, bazal değerlere göre değişimi yansıtan bir tetkik olduğu için, başlangıçta alınan ölçüm oldukça önemlidir. Bazal arter çapı ve pik çapa ulaşma süresi, ABD yanıtı ile ters orantılıdır (167). Ayrıca çapı 5mm'den daha büyük ve 2.5mm'den daha küçük arterlerde hiperemi sonrası gelişecek dilatasyon yanıtının değerlendirilmesi zorlaşır (168). Bu nedenle ideal olarak bu iki değer arasında çapa sahip bir konduit arterin seçilmesi uygundur (49). Brakial arterin bazal çapının genellikle 2.5mm ila 5mm aralığında olması, ABD çalışmalarında yaygın kullanılmasının nedenlerinden biridir (6, 49). Brakial arter dışındaki diğer konduit arterlerin kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Diğer arterlerde, akım hızı ve dilatasyon gelişiminin farklı olmasının yanı sıra, NO ve endotel disfonksiyonu ile ilişkileri, brakial arter kullanılan çalışmalardaki kadar belirgin değildir ve teknik olarak ABD uygulanması daha güçtür (7). Bu nedenle

ABD incelemesi için genellikle brakial arterin antekübital fossa yakınında görüntülenmesi tercih edilir. Bazal ölçümler alınmaya başlamadan önce proba yakın ve uzak vasküler sınırların net seçilebildiği şekilde damarın longitudinal kesitinin alındığından emin olunmalıdır. ABD incelemesinde damar çapı ölçümleri için intima tabakasından karşı duvarın intimasına olan mesafe seçilmelidir (7, 149). Adventisya tabakasından adventisyaya ölçüm alınacak olursa, bazal çap olduğundan daha büyük olarak belirlenecek ve dilatasyon sonrası çap ile oranına bakılacağı için ABD olduğundan daha düşük tespit edilecektir (149). Manuel ölçümlerdeki yanılma payı nedeni ile mümkün olan durumlarda, damar çapını takip ederek otomatik ölçüm alabilen yazılımların kullanılması tavsiye edilmektedir (149). Bazal değer için tek ölçüm alınması, değişkenliği arttıracağı için; birkaç kardiyak siklusta ölçüm alınıp; bu değerlerin ortalamasının kullanılması önerilir (6). Yine bazal ölçüm sırasında anatomik belirteçler ile ölçüm alınan yerin tanımlanması, tekrarlayan ölçümlerin aynı yerden alınmasını güvence altına alacaktır (6). İnceleme sürecince, brakial arter görüntüsünün aynı yerden alınmasının sağlanabilmesi için prob tutuculu bir düzenek de kullanılabilir (6). Tekrarlanan ölçümlerde de prob pozisyonunun medyal epikondil gibi yakında bulunan anatomik yapılarla ilişkisinin not edilmesi ve buna dayanarak yeniden yerleştirilmesinin ABD sonuçlarındaki değişkenliği azaltabildiği de gösterilmiştir (169). Brakial arterin net şekilde görüntülendikten sonra, hem probun pozisyonunun hem de ölçüm alınan bölgenin yakınlarındaki anatomik yapıların belirlenerek tanımlanması, inceleme güvenilirliğini arttıracağı için önemlidir. Bazal akıma ait veriler elde edilirken dikkat edilmesi gereken nokta, akım hızının, dinlenim halinde dahi atımdan atıma değişkenlik göstermesi nedeni ile birkaç değerin ortalamasının alınmasıdır (149).

Bazal ölçümler alındıktan sonra, vasküler oklüzyon aşamasına geçilir. Manşon pozisyonu ve oklüzyon süresinin ABD cevabına etkili oldukları bilindiği için bu iki noktaya dikkat edilmelidir. Coretti'nin 2002 yılında derlediği kılavuzda, manşon ile oklüzyonun hem üst hem ön koldan yapılabileceği belirtilmişse de ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalar sonrası, ABD ölçümlerinin görüntülenen arterin distalinde (brakial arter için ön kolda) oklüzyon yapılarak alınması önerilmiştir (6, 49, 149, 170). Agewall ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, üst kol oklüzyonu sonrası; brakial arter dilatasyonunun önkol oklüzyonuna kıyasla; akım

artışı aynı olmasına karşın daha fazla olduğu gösterilmiştir (171). Bunun nedeni, üst kol oklüzyonunda, kendisi de iskemik bölgede kalan brakial arterin dilatasyonunun NO dışı mediyatörlerden de etkilenmesidir (170). Üst kol ve bilek oklüzyonunun, karşılaştırıldığı bir çalışmada; üst kol oklüzyonu sonrası elde edilen ABD değerleri bilek oklüzyonuna kıyasla daha yüksek izlenmiştir. NO inhibisyonu sonrası bilek oklüzyonu ile brakial arter dilatasyonu kaybolurken, üst kol oklüzyonunda dilatasyon yanıtı sadece kısmen azalmıştır (172). Bu çalışma da, distal oklüzyon pozisyonunun proksimal oklüzyona kıyasla daha fazla NO bağımlı olduğunu göstermiştir (171). Üst kol ve önkol oklüzyonunu kıyaslayan bir diğer çalışmada da, hem üst kol oklüzyonunda daha yüksek ABD değerleri elde edildiği, hem de maksimum dilatasyonun gelişmesinin 22 saniye geciktiği gösterilmiştir (173). Sekiz sağlıklı bireyle yapılan küçük bir çalışmada ise, üst kol, ön kol ve bilek oklüzyonu; egzersiz ile kombine edilerek karşılaştırılmıştır. Oldukça az hasta ile yapılan bu çalışma, hem proksimal ve distal oklüzyonda farklılık olabileceğini, hem de oklüzyon sırasında egzersiz yapılmasının dilatör yanıtı arttırabileceğini göstermiştir (174). Bilek oklüzyonu sonrası akım artışı ve ABD'nin; üst kol ve ön kola kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir (174). Literatürde bu küçük çalışma dışında ön kolun sadece bilek kısmından oklüzyonu ile proksimal bölgeden oklüzyonunu kıyaslayan örnek yoktur. Dolayısıyla kılavuzların akım oklüzyonu için önerdiği manşon pozisyonunun ön koldaki yerleşimi net değildir (49,149,170). Uygun oklüzyon pozisyonu belirlendikten sonra manşon 250mmHg veya sistolik kan basıncından 50mmHg daha yüksek seviyeye getirilerek şişirilir. Farklı oklüzyon zamanlarını kıyaslayan bir çalışmada, maksimum cevabın 4.5 dakika sonrası tüm bireylerde geliştiği ve uzayan oklüzyon süresinin dilatör yanıt üzerinde anlamlı etkisi olmadığı gösterilmiştir (175). Bu çalışmanın sonuçlarıyla çelişen şekilde, 10 dakikalık oklüzyon sonrası ABD yanıtında artışın izlendiği de bildirilmiştir (176). 5 dakika ve 10 dakika oklüzyon süresinin kıyaslandığı bir çalışmada 10 dakikalık oklüzyon sonrası yapılan ABD incelemesinin NO inhibisyonundan etkilenmediği gösterilmiştir (125). Dolayısıyla oklüzyon süresi uzadıkça, ABD yanıtı NO dışında mediyatörlerden etkilenmekte ve endotel fonksiyon belirteci olarak güvenilirliğini kaybetmektedir. Manşonun yüksek basınçta şişirileceği ve distal akımın engelleneceği sürenin ideal olarak 5 dakika olması önerilir (6, 49, 149). Bu sürenin ardından manşon hızlıca indirilerek akımın

ani artışı sağlanır. Akım artışını takiben endotel aracılıklı dilatasyon yanıtının görüntülenmesine geçilir.

Manşonun indirilmesini takiben gelişen akım artışı ve dilatasyonun görüntülenmesinde dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. 2002 yılındaki Coretti'ye ait kılavuzda, çap ölçümlerinin manşonun inişini takip eden 60. saniyede yapılması önerilmekte idi (6). Ancak daha sonra yapılan çalışmalar tek bir ana ait kayıt alınmasının ABD'nin gerçek değerini tespit etmede yetersiz kalacağını ortaya koymuştur. Black ve arkadaşlarının genç ve yaşlı sağlıklı bireylerde yaptıkları bir çalışmada, yalnızca 60. saniyeye ait veri kullanılırsa, gençlerin %42'sinde ve yaşlı grubun tamamında ölçülen ABD değerinin gerçek değerden daha düşük olarak tespit edileceği ortaya konmuştur (177). Dilatasyon yanıtı 120 saniyeye kadar izlenirse, genç ve yaşlı aktif bireylerde ABD yanıtının tutarlı olarak belirlenebileceği gösterilmiştir (177). Yaşlı sedanter bireylerde ise, izlem süresinin 120 saniyeye çıkarılmasına karşın %17 oranında gerçekte olduğundan daha farklı ABD değerleri elde edilebileceği de gözlenmiştir (177). ABD ölçümü yapılırken, görüntülerin manşon indirilmeden önceki 10. saniyeden; manşonun indirilmesini takip eden 2. dakikaya kadar alınması önerilir (149). Hiperemi periyodunda belirlenmiş zaman aralıklarında görüntü alınması; maksimum çapla ilgili verileri sağlamada yetersiz kalabileceği için, mümkün olan hallerde devamlı çap ölçümü yapan otomatik yazılımlar aracılığı ile görüntü alınması önerilir (149, 170). Otomatik yazılım kullanımı mümkün olmayacaksa 2 dakikalık sürede sık olarak görüntü alınması da alternatif bir yöntemdir (149). Vazodilatasyonun en fazla olduğu zamanın, bireyler arasında ve aynı bireyde zaman içerisinde farklılık gösteriyor oluşunun endotel fonksiyonları açısından önemli olabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan yeni çalışmalar, maksimum çapa ulaşma süresinin daha az NO bağımlı olduğunu ve ABD'ye ek olarak yeni bir bilgi sağlamadığını göstermiştir (170, 178). Oklüzyon sonrası maksimum çapa ulaşılan süre ile maksimum akımın izlendiği süre farklıdır (7). Oklüzyon sonrası dönemde akım genellikle ilk 15 saniye içerisinde maksimum değerine ulaşır ve akım ölçümlerinin 15 saniyeden geç olmayacak şekilde yapılması önerilir (7). Dupleks prob ile eş zamanlı çap ve akım ölçümü alınmasına imkân yoksa veya çözünürlüğü daha iyi olduğu için B-mod kullanılmak istenirse akım ölçümlerinin ilk 30 saniye içinde yapılıp, ardından çap ölçümleriyle devam edilmesi

tavsiye edilir (7). Thijssen ve ekibine ait bir çalışmada; otomatik sistemlerle sürekli akım izlem yapılarak elde edilen shear stres eğrisinin değil; 30 ve 60. saniye gibi belirli zamanlarda ölçülen akım ile hesaplanan shear stresin ABD yanıtı ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (179). Dolayısı ile akım ölçümlerinin oklüzyon sonrası belirli zamanlarda yapılması uygun bir yaklaşımdır (7).

Bazal ve oklüzyon sonrası verilerin toplanmasını takiben ABD ölçümüne geçilebilir. ABD değerini verecek olan denklem şu şekildedir (149):

$$ABD\ (\%) = \frac{maksimum\ çap - bazal\ çap}{bazal\ çap} \text{ x } 100$$

ABD'nin yalnızca maksimum çap ile bazal çapın farkının bazal çapa oranlanması olarak değerlendirilmesi, sağladığı önemli bilginin gözden kaçırılmasına neden olur. Basitçe ABD hesaplanmasına bakıldığında daha küçük bazal damar çapının, vasküler reaktiviteden bağımsız olarak daha yüksek ABD değerlerine yol açacağı öngörülebilir (147). Dolayısıyla ABD çalışmalarında veriler değerlendirilirken sadece yüzde ABD değeri değil, bazal çap, mutlak çap artışının miktarı ve shear hız da dikkate alınmalıdır (49, 149).

Shear hız dupleks prob ile elde edilen akım eğrisinin altında kalan alan aracılığı ile hesaplanabilir (179). Dupleks prob ile devamlı akıma ait veriler alınamayacaksa, akıma dair ölçümlerden shear hızın hesaplanması için basitleştirilmiş formüller kullanılabilir. Bu konuda tavsiye, PW örneklem bölgesi geniş olarak alınarak, shear hızın; 8 x maksimum akım/ çap denklemi ile hesaplanmasıdır (149). ABD ölçümlerinin temel uyaranının artan shear stres olduğu düşünülerek, shear stres ile ABD yanıtının normalize edilmesinin değeri araştırılmıştır. Buradaki ilk önemli nokta, maksimum shear stresten ziyade, artış karakteristiğinin ABD yanıtına etkin olduğunun gösterilmiş olmasıdır (180). Shear hıza göre elde edilen ABD değerini normalize edebilmek için de shear hız ile ABD yanıtı arasında en azından orta düzeyde korelasyon olması gereklidir. Ancak yapılan çalışmalar shear hız ile ABD yanıtı arasında genç sağlıklı bireylerde zayıf bir

korelasyon olmakla beraber diğer gruplarda böyle bir ilişkinin kurulamayacağını göstermiştir (179). Shear hız ile ABD yanıtı ilişkisi lineer bir ilişki olmaktan ziyade, birkaç farklı basamakla bağıntılıdır. Shear stres uyarısının karakteri (süre, değer), shear stresin düz kas hücrelerince algılanması, vazodilatör uyarana düz kas hücrelerinin kalsiyum konsantrasyonu değişimleri aracılığıyla vereceği yanıt ve damar duvarının özellikleri, ABD ile shear hız ilişkisinde rol oynar (7). ABD tüm bu etkilerin ortak sonucunun ölçülmesine dayandığı için sadece shear hız ile normalize edilmesi uygun bir yaklaşım olmayacaktır. Halen devam eden tartışmalar olmakla beraber, henüz ABD yanıtını, bireyler arasında normalize etmek için shear hıza oranlamak tavsiye edilen bir yaklaşım değildir (149).

Endotel ilişkili vazodilatasyonu belirleyen ABD ölçümleri yapılırken egzojen NO donörleri ile maksimum dilatör yanıtın belirlenmesi eski çalışmalarda sıkça kullanılmış olan tamamlayıcı bir yöntemdir. Nitrogliserin ile düz kas hücrelerinde NO aracılıklı dilatasyon oluşturularak 3 ila 4. dakikalarda görüntü alınmasıyla endotel bağımlı olmayan dilatör yanıtın değerlendirilmesi, ABD verilerinin elde edilmesini takiben yapılabilir (6). Ancak son dönemde yürütülen pek çok ABD çalışmasında NTG ilişkili dilatasyon değerlendirilmediği gibi, Corretti'den sonra yazılan kılavuzlarda da tavsiye edilmemiştir (7, 49, 149).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Hasta Alımı

Çalışmaya 18 ila 55 yaş arasında, bilinen kronik hastalığı olmayan, İbni Sina Hastanesi Kardiyoloji ve Geriatri Ana Bilim Dalında görev yapmakta olan sağlıklı erkek ve kadın gönüllüler alınmıştır. Çalışmaya katılan bireylerin hipertansiyon, diyabetes mellitus, hipertansiyon, kronik böbrek hastalığı, koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı, geçirilmiş serebrovasküler hastalık anamnezi yoktu. Katılımcılar sigara kullanımı açısından sorgulandı, aktif sigara içicileri çalışmaya dâhil edilmedi. Katılımcılar vazoaktif ilaç kullanımı açısından da sorgulandı ve ilaç kullanımı olan bireyler çalışmaya dâhil edilmedi. Sağlıklı 50 gönüllü Nisan 2014 ile Haziran 2014 tarihleri arasında ABD ölçümleri ile değerlendirildi.

Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerin kırk yedisi 6 saat açlık sonrası incelemeye alındı. Üç gönüllü düşük yağ içerikli öğün sonrası değerlendirildi. Bireylerden 12 saat öncesine dek kafein içerikli içecekler tüketmemeleri ve yoğun egzersiz yapmamaları istendi. Kadın gönüllülerin menstürasyon dönemi sonrasında ölçümleri alındı. Tüm incelemeler saat 08:00 ila 12:00 arasında, ısının 22 ila 25 °C arasında olduğu sessiz ve hafif ışıkla aydınlatılmış İbni Sina Hastanesi ekokardiyografi laboratuarında gerçekleştirildi.

3.2. Akıma Bağlı Dilatasyon

Brakial arter ultrasonografi incelemeleri, uygun koşullar sağlandıktan sonra aynı operatör tarafından İbni Sina Hastanesi ekokardiyografi laboratuarında gerçekleştirildi. Ölçümler konuyla ilgili olarak hazırlanmış kılavuzlar ve derlemelerdeki öneriler doğrultusunda gerçekleştirildi (6, 7, 49). ABD ölçümü öncesi bireylerin boy ve vücut ağırlıkları belirlendi. Ölçüm öncesi hastalar 10 dakika supin pozisyonda dinlendi ve kan basıncı ile nabız hızları kaydedildi. Brakial arter görüntülemesi için Vivid 7 ultrasonografi cihazı (Vivid 7, Wipro GE Healthcare, GE Medical Systems Inc, Chicago, U.S.A) ve 12 MHz lineer vasküler ultrasonografi probu kullanıldı. Bütün ölçümler aynı operatör tarafından gerçekleştirildi. Brakial arter görüntüleri kaydedilerek, değerlendirmeler ölçüm sonrası elde edilmiş kayıtlar

üzerinden yapıldı. Oklüzyon pozisyonunun ABD ölçümleri üzerindeki etkisini incelemek için planlanmış olan çalışmada iki farklı manşon yerleşimi kullanıldı. Proksimal oklüzyon pozisyonu için manşon antekubital fossanın 3 ila 4 cm distaline yerleştirildi. Distal oklüzyon pozisyonu içinse manşon; distal ucu stiloid çıkıntılar hizasına gelecek şekilde yerleştirildi. Aynı bireyde, her iki oklüzyon pozisyonuna ait ölçümler aynı gün içerisinde değerlendirildi. İlk pozisyonda alınan ölçümler sonrası bireyler 20 dakika dinlendirildi. Kan basıncı, nabız, brakial arter çapı ve akım hızı ilk ölçümde elde edilen bazal değerlere döndükten sonra diğer oklüzyon pozisyonu ile ikinci ölçüme geçildi. Bireylerde gerçekleştirilecek ABD ölçümlerindeki oklüzyon pozisyonlarının sırası randomizasyon ile belirlendi. On dakika supin pozisyonda dinlendirildikten sonra, brakial arter antekübital fossanın 4 ila 5 cm yukarısındaki 5-7cm'lik uzunluğu boyunca görüntülendi. Brakial arterin tortüyozite göstermediği, intimal tabakanın net olarak görüntülendiği pozisyon elde edildikten sonra probun yerleştirildiği kısım cilt yüzeyinde kullanılan kalem ile işaretlendi ve çevresindeki anatomik yapılar not edildi. Prob için uygun yerleşimin belirlenmesinin ardından bazal ölçümlere geçildi. Dupleks prob kullanılmaması nedeni ile B-mod aracılığı ile çap, PW doppler aracılığı ile akım ölçümleri gerçekleştirildi. Bazal çap, EKG'de R dalgasının tepesine gelecek şekilde diyastol sonunda 3 defa ölçüldü ve ortalaması alındı. Bazal çap ölçümünün ardından uygun örneklem genişliği seçilerek PW dopler aracılığıyla bazal akım ölçümü gerçekleştirildi. Daha sonra randomizasyonla belirlenen oklüzyon pozisyonuna yerleştirilmiş olan manşon, 250mmHg'ye dek şişirildi. Beş dakikalık oklüzyon süresi sonrası manşon hızlıca indirilerek diğer ölçümlere geçildi. Oklüzyon sonrası çap ölçümleri de EKG'de R dalgasının tepesine gelecek şekilde diyastol sonunda alındı. Oklüzyon sonrası brakial arterdeki akım (hiperemi cevabı) 10.ila 15. ve 25. İla 30. Saniyeler arasında uygun örneklem genişliği kullanılarak PW doppler ile belirlendi. Akım ölçümleri kaydedildikten hemen sonra, brakial arter çapı için ölçümler gerçekleştirildi. Oklüzyon sonrası çap ölçümleri 15, 30, 60, 90 ve 120. saniyelerde alındı. İlk oklüzyon pozisyonunda ABD ölçümlerinin alınmasının ardından bireyler 20 dakika dinlendirildi. Yirmi dakikalık dinlenim ardından kan basıncı, nabız, bazal çap ve akım ölçümleri tekrarlandı. Bazal çap, üç farklı diyastol sonu ölçümün ortalaması olarak alındı. Bazal çap ve akımın başlangıç değerlerine döndüğü teyit edildikten ve kayıtlar alındıktan sonra

randomizasyona uygun olarak ikinci oklüzyon pozisyonuna yerleştirilmiş olan manşon 250mmHg düzeyine dek şişirildi. Beş dakikalık oklüzyon ardından manşon hızlıca indirilerek, tanımlanmış olan protokole uygun şekilde görüntüler alındı. Tüm görüntülerin elde edilmesinin ardından, kayıtlar üzerinden çap ve akım ölçümleri yapıldı. Tüm veriler hazırlanmış olan çalışma formuna not edildi. Proksimal ve distal oklüzyon pozisyonlarında elde edilen değerler, her iki pozisyon için ABD değerlerinin ölçülmesi için kullanıldı. Elde edilmiş olan maksimum çapın bazal çaptan farkının, bazal çapa oranlanması ile ABD değeri belirlendi.

$$[ABD = (maksimum\ çap - bazal\ çap) \div bazal\ çap\ ]$$

3.3. İstatistiksel Analiz

Sayısal değişkenler ortalama ± standart sapma (SD), minimum, maksimum ve median değerleri olarak; kategorik değişkenler ise frekans ve yüzde olarak ifade edildi. Sağlıklı gönüllülerde farklı manşon oklüyon pozisyonlarının ABD sonuçları üzerindeki etkisini izleyen çalışmada; aynı hastada biri proksimalden ve diğeri distalden gerçekleştirilen oklüzyon sonrası ABD ölçümleri yapıldı. Ölçüm sırasının sonuçları etkileme potansiyeli düşünülerek, ölçüm sırası randomize edildi. Buna göre randomize bir şekilde bazı hastalarda ilk ölçüm proksimal diğerlerinde ise distal oklüzyon sonrası alındı. Proksimal ve distaldeki ölçümlerin istatistiksel olarak farklı olup olmadığını test etmek için rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model (*random intercept mixed effects model*) kullanıldı. Bu modelde proksimal ve distaldeki ölçümlerin farklılığı değerlendirilirken, ölçüm sırasının ve bazal çapın olası etkileri de düşünülerek bu değişkenler de modele eklendi ve bu şekilde proksimal ve distal oklüzyon sonrası ABD değerlerindeki farklılıklar; bu etkenlere göre düzeltilerek elde edildi. Diğer değişkenlerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösterenlerde paired t testi, normal dağılım göstermeyenlerde ise Wilcoxon testi kullanıldı. Analizlerde p değerinin $<0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Özellikler

Sağlıklı gönüllülerde manşon oklüzyon pozisyonunun ABD ölçümü üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışmada, 50 sağlıklı gönüllü değerlendirildi. Çalışmaya katılan gönüllüler İbn-i Sina Hastanesi Kardiyoloji ve Geriatri Ana Bilim Dalı bünyesinde görev yapmakta olan sağlık çalışanlarıydı. ABD ölçümleri yapılmadan önce, gönüllülerin demografik (yaş ve cinsiyet) ve antropometrik (boy ve kilo) bilgileri ile çalışma öncesi kalp hızları ve kan basınçları kaydedildi.

Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerin %54'ü kadın, %46'sı erkek olup yaş ortalaması 31,9 ± 9,5 idi. Katılımcıların ortalama vücut kütle indeksi (VKİ) değerleri 25,1 ± 4,6 kg/m^2, başlangıçta değerlendirilen sistolik kan basıncı 112,7 ± 14,5 mmHg, diyastolik kan basıncı 76,9 ± 11,1 mmHg ve kalp hızı 74,3 ± 9,5 atım/dakika idi. Çalışma grubuna ait genel bilgiler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerin genel özellikleri

	Yaş (yıl)	**VKİ (kg/m^2)**	**SKB (mmHg)**	**DKB (mmHg)**	**Kalp Hızı (atım/dk)**
Ortalama ± SD	31,9 ± 9,5	25,1 ± 4,6	112,7 ± 14,5	76,9 ± 11,1	74,3 ± 9,4
Median	30	25,3	110	80	74
Minimum	19	17,0	90	60	55
Maksimum	53	33,8	145	100	96

DKB: diyastolik kan basıncı, SD: standart deviasyon, SKB: sistolik kan basıncı, VKİ: vücut kitle indeksi.

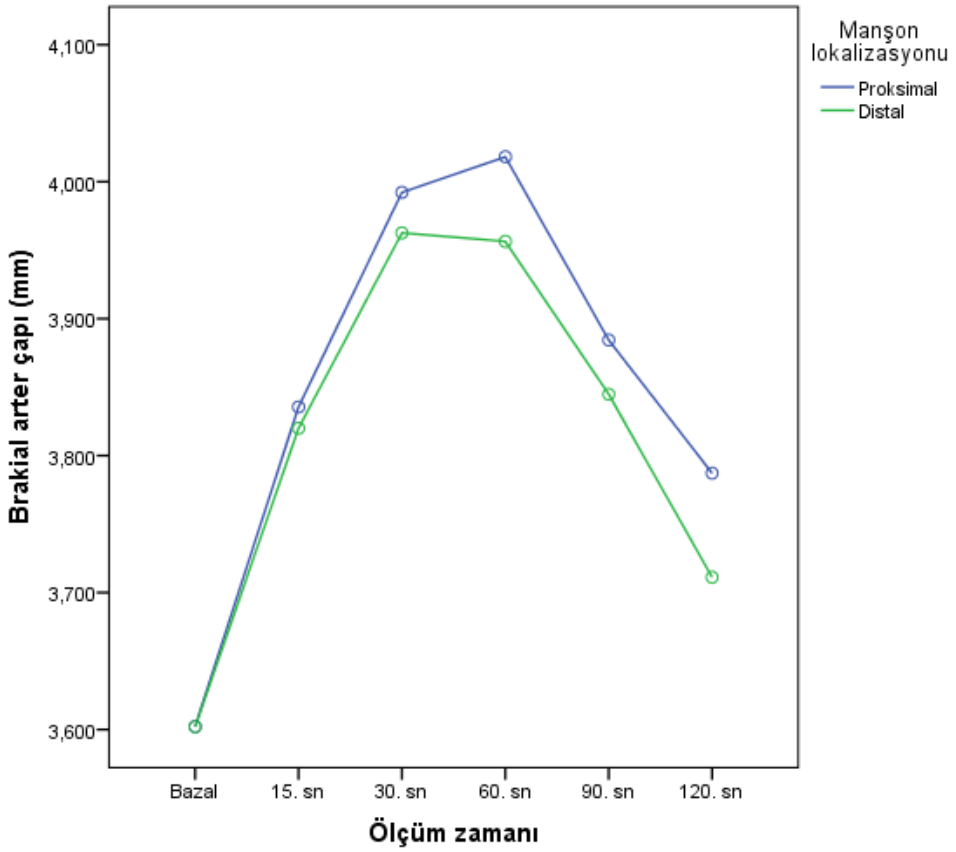
4.2. Akıma Bağlı Dilatasyon ile İlgili Ölçümler

Sağlıklı gönüllülerde uygun hazırlık sonrası yapılan ABD ölçümlerinde iki farklı manşon oklüzyon pozisyonu kullanıldı. Katılımcıların proksimal ve distal manşon oklüzyon pozisyonlarındaki ABD ölçümleri aynı gün içerisinde, ortalama 20 dakikalık bekleme süresi ardından bazal değerlere dönüş sonrası randomizasyon ile belirlenen sıraya göre yapıldı. Gönüllülerin proksimal ve distal oklüzyon ile ABD ölçümlerindeki bazal çap, bazal akım ve oklüzyon sonrası maksimum çapa ulaşma süreleri (t_{max}) değerlendirildi. Proksimal ve distal oklüzyon pozisyonlarında gerçekleştirilen ABD ölçümleri öncesi bazal çap için yapılan karşılaştırmada anlamlı farklılık izlenmemiş olup p değeri 0,97 olarak bulunmuştur. Bazal akımlar arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmayıp p değeri 0,53 olarak hesaplanmıştır. Her iki oklüzyon pozisyonu sonrası gerçekleşen maksimum dilatasyonuna ulaşma zamanı da benzer olup, p değeri 0,74'tir. Katılımcıların proksimal ve distal oklüzyon ile ABD ölçümlerindeki bazal çap, bazal akım ve oklüzyon sonrası maksimum çapa ulaşma süreleri (t_{max}) Tablo 2'de özetlenmiş, brakial arter çapının zamanla değişimi Şekil 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Proksimal ve distal oklüzyon pozisyonlarında bazal çap, bazal akım ve maksimum çapa ulaşma sürelerinin karşılaştırılması

		Ortalama± SD	Median	Minimum	Maksimum	p
Bazal çap (mm)	**Proksimal**	3,62±0,55	3,63	2,75	4,72	0,97
	Distal	3,60±0,56	3,61	2,74	4,76	
Akım (cm/sn)	**Proksimal**	81,71±19,92	80,22	49,22	130,97	0,53
	Distal	81,01±18,61	81,89	48,59	130,47	
t_{max} (sn)	**Proksimal**	48,60±24,54	60	15	120	0,74
	Distal	46,20±23,25	30	15	90	

SD: standart deviasyon, t_{max}: oklüzyon sonrası maksimum çapa ulaşma süresi



Şekil 2. Brakiyal arter çapının zamana göre değişimi

Şekil 2'de de görüldüğü gibi ABD sırasında brakial arter çapı 30 ila 60. saniyeler arasında maksimuma ulaşmaktadır. Proksimal lokalizasyonda maksimuma ulaşma zamanı biraz daha gecikse de aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,74).

Bazal çap ve sıra etkisine göre düzeltmiş maksimum akımın proksimal oklüzyonda distal oklüzyona kıyasla sayısal olarak fazla olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığı görüldü (beta = 8,79; p = 0,307). Proksimal ve distal oklüzyon pozisyonları sonrası oluşan maksimum akımın bazale göre değişiminin (maksimum reaktif hiperemi) sıra ve bazal çapa göre düzeltilerek değerlendirilmesinde ise proksimaldeki akım değişikliği distale göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (beta=18,56; p=0,03).

4.3. Proksimal ve Distal ABD Değerlerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda ölçüm sırasının sonucu etkileyebilme potansiyeli olduğu düşünülerek proksimal ve distal ABD ölçümlerinin sırası randomize edildi. ABD değerinin, bazal çap ve maksimum dilatasyon sonrası çap arasındaki farkın, bazal çapa oranlanarak elde edilmesi nedeniyle, bazal çap değerinden etkilenebileceği öngörüldü. ABD değerlerinin karşılaştırılmasında hem ölçümde kullanılan randomizasyon ile belirlenmiş sıralamaya, hem de bazal çapa göre düzeltme yapılarak "rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model" uygulandı. Kullanılmış olan "rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model" şu şekilde oluşturuldu:

$$ABD = \beta_0 + \beta_1 * Proximal + \beta_2 * Sıra1 + \beta_3 * BC + \beta_4 * (Proximal * Sıra1) + u_0 + e$$

ABD: akıma bağlı dilatasyon, *BC*: bazal çap.

Modeldeki β_0 kesim noktasının, β_1 proksimal ölçümün (distal ölçüme kıyasla), β_2 sıranın, β_3 bazal çapın, β_4 proksimal ölçüm ile sıra etkileşiminin katsayılarını, u_0 kesim noktasının değişkenliğini, e ise rastgele hataları tanımlamaktadır. Modelde kullanılan bu özelliklere göre ortalama ABD değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili modelde kullanılan parametreler için elde edilen ortalama ABD değerleri

	Ortalama (Standart Hata)	%95 Güven Aralığı
Proximal	13,88 (0,47)	12,96-14,81
Distal	12,12 (0,47)	11,20-13,05
Sıra1	13,20 (0,47)	12,27-14,12
Sıra2	12,81 (0,47)	11,89-13,74
Proximal - Sıra1	13,86 (0,67)	12,53-15,20
Distal - Sıra1	12,53 (0,67)	11,19-13,86
Proximal - Sıra2	13,91 (0,67)	12,57-15,24
Distal - Sıra2	11,72 (0,67)	10,38-13,05

Tablo 3'teki değerlere bakıldığında proksimalden yapılan ABD ölçümlerinde distale kıyasla biraz daha büyük değerlerin elde edildiği görülmektedir. Benzer şekilde birinci sırada alınan ölçümlerin de ikinci sırada alınan ölçümlere göre biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu bulgu, aradaki fark çok büyük olmamakla birlikte, sıra etkisinin dikkate alınmasının uygun olacağını düşündürmektedir.

Tablo 4. Rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model kullanılarak elde edilen kestirim değerleri

	Kestirim	**Standart Hata**	**p***	**%95 Güven Aralığı**
β_0**: Kesim noktası**	18,57	2,65	<0,001	13,25; 23,90
β_1**: Proksimal vs. Bazal**	2,19	0,97	0,027	0,26; 4,12
β_2**: Sıra**	0,81	0,97	0,405	-1,12; 2,74
β_3**: Bazal çap**	-1,90	0,75	0,015	-3,41 -0,40
β_4**: Proksimal*sıra**	-0,85	1,65	0,607	-4,17; 2,46
σ_e^2: $Varyans\ (e)$	6,41	1,31		
$\sigma_{u_0}^2$: $Varyans(\ u_0)$	4,38	1,70		

*: p değeri rastgele kestirim noktası içeren karışık etkili modelden bulunmuştur.

Oluşturulan modelin parametre kestirim değerleri Tablo 4'te gösterilmiştir. Buna göre ölçüm sırasının etkili olmadığı (p = 0,405), bazal çapın ise modeli istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilediği görüldü (p=0,015). Bazal çapın büyük olması ABD değerinin daha düşük olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu iki faktöre göre düzeltilmiş olarak yapılan analizde proksimal ve distal oklüzyon pozisyonları kullanılarak gerçekleştirilen ABD ölçümleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p=0,027). Buna göre proksimal ölçümlerde ABD değeri distal ölçümlere kıyasla ortalama %2,2 daha yüksek bulunmaktadır (%ABD farkı).

5. TARTIŞMA

Ateroskleroz ve ilişkili klinik durumlar tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (1, 2). Başlangıcından sonra klinik bulgu verene kadar geçen latent dönemde ateroskleroz, patofizyolojisindeki önemli basamaklardan endotel disfonksiyonunun tespiti aracılığıyla tanınabilir. Endotel fonksiyonlarıyla ilgili testlerin en yaygın kullanılanları, endotelin çeşitli fizyolojik ve farmakolojik ajanlara NO aracılıklı verdiği yanıtın incelendiği vazomotor aktivite ile ilgili olanlardır. Endotelin vazomotor aktivitesini yansıtan fonksiyonel testler arasında en yaygın kullanılan 1992 yılında Celermajer ve arkadaşlarının geliştirdiği "Akıma Bağlı Dilatasyon"dur (5). ABD, kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir, non-invaziv, düşük maliyetli bir tetkik oluşu ve koroner arterlerdeki endotel fonksiyonlarını yansıtabilmesi nedeni ile bu amaçla kullanılabilecek ideal yöntemdir. (42) ABD, akımın ani artışını takiben gelişen shear stresteki değişimin endotel tarafından algılanarak dilatasyon cevabı oluşmasına dayanan bir ölçümdür. Bu cevabın gelişiminde temel mekanizma olarak NO gösterilmesine karşın, prostoglandinler ve EDHF gibi başka mediyatörlerin de değişen oranlarda rolü olduğu bilinmektedir (102).

ABD yanıtının aterosklerotik hastalığı olan bireylerde azaldığı bilinmektedir. (49) Aynı zamanda aşikâr hastalığı olmayanlarda da aterosklerozun klasik risk faktörlerinden diyabet, ileri yaş, hipertansiyon, hiperlipidemi ve sigara kullanımının ABD yanıtını azalttığı gösterilmiştir (51-74). Sadece bilinen risk faktörlerin varlığında ABD yanıtının azaldığını söylemek klinik kullanışlılığını yeterli olarak tanımlamayacaktır. ABD'nin henüz klinik ateroskleroz gelişimi olmayan bireylerde klasik risk faktörlerine ek olarak değerlendirmesinin öngördürücülüğü arttırabileceği gösterilmiştir (75-81). Aterosklerotik hastalığı mevcut olan bireylerde de ABD prognozu belirlemede kullanılabilir (46, 82-85). Ancak ABD'nin, klinikte hali hazırda kullanılan prognostik kriterlere ek bilgi sağlamadığına dair çalışmalar da mevcuttur (86-88). ABD kullanışlılığına ilişkin çok sayıda çalışmanın yanı sıra, bu olumsuz sonuçların da varoluşu kullanılan ABD tekniği, elde edilen sonuçların yorumlanması ve bu verilere bağlı olarak oluşturulan grupların heterojenitesine

bağlanmaktadır. Yirmi yılı aşkın süredir bilinen ve çalışılan bu yöntem, elde edilen sonuçlarının tutarsızlığı nedeni ile aktif klinik kullanıma halen girememiştir.

ABD kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen farklı sonuçların önemli bir nedeni, standart ölçüm metodunun henüz kesin olarak belirlenmemiş oluşudur. Uygulanan teknik, çevresel etkenler ve sonuçların analiziyle ilişkili faktörlerden etkilenen ABD için standart ölçüm metodu geliştirilebilmesi amacıyla bazı kılavuzlar yayınlanmış olmakla beraber, bu kılavuzların da yöntemin standardize edilmesinde yetersiz kaldığı görülmektedir (6, 7, 147). Ultrasonografi tekniğine ait faktörler, verilerin toplanması için kullanılacak yöntem, oklüzyon oluşturulacak bölge ve süre, ölçümün yapılması için gerekli ön hazırlık, sonuçların yorumlanması için dikkate alınması gereken vasküler akım ve dilatasyon kinetikleri halen tartışılmakta olan konulardır (149, 181). ABD yöntemin bu yönlerden geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

ABD ölçümünde farklı konduit arterler değerlendirilmiş ancak brakial arter hem teknik kullanışlılık, hem de uygulanan çalışmaların çokluğu nedeni ile öne çıkmıştır (6, 49). Brakial arterde hiperemi oluşturmak için; akım manşon şişirilerek azaltılır veya durdurulur ve takiben, aniden indirilerek akımda artış sağlanır (6, 7, 49). Brakial arterde bu oklüzyonu oluşturmak için manşon farklı pozisyonlara yerleştirilebilir (172-174). 2002 yılında ABD ölçümlerine standart getirebilmek için hazırlanmış olan Corretti'nin kılavuzunda hem proksimal (üst kol) hem de distal oklüzyon (ön kol) kullanılabileceği belirtilmiştir (6). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda ise bu iki oklüzyon pozisyonunun hem mekanizma hem de elde edilen sonuçlar bakımından farklı olduğu gösterilmiştir. Proksimal oklüzyonu takiben alınan ABD değerlerinin, pik akım benzer olmasına karşın distale kıyasla daha fazla olduğu ve NO inhibisyonundan daha az etkilendiği bilinmektedir (172-174). Bunun temel nedeni olarak proksimal oklüzyonda kendisi de iskemik zonda kalan brakial arterin NO dışında, başka mediyatörlerin de etkisine maruz kalması ileri sürülmüştür (172). Bu nedenle, hazırlanan yeni kılavuzlar ve derlemelerde; NO biyoyararlanımı ve endotel fonksiyonlarını yansıtmada daha uygun olan distal oklüzyon pozisyonu tavsiye edilmektedir (7, 49, 149). Ancak distalden yapılacak oklüzyonun kesin yeri ile ilgili öneri yoktur çünkü bu konudaki karşılaştırmalı çalışmalar, kesin bir yargıya varabilmek için yetersizdir. Brakial arter ABD incelemesinde, üst kol ile ön kolun yanı sıra bilek oklüzyonunu da kullanan karşılaştırmalı tek çalışma sekiz hastalık bir

grupta yapılmıştır (174). Dolayısıyla ön kolda farklı manşon yerleşim bölgeleri kullanılmasının ABD yanıtına etkisine dair bilgilerimiz yetersizdir. Distal oklüzyon terimi; manşonun yerleşimi için ön kolda hangi bölgenin kullanılmasının uygun olacağını kesin olarak tarif etmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda, ön kolda uygulanacak farklı oklüzyon pozisyonlarının ABD yanıtına etkisini incelemeyi amaçladık.

Ön kol oklüzyonunun distal ve proksimal bölgeden yapılmasının ABD sonuçları üzerine etkisini 50 sağlıklı birey üzerinde yaptığımız ölçümler aracılığı ile kıyasladık. Bireylerden randomizasyon ile belirlenen sıraya uygun şekilde, biri antekubital fossanın 3 ila 4 cm distalinde (proksimal) diğeri manşonun uç kısmı stiloid çıkıntılara gelecek şekilde el bileği hizasında (distal) olmak üzere iki farklı oklüzyon pozisyonunda ABD ölçümü alındı. Elde edilmiş ölçümlerin kıyaslanması için sonuçları etkileyebileceği öngörülen ölçüm sıralaması ve brakial arterin bazal çapıyla ilgili düzeltme yapılarak değerlendirmede "rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model" uygulandı.

Bireylerde zamana bağlı olarak ABD yanıtının değişken olabildiği bilindiği için çalışmamızda ölçümler aynı seansta gerçekleştirildi. (165, 166, 182-184) İkinci ölçüm öncesi brakial arter çapının ve akımının bazal değerlere dönmesi için 20 dakikalık bir süre boyunca bireyler dinlendirildi. Bireylerin proksimal ve distal ölçümler öncesi elde edilen bazal çap ($p = 0,97$)ve akım ($p=0,53$)değerleri arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlendi. Bireylerde akım artışını takiben maksimum çapa ulaşma zamanı, proksimal ölçümde bir miktar daha geç olmakla beraber, gruplar arasında benzerdi ($p = 0,74$). Maksimum çapa ulaşma süresinin (t_{max}) üst kol ile ön kol oklüzyonu kullanılmasından veya bireylerin yaş grubundan etkilenebildiği bilinmektedir (173, 177). ABD ölçümlerinin gerçekleştirildiği farklı gruplarda da t_{max}'ın değiştiği ancak bunun endotel sağlığı ile ilgili ek bilgi sağlamadığı da gösterilmiştir (178). Yine de t_{max}, uygulanacak yöntem ve çalışılacak hasta grubunda çap ölçümlerinin alınması için uygun olan zamanı belirlemede yol göstericidir. Değerlendirmemizde t_{max} değerleri arasında fark olmayışı; proksimal ön kol ve distal ön kol oklüzyonu ile gerçekleştirilen ABD ölçümlerinde aynı zaman aralığında ölçüm almanın uygun bir yaklaşım olduğuna işaret etmektedir.

ABD ölçümlerinin aynı bireyde farklı günlerde hatta aynı gün farklı saatlerde değişkenlik gösterdiği bilindiği için; her iki ölçüm, ölçümler arasında uygun süre beklenerek aynı seansta gerçekleştirildi (165, 166, 182-184). Ölçüm sırasının sonuçlara olası etkisi nedeniyle randomizasyon yapılmış olmasına karşın; etkinin tamamen bertaraf edilemeyeceği düşünülerek, hazırlanan rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili modele sıralama ile ilgili düzeltme eklendi. Şu ana kadar yürütülmüş, farklı oklüzyon pozisyonlarının kullanıldığı çalışmalarda, sıra ve zamanlamanın dikkate alınmamış olması ilgi çekicidir. Söz konusu çalışmalarda ya farklı günlerde ölçüm alınmış ya da ölçüm sıralaması için düzeltme modele eklenmemiştir (172-174). Oluşturduğumuz modelde ilk sırada alınan ölçümlerin, çok büyük bir farkla olmasa dahi ikinci sırada alınanlara kıyasla daha yüksek olduğu gözlendi. İlk ölçüm değerlerinin hafifçe yüksek bulunmuş olmasının, operatör ilişkili faktörlerden veya endotel yanıtının tekrarlanan hiperemi sonucu azalmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, ortaya çıkmış olan bu fark sıralamanın da ABD ölçümleri üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

ABD ölçümü; maksimal çapla bazal çapın farkının bazal çapa oranını yansıttığı için; elde edilecek sonuç bazal çaptan etkilenecektir. ABD yanıtının radyal, brakial ve popliteal arterlerde bazal çap ile ters korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (167). Bunun nedenlerinden birinin, daha küçük arterlerde, akımın benzer olduğu koşullarda dahi daha fazla shear stres gelişmesi olduğu düşünülmüştür. Ancak bu öngörüden hareket edilerek, shear hıza göre ABD değerinin normalize edilmesi sonrası da bazal çapın ölçümlere etkisi devam etmektedir. Shear hıza göre düzeltilmiş ABD değerlerinin de bazal çapla ters korelasyonu mevcuttur (167). Ayrıca shear hızın ABD değerleri ile belirgin korelasyon göstermediği bilinmektedir (179). Bu durum bazal çap - ABD ilişkisinin shear stres dışı faktörlerle belirlendiğini düşündürmektedir. Matematiksel olarak da aynı miktardaki çap artışının yüzde olarak etkisi küçük ve büyük çaptaki arterlerde farklı olmaktadır. Bu nedenle gruplar arası ABD karşılaştırılması yapılacak çalışmalarda, sonuçların shear stresten ziyade bazal çapa göre düzeltilmesi önerilmektedir (185). Bu nedenle biz de çalışmamızda, distal ve proksimal oklüzyon pozisyonlarında elde edilmiş olan ABD değerlerini karşılaştırmak için kullandığımız

rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili modelde, sıralamanın yanı sıra bazal çapın da etkisini düzeltmeyi tercih ettik. Söz konusu düzeltmelerin yapılması ardından elde edilen ABD değerlerinin, proksimal ön kol oklüzyon pozisyonunda distal ön kol oklüzyonuna kıyasla %2,2 daha fazla olduğu gözlendi. İki pozisyon arasındaki farkın p değeri 0,027 olup, anlamlı bulundu. Sekiz sağlıklı gönüllüde distal ön kol oklüzyonu, proksimal ön kol ve üst kol oklüzyonunu takiben her üç oklüzyon pozisyonunda da akımın arttığı gözlenmiş, ancak distal ön kol oklüzyonu sonrası brakial arter çapı bazal değere göre belirgin olarak değişmemiş ve anlamlı ABD yanıtı oluşmamıştır (174). Bu çalışmada akımın artışına karşın yanıt gelişmemesi, pik shear stres ve pik kan akımı ile toplam hiperemik stimulusun farklı olmasıyla ilişkilendirilmiştir (174). Söz konusu çalışma sonuçlarından farklı olarak, elli sağlıklı gönüllüde distal ön kol oklüzyonu sonrası; proksimale kıyasla daha düşük olmakla birlikte anlamlı ABD yanıtı geliştiğini gösterdik. Her iki koşulda da brakial arterin iskemik zonda kalmıyor olması; üst kol ve ön kol oklüzyon pozisyonlarında elde edilen farklı sonuçları açıklamak için kullanılan; başka iskemik mediyatörlerin varlığı hipotezini dışlamaktadır. Ön kol proksimali ve bilek oklüzyonunu kıyaslayan çalışma olmamakla birlikte bu iki durumun üst kol oklüzyonu ile ayrı ayrı kıyaslandığı çalışmalar mevcuttur. Her iki ön kol oklüzyon pozisyonunda da üst kol oklüzyonuna kıyasla daha düşük ABD değerleri elde edildiği gözlenmiştir ve bu pozisyonlardaki ABD ölçümlerinin L-NMMA ile inhibisyon sonrası kaybolduğu dolayısı ile NO temelli olduğu da bilinmektedir (172-174). Ön kol oklüzyonunda farklı manşon pozisyonları kullanılmasının hangi mekanizmalar ile farklı sonuçlara yol açtığı net değildir. Bu durumun olası açıklamalarından biri; iki oklüzyon pozisyonundaki manşonun hızlıca indirilmesini takiben gelişen akım dinamiğindeki farklılıklar olabilir. Bu iki pozisyonda gelişen; bazal çap ve sıraya göre düzeltilmiş maksimum akım hızlarının benzer olmasına (p = 0,307) karşın akımdaki bazale göre değişimin (maksimum reaktif hiperemi) istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde proksimal pozisyonda fazla olması (p = 0,03); akım kinetiklerinin farklı olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda, daha önce yapılmış olan pek çok çalışmadakine benzer şekilde, dupleks prob kullanılmadığı için; akım hızı ve çap ölçümlerinin aynı anda gerçekleştirilememiş olması akım değerlendirmelerinin yapılmasını güçleştirmektedir. Akım

değerlendirmelerinde, çok yakın aralıklarda alınmış çap ve hız ölçümlerinin kullanılması sonuçlarda yanılma payı oluşturmaktadır. Bu nedenle akıma dair yorumlarımızda, ölçüm tekniği ile ilişkili bir takım kısıtlılıklar vardır. Bu kısıtlılıkların da ötesinde, akımın belirli zaman aralıklarında değerlendirilmiş ve otomatik sistemlerle devamlı izlenememiş olması, toplam hipereminin ve akımın değişen kinetiklerinin belirlenememesine neden olmuştur. Elde etmiş olduğumuz ABD sonuçlarına, iki pozisyon arasındaki maksimal hiperemi farkının etkisi ise tartışmalıdır. Maksimal hiperemiden ziyade toplam hipereminin etkisinin ABD'yi etkilediği gösterilmiş olduğu için sonuçlarımız yalnızca bu farklılıkla açıklanamamaktadır (180). Akım kinetiklerinin daha detaylı incelenmesi, bu iki oklüzyon pozisyonundaki farklılıkları ortaya koyabilecek; tekrarlayan ölçümler aracılığıyla da hiperemi, ABD yanıtı ilişkisi belirlenebilecektir. Distal ve proksimale yerleştirilmiş olan ön kol manşon pozisyonları aracılığıyla farklı miktarda dokuda ve brakial artere değişen uzaklıkta iskemi yaratmış olması da, ABD yanıtına akımdaki ani artış ve NO salınımı dışında, ilgili bölgelerde ortaya çıkan mediyatörler aracılığıyla etki etmiş olabilir. Ancak bu iki ön kol oklüzyon pozisyonu arasındaki farkın kesin mekanizması bilinmemektedir. Elde ettiğimiz sonuçları açıklayabilmek, mekanizmaya yönelik farklı mediyatörlerin etkilerinin kontrollü olarak inhibisyonu sonrası tekrarlanan ölçümlerle yürütülecek çalışmalarla mümkün olacaktır.

Ön kolda farklı oklüzyon pozisyonları kullanılarak yapılan değerlendirme sonrası alınan ABD ölçümlerinin klinik öngördürücülük açısından incelenmeleri gereklidir. Bu farklı yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri ve klinik takipte olay gelişimi ile ilgili kestirim güçleri karşılaştırılmalı, aralarındaki farkın zaman içinde değişim gösterip göstermediğinin belirlenmelidir. Çalışmamız kesitsel bilgiye dayandığı için, sağlıklı gönüllülerde olay gelişimi ile elde ettiğimiz değerler arasında bağlantı kurulamamıştır. Uzun süreli takip ile iki yöntemde elde edilmiş olan farklı sayısal değerlerden belirlenecek kestirim noktalarının güvenilirliği karşılaştırılabilir. ABD uygulaması için bu iki yöntemden herhangi birinin tavsiye edilebilmesi, klinik olay belirleyiciliği açısından güçlerine bağlıdır.

Sağlıklı gönüllülerde ön kolda farklı manşon oklüzyon pozisyonlarının ABD ölçümlerine etkisini incelediğimiz çalışmamızda, proksimal oklüzyon ile distal oklüzyona kıyasla daha büyük değerler elde edilmiştir. Tanımlandığı 1992'den bu

yana farklı metodolojik açılardan değerlendirilen ve henüz standart bir yöntem belirlenmemiş olan ABD ölçümlerinde, ön kolda oluşturulacak oklüzyon için manşon yerleşimi ile ilgili önerilerin daha ayrıntılı olarak tanımlanması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Sağlıklı gönüllülerde ön kol manşon yerleşim pozisyonunun ABD ölçümlerine etkisini incelediğimiz çalışmamızda, elli sağlıklı gönüllüde aynı günde distal ve proksimal oklüzyon sonrası ABD incelemesi yapıldı. Ölçüm sırasının ABD ölçümlerinde istatistiksel anlama kavuşmayan düzeyde farklılık yarattığı gözlendi. Konuyla ilgili daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak, bazal çapın ise ABD ölçümleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu izlendi. Ölçüm sırası ve bazal çapa göre düzeltmenin uygulandığı rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model ile yapılan değerlendirmede, ön kol proksimaline manşon yerleştirilerek ölçülen ABD değerlerinin distal manşon yerleşimine kıyasla %2,2 oranında daha fazla olduğu gözlendi.

ÖZET

Sağlıklı Gönüllülerde Farklı Manşon Oklüzyon Pozisyonlarının Akıma Bağlı Dilatasyon Ölçümlerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Amaç: Akıma bağlı dilastayon (ABD) endotel disfonksiyonu belirlenmesi amacıyla tasarlanmış ancak standart bir metodun geliştirilememesi nedeni ile yaygın klinik kullanım kazanamamış bir yöntemdir. ABD uygulamasında manşon oklüzyon pozisyonunun önemi bilinmekte ve ön kola yerleştirilmesi önerilmektedir. Ancak ön kolda manşonun distal veya proksimal pozisyonlara yerleştirilmesinin ABD üzerindeki etkisi bilinmemektedir. ABD ölçümleri için ön kolda uygulanacak farklı oklüzyon pozisyonlarının sonuçlara etkisini incelemeyi amaçladık.

Materyal – Metod: Çalışmaya, bilinen hastalığı ve aterosklerotik risk faktörü olmayan 19 ila 53 yaş arasında erkek ve kadın sağlıklı gönüllüler alındı. Bireylerin uygun hazırlığını takiben, aynı gün içerisinde iki farklı oklüzyon pozisyonunda brakiyal arterde ABD ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçümler için olası etkisi düşünülerek sıralama randomizasyon ile belirlendi. İki ABD çalışması arasında, akım ve brakial arter çapının bazal değerlere dönmesi için uygun süre beklendi. Aynı operatör tarafından görüntüler alındıktan sonra, elde edilmiş olan kayıtlardan ölçümler gerçekleştirildi.

Bulgular: Proksimal ve distal ön koldan yapılan ABD ölçümlerinde, gruplar arasında bazal çap ($p = 0,97$) ve bazal akım değerleri ($p = 0,53$) arasında farklılık izlenmedi. Ölçümler, sonuçlara etkisi olacağı öngörülen sıralama ve bazal çap değerlerine göre düzeltmenin yapıldığı rastgele kesim noktasını içeren karışık etkili model ile karşılaştırıldı. Bu değerlendirme sonucunda proksimal ön kol oklüzyonu ile elde edilen ABD değerlerinin, distal ön kol oklüzyonuna kıyasla %2.2 daha fazla olduğu gözlendi ($p = 0,027$). İlk sırada alınan ABD ölçümleri ikinci sırada alınanlardan daha fazla idi. Oluşturulan modelde sıralamanın etkisinin istastistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p = 0,405$), bazal çapın etkisinin ise anlamlı olduğu ($p = 0,015$) gözlendi.

Sonuç: ABD ölçümlerinde ön kolda farklı oklüzyon pozisyonları kullanılması sonuçları etkilemektedir. Ön kolun proksimalinde oklüzyon oluşturulması, distal bölgede oluşturulan oklüzyonla kıyaslandığında daha yüksek ABD değerleri izlenmesine neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Endotel disfonksiyonu, akıma bağlı dilatasyon, oklüzyon pozisyonu

SUMMARY

The Effect of Different Occlusion Cuff Positions on Flow-Mediated Dilatation of Healthy Volunteers

Objective: Flow Mediated Dilatation (FMD) is a technique designed to determine endothelial dysfunction but because a standardized method has not yet been described, doesn't have a wide clinical utility. The importance of occlusion cuff position on FMD is known and fore-arm occlusion is recommended. But the effect of proximal or distal fore-arm occlusion cuff position on FMD is not known. We plan to evaluate the effect of different fore-arm circulatory occlusion cuff positions on FMD.

Material-Method: Fifty healthy vounteers with no atherosclerotic risk factors between age of 19 and 53 were included in the study. After appropriate preparation measures have taken, subjects underwent FMD with two different occlusion positions on the same day. The sequence of occlusion cuff position for the subjects were determined with randomisation. Between two different FMD protocols, there was an appropriate time interval for brachial artery to return basal diameter and flow conditions. Images obtained during FMD study were recorded. All FMD measurements were made by the same operator from the recorded data.

Results: Between proximal and distal fore-arm FMD measurements no difference was observed for basal diameter ($p = 0,97$) and basal flow ($p = 0,53$). The comparison of proximal and distal occlusion positions were made with random intercept mixed effects model, adjusting for effect of sequence of measurements and basal diameter on FMD. Using this model, the FMD values obtained from proximal occlusion cuff position were 2.2%higher when compared to distal occlusion cuff position ($p = 0,027$). First measurements were higher than the second measurements. Random intercept mixed effects model revealed that the effect of sequence on FMD were not significant ($p = 0,405$) while the effect of basal diameter was ($p = 0,015$).

Conclusion: Differect fore-arm occlusion cuff positions have effect on FMD measurements. Proximal fore-arm occlusion cuff position, results in higher FMD compared to distal fore-arm occlusion.

Key Words: Endothelial dysfunction, flow-mediated dilatation, occlusion cuff position

KAYNAKLAR

1. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). European heart journal. 2012;33(13):1635-701.
2. Organization WH. Global status report on noncommunicable diseases 2010: World Health Organization; 2011.
3. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? Journal of the American College of Cardiology. 1997;30(2):325-33.
4. Poredos P, Jezovnik MK. Testing endothelial function and its clinical relevance. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2013;20(1):1-8.
5. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet. 1992;340(8828):1111-5.
6. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. Journal of the American College of Cardiology. 2002;39(2):257-65.
7. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, et al. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2011;300(1):H2-12.
8. Organization WH. The global burden of disease: 2004 update. 2008.
9. Organization WH. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. 2007.

10. Unal B, Critchley JA, Capewell S. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in England and Wales between 1981 and 2000. Circulation. 2004;109(9):1101-7.

11. Malcom GT, Oalmann MC, Strong JP. Risk factors for atherosclerosis in young subjects: the PDAY Study. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. Annals of the New York Academy of Sciences. 1997;817:179-88.

12. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation. 2005;111(25):3481-8.

13. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. The New England journal of medicine. 2005;352(16):1685-95.

14. Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. The American journal of medicine. 2009;122(1 Suppl):S3-S14.

15. Ma X, Ma C, Zheng X. MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: a conflicting role? Heart, lung & circulation. 2013t;22(10):811-8.

16. Robert O. Bonow DLM, Douglas P. Zipes, Peter Libby.—9th ed. Braunwald's Heart Disease: A Textbook Of Cardiovascular Medicine. Saunders, an Imprint of Elsevier; 2012.

17. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on A. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. Journal of the American College of Cardiology. 2009;54(23):2129-38.

18. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Sr., Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation. 2013.

19. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. Circulation. 2003;108(15):1772-8.

20. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. Circulation. 2003;108(14):1664-72.

21. Celermajer DS. Reliable endothelial function testing: at our fingertips? Circulation. 2008;117(19):2428-30.

22. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. Circulation. 2012;126(6):753-67.

23. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation. 2007;115(10):1285-95.

24. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288(5789):373-6.

25. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. Circulation. 2006;113(13):1708-14.

26. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. Circulation research. 1996;79(5):984-91.

27. Cooke JP. Flow, NO, and atherogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(3):768-70.

28. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(19):10417-22.

29. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. American journal of physiology Renal physiology. 2001;280(2):F193-206.

30. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. Cell. 2001;106(6):675-83.

31. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. Circulation. 2000;101(8):841-3.

32. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. Journal of the American College of Cardiology. 2003;42(7):1149-60.

33. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. Circulation. 2005;111(3):363-8.

34. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2003;23(2):168-75.

35. Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient. Circulation. 2004;110(14):1926-32.

36. Lavi S, Bae JH, Rihal CS, Prasad A, Barsness GW, Lennon RJ, et al. Segmental coronary endothelial dysfunction in patients with minimal atherosclerosis is associated with necrotic core plaques. Heart. 2009;95(18):1525-30.

37. Zeiher AM, Krause T, Schachinger V, Minners J, Moser E. Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. Circulation. 1995;91(9):2345-52.

38. Prasad A, Higano ST, Al Suwaidi J, Holmes DR, Jr., Mathew V, Pumper G, et al. Abnormal coronary microvascular endothelial function in humans with asymptomatic left ventricular dysfunction. American heart journal. 2003;146(3):549-54.

39. Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, et al. Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. Circulation. 1990;81(3):772-9.

40. Kasprzak JD, Klosinska M, Drozdz J. Clinical aspects of assessment of endothelial function. Pharmacological reports: PR. 2006;58 Suppl:33-40.

41. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. Circulation. 1989;80(3):458-65.

42. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrange D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. Journal of the American College of Cardiology. 1995;26(5):1235-41.

43. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. Circulation. 1990;81(6):1762-7.

44. Petrie JR, Ueda S, Morris AD, Murray LS, Elliott HL, Connell JM. How reproducible is bilateral forearm plethysmography? British journal of clinical pharmacology. 1998;45(2):131-9.

45. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. Journal of the American College of Cardiology. 2004;44(11):2137-41.

46. Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, et al. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology. 2009;53(4):323-30.

47. Jezovnik MK, Poredos P, Stalc M. Impairment of the vasodilatation capability of the brachial artery in patients with idiopathic venous thrombosis. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2010;17(11):1190-8.

48. Celermajer DS. Brachial artery FMD with 5-minute distal cuff occlusion--a useful pathophysiological test after all! Journal of applied physiology. 2005;99(4):1619.

49. Charakida M, Masi S, Luscher TF, Kastelein JJ, Deanfield JE. Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation. European heart journal. 2010;31(23):2854-61.

50. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. Circulation. 2003;107(1):139-46.

51. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. Journal of the American College of Cardiology. 1994;24(2):471-6.

52. Eskurza I, Monahan KD, Robinson JA, Seals DR. Effect of acute and chronic ascorbic acid on flow-mediated dilatation with sedentary and physically active human ageing. The Journal of physiology. 2004;556(Pt 1):315-24.

53. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. The Journal of clinical investigation. 1994;93(1):50-5.

54. Chowienczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR, Ritter JM. Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolaemia. Lancet. 1992;340(8833):1430-2.

55. Lupattelli G, Lombardini R, Schillaci G, Ciuffetti G, Marchesi S, Siepi D, et al. Flow-mediated vasoactivity and circulating adhesion molecules in hypertriglyceridemia: association with small, dense LDL cholesterol particles. American heart journal. 2000;140(3):521-6.

56. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Karas RH. Comparison of flow-mediated dilatation of the brachial artery in coronary patients with low-density lipoprotein cholesterol levels <80 mg/dl versus patients with levels 80 to 100 mg/dl. The American journal of cardiology. 2005;95(1):93-5.

57. Lupattelli G, Marchesi S, Lombardini R, Siepi D, Bagaglia F, Pirro M, et al. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on the endothelial

function in hyperlipemia. Metabolism: clinical and experimental. 2003;52(9):1191-5.

58. Kuvin JT, Ramet ME, Patel AR, Pandian NG, Mendelsohn ME, Karas RH. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. American heart journal. 2002;144(1):165-72.

59. Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. Journal of the American College of Cardiology. 1996;28(3):573-9.

60. Christen AI, Armentano RL, Miranda A, Graf S, Santana DB, Zocalo Y, et al. Arterial wall structure and dynamics in type 2 diabetes mellitus methodological aspects and pathophysiological findings. Current diabetes reviews. 2010;6(6):367-77.

61. Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A, et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. Cardiovascular research. 1997;34(1):164-8.

62. Ravikumar R, Deepa R, Shanthirani C, Mohan V. Comparison of carotid intima-media thickness, arterial stiffness, and brachial artery flow mediated dilatation in diabetic and nondiabetic subjects (The Chennai Urban Population Study [CUPS-9]). The American journal of cardiology. 2002;90(7):702-7.

63. Rodriguez CJ, Miyake Y, Grahame-Clarke C, Di Tullio MR, Sciacca RR, Boden-Albala B, et al. Relation of plasma glucose and endothelial function in a population-based multiethnic sample of subjects without diabetes mellitus. The American journal of cardiology. 2005;96(9):1273-7.

64. Ardigo D, Franzini L, Valtuena S, Monti LD, Reaven GM, Zavaroni I. Relation of plasma insulin levels to forearm flow-mediated dilatation in healthy volunteers. The American journal of cardiology. 2006;97(8):1250-4.

65. Bagg W, Whalley GA, Sathu A, Gamble G, Sharpe N, Braatvedt GD. The effect of acute hyperglycaemia on brachial artery flow mediated dilatation in normal volunteers. Australian and New Zealand journal of medicine. 2000;30(3):344-50.

66. Kimura Y, Matsumoto M, Den YB, Iwai K, Munehira J, Hattori H, et al. Impaired endothelial function in hypertensive elderly patients evaluated by high resolution ultrasonography. The Canadian journal of cardiology. 1999;15(5):563-8.

67. Malik AR, Sultan S, Turner ST, Kullo IJ. Urinary albumin excretion is associated with impaired flow- and nitroglycerin-mediated brachial artery dilatation in hypertensive adults. Journal of human hypertension. 2007;21(3):231-8.

68. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. Circulation. 1993;87(5):1468-74.

69. Xu JZ, Zhang Y, Wu SN, Niu WQ, Zhu DL, Gao PJ. Impaired endothelial function in hypertensive patients with target organ damage. Journal of human hypertension. 2009;23(11):751-7.

70. Yugar-Toledo JC, Bonalume Tacito LH, Ferreira-Melo SE, Sousa W, Consolin-Colombo F, Irigoyen MC, et al. Low-renin (volume dependent) mild-hypertensive patients have impaired flow-mediated and glyceryl-trinitrate stimulated vascular reactivity. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society. 2005;69(11):1380-5.

71. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. The New England journal of medicine. 1996;334(3):150-4.

72. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially

reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. Circulation. 1993;88(5 Pt 1):2149-55.

73. Juonala M, Magnussen CG, Venn A, Gall S, Kahonen M, Laitinen T, et al. Parental smoking in childhood and brachial artery flow-mediated dilatation in young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns study and the Childhood Determinants of Adult Health study. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2012;32(4):1024-31.

74. Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschsorur G, et al. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. Journal of the American College of Cardiology. 2002;39(2):251-6.

75. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. Circulation. 2007;115(18):2390-7.

76. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, et al. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. Circulation. 2009;120(6):502-9.

77. Shechter M, Issachar A, Marai I, Koren-Morag N, Freinark D, Shahar Y, et al. Long-term association of brachial artery flow-mediated vasodilation and cardiovascular events in middle-aged subjects with no apparent heart disease. International journal of cardiology. 2009;134(1):52-8.

78. Shechter M, Shechter A, Koren-Morag N, Feinberg MS, Hiersch L. Usefulness of brachial artery flow-mediated dilation to predict long-term cardiovascular events in subjects without heart disease. The American journal of cardiology. 2014;113(1):162-7.

79. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wolfl G, Kostner K, Maurer G, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. The American journal of cardiology. 2000;86(2):207-10.

80. Simova I, Katova T, Denchev S. Diagnostic accuracy of flow-mediated dilatation and intima-media thickness for the presence of significant coronary

artery disease. Journal of the American Society of Hypertension: JASH. 2009;3(6):388-94.

81. Simova I, Katova T, Denchev S, Dimitrov N. Flow-mediated dilatation has an additive value to stress ECG for the diagnosis of angiographically significant coronary atherosclerosis. Journal of the American Society of Hypertension: JASH. 2010;4(4):203-8.

82. Guazzi M, Reina G, Gripari P, Tumminello G, Vicenzi M, Arena R. Prognostic value of flow-mediated dilatation following myocardial infarction. International journal of cardiology. 2009;132(1):45-50.

83. Karatzis EN, Ikonomidis I, Vamvakou GD, Papaioannou TG, Protogerou AD, Andreadou I, et al. Long-term prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery after acute coronary syndromes without ST elevation. The American journal of cardiology. 2006;98(11):1424-8.

84. Patti G, Pasceri V, Melfi R, Goffredo C, Chello M, D'Ambrosio A, et al. Impaired flow-mediated dilation and risk of restenosis in patients undergoing coronary stent implantation. Circulation. 2005;111(1):70-5.

85. Kitta Y, Nakamura T, Kodama Y, Takano H, Umetani K, Fujioka D, et al. Endothelial vasomotor dysfunction in the brachial artery is associated with late in-stent coronary restenosis. Journal of the American College of Cardiology. 2005;46(4):648-55.

86. Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. Journal of the American College of Cardiology. 2004;43(4):616-23.

87. Mizia-Stec K, Wieczorek J, Orszulak M, Mizia M, Gieszczyk-Strozik K, Sikora-Puz A, et al. Flow-mediated dilatation (FMD) and prevalence of cardiovascular risk factors - the value of FMD assessment in high risk patients is limited. Kardiologia polska. 2013.

88. Frick M, Suessenbacher A, Alber HF, Dichtl W, Ulmer H, Pachinger O, et al. Prognostic value of brachial artery endothelial function and wall thickness. Journal of the American College of Cardiology. 2005;46(6):1006-10.

89. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Okumura K, Ohgushi M, Yoshimura M, et al. Flow-mediated, endothelium-dependent dilatation of the brachial arteries is impaired in patients with coronary spastic angina. American heart journal. 1997;133(3):263-7.

90. Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CN, Voutsas AA, Stamatelopoulos SF, Moulopoulos SD. Peripheral vascular endothelial dysfunction in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. Journal of the American College of Cardiology. 1998;31(3):541-6.

91. Atmaca Y, Ozdol C, Turhan S, Vurgun K, Duzen V, Erol C. The association of elevated white blood cell count and C-reactive protein with endothelial dysfunction in cardiac syndrome X. Acta cardiologica. 2008;63(6):723-8.

92. Ong P, Sivanathan R, Borgulya G, Bizrah M, Iqbal Y, Andoh J, et al. Obesity, inflammation and brachial artery flow-mediated dilatation: therapeutic targets in patients with microvascular angina (cardiac syndrome X). Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. 2012;26(3):239-44.

93. Naidu OA, Rajasekhar D, Latheef SA. Assessment of endothelial function by brachial artery flow mediated dilatation in microvascular disease. Cardiovascular ultrasound. 2011;9:40.

94. Freestone B, Chong AY, Nuttall S, Lip GY. Impaired flow mediated dilatation as evidence of endothelial dysfunction in chronic atrial fibrillation: relationship to plasma von Willebrand factor and soluble E-selectin levels. Thrombosis research. 2008;122(1):85-90.

95. Tekin A, Tekin G, Sezgin AT, Hucran C, Kizilkilic O, Erol T, et al. Rheumatic mitral valve stenosis is associated with impaired flow-mediated dilatation. International journal of cardiology. 2008;125(3):410-2.

96. Beer CD, Potter K, Blacker D, Arnolda L, Hankey GJ, Puddey IB. Systemic vascular function, measured with forearm flow mediated dilatation, in acute and stable cerebrovascular disease: a case-control study. Cardiovascular ultrasound. 2010;8:46.

97. Pretnar-Oblak J, Sabovic M, Pogacnik T, Sebestjen M, Zaletel M. Flow-mediated dilatation and intima-media thickness in patients with lacunar infarctions. Acta neurologica Scandinavica. 2006;113(4):273-7.

98. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1989;3(9):2007-18.

99. Bevan JA, Henrion D. Pharmacological Implications of the Flow-Dependence of Vascular Smooth Muscle Tone. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 1994;34(1):173-90.

100. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. Journal of clinical hypertension. 2012;14(4):198-205.

101. Gori T, Dragoni S, Lisi M, Di Stolfo G, Sonnati S, Fineschi M, et al. Conduit artery constriction mediated by low flow a novel noninvasive method for the assessment of vascular function. Journal of the American College of Cardiology. 2008;51(20):1953-8.

102. Stoner L, Erickson ML, Young JM, Fryer S, Sabatier MJ, Faulkner J, et al. There's more to flow-mediated dilation than nitric oxide. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2012;19(7):589-600.

103. Reneman RS, Arts T, Hoeks AP. Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory. Journal of vascular research. 2006;43(3):251-69.

104. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. Circulation research. 1983;53(4):502-14.

105. Friedman MH, Deters OJ, Bargeron CB, Hutchins GM, Mark FF. Shear-dependent thickening of the human arterial intima. Atherosclerosis. 1986;60(2):161-71.

106. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. JAMA: the journal of the American Medical Association. 1999;282(21):2035-42.

107. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. Journal of internal medicine. 2006;259(4):339-50.

108. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. Pflugers Archiv: European journal of physiology. 2000;440(5):653-66.

109. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. Circulation research. 2003;93(10):e136-42.

110. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JA, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2003;285(2):H722-6.

111. Yao Y, Rabodzey A, Dewey CF, Jr. Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2007;293(2):H1023-30.

112. Feletou M, Kohler R, Vanhoutte PM. Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. Annals of medicine. 2012;44(7):694-716.

113. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annual review of biochemistry. 1994;63:175-95.

114. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovascular research. 1999;43(3):521-31.

115. Busse R, Mulsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. FEBS letters. 1990;265(1-2):133-6.

116. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. Pharmacological reviews. 1987;39(3):163-96.

117. Feelisch M, Noack EA. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. European journal of pharmacology. 1987;139(1):19-30.

118. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. Journal of cardiovascular pharmacology. 1988;12 Suppl 5:S115-8.

119. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. Circulation research. 1983;52(3):352-7..

120. Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. Journal of applied physiology. 2001;91(3):1421-30.

121. Huang A, Sun D, Shesely EG, Levee EM, Koller A, Kaley G. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2002;282(2):H429-36.

122. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. Circulation. 1995;91(5):1314-9.

123. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. The American journal of cardiology. 1996;78(11):1210-4.

124. Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ, et al. Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. Clinical science. 2001;101(6):629-35.

125. Kooijman M, Thijssen DH, de Groot PC, Bleeker MW, van Kuppevelt HJ, Green DJ, et al. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. The Journal of physiology. 2008;586(4):1137-45.

126. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, Donald AE, Taylor M, Vallance P, et al. Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. Circulation research. 2001;88(2):145-51.

127. Parker BA, Tschakovsky ME, Augeri AL, Polk DM, Thompson PD, Kiernan FJ. Heterogenous vasodilator pathways underlie flow-mediated dilation in men and women. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2011;301(3):H1118-26.

128. Pyke K, Green DJ, Weisbrod C, Best M, Dembo L, O'Driscoll G, et al. Nitric oxide is not obligatory for radial artery flow-mediated dilation following release of 5 or 10 min distal occlusion. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2010;298(1):H119-26.

129. Grabowski EF, Jaffe EA, Weksler BB. Prostacyclin production by cultured endothelial cell monolayers exposed to step increases in shear stress. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1985;105(1):36-43.

130. Arehart E, Gleim S, Kasza Z, Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. Prostacyclin, atherothrombosis, and cardiovascular disease. Current medicinal chemistry. 2007;14(20):2161-9.

131. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. Lancet. 1977;1(8001):18-20.

132. Vane JR. Nobel lecture, 8th December 1982. Adventures and excursions in bioassay: the stepping stones to prostacyclin. British journal of pharmacology. 1983;79(4):821-38.

133. Luckhoff A, Pohl U, Mulsch A, Busse R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. British journal of pharmacology. 1988;95(1):189-96.

134. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. Experimental physiology. 2008;93(1):141-7.

135. Osanai T, Akutsu N, Fujita N, Nakano T, Takahashi K, Guan W, et al. Cross talk between prostacyclin and nitric oxide under shear in smooth muscle cell: role in monocyte adhesion. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2001;281(1):H177-82.

136. Duffy SJ, Castle SF, Harper RW, Meredith IT. Contribution of vasodilator prostanoids and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilation, and flow-mediated dilation in human coronary circulation. Circulation. 1999;100(19):1951-7.

137. Bryan RM, Jr., You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. Anesthesiology. 2005;102(6):1261-77.

138. Edwards G, Feletou M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. Pflugers Archiv: European journal of physiology. 2010;459(6):863-79.

139. Bellien J, Iacob M, Gutierrez L, Isabelle M, Lahary A, Thuillez C, et al. Crucial role of NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human sustained conduit artery flow-mediated dilatation. Hypertension. 2006;48(6):1088-94.

140. Bellien J, Thuillez C, Joannides R. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of radial artery basal diameter and endothelium-dependent dilatation in vivo. Clinical and experimental pharmacology & physiology. 2008;35(4):494-7.

141. Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2000;279(2):H459-65.

142. Clark SG, Fuchs LC. BK(Ca) channels compensate for loss of NOS-dependent coronary artery relaxation in cardiomyopathy. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2000;279(6):H2598-603.

143. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. The Journal of clinical investigation. 1997;100(11):2793-9.

144. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. Atherosclerosis. 2009;202(2):330-44.

145. Spieker LE, Luscher TF, Noll G. ETA receptors mediate vasoconstriction of large conduit arteries during reduced flow in humans. Journal of cardiovascular pharmacology. 2003;42(3):315-8.

146. Gori T, Grotti S, Dragoni S, Lisi M, Di Stolfo G, Sonnati S, et al. Assessment of vascular function: flow-mediated constriction complements the information of flow-mediated dilatation. Heart. 2010;96(2):141-7.

147. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. The Journal of physiology. 2005;568(Pt 2):357-69.

148. Pala S, Kahveci G, Akcakoyun M, Kargin R, Tigen K, Tanalp AC, et al. Reliability of ultrasonography in detecting flow mediated dilation. The international journal of cardiovascular imaging. 2009;25(7):705-11.

149. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. Hypertension. 2010;55(5):1075-85.

150. Stoner L, Sabatier MJ. Use of ultrasound for non-invasive assessment of flow-mediated dilation. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2012;19(5):407-21.

151. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. Circulation. 1986;74(6):1399-406.

152. Chuang ML, Douglas PS, Bisinov EA, Stein JH. Effect of cardiac cycle on ultrasound assessment of endothelial function. Vascular medicine. 2002;7(2):103-8.

153. Raitakari OT, Adams MR, McCredie RJ, Griffiths KA, Stocker R, Celermajer DS. Oral vitamin C and endothelial function in smokers: short-term improvement, but no sustained beneficial effect. Journal of the American College of Cardiology. 2000;35(6):1616-21.

154. Kato T, Inoue T, Morooka T, Yoshimoto N, Node K. Short-term passive smoking causes endothelial dysfunction via oxidative stress in nonsmokers. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2006;84(5):523-9.

155. Papamichael CM, Aznaouridis KA, Karatzis EN, Karatzi KN, Stamatelopoulos KS, Vamvakou G, et al. Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. Clinical science. 2005;109(1):55-60.

156. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, et al. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. Biochemical and biophysical research communications. 1995;214(3):847-55.

157. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. Circulation. 1995;92(12):3431-5.

158. Harvey PJ, Morris BL, Kubo T, Picton PE, Su WS, Notarius CF, et al. Hemodynamic after-effects of acute dynamic exercise in sedentary normotensive postmenopausal women. Journal of hypertension. 2005;23(2):285-92.

159. Harris RA, Padilla J, Hanlon KP, Rink LD, Wallace JP. The flow-mediated dilation response to acute exercise in overweight active and inactive men. Obesity. 2008;16(3):578-84.

160. Dawson EA, Green DJ, Timothy Cable N, Thijssen DH. Effects of acute exercise on flow-mediated dilatation in healthy humans. Journal of applied physiology. 2013;115(11):1589-98.

161. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. The American journal of cardiology. 1997;79(3):350-4.

162. Ceriello A, Cavarape A, Martinelli L, Da Ros R, Marra G, Quagliaro L, et al. The post-prandial state in Type 2 diabetes and endothelial dysfunction: effects of insulin aspart. Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association. 2004;21(2):171-5.

163. Jarvisalo MJ, Jartti L, Marniemi J, Ronnemaa T, Viikari JS, Lehtimaki T, et al. Determinants of short-term variation in arterial flow-mediated dilatation in healthy young men. Clinical science. 2006;110(4):475-82.

164. Etsuda H, Takase B, Uehata A, Kusano H, Hamabe A, Kuhara R, et al. Morning attenuation of endothelium-dependent, flow-mediated dilation in healthy young men: possible connection to morning peak of cardiac events? Clinical cardiology. 1999;22(6):417-21.

165. Otto ME, Svatikova A, Barretto RB, Santos S, Hoffmann M, Khandheria B, et al. Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans. Circulation. 2004;109(21):2507-10.

166. Harris RA, Padilla J, Rink LD, Wallace JP. Variability of flow-mediated dilation measurements with repetitive reactive hyperemia. Vascular medicine. 2006;11(1):1-6.

167. Thijssen DH, Dawson EA, Black MA, Hopman MT, Cable NT, Green DJ. Heterogeneity in conduit artery function in humans: impact of arterial size. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2008;295(5):H1927-34.

168. Stout M. Flow-mediated dilatation: a review of techniques and applications. Echocardiography. 2009;26(7):832-41.

169. Kanahara M, Harada H, Katoh A, Ikeda H. New Methodological Approach to Improve Reproducibility of Brachial Artery Flow-Mediated Dilatation. Echocardiography. 2013.

170. Thijssen DH, Willems L, van den Munckhof I, Scholten R, Hopman MT, Dawson EA, et al. Impact of wall thickness on conduit artery function in humans: is there a "Folkow" effect? Atherosclerosis. 2011;217(2):415-9.

171. Agewall S, Doughty RN, Bagg W, Whalley GA, Braatvedt G, Sharpe N. Comparison of ultrasound assessment of flow-mediated dilatation in the radial and brachial artery with upper and forearm cuff positions. Clinical physiology. 2001;21(1):9-14.

172. Sagar N. Doshi KKN, Nicola Payne, Christopher J. H. Jones, Moira Ashton. Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. Clinical Science (2001) 101, 629–635 (Printed in Great Britain). 2001 (101):629–35.

173. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. Clinical science. 2000;99(4):261-7.

174. Betik AC, Luckham VB, Hughson RL. Flow-mediated dilation in human brachial artery after different circulatory occlusion conditions. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2004;286(1):H442-8.

175. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. Heart. 1997;78(1):22-7.

176. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Tedjasaputra V, Bailey DM, Richardson RS. The effect of oral antioxidants on brachial artery flow-mediated dilation following 5 and 10 min of ischemia. European journal of applied physiology. 2009;107(4):445-53.

177. Black MA, Cable NT, Thijssen DH, Green DJ. Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans. Hypertension. 2008;51(2):203-10.

178. Liuni A, Luca MC, Lisi M, Dragoni S, di Stolfo G, Mariani JA, et al. Observations of time-based measures of flow-mediated dilation of forearm conduit arteries: implications for the accurate assessment of endothelial function. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2010;299(3):H939-45.

179. Thijssen DH, Bullens LM, van Bemmel MM, Dawson EA, Hopkins N, Tinken TM, et al. Does arterial shear explain the magnitude of flow-mediated dilation?: a comparison between young and older humans. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2009;296(1):H57-64.

180. Pyke KE, Tschakovsky ME. Peak vs. total reactive hyperemia: which determines the magnitude of flow-mediated dilation? Journal of applied physiology. 2007;102(4):1510-9.

181. Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, de Koning EJ. Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. European heart journal. 2005;26(4):363-8.

182. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. British heart journal. 1995;74(3):247-53.

183. De Roos NM, Bots ML, Schouten EG, Katan MB. Within-subject variability of flow-mediated vasodilation of the brachial artery in healthy men and women: implications for experimental studies. Ultrasound in medicine & biology. 2003;29(3):401-6.

184. Charakida M, de Groot E, Loukogeorgakis SP, Khan T, Luscher T, Kastelein JJ, et al. Variability and reproducibility of flow-mediated dilatation in a multicentre clinical trial. European heart journal. 2013;34(45):3501-7.

185. Woodman RJ, Mangoni AA. Adjusting for brachial artery diameter in the analysis of flow-mediated dilatation: pitfalls of a landmark paper? Atherosclerosis. 2013;228(1):277-9.