



KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HETEROKRONİK PARABİOSİS MODELİ KULLANILARAK
YAŞLI FARELERDE DAMAR YANITLARININ
ARAŞTIRILMASI**

ÜLFET FARİSOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. GÜNNUR KOÇER

2019-LEFKOŞA

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ülfet Farisoğlu

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren desteğini hiç eksik etmeden hissettiren aileme sonsuz teşekkür ederim. Tezime başladığım günden itibaren yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren ve destek olan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Günnur Koçer'e, çalışmam boyunca bize her türlü desteği veren anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Emine Koç'a sonsuz teşekkür ederim. Tezimin deney kısmında bize olan yardımlarını esirgemeyen ve her zaman destekleyen Yakın Doğu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi sorumlusu veteriner hekim Melis Temizel'e ve Deney Hayvanları Araştırma Merkezi çalışanı Mustafa Çukur'a teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans tezimin cerrahi birleştime kısmında yardımlarını esirgemeyen Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Özlem Balcıoğlu'na, Doç. Dr. Barçın Özcem'e ve Uzman Dr. Ali Önder Kılıç'a, çalışmamıza kimyasal malzeme desteğinde bulunan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Kansu Büyükaşar'a teşekkürü bir borç bilirim.

Saygılarımla

Ülfet Farisoğlu

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	2
GİRİŞ	3
GENEL BİLGİLER.....	5
2. Vasküler Tonus	5
2.1. Vasküler Sistemin Yapısı ve Fonksiyonu	5
2.1.1 Vasküler sistemin histolojik yapısı	5
2.2. Vasküler Tonusun Düzenlenmesi	6
2.2.1 Ekstresek mekanizmalar:	7
2.2.1.1 Nöral kontrol.....	7
2.2.1.2 Humoral kontrol.....	8
2.2.2 İntresek mekanizmalar	9
2.2.2.1 Doku faktörleri.....	9
2.2.2.2 Parakrin hormonlar	10
2.2.2.3 Miyojenik mekanizmalar	11
2.2.2.4 Endotelyal kontrol.....	11
2.3. Yaşlılıkta Vasküler Tonusun Düzenlenmesine Katılan Mekanizmalar	15
2.3.1 Yaşlılığa bağlı endotel disfonksiyon.....	16
2.3.1.1 Nitrik oksit biyoyararlanımı.....	16
2.3.1.2 Kontraktil faktörler	18
2.3.1.3 Oksidatif stres	19
2.3.1.4 İnflamasyon.....	20
2.3.2 Cinsiyet hormonları	21
2.3.2.1 Testosteron.....	21
2.3.2.2 Östrojen.....	22

2.4. Parabiyoz.....	23
2.4.1 Parabiyoz yöntemi kullanılarak yapılan bazı çalışmalar.....	25
GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Hayvanların Gruplandırılması.....	27
3.2. Parabiyoz protokolü	27
3.2.1 Ameliyat sonrası iyileşme.....	28
3.3. Deneysel Prosedür	29
3.3.1 Hayvanların feda edilmesi	29
3.4. Organ Banyosu Çalışması.....	29
3.4.1 Kasılma Protokolü	30
3.4.2 Gevşeme Protokolü	30
3.4. Verilerin değerlendirilmesi	30
BULGULAR.....	31
4.1.Gevşeme Yanıtları	31
4.1.1 Endotel bağımlı gevşeme yanıtları.....	31
4.1.1.1 Yaşlılıkta endotel disfonksiyonu.....	31
4.1.1.2 Parabiyoz gruplarında endotel bağımlı gevşeme yanıtları	32
4.1.1.3 Endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının mekanizmalarının incelenmesi.....	34
4.1.1.3.1 Kontrol genç ve yaşlı grupların endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının mekanizmalarının incelenmesi.....	34
4.1.1.3.2 9. haftada heterokronik parabiyoz grupların endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının mekanizmalarının incelenmesi.....	35
4.1.2 Endotel bağımsız gevşeme yanıtları	35
4.1.2.1 Sodyum nitroprusside gevşeme yanıtları	35
4.2. Kasılma Yanıtları	38
4.2.1 Fenilefrin kasılma yanıtları	38
4.2.2 Potasyum klorür kasılma yanıtları	40
TARTIŞMA.....	44
5.1. Gevşeme Yanıtları	44
5.1.1 Endotel bağımlı gevşeme yanıtları.....	44
5.1.2 Endotel bağımsız gevşeme yanıtları	46
5.2. Kasılma Yanıtları	47
5.2.1 Fenilefrin kasılma yanıtı	47

5.2.2 Potasyum klorür kasılma yanıtı.....	47
SONUÇLAR.....	49
KAYNAKLAR	50
EKLER	69
EK 1: Etik Kurul Onayı	69
EK 2: Özgeçmiş	70

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Vasküler tonusu düzenleyen mekanizmalar.....	7
---	---

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 NO'in sentezi ve vazodilatasyon mekanizması.....	13
Şekil 4.1. Genç ve Yaşlı grupların ACh maksimal gevşeme yanıtları (A) Genç gruptan fark * p<0,05.....	31
Şekil 4.2. Torasik aort halkalarının haftalara göre ACh (10^{-9} - 3×10^{-5}) doz yanıt eğrileri.....	32
Şekil 4.3. Torasik aorta halkalarının gruplara göre ACh (10^{-9} - 3×10^{-5}) doz yanıt eğrileri.....	33
Şekil 4.4. Torasik aorta halkalarının ACh 3×10^{-5} dozunda haftalara göre maksimum gevşeme yanıtları, Genç grubun ACh yanıtlarından fark * p<0,05.....	33
Şekil 4.5. Kontrol ve Yaşlı grupların torasik aorta halkalarının İndometazin ve L-NNA inkübasyonu sonrasında elde edilen maksimum gevşeme yanıtları ACh yanıtlarından fark * p<0,05, ** p<0,01.....	34
Şekil 4.6. Torasik aorta halkalarının İndometazin ve L-NNA inkübasyonu sonrasında elde edilen maksimum gevşeme yanıtları ACh yanıtlarından fark * p<0,05.....	35
Şekil 4.7. Torasik aort halkalarının haftalara göre SNP (10^{-9} - 3×10^{-4}) doz yanıt eğrileri.....	36
Şekil 4.8. Torasik aorta halkalarının gruplara göre SNP (10^{-9} - 3×10^{-4}) doz yanıt eğrileri.....	37
Şekil 4.9. Torasik aorta halkalarının SNP 3×10^{-4} dozunda haftalara göre maksimum gevşeme yanıtları.....	37
Şekil 4.10. Torasik aorta halkaların haftalara göre PE (10^{-9} - 3×10^{-5}) doz yanıt eğrileri İzokronik gruptan fark * p<0,05, ** p<0,01, İzokronik genç gruptan fark ## p<0,01..	38
Şekil 4.11. Torasik aorta halkalarının gruplara göre PE (10^{-9} - 3×10^{-5}) doz yanıt eğrileri.....	39

Şekil 4.12. Torasik aorta halkalarının PE 3×10^{-5} dozunda haftalara göre maksimum kasılma yanıtları ** $p < 0,01$ Genç kontrolden fark.....	40
Şekil 4.13. Torasik aorta halkaların haftalara göre KCl (20mM, 40mM, 60mM, 80mM) doz yanıt eğrileri.....	41
Şekil 4.14. Torasik aorta halkaların gruplara göre KCl (20mM, 40mM, 60mM, 80mM) doz yanıt eğrileri.....	42
Şekil 4.15. Torasik aorta halkalarının KCl 80 mM dozunda maksimum kasılma yanıtları.....	43

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1 Tıraş olmuş hayvanlar yan yana yerleştirilir.....	28
Resim 3.2 Farelerde parabiyozy işleminden sonraki görünüm (2a) ve oluşan ortak damarlanma (2b).....	29

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

- ACE: Anjiotensin dönüştürücü enzim
- ACh: Asetilkolin
- ADMA: Asimetrik dimetilarjinin
- AMP: Adenozin monofosfattan
- Ang I: Anjiotensin I
- Ang II: Anjiotensin II
- ANP: Atrial natriüretik peptit
- BH4: Tetrahidrobiyopterin
- BK_{Ca}: Kalsiyum bağımlı potasyum kanalları
- BNP: Beyin natriüretik peptit
- Ca⁺²: Kalsiyum iyonu
- cGMP: Siklik guanozin mono fosfat
- COX: Siklooksijenaz
- ECE: Endotelin dönüştürücü enzim
- EDHF: Endotelden kaynaklanan hiperpolarize edici faktör
- EET: Epoksieikosatrienoik asit
- eNOS: Endotelial NOS
- ET-1: Endotelin 1
- FADH: Flavın adeninin dinükleotit
- GDF 11: Büyüme farklılaşma faktörü 11

H⁺: Hidrojen iyonu

H₂: Hidrojen

H₂S: Hidrojen sülfür

HO: Heme oksijenaz

HP-G: Heterokronik genç

HP-Y: Heterokronik yaşlı

ICAM: Adezyon molekülü 1

IL1 β : İnterlökin 1

IL6: İnterlökin 6

IP-G: İzokronik genç

IP-Y: İzokronik yaşlı

iNOS: İndüklenabilir NOS

K⁺: Potasyum iyonu

KCl: Potasyum klorür

L-NMMA: N(omega)-Monomethyl-L-Arginine Acetate

L-NNA: N(omega)- Nitro-L-arginin

M: Molar

MLCK: Miyosin hafif zincir kinaz

μ M: Mikro molar

mM: Mili molar

mRNA: Mesajcı RNA

NF- κ B: Nükleer faktör κ B

nNOS: Nöral NOS

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

PE: Fenilefrin

PGE₂: Prostoglandin E₂

PGF₂ α : Prostoglandin F₂ α

PGI₂: Prostosiklin 2

RAS: Renin-Anjiotensin Sistemi

ROS: Reaktif oksijen

SERCA-2: Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz 2

SNP: Sodyum nitro prusside

SOD: Süperoksit dismutaz

TNF α : Tümör nekroz faktör alfa

TPE: Terapötik plazma değişimi

TXA₂: Tromboksan A₂

VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü

Heterokronik parabiosis modeli kullanılarak yaşı farelerde damar yanıtlarının araştırılması

Öğrencinin Adı: Ülfet Farisoğlu

Danışmanı: Günnur Koçer

Anabilim Dalı: Fizyoloji

ÖZET

Amaç: Parabiyoz yönteminin yaşı ve genç farelerin damar yanıtlarına etkisini ve bu hayvanların damar yanıtlarındaki değişim sürecini ortaya koymayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda 133 adet yaşı ve genç balb/c fareler kullanıldı. Hayvanlar, izokronik yaşı (IP-Y), heterokronik yaşı (HP-Y), izokronik genç (IP-G), heterokronik genç (HP-G), genç kontrol (G-K) ve yaşı kontrol (Y-K) olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı. Heterokronik grupta yaşı ve genç hayvanlar, izokronik parabiyozis grubunda da yaşı ya da genç hayvanlar ortak bir dolaşım oluşturmak için derilerinden cerrahi olarak birleştirildi. Cerrahi işleminden sonra 3., 5., 7., ve 9. Haftalarda hayvanlar feda edilerek torasik aortaları izole edildi. Damar yanıtları organ banyosu ile tayin edildi. Kasılma yanıtlarını değerlendirmek için fenilefrin (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve potasyum klorürlü krebs (20mM, 40mM ve 80mM), gevşeme yanıtlarını değerlendirmek için de asetilkolin (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve sodyumnitroprusside (10^{-9} - 3×10^{-4} M) yanıtları kaydedildi. Doz yanıt eğrileri tekrarlı varyans analizi ile maksimum kasılma ve gevşeme yanıtları tek değişkenli varyans analizi kullanılarak değerlendirildi. Post Hoc test olarak da LSD testi kullanıldı. Veriler $\pm$ standart hata olarak verildi ve $p \leq 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular ve sonuçlar: Yaşlılığın maximum ACh gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak düşürücü etkisi vardı ($p \leq 0,01$). Fakat HP-Y grubunda da 3. Haftada maksimum ACh gevşeme yanıtı anlamlı olarak düşüken ($p \leq 0,05$) ama bu anlamlılık 9. Haftada ortadan kalktı. Maksimum fenilefrin kasılma yanıtları heterokronik parabiyoz grubunda daha düşüktü ($p \leq 0,05$). Parabiyoz modelinin, yaşı yaşlılıkta görülen endotel disfonksiyonun düzeltici katkısı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Parabiyoz, endotel bağımlı gevşeme, NO

Investigation of vascular responses in elderly mice using heterocronic parabiosis model

Student Name: Ülfet Farisoğlu

Advisor: Yrd. Doç. Dr. Günnur Koçer

Department: Physiology

ABSTRACT

Aims: To investigate whether plasma factors in the circulation of old and young animals have an effect on vascular tone in old and young animals whose circulation is combined with parabiosis method. Secondly, we aimed to demonstrate the process of change in vascular tone in animals sacrificed at weeks 3,5,7 and 9.

Methods: There were 133 old and young balb/c mice used in the investigation. The animals were separated into 6 categories, these being; isochronic old (IP-O), heterochronic old (HP-O), isochronic young (IP-Y), heterochronic young (HP-Y), control young (C-Y) and control old (C-O). While in the heterochronic group, old and young animals were surgically combined from their skin, in the isochronic group, the same process was repeated with young and young or old and old animals to create a common circulation. After surgery, animals were sacrificed at weeks 3, 5, 7, and 9, and thoracic aortas were isolated. Vascular responses were determined by organ bath. In order to determine contraction responses, phenylephrine (10^{-9} - 3×10^{-5} M) and potassium chloride krebs (20 mM, 40mM ve 80mM), and to determine vasodilation responses acetylcholine (10^{-9} - 3×10^{-5} M), acetylcholine in the presence of nitroargine (10^{-9} - 3×10^{-5} M) in sodiumnitroprusside (10^{-9} - 3×10^{-4} M) were recorded. While dose response curves were evaluated using 3-way analysis of variance, maximum contraction and relaxation responses were evaluated using a univariate general linear model. Results shown below were founded using the LSD test from Post Hoc. The data were entered as $\pm$ standard deviation and $p \leq 0,05$ was obtained as significant difference.

Results and conclusion: Aging had a significantly lowering effect on maximum ACh relaxation responses ($p \leq 0.01$). However, in the HP-Y group, the maximum ACh relaxation response at the 3rd weeks was significantly lower ($p \leq 0.05$), but this significance disappeared at 9th weeks. Maximum phenylephrine contraction responses were lower in the heterocronic parabiosis group ($p \leq 0,05$). ACh responses increased at the end of 9 weeks in the HP-Y group. Thats why the parabiosis model may have a improver effect on endothel disfunction seen in aging.

Keywords: Parabiosis, Endothelial dependent vasodilation, NO

GİRİŞ

Yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. Kardiyovasküler risk faktörlerinin en önemli hedeflerinden birisi de vasküler endotel tabakasıdır (Lüscher ve ark., 1991). Endotel bağımlı vazodilatasyonun kırk yaşından sonra bozulduğu ve giderek artan yaşla birlikte azaldığı bildirilmiştir (Seals ve ark., 2011). Endotel disfonksiyonu, sadece esansiyel hipertansiyon veya sekonder hipertansiyon (Panza ve ark., 1990, Taddei ve ark., 1993), hiperkolesterolemi (Creager ve ark., 1990, Zeiher ve ark., 1993) ve ateroskleroz (Zeiher ve ark., 1993) gibi hastalıkların karakteristik özelliği olmayıp yaşlılıkla da ilişkilendirilmektedir (Maeda ve ark., 2003, Maeda ve ark., 2004). Patolojik durumlardan bağımsız olarak yaşlılığın, aorta ve direnç arterlerinde endotel disfonksiyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (Maeda ve ark., 2003, Dohi ve ark., 1990, Mayhan ve ark., 1990). Endotel fonksiyonunda yaşlanmayla birlikte görülen değişiklikler kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde klinik açıdan önemli etkileri olabilir. Yaşa bağlı olarak görülen endotel fonksiyonlarındaki bozulma/azalma öncelikle endotel hücrelerinin vasküler tonusu düzenlemek için salgıladıkları gevşetici mediatörlerin azalması ile kendini gösterir. Bu durum endotelden salgılanan çeşitli vazodilatör maddelerin ve özellikle nitrik oksitin (NO) hem üretiminin hem de bioyararlanımının azalması ile açıklanmaktadır (Hayashi ve ark., 2008). Yaşlanma sürecinde NO dışında prostasiklin ve endotelden kaynaklanan hiperpolarize edici faktör (EDHF) gibi endotel bağımlı gevşeticilerin katkısı da azalmaktadır (Najjar ve ark., 2005, Yıldız, 2007).

Parabiyoz; iki organizmanın cerrahi olarak birleştirilmesi anlamına gelmektedir (Bert, 1864). Bu yöntem ilk olarak 1864'te Fransız fizyolog Paul Bert tarafından dolaşım sistemlerini incelemek için beyaz albino sıçanlar kullanılarak yapıldı (Bert, 1864, Conboy ve ark., 2013). Başlangıçta parabiyozda kısa deri insizyonları oluşturuluyor ve hayvanın her iki yan tarafına birer dikiş atılıyordu. Günümüzde ise dikiş tüm vücut kenarı boyunca uzanmaktadır (Conboy ve ark., 2013). Parabiyoz, inflamasyon bölgesinde mikrovasküler oluşumu teşvik eder (Waskow ve ark., 2010). Aynı zamanda büyüme ve proliferasyon faktörleri gibi dolaşımda bulunan mediyatörlerin paylaşılmasına aracılık eder (Weissman ve ark., 1984). Parabiyoz

yöntemi, hücre ve doku yaşlanmasına yönelik sistemik sonuçları ve yaşa bağlı rahatsızlıkların değerlendirilmesine olanak sağlar (Conboy ve ark., 2013). Farklı yaş grubu ya da farklı özellikteki hayvanların dolaşımlarının birleştirilmesine heterokronik parabiyoz, aynı yaş grubu ya da aynı özelliklere sahip hayvanlarla oluşturulan parabiosise de izokronik parabiyoz denmektedir. Heterokronik parabiyotik çalışmalar genç hayvanların dolaşımından köken alan faktörlerin yaşlı hayvanların dolaşımına geçerek bu hayvanların tamir mekanizmalarını aktive edebileceğini önermektedir (Loffredo ve ark., 2013, Conboy ve ark., 2005). Parabiyotik çalışmalar yaşlı hayvanlarda; iskelet kasında kas myosatellite hücrelerinin fonksiyonun ve tamir mekanizmalarının arttığını (Katsimparti ve ark., 2014), Beyinde subventriküler alanda damarlanmanın ve kan akımının arttığını (Villeda ve ark., 2014), artmış olan kardiyak hipertrofinin (Conboy ve ark., 2005) geri döndürüldüğünü göstermektedir. Tam tersine genç hayvanlarda da yaşlı sistemik çevrenin, myogenezi (Loffredo ve ark., 2013) ve nörogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Fakat parabiyotik hayvanlarla yapılan çalışmalarda damar yanıtlarının nasıl değiştiğine dair herhangi bir literatür bilgisi yoktur. Bu veriler ışığında çalışmamızda aşağıda belirttiğimiz gibi iki önemli amacımız vardır;

1- Yaşlı ve genç hayvanların dolaşımlarında yer alan faktörlerin vasküler tonusa etkisinin olup olmadığını araştırmak. Bunun için endotel bağımlı ve endotel bağımsız gevşeme yanıtları ile damarın kasılma yanıtlarını inceleyeceğiz.

2- Parabiyoz çalışmalarında hayvanlar genellikle 4 veya 6 hafta sonra feda ediliyor. Loffredo ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada sistolik kan basıncında 7. haftadan itibaren bir değişiklik saptamışlar. Bu nedenle ikincil olarak hayvanları 3.,5.,7. ve 9. haftalarda feda ederek vasküler tonustaki değişim sürecini ortaya koymayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2. Vasküler Tonus

Vasküler sistemin, başlıca dağıtım ve değişim olmak üzere iki önemli görevi vardır. Dağıtım, kan ile oksijen, besin gibi dokuların kullanacağı yararlı maddelerin götürülmesi ve metabolik artıkların uzaklaştırılması işlemini içerir. Değişim ise akım hızının en az olduğu kapiller damar yatağında kan ve dokular arasında madde alış verişini kapsar. Damar çaplarının değişmesi kan basıncının düzenlenmesini ve kanın tüm vücut bölgelerine ulaşmasını sağlar (Griffith, 1994, Bern, 2008).

2.1. Vasküler Sistemin Yapısı ve Fonksiyonu

2.1.1 Vasküler sistemin histolojik yapısı

Vücutta bulunan damar ağı, kanı kalpten dokulara taşıyan arteriyel sistem, kan ile dokular arasındaki madde alışverişinin gerçekleşmesini sağlayan kapillerler ile kanın kalbe geri dönmesini sağlayan venöz sistemden oluşmaktadır. Büyük damarlarda intima, media ve adventisya olarak toplamda üç tabaka bulunur. Büyük damarlarda, bazal lamina ile endotel hücrelerin arasında bağ doku bulunur. Media tabakasında düz kas hücreleri glikoprotein, elastin ve kolejen matrikse iyice yerleşmiş halde bulunur. Damarın büyüklüğüne bağlı olarak düz kasın hücreleri birkaç tabaka içerebilir. Bu tabakalar longitudinal, helikal ve dairesel olarak düzenlenmiştir. Düz kasın kasılması ile birlikte damarın çapı daralır. Küçük damarlar ve kapillerler ise endotel hücreleri ve bazal laminadan oluşurken düz kastan yoksundurlar. İntima tabakası, tek sıralı endotel hücrelerden oluşurken bazal lamina ile media tabakasından ayrılır. En dışta bulunan adventisya tabakasında kolajen, fibroblast, büyük damarlarda vaza vozumlar, lenfatikler, otonom sinirler özellikle sempatik adrenerjik sinirler bulunur (Klabunde, 2011).

2.2. Vasküler Tonusun Düzenlenmesi

Vasküler düz kas tabakası kan damarlarının kasılmasına ve gevşemesine aracılık eder (Shepherd ve Vanhoutte, 1979). Vasküler düz kas hücrelerinin kasılmaları, mekanik (intralüminal basınç, gerilme) veya farmakolojik aktivasyonla (yani, ligandların hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasıyla) veya hücre içi kalsiyumu hücre içi depolardan salgılayarak (sarkoplazmik retikulum) veya plazma zarında kalsiyum kanallarının açılmasını takiben kalsiyumun hücreye girmesiyle başlayabilir (Ji ve ark., 2002, Hilgers ve Webb, 2005, Wiedeman, 1966, Walsh, 2011, Webb, 2003, Wray ve Burdya, 2010, Devine ve ark., 1972, Cribbs, 2001). Hücre içi serbest kalsiyum iyonları, kalmoduline bağlanır ve kalsiyum-kalmodulin kompleksi, miyosin hafif zincir kinazını (MLCK) aktive eder. MLCK, miyozin hafif zincirini fosforile eder, bu da miyozin başları ile aktin filamentleri arasında çapraz köprü oluşumunu sağlar. Böylece düz kas hücreleri kasılır (Horowitz ve ark., 1996, Shozo ve Potter, 1986, Van Lierop ve ark., 2002, Raina ve ark., 2009, Walsh, 1994, Stull ve ark., 1991, Rembold ve Murphy, 1993).

Vasküler tonus, regülasyonu ve yeterli doku perfüzyonunu korumak için temel bir fonksiyondur. Vasküler tonus, sinirsel ve humoral faktörler (örneğin, endotel ve düz kas) gibi çeşitli parakrin faktörleri arasındaki karmaşık bir etkileşimle düzenlenir. Fizyolojik süreçte olduğu gibi birçok patolojik süreçte de endotel, vazodilatör ve vazokonstriktör mediyatörler ile vasküler tonusun önemli bir düzenleyicisidir (Griffith ve ark., 1994, Triggle ve Ding, 2011).

Vasküler tonusun düzenlenmesini sağlayan mekanizmaları ekstrensek ve intrensek mekanizmalar olmak üzere iki başlık altında toplayabiliriz. Bu mekanizmalar aşağıda tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Vasküler tonusu düzenleyen mekanizmalar (Koçer,2012).

Vaküler Tonusun Düzenlemesi

<u>Ekstresek Mekanizmalar</u>	<u>İntrensek Mekanizmalar</u>
Nöral Kontrol	Doku Faktörleri
Humoral Kontrol	Parakrin Hormonlar
	Miyojenik Mekanizmalar
	Endotelial Kontrol

2.2.1 Ekstresek mekanizmalar

2.2.1.1 Nöral kontrol

Vasküler tonusun nöral kontrolü iki başlık altında incelenmektedir;

-Parasempatik İnnervasyon; Kalbi innerve eden parasempatik lifler medulladan kaynaklanır. Bazı efferent parasempatik lifler doğrudan veya dolaylı olarak bazı organlardaki kan damarlarını innerve ederek vazodilatasyona yol açarlar. Parasempatik innervasyonda NO oluşumu ile vazodilatasyona neden olan vasküler endoteldeki muskarinik reseptörlere bağlanan asetilkolindir (ACh).

-Sempatik İnnervasyon; Kalp ve damarların sempatik adrenerjik kontrolünün en önemlileri medullada yer alan nöronlardan kaynaklanmaktadır (Klabunde, 2012). Perivasküler sempatik sinirler, postganglionik efferent liflerdir ve hücre gövdeleri paravertebral gangliyonlarda bulunur (McLachlan,2003). Sempatik efferentlerin küçük dalları damarların adventisiya tabakasında yer alır. Bu sinirlerin küçük, şişkin kısımları olan varikositlerden nörotransmitterler salgılanır (Klabunde, 2012). Norepinefrin, salgılanan başlıca nörotransmitterdir ve serbest bırakıldığı zaman α adrenerjik veya β adrenerjik reseptöre bağlanıp etki gösterir (Bell ve ark., 1996, Minneman, 1988). Direnç ve kapasitans damarlarda kasılmaya neden olan sempatik aktivasyon sistemik vasküler direncin de artmasını sağlar. Bunun yanında venlerde kasılmayı sağlayarak venöz kapasitansı azaltır. Direnç damarlarının sempatik aktivasyonu birçok organda vasküler tonusa katkıda bulunur. β_2 adrenerjik reseptörlerin inervasyonu damarlarda vazodilatasyona neden olur fakat damarlarda α -adrenoreseptörler daha fazla ve daha baskın olduğu için β_2 adrenoreseptörlerin

vazodilatör etkisini görmek için ancak α -adrenoreseptörlerin tamamen bloke olması gerekir.

2.2.1.2 Humoral kontrol

Humoral faktörlerin bazıları kalp ve damarlarını doğrudan etkilerken bir kısmı da kan hacmindeki değişikliklerle kardiyovasküler fonksiyonları etkiler. Başlıca humoral faktörler; dolaşımdaki katekolaminler, renin-anjiyotensin-aldesteron sistemi (RAS), atrial natriüretik peptit (ANP), antidiüretik hormon (Vazopressin)'dir (Klabunde, 2012).

- *Katekolaminler*; Adrenal medulla dokuyu innerve eden pregangliyonik sinirlerle aktive edildiğinde %80 epinefrin, %20 norepinefrin salgılar. Normalde salgılanan norepinefrinin çoğu sinirler tarafından geri alınarak metabolize edilir. Az miktarda norepinefrin kana karışır ve yayılır. Bu hormonlar vazokonstriksiyona yol açar (Klabunde, 2012).

-*Renin-Anjiyotensin Sistemi*; Kan hacmini, arteriyal kan basıncını, kardiyak ve vasküler fonksiyonu düzenlemede rol oynar. Böbreklerin sempatik sistem tarafından uyarılması sonucuyla renal arter kan basıncının düşmesi ve makula densaya ulaşan sodyum konsantrasyonunun düşmesi sonucunda renin üretilir. Renin, karaciğer tarafından salgılanan anjiyotensinojeni, anjiyotensin I'e (Ang I) dönüştürür. Ang I oluştuktan sonra anjiyotensin dönüştürücü enzimle (ACE) anjiyotensin II'ye (Ang II) dönüştürülür. Ang II'nin vasküler tonusu düzenleyici etkileri şunlardır; resistans damarlarında konstriksiyona sebep olarak sistemik vasküler direnci ve arteriyal basıncı artırır, sempatik sinir uçlarından norepinefrin salgısını artırıp geri alınımını inhibe ederek sempatik adrenarjik aktiviteyi artırır, adrenal kortekse etki ederek aldesteron salgılanmasını sağlar böylece sodyum ve sıvı tutulmasını artırarak kan hacmini artırmış olur, arka hipofizden vazopressin salgılatarak ve beyindeki susama merkezini uyatarak kan hacmini artırıp kan basıncının artmasına ve kan basıncının düzenlenmesine yardım eder (Klabunde, 2012).

-*Atriyal Natriüretik Peptid*; Atriyal distansiyona cevap olarak kalpteki atriyal myositlerden salgılanır. Uzun süreli sodyum ve su dengesi, kan hacminin ve arteriyal basıncın düzenlenmesinde rol oynar. RAS ile zıt çalışan bir hormondur. Aldesteron

salgılanmasını azaltır, glomerüler filtrasyonu artırır. Natiürez ve diürez neden olur ve renin salgılanmasını azaltarak Ang II'yi azaltmış olur. Böylece kan hacmini azaltarak kalp debisi ve kan basıncında düşüşe yol açar (Klabunde, 2012).

-*Vazopressin*; Arka hipofiz bezinden salgılanır. Böbreklere ve kan damarlarına etki eder. Hipovolemik şok gibi aşırı kanama olduğu zaman salgılanması artarak vasküler direnci eski haline getirir. Bu vazokonstriktör etki bazen dolaşım şoku tedavisinde kullanılarak vasküler direnci ve dolayısıyla arteriyal basıncını normal düzeylere arttırmada kullanılır (Klabunde, 2012).

2.2.2 İntrensek mekanizmalar

2.2.2.1 Doku faktörleri

Doku faktörleri kan damarlarını çevreleyen dokular tarafından üretilen maddelerdir. Bu maddeler kan damalarının kasılmasını veya gevşemesini sağlayarak kan akışını ve direnci değiştirir. Bazı durumlarda bu maddeler endotel fonksiyonunu dolaylı olarak etkileyerek veya sempatik sinirler tarafından norepinefrin salgılayarak vasküler düz kas hücrelerini etkiler. Bu vazoaktif maddelerden bazıları adenozin, karbondioksit (CO_2), hidrojen iyonu (H^+), potasyum iyonu (K^+) ve laktat gibi hücre metabolizma ürünleridir. Bunların yanında kan damarlarını çevreleyen farklı hücre tipleri lokal parakrin hormonlar olarak adlandırılan vazoaktif maddeler de salgırlar. Bu maddeler histamin, bradikinin ve prostoglandinlerdir (Klabunde, 2012).

-*Adenozin*; 5' nükleotidaz enzimiyle adenozin monofosfattan (AMP) üretilir. AMP, ADP ve ATP'den üretilir. Az miktarda ATP hidrolizi, büyük miktarda adenozin üretilmesini sağlar. Çünkü ATP'nin hücre içi konsantrasyonu adenozine göre çok yüksektir (Klabunde, 2012). Böbrek damarları dışında pek çok dokuda vazodilatör görevi görür. Hipoksi ve oksijen tüketiminin arttığı koşullarda adenozin üretiminin arttığı gözlenmiştir. Adenozinin vazodilatör etkisine K_{ATP} kanallarının aktivasyonu aracılık eder (Deussen ve ark., 2006, Klabunde, 2012).

- *Karbondioksit*; Özellikle beyinde kan akımının düzenlenmesinde önemlidir (Erlichmana ve ark., 2010). Kan akımının azaldığı durumlarda kanda CO_2

konsantrasyonu artar. CO₂, parankimal hücrelerden damar düz kas hücrelerine yayılarak vazodilatasyona sebep olur (Klabunde, 2012).

- *Hidrojen İyonu*; H⁺ konsantrasyonu CO₂ konsantrasyonu artışına bağlı olarak artabileceği gibi anaerobik metabolizma sonucunda oluşan laktik asit gibi metabolitler de H⁺ konsantrasyonunu arttırmaktadır. H⁺ iyonu lokal olarak vazodilatasyona neden olur. Serebral dolaşımın düzenlenmesindeki katkısı önemlidir (Klabunde, 2012).

-*Potasyum İyonu*; K⁺, kalp kası ve iskelet kasının kasılmasıyla hücre dışına geçerek kan damarlarının çevresinde artar. Artmış K⁺ iyonu konsantrasyonu damar düz kasında hiperpolarizasyona neden olarak damarlarda vazodilatasyona yol açar (Klabunde, 2012).

- *Oksijen (O₂)*; O₂ seviyesi lokal kan akımının düzenlenmesinde önemlidir. Dokulardaki parsiyel oksijen basıncı düştüğünde ve oksijen kullanımı arttığında oluşan hipoksi, pulmoner damar yatağı hariç diğer damar yataklarında vazodilatasyona sebep olur (Klabunde, 2012).

- *Ozmolarite*; kan ve dokulardaki ozmolarite değişikliği kan akımının düzenlenmesi ile ilişkilidir. Doku iskemisi veya metabolik aktivite artışı, intersisyonel sıvının ve venöz kanın ozmolaritesini artırıp vazodilatasyona yol açar. Ozmoralitede meydana gelen spesifik olmayan değişikliklerin kan akımının düzenlenmesinde rol alabileceği düşünülmektedir (Klabunde, 2012).

2.2.2.2 Parakrin hormonlar

Kan akımının düzenlenmesinde histamin, bradikinin ve arşidonik asit metabolitleri doku metabolizmasından bağımsız olarak etki eden mediyatörlerdir.

- *Histamin*: Histamin, doku mast hücrelerinden hasar, inflamasyon ve alerjik tepkilere yanıt olarak salgılanır. Etkisini H1 ve H2 reseptörleri aracılığıyla gösterir. Bazı damarlarda vazodilatasyona neden olurken, bazı damar yataklarında ise vazokonstriksiyona neden olur (Klabunde, 2012).

- *Bradikinin*: Kanda ve dokularda bulunup alfa-2 globuline etki ederek kallikrenin etkisi ile oluşur. Bradikinin endotel hücrelerinde bulunan B2 kinin reseptörlerine

bağlanıp hücre içerisinde Ca^{+2} konsantrasyonunu artırarak NO oluşumunu uyarır ve vazodilatasyona sebep olur. Böylece fosfolipaz A2 aktivasyonu ile membranda vazoaaktif maddeler sentezlenir. Arşidonik asit metabolitleri ve NO ile dolaylı yoldan vazodilatasyona sebep olur.

-Arşidonik Asit Metabolitleri: Mebrandaki bir fosfolipit olan arşidonik asitten üretilen prostosiklin, prostoglandin E₂ (PGE₂) vazodilasyona, prostoglandin F₂α, tromboksanlar ve lökotrienler vazokonstriksiyona sebep olur. Birçok dokuda etki gösterirler ve bunun yanında birçok uyaran sayesinde salgılanıp bazal tonusa etki ederler. Böylece doku kanlanmasının düzenlenmesinde katkıda bulunurlar (Koçer, 2012, Klabunde, 2012).

2.2.2.3 Miyojenik mekanizmalar

Bazal durumda sabit olan doku metabolizması, perfüzyon basıncında değişiklik olsa bile kan akımının sabit şekilde devam ettirilmesi gerekir. Bu mekanizma kan akımının otoregülasyonu olarak adlandırılmaktadır. Perfüzyon basıncı değiştiğinde kan akımının sabit kalmasını miyojenik mekanizmalar sağlar. Miyojenik mekanizmalar, intravasküler basınç arttığı zaman damar çapını ve direncini yeniden eski haline getirebilmek için kasılma yoluyla cevap verir. Bu mekanizmanın işleyişine bakacak olursak; vasküler düz kasın gerilmesi sonucunda membranda bulunan gerime duyarlı kanallar açılır ve hücre içi kalsiyum düzeyi artırarak damar düz kasında kasılmaya yol açar (Koçer, 2012, Klabunde, 2012).

2.2.2.4 Endotelyal kontrol

Endotel hücrelerinin intimal tabakası kalpten en küçük kılcal damarlara kadar tüm vasküler ağacı kaplar, böylece kan damarlarının tüm iç yüzeyini oluşturmuş olur.

Endotel tabakası, kardiyovasküler risk faktörlerinin de hedefidir (Lüscher ve ark., 1991). Sağlıklı arterlerdeki endotel bağımlı gevşemeler, EDHF, NO ve/veya prostosiklin üretimi gibi mekanizmalara bağlıdır (Furchgott ve ark., 1989, Pearson ve Vanhoutte, 1993). Büyük arterlerde endotel bağımlı gevşemelerin büyük bir kısmından NO salınımı sorumludur (Davidge ve ark., 1998).

Vasküler tonusun düzenlenmesinde endotel tabakasından salgılanan faktörler hem vazodilatasyona ve vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Endotelden salgılanan

NO, prostosiklin ve EDHF vazodilatör ajanlarken, endotelden salgılanan endotelin 1 (ET1) ise vazokonstriktör ajandır (Klabunde, 2012). Bu vazoaaktif maddeler vasküler tonusu desteklemek, sağlıklı arter yapısının ve işlevinin devamını sağlamak için gereklidir (Sloboda ve ark. 2012).

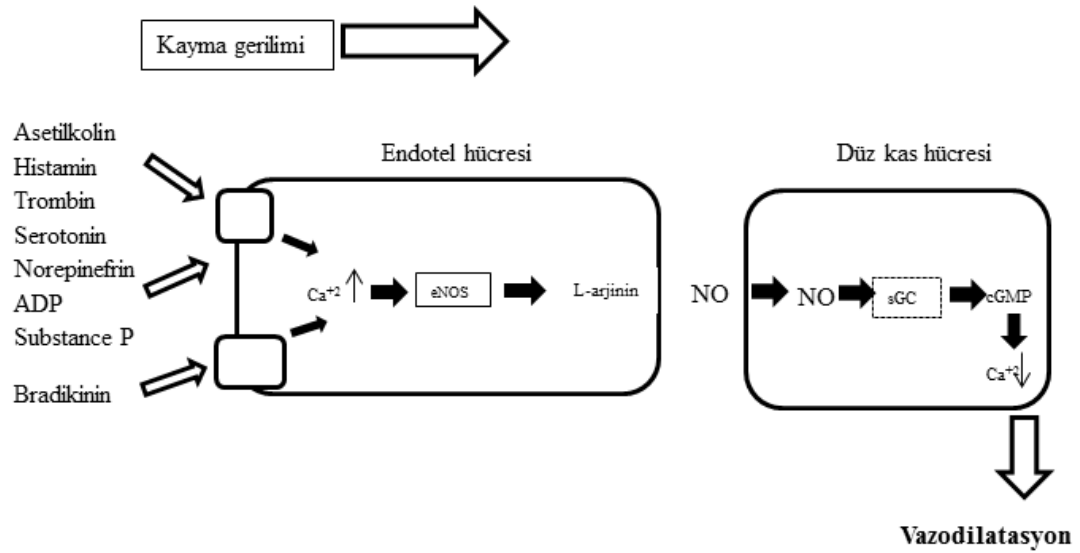
- *Nitrik oksit*: Endotel kaynaklı NO güçlü bir vazodilatör ajan olmasının yanında (Furchgott ve ark., 1980, Ignarro ve ark., 1987), vasküler tonus ve kan basıncının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar (Moncada ve Radomski, 1988, Furchgott ve ark., 1980.).

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından endotel hücrelerdeki L-argininden sürekli olarak sentezlenen uçucu bir gazdır (Palmer ve ark., 1988). Yapısal ve fonksiyonel olarak NOS'un üç farklı izoformu bulunur. Bunlar; endotelial NOS (eNOS), nöral NOS (nNOS) ve indüklenabilir NOS (iNOS)'tur (Ayajiki ve ark., 1996, Rees ve ark., 1989).

Endotel tabakasında NO, spesifik olarak iyi karakterize edilmiş bir NO sentaz (eNOS) enzimi aracılığı ile sentezlenirken, vasküler duvardaki NO degregasyonu ve metabolizma süreci iyi anlaşılmamıştır (Papapetropoulos ve ark., 1999, Stuehr, 1999). eNOS kalsiyum bağımlı veya bağımsız yollarla aktive edilebilir. Asetilkolin, bradikinin ve histamin gibi agonistler, endotel hücre membranındaki spesifik reseptörlere etki ederek hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır ve kalsiyum, kalmoduline bağlanıp kalmodulinin aktivasyonuna yol açarak NO üretimini artırır (Zhao ve ark., 2015). eNOS'ın kalsiyumdan bağımsız aktivasyonu ise eNOS'ın sahip olduğu farklı inhibisyon ve aktivasyon bölgeleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu bölgelerden Ser1177 aktivasyon, Thr495 ise inhibisyon bölgeleridir. Protein kinaz A ve B, büyüme faktörleri veya hormonlar gibi çeşitli uyaranlar Ser1177'yi fosforile ederek eNOS'ı aktive ederler (Dimmeler ve ark., 1999, Chen ve ark. 1999). Kayma geriliminin neden olduğu NO salınması da Ca^{+2} bağımsız yolla, protein kinaz A'ya bağlı şekilde eNOS'ın aktivasyon bölgelerini fosforile ederek gerçekleşir (Boo ve ark. 2002, Boo ve ark. 2002).

Vasküler düz kas kasılmasının düzenlenmesini sağlayan en önemli mekanizma NO-cGMP mekanizmasıdır. Endotel bağımlı vazodilatör maddeler olan asetilkolin, histamin, trombin, serotonin, norepinefrin, ADP, substance P ve bradikinin kendi reseptörlerine bağlandıkları zaman eNOS'u aktive ederek L-

argininden NO üretimini sağlarlar (Klabunde, 2012, Tousoulis ve ark., 2012). Endotelden gaz halinde salınan NO, düz kas hücrelerine geçerek soluble guanilat siklazı (sGC) uyararak cGMP üretimini artırır. Böylece hücre içi Ca^{+2} düzeyi azalarak gevşemeye sebep olur (Moncada ve ark., 1991, Radomski ve Moncada, 1991, Klabunde, 2012) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. NO'nın sentezi ve vazodilatasyon mekanizması

NO, vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir mediyatördür. Yapılan birçok çalışmada NO salınımının azalması, hipertansiyona, ateroskleroza ve hiperkolestrolemi gibi patolojik sorunlara yol açtığı bildirilmiştir (Canon, 1998). Huang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada endoteli sağlam fakat eNOS'dan yoksun hayvanların aort damarlarında asetilkoline verilen gevşeme yanıtlarının azaldığını ve bu hayvanların hipertansif olduklarını göstermişlerdir. Kardiyak, nöronal ve hormonal homeostatik mekanizmaların devreye girmesine karşın eNOS'ın olmayışı kompanse edememekte ve hipertansiyon gelişmektedir. Bu durum sistemik kan basıncının düzenlenmesinde eNOS kaynaklı NO'nın rolünün çok önemli olduğunu göstermektedir (Koçer, 2012).

Endotelial nitrik oksit sentaz içermeyen hayvanların pulmoner dolaşımında NO'nin katkısı incelenmiştir. Bu hayvanlarda pulmoner arter basıncı ve damar direncinin arttığı gözlenmiştir.

Koroner damar tonusunun düzenlenmesinde NOS enziminin inhibe edilmesi ile NO'nin önemi gösterilmiştir. Kalplerin N(omega)-Monomethyl-L-Arginine Acetate (L-NMMA) ile perfüze edilmesi sonucunda bazal koroner damar tonusunda artış gözlemlenmiştir. Bunun yanında asetilkoline ve bradikinine verilen gevşeme ise baskılanmıştır (Cannon, 1998, Koçer,2012). L-NMMA, N (omega)- Nitro-L-arginine (L-NNA) ve N omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) NO'nin endotel hücrelerden salınmasını inhibe ederek bu dokularda asetilkoline verilen gevşeme yanıtı da baskılamış olur (Moncada ve Higgs, 1991).

- *Prostosiklin (PGI₂)*: Endotel hücrelerinde arşidonik asit ve siklooksijenaz enzimlerinden üretilir. Bu madde güçlü bir vazodilatördür. Damar düz kasında cAMP aracılığıyla gevşemeye neden olur. İskelet kasında kan akımını ve metabolik vazodilatasyonu düzenler. PGI₂ sentezi bradikinin, substance P, platallet kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, adenin nükleotiti, adenosin ve NO tarafından uyarılır. PGI₂, vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynar (Klabunde, 2012, Koçer, 2012).

-*Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör*: Endotel hücreleri, bradikin ve asetilkolin gibi agonistler tarafından aktive edildiğinde EDHF salgılanır (Cohen ve Vanhoutte, 1995). EDHF hiperpolarizasyon oluşturarak vazodilatasyon sağlar. Hiperpolarizasyonu sağlayan üç mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki; Ca⁺² seviyesi artışı ile endotelde bulunan kalsiyum bağımlı potasyum kanalları (BK_{Ca}) aktive olur. Böylece hücre dışına K⁺ çıkışına sebep olurlar. Hiperpolarizasyon sonucunda düz kas membranında oluşan değişim, hücre içi Ca⁺² seviyesini azaltır ve vazodilatasyona sebep olur (Edwards ve Weston, 2004). İkinci mekanizma; epoksieikosatrienoik asit (EET), arşidonik asit metabolizması ürünüdür. Endotel hücresinde sentezlenmelerine rağmen, düz kas hücrelerinden K⁺ akışını artırıp hiperpolarizasyon ve dolayısıyla gevşemeye neden olurlar (Quilley ve McGiff 2000, Campbell ve ark., 1996, Gauthier ve ark., 2002). Üçüncü mekanizma; BK_{Ca} ile

endotelde oluşan hiperpolarizasyon gap junctionlarla vasküler düz kasa iletilip burada vazodilatasyona sebep olur (Sandoo ve ark., 2010, Assar ve ark., 2012).

Genelde, iletim arterlerinden küçük arterlere gidildikçe NO'nın vasküler tonusa katkısı azalırken EDHF'ninki artmaktadır. EDHF üretimi ve NO düzeylerinin düzenlenmesi arasında bir etkileşim vardır.

- *Endotelin-1 (ET-1)*: Endotel hücre zarında preproendotelin olarak sentezlenip yine burada bulunan endotelin dönüştürücü enzim (ECE) tarafından aktif ET'e dönüştürülerek salgılanır. Vazokonstriktör olarak görev yapar. ET'ler, ET-A ve ET-B reseptörleri üzerinden etkilerini gösterirler. ET-A reseptörü vazokonstriktör etki, ET-B reseptörü ise vazodilatör etki gösterir. ET-A reseptörü damar düz kasında daha fazla bulunurken ET-B reseptörü endotel hücrelerinde yer alır. İlk aktive olduğunda güçlü vazokonstriksiyonu uyarır; ancak ilerleyen süreçte NO salınımını uyararak etkisini azaltır. ET-1 endotel hücreleri tarafından oluşumu ve salınması, anjiyotensin II, vasopressin, trombin, sitokinler, reaktif oksijen türleri ve vasküler endotel üzerinde etkili olan kayma kuvvetleri tarafından uyarılır. ET-1 salınımı nitrik oksit, ayrıca prostasiklin ve atriyal natriüretik peptid tarafından inhibe edilir (Klabunde, 2012, Koçer, 2012).

- *Karbonmonoksit (CO)*: CO, hem'in heme oksijenaz (HO) tarafından degrade edilmesi sonucunda demir ve biliverdinle birlikte endojen olarak üretilen gaz molekülüdür (Leffler ve ark., 2011). Endojen CO'nın ve ekzojen olarak uygulanan CO'nın, farklı hayvan türlerinden farklı vasküler dokularda vazodilatasyona yol açtığı gösterilmiştir (Ndisang ve ark. 2004). HO/CO sistemi vasküler tonus ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Zhang ve ark. 2001, Stec ve ark., 2008).

2.3. Yaşlılıkta Vasküler Tonusun Düzenlenmesine Katılan Mekanizmalar

Yaşlılığın, patolojik durumlardan bağımsız olarak aorta ve direnç arterlerinde endotel disfonksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Yaşlanmaya bağlı olarak endotel fonksiyonunda görülen değişiklikler kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde klinik açıdan önemli etkileri olabilir. Görülen bu değişiklikler öncelikli olarak endotel hücrelerinin vasküler tonusu düzenlemek için salgıladıkları gevşetici

mediatörlerden özellikle NO'nın hem üretilmesinin hem de biyoyararlanımının azalması ile kendini gösterir. NO yanında, prostasiklin ve EDHF gibi endotel bağımlı gevşeticilerin etkisi de azalmaktadır (Herrera ve ark., 2010).

2.3.1 Yaşlılığa bağlı endotel disfonksiyon

Arteriyel endotel, kan ve damar duvarı arasında yer alan son derece dinamik bir yapıya sahiptir. Yaşlanmaya bağlı olarak kardiovasküler değişikliklerde endotel anahtar rol oynamaktadır. Fizyolojik koşullarda vasküler yapı ve fonksiyonların sürdürülmesinde büyük görev üstlenen endotel, ürettiği ve/veya salgıladığı otokrin ve parakrin mediatörlerle bu işlevleri yürütmektedir. Endotel hücrelerinin fonksiyonunda oluşabilecek yetersizlik, endotel disfonksiyonu olarak adlandırılmakta ve günümüzde birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı kabul edilmektedir. Endotel disfonksiyonu, sadece hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve ateroskleroz gibi hastalıkların karakteristik özelliği olmayıp yaşlılıkla da ilişkilendirilmektedir. Yaşlılıkta değişiklik gösteren vasküler mekanizmaları ayrıntılı olarak ele alacak olursak;

2.3.1.1 Nitrik oksit biyoyararlanımı

Nitrik oksit, endotelden salınan hem direnç arterlerinde hem de büyük arterlerin vasküler tonusunda rol alan güçlü bir vazodilatördür (Herrera ve ark., 2010). NO, L-arjininden, NOS enzimi aracılığıyla sentezlenir fakat üretiminde tetrahidrobiopterin (BH4) ve FADH gibi kofaktörlere de ihtiyaç vardır (Donato ve ark., 2015). NO ilişkili olan asetil kolin bağımlı gevşeme yanıtı ratlarda 18-24 ay aralığında (Matz ve ark., 2000) insanlarda 60 yaşından sonra (Al-Shaer ve ark. 2006) yaşlılıkla birlikte azalmıştır (Herrera ve ark., 2010). Yaşlılık sürecinde NO biyoyararlanımının azalmasına NO yapımının azalması veya yıkımının artması ile ilgili mekanizmalar neden olmaktadır. Yaşlılıkta NO üretiminin azalması; L-arjinin yetersizliğine, endojen eNOS inhibitörlerinin artmasına, eNOS kofaktörlerinin azlığına ve eNOS aktivitesi ve/veya ekspresyonunda azalma ile ilişkili olabilir (Matz and Andrian 2003, Assar ve ark., 2012). Yaşlılıkta NO biyoyararlanımındaki azalmanın en önemli nedeni yaşlanmayla birlikte süperoksit anyon formasyonunun oldukça fazla artışıdır (Spier ve ark., 2014, Assar ve ark., 2012).

L-Arjinin düzeylerinin azalması: Yaşlı hayvanlarda ve yaşlı insanlarda NO üretiminin azalmasından sorumlu mekanizmalardan biri endotel hücrelerinin sitoplazmasında L-arjininin konsantrasyonlarının düşük olmasıdır (Herrera ve ark., 2010, Assar ve ark., 2012). Yaşlılıkla birlikte arjinaz ekspresyonunun ve aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Santhanam ve ark., 2008). İnsanlarda (Holowatz ve ark., 2006) ve ratlarda (4-Santhanam ve ark., 2007) arjinaz inhibitörü ile yapılan çalışmalarda NO bağımlı vazodilatasyonu düzelttiğini göstermiştir. Artmış arjinaz aktivitesi L-arjininin degradasyonuna ve eNOS için substrat azalmasına neden olarak NO sentezinin azalmasına yol açmaktadır.

Endojen NOS inhibitörü: NO sentezi, asimetrik dimetilarjinin (ADMA) ile inhibe edilmektedir (Assar ve ark., 2012). ADMA doğal olarak plazma ve çeşitli dokularda bulunmaktadır (4-Yamagishi ve Matsui 2011). ADMA üretiminin artması vasküler hastalıklar ve hipertansiyon gibi patolojilerle ilişkili kardiyovasküler risk faktörüdür. Sağlıklı kişilerde yaş ile plazma ADMA seviyeleri arasında pozitif korelasyon rapor edilmiştir (Schulze ve ark., 2005). ADMA'nın endotel yaşlanmasını arttırdığına dair verilerin olmasının yanı sıra endotel bağımlı vazodilatasyondaki bozulma ile ilişkisinin olmadığını söyleyen yayın da mevcuttur (Gates ve ark., 2007).

Tetrahidrobiopterin (BH4): BH4, NOS aktivitesi için gerekli bir kofaktördür. İnsanlarda yaşlılığa bağlı endotel disfonksiyonu ve BH4 yetersizliği arasındaki ilişki ve BH4 infüzyonunun endotel bağımlı gevşemeyi düzelttiği rapor edilmiştir (Higashi ve ark., 2006).

Endotelial NOS: Yaşlılıkla birlikte NO biyoyararlanımının azaldığı konusunda herhangi bir şüphe yokken farklı damar yataklarında eNOS ekspresyonu ile çelişkili bilgiler vardır. Ekspresyonunun arttığını (4- Briones ve ark., 2005, Cernadas ve ark., 1998) gösteren yayınların yanında azaldığını (4- Tang ve Vanhoutte 2008) gösteren yayınlar da mevcuttur. eNOS post-translasyonel olarak PI3 Kinaz/Akt bağımlı fosforilasyon ile serin1177 fosforlanarak aktivitesi artırılır. Yaşlı hayvanlarda hem küçük hem de büyük damarlarda Akt bağımlı fosforilasyonun azaldığı gösterilmiştir (Soucy ve ark., 2006, Le Blanc ve ark. 2008).

Endotelden Kaynaklanan Hiperpolarize Edici Faktör: Endotel, NO ve prostosiklinin salınımının yanı sıra endotel bağımlı hiperpolarizasyon faktör ile vasküler tonusu kontrol eder (Assar ve ark., 2012). Siklooksijenazdan (COX) türetilmiş araşidonat metabolitleri, hidrojen sülfür (H₂S), CO ve endotelden salınan çeşitli peptidler EDHF olarak kabul edilmektedir. EDHF bağımlı vazodilatasyon direnç damarlarında önemli bir rol oynar ve EDHF yanıtları damar çapı ile ters yönde değişmektedir (Shimokawa ve ark., 1996). Yaşlı ratların mezenterik ve renal arterlerinde EDHF bağımlı vazodilatasyonun bozulduğu gösterilmiştir (Goto ve ark., 2000, Long ve ark., 2005). Yaşlı farelerin kutanöz damarlarında NO ve prostosiklin bağımlı vazodilatasyondaki azalmanın kısmen EDHF bağımlı vazodilatasyon ile kompanse edildiği belirtilmiştir (Gaubert ve ark., 2007). Yaşlılarda EDHF ile ilgili tartışmalı sonuçlar tür farklılıklarından, damar yataklarındaki farklılıklardan veya damar çaplarındaki değişikliklerden kaynaklanabilmektedir (Herrera ve ark., 2010, Assar ve ark., 2012). Yaşlanmayla birlikte EDHF vazodilatasyon yanıtlarındaki azalma kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının ekspresyonunun azalması (Idris Khodja ve ark., 2012) veya renin-anjiyotensin sisteminin upregüle olmasıyla ilişkili olabileceği de öne sürülmektedir (Goto ve ark., 2004).

2.3.1.2 Kontraktil faktörler

Siklooksijenaz yolağındaki değişiklik: Siklooksijenaz yolağı, salgıladığı vazodilatör mediyatörler ve vazokonstriktör mediyatörler ile vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yaşlanmayla birlikte vazodilatör ve vazokonstriktör mediyatörler arasındaki denge bozularak kontraktil faktörlerde artış gözlenmektedir. İn vivo ve in vitro olarak vazodilatör PGI₂'in yaşlılıkla azaldığı COX kaynaklı vazokonstriktörlerin katkısı rapor edilmiştir. Fakat insanlarda COX yolağı kaynaklı tromboksan A₂ (TXA₂), PGF₂ α gibi konstriktörlerin katkısı açık değildir (Assar ve ark., 2012).

Renin Anjiyotensin Sistemi: RAS fizyolojik ve patolojik koşullarda kardiyovasküler kontrol için kritiktir (Assar ve ark., 2012). AngII etkisini AT₁ ve AT₂ reseptörleri aracılığıyla göstermektedir (Stegbauer ve Coffman 2011). Ang II, AT₁ reseptörüne bağlandıktan sonra, NAD(P)H aktivasyonu (Kimura ve ark., 2005) ve eşleşmemiş eNOS (Mollnau ve ark., 2002) ile intraselüler süperoksit üretimini tetikler (Assar ve

ark., 2012). Normal fizyolojik koşullarda AngII aracılı sinyal yolları sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Fakat RAS aktivitesinin çeşitli vasküler hastalıklarda arttığı ve yaşlanmayla birlikte AngII ve ACE ekspresyonunun arttığı (Rajagopalan ve ark., 2002, Wang ve ark., 2003), RAS'nin yaşlılığa bağlı endotel disfonksiyonunda rolü olduğu gösterilmiştir (Assar ve ark., 2012). AngII'nin, endotelial disfonksiyonun ve vasküler oksidatif stresin güçlü uyarıcı olduğu tespit edilmiştir (Idris Khodja ve ark., 2012). Ratlarda AT1 reseptör antagonisti veya ACE inhibitörü ile tedavi edilmesi endotel disfonksiyonunu düzelttiği ve oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (Goto ve ark., 2000, Kansui ve ark., 2002, Mukai ve ark., 2002). Benigni ve arkadaşlarının AT1A reseptörü olmayan farelerle yapmış oldukları çalışmada, bu farelerin yaşam sürelerinin daha uzun, ROS üretiminin çok düşük olduğu tespit edilmiştir (Benigni et al 2009).

Endotelin 1: ET1 endotel hücrelerinde sentezlenip salınan güçlü bir vazokonstriktör mediyatördür. ET1, etkisini damar düz kasında bulunan ETA ve hem damar düz kasında hem de endotelde bulunan ETB reseptörü aracılığıyla etkisini göstermektedir. Her iki reseptörü de PLC yolağı aracılığıyla sitozolik Ca konsantrasyonunun artmasına ve uzun süreli düz kasın kasılmasına yol açar (Lüscher ve Barton 2000, Seo ve ark., 1995). ETB endotelde hücre içi Ca artışı aracılığıyla eNOS aktivasyonuna ve vazodilatasyona neden olur (Tsukara ve ark., 1994). Yaşlı ratlarda ET 1 bağımlı vasokonstriksiyonun arttığı rapor edilmiştir (Donato ve ark., 2005, Korzick ve ark., 2005). İnsanlarda yaşlanmayla plazma ET1 düzeylerinin arttığı ve ETA/ETB antagonistlerinin periferik arterlerde kan akımını arttırdığı gösterilmiştir. Hem deney hayvanlarında hemde insanlarda yaşlılıkla birlikte ET1 vasokonstriksiyonu arttığı tespit edilmiştir (Donato ve ark., 2009, Thijssen ve ark., 2007).

2.3.1.3 Oksidatif stres

Reaktif oksijen türevleri (ROS) fizyolojik olarak damar duvarında üretilmektedir ve üretimi çeşitli mekanizmalarla kontrol edilmektedir (Assar ve ark., 2012). Normal koşullar altında vücudumuzda endojen olarak üretilen enzimatik olarak mangan/çinko/bakır süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz ve enzimatik olmayan vitamin C, Vitamin E, ürik asit gibi anti oksidan defans mekanizmalarımız

bulunmaktadır ve doku tamirinde rol almaktadırlar (Assar ve ark., 2012). Patolojik koşullarda ROS artışı, mutasyon hızını, inflamasyon ve endotel disfonksiyonunu arttırmaktadır (Malinin ve ark., 2011). Artmış ROS ve/veya azalmış antioksidan mekanizmalar oksidan strese yol açmaktadır.

Oksidan stresinin ve ROS üretiminin yaşlılıkla arttığı (Ungvarive ark., 2008, 2010b), anti oksidan kapasitenin de zıt yönde değiştiği bilinmektedir (Goraca 2004). Fakat anti oksidan kapasitenin azalmadığına dair yayınlar da literatürde yer almaktadır (Meccoci ve ark., 2000). Artan reaktif oksijen türevlerinin önemli etkilerinden birisi NO biyoyararlanımını dolayısıyla endotel bağımlı gevşemeyi azaltmasıdır (Pacher et al 2007). Oksidatif stresin artması reaktif oksijen türevleri ile NO reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna yol açar. Çalışmalar yaşlılıkla birlikte kardivasküler sistemde ve yaşlı hayvanların arterlerinde, insan mezenterik arterinde nitrosatif stresin arttığını göstermektedir (Assar ve ark., 2012, Franciave ark., 2004, van der Loo ve ark., 2000, rodriguez Manas ve ark.,2009). Nitrosatif stresle doğru orantılı olarak insan brakiyal arterinde akım aracılı gevşemenin azaldığı gösterilmiştir (Donato ve ark., 2007). Ürik asit, SOD veya TEMPOL gibi anti oksidan uygulanan insan çalışmalarında yaşlılıkla ortaya çıkan endotel bağımlı gevşemenin arttığı gösterilmiştir (4-Rodriguez Manas ve ark., 2009).

2.3.1.4 İnflamasyon

Oksidan strese ek olarak yaşlanma periyodunda düşük şiddetli kronik inflamasyon da gelişmektedir (Assar ve ark., 2012). Normal yaşlanma süreci ile yüksek TNF α , IL1 β , IL6 gibi sitokin seviyeleri ilişkilidir (Ferruci ve ark., 2005) ve bu pro-inflamatuvar mikroçevre vasküler disfonksiyona katkı koymaktadır. Oksidan stres ile inflamasyon arasında da güçlü bir ilişki bulunmaktadır. ROS, redoks sensitif transkripsiyonel faktörleri aktive etmektedir ve bu faktörler TNF α , IL1 β , IL6 gibi sitokinlerin, ICAM ve VCAM gibi adhezyon molekülleri ile iNOS ve COX-2 gibi proinflatuar enzimlerin gen ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (Yu ve Chung, 2006). Deneysel hayvan modellerinde yaş ile vasküler inflamasyon arasındaki korelasyon gösterilmiştir (Chung ve ark. 2002, Csiszar ve ark., 2003, d'Alessio 2004, Ungvari ve ark., 2004). Yaşlılığa bağlı koroner arterde gösterilen TNF α up-regülasyonu endotel hücrelerinde apoptozisin artmasına ve endotel

disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir (Csiszar ve ark., 2004). Kronik TNF α inhibisyonu ile yaşlı hayvanların direnç arterlerinde akım aracılı gevşemenin düzeldiği ICAM ve iNOS ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Arenas ve ark., 2006).

İndüklenebilir NOS'ın uyarılması ile endotelial disfonksiyon arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Ratlarda yaşlılıkla birlikte vasküler iNOS ekspresyonunun arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Cernadas ve ark., 1998, ve ark., 2002). Aynı zamanda yaşlı insanlardan alınan mezenterik arterde de iNOS mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Nevado ve ark., 2006). Selektif iNOS inhibisyonu yaşa bağlı gelişen endotel disfonksiyonunu düzelttiği gösterilmiştir (Rodriguez Manas ve ark., 2009).

İnsanlarda yaşlılık ile düşük düzeyde inflamasyon arasındaki ilişkiyi gösteren bir diğer kanıt ise inflamatuvar transkripsiyon faktörü nükleer faktör κ B (NF- κ B)'dir. Yaşlı insanların aort duvarında (Wang ve ark., 2007) ve mezotelial hücrelerde (Nevado ve ark., 2006) NF- κ B ekspresyonunun ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Yaşlı insanların vasküler endotel hücrelerinde NF- κ B düzeylerinin ve pro-inflamatuvar sitokinlerin artması ile endotel disfonksiyonu arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (Assar ve ark., 2012).

2.3.2 Cinsiyet hormonları

2.3.2.1 Testosteron

Testosteronun çok miktarda testislerde, az miktarda da adrenal bezlerde üretilir. Testosteron, üreme sisteminin gelişiminde, erkeklerin ikincil cinsel özelliklerini destekleyen önemli bir rol oynar. Testosteron, plazma zarı boyunca serbestçe yayılabilir, sitoplazmaya girebilir ve androjen reseptörüne bağlanabilir.

Erkeklerde dolaşımdaki testosteron, yetişkinliğin ilk yıllarından başlayarak yaşlanma ile birlikte giderek azalır (Bhasin ve Buckwalter, 2001). Testosteron, endotel bağımlı mekanizmalar, iyon kanalı modülasyonu ve vasküler yapısal yeniden yapılanma yoluyla vazodilatasyona yol açmaktadır (Miller ve Mulvagh, 2007).

Endotelden bağımsız testosteron mekanizmalarının, öncelikle voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarını inhibe etmesi ve/veya düz kas hücrelerinde K^+ kanallarını aktive ederek vasküler tonusu düzenlediği düşünülmektedir. Testosteron fizyolojik koşullar altında; 1-L-tipi Ca^{2+} kanalını inhibe eder ve hücre içerisine kalsiyum akışını azaltarak 2- voltaj bağımlı K^+ kanallarını ve/veya BK_{Ca} kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyona neden olarak ve 3- prostoglandin $F2\alpha$ 'ya yanıtı bloke ederek sarkoplazmik retikulumdan sitozole kalsiyum salgılanmasını inhibe ederek vazodilatasyona sebep olur (Kelly ve Jones, 2013). Testosteron, ayrıca NO salınımı yoluyla endotel fonksiyonunu düzenleyebilir (Miller ve Mulvagh, 2007).

Yaşlılıkta testosteronun azalması çeşitli mekanizmalarla vazodilatasyonda azalmaya yol açar. Testosteron eksikliği BK_{Ca} kanallarının ekspresyonunu azaltarak (Marijic ve ark., 2001) ve uzun süreli testosteronun yoksunluğu vasküler düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerindeki voltaj bağımlı K^+ kanallarının ekspresyonunu azaltarak vazodilatasyonda azalmaya neden olur (Lopes ve ark., 2012).

2.3.2.2 Östrojen

Östrojen, kardiyovasküler ve serebrovasküler sistemler için koruyucu bir faktördür (Mendelsohn, 2002). Her iki östrojen reseptörü tipi olan $ER\alpha$ ve $ER\beta$ vasküler endotelde, düz kas hücrelerinde ve adventisyada bulunabilir. Östrojen plazma membran bölgelerine bağlanabilir, böylece vasküler düz kas hücrelerinde L tipi Ca^{2+} voltaj kapılı kanalları inhibe ederek endotel hücrelerde birçok sinyal yolunu aktive edebilir (Hisamoto ve ark., 2001, Nakajima ve ark., 1995).

Endotel hücresinde östrojenler, transkripsiyonel seviyede eNOS ekspresyonu, fosforilasyon yoluyla eNOS aktivasyonunu artırarak NO biyoyararlanımını ayarlar (Chambliss ve ark., 2002, Monsalve ve ark., 2007). Östradiol, endotel hücrelerde COX1 ve prostosiklin sentaz ekspresyonunu düzenler böylece ET-1 salgılanmasını azaltarak prostosiklin salgılanmasını artırır (Sobrino ve ark. 2010, Dubey ve ark., 2001, Juan ve ark., 2004). Östrojen, NO biyoyararlanımını artırarak ve ROS seviyelerini baskılayarak vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Östrojen ayrıca, kadınlarda vasküler tonus aracıları olan prostaglandin H_2 ve tromboksan A_2 içeren siklooksijenaz türevli vazokonstriktörlerin ekspresyonunu veya fonksiyonunu inhibe etmektedir (Novella ve ark., 2012).

Östrojen seviyelerinin yaşlılıkta azalması, NO biyoyararlanımının azalmasına ve yaşlı vasküler dokulardaki vazokonstriktör prostanoidleri artmasına neden olur. Ayrıca eNOS aktivitesini azaltır (Novella ve ark., 2013, Cau ve ark., 2012). Östrojen reseptörlerinin sayısındaki değişiklikler de östrojenin yaşlanmadaki rolü ile ilişkilidir. Menopoz sonrası kadınlarda ER α sayısının azaldığı tespit edilmiştir (Novella ve ark., 2012, Bowling ve ark., 2014).

Östrojen aynı zamanda damarlarda yapısal değişikliklere de neden olmaktadır. Bazı kanıtlar; östrojen eksikliğinin, damar sertliğine ve ateroskleroza neden olabileceğini göstermektedir (Zaydun ve ark., 2006, Takahashi ve ark., 2005). Östrojen tedavisinin menopoz sonrası kadınlarda aterosklerotik lezyonların ilerlemesini geciktirebileceğini öne sürmektedir (Hodis ve ark., 2016).

2.4. Parabiyoz

Parabiyoz; iki organizmanın cerrahi olarak birleştirilmesi anlamına gelmektedir (Bert, 1864). Bu yöntem ilk olarak 1864'te Fransız fizyolog Paul Bert tarafından dolaşım sistemlerini incelemek için beyaz albino sıçanlar kullanılarak uygulandı (Bert, 1864, Learoyd ve ark., 2012). Bert, "la greffe animale" adlı doktora tezinde, iki albino sıçanın derilerini birleştirdi ve intravenöz olarak verilen sıvıların, bir hayvanın dolaşımından, birleştirilmiş olan eşinin kan dolaşımına geçtiğini buldu. Bu nedenle cerrahi olarak bağlı hayvanların anastomoz yoluyla kendiliğinden tek bir paylaşımlı bir dolaşım sistemi geliştirdiğini öne sürmüştür (Bert, 1863). Bert'in orijinal tezinden beri parabiosis ile ilgili 1700'den fazla makale yayınlanmıştır (Eggel ve Wyss-Coray, 2014). 1960-1980 yılları arasında bir yayın zirvesine ulaşmıştır. Bert'in bulduğu yöntemi 1993 yılında Bunster ve Meyer geliştirmiştir.

Başlangıçta parabiyozda kısa deri insizyonları oluşturuluyor ve hayvanın her iki yan tarafına birer dikiş atılıyordu. Günümüzde ise dikiş tüm vücut kenarı boyunca uzanmaktadır (Learoyd ve ark., 2012).

Parabiyoz yöntemi iki farklı şekilde yapılmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi insanda heterokronik parabiyoz yöntemini mümkün kılan terapötik plazma değişimidir (TPE). Bu yöntemle; sistemik dolaşımda bulunan kan kaynaklı faktörlerin değişimine olanak sağlar (Kiprova, 2013). Bir diğer parabiyoz yöntemi ise

Paul Bert'in kullandığı ve günümüzde Bunster ve Meyer tarafından geliştirilmiş olan yöntemdir. Bu yöntemde farklı yaş grubu ya da farklı özellikteki hayvanların dolaşımlarının birleştirilmesine heterokronik parabiyo, aynı yaş grubu ya da aynı özelliklere sahip hayvanlarla oluşturulan parabiyo ise izokronik parabiyo olarak adlandırılmaktadır. Bizim çalışmamızda da Bunster ve Meyer tekniğı kullanılmıştır.

Parabiyo, inflamasyon bölgesinde mikrovasküler oluşumu teşvik eder (Waskow, 2010). Aynı zamanda büyüme ve proliferasyon faktörleri gibi dolaşımda bulunan mediyatörlerin paylaşılmasına da aracılık eder (Weissman ve ark., 1984). Parabiyo yöntemi, hücre ve doku yaşlanmasına yönelik sistemik sonuçları ve yaşa bağlı rahatsızlıkların değerlendirilmesine de olanak sağlar (Conboy ve ark., 2013).

İleri yaş, çoğu kronik hastalık ve insanlarda fonksiyonel bozukluk için ana risk faktörüdür (He ve ark. 2012). Son çalışmalar, sistemik ortamın farelerde hücresel yaşlanma sürecini inhibe edebileceğı veya teşvik edebileceğine dair kanıt sağlamaktadır. Heterokronik parabiyo modelleri, yaşlı farelerin satellite hücrelerinin genç farelerin plazmasına maruz kalmasıyla birlikte bu hücrelerin proliferasyonunu ve rejeneratif kapasitesini geri kazandığını göstermiştir. Tersine, genç bir fareyi yaşlı bir sistemik ortama veya plazmaya maruz bırakmak hücresel ve sistemik fonksiyonların bozulmasına yol açabileceğı göstermiştir (Baker ve ark., 2011, Conboy ve ark., 2005, Villeda ve ark., 2011).

Parabiyo işleminde sıçanların kullanıldığı ilk deneyleri takiben, axolsotlar da dahil olmak üzere diğer hayvan türleri de (Harris, 1984) kullanılmıştır; ancak kemirgenlerin ameliyattan en iyi şekilde çıktığı ve daha yüksek memelilerin aksine yara enfeksiyonlarına karşı belirgin bir direnç gösterdiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, sonraki incelemelerin çoğu, sıçanlar veya fareler ile gerçekleştirilmiştir. Parabiyoda yetişkin organizmaların bağlanması ek olarak, embriyonik dokularda gelişim süreçlerini incelemek için amfibi ve balık da kullanılmıştır (Demy ve ark., 2013).

2.4.1 Parabiyoz yöntemi kullanılarak yapılan bazı çalışmalar

Stanford Üniversitesi'nin yapmış olduğu bir parabiyoz çalışmasında kas yaralanmasından 5 gün sonra genç farelerin dolaşımına maruz kalan yaşlı partnerlerde (HP-Y) kas rejenerasyonu önemli ölçüde artmıştır (Conboy ve ark., 2003).

Wagers ve ark.nın (Sinha ve ark., 2014) makalesinde, yaşlı heterokronik farelerden alınan satellite hücrelerinde yaşlı kontrollerden izole edilenlerle kıyaslandığında, DNA hasarının düşük olduğu ve miyogenik farklılaşma kapasitesinin de arttığı gösterilmiştir.

Genç farelerin dolaşımına maruz kalan yaşlı farelerde 4 haftanın sonunda kardiyak hipertrofi gerilemeye başlamıştır. Kalp ağırlığının tibia uzunluğuna oranı değerlendirildiğinde, genç bir dolaşıma (HP-Y) maruz kalan yaşlı farelerde kardiyak hipertrofinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

Heterokronik yaşlı farelerde hipertrofinin bir moleküler düzeyde tersine çevrilmesini değerlendirmek için, atriyal natriüretik peptidin (ANP) ve beyin natriüretik peptidinin (BNP) kardiyak transkripsiyonel ekspresyonuna bakıldığında genç bir dolaşıma maruz kalan yaşlı farelerin kalplerinde ANP ve BNP transkript düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA-2) ekspresyonu, izokronik yaşlı kontrollere kıyasla genç bir dolaşıma (HP-Y) maruz kalan yaşlı farelerin kalplerinde önemli ölçüde artmıştır (Loffredo ve ark., 2013).

Sonuç olarak; heterokronik parabiyotik çalışmalar genç hayvanların dolaşımından köken alan faktörlerin yaşlı hayvanların dolaşımına geçerek bu hayvanların tamir mekanizmalarını aktive edebileceğini göstermektedir (Loffredo ve ark., 2013, Conboy ve ark., 2005). Parabiyotik çalışmalar yaşlı hayvanlarda; iskelet kasında kas myosatellite hücrelerinin fonksiyonun ve tamir mekanizmalarını arttığını (Katsimparti ve ark., 2014), beyinde subventriküler alanda damarlanmanın ve kan akımını arttığını (Villeda ve ark., 2014), artmış olan kardiyak hipertrofinin (Conboy ve ark., 2005) geri döndürüldüğünü göstermektedir. Tam tersine genç hayvanlarda da yaşlı sistemik çevrenin, myogenezi (Loffredo ve ark., 2013) ve nörogenezi inhibe

ettiği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalar yanında vasküler tonus ve endotel bağımlı vazodilatasyon hakkında herhangi bir çalışma yoktur. Bu veriler ışığında çalışmamızda aşağıda belirttiğimiz gibi iki önemli amacımız vardır;

1- Yaşlı ve genç hayvanların dolaşımlarında yer alan faktörlerin vasküler tonusa etkisinin olup olmadığını araştırmaktır. Bunun için endotel bağımlı ve endotel bağımsız gevşeme yanıtları ile damar kasılma yanıtlarını inceleyeceğiz.

2- Parabiyoz çalışmalarında hayvanlar genellikle 4 veya 6 hafta sonra feda ediliyor. Loffredo ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada sistolik kan basıncında 7. haftadan itibaren bir değişiklik saptamışlar. Bu nedenle ikincil olarak hayvanları 3.,5.,7. ve 9. haftalarda feda ederek vasküler tonustaki değişim sürecini ortaya koymayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışmada genç (2-4 aylık), yaşlı (18-22 aylık) dişi fare (balb/c) olmak üzere toplam 133 hayvan kullanıldı. Yerel etik kurul onayı ile Yakın Doğu Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim ünitesinden temin edilen fareler 23 ± 2 °C olan ve 12 saat gün ışığı 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutuldu ve kısıtlamaksızın ticari fare yemi ile su tüketimine bırakıldılar.

3.1. Hayvanların Gruplandırılması

Kullanılan fareler genç heterokronik parabiyo, yaşlı heterokronik parabiyo, genç izokronik parabiyo, yaşlı izokronik parabiyo, genç kontrol ve yaşlı kontrol grubu olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Parabiyo gruplarında yer alan hayvanlar 3., 5., 7. ve 9. haftalarda feda edildi. Parabiyotik değişimleri daha iyi değerlendirmek için hiçbir işlem yapılmayan genç ve yaşlı fareler kontrol grubu olarak kullanıldı.

3.2. Parabiyo protokolü

Parabiyo protokolü aşama aşama aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

1. Fareler gruplandırmaya uygun olarak ikişer ikişer kafeslere yerleştirildi ve en az iki hafta boyunca uyumlu bir şekilde yaşamaları sağlandı.
2. Sevoflurane (%2-4) gaz anestezisi ile hayvanlar uyutuldu ve uygulama süresince anestezisi idamesi maske ile sağlandı.
3. Hayvanlar sırt üstü yatırıldı. Bir farenin sol tarafı ile diğer farenin sağ tarafı dirseğin yaklaşık 1 cm yukarısından dizin 1 cm aşağısına doğru iyice tıraş edildi.
4. Hayvanlar yan yana, tıraş bölgeleri yukarıya bakacak şekilde operasyon masasına Resim 1'deki gibi yerleştirildi. Keskin bir bistüri ile dirseğin 0,5 cm üzerinden başlayarak diz eklemine 0,5 cm altına kadar her bir hayvanın tıraş olmuş tarafına uzunlamasına cilt insizyonları yapıldı. Kesiği takiben, bir çift kavisli pens ile deri fasyasından ayrıldı.



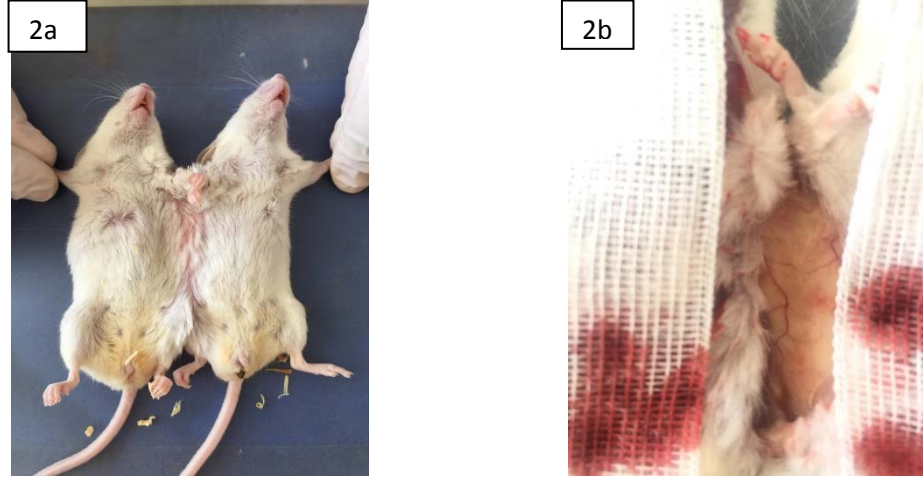
Resim 3.1. Tıraş olmuş hayvanlar yan yana yerleştirilir.

5. Hayvanlar diz ve dirsek eklemlerinden 3-0 ipek iplikle birleştirildi.
6. Eklemlerin bağlanmasını takiben 2 hayvan cilt insizyonları boyunca dirseklerinden dizlerine doğru, sürekli olarak emilebilen 5-0 ipek iplik ile birleştirildi.
7. Birleştirme işleminin sonunda dehidratasyonu önlemek için subkutan olarak genç farelere 0,3 ml, yaşlı farelere ise 0,5 ml serum fizyolojik uygulaması yapıldı.
8. Operasyondan sonra ağrı kesici olarak genç farelere 0,02 ml, yaşlı farelere ise 0,03 ml dozunda meloxicam subkutan olarak uygulandı.

3.2.1 Ameliyat sonrası iyileşme

1. Ameliyat sonrasında her bir hayvana 3 gün boyunca aynı dozlarda ağrı kesici ve serum fizyolojik uygulandı. Hayvanlar 2 hafta süresince her gün sallanma, uyuşukluk, kuyruk çiğneme gibi acı belirtileri açısından izlendi. Acı belirtisi saptanan hayvanlara ekstra ağrı kesici uygulaması yapıldı.
2. Profilatik olarak bakteriyel enfeksiyonları önlemek için 10 gün boyunca 2 mg sülfam/ ml + 0.4 mg trim/ ml Sulfamethoxazole/Trimethoprim dozlara uygun şekilde bactrim ile oral süspansiyon olarak sularına ilave edildi.
3. Parabiyotik sürece uyumda gıdaya ulaşma zorluluğunu en aza indirmek için antibiyotik süspansiyonu ile nemlendirilmiş gıda peletleri 10 gün boyunca da kafes tabanına yerleştirildi. 1-2 hafta içerisinde parabiyotik hayvanlar normal olarak hareket etmeye başladılar.

4. Kan kimerizmi ameliyattan 10-14 gün sonra oluşur (Resim 2).



Resim 3.2. Farelerde parabiyozyol işleminden sonraki görünüm (2a) ve oluşan ortak damarlanma (2b).

3.3. Deneysel Prosedür

3.3.1 Hayvanların feda edilmesi

Ketamine (150 mg/ kg) ve xylasizine (15-20 mg/kg) antestezisi altında hayvanların kanları alınarak feda edildi. Trakea, kalp ve akciğerlerle birlikte aortun diyaframa kadar olan kısmı izole edildi. Torasik aorta mikroskop altında sistemden diseke edilerek soğuk krebs içerisinde organ banyosuna asılana kadar saklandı.

3.4. Organ Banyosu Çalışması

Farelerin torasik aortaları soğuk krebs solüsyonu yaklaşık 2 mm olacak şekilde kesildikten sonra % 95 O₂, % 5 CO₂ içeren gaz karışımı ile gazlandırılan, 37°C'de pH'sı 7,4 olan 20 ml krebs solüsyonu içeren organ banyosuna asıldı (May-ITBS08). İlk 1 saat boyunca damarlar 1g'lık gerimde dinlendirildi ve her yarım saatte bir banyonun krebs solüsyonu değiştirildi. 1 saatlik dinlenme periyodunun ardından damarların endotel sağlamlığını test etmek için damarlar 10⁻⁶ M fenilefrin (PE) ile kasıldıktan 10⁻⁶ M ACh gevşeme yanıtlarına bakıldı. Gevşeme yanıtı %60 ve daha fazla olan damarlar ile kasılma ve gevşeme prosedürlerine geçildi. Tüm kasılma ve gevşeme yanıtları kaydedildikten sonra bir sonraki prosedüre geçmeden önce damarlar normal krebs ile 2 kez yıkandı.

3.4.1 Kasılma Protokolü

Vasküler düz kasın potasyum depolarizasyonu ile oluşan kasılma yanıtı banyoya artan dozlarda (20mM, 40mM, 60mM ve 80mM) ilave edilen potasyum klorürlü (KCl) krebs ile test edildi. Damar düz kasının α -adrenarjik reseptör agonisti bağımlı kasılma yanıtlarını test etmek için damarların kümülatif 10^{-9} - 3×10^{-5} M dozlarında PE'e (Sigma P6126) verdikleri kasılma yanıtları kaydedildi.

3.4.2 Gevşeme Protokolü

Damarların endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını test etmek için öncelikle damarlar submaksimal dozda PE ile kasıldıktan sonra kümülatif olarak 10^{-9} - 3×10^{-5} M dozlarındaki ACh'e (Sigma A6625) verdikleri gevşeme yanıtları kaydedildi. Endotel bağımlı gevşemeden sorumlu vazodilatör ajanların katkısını araştırmak için inhibitör maddeler kullanıldı. Endotel bağımlı gevşeme yanıtına prostoglandinlerin katkısını test etmek için siklooksijenaz inhibitörü indometazin (Sigma I7378) kullanıldı. $5 \mu\text{M}$ indometazin içeren krebs damarlar 30 dakika inkübe edildikten sonra indometazimli krebs varlığında ACh gevşeme yanıtları tekrardan kaydedildi. Nitrik oksidin katkısını test etmek için damarlar 30 dakika boyunca 10^{-4} M NOS inhibitörü N(omega)-Nitro-L-arginin (L-NNA-sigma-N5501) içeren krebs ile inkübe edildikten sonra Nitroarjininli krebs varlığında ACh gevşeme yanıtı tekrardan kaydedildi. Endotel bağımsız düz kasın gevşeme yanıtlarını test etmek için Sodyum nitro prusside (SNP, Merck 1065410025) kullanıldı. Normal krebs ile damarlar 30 dakika dinlendirildikten sonra damarlar submaksimal dozda PE ile kasıldıktan sonra 10^{-9} - 3×10^{-4} mM kümülatif dozlarda SNP gevşeme yanıtları kaydedildi.

3.4. Verilerin değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. Doz yanıt eğrileri üç yönlü tekrarlı varyans analizi (ANOVA), maksimum kasılma ve gevşeme yanıtları üç yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Her ANOVA için Post Hoc test olarak LSD testi kullanılmıştır. İki bağımsız grubun karşılaştırılmasında Student's t testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik derecesi $p \leq 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

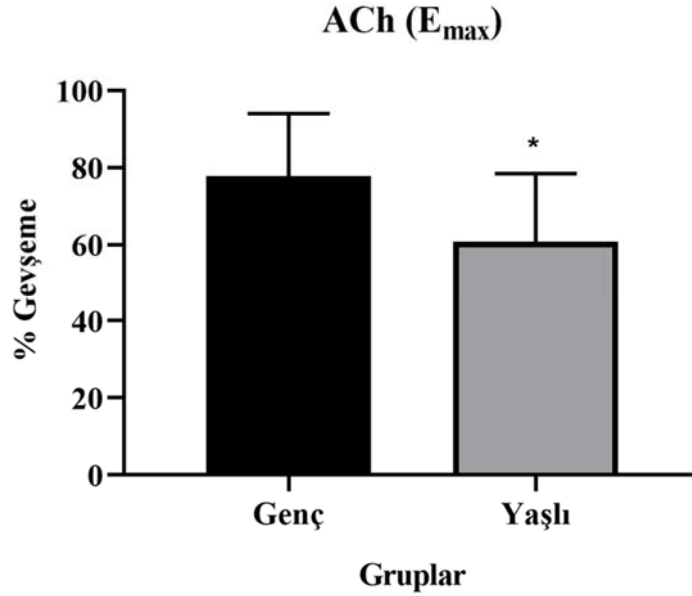
Bu çalışmada ağırlığı 18-26 g olan 2-4 aylık genç ve ağırlığı 26-32 g olan 18-22 aylık yaşlı, balb/c cinsi toplam 133 adet dişi fare kullanıldı.

4.1.Gevşeme Yanıtları

4.1.1 Endotel bağımlı gevşeme yanıtları

4.1.1.1 Yaşlılıkta endotel disfonksiyonu

Torasik aort halkalarında endotel disfonksiyonunu göstermek için genç ve yaşlı gruplarda artan dozlarda ACh gevşeme yanıtlarına baktık. Kontrol ve yaşlı grupların maksimum ACh gevşeme yanıtları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

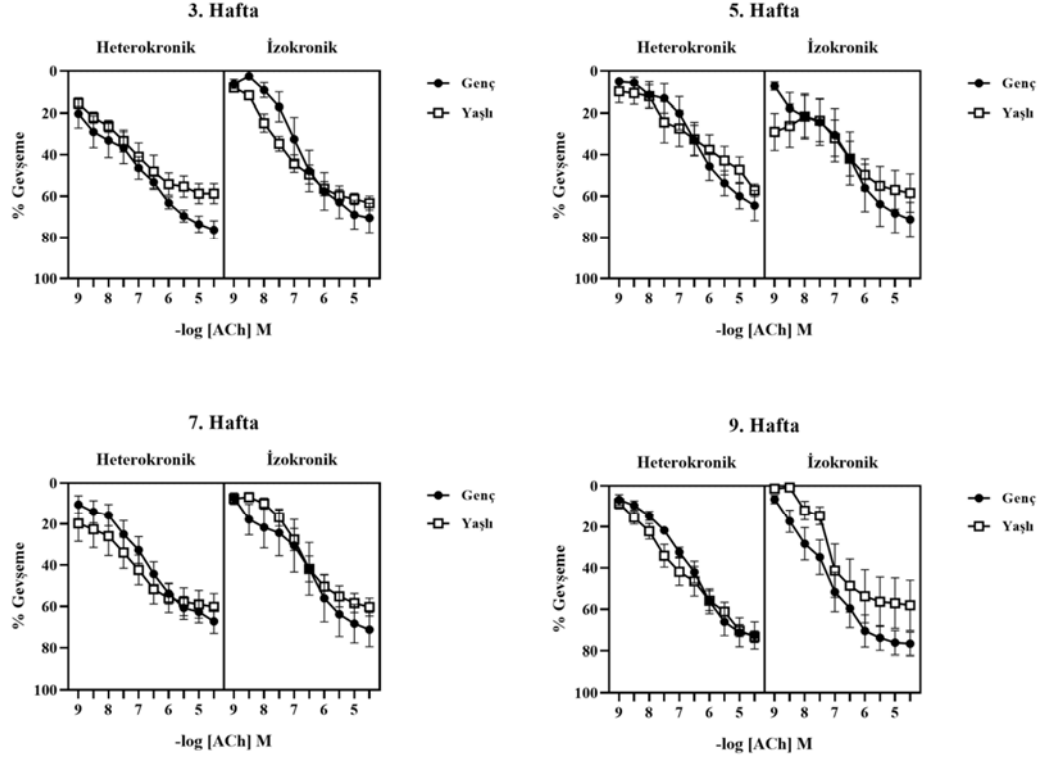


Şekil 4.1. Genç ve Yaşlı grupların ACh maksimal gevşeme yanıtları (A) Genç gruptan fark * $p < 0,05$.

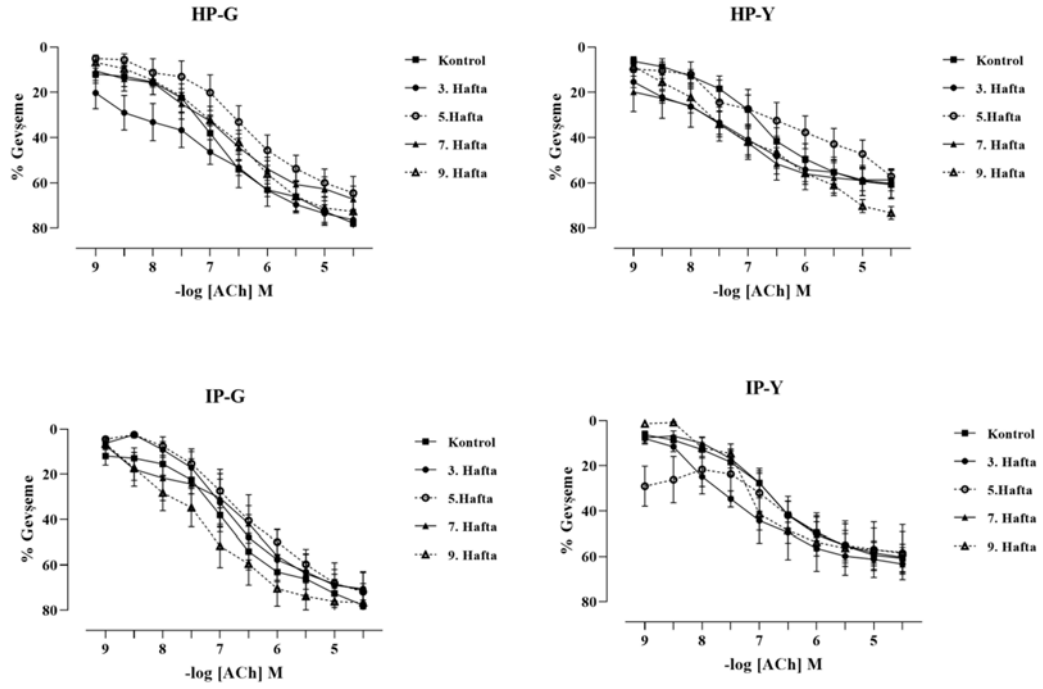
Yaşlı grubun ACh’e verdiği maksimal gevşeme yanıtları anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0,05$).

4.1.1.2 Parabiyoz gruplarında endotel bağımlı gevşeme yanıtları

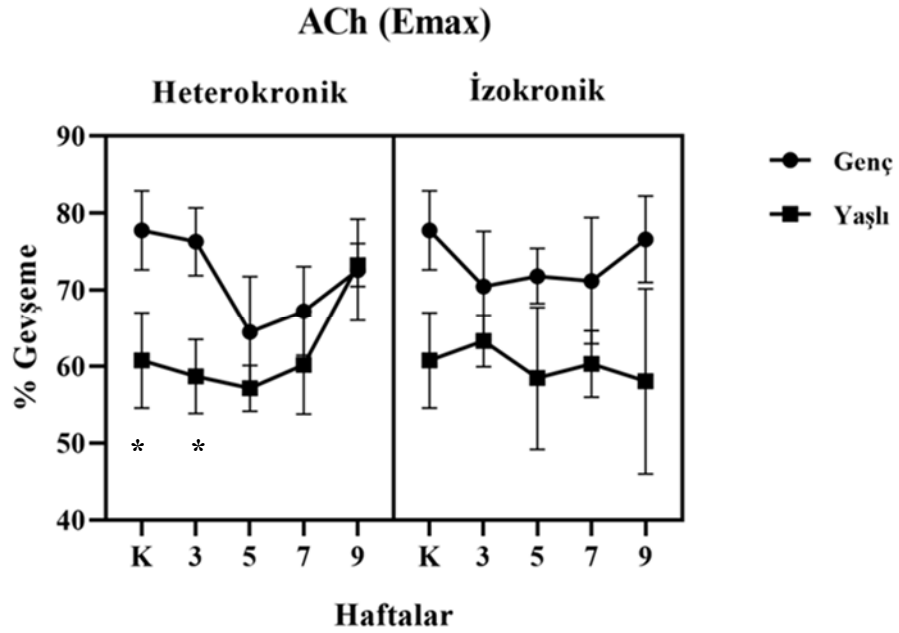
Parabioz gruplarına ait ACh gevşeme yanıtları haftalara göre sonuçlar Şekil 4.2’de, gruplara göre sonuçlar Şekil 4.3’te ve maksimal gevşeme yanıtları Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Torasik aort halkalarının haftalara göre ACh (10^{-9} - 3×10^{-5}) doz yanıt eğrileri.



Şekil 4.3. Torasik aorta halkalarının gruplara göre ACh (10⁻⁹-3x10⁻⁵) doz yanıt eğrileri.



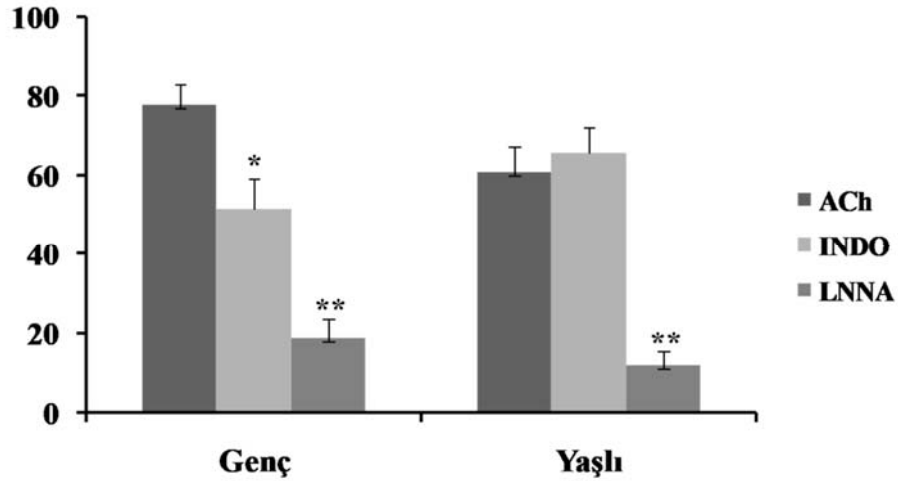
Şekil 4.4. Torasik aorta halkalarının ACh 3x10⁻⁵ dozunda haftalara göre maksimum gevşeme yanıtları, Genç grubun ACh yanıtlarından fark * p<0,05.

Torasik aorta halkalarında ACh doz yanıt eğrilerinde yaşa ve haftalara göre fark yoktur. Maksimum gevşeme yanıtlarına bakıldığında yaşlı gruplarının gevşeme yanıtları istatistiksel olarak daha düşüktü ($p<0,01$). Grupların ikili karşılaştırmalarına baktığımızda 3. haftada HP-Y grubun gevşeme yanıtı anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0,05$). Bu anlamlılık ilerleyen haftalarda ortadan kalktı.

4.1.1.3 Endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının mekanizmalarının incelenmesi

4.1.1.3.1 Kontrol genç ve yaşlı grupların endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının mekanizmalarının incelenmesi

Kontrol ve yaşlı gruplara ait torasik aorta halkalarının İndometazin ve L-NNA inkübasyonu sonrasında elde edilen maksimum gevşeme yanıtları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

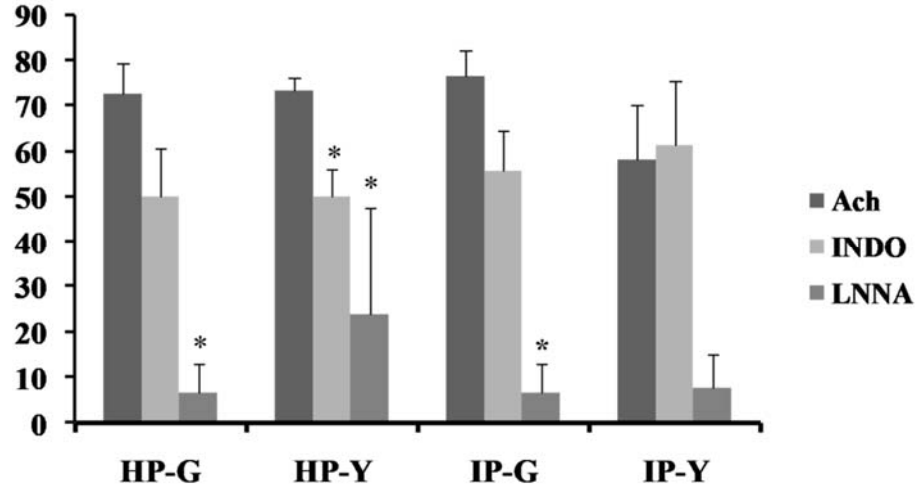


Şekil 4.5. Kontrol ve Yaşlı grupların torasik aorta halkalarının İndometazin ve L-NNA inkübasyonu sonrasında elde edilen maksimum gevşeme yanıtları ACh yanıtlarından fark * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Genç grupta ACh yanıtı hem indometazin ($p<0,05$) hem de L-NNA ($p<0,01$) ile inhibe edilirken, Yaşlı grupta sadece L-NNA ile inhibe edilmiştir ($p<0,01$).

4.1.1.3.2 9. haftada heterokronik parabiyo grupların endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının mekanizmalarının incelenmesi

9. haftada HP-Y gruplarına ait torasik aorta halkalarının İndometazin ve L-NNA inkübasyonu sonrasında elde edilen maksimum gevşeme yanıtları Şekil 4.6'te gösterilmiştir.



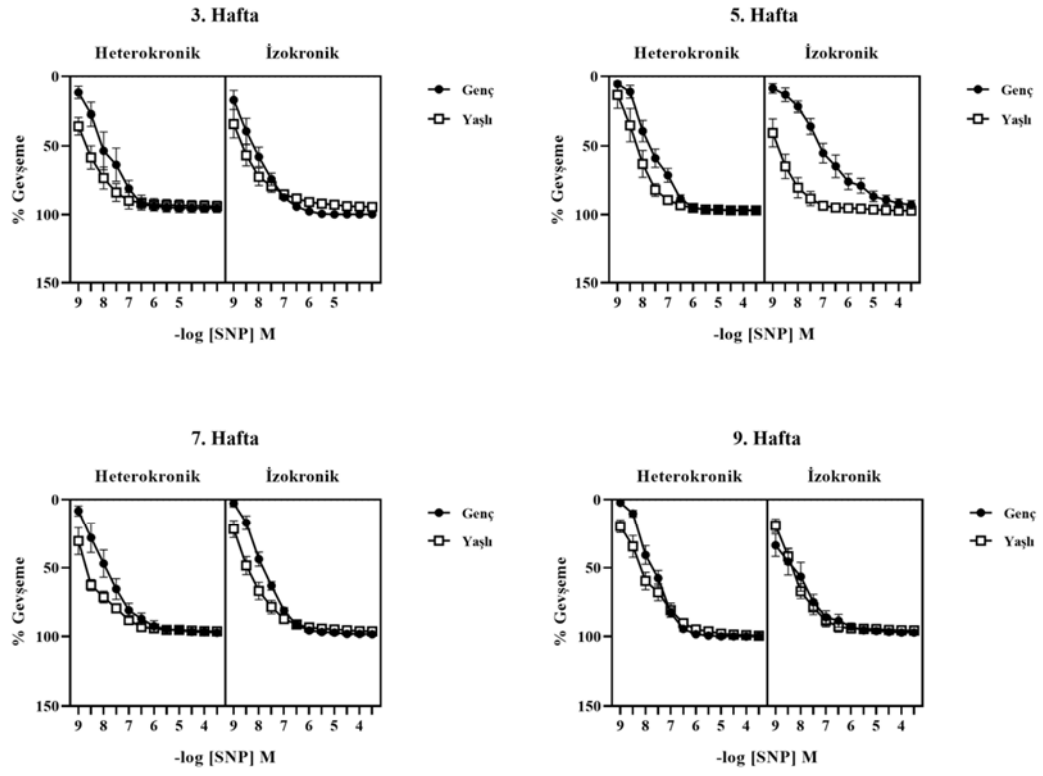
Şekil 4.6. Torasik aorta halkalarının İndometazin ve L-NNA inkübasyonu sonrasında elde edilen maksimum gevşeme yanıtları ACh yanıtlarından fark * $p < 0,05$.

9. haftada sadece HP-Y grubunda indometazinin ACh gevşeme yanıtlarına inhibe edici etkisi tespit edildi ($p < 0,05$). HP-G, HP-Y ve IP-G grubunda L-NNA ACh gevşeme yanıtlarını istatistiksel olarak baskıladı ($p < 0,01$).

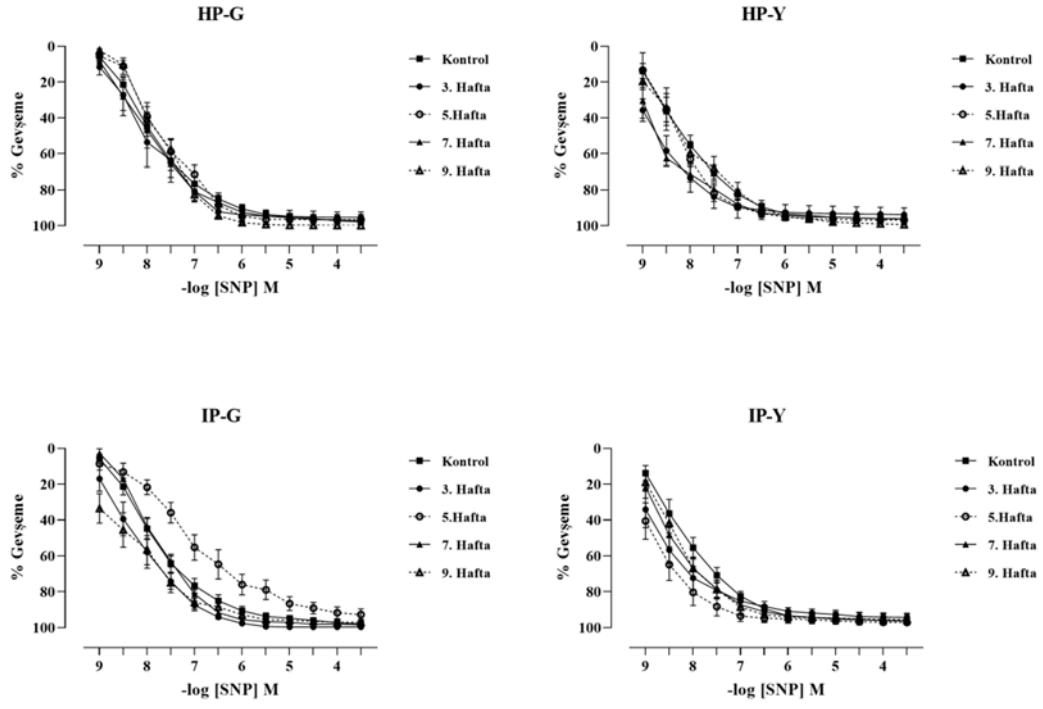
4.1.2 Endotel bağımsız gevşeme yanıtları

4.1.2.1 Sodyum nitroprusside gevşeme yanıtları

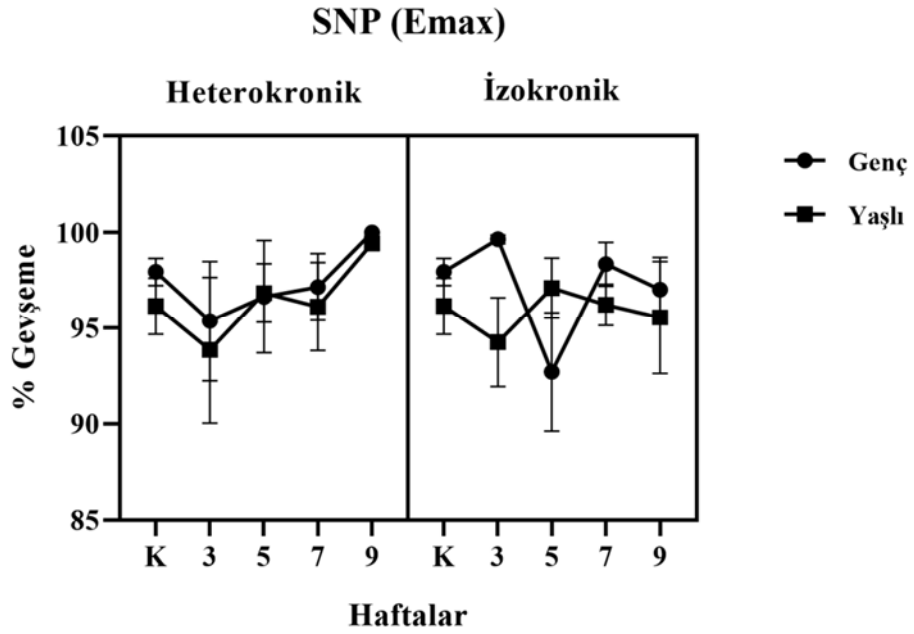
Torasik aorta halkalarında SNP'e verilen gevşeme yanıtları kaydedilmiştir. Haftalara göre sonuçlar Şekil 4.7'da, gruplara göre sonuçlar Şekil 4.8'de, maksimal gevşeme yanıtları Şekil 4.9'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Torasik aort halkalarının haftalara göre SNP (10^{-9} - 3×10^{-4}) doz yanıt eğrileri.



Şekil 4.8. Torasik aorta halkalarının gruplara göre SNP (10^{-9} - 3×10^{-4}) doz yanıt eğrileri.



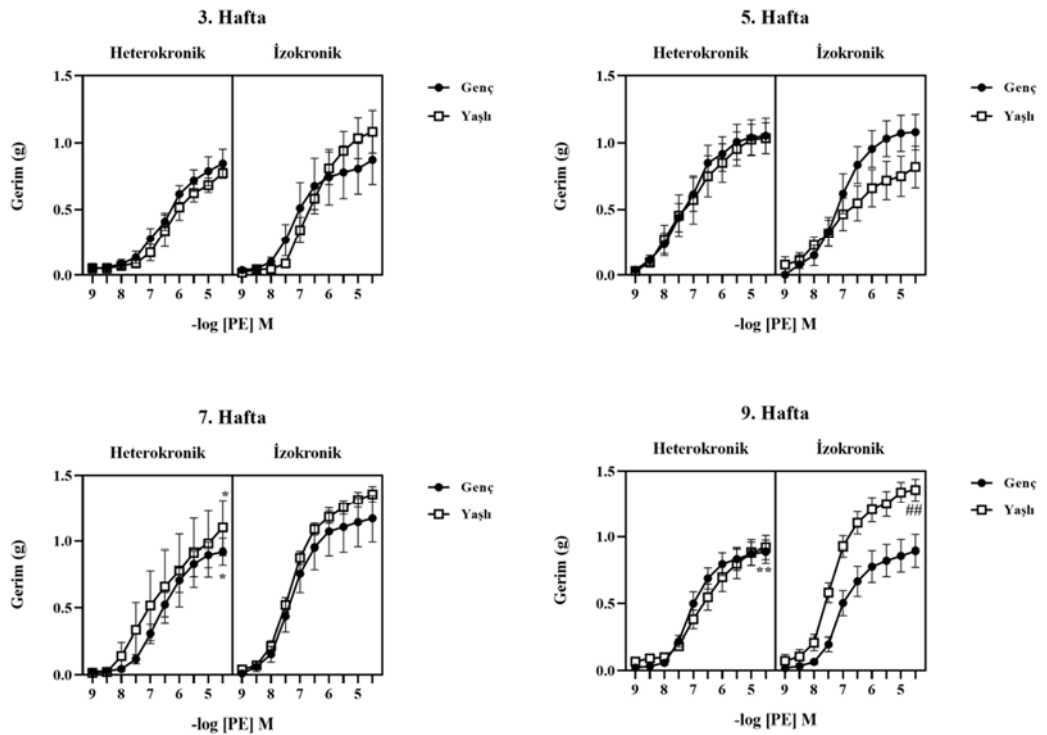
Şekil 4.9. Torasik aorta halkalarının SNP 3×10^{-4} dozunda haftalara göre maksimum gevşeme yanıtları.

SNP doz yanıt eğrilerinde torasik aorta halkalarının yaşa, haftalara göre ve maksimum gevşeme yanıtlarında herhangi bir fark yoktur.

4.2. Kasılma Yanıtları

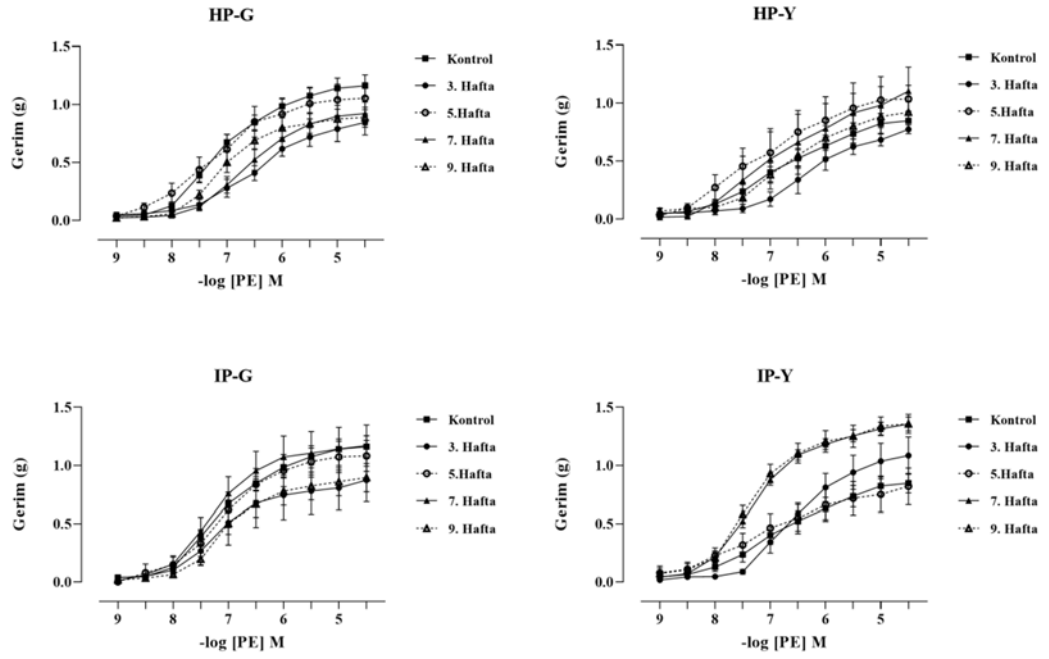
4.2.1 Fenilefrin kasılma yanıtları

Torasik aorta halkalarında PE'ye verilen kasılma yanıtları kaydedilmiştir. Haftalara göre sonuçlar Şekil 4.10'da, gruplara göre sonuçlar Şekil 4.11'de, maksimum kasılma yanıtları Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



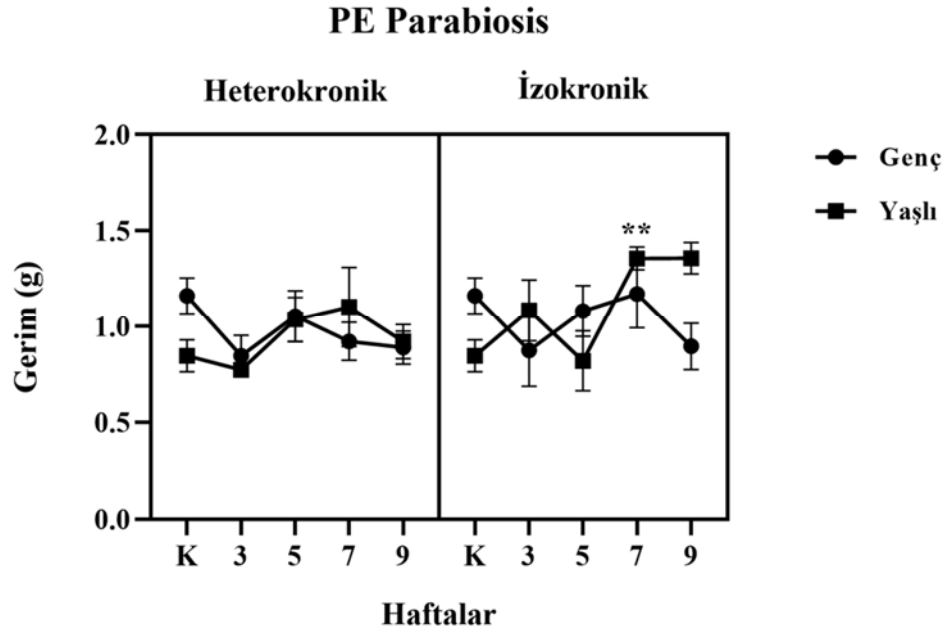
Şekil 4.10. Torasik aorta halkaların haftalara göre PE (10⁻⁹-3x10⁻⁵) doz yanıt eğrileri İzokronik gruptan fark * p<0,05, ** p<0,01, İzokronik genç gruptan fark ## p<0,01.

Torasik aorta halkalarının PE doz yanıt eğrilerinde parabiyozy uygulamasının etkilerine bakıldığında heterokronik parabiyozy grubu izokronik parabiyozy gruplarına göre daha düşük PE kasılma yanıtına sahipti (p<0,01). 7. ve 9. haftada heterokronik parabiyozy gruplarında PE kasılma yanıtı anlamlı olarak daha düşüktü (p<0,05). 9. Haftada PE kasılma yanıtlarına yaşın anlamlı bir etkisi vardı (p<0,01). İzokronik yaşlı grupta PE kasılma yanıtı anlamlı olarak daha yüksekti.



Şekil 4.11. Torasik aorta halkalarının gruplara göre PE (10^{-9} - 3×10^{-5}) doz yanıt eğrileri.

Torasik aorta halkalarının doz yanıt eğrilerinde HP-Y ve IP-G grubunda herhangi bir fark yoktur. IP-Y’de haftalara göre PE kasılma yanıtlarında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,01$).

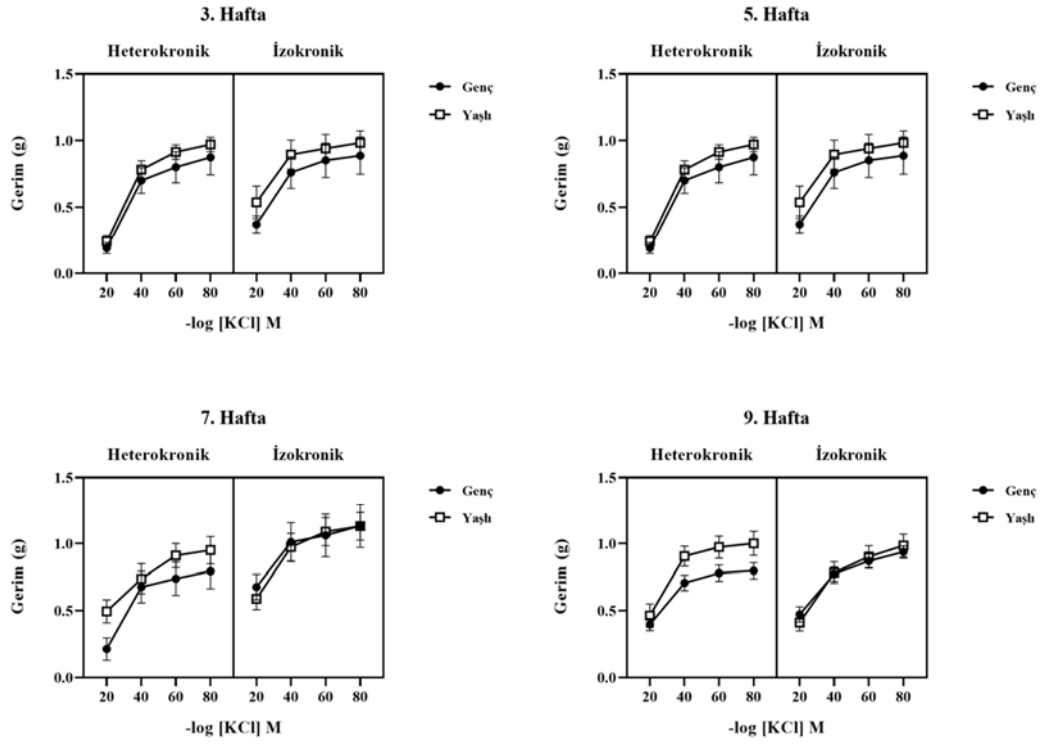


Şekil 4.12. Torasik aorta halkalarının PE 3×10^{-5} dozunda haftalara göre maksimum kasılma yanıtları ** $p < 0,01$ Genç kontrolden fark.

Torasik aorta halkalarının PE maksimum kasılma yanıtları 7. haftada genç kontrolden anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0,01$).

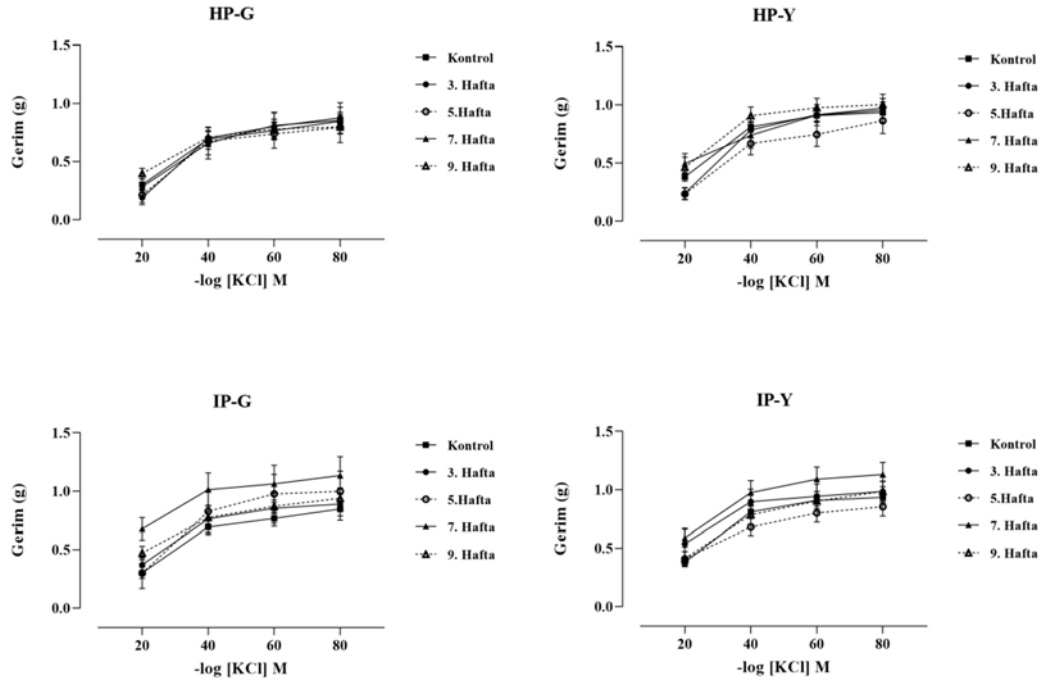
4.2.2 Potasyum klorür kasılma yanıtları

Torasik aorta halkalarının KCl'e verdiği kasılma yanıtları kaydedilmiştir. Haftalara göre sonuçlar Şekil 4.13'te, gruplara göre sonuçlar Şekil 4.14'de maksimum kasılma yanıtları Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



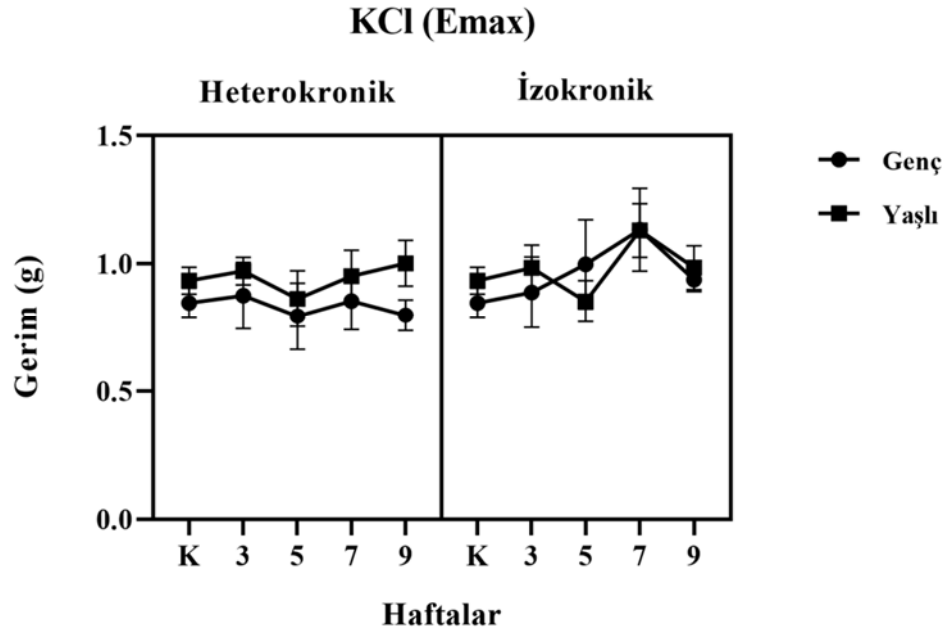
Şekil 4.13. Torasik aorta halkaların haftalara göre KCl (20mM, 40mM, 60mM, 80mM) doz yanıt eğrileri.

Torasik aorta halkalarının haftalara göre KCl kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur.



Şekil 4.14. Torasik aorta halkaların gruplara göre KCl (20mM, 40mM, 60mM, 80mM) doz yanıt eğrileri.

Torasik aorta halkalarının KCl kasılma yanıtları gruplara göre değerlendirildiğinde her bir grubun 9 haftalık süreçte KCl kasılma yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.



Şekil 4.15. Torasik aorta halkalarının KCl 80 mM dozunda maksimum kasılma yanıtları.

Torasik aorta halkalarının KCl maksimum kasılma yanıtlarında haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışma; literatürde yaşlılıkta görülen endotel disfonksiyonuna ve mekanizmasına parabiyo yönteminin etkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Çalışmamızın önemli bulguları; Heterokronik parabiyo yönteminin yaşlı hayvanlarda endotel disfonksiyonu üzerinde düzeltici bir etkisinin olduğunu, Fenilefrin kasılma yanıtlarını azalttığını, KCl ve SNP yanıtlarına etkisinin olmadığını göstermektedir. Heterokronik parabiyo yönteminin endotel disfonksiyonu üzerine düzeltici etkileri 9 hafta sonrasında görülmeye başlanmıştır.

5.1. Gevşeme Yanıtları

5.1.1 Endotel bağımlı gevşeme yanıtları

Torakik aortada endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını test etmek için artan dozlarda asetil kolin uygulaması yapıldı. Parabiyo uygulanmayan yaşlı ve genç gruplarda asetil koline verilen gevşeme yanıtlarına baktığımızda yaşlı grupta anlamlı olarak daha düşüktü. Bu veri hem kullandığımız yaşlı hayvanlarda endotel disfonksiyonu olduğunu göstermektedir hem de literatürdeki çalışmalarla da desteklenmektedir. Yapılan bir çalışmada 14-25 aylık yaşlı farelerin ACh'e verdikleri gevşeme yanıtları, 3 aylık genç ve 8 aylık yetişkin farelere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (Matz ve ark., 2000). Yine yapılan başka bir çalışmada 24-25 aylık yaşlı ratlar ile 3-4 aylık genç ratların ACh'e verdikleri gevşeme yanıtları karşılaştırıldığı zaman yaşlı ratların ACh'e verdikleri gevşeme yanıtlarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Tian ve ark., 2010), literatürde verilerimizi destekleyen pek çok çalışma bulunmaktadır. Yaşlılarda oluşan düşük ACh yanıtlarının sebepleri endotel disfonksiyonunun gelişmesidir. Endotel tarafından üretilen vazodilatör ve vazokonstriktör faktörler arasındaki denge, yaşın artması ile birlikte bozulmaktadır. Bu dengesizlik NO biyoyararlanımındaki azalma ve COX türevli vazokonstriktör faktörlerin üretimindeki artışla kendini göstermektedir. Yaşlanma sürecinde oluşan aşırı miktardaki süperoksit anyon seviyeleri, L-arginin azalması, endojen NOS inhibitörü artışı, eNOS kofaktörlerinde azalması, eNOS ekspresyonu ve/veya

aktivasyonundaki azalma, NO biyoyararlanımını azaltan mekanizmalardır (Herrera ve ark., 2010).

Parabiyoz; iki organizmanın cerrahi olarak birleştirilmesi anlamına gelmektedir (Bert, 1864). Farklı özellikteki hayvanların cerrahi olarak birleştirilmesine heterokronik parabiyoz, aynı özellikteki hayvanların birleştirilmesine de izokronik parabiyoz denilmektedir. Çalışmamızda yaşlı dişi ve genç dişi fareleri kullandık. Heterokronik parabiyoz gruplarında yaşlı ve genç fareler cerrahi olarak birleştirildi. Heterokronik parabiyoz yöntemi, genç ve yaşlı hayvanların dolaşımında yer alan çeşitli faktörlerin yaşlı hayvanların dolaşımından genç hayvanların dolaşımına veya tam tersi olarak genç hayvanların dolaşımından yaşlı hayvanların dolaşımına geçişine olanak sağlamaktadır. Çalışmamızın en önemli bulgularından bir tanesi ACh yanıtının 9 haftalık heterokronik parabiyoz sürecinde, 3. haftada maksimum endotel bağımlı gevşeme yanıtı HP-Y grubunda anlamlı olarak daha düşükken 9. haftada endotel bağımlı gevşeme yanıtının arttığı ve HP-G ile HP-Y grupları arasında endotel bağımlı gevşeme yanıtlarına ait istatistiksel farklılığın ortadan kalktığını tespit etmemizdir. Bu verimiz; genç hayvanların dolaşımından yaşlı hayvanların dolaşımına geçen bir faktörün endotel disfonksiyonunu düzeltebileceği anlamına gelmektedir. Heterokronik parabiyoz çalışmalarını incelediğimizde büyüme farklılaşma faktör 11 (Growth Differentiation Factor 11, GDF 11) oldukça üzerinde durulan bir plazma faktörüdür. Yaşlanmayla birlikte plazma GDF 11 düzeylerinin azaldığı ve parabiyoz yöntemi uygulanan yaşlı hayvanlarda plazma GDF 11 seviyeleri arttığı gösterilmiştir (Loffredo ve ark., 2013). GDF 11, TGF β ailesindendir ve TGF- β /Smad2/3, AMPK/eNOS yollarını aktive ederken JNK ve NF- κ B yollarını da inhibe etmektedir (Mei ve ark., 2016). Çalışmamızda 9. Haftada HP-Y farelerin ACh yanıtlarındaki artış, endotel disfonksiyonu üzerindeki düzeltici etkisi, GDF 11'in eNOS aktivitesini arttırması aracılığıyla gerçekleşmiş olabilir.

Yaşlanma sürecinde büyük arterlerde ve küçük arterlerde NO biyoyararlanımında ve endotel bağımlı gevşemede bozulmanın olduğu oldukça iyi bilinmektedir (Virdis ve ark., 2010, Taddei ve ark., 1997, Egashira ve ark., 1993) ve ana mekanizma NO yolağında meydana gelen defektir. Yaşlılıkta, NO yolağına ek

olarak COX yolağı bağımlı salgılanan vazokonstriktörler de önem kazanmaktadır (Virdis ve ark., 2010). Yaşlılık periyodunda, COX yolağından kaynaklanan vazokonstriktörler endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını maskeleymektedir. Bu da COX yolağından kaynaklanan prostonoidlerin, hipertansiyon gibi patolojik koşullarda veya yaşlılıkta endotel disfonksiyonunun gelişmesinde önemli paya sahip olduğunu göstermektedir. İndometazin gençlerde ACh gevşeme yanıtlarını baskımlarken yaşlılarda ise pozitif yönde arttırıcı etkisi vardır (Virdis ve ark., 2010, Taddei ve ark., 1997). Bizim hiçbir uygulama yapmadığımız genç ve yaşlı gruplarda da benzer sonuçlar gözlemlendi. Gençlerde hem İndometazin hem de L-NNA asetil kolin yanıtlarını baskımlarken yaşlılarda sadece L-NNA baskıladı.

Heterokronik yaşlı grupta 9. haftada gözlenen, endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının düzelmesinde katkısı olan mekanizmaları ortaya koymak için COX yolağını inhibe eden İndometazini ve NOS enzimini inhibe eden de L-NNA'yı kullandık. HP-Y grubunda endotel bağımlı gevşeme yanıtı hem İndometazin ile hem de L-NNA ile anlamlı olarak baskımlandı. Bu yanıt hiçbir uygulama yapmadığımız genç grupta elde ettiğimiz yanıtlarla benzerlik göstermektedir. Bu verimiz, HP-Y grubunda endotel bağımlı gevşeme yanıtındaki 9. haftadaki düzelmede COX yolağından kaynaklanan vazodilatör mediyatörlerin ve NO yolağının katkısının olduğunu ve özellikle NO yolağının katkısının daha ön planda olduğunu göstermektedir.

5.1.2 Endotel bağımsız gevşeme yanıtları

Çalışmamızda endotelden bağımsız gevşemeyi test etmek için NO donörü SNP'yi kullandık. SNP gevşeme yanıtlarında torasik aorta halkalarında yaşa ve haftalara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Bu sonuçlar; yaşlı gruplarda azalan ACh yanıtının vasküler düz kas hücrelerinin duyarlılığındaki azalmadan değil NO yapımı veya biyoyararlanımındaki azalma ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Literatürde heterokronik parabiyoza ait SNP yanıtları yoktu fakat uygulama yapılmayan genç ve yaşlı hayvanlara ait SNP sonuçları literatürdeki sonuçlarla desteklenmektedir (Novella ve ark., 2013, DeSouza ve ark., 2000).

5.2. Kasılma Yanıtları

5.2.1 Fenilefrin kasılma yanıtı

Fenilefrin kasılma yanıtları $\alpha 1$ -adrenoreseptörlerin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir ve sistemik kan basıncının kontrolünde ve yaşlılığa bağlı vazospazmlarda önemli rol oynamaktadır (Dinenno ve ark., 2001). Çalışmamızda izokronik yaşlı grupların PE kasılma yanıtları anlamlı olarak yüksekti. Literatürde parabiyoz yöntemi ile kaydedilmiş PE kasılma yanıtları bulunmamaktadır. Fakat yaşlı dişi farelerde PE yanıtının yüksek olduğu çalışmalar mevcuttur (Novella ve ark., 2013, Muller-Delp ve ark., 2002, Proctor ve Parker, 2006). Çalışmamızın sonuçlarına göre heterokronik parabiyoz yöntemi 7. haftadan itibaren PE kasılma yanıtlarında azaltıcı etkiye sahiptir.

5.2.2 Potasyum klorür kasılma yanıtı

Çalışmamızda etkisini incelediğimiz bir diğer kasıcı ajan KCl idi. KCl, reseptörden bağımsız kasılma mekanizmasını ve K^+ denge potansiyelini değiştirerek düz kas aktivasyonu test etmek için kullanılmaktadır (Bolton, 1979). KCl, voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları aracılığıyla vasküler düz kas hücresinin membranında depolarizasyona yol açarak kasılmaya neden olmaktadır (Ratz ve ark., 2005). Yaşlanmanın KCl yanıtlarına etkisi ile ilgili literatürde azaldığını söyleyen (Delp ve ark., 1985) yayınların yanı sıra bizim sonuçlarımız gibi değişmediğini söyleyen yayınlar da bulunmaktadır (Muller-Delp ve ark., 2002). Torasik aorta halkalarında yaşa ve haftalara göre KCl kasılma yanıtlarında istatistiksel bir farklılık tespit edilmedi. Verilerimiz heterokronik parabiyoz yönteminin KCl kasılma yanıtına etkisi olmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak parabiyoz yöntemi ile elde ettiğimiz kasılma ve gevşeme yanıtları literatürde ilk defa gösterilmiştir. Projemizi planlarken parabiyoz yönteminin damar yanıtlarına etkisi var mı? Varsa ne zaman görülmeye başlıyor? Bu iki soruya yanıt aramayı amaçlamıştık. 9 haftalık parabiyoz işleminin sonucunda endotel bağımlı gevşeme cevaplarında düzelme ve kasılma yanıtlarında azalma tespit ettik. Bu literatüre katacağımız veriler endotel disfonksiyonu ve buna bağlı gelişen hastalıkların tedavisinde yeni bir bakış açısı kazandıracağını ve bu damar yanıtlarına

ait moleküler mekanizmaların yeni çalışmalarla aydınlatılmasının önemli olacağını düşünüyoruz.

SONUÇLAR

- 1- Parabiyoz yöntemi ile elde ettiğimiz kasılma ve gevşeme yanıtları literatürde ilk defa gösterilmiştir.
- 2- 9 haftalık parabiyoz işleminin sonucunda endotel bağımlı gevşeme cevaplarında düzelme tespit ettik.
- 3- Endotel yanıtlarındaki düzelmeye NO yolağının katkısı daha baskın olmakla birlikte NO ve COX yolağının katkıları vardır.
- 4- PE kasılma yanıtı heterokronik parabiyoz grubunda anlamlı olarak daha düşüktü.
- 5- Endotel bağımsız gevşeme yanıtında ve vasküler düz kasın potasyum depolarizasyonu ile oluşan kasılma yanıtında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.
- 6- Sonuç olarak; literatüre katacağımız bu veriler endotel disfonksiyonu ve buna bağlı gelişen hastalıkların tedavisinde yeni bir bakış açısı kazandıracağını ve bu damar yanıtlarına ait moleküler mekanizmaların yeni çalışmalarla aydınlatılmasının önemli olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

Al-Shaer MH, Choueiri NE, Correia ML, Sinkey CA, Barenz TA, Haynes WG. Effects of aging and atherosclerosis on endothelial and vascular smooth muscle function in humans. *Int. J. Cardiol.* 2006;109:201–206.

Arenas IA, Xu Y, Davidge ST. Age-associated impairment in vasorelaxation to fluid shear stress in the female vasculature is improved by TNF-alpha antagonism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006;290:H1259–H1263.

Assar ME, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Frontiers in physiology.* 2012;3: doi:10.3389.

Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* 1996;78:8-750.

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur N, Childs B, van de Sluis B, Kirkland J, van Deursen J. Clearance of p16ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011;479:232–236.

Bell D, McDermott BJ. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol Rev.* 1996;48:253–288.

Benigni A, Corna D, Zoja C, Sonzogni A, Latini R, Salio M, Conti S, Rottoli D, Longaretti L, Cassis P, Morigi M, Coffman TM, Remuzzi G. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J.Clin. Invest.* 2009;119:524–530.

Bern RM. Kalp, Kan Damarları ve Kana Genel Bakış, in *Fizyoloji*. A. Aktaş, Editor. Mosby: Ankara. 2008;:365-373.

Bert P. De la greffe animale. Thèse pour le doctorat en médecine. 1863 Aug 8.

Bert P. Expériences et considérations sur la greffe animale. *Journal de l'Anatomie et de la Physiologie*. 1864;1:69-87.

Bhasin S, Buckwalter JG. Testosterone supplementation in older men: a rational idea whose time has not yet come. *J Androl*. 2001;22:718-731.

Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*. 1979;59:606–718.

Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by a protein kinase A dependent mechanism. *Am J Physiology-Heart Circulatory Physiology*. 2002;283:1819-1828.

Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms role of protein kinase A. *J Biol Chem*. 2002;277:3388-3396.

Bowling MR, Xing D, Kapadia A. Estrogen effect on vascular inflammation are age dependent: role of estrogen receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014;34:1477–1485.

Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton. Autacoid Pharmacol*. 2005;25:155–162.

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. 1996;78:23-415.

Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*. 1998;44:1809–1819.

Cau SBA, Carneiro FS, Tostes RC. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Frontiers in Physiology*. 2012;3:218.

Cernadas MR, Sanchez De Miguel L, Garcia-Duran M, Gonzalez Fernandez F, Millas I, Monton M, Rodrigo J, Rico L, Fernandez P, De Frutos T, Rodriguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, Lopez F. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ.Res.* 1998;83:279–286.

Chambliss KL, Shaul PW, Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrine Reviews.* 2002;23:665–686.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999;443:285-289.

Chung HY, Kim, HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular in flammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorierestriction. *Microsc. Res. Tech.* 2002;59:264–272.

Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-Dependent Hyperpolarization: Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. *Circulation.* 1995;92:49-3337.

Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science.* 2003;302:1575-1577.

Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature.* 2005;433:4–764.

Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA, Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging Cell.* 2013;12:525–30.

Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1990;86: 228-34.

Cribbs LL. Vascular smooth muscle calcium channels could “T” be a target? *Circulation Res.* 2001;89:560-562.

Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ. Res.* 2002;90:1159–1166.

Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, and Kaley G. Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEBJ.* 2003;17:1183–1185.

Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, Kaley G. Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging. *Physiol. Genomics* 2004;17:21–30.

d'Allessio P. Aging and the endothelium. *Exp. Gerontol.* 2004;39:165–171.

Davidge ST, Ojimba J, McLaughlin MK. Vascular function in the vitamin E-deprived rat: an interaction between nitric oxide and superoxide anions. *Hypertension.* 1998;31:830–835.

Delp MD, Brown M, Laughlin MH, Hasser EM. Rat aortic vasoreactivity is altered by old age and hindlimb unloading. *J Appl Physiol* (1985). 1995;78:86-2079.

Demy DL, Ranta Z, Giorgi J-M, Gonzalez M, Herbomel P, Kissa K. Generating parabiotic zebrafish embryos for cell migration and homing studies. *Nat Meth.* 2013; 10:256–8.

DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, Seals DR. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation.* 2000;102:7-1351.

Deussen A, Brand M, Pexa A, Weichsel J. Metabolic coronary flow regulation – Current concepts. *Basic Res Cardio.* 2006;101:453–464.

Devine CE, Somlyo AV, Somlyo AP. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J Cell Biol.* 1972;52:690-718.

- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399:601-605.
- Dinenno FA, Tanaka H, Stauffer BL, Seals DR. Reductions in basal limb blood flow and vascular conductance with human ageing: role for augmented α -adrenergic vasoconstriction. *J Physiol*. 2001;536:977–983.
- Dohi Y, Thiel MA, Bühler FR, Lüscher TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension*. 1990;16:9-170.
- Donato AJ, Lesniewski LA, Delp MD. The effects of aging and exercise training on endothelin-1 vasoconstrictor responses in rat skeletal muscle arterioles. *Cardiovasc. Res*. 2005;66:393–401.
- Donato AJ, Gano LB, Eskurza I, Silver AE, Gates PE, Jablonski K, Seals DR. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2009;297:H425–H432.
- Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015;89:122–135.
- Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M. “Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension*, 2001;37;640–644.
- Edwards G, Weston AH. Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarizations. *Pharmacol Res*. 2004;49:41-535.
- Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Kuga T, Urabe Y, Takeshita A. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation*. 1993;88:77-81.
- Eggel A, Wyss-Coray T. Parabiosis for the study of age-related chronic disease. *Swiss Med Wkly*. 2014;144:doi:10.4414/smw.2014.13914.

Erlichmana JS, Leiter b JC, Gourine AV. ATP, glia and central respiratory control. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2010;173:305–311.

Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*. 2005;105:2294–2299.

Finerty JC. Parabiosis in physiological studies. *Physiol. Rev*. 1952;32:277-302.

Francia P, Delli Gatti C, Bachschmid M, Martin-Padura I, Savoia C, Migliacci E, Pelicci PG, Schiavoni M, Luscher TF, Volpe M, Cosentino F. Deletion of p66shc gene protects against age related endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004;110:2889–2895.

Furchgott RF, Vanhoutte PM . Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J: Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1989;3:2007–2018.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.

Gates PE, Boucher ML, Silver AE, Monahan KD, Seals DR. Impaired flowmediated dilation with age is not explained by L-arginine bioavailability or endothelial asymmetricdimethylarginineproteinexpression. *J. Appl. Physiol*. 2007;102:63–71.

Gaubert ML, Sigaud-Roussel D, Tartas M, Berrut G, Saumet JL, Fromy B. Endothelium derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J. Physiol*. 2007;585:617–626.

Gauthier KM, Deeter C, Krishna UM, et al. 14,15-Epoxyeicosa5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ Res*. 2002;90:36-1028.

Goraca A. Assessment of total antioxidant capacity in human plasma. *Folia Med. (Plovdiv)*. 2004;46:16–21.

- Goto K, Fujii K, Kansui Y, Iida M. Changes in endothelium derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with reninangiotensin system inhibitors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004;31:650–655.
- Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I, Fujishima M. Angiotensin converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2000;36:581–587.
- Griffith TM. Modulation of blood flow and tissue perfusion by endothelium-derived relaxing factor. *Exp Physiol.* 1994;79:873-913.
- Harris WA. Axonal pathfinding in the absence of normal pathways and impulse activity. *J Neurosci.* 1984;4:62-1153.
- Hayashi T, Yano K, Matsui-Hirai H, Yokoo H, Hattori Y, Iguchi A. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol Ther.* 2008;120:9-333.
- He W, Muenchrath, M, Kowal, P. US Census Bureau, Shades of gray: A cross-country study of health and well-being of the older populations in SAGE countries. Government Printing Office. 2012;2007–2010.
- Herrera MD, Mingorance C, Rodri'guez-Rodri'guez R, de Sotomayor MA. Endothelial dysfunction and aging: An update. *Ageing Research Reviews.* 2010;9:142–152.
- Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Hara K, Jitsuiki D, Goto C, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. *Atherosclerosis.* 2006;186:390–395.
- Hilgers RH, Webb RC. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med.* 2005;230:835-829.
- Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, et al. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276:3459-3467.

Hodis HN, Mack WJ, Henderson VW, Shoupe D, Budoff MJ, Hwang-Levine J, et al. Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol. *N Engl J Med*. 2016;374:1221-1231.

Holowatz LA, Thompson CS, Kenney W L. LArginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilatation in aged human skin. *J. Physiol. (Lond.)*. 2006;574:573–581.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. 1996;76:967-1003.

Idris Khodja N, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth VB. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. 2012; *PLoS ONE* 7, e32039. doi:10.1371/journal.pone.0032039

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:9265-9269.

Ji G, Barsotti RJ, Feldman ME, Kotlikoff MI. Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *J General Physiology*. 2002;119:533-543.

Juan SH, Chen JJ, Chenetal CH. 17 β -estradiol inhibits cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression within vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2004;287;H1254–H1261.

Kansui Y, Fujii K, Goto K, Abe I, Iida M. Angiotensin II receptor antagonist improves aged-related endothelial dysfunction. *J. Hypertens*. 2002;20:439–446.

Katsimparti L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz, GR, Ghen JW, Lee RT, Wagers AJ, Rubin LL, Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science*. 2014;344:630.634.

Kelly DM, Jones TH. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology*. 2013;217:R47–R71.

Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension*. 2005;45:860–866.

Kiproff DD. Intermittent Heterochronic Plasma Exchange as a Modality for Delaying Cellular Senescence-A Hypothesis. *Journal of Clinical Apheresis*. 2013;28:387-389.

Klabunde RE, *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2. Ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. 2012:125-153.

Klabunde RE. Cellular Structure and Function, in *Cardiovascular Physiology Concepts*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 2011;50-52.

Koçer G. Farklı damar yataklarında ve segmentlerinde karbonmonoksitin vasküler tonusa katkısı: Tanımlayıcı bir çalışma. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2012, Antalya (Danışman: Prof. Dr. Ümit Kemal Şentürk).

Korzick DH, Muller-Delp JM, Dougherty P, Heaps CL, Bowles DK, Krick KK. Exaggerated coronary vasoreactivity to endothelin-1 in aged rats: role of protein kinase C. *Cardiovasc Res*. 2005;66:384–392.

Learoyd P. The history of blood transfusion prior to the 20th century--part 1. *Transfus Med*. 2012;22:308-314.

LeBlanc AJ, Shipley RD, Kang LS, Muller-Delp JM. Age impairs Flk-1 signaling and NO mediated vasodilation in coronary arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2008;295:H2280–H2288.

Leffler CW, Parfenova H, Jaggar JH. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2011;301:1-11.

Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, Sinha M, Dall’Osso C, Khong D, Shadrach JL, Miller CM, Singer BS, Stewart A, Psychogios N, Gerszten RE, Hartigan AJ, Kim MJ, Serwold T, Wagers AJ, Lee RT. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell*. 2013;153:828–839.

Long DA, Newaz MA, Prabhakar SS, Price KL, Truong LD, Feng L, Mu W, Oyekan AO, Johnson RJ. Loss of nitric oxide and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in aging. *Kidney Int.* 2005;68:2154–2163.

Lopes RAM, Neves KB, Carneiro FS, Tostes RC. Testosterone and vascular function in aging. *Frontiers in physiology.* 2012;3:doi: 10.3389/fphys.2012.00089

Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation.* 2000;102:2434–2440.

Lüscher TF, Dohi Y, Tanner FC, Boulanger C. Endothelium-dependent control of vascular tone: Effects of age, hypertension and lipids. *Basics Res Cordiol.* 1991;86:58-143.

Maeda S, Tanabe T, Miyauchi T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Kuno S, Ajisaka R, Yamaguchi I, Matsuda M. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95:41-336.

Maeda S, Tanabe T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Miyauchi T, Kuno S, Ajisaka R, Matsuda M. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res.* 2004;27:53-947.

Malinin NL, West X Z, Byzova TV. Oxidation as “the stress of life.” *Aging* (Albany NY). 2011;3:906–910.

Marijic J, Li Q, Song M, Nishimaru K, Stefani E, Toro L. Decreased expression of voltage and $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated $\text{K}^{(+)}$ channels in coronary smooth muscle during aging. *Circ. Res.* 2001;88:210–216.

Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction: potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging.* 2003;20:527–550.

Matz RL, de Sotomayor, MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br. J. Pharmacol.* 2000;131:303–311.

Mayhan WG, Faraci FM, Baumbach GL, Heistad DD. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol.* 1990; 258:43-1138.

McLachlan EM. Transmission of signals through sympathetic ganglia--modulation, integration or simply distribution?. *Acta Physiol Scand.* 2003;177:227–235.

Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;28:1243–1248.

Mei W, Xiang G, Li Y, Li H, Xiang L, Lu J, Xiang L, Dong J, Liu M. GDF11 Protects against Endothelial Injury and Reduces Atherosclerotic Lesion Formation in Apolipoprotein E-Null Mice. *Mol Ther.* 2016;24:1926–1938.

Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol.* 2002;89:12E17E, 17E-18E.

Miller VM, Mulvagh SL. Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:263-270.

Minneman KP. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol Rev.* 1988;40:87–119.

Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K, Munzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ. Res.* 2002;90:E58–E65.

Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991;21: 42-361.

Moncada S, Radomski MW. Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.* 1988;37:2495–2501.

- Monsalve E, Oviedo P, Garcíaperez M, Tarín J, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovascular Research*. 2007;73:66–72.
- Mukai Y, Shimokawa H, Higashi M, Morikawa K, Matoba T, Hiroki J, Kunihiro I, Talukder HM, Takeshita A. Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22:1445–1450.
- Muller-Delp J, Spier SA, Ramsey MW, Lesniewski LA, Papadopoulos A, Humphrey JD, Delp MD. Effects of aging on vasoconstrictor and mechanical properties of rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:54-H1843.
- Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension*. 2005; 46:454-62.
- Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y. 17 β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1995;294:625-635.
- Ndisang JF, Tabien HE, Wang R. Carbon monoxide and hypertension, *J. Hypertens*. 2004;22:1057-1074.
- Nevado J, Vallejo S, El-Assar M, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF, and Rodriguez-Manas L. Changes in the human peritoneal mesothelial cells during aging. *Kidney Int*. 2006;69:313–322.
- Novella S, Dantas AP, Segarra G, et al. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Experimental Gerontology* 2013;48:37–1337.
- Novella S, Dantas AP, Segarra G, Medina P, Hermenegildo C. Vascular Aging in Women: is Estrogen the Fountain of Youth? *Front Physiol*. 2012;3:165.
- Novella S, Heras M, Hermenegildo C, Dantas AP. Effects of estrogen on vascular inflammation: a matter of timing. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32:2035–2042.

- Pacher P, Beckman J S, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007;87:315–424.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:6-664.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990;323:7-22.
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 1999;43:509–520.
- Pearson PJ, Vanhoutte PM. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1993;122:1–67.
- Proctor DN, Parker BA. Vasodilation and vascular control in contracting muscle of the aging human. *Microcirculation.* 2006;13:27-315.
- Quilley J, McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:4-121.
- Radomski MW, Moncada S. Biological role of nitric oxide in platelet function. In: Moncada S, Higgs EA, Berrazueta ER, eds. *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system.* Edicomplet. 1991:45–56.
- Raina H, Zacharia J, Li M, Wier W. Activation by Ca²⁺/calmodulin of an exogenous myosin light chain kinase in mouse arteries. *J Physiology.* 2009;587:2599-2612.
- Rajagopalan S, Brook R, Mehta RH, Supiano M, Pitt B. Effect of losartan in aging-related endothelial impairment. *Am. J. Cardiol.* 2002;8:562–566.
- Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium- sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:C769–C783.

Rees DO, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol.* 1989;96:24-418.

Rembold CM, Murphy RA. Models of the mechanism for crossbridge attachment in smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 1993;14:325-334.

Rodriguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R, Montes M, Nevado J, Castro M, Gomez-Guerrero C, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF. (Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell.* 2009;8:226–238.

Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 2010;4:302-312.

Santhanam L, Christianson DW, Nyhan D, Berkowitz DE. Arginase and vascular aging. *J. Appl. Physiol.* 2008;105:1632–1642.

Santhanam L, Lim H K, Miriel V, Brown T, Patel M, Balanson S, Ryoo S, Anderson, M, Irani K, Khanday F, Di Costanzo L, Nyhan D, Hare JM, Christianson DW, Rivers R, Shoukas A, Berkowitz DE. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 2007;101:692–702.

Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G) dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005;35:622–626.

Seals DR, Jablonski KL, Donato A. J. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin. Sci (Lond.)*. 2011;120:357–375.

Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, Von Segesser L, Luscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 1994;89:1203–1208.

Shepherd JT, Vanhoutte PM. The Human Cardiovascular System: Facts and Concepts. 1979

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996;28:703–711.

Shozo I, Potter JD. Calcium binding to calmodulin. Cooperativity of the calcium-binding sites. *J Biochem.* 1986;99:1765-1772.

Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 2014;344:649-652.

Sloboda N, Fève B, Thornton SN, Nzietchueng R, Regnault V, Simon G. Fatty acids impair endothelium-dependent vasorelaxation: a link between obesity and arterial stiffness in very old Zucker rats. *A Biol. Sci. Med. Sci.* 2012;67:927–938.

Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . *Journal of Molecular Endocrinology.* 2010;44:237–246.

Soucy KG, Ryoo S, Benjo A, Lim HK, Gupta G, Sohi JS, Elser J, Aon MA, Nyhan D, Shoukas AA, Berkowitz DE. Impaired shear stress induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness. *J. Appl. Physiol.* 2006;101:1751–1759.

Spier SA, Delp MD, Meininger CJ, Donato AJ, Ramsey MW, Muller-Delp JM. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *J. Physiol.* 2004;556:947–958.

Stec DE, Drummond HA, Vera T. Role of carbon monoxide in blood pressure regulation, *Hypertension.* 2008;51:597-604.

Stegbauer J, Coffman T M. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2011;20:84–88.

Stuehr D J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1411:217–230.

Stull JT, Gallagher PJ, Herring BP, Kamm KE. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension.* 1991;17:723-732.

Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension.* 1997;29:43-736.

Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension.* 1993; 21:929-33.

Takahashi K, Miura S, Mori-Abe A, Kawagoe J, Takata K, Ohmichi M, et al. Impact of menopause on the augmentation of arterial stiffness with aging. *Gynecol Obstet Invest.* 2005;60:162-166.

Tang EH, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol. Genomics.* 2008;3:409–418.

Thijssen DH, Rongen GA, Van Dijk A, Smits P, Hopman MT. Enhanced endothelin-1 mediated leg vascular tone in healthy older subjects. *J. Appl. Physiol.* 2007;103:852–857.

Tian J, Yan Z, Wu Y, Zhang S, Wang K, Ma X, Guo L, Wang J, Zuo L, Liu J, Quan L, Liu H. Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2010;31:1324–1328.

Tousoulis D, Kampoli AM, Papageorgiou CTN, Stefanadis C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology.* 2012;10:4-18.

Triggle CR, Ding H. The endothelium in compliance and resistance vessels. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3:730-744.

Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou W F, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the nonisopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1994;269:21778–21785.

Ungvari Z, Buffenstein R, Austad SN, Podlutzky A, Kaley G, Csiszar A. Oxidative stress in vascular senescence: lessons from successfully aging species. *Front. Biosci.* 2008;13:5056–5070.

Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G. Vascular inflammation in aging. *Herz.* 2004;29:733–740.

Ungvari Z, Sonntag WE, Csiszar A. Mitochondria and aging in the vascular system. *J. Mol. Med.* 2010b;88:1021–1027.

Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Luscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.* 2000;192:1731–1744.

Van Lierop JE, Wilson DP, Davis JP, Tikunova S, Sutherland C, Walsh MP, et al. Activation of smooth muscle myosin light chain kinase by calmodulin role of LYS30 and GLY40. *J Biol Chem.* 2002;277:6550-6558.

Villeda SA, Luo J, Mosher K, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan T, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin K, Czirr e, Park J, Couillard-Despres S, Aigner L, Li G, Peskind E, Kaye J, Quinn J, Galasko D, Xie X, Rando T, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature.* 2011;477:90-94.

Villeda SA, Plambeck KE, Middeldrop J, Castellano JM, LLuo J, Smith LK, Bierti G, Lin K, Berdnik D, Wabl R, Udeochu J, Wheatley EG, Zou B, Simmons DA, Xie XS, Longo FM, Wyss-Coay T. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nature.* 2014;20:659-663.

Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 2010;459:1015–1023.

Walsh MP. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem.* 1994;135:21-41.

Walsh MP. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications. *IUBMB Life.* 2011;63:987-1000.

Wang M, Zhang J, Jiang LQ, Spinetti G, Pintus G, Monticone R, Kolodgie FD, Virmani R, Lakatta EG. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension.* 2007;50:219–227.

Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF, Lakatta EG. Aging increases aortic MMP2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension.* 2003;41:1308–1316.

Waskow C, Generation of parabiotic mice for the study of DC and DC precursor circulation. *Methods Mol. Biol.* 2010;595:413-428.

Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiology Educ.* 2003;27:201-206.

Weissman IL, Jerabek L, et al. Tolerance and the H-Y antigen: Requirement for male T cells, but not B cells, to induce tolerance in neonatal female mice. *Transplantation.* 1984;37:3-6.

Wiedeman MP. Contractile activity of arterioles in the bat wing during intraluminal pressure changes. *Circulation Res.* 1966;19:559-563.

Wray S, Burdyga T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev.* 2010;90:113-178.

Yamagishi S, Matsui T. Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy-friend or foe? *Pharmacol. Res.* 2011;64:187–194.

Yildiz O, Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1100:60-353.

Yu BP, Chung HY. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech. Ageing Dev.* 2006;127:436–443.

Zaydun G, Tomiyama H, Hashimoto H, Arai T, Koji Y, Yambe M, et al. Menopause is an independent factor augmenting the age-related increase in arterial stiffness in the early postmenopausal phase. *Atherosclerosis.* 2006;184:137-142.

Zeicher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest.* 1993;92:62-652.

Zhang F, Kaide JI, Rodriguez-Mulero F, Abraham NG, Nasjletti A. Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system, *Am. J. Hypertens.* 2001;14:62S-67S.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung Susan WS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2015;129:83-94.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı



YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 26/09/2018
Toplantı No : 2018/24
Proje Başvuru No : 53

Yakın Doğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nden, Sorumlu Araştırmacı Yard. Doç.Dr. Günnur KOÇER tarafından hazırlanan "*Heterokronik Parabiosis Modeli Kullanılarak Yaşlı Farelerde Damar Yanıtlarının Araştırılması*" başlıklı araştırma önerisi Kurulumuzca etik olarak uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emine KOÇ	(BAŞKAN)	
1. Prof. Dr. Tamer YILMAZ	(ÜYE)	
2. Prof. Dr. Vedat SAĞMANLIGİL	(ÜYE)	
3. Doç. Dr. Dilek ARSOY	(ÜYE)	
4. Doç. Dr. Bilgen BAŞGUT	(ÜYE)	
5. Doç. Dr. Serdar SUSEVER	(ÜYE)	
6. Yrd. Doç. Dr. Savaş Volkan GENÇ	(ÜYE)	
7. Vet. Hek. Umut SAYILI	(ÜYE)	
8. Avukat Burak NOLAN	(ÜYE)	
9. Vet. Hek. Meliha TEMİZEL	(ÜYE)	

EK 2: Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ülfet	Soyadı	FARİSOĞLU
Doğum Yeri	Girne	Doğum Tarihi	05/02/1995
Uyruğu	K.K.T.C	Tel	05338328616
E-mail	ulfet-1905@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lise	Kurtuluş Lisesi	2013
Lisans	Trakya Üniversitesi	2017

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	iyi

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	58,99	57,46	56,53

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım Becerisi
Office Programları	iyi