

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NOS İNHİBİSYONU VE TUZ İLE OLUŞTURULAN
HİPERTANSİYONDA PERİNDOPRİL, LOSARTAN VE
NOVOKİNİN'İN KAN BASINCI, eNOS, ADMA, RHOKİNAZ,
NADPH OKSİDAZ VE ATII RESEPTÖR KATILIMINI İÇEREN
VASKÜLER CEVAPLARA ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Emre MUTLU**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Engin ŞAHNA**

**ELAZIĞ
2013**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Engin ŞAHNA _____ **Danışman**

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin ŞAHNA _____

Doç. Dr. Mehmet Kaya Özer _____

Yrd. Doç. Dr. Selçuk İLHAN _____

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı sabırla yürüten, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezimi hazırlarken yön bulmama yardım eden hocam Sayın Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve becerilerimi kazanmamda büyük katkılarını gördüğüm Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Selçuk İLHAN'a, tezimin oluşumundaki katkılarından dolayı asistan arkadaşlarıma ve tüm Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca bugünlere gelmemde bana her zaman her konuda destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Çalışmamızda nitrik oksit sentaz inhibisyonu ve tuz yüklemesi ile oluşturulan hipertansiyon (HT) da Rhokinaz, NADPH oksidaz aktivitelerinin, endotelial nitrik oksit sentaz, asimetrik dimetil arginin (ADMA) düzeylerinin rolü ve ADE inhibisyonu (perindopril), AT1 reseptör blokajı (losartan), AT2 agonisti Novokin'in kan basıncı ve bu parametreler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Ek olarak tüm grupların izole torasik aortalarında, fenilefrin kasılma, asetilkolin (Ach) gevşeme cevapları ve anjiotensin II indüklü kasılmalar üzerine rhokinaz ve ATII reseptörlerinin rolü araştırıldı.

Hipertansiyon oluşturmak için 4 hafta boyunca intraperitoneal NOS inhibitörü, L-NAME ve içme suyuyla %1 tuz verildi. Perindopril (2mg/kg/gün), losartan (2mg/kg/gün), novokin (0,1mg/kg/gün) 2 hafta boyunca intraperitoneal uygulandı. Kan basıncı tail-cuff yöntemiyle, NADPH oksidaz, ADMA'yı sentezleyen protein arginin metiltransferaz (PRMT) enzimi, Rhokinaz ve eNOS düzeyleri aort dokularında real time-polimeraz zincir reaksiyonu ile ölçüldü.

Kan basınçları L-NAME ve tuz alan gruplarda 14. ve 28. günde anlamlı yüksekti. Tedavi gruplarının hepsinde kan basıncı 28. günde anlamlı düşüktü. Sadece ilaç alan gruplarda Hipertansif grupta NADPH oksidaz, PRMT ve Rho kinaz ekspresyon düzeylerinde artış, eNOS da azalma görüldü, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ach EC50 değerleri hipertansif grupta anlamlı yüksek, Emax değerleri anlamlı düşüktü. Tedavi alan hipertansif gruplarda Ach EC50 değerleri anlamlı düşük, Emax değerleri ise anlamlı yüksekti.

Anjiotensin tip 2 reseptör agonisti novokininin kan basıncı üzerine etkisi losartanla benzerdi. Asetilkolin duyarlılığı, novokin grubunda losartan uygulanan gruptan daha yüksekti. Parametrelerin ölçülen düzeyleri novokin ve perindopril gruplarında benzerdi. Bu sonuçlar novokininin kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu etkiler yönünden test edilebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipertansiyon, nitrik oksit, novokin, rhokinaz, ADMA

ABSTRACT

THE EFFECT OF PERINDOPRIL, LOSARTAN, NOVOKININ ON BLOOD PRESSURE, eNOS, ADMA, RHOKINASE, NADPH OXIDASE AND THE VASCULAR RESPONSES INCLUDING ATII RECEPTOR IN HYPERTENSION INDUCED BY NOS INHIBITION AND SALT

In our study, we investigated the roles of NADPH oxidase, Rho kinase activities, eNOS (endothelial nitric oxide synthase), asymmetric dimethylarginine (ADMA) level and the effects of ACE inhibitor (perindopril), AT1 receptor blockade (losartan), AT2 receptor agonist (novokinin) on these enzymes and blood pressure in hypertension induced by NOS inhibition and salt. Furthermore, in the isolated thoracic aorta rings of all groups, phenylephrine induced contractile, acetylcholine induced dilator responses and the role of AT2 receptor and Rho kinase on angiotensin II induced contraction was investigated.

To develop hypertension, L-NAME was administrated intraperitoneally, salt was given with drinking water (1%) for 4 weeks. Perindopril (2mg/kg/day), losartan (2mg/kg/day), novokinin (0,1mg/kg/day), were administrated intraperitoneally for 2 weeks. Blood pressure was measured by using tail-cuff method; NADPH oxidase, Rho kinase, protein arginine methyltransferase (PRMT) ADMA synthesizing enzyme, eNOS levels were measured by Real-Time Polymerase Chain Reaction in aortic tissues.

Blood pressure increased significantly in L-NAME and salt administrated groups at 14th and 28th days. In treated hypertensive groups, blood pressure reduced at 28th day significantly. The levels of Rho kinase and PRMT expression increased and the level of eNOS expression decreased in hypertensive group, but it was not significant. L-NAME and salt administration increased EC50 value of acetylcholine dilatation, decreased Emax value significantly. In treated hypertensive groups, EC50 decreased, Emax increased significantly.

The effect of AT2 receptor agonist novokinin on blood pressure was similar to losartan. Acetylcholine sensitivity was higher in novokinin than losartan treatment group. The measured levels of these parameters were similar in novokinin and perindopril groups. These results suggest that novokinin may test in cardiovascular disease in terms of protective effects.

Key Words: Hypertension, nitric oxide, novokinin, rhokinase, ADMA

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Esansiyel Hipertansiyonun Tanımı ve Kan basıncını Belirleyen Faktörler	3
1.2. Esansiyel hipertansiyona katılımcı olduğu düşünülen patofizyolojik durumlar	5
1.2.1. Hemodinamik değişiklikler	5
1.2.1.1. Kardiyak değişiklikler	5
1.2.1.2. Periferik arter değişiklikleri	5
1.2.2. Genetik Etkenler	5
1.2.3. Aşırı Tuz Alımı	5
1.2.4. Renal Kaynaklı Sodyum ve Su Retansiyonu	6
1.2.4.1. Natriüretik Hormon	6
1.2.4.2. Vazopressin	6
1.2.5. Renin-angiotensin-aldosteron sistemi	6
1.2.6. Stres ve aşırı sempatik aktivite	10
1.2.7. Endotel disfonksiyonu	10
1.2.7.1. Nitrik Oksit	10
1.2.7.2. Endotelyal Nitrik Oksit sentaz	13
1.2.7.3. ADMA (Asimetrik dimetilarginin)	15
1.2.7.4. NADPH oksidaz	19
1.2.7.5. Rho Kinaz	20
1.2.8. Prostaglandinler	24
1.2.9. Endotelin	24

1.2.10. Obezite	25
1.2.11. Vazoaktif peptidler	25
1.2.12. Sigara	25
1.2.13. Alkol	25
1.2.14. Fiziksel inaktivite	25
1.3. Deneysel Hipertansiyon Modelleri	25
1.3.1. Genetik İndüklü Hipertansiyon	25
1.3.2. Çevresel İndüklü Hipertansiyon	26
1.3.3. Farmakolojik İndüklü Hipertansiyon	26
1.3.3.1. NOS İnhibisyonu ile oluşturulan Hipertansiyon	26
1.3.4. Renal İndüklü Hipertansiyon	28
1.4. Losartan, Perindopril, Novokinin	28
1.4.1. Losartan	28
1.4.2. Perindopril	29
1.4.3. Novokinin	29
1.5. Çalışmanın Amacı	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1. Denekler	31
2.2. Deney protokolü	31
2.2.1. HT oluşturulması	31
L-NAME uygulamaları	31
2.2.3. Kan basıncı ölçümleri	32
2.2.4. Cerrahi uygulamalar	32
2.2.5. İn vitro deneyler	32
2.2.5.1. Fenilefrin (phe) kasılma cevapları	33
2.2.5.2. Asetilkolin (Ach) Gevşeme cevapları	33
2.2.5.3. AT1 ve AT2 reseptör rolünün belirlenmesi	33
2.2.6. Biyokimyasal analizler	34
2.2.6.1. Doku ADMA, eNOS, NADPH oksidaz, RhoA aktiviteleri	34
2.3. İstatistiksel analiz	34
2.4. Kullanılan Kimyasallar	34
3.BULGULAR	35

3.1. Kan basınçları	35
3.1.1. L-NAME ve tuz uygulamasının sistolik kan basıncı üzerine etkisi	36
3.1.2. Perindopril uygulamasının etkisi	36
3.1.3. Losartan uygulamasının etkisi	36
3.1.4. Novokinin uygulamasının etkisi	36
3.1.5. Kan basıncına etki açısından ilaç gruplarının kendi arasında karşılaştırılması	36
3.2. Torasik aortada kasılma-gevşeme yanıtları	38
3.2.1. Fenilefrin kasılma cevapları	38
3.2.2. Asetilkolin gevşeme cevapları (%)	40
3.2.2.1. Ach gevşeme cevapları üzerine perindopril tedavisinin etkileri	42
3.2.2.2. Ach gevşeme cevapları üzerine losartan tedavisinin etkileri	43
3.2.2.3. Ach gevşeme cevapları üzerine novokinin tedavisinin etkileri	45
3.2.2.4. Hipertansif gruplarda asetilkolin gevşeme cevapları üzerine ilaç etkinliklerinin karşılaştırılması	46
3.2.3. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II cevapları	48
3.2.3.1. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine perindopril etkisi	50
3.2.3.2. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine losartan etkisi	51
3.2.3.3. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine novokininin etkisi	52
3.2.3.4. Phe önkasılması sonrası AngII cevaplarına ilaç etkinliklerinin karşılaştırılması	52
3.2.4. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisi	53
3.2.4.1. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine perindopril etkisi	55
3.2.4.2. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine losartan etkisi	55
3.2.4.3. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine novokininin etkisi	57

3.2.4.4. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası AngII'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine ilaç etkinliklerinin karşılaştırılması	57
3.2.5. Losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisi	58
3.2.5.1. Losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine perindopril etkisi	60
3.2.5.2. Losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine losartan etkisi	60
3.2.5.3. Losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine novokininin etkisi	61
3.2.5.4. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine ilaç etkilerinin karşılaştırılması	62
3.2.6. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası fasudil (10-5mol/l) cevapları	63
3.3.Aortik dokularda gen ekspresyon çalışmaları	64
4. TARTIŞMA	67
5. KAYNAKLAR	77
6. ÖZGEÇMİŞ	97

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 0, 14 ve 28.günde kan basıncı değerleri	35
Tablo 2. Kan basıncı değişimi yüzdesi	37
Tablo 3. Fenilefrin Kasılma Yanıtları	39
Tablo 4. Ach gevşeme yanıtları	41
Tablo 5. Ach gevşeme yanıtları Emax ve Ec50 değerleri	41
Tablo 6. Phe önkasılması sonrası angII yanıtları	49
Tablo 7. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII yanıtları	54
Tablo 8. Losartan ve PD123319 varlığında Phe önkasılması sonrası angII cevapları ortalama	59
Tablo 9. Phe önkasılması sonrası 10^{-5} dozda fasudil uygulamasına verilen cevapların ortalama değerleri	63
Tablo 10. Rho kinaz, eNOS, PRMT, NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri	64

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Deney grupları ve ilaç uygulamaları	32
Şekil 2.	0, 14 ve 28.günde kan basıncı değişimleri	35
Şekil 3.	Hipertansif gruplarda ilaçların antihipertansif etkilerinin karşılaştırılması	37
Şekil 4.	Fenilefrin Doz Cevap Eğrisi	38
Şekil 5.	Kontrol ve HT grubunda phe doz cevap eğrisi	38
Şekil 6.	Asetilkolin gevşeme cevapları	40
Şekil 7.	Kontrol ve HT gruplarında ach gevşeme cevapları	40
Şekil 8.	Ach gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine perindopril etkisi	42
Şekil 9.	Asetilkolin gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine perindopril etkisi	43
Şekil 10.	Asetilkolin gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine losartan etkisi	44
Şekil 11.	Asetilkolin gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine losartan etkisi	44
Şekil 12.	Asetilkolin gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine novokinin etkisi	45
Şekil 13.	Asetilkolin gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine novokinin etkisi	46
Şekil 14.	Ach gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine hipertansif gruplarda ilaç tedavilerinin etkileri	47
Şekil 15.	Ach gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine hipertansif gruplarda ilaç tedavilerinin etkileri	47
Şekil 16.	Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisi	48
Şekil 17.	Phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine perindopril etkisi	50
Şekil 18.	Phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisine losartanın etkisi	51
Şekil 19.	Phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine novokinin etkisi	52
Şekil 20.	Phe önkasılması sonrası angII cevaplarına hipertansif gruplarda ilaçların etkisi	53
Şekil 21.	Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisi	55
Şekil 22.	Losartan varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine perindopril etkisi	56

Şekil 23. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisine losartan tedavisinin etkisi	56
Şekil 24. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisine novokinin tedavisinin etkisi	57
Şekil 25. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası angII cevaplarına hipertansif gruplarda ilaçların etkisi	58
Şekil 26. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisi	58
Şekil 27. Losartan ve P123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine perindopril etkisi	60
Şekil 28. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine losartan etkisi	61
Şekil 29. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine novokininin etkisi	62
Şekil 30. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası angII cevaplarına hipertansif gruplarda ilaçların etkisi	63
Şekil 31. Fenilefrin ön kasılması sonrası fasudile bağlı gevşeme cevapları	64
Şekil 32. Aort dokusunda eNOS ekspresyon düzeyleri	65
Şekil 33. Aort dokusunda Rho kinaz ekspresyon düzeyleri	65
Şekil 34. Aort dokusunda NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri	66
Şekil 35. Aort dokusunda PRMT ekspresyon düzeyleri	66

KISALTMALAR LİSTESİ

2B1K	:	2 böbrek 1 klemb
ADE	:	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ADMA	:	Asimetrik dimetil arginin
ANF	:	Atriyal Natriüretik Faktör
ANG-I	:	Anjiyotensin1
ANG-II	:	Anjiyotensin 2
ARB	:	Anjiotensin reseptör blokörü
AT1	:	Anjiotensin tip 1 reseptör
AT2	:	Anjiotensin tip 2 reseptör
Ca²⁺	:	Kalsiyum
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
COX	:	Siklooksijenaz
DDAH	:	Dimetil arginin aminohidrolaz
DKB	:	Diyastolik Kan Basıncı
DOCA	:	Deoksikortikositeron Asetat
DS Rat	:	Dahl's salt sensitive rat
eNOS	:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GDP	:	Guanozin difosfat
HT	:	Hipertansiyon
IP3	:	İnozitoltrifosfat
iNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JGA	:	Juxtaglomerüler Aparat
KH	:	Kalp Hızı
L-NAME	:	N ^o -Nitro-L-Arjinin Metil Ester
L-NMMA	:	N ^o -Monometil-L-Arjinin
L-NNA	:	N ^o -Nitro-L-Arginin
Na⁺	:	Sodyum
nNOS	:	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz

NOX	:	Nitrit/Nitrat
PGI₂	:	Prostasiklin
PRMT	:	Protein arginin metiltransferaz
RAAS	:	Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi
RKA	:	Renal Kan Akımı
ROS	:	Reaktif oksijen ürünleri
SD	:	Sprague-Dawley
SH	:	Spontan Hipertansif
SHR	:	Spontan Hipertansif Rat
SKB	:	Sistolik Kan Basıncı

1. GİRİŞ

Hipertansiyon ve neden olduğu kardiyovasküler hastalıklar dünyada başlıca ölüm nedenleri arasındadır. Dünya Sağlık Örgütü, hipertansiyonun tedavi alan çoğu hastada yetersiz kontrolü olduğunu, kardiyovasküler morbidite oranlarının yüksek kaldığını ve ilave farmakolojik tedaviler düzenlenmesi gerektiğini bildirmektedir (1,2). Etkili tedavi olmazsa persistan hipertansiyon inme, kalp hastalıkları, kronik böbrek hastalıkları, arteriyel anevrizmaya yol açabilir böylece yaşam süresini ve kalitesini etkileyebilir.

Hipertansiyondan sorumlu çeşitli mekanizmalar olmakla birlikte özellikle endotel disfonksiyonu ile NO biyoyararlanımında dolayısıyla vazodilatasyonda azalma ve tuz alınımına bağlı plazma volümündeki artış önemli rol oynamaktadır. Renin anjiotensin aldosteron sistemi (3), anjiotensin II (Ang II) üretimi aracılığıyla hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde kritik bir role sahiptir (4). Ang II anjiotensin tip 1 (AT1) reseptörü aracılığıyla vazokonstriksiyonu indüklemesinin yanı sıra yine vasküler büyüme, proliferasyon ve endotelial disfonksiyona yol açarak kardiyovasküler hastalıklara sebep olmaktadır (5). Aldosteron sentez ve salınımını, sempatik aşırımı ve katekolamin salınımını artırması, organ hasarını kolaylaştırmasındaki etkili faktörlerdendir (6). Ang II kan basıncı modülasyonunun yanında kardiyovasküler ve renal hastalıkların bütün evrelerinde birçok etkiye sahiptir (7, 8). Ang II kardiyak hipertrofi ve remodelling, myokardiyal infarktüs, ateroskleroz, stent restenozu, hipertansiyon, renal fibrozis gibi rahatsızlıkların fizyopatolojisinde önemli rol oynar (9,10). Ang II interlökin1-6-8, TNF- α , TNF- β , IFN- γ , CRP, ICAM-1, VCAM-1 gibi inflamatuvar mediatörlerin oluşumunu indükleyebilmekte dolayısıyla ateroskleroz başlangıcı ve gelişimini provoke edebilmektedir (11). Bütün bu etkiler RAAS'ı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir hedef haline getirmiştir. Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri RAAS'ı baskılamak için kullanılan ilk ilaçlardır (12). Anjiotensin reseptör blokörlerinin de (ARB) tedavide aynı etkinliği gösterdiği belirlenmiştir. Her ne kadar bu ilaçlar kan basıncını düşürmede efektif ve hipertansiyon tedavisinde genişçe yer bulsalar da, RAAS baskılamada yetersiz kalmaktadırlar. ADE inhibitörleri ve ARB'ler böbrekte jukstaglomeruler hücrelerde AT1 reseptörü ile renin salınımı üzerindeki negatif feed-back etkiyi azaltarak renin

salınımında kompensatuar artışa neden olmakta ve bu durum ilaçların organ koruyucu etkilerini bozabilmektedir. ADE inhibitörleri anjiotensin I'ın anjiotensin II'ye dönüşümünü tamamen önleyemezler, çünkü bu reaksiyonu meydana getiren başka enzimler de (kimaz, katepsin, tonin, tPA) vardır. Bu yollar Ang II'yi kademeli olarak patolojik seviyeye tekrar getirebilmektedirler ve buna anjiotensin kaçış fenomeni denilmektedir. Bahsedilen nedenler RAAS'ı farklı basamaklardan etkileyecek ve mevcut tedavilere aditif etki sağlayacak yeni ilaçların araştırma gereğini doğurmuştur. Ang II'nin diğer bir reseptörü olan anjiotensin tip 2 (AT2) reseptörünün uyarılması vazodilatör, antiproliferatif, proapoptotik etkiler gösterir (13), dolayısıyla AT1 reseptörüne zıt etkiler oluşturmaktadır. AT2 reseptörünün vazodilatör etkisini nitrik oksit (NO) aracılığıyla yaptığı belirlenmiştir (14,15). Ayrıca AT2 reseptörü renal prostaglandin E düzeyini artırabilmektedir (16). dolayısıyla renal perfüzyonu arttırarak renin anjiotensin sistemini baskılayabildiği düşünülmektedir (17). AT2 reseptörünün bu yönleriyle hipertansiyon tedavisinde önemli olabileceği düşünülebilir.

Reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların oluşumunda önemli etkisi bulunmaktadır (18,19). Çünkü ROS NO'nin inaktivasyonuna neden olmakta, hücrel moleküllere zarar vermekte, vasküler remodellingi indükleyen sinyallere neden olabilmektedir (20). ROS nitrik oksit sentazı inaktive ederek NO üretimini bozduğundan dolayı endotelial disfonksiyona da yol açmaktadır (21). ROS'un vasküler duvardaki en büyük kaynağı NADPH oksidaz enzim ailesidir. Ang II ise nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimini AT1 reseptörü aracılığıyla indükleyebilmekte ve oksidatif stresi artırabilmektedir. RAAS ile NADPH oksidaz arasındaki etkileşimin yol açtığı oksidatif stres kardiyovasküler patolojilerde (ateroskleroz, diyabet, kalp hastalıkları, hipertansiyon) anahtar rol oynayabilmektedir. Oksidatif streste artan ve kardiyovasküler patolojilerde düzeyi yükselen diğer bir parametre, eNOS inhibitörü olan asimetrik dimetil arginin (ADMA)'dır (22). Artmış oksidatif stres ADMA yıkımını sağlayan dimetil arginin aminohidrolaz (DDAH) enzim aktivitesini azaltarak ADMA düzeyini artırabilmektedir (23). ADMA damarlardaki dominant nitrik oksit sentaz izoformu olan eNOS inhibisyonu yaparak hipertansiyonun ve aterosklerozun fizyopatolojisinde önemli olan endotelial disfonksiyona sebebiyet

vermektedir (24, 25). Çünkü NO direkt olarak cGMP'yi indükleyerek damarlarda gevşemeyi uyarır. İlave olarak NO'in platelet agregasyon ve adezyonunu, ateroskleroz gelişimini, vasküler proliferasyonu önleyici etkileri vardır.

Vasküler yenilenmede eNOS gerekli olan etkenlerden biridir. Bu nedenle endotel disfonksiyonunun önemli nedenlerinden biri olabilen ADMA düzeylerini azaltmaya yönelik stratejiler, ilgili hastalıkların tedavisinde önem kazanmaktadır. Wistar ratlarda yapılan bir çalışmada, artmış ADMA düzeyinin arter duvarındaki vasküler renin anjiotensin sistemini aktive ettiği, ang II'nin ise NADPH oksidaz aktivitesini artırarak superoksit ürünlerinin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (26). RAAS'ı baskılayan ilaçların ADMA'ya etkisini inceleyen ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

Rho kinaz apoptozis, büyüme, metabolizma, migrasyon ve kontraksiyon gibi hücrel faaliyetlerin önemli bir düzenleyicisidir (27). Ang II ve endotelin, Rho kinaz yolağını aktive edebilirler, bu da vasküler hastalıkların patofizyolojisindeki rolü açısından önemli görünmektedir (28, 29). AT2 reseptörünün ise Rho kinazı inhibe edebileceği belirlenmiştir (30). NO ve Rho kinaz yolları özellikle kardiyovasküler sistemde (KVS) birbirine zıt çalışan iki mekanizma olarak görülmektedir. RhoA/Rhokinaz aktivasyonu, eNOS ekspresyonunu eNOS-mRNA stabilitesini azaltarak düşürebilir (31). Aşırı RhoA/Rho kinaz aktivitesi NO sentezinde azalmaya ve endotelial disfonksiyona neden olabilir ve RhoA/Rhokinaz inhibitörleri bunu geri çevirebilir (27). Ateroskleroz, vazospazm, iskemi reperfüzyon hasarı, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, kalp yetmezliği, inme gibi hastalıkların patogeneğinde RhoA/Rhokinaz yolağının rolü gösterilmiştir (32). Bu nedenle RhoA/Rhokinaz yolağı kardiyovasküler tedavide önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir.

1.1. Esansiyel Hipertansiyonun Tanımı ve Kan basıncını Belirleyen Faktörler

Arteriyel kan basıncının oluşumunda kardiyak debi ve periferik damar direnci en önemli iki faktördür. Sistolik kan basıncı (SKB), kalp atım hacmi ve aortanın gerilebilirliği (distansibilitesi) tarafından belirlenirken, arterdeki minimum kan basıncının karşılığı olan diyastolik kan basıncı (DKB) periferik damar direnci tarafından belirlenmektedir. Kalp debisi ile total periferik direncin çarpımı kan basıncını belirlediğinden, hipertansiyon durumunda belirtilen iki değişkenden

birisinde artma olduğu düşünölebilir. Sistemik damar direncini, damar çapı, damar duvarının yapısı ve damar düz kaslarının tonüsü gibi faktörler belirlerken; atım hacmi (stroke volüm) ile kalp hızının çarpımı kalp debisini gösterir. Damar düz kaslarının tonusunda çeşitli nörojenik, humoral, miyojenik ve lokal damar faktörlerinin etkili olduğu bilinirken, atım hacmini ön yük, art yük ve kalbin kasılma gücü etkilemektedir (33). Bununla birlikte kan basıncı, kalp debisi, periferik damar direnci arasındaki ilişki gerçekte çok daha karmaşıktır. Kardiyovasküler hastalıkların yaygın bir nedeni olan hipertansiyon, kalp ve böbrek yetersizliğı, inme ve nihayetinde ölüme yol açabilmektedir. Komplikasyonları ve görölme sıklığına bakıldığında önemli bir sağık sorunudur. Sıklığı ırk ve coğrafyalara göre değışmekle beraber, ABD, Avrupa ve diğerk birçok ölkede erişkin popölasyonun yaklaşık %25’inde hipertansiyon vardır.

Hipertansiyon, esansiyel (veya birincil) ve ikincil (sekonder) olarak ikiye ayrılmaktadır. Temel nedeni belli olmayan esansiyel hipertansiyon olguların yaklaşık %95’ini oluşturmaktadır. Olguların geri kalan % 5’inde, hipertansiyon; başta bazı böbrek hastalıkları, renovasküler hastalıklar ve bazı endokrin hastalıklar (bazı tiroid, adrenal, paratiroid ve ön hipofiz hastalıkları gibi) olmak üzere arteriyel kan basıncını yükselttiğı bilinen primer patolojik bozukluklara bağılıdır. Kırk yaşın altında hipertansiyon seyrek görölür; kırk yaşın üstünde prevalans yaş ile orantılı bir şekilde artar ve altmışbeş yaşın üstünde %50’yi geçer. Yirmi yaş altı bireylerde esansiyel hipertansiyon çok seyrek tespit edilir ve genç bireylerde kan basınç yüksekliğı sıklıkla sekonder nedenlere bağılıdır (34). Tespit edilme sıklığı bakımından esansiyel hipertansiyon cinsler arasında da farklılıklar gösterir. Orta yaş altı dönemde ve genç erişkinlikte erkeklerde daha sık tespit edilirken, orta yaş üstünde kadınlarda daha sık tespit edilir. Irklar arasında esansiyel hipertansiyonun tespit edilme sıklığı da farklılık sergilemektedir. Siyah ırkta daha sık tespit edilmektedir. Eğıtim düzeyi düşöklüğü ve sosyoekonomik düzey düşöklüğü beyaz ve siyah ırkta esansiyel hipertansiyon açısından gittikçe artış gösteren bir ilişki belirlenmiştir (33, 35).

Uzun yıllar klinik belirti oluşturmada kalabilen hipertansiyonun, tedavi edilmeyen veya yetersiz tedavi edilen olgularda kalp yetmezliğı, koroner kalp hastalığı, hemorajik ve trombotik inme, böbrek yetersizliğı, periferik arter hastalığı, aort diseksiyonuna sebebiyet verdiğı ve ölüm oranını arttırdığı ortaya koyulmuştur.

1.2.Esansiyel hipertansiyona katılımcı olduğu düşünölen patofizyolojik durumlar

Progresif seyirli ve multifaktöriyel nedenli olduğu düşünölen esansiyel hipertansiyonun henüz oluş mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu patolojik durumun temelinde dokuların sempatik etkinliğe cevaplarındaki artış, baroreseptör duyarlılığın değışmesi, oksidatif stres artışı, renin-anjiyotensin sisteminde anormal aktivasyon ve renal sodyum tutulumu artışı gibi etkenlerin olabileceğı tahmin edilmiştir.

1.2.1. Hemodinamik değışiklikler

1.2.1.1. Kardiyak değışiklikler

Yüksek kan basıncına sahip ve dolaşımı hiperkinetik olan bazı kişilerde kalp debisinin artmış olduğu belirlenmiştir. Fakat kalp debisindeki artış hipertansiyonun başlamasında oldukça etkili olsa da, yerleşmiş hipertansif durumda kalp debisinde artış olmamaktadır (33).

1.2.1.2. Periferik arter değışiklikleri

Yüksek kan basınçlı bireylerin, deri altı yağ dokularındaki küçük direnç damarlarının, normal kan basınçlılarla karşılaştırılması ile yapılan çalışmalarda, media kalınlığı/iç çap oranında %26-62 arasında değışen artışlar saptanmıştır (33).

1.2.2. Genetik Etkenler

Hipertansiyon gelişiminde etkili olan birçok gen vardır. Genetik çalışmalarda hipertansiyon gelişimi ile en güçlü ilişkisi olduğu bulunan genler renin-anjiyotensin sisteminin bileşenlerini ilgilendirmektedir. Bunlar anjiyotensinojen, anjiyotensin dönüştürücü enzim, anjiyotensin II tip 1 reseptörü ve beta-2 adrenerjik reseptördür. Bu genetik bozuklukların ortak bir noktası; artmış tuz ve su tutulumu ile sonuçlanan kalıtsal bir renal disfonksiyonun varlığıdır.

1.2.3. Aşırı Tuz Alımı

Tuz tüketimi yüksek olan toplumlarda hipertansiyon sıklığının yüksek olması, tuz kısıtlaması ile kan basıncı değerlerinde azalma gözlemlenmesi ve tuzdan fakir diyetle beslenen ilkel toplumların diyetlerindeki tuz oranı artırıldığında esansiyel hipertansiyon insidansının yükselmesi, esansiyel hipertansiyon etyolojisinde tuz

alımının önemiyle ilişkili değerli ipuçları sağlamaktadır. Yüksek düzeyde sodyum alınması dolaşım hacmini ve kalbe dönen kan miktarının artırarak bu yoldan kalp debisini yükseltir ve sonuç olarak kan basıncında artışa neden olduğu bilinmektedir.

Sağlıklı bireylerde kan basıncı artışına bağlı olarak böbreklerden sodyum ve su atılımı artar, sıvı hacmi azalır ve basınç normal düzeye döner (basınç natriürezisi). Bu mekanizmada oluşabilecek bozulmanın, kan basıncında artışla sonuçlanabileceği tahmin edilmektedir. İlave olarak artmış sodyum düzeyi kan basıncını, damarsal etkinliği bozma yoluyla da artırabilir. Günlük diyetle alınan sodyum miktarı esansiyel hipertansiyon patogenezi ile oldukça ilişkilidir, buna rağmen yüksek kan basıncı oluşumu için tek başına yeterli bir faktör değildir (33).

1.2.4. Renal Kaynaklı Sodyum ve Su Retansiyonu

1.2.4.1. Natriüretik Hormon

Esansiyel hipertansiyon ve renovasküler hipertansiyonda plazma natriüretik hormon düzeyleri incelenmiş ve yaş arttıkça esansiyel hipertansiyonlularda natriüretik hormon düzeyinin normotansiflere göre anlamlı oranda arttığı gösterilmiştir. Renovasküler hipertansiyonlular ise normotansiflere göre daha yüksek plazma natriüretik hormon düzeyine sahiptir. Natriüretik hormon kan basıncında düşüş meydana getirir. Natriüretik hormonun uzun süre düşük dozda infüzyonu esansiyel hipertansiyonlu hastalarda semptomatik hipotansiyon meydana getirebilir.

1.2.4.2. Vazopressin

Plazma ozmolaritesinin yükselmesine yanıt olarak arka hipofizden salgılanan vazopressin (36) yanıt olarak sodyum ve su tutulmasını uyarır.

1.2.5. Renin-angiotensin-aldosteron sistemi

Renin anjiotensin aldosteron sistemi, kan basıncının ve ekstraselüler sıvı volümünün düzenlenmesinde normotansif ve hipertansif kişilerde önemli bir mediatördür. Renin bir aspartil proteazdır, preprohormon gibi sentezlenir. İnaktif formu olan prorenin böbrekte afferent arteriollerle çevrili jukstaklomerüler hücrelerde depo edilir. Prorenin aktivite gösterebilmesi için renine dönüşmesi gerekir. Prorenin proteolitik ve non proteolitik yollarla aktive edilebilir. Proteolitik aktivasyon jukstaklomeruler hücrelerde 43 amino asidin N-terminal kısmından

ayrılmasıyla meydana gelir. Proteolitik olmayan aktivasyonun da proreninin yeni keşfedilen prorenin reseptörüne bağlanması yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir (37).

Renin ve prorenin glomerüler afferent arterioldeki basınç düşüşüne, sempatik sinir stimülasyonuna veya makula densaya geçen sodyumdaki düşüşe cevap olarak salgılanır. Prorenin dolaşımdaki baskın formdur, normal insanlardaki total renin'in %90'nını oluşturur (38). Aktif renin, anjiotensinojenin anjiotensin I'e dönüşümünü katalizler, anjiotensin I anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) veya diğer proteazlar ile anjiotensin II 'ye dönüşür. ADE damar genişletici olan bradikinini ise inaktive eder. ADE bütün organların damar yataklarında ve özellikle akciğer damar yatağında bol olarak bulunur. AT-II, böbrek üstü bezi korteksinden aldosteron salgılatan ve çevresel damar direncini artıran güçlü bir damar daraltıcıdır. Ang II bu etkilerini AT1 reseptörü aracılığıyla meydana getirmektedir. Aldosteron nefron boyunca sodyum ve su tutulumunu artırır, kan basıncının yükselmesinde etkili olur.

Artan RAAS aktivitesi, özellikle yükselen AngII ve aldosteron düzeyi, hedef organ hasarına neden olurken; kan basıncını yükselterek kardiyak, renal ve vasküler endotelium üzerindeki direkt etkiler ile kardiyovasküler risk faktörlerini arttırabilir (39). Ang II konstriksiyon, remodelling, aldesteron sentez ve salınımı, sempatik aşırımı artırması, katekolamin salınımını kolaylaştırması yollarıyla hedef organ hasarına neden olabilmektedir (6). Ayrıca ang II NADPH oksidazı artırarak oksidatif reaksiyonları stimule eder, dolayısıyla vaskülotoksiktir. İlaveten growth faktör, sitokin ve onların reseptörlerinin ekspresyonunu stimule ederek kardiyak ve vasküler düz kas hipertrofisine neden olur.

Renin anjiotensin sisteminin kronik aktivasyonu ateroskleroz patogenezi, hipertansiyon, sol ventrikül hipertrofisi, myokardial infarktüs gibi hastalıklarda önemli rol oynaması nedeniyle, bu sistemin blokajı kardiyovasküler tedavide en etkili yöntem olduğu önerilmiştir (40). ADE inhibitörleri ve anjiotensin AT1 reseptör antagonistleri RAAS'ı farklı basamaklarda bloke ederken, kan basıncını düşürmelerinin yanında koroner arter hastalığı, sol ventriküler hipertrofi, kronik böbrek hastalığı gibi hedef organ hasarlarını sınırlayıcı veya geri döndürücü etkiler gösterebilmektedirler. Bununla beraber ADE inhibitörleri (ADEi) ve Ang II reseptör blokörleri (ARB) böbrekte AT1 reseptörüyle jukstaglomerüler hücreler üzerindeki negatif feed-back etkiyi bozarak renin salınımında kompensatuar artışa neden

olabilmektedirler. Plazma renin aktivitesindeki artış ise bu ilaçların organ koruyucu etkisini sınırlayabilmektedir. Ayrıca ADE inhibitörleri ang I'in ang II'ye dönüşümünü tamamen önleyemezler, çünkü bu reaksiyonu meydana getiren başka enzimler de (kimaz, katepsin, tonin, tPA) vardır. Bu yolaklar ang II'yi kademeli olarak patolojik seviyeye tekrar getirebilmektedirler ve buna anjiotensin kaçış fenomeni denilmektedir. Bu gibi nedenler bazı hastalarda RAAS'ın yeterince baskılanamamasına neden olmakta, kan basıncında düşüşler sağlanmasına rağmen kardiyovasküler, renal hastalık risklerinde artışlar devam edebilmektedir. RAAS'ın yetersiz blokajı yeni tedavi rejimlerine (örneğin ilaç kombinasyonları) ve bu sistemi farklı basamaklarda antagonize edecek yeni ilaç arayışlarına neden olmuştur.

Ang II biyolojik aktivitelerini gerçekleştirdiği membrana bağlı olan diğer reseptörü anjiotensin II tip 2 (AT2) reseptörüdür (41). Yetişkinlerde AT1R düzeyi nisbeten sabit oranda ifade olmaktadır. Diğer taraftan, yetişkin damarları ve kalpte AT2R ekspresyonu zayıftır, fakat patolojik kardiyovasküler durumlarda upregüle olmaktadır (42). Daha önceden de vurgulandığı gibi RAAS aktivasyonu; vasküler hipertrofi, vazokonstriksiyon, su ve tuz tutumu ile gelişen hipertansiyon ile sonuçlanır. Bu etkilere dominant olarak AT1 reseptörü aracılık ederken diğer Ang II'ye bağlı etkiler; hücre ölümü, vazodilatasyon, natriürezis AT2 reseptörü aracılığıyla olur (16). Ayrıca yapılan pek çok çalışma AT2 reseptörünün AT1'e antagonistik etkisinin olduğunu göstermektedir (14). Örneğin AT2 reseptörü; AT1'e zıt olarak, büyümeyi inhibe edici, antihipertrofik ve proapoptotik özellikler taşımaktadır. AT2R agonisti olarak CGP42112A ve Novokinin bilinirken, AT2 reseptör antagonistleri; PD123319, PD123317 ve PD123310'dur. Novokinin potent hipotansif bir peptiddir (43). Spontan hipertansif ratlarda yapılan çalışmada oral yoldan uygulandığında sistolik kan basıncını anlamlı şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Hipotansif etkisi PD123319 tarafından inhibe edilmiştir (44). AT2 reseptör defisiti olan farelerde novokinin hipotansif etki gösterememiştir. Ayrıca novokinin'in hipotansif etkisi siklooksijenaz inhibitörü indometazin verilmesiyle bozulmuştur (41).

Anjiotensin tip 2 reseptörünün vazodilatasyon yapıcı etkisini NO ve bradikinin aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir (15). Yapılan bir çalışmada AT2

reseptör aracılı vazodilatasyon bradikinin antagonisti ikatibant verilmesiyle baskılanmıştır (14).

Başka bir çalışmaya göre Ang II, AT2 reseptörü aracılığıyla NO, cGMP gibi ürünlerin oluşumunu stimüle ederken; cGMP protein kinazı aktive ederek vazokonstriksiyonda görev alan Rho'yu fosforiller ve inaktive eder (45-46). Bu ise AT2 reseptör aracılı vazodilatasyonla ilişkilidir. AT1 reseptör antagonisti uygulamasıyla AT2 reseptörü upregule olur ve bu etki belirginleşir. Ang II nin indüklediği AT1 reseptör aracılı vazokonstriksiyon, Rho kinaz inhibitörü fasudil tarafından bloke edilmiştir (47).

Anjiotensin II infüzyonu ile hipertansif sıçanlarda artmış olan vasküler cGMP konsantrasyonunun losartan uygulamasıyla daha da arttığı, ayrıca AT2 reseptör uyarımı NO artışına yol açarak AT1 reseptör antagonistlerinin fizyolojik ve terapötik etkilerine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (47). Ayrıca AT1 antagonistlerinin refleks olarak Ang II'yi arttırmaları AT2 stimulasyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle AT2'nin sardanların efikasitesine katkıda bulunabileceği düşünülebilir (47). Hipertansif sıçanlara AT2 reseptör agonisti olan CGP-42112 uygulaması ortalama arteriyel basınçta azalma yaparken, selektif AT2 reseptör antagonisti PD123319 bu etkiyi kaldırmıştır.

AT2 reseptör ekspresyonunun daha fazla olduğu genç ratlarda yapılan bir çalışmada, AT2 reseptörü böbrekte nNOS ekspresyonunu uyararak NO ve cGMP aracılığıyla renal renin biyosentezini baskıladığı belirlenmiştir (48). Ayrıca AT2 reseptörünün NO, PGE düzeyini artırarak böbrek perfüzyonunu artırması ve dolayısıyla renin anjiotensin sistemi gibi kardiyovasküler hastalıkların fizyopatolojisinde önemli rolü olan sistemi baskılaması, bu reseptörü önemli bir terapötik hedef haline getirmiştir. İlâveten renin'in dokularda kendi reseptörü olduğu ve bu reseptörü aracılığıyla hedef organ hasarlarına neden olabilmesi, AT2 reseptörünün renin üzerindeki negatif etkisinin önemini bir kat daha artırmıştır.

Yapılan çalışmalarda AT2 reseptörünün böbrekte oksidatif stresi azaltabileceği bildirilmesine karşın (49), aortta oksidatif stresi nasıl etkilediği yeterince açık değildir.

1.2.6. Stres ve aşırı sempatik aktivite

Sempatik sinir sistemi aktivitesinde artış, kan basıncını belirgin seviyede yükseltebilir, ayrıca birçok yüksek kan basıncılı kişide tespit edilen artmış kalp hızından da sorumlu olabilir.

1.2.7. Endotel disfonksiyonu

Endotel damar tonusu, kan basıncı, kan akımı ve pıhtılaşma sistemi üzerinde etkili olan, vücuttaki en büyük endokrin organdır. Endotelden salınan nitrik oksit vasküler devamlılığı sağlamaktadır. Endotel fonksiyon bozukluğunda, salınan vazodilatör ile vazokonstriktör faktörler arasındaki denge değişmiştir. Esansiyel hipertansiyonda endotele bağlı vazodilatasyon cevabının bozulması ve vazokonstriktörlere olan hassasiyetin artması periferik damar direncini arttırabilmektedir. Endotel disfonksiyonun gelişiminde önemli etkenlerden biri olan oksidatif stresle ilişkili, artan veya azalan birçok parametre vardır.

1.2.7.1. Nitrik Oksit

Endotel salgıladığı değişik özellikteki parakrin maddelerle vasküler işlevlerin kontrolünde büyük öneme sahiptir. Endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) bilinen en güçlü endojen vazodilatördür ve dolaşım dengesinin düzenlenmesinde önemli bir mediatördür. NO'nın azalması veya eksikliği hipertansiyon gelişimine neden olan etkenlerden biridir (50). NOS inhibitörlerinin uygulanması sistemik vasküler dirençte artışa sebep olduğu için kan basıncının artışına yol açmaktadır. Bu sonuçlar damar direncinin kontrolünde NO'nun hemostatik rolünün önemini göstermektedir (51).

Nitrik oksit sentaz enzimi L-argininden nitrik oksit üretimini indükler. NOS enziminin NOS1 (nNOS), NOS2 (iNOS) ve NOS3 olmak üzere 3 izoenzimi bulunmaktadır (52, 53). Lokal etki gösteren ve biyolojik haberci rolü olan NO'nun kimyasal yapısı meydana getirdiği işlevleri kolaylaştıracak şekildedir. Suda ve yağda çözünbilme özelliği biyolojik membranlardan kolayca diffüze olmasını ve hücre içindeki hedef moleküllere ulaşmasına neden olmaktadır.

Nitrik oksit sentaz izoformlarından olan nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) spinal kordun bazı bölümlerinde, periferik nöronlar, trakea, bronşlar, akciğer, uterus ve midenin epitel hücreleri, pankreas adacık hücreleri ve iskelet kası hücrelerinde gösterilmiştir (54). nNOS kalsiyum/kalmodulin bağımlı bir enzimdir ve aktivitesi

hücre içi kalsiyum düzeyindeki farklılıklarla ayarlanır. Ayrıca nNOS tarafından üretilen NO'nun kan basıncının düzenlenmesinde görevleri olduğu bildirilmiştir. NOS'un diğer bir izoformu olan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) makrofajlarda, dalağın kırmızı pulpasındaki bazı lenfosit, nötrofil ve eozinofillerde, karaciğerdeki endotelial hücrelerde ve hepatositlerde, akciğerdeki alveolar makrofajlarda, böbreküstü bezindeki makrofajlarda ve endotelial hücrelerde, kalın barsaktaki histiositlerde, eosinofillerde, mast hücrelerinde ve endotelial hücrelerde saptanmıştır. iNOS hücrelerde sitokinler (interlökin-1, interferon- γ , endotoksin ve tümör nekrozis faktör alfa) ve bakterial lipopolisakkaritler aracılığıyla uyarılabilir. iNOS'un immun cevap sırasında uyarılan bir enzim olduğu bilinmekle birlikte, kalıcı ekspresyonu da mevcuttur. Diğer bir izoformu olan eNOS ilk olarak endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan immunohistokimyasal çalışmalar birçok dokuda arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir.

Ayrıca böbrek tübüler epitel hücrelerinde, insan plasentasının sinsitiotrofoblastlarında, birçok beyin bölgelerinde de saptanmıştır. Hücrede membrana bağlı olarak bulunan eNOS aktivitesi kalsiyum iyonu, asetilkolin, bradikinin, adenosin trifosfat (ATP) ve sıvı akımındaki artışla uyarılabilir. eNOS enziminin ekspresyonu; dolaşımın düzenlenmesinde, polimorf çekirdekli lökositlerin ve trombositlerin damar lümeniyle olan etkileşiminde önemli role sahiptir (55).

Nitrik oksit etkilerini soluble guanilat siklaz (sGC) enzimini aktive ederek meydana getirir (56). sGC enzimi α ve β subunitlerinden oluşan heterodimerik bir yapıdadır (57). NO sGC enziminin β subunitinin amino terminal kısmındaki protoporfirin-IX'a bağlanmaktadır. NO çok düşük konsantrasyonlarda da bu enzimi uyarabilmektedir. NO ferröz demir taşıyan heme bağlandığında, enzimde yapısal bir değişiklik olmakta α ve β subunitlerinin katalitik bölgeleri aktive olmaktadır (58). Aktive olan sGC hücre içi ikincil haberci olan cGMP artışını uyarmaktadır. cGMP artışı, hücre içi kalsiyum miktarında azalmaya neden olan farklı mekanizmalarla düz kas hücrelerinde gevşeme oluşturmaktadır. Bu azalma, aktinomyozin ATPaze etkinliğinin düzenlenmesinde görevli miyozin hafif zincir kinazını (Myosin light chain kinase-MLCK) fosforile eden bir enzim olan cGMP bağımlı protein kinazın katıldığı reaksiyon sonucu meydana gelmektedir (59). Damarlarda cGMP aracılığı ile

oluşturulan gevşemeyi açıklayan birçok katılımcı mekanizma öne sürülmüştür (60). Bu mekanizmalar;

1- Siklik guanilat monofosfat (cGMP) ve cGMP bağımlı protein kinazın agonistlerle uyarılmış fosfolipaz C oluşumunu inhibe ederek inositol trifosfat oluşumunun engellenmesi,

2- Kalsiyumun hücre dışına atılımının uyarılması (Ca^{+2} ATPaz düzenleyici proteinin, cGMP bağımlı protein kinazla fosforilasyonu sonucunda sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz'ının etkinleştirilmesiyle),

3- Miyozinin aktif olmayan formunu stabilizasyonunu sağlayan miyozin hafif zincirinin defosforilasyonunun arttırılması,

4- Reseptörle düzenlenen Ca^{+2} kanallarının inhibe edilmesi,

5- Hücre zarı Ca^{+2} -ATPase' nın indüklenmesi,

6- Potasyum kanalları aracılığıyla K^{+} geçirgenliğinde artış. Bu etki cGMP bağımlı protein kinazın cGMP aracılığıyla aktive edilmesi sonucu oluşturulur. K^{+} kanalları damar düz kas hücrelerinin membran potansiyelini kontrol ederek damar gerginliğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu kanalların açılması membranı hiperpolarize ederek voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalların kapanmasına ve damar genişlemesine neden olmaktadır.

Ayrıca cGMP protein kinaz G'yi aktive etmek suretiyle vasküler düz kaslarda proliferasyonu inhibe ederken apoptozisi uyarır. Diğer taraftan vasküler endotel hücrelerde ise cGMP-protein kinaz G sinyali yolu proliferasyonu, permeabilite ve apoptozisi artırıcı etkide bulunur (15). Kardiak myositlerde ise bu sinyal yolu hipertrofiyi ve kontraktiliteyi azaltıcı etkide bulunur.

İzole arterlerde, arteriyollerde, venlerde, venüllerde, lenf damarlarında ve kılcal damarlarda endotel bağımlı vazorelaksasyon olmakta ve L-NAME verilerek NOS inhibisyonu yapıldığında ise izole arterlerde kasılma gerçekleşmektedir. Bu sonuca göre endotelyumdan devamlı bir NO salınımı meydana geldiği ve bu sayede normal damar gerginliğinin oluşturulduğu bildirilmiştir (61).

Nitrik oksit, endotel hücre yüzeyinden salınan ve platelet agregasyonunu engelleyen önemli bir mediatördür. Nitrik oksit, trombus oluşumunun düzenlenmesi ve kan akışkanlığının kontrolünde etkili rol üstlenmektedir (62). İn vitro uygulanan nitrik oksit, trombositin zengin plazmada ve tam kanda çeşitli pıhtılaşma

faktörlerinin uyardığı agregasyonu önlemiştir. Nitrik oksit, trombosit agregasyonlarının dağılmalarını sağlamakta, nötrofillerin ve monositlerin adezyonlarını önlemekte ve kemotaksislerini kontrol ederek aterosklerotik süreçlerin gelişimini de baskılayabilmektedir (63).

Oksidatif stres NO inaktivitesine neden olduğundan dolayı kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür (64). Diabetes mellitus, hipertansiyon, sigara, dislipidemi ve obezite gibi kardiyovasküler risk faktörlerinin hepsinde oksidatif stres artmıştır. NO ve süperoksit anyonları arasındaki reaksiyon yüksek derecede reaktif peroksinitrit (ONOO^-) oluşumuna neden olmaktadır (65). NO'nun varlığının kaybı artan endotelin ve Ang II düzeyi ile de ilişkilidir. Bütün bu faktörler vazodilatasyondaki düşüşe, platelet ve lökosit adezyonundaki artışla endotelial hasara, vasküler düz kas hücrelerindeki migrasyon ve proliferasyona, intima içine lipid depozisyonuna katkıda bulunur (66-67). Dolayısıyla ARB'ler ve ADEi'ler gibi RAAS'ı bloke eden ilaçlar oksidatif stresi azaltmakta, NO varlığını artırmakta, inflamatuvar reaksiyonları azaltarak endotel aktivitesini ve vasküler fonksiyonları düzeltebilmektedirler (68).

1.2.7.2. Endotelial Nitrik Oksit sentaz

Kan damarlarında eNOS, baskın NOS izoformudur. Damarlarda NO üretiminden en fazla sorumlu enzimdir. NO sentezi damarlarda başlıca “shear stres” ile uyarılmaktadır. Bu fenomen kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endotel yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki (sürtünme) olarak tanımlanmaktadır. Endotel hücreleri bu mekanik etki ile şekil değişikliğine zorlanırken hücre iskeleti aracılığı ile hücre içine sinyaller gönderir. Bunun sonucunda Protein Kinaz B aktive edilerek eNOS'u fosforile eder (69). Serin 1177'den fosforilasyonu bu enzimin aktivasyonuna neden olur. Sonuçta, endotel hücresinden sürekli NO üretilip salıverilir. Damar endotelinden NO üretimine yol açan en önemli fizyolojik uyarı bu fenomendir (shear stress). Bu şekilde NO üretimi için kalsiyuma gerek yoktur, eNOS'un fosforile edilerek aktive edilmesi yeterlidir. Diğer taraftan hücre içi kalsiyum düzeylerini artıran bazı mediatörlerde (asetilkolin, histamin, bradikinin, trombin, serotonin, noradrenalin) vasküler endoteliumda kalsiyuma bağımlı bir enzim olan eNOS'u uyarabilmektedirler.

Endotelyal nitrik oksit sentaz, NO sentezinde substrat olarak L-arginin, ko-substrat olarak NADPH, koenzim olarak da FAD, FMN, tetrahidrobiopterin ve Hem molekülünü kullanmaktadır. Bu ko-faktörler elektron taşınmasında redoks grubu olarak işlev görmektedirler. Sonuçta oksijen molekülünden bir oksijen atomu arjininin terminal guanidin nitrojen grubuna aktarılır ve meydana gelen bileşikten L-sitrülin ve NO oluşmaktadır (70).

Endotelyal nitrik oksit sentaz, 2 globuler protein zincirinden meydana gelmektedir (redüktaz ve oksijenaz segmentleri). Bu iki segment esnek protein yapı ile birbirine bağlanmıştır. Redüktaz segmenti, NO sentezi için NADPH'a bağlanarak dehidrojenasyonu katalize etmek için gerekli olan elektronları üretir. Elektronlar esnek protein yapıdan oksijenaz segmentine transfer edilir. Bu elektron transferi kalmodulinin, esnek protein parçasındaki spesifik bağlanma bölgesine kalsiyum aracılığıyla bağlanmasıyla aktive edilir. Oksijenaz segmenti, NO üretimi için gerekli olan katalitik merkezden oluşur ve hem'i, L-arjinini, tetrahidrobiopterini (BH4) bağlar. eNOS baskın olarak caveola denilen plazma membranındaki invajinasyonlarda yer almaktadır. Caveolae'nın major dış proteini olan Caveolin-1, eNOS ile birleşerek eNOS'un inhibisyonuna neden olmaktadır. Caveolin kalmodulin ile etkileşerek NADPH'dan hem molekülüne oksijenaz segmentinde elektron transferini inhibe etmektedir. Bununla beraber selüler düzeyde kalsiyumun artışıyla caveolin-eNOS kompleksi ayrılarak eNOS aktive olmaktadır. Daha sonra eNOS caveolae'den sitoplazmaya transloke olmaktadır. Enzimatik aktivitesi upregule olmakta ve oksijenaz segmentine elektron transportu başlayarak NO üretimi gerçekleşmektedir. İlaveten caveola'da sitrülinden substrat L-arginin geri dönüşümü gerçekleştiğinden, burası eNOS için bir havuz görevindedir (71-72). Ayrıca eNOS aktivitesi hücreye kalsiyum girişi ve çeşitli aminoasit rezidülerinin fosforilasyonu gibi posttranslasyonel modifikasyonlardan etkilenmektedir (73). Kalsiyumun aktive ettiği kalmodulin eNOS'un temel allosterik aktivatörüdür. eNOS fonksiyon ve aktivitelerinin düzenlenmesinde fosforilasyonu önemli bir anahtardır. Kalmodulin, caveolin ve eNOS amino asit rezidülerini içeren fosforilasyon söz konusudur. eNOS'un serin 1177'de fosforilasyonu aktivasyonunda ve kalsiyuma duyarlılığının artışında önemli bir etkindir (74). Adenin monofosfat kinaz tarafından ser1177'nin direkt fosforilasyonu ile eNOS aktivitesindeki artışa ısı şok proteini 90 da aracılık

etmektedir (75). Ayrıca düşük kalsiyum düzeyinde kalsiyumdan bağımsız olarak protein kinaz B aracılı fosforilasyon gerçekleşebilmektedir.

Nitrik oksit direkt guanilat siklazı stimule ederek düz kaslarda cGMP düzeyini artırır ve vazodilatasyonu sağlar. NO'nin platelet agregasyonunu, damara lökosit adezyonunu, proliferasyonu ve aterosklerotik plak oluşumunu önleyici etkileri vardır. Aterogenezin ileri aşması olan fibroz plak oluşumunu önleyebilmektedir. Ayrıca NO'nin vasküler onarımda endotelial hücre yenilenmesinde önemli rolü vardır (76). Bütün bu önemli görevlerden dolayı eNOS enziminin fonksiyon kaybı önemli patofizyolojik sonuçlara neden olmaktadır. Farmakolojik yaklaşımlar eNOS'u korumaya veya fonksiyonlarını onarmaya yöneliktir.

Anjiotensin II AT1 reseptörü aracılığıyla NADPH oksidaz enzimini aktive etmekte ve bunun sonucunda artan süperoksit radikalleri ise protein kinaz C'yi indüklemektedir. Protein kinaz C ise eNOS'u treonin 495'te fosforilleyerek inaktive edebilmektedir (77). Bu nedenle renin anjiotensin sistemini bloke eden ilaçlar eNOS ekspresyonunu ve NO biyomevcudiyetini artırabileceklerdir.

1.2.7.3. ADMA (Asimetrik dimetilarginin)

Asimetrik dimetilarginin (ADMA) plazmada, idrarda ve dokularda bulunan, arginine türevi bir aminoasittir. Proteinlerdeki arginin kalıntılarının metillenmesiyle oluşabilmektedir. ADMA endojen ve kompetitif NOS inhibitörüdür (22, 26, 78).

Asimetrik dimetilarginin, metilargininler grubunda yer almaktadır. Metilargininler üç şekilde bulunurlar;

- Asimetrik dimetilarginin (ADMA)
- Simetrik dimetilarginin (SDMA)
- Monometilarginin (L-NMMA)

Bunlardan sadece ikisi NOS inhibitörüdür;

- 1- NG, NG-dimetil-L-arginin (Asimetrik dimetil-arginin, ADMA)
- 2- NG-monometil-L-arginin (L-NMMA).

İnsanlarda plazma ADMA düzeyi, L-NMMA düzeyinden 10 kat fazladır. ADMA, NO biyosentezinin önemli bir inhibitörüdür (79). ADMA, sıklıkla nukleusta bulunan, metillenmiş arginin rezidüleri içeren polipeptidlerin katabolizmasına sonucu oluşmaktadır. ADMA sentezi için arginin rezidülerini metilleyen, protein arginin

metiltransferaz (PRMT) enzim ailesi gerekmektedir. PRMT enzim grubu spesifik katalitik aktivitelere göre iki sınıfa (birinci tip izoformlar PRMT1,3,4,6,8; ikinci tip izoformlar PRMT5,7 ve FBX011) ayrılmıştır (80). Metil grubu vericisi olarak S-adenozil metiyonin (SAM) kullanılır (81). PRMT birinci tip izoformlar kalpte, düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde eksprese olur. Damar duvarında ADMA oluşum hızı, PRMT ekspresyonundaki değişiklikler ile düzenlenmektedir. PRMT'nin ikinci tip izoformlar ise SDMA'nın oluşumunda görevlidir. SDMA, ADMA'nın stereoizomeridir ve NO sentezi üzerine direkt inhibitör etkisi yoktur.

Metil argininler (ADMA, SDMA ve L-NMMA), katyonik aminoasit taşıyıcısı olarak tanımlanmış y^+ transport sistemi ile hücre içine taşınmaktadırlar (82). y^+ taşıyıcı aktivitesi, metilargininlerin lokal konsantrasyonlarını belirlemede önemli olduğu düşünülmektedir. Metilargininler, hücre içine transport için birbirleriyle ve arginin ile yarışır (82). Artan ADMA düzeyleri, hücre içi L-arginin transportunu potansiyel olarak engelleyebilmektedir (82). L-arginin transportunda azalma sonucunda NO sentezinde de azalma gerçekleşmektedir. Endotel hücrelerindeki y^+ taşıyıcı sistemi yoğunluğu, dolaşımdaki ADMA düzeyi artışını dengelemek için artabilmektedir (82). y^+ taşıyıcı sisteminde herhangi bir defekt, dolaşımdaki ADMA düzeylerinde artışa, bu artış ise NO sentezinde azalmaya neden olabilmektedir. Çeşitli hastalıkların patogeneğinde y^+ taşıyıcı sistemi önemli yer tutabileceği ve ilerisi için bir farmakolojik yaklaşım olabileceği düşünülebilir (83).

Asimetrik dimetilargininin katabolizmasında üç önemli yol bulunmaktadır: Birinci yol; ADMA'nın dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrülün ve dimetilaminlere ayrılmasıdır. (>%90) (84). İkincisi; ADMA'nın değişmeden böbreklerden atılmasıdır (~%5). Üçüncüsü ise; dimetilarginin pirüvat aminotransferaz enzimi tarafından a-ketoasidlere çevrilmesidir (<% 5) (85). ADMA yıkılımının düzenlenmesinde DDAH önemli rol oynar. DDAH, böbrek, karaciğer, pankreas ve kan damarlarında eksprese olmaktadır. İki izoformu vardır: DDAH-I, tipik olarak nöronal NOS'un eksprese olduğu dokularda bulunmaktadır. DDAH-II ise eNOS'u içeren dokularda fazla bulunmaktadır. Vücutta sürekli bir ADMA üretimi vardır. DDAH, ADMA için spesifiktir, SDMA'yı etkilememektedir. Birçok hastalıkta azalan DDAH aktivitesi, dolaşımdaki ADMA düzeylerinin artışına neden olmaktadır (86). Hiperglisemi ve hiperkolesterolemi gibi durumlar DDAH

aktivitesinde azalmaya sebep olarak ADMA birikimi sonucunu doğurmaktadır (87). Okside-LDL veya tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) tarafından uyarılan oksidatif stres, DDAH aktivitesini azaltmaktadır. Homosistein, redoks aracılı mekanizma ile DDAH aktivitesini azaltmakta, bu durum ise ADMA düzeylerinin yükselmesiyle sonuçlanmaktadır (88). NO'nun aşırı üretimi (indüklenebilir NOS artışına bağlı olabilir), DDAH'nın aktif merkezine bağlanarak DDAH'nın inaktivasyonuna sebebiyet verdiği belirlenmiştir. All-trans-retinoik asidin ise, DDAH-II ekspresyonunu yükselterek ADMA düzeyini azalttığı böylece endotel hücrelerinde NO sentezini gösterilmiştir (87). Böylece ADMA'yı azaltmak yoluyla endotel hücrelerinde NO sentezini arttırdığı gözlenmiştir. Östrojen veya östrojen-progesteron tedavisi DDAH aktivitesini arttırarak plazma ADMA düzeylerini düşürebilmektedir, dolayısıyla endotel üzerinde koruyucu etkiler oluşturabilmektedir (89).

Asimetrik dimetil arginin hücrelerin içinde oluşmaktadır. Metabolizmasında görevli olan PRMT ve DDAH enzimlerinin her ikisi de endotel hücrelerinde eksprese olabilmektedir. Vasküler dokularda DDAH inhibisyonu, ADMA düzeylerinin yükselmesine sebep olarak endotelyal disfonksiyon gelişimini uyarabilmektedir (83). Endotel hücrelerinden ADMA'nın dolaşıma verilmesi; argininin PRMT tarafından metillenme hızı, DDAH tarafından ADMA'nın metabolize edilme hızı ve hücrelerden aktif çıkış hızı arasındaki dengeyle ilişkilidir (90). Bir hücrede oluşturulan ADMA'nın ikinci bir hücreye difüze olarak NOS'u inhibe edebilme yeteneğinde belirlenmiş ve bu durum endotel hücrelerinde ayrıca makrofajlarda da gösterilmiştir (91). ADMA NOS'un 3 izoformunu da inhibe edebilmektedir. ADMA, NO oluşumunu engellemesi yanında süperoksit anyonlarının oluşumuna da yol açar.

Sağlıklı kişilerde plazma ADMA düzeyleri 0.2-1.2 mmol/L arasındadır (93). Patolojik durumlarda ADMA düzeylerinde artış gözlemlenebilmektedir. Yüksek plazma ADMA düzeyleri, kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere diğer pekçok hastalıkta belirlenmiştir. PRMT-I enzim aktivitesinin artışı ve DDAH disfonksiyonu dolaşımdaki ADMA düzeylerinde artışa neden olur (92). Her gün yaklaşık 60 mmol ADMA idrarla atılabilmektedir (93). ADMA'nın idrarla atılımının tamamen bozulması, plazma ADMA düzeylerinde artış sebepleri arasında yer alabilmektedir.

Plazma ADMA düzeylerinin yüksek olarak gösterildiği bazı klinik durumlar: hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi, hiperhomosisteinemi, endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, insülin direnci, Tip 2 diyabetes mellitus, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, koroner arter hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, trombotik mikroanjiyopati, periferik arter hastalıkları, preeklampsi, kronik böbrek yetmezliği, erektil disfonksiyon, şizofreni, inme, yaşlanma, alzheimer hastalığı (86, 89, 94).

İnsanlarda plazma ADMA düzeyleri, ani olarak değişebilir. Bu durum endotelial vazodilatör fonksiyondaki değişiklikler ile ilişkilidir. ADMA günümüzde endotel disfonksiyonuna yol açabilen bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (89).

Asimetrik dimetilarginin, NOS inhibisyonu aracılığıyla NO düzeyini özellikle endotelde azaltarak vazodilatasyonu bozmakta ve kan basıncının yükselmesine yol açmaktadır (95). NOS inhibisyonu böbrekleri de etkileyerek sodyum ekskresyonunun azalmasına sebep olur. Vücutta sodyum tutulumunun artışı, hipertansiyon oluşumuna kolaylaştıran etkenler arasındadır (96). ADMA'ya uzun süre maruz kalma, aterogenezi arttırmakta ve hipertansiyon gelişimine neden olarak organ hasarlarına yol açabilmektedir. ADMA tarafından uzun süre NOS inhibisyonu, sol ventrikül hipertrofisi gelişiminde etkili olabilmektedir. ADMA, kalp hızını ve kardiyak output düşürücü etkileri de belirlenmiştir (97). ADMA'nın intraarteriyel infüzyonu lokal vazokonstriksiyona sebebiyet verirken, sistemik infüzyonu ise vasküler direnci artırır ve böbrek işlevlerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (83). Deneysel ve klinik birçok çalışmada ADMA düzeylerindeki küçük değişikliklerin dahi damarlardaki NO üretiminde, damarsal tonusta ve sistemik vasküler dirençte anlamlı değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (86).

Çeşitli deneysel hayvan modellerinde yüksek ADMA düzeyi, artmış oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu arasında anlamlı ilişkiler rapor edilmiştir. ADMA'nın vasküler süperoksid düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (98). Oksidatif stres, ADMA yıkımında görevli enzim olan DDAH'nın aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (84). Okside LDL, hiperhomosisteinemi, inflamatuvar sitokinler, hiperglisemi, hipertansiyon süperoksid anyon oluşumuna neden olarak endotelial oksidatif stresin artmasına yol açar (14). DDAH enziminin aktif merkezindeki reaktif sistein rezidülerinin varlığı, bu enzimi süperoksid gibi reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyona veya S-nitrozilasyona sebebiyet vererek bu enzimin aktivitesini azaltır.

Hipertansiyonda plazma ADMA seviyeleri artmıştır (99-101). Esansiyel hipertansiyonda, endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulması katılımcı mekanizmalar arasındadır. ADMA, eNOS'u inhibe ederek NO sentezini azalttığı için hipertansiyonun patofizyolojisinde yer almakta ve farmakolojik bir hedef haline gelmektedir (95). DDAH aktivitesinin lokal inhibisyonu, ADMA birikimine ve sonuçta endotel bağımlı vazorelaksasyonun azalmasına sebep olmaktadır (102). ADMA, endotelde bulunan lokal renin-anjiyotensin-aldesteron sistemini aktive edebilmektedir. Anjiyotensin II ise AT1 reseptörü aracılığıyla NADPH oksidazı indüklemekte ve oksidatif stresi artırabilmektedir (112). Artan oksidatif stres ise NO inaktivasyonuna neden olarak endotel disfonksiyonu tetikleyen diğer bir etken olmaktadır. Hipertansiyon hastalarının ADE inhibitörleri veya anjiyotensin reseptör antagonistleri ile tedavisi sonucu, ADMA düzeylerinin azaldığı görülmüştür (98).

1.2.7.4. NADPH oksidaz

Birçok kardiyovasküler hastalığın patofizyolojisiyle ilişkili olan reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) major kaynağı NADPH oksidaz enzim ailesidir (NOXs) (20). Ayrıca bu enzimlerin hücrenin büyüme, diferansiyasyon, migrasyon ve proliferasyon gibi fonksiyonlarıyla ilişkili redoks duyarlı sinyal yolunun modülasyonunda önemli oldukları belirlenmiştir. Redoks sinyali ve oksidatif stres ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler durumlarda önemlidir. NADPH oksidaz enzim ailesinin 7 üyesi bulunmaktadır. Bunlar Nox 1, Nox 2, Nox 3, Nox 4, Nox 5, Duox1 ve Duox 2 (103-104). Bütün bu enzimler NADPH'yı bir elektron donörü gibi kullanarak elektronların moleküler oksijene transferini katalizleyerek superoksit ve hidrojen peroksit oluşumunu gerçekleştirirler. Ayrıca NADPH oksidaz enziminin membrana bağlı gp91phox ve p22phox gibi subunitlerinin yanında, sitozolde yeralan p47phox, p67phox, p40phox ve Rac gibi subunitleride bulunmaktadır. Herhangi bir agonist stimülasyonu ile sitozolik subunitlerin membrana transloke olmaları sonucunda enzim aktivitesinde artış sağlanır (105). Herbir NADPH oksidaz enzim homoloğu intraselüler ROS'u artırmakla birlikte aktivasyonu, lokalizasyonu ve subunit yapısı arasında ciddi farklar vardır. Nox 1 vasküler hücreler (endotel, düz kas, adventisyel fibroblast) ve kolonda bulunur. Nox 2 fagositozda görev almasının yanında renal, kardiyak, vasküler ve nöral hücrelerde eksprese olmaktadır. Nox 3 fetal dokularda bulunmasının yanısıra yetişkin

iç kulakta da bulunmaktadır. Nox 4 böbrekte, vasküler hücrelerde ve osteoklastlarda bulunmaktadır. Nox 5 testis, lenfoid doku ve vasküler hücrelerde ifade olmaktadır. Duox 1 ve Duox 2 tiroid dokusunda hormon biyosentezinde görevlidir. Nox1, 2 ve 4 aktivasyonlarında esansiyel olan p22phox subunitine bağlıdır. Spesifik agonist (anjiotensin II, büyüme faktörleri, sitokinler) tarafından hücre stimülasyonundan sonra Nox1 ve Nox 2 regüler subunitlerle ilişkili olarak aktive olmaktadır. Nox 2'in sitozolik regüler subunitleri p47phox, p67phox, p40phox ve Rac1 iken, Nox 1 p47phox ve p67phox'un analogları olan Noxo1 ve NoxA1'e bağlanır. Nox 4 aktivasyonu regülatör subunitlerle ilişkili değildir. Nox 5 aktivasyonu ise kalsiyum tarafından düzenlenir.

Damarın bütün tabakalarında NADPH oksidaz enzim ailesi ifade olduğundan kan basıncı regülasyonunu da etkilerler (106-107). Damar duvarında ROS vasküler direnci ya direkt vasküler tonus modülasyonu ya da vasküler remodelingi değiştirerek etkilemektedir (108). Vasküler süperoksit üretimi NO inaktivasyonuna ve peroksinitrit oluşumuna neden olarak vazokonstriktör etkiye sebebiyet vermektedir. NADPH oksidaz etkisiyle redoks duyarlı sinyal yolunun aktivasyonu vasküler remodelingde ve kronik hipertansiyonda önemlidir. Yapılan son çalışmalarda Nox 2 aktivasyonunun Ang II indüklü hipertansiyonunun vasküler duvara olan inflamatuvar etkisinde önemi vardır.

Anjiotensin II indüklü hipertansiyon modelinde ROS üretiminde artış belirlenmiştir. Bu artış ise damar duvarındaki bütün hücrelerde ekspresyonu ve aktivitesi artan NADPH oksidaz enzimiyle ilişkilendirilmiştir (109-110). Ayrıca hipertansif hastalardaki endotelial disfonksiyon artmış NADPH oksidaz bağımlı ROS üretimine dayandırılabilir (111).

1.2.7.5. Rho Kinaz

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, GTP'ye bağlı küçük proteinlerin (G proteinleri) hücre içi sinyal yollarında önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Küçük G proteinleri hücre farklılaşması, bölünmesi, hücre iskeletinin kontrolü gibi çeşitli hücresel işlevlerde görev yapmaktadır.

G proteinleri Rho, Ras, Rab, Sar1/Arf ve Ran ailelerinden oluşur. Rho ailesinin memelilerde en az 10 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar arasında Rho izoformlarından Rho A, Rho B, Rho C, Rho D, Rho E ve Rho G; Rac

izoformlarından Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42 ve TC10 bulunur. Rho izoformları arasında vücutta birçok hücrede varlığı belirlenen ve üzerinde en fazla araştırma yapılan Rho A proteindir (112-113). Rho A, Rho B ve Rho C proteinlerinin efektör bölgelerinin amino asit dizimleri aynıdır ve hücre fonksiyonlarında benzer olduğu gösterilmiştir (112). Rho proteinleri, hücre iskeleti kontrolü, stres liflerinin yapılması, fibroblastların yapışması ve düz kas kasılmasında kalsiyuma duyarlılığın artması gibi işlevlerde rol üstlendiği bildirilmiştir (114). Bunlardan başka hücre yapışması, hareketliliği, sitokinez ve genetik bilginin genden proteine aktarılması gibi birçok hücre fonksiyonunda da etkili oldukları gösterilmiştir (115). Rho B'nin hücre büyümesini engellediği ve apoptozu uyardığı belirlenmiştir. Çeşitli kanser hücrelerinde varlığı belirlenen Rho C'nin ise bu hücrelerin yayılmasında etkisi olduğu bildirilmiştir (116). Rac ve Cdc42 gibi diğer formlarda aktin polimerizasyonunu düzenlenmesinde görev almaktadırlar (117).

Küçük G proteinleri GDP-bağlı etkisiz ve GTP-bağlı etkin olmak üzere birbirine dönüşebilen iki farklı şekilde bulunmaktadır (118). Rho aktivitesinin GTPaz etkinleştirici protein (GTPase activating protein; GAP) ve GTPaz ayrışma inhibitörü olmak üzere iki negatif ve guanin nükleotit değiştirici faktör (Guanin nükleotid exchange factor; GEF) olmak üzere bir pozitif düzenleyicisi bulunmaktadır. Dinlenme durumundaki hücrelerde Rho-GDP ayrışma inhibitörü (Rho-GDI), GDP-Rho'ya bağlanarak onu hücre zarından alarak sitozole getirmektedir. Hücreler bazı agonistler aracılığıyla uyarıldıklarında Rho'ya özgül GEF'ler GDP ayrışmasını ve bunun ardından GTP bağlanmasını başlatarak Rho'nun etkinliğini artırmaktadırlar. Bunun ardından GTP-Rho hücre zarına yönelerek özgül hedefleri ile etkileşmektedir (119). GAP'ler Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini hızlandırarak ve onu etkisiz GDP-Rho'ya çevirerek negatif düzenleyiciler gibi davranmaktadırlar.

Rho kinazlar (ROCK'ler) Rho'nun ilk efektörleri yani uyarıya cevap veren hedef molekülleri olarak keşfedilmiştir. Rho kinazların ROCK I ve ROCK II olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. ROCK serin-treonin kinaz etkinlikli protein olarak tanımlanmıştır. Rho kinaz üzerinde Rho'nun bağlandığı bölge enzimin kıvrılmış kıvrım bölgesinin C- terminalinde lokalize olmuştur. GTP bağlı Rho'nun bu bölgeye bağlanması ile de Rho kinazın etkinliği artmaktadır (120). Rho kinazın her iki

izoformu, kinaz bölgesinde %92, tüm amino asit diziliminde %65 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (121).

Rho kinaz II beyin ve kas dokusunda daha çok eksprese olurken, ROCK I böbrek, karaciğer ve testislerde belirgin düzeyde eksprese olabildiği belirlenmiştir. ROCK I ve ROCK II'nin herikisi de damar düz kasında ve kalpte eksprese olabilmektedirler. ROCK I ve ROCK II hücrede sitoplazmada bulunurken, Rho ile aktive edilmeleri sonucunda membrana doğru hareketlenerek hücre membranına bağlanmaktadır. ROCK II hücre hareketi sırasında, stress filament ve vimentin aracılıklı filament ağının oluşumu esnasında kesilme girintilerinde bulunurken, ROCK I'in ise sentrozomlarla birlikte bulundukları gösterilmiştir (122).

Rho kinaz, düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti oluşumu, hücre yapışması ve hareketliliği, çoğalması, sitokinez ve genetik bilginin genden proteine aktarılması gibi kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde etkili olan birçok hücresel fonksiyona aracılık etmektedir (119). ROCK'un damar düz kas hücrelerinin kasılmasında önemli rol aldığı daha önceki birçok çalışmada bildirilmiştir. Buna göre, ROCK inhibitörlerinin koroner vazospasm, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon ve myokardial iskemi reperfüzyon hasarı gibi damar düz kas hücresi aşırı kasılmasının patofizyolojide rol aldığı birçok kardiyovasküler hastalığın tedavisinde yararlı olabilecekleri göstermektedir (123-124). Bu bilgiler ışığında, çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ROCK inhibitörleri ile ilgili yapılan çalışmalar devam etmektedir.

Sitoplazmik kalsiyum miktarındaki yükselme, düz kaslarda kasılmayı uyaran temel mekanizmadır. Bununla birlikte, düz kaslarda agonistle indüklenen kasılma, büyük oranda hücre zarı potansiyelinden bağımsız bir şekilde kontrol edilmektedir (119). Serotonin ve fenilefrin gibi agonistler, fosfotidil inozitol yolunu aktifleştirerek sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesinde uyarıcı etkiye yol açmaktadırlar. Hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasını sağlar. Kalsiyum-kalmodulin kompleksi, myozin hafif zincir (MLC)'yi fosforile ederek, myozin hafif zincir kinazı (MLCK)'yi aktifleştirmektedir. MLC'nin fosforilasyon düzeyi, düz kaslarda kasılmanın büyüklüğünü belirleyen önemli bir faktördür. MLC fosforilasyonu düz kaslarda kasılmayı sağlarken, hücre içi kalsiyum miktarındaki azalmanın sonucu meydana gelen MLC defosforilasyonu gevşemeye

yol açmaktadır (125). Rho/Rho kinaz yolu, MLC'nin fosforilasyon seviyesinin belirlenmesinde önemli bir etken olduğu bildirilmiştir. Bu düzenlemeyi esas olarak myozin fosfatazı (MP) fosforillemek suretiyle baskılayarak oluşturmaktadır. Böylece düz kas kasılmasında agonistin sebebiyet verdiği kalsiyum duyarlılığındaki artışa destek olmaktadır. Hücre içi kalsiyum düzeyi ölçüldüğü zaman kalsiyum derişiminin, düz kas kasılması ve MLC fosforilasyonu ile her zaman birlikte olmadığı bildirilmiştir (126). GTP bağlayıcı protein olan Rho, agonist aracılı kalsiyum duyarlılığında önemli rol üstlendiği görülmüştür. Ayrıca, belli bir kalsiyum derişiminde artmış kasılmaların, etkinleşmiş Rho ile MLC fosforilasyon düzeyindeki artıştan ziyade, defosforilasyon düzeyindeki azalma nedeniyle gerçekleştiği öne sürülmüştür (112). Rho proteinleri bu etkileri başlıca uyarılarına cevap veren enzim olan ROCK aracılığı ile gerçekleştirmektedirler.

Rho/Rho kinaz yolu hücrelerin göçü, çoğalması, apoptoz ve DNA'dan RNA polimeraz enzimi aracılığı ile RNA molekülü oluşumunda etkili rol üstlendikleri, bu işlevlerde düzenleyici görevi aldıkları bilinmektedir (123). Bunların dışında Rho/Rho kinaz yolu inflamasyon ve transendotel lökosit göçü, trombosit aktivasyonu, tromboz gibi süreçlerde etkili olduğu ve oksidatif stresin durumlarında da yer aldığı gösterilmiştir (127). Rho kinazın hipertansiyon, koroner arter spazmı, anjina, ateroskleroz, miyokardial iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu zedelenme ve restenoz kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde önemli rol oynadığı rapor edilmiş dolayısıyla yeni bir terapötik hedef olabileceği önemle vurgulanmıştır (126).

Aterosklerotik sürecin basamaklarında da oldukça etkili olan Rho kinaz, intimada doku faktörünün sentezini uyarmakta, media tabakasında damar düz kas hücrelerinin aşırı derecede kasılmasına yol açmakta, çoğalmalarında ve göçlerinde de etkin rol oynayabilmektedir (126). Ayrıca Rho kinaz inflamasyonda rol alan bazı hücrelerin adventisyada birikimini uyarmakta, endotelial kasılma ile geçirgenliğinde artışa yol açmakta ve sonuçta ateroskleroza meydana gelmesinde önemli rol üstlenmektedir (126). Rho kinaz aracılı endotel yapıda zayıflama, tromboz eğilimini artırmakta, aşırı vazokonstriksiyon, damarlarda patolojik yeniden yapılanma (remodeling) gibi hücrel cevaplar aniden gelişen koroner sendrom gibi vasküler kriz ile sonuçlanabilmektedir (126). Uzun süre Rho kinaz inhibitörü Y-27632 verildiğinde aterosklerotik plak boyutunun azaldığı gösterilmiştir (128).

Rho/ROCK yolu eNOS ekspresyonunu down regule edebilmektedir (129). Rho kinaz eNOS'u direkt olarak Treonin 495'te fosforilleyerek eNOS aktivitesini baskılayabilmektedir (130). Fasudil kullanılarak rhokinazın inhibisyonu ise eNOS'u aktive etmekte ve NO üretimini artırmaktadır (131). Ayrıca rho kinaz Akt (protein kinaz B) inhibisyonuna neden olarak eNOS aktivitesini negatif yönde etkilemektedir (132). Fizyolojik olarak serbestleşmiş endotelial NO guanilat siklazı aktive ederek cGMP düzeyini yükseltir (45, 46). Yükselen cGMP protein kinaz G'yı aktive etmekte, aktive olan protein kinaz G RhoA'yı fosforilleyerek inaktive etmekte ve dolayısıyla RhoA bağımlı kalsiyum duyarlılığı ortadan kalkmaktadır (133-135). NO ve Rho kinaz yolları özellikle kardiyovasküler (KVS) sistemde birbirine zıt çalışan iki mekanizma olarak görülmektedir.

Anjiotensin II AT1 reseptörü aracılığıyla birçok heterodimerik G-proteiniyle (Gi, Gq, G11, G12) etkileşir ve ikincil mesajcıların (diacilgliserol, inozitoltrifosfat, reaktif oksijen ürünleri) üretilmesini uyarır. Ayrıca anjiotensin II hücre içi birçok protein kinazı ve Ras, Rac, Rho gibi GTP bağımlı küçük G proteinleri aktive edebilmektedir (136-138). Rho/ROCK yolu Ang II'nin indüklediği vasküler remodellingde önemli yer tutmaktadır (139). AT2 reseptörünün ise Rho/ROCK yolunu inhibe ettiği belirlenmiştir (140).

1.2.8. Prostaglandinler

Kan basıncına çeşitli prostaglandinlerin artırıcı veya azaltıcı yönde değişik etkileri vardır. Örneğin Tromboksan A2 vazokonstriksiyonu desteklerken, Prostaglandin I2 vazodilatör yönde etki gösterir (141). Özellikle prostaglandin E vasküler tonusu, sodyum dengesini ve renin salınımının inhibisyonunu sağlayarak kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynar (142).

1.2.9. Endotelin

Güçlü bir endojen vazokonstriktör maddedir. Şöyle ki; gravimetrik etki gücü Ang II'ye göre 10 kez daha fazladır. Bilinen üç izoformu vardır. Endotelin I esas olarak endotelde sentezlenir, bilinen depo yeri yoktur. Endotelin etkilerini özgün reseptörleri yoluyla parakrin veya otokrin yolla ortaya koyar. Esansiyel hipertansiyonda, konjestif kalp yetmezliğinde, iskemik kardiyak disfonksiyonda endotelin düzeyinin yükseldiği gözlenmiştir.

1.2.10. Obezite

Obezite, sempatik sinir sistemi ve RAAS aktivasyonu, plazma hacminin artması, hiperinsülinemi gibi mekanizmalarla kan basıncı değerlerinde artma meydana getirir.

1.2.11. Vazoaktif peptidler

Esansiyel hipertansiyonda natriüretik peptid, adrenomedullin, dopamin, serotonin, vazopressin, opioid peptidler, kinin, kallikrein, nöropeptid Y ve medullipinin etkili olduğu tahmin edilmektedir (33).

1.2.12. Sigara

Nikotin, nikotinik reseptörleri uyararak, adrenerjik sinir uçlarında noradrenalin salınmasına sebebiyet vermektedir. Sigara, endotele bağımlı gevşemede zayıflama ve endotelin düzeylerinde yükselmeyle kan basıncında artışa yol açmaktadır (33).

1.2.13. Alkol

Alkol sempatik sinir sistemini ve RAAS'ı aktive ederek, plazma kortizon düzeyini artırarak kan basıncı değerlerini yükseltir (33).

1.2.14. Fiziksel inaktivite

Fiziksel aktivite açısından aktif kişilerde, daha az yüksek kan basıncı görülmektedir. Hipertansif bireylerde ise düzenli egzersize başladıktan sonra kan basıncında düşme tespit edilmektedir.

1.3. Deneysel Hipertansiyon Modelleri

Hipertansiyon hayvan modelleri etiyolojilerine göre primer ve sekonder olarak iki gruptan oluşur. Uygulama yoluna göre primer hipertansiyon genetik ve çevresel indüklü olarak iki ana grupta, sekonder hipertansiyon ise renal ve farmakolojik olarak iki ana grupta incelenebilir.

1.3.1. Genetik İndüklü Hipertansiyon

Bu model için en iyi iki örnek olarak Spontan Hipertansif Rat (SHR) ve Dahl'in tuza duyarlı ratları verilebilir. Spontan hipertansif ratların kökeni, hipertansif wistar cinsi ratlardır. Bu model hep yakın akraba içinde çiftleştirme

yaptırılan ve doğumdan sonra yaklaşık 4-6. haftalarda hipertansif olup kan basıncı yükselmesi tuza bağımlı olmayan modeldir. Dahl cinsi tuza duyarlı ratlar ise; Sprague-Dawley cinsi ratlardan, tuz diyetine verdikleri kan basıncı cevabına göre küçük yaşta hipertansif ve non-hipertansif olarak ayrılan ratların kendi içinde çiftleştirilmesiyle türeyen yeni ratlardan, tuz diyetine en yüksek kan basıncı cevabını verenlerin seçilmesiyle elde edilirler. Spontan hipertansif ratlar böbrek yetmezliği, kalp yetmezliği ve kardiyak hipertrofi gibi birçok hipertansiyona bağlı organ hasarına sahiptirler. Günümüzde kullanılmakta olan deneysel hipertansiyon modelleri arasında ilk sırada olduğu rapor edilmesine rağmen (143), patogenezi hala açık değildir.

1.3.2. Çevresel İndüklü Hipertansiyon

Stres indüklü hipertansiyon, diyet (yüksek yağ, şeker veya tuz oranına sahip diyet) indüklü hipertansiyon ve soğuk indüklü hipertansiyon modelleri bu grupta incelenebilirler.

1.3.3. Farmakolojik İndüklü Hipertansiyon

Bu tip hipertansiyon modelinin tipik gösterimi DOCA-Tuz indüklü hipertansiyon modelidir. Hipertansiyon oluşumu için deneklere 300-1000 mg/kg/gün (sc) gibi çok yüksek bir dozda DOCA (deoxycorticosterone acetate) uygulanır ve beraberinde hipertansiyonun şiddetini artırmak amacıyla içme suyu olarak sadece salin solüsyonu verilir. Bu modelde hipertansiyon oluşumunu kolaylaştırmak amacıyla renal kitlenin de cerrahi olarak azaltılması sıklıkla gerekir. Hipertansiyon başlangıç aşamasında tuza bağımlı özellik gösterir. DOCA-tuz aracılı hipertansiyon düşük reninli ve volüm yüklü bir hipertansiyon formudur. Arginine vasopressin (AVP) bu model hipertansiyonun gelişimi ve devamlılığında rolü olduğu ve ayrıca sempatik sinir sisteminin de bu modelde katılımcı olduğuna dair kanıtlar vardır (144-145).

1.3.3.1. NOS İnhibisyonu ile oluşturulan Hipertansiyon

Kronik NOS inhibisyonunun ilk defa 1992 yılında yeni bir arterial hipertansiyon modeli olarak kullanılabileceği yapılan araştırmalar sonucu bildirilmiştir (146). Bu sonuç, NO'nun kan basıncının uzun dönem düzenlenmesinde gerekli olduğu verileriyle paralellik göstermektedir. Ratlarda değişik dozlarda verilen

nitrik oksit sentaz inhibitörünün hipertansiyona sebep olmasının yanında ayrıca yüksek dozları daha şiddetli hipertansiyona ve organ hasarlarına neden olabildiği belirlenmiştir (146). Ratlarda hipertansiyon meydana getirmek için kullanılan ilk NOS inhibitörü bir L-arginin analogu olan L-NAME'dir (147). L-NAME'nin suda çözünmesi ve içme suyuyla rahatlıkla hayvanlara verilebilmesi ilerleyen yıllarda bu modelin daha yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Ayrıca L-NAME intraperitoneal enjeksiyon yoluyla da verildiğinde ratlarda hipertansiyon meydana getirilmiştir (84).

Yaptıkları çalışmalarda sıçanlarda L-NAME ile hipertansiyon modelini kullanan araştırmacılar bu inhibitörün farklı dozlardaki ve uygulama sürelerindeki etkisini de incelemiştir. Çalışmalarda farklı kan basıncı değerleri elde edilmesiyle birlikte gözlemlenen net etki kan basınçlarını anlamlı olarak yükselten, uygulama süresine ve doza bağımlı bir etkidir. Fakat yine de aynı veya yakın yaştaki ratlara L-NAME'nin benzer dozlarının uygulanmasıyla çok yakın sonuçlar elde edilmemiştir. Ratlarda aynı dozda verilen L-NAME farklı soylarda değişik hipertansif sonuçlara sebep olabildiği görülmüştür. Bu farklı kan basıncı verilerine rağmen kronik olarak yani 21 gün uygulanan yüksek dozdaki L-NAME'nin daha büyük vasküler ve renal patolojilerin oluşumuna sebebiyet verdiği bilinen bir sonuç durumundadır (146-147).

Biyolojik dokularda kısa yarılanma ömrüne sahip NO oksidasyon ile nitrit ve nitrate dönüştürülerek inaktive edilmektedir. Bu reaksiyonun ise başlıca süperoksitlerden türeyen radikaller tarafından katalize edildiği gösterilmiştir, çünkü doku banyosuna süperoksit dismutaz eklendiğinde NO yarılanma süresinin uzadığı belirlenmiştir. Oksijenden türeyen radikaller arasında süperoksit anyonu (O_2^-) canlı dokularda spesifik oksidazlar (NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, monooksijenaz, sitokrom P450) tarafından üretilmektedir (148-150). Her ne kadar normal durumlarda O_2^- hücrel metabolizmanın sabit ürünü olsa da, hücre diferansiyasyonu, apoptozis ve immun cevapları etkileyen toksik bir ajan olduğu görülmüştür (149, 151). O_2^- toksik etkileri antioksidan süperoksit dismutaz tarafından indirgenenerek önlediği gibi ayrıca NO'nunda normal durumlarda O_2^- nin yan etkilerini azaltan güçlü antioksidan etki gösteren bir mediatör olduğu gözlenmiştir (152-154). NO ile O_2^- reaksiyonu sonucu peroksinitrit oluşum hızı, süperoksit dismutaz ile O_2^- reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit oluşum hızından 3 kat daha fazladır (155).

Hücredeki NO düzeyi, O_2^- üretimi ve ikisi arasındaki etkileşim hücre fonksiyonlarının kontrolü açısından önemlidir (156). Dolayısıyla L-NAME ile nitrik oksit sentezinin inhibisyonu oksidatif stresin artmasına sebep olmaktadır (157-159). Ayrıca oksidatif stres renin anjiotensin sisteminin aktivasyonunda rol oynamaktadır (160).

1.3.4. Renal İndüklü Hipertansiyon

RAS sisteminin önemli bir üyesi olan renini salgılamak ve sıvı-elektrolit dengesini sağlamak gibi önemli fizyolojik fonksiyonları bulunan böbreğin hipertansiyon patogeneğinde önemli role sahip olabileceği her zaman düşünülmüştür. Buna bağlı olarak Goldblatt ve arkadaşlarının köpek renal arterinin kısmen kasılması yoluyla kan basıncında yükselme elde etmelerinden bu yana birçok renal uyarı aracılı hipertansiyon modeli değişik türlerde başarıyla gerçekleştirilmiştir. Goldblatt modeli iki böbrek bir klemb (tek renal arter klembli, diğeri işler durumdadır) ve tek böbrek tek klemb (bir böbrek çıkarılıp, diğesine klemb konulur) uygulamalarını içerir. Bu şekilde oluşturulan hipertansiyonda plazma renin düzeyi bifazik seyir gösterir. Başlangıç fazında tespit edilen sodyum retansiyonu 1. haftaya doğru düzelme eğilimi gösterir ve bu plazma renin aktivitesi ile paralellik gösterdiğinden RAAS'ın 2B1K goldblatt modelinde katılımcı olabileceğini düşündürür. Her iki tip goldblatt modelinde de klip çıkarıldığı zaman kan basıncı normal seviyeye gelir. Burdan anlaşılacağı gibi bu model geri dönüşlü ve tekrarlanabilir bir model olarak karşımıza çıkar.

1.4. Losartan, Perindopril, Novokinin

1.4.1. Losartan

Bir anjiotensin tip 1 reseptör antagonistidir. Mide-barsak kanalından iyi absorbe edilir. Absorpsiyonu besinle alındığında azalmaz. Diğer anjiotensin reseptör blokörleri gibi plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır (%99). Eliminasyon yarılanma ömrü aynı gruptaki diğer ilaçlarınkinden kısadır (6-9 saat). Böbrekten salgılanmak ve karaciğerden safraya itrah suretiyle elimine edilir. Ürik asit atılımını azalttığı için hiperürisemiye neden olabilir. Hem hipertansif ve hem de normotansif hastalarda, arteriyel kan basıncını, tedavinin başlangıcında, varolan anjiotensin etkinliğinin büyüklüğü ile orantılı bir seviyede düşürür. ADE inhibitörlerinin aksine,

bradikininler veya nörokinin gibi vazodilatör kinin peptidlerle etkileşmez. Kanda renin ve anjiotensin seviyesini belirgin derecede arttırır. Losartan anjiotensin II reseptör blokeri olmasının yanı sıra, tromboksan A2 reseptörlerinin kompetitif antagonistidir ve trombosit agregasyonunu azaltabilmektedir. Spontan hipertansif ratlarda yapılan bir çalışmada losartan verilen grupta aortta NADPH oksidaz ekspresyon düzeyinde anlamlı azalma belirlenmiştir (161-162). Yine spontan hipertansif ratlarda yapılan bir çalışmada losartan verilen grupta plazma ADMA seviyesinde anlamlı düşüş gözlemlenmiştir (163). Başka bir çalışmada spontan hipertansif ratlara beş ay boyunca içme suyuyla tuz verilmiş, losartan alan grupta böbrekte eNOS aktivitesindeki azalmanın önlendiği bildirilmiştir (164). Farklı bir çalışmada losartan alan hipertansif ratlarda aortta eNOS ekspresyon düzeyi tedavi almayan gruba göre anlamlı düzeyde yükselmiştir (165).

1.4.2. Perindopril

Perindopril önilaç yapısında bir maddedir. Verilen dozun %30-50'si sistemik olarak hepatik esterazlar tarafından perindoprilata dönüştürülür. Oral biyoyararlanımı gıda maddelerinden etkilenir. Perindopril 3-7 saat içinde plazma doruk konsantrasyonuna ulaşır. İki fazlı bir eliminasyon kinetiği gösterir; birinci faz ana bileşiğin eliminasyonunu gösteren 3-10 saatlik, ikinci faz ise perindoprilatın dokudaki ADE'lerden yavaş ayrılmasını gösteren 30-120 saatlik bir yarılanma ömrüdür.

1.4.3. Novokinin

Novokinin, ovalbuminden türeyen ovokininden elde edilmiş potent hipotansif bir peptiddir (166). Novokinin'in spontan hipertansif ratlarda 0,1 mg/kg dozda oral uygulanarak kan basıncını anlamlı şekilde düşürdüğü gözlenmiştir (43). AT2 reseptör antagonisti PD123319 verildiğinde hipotansif etkisi bloke olmuştur (43). Ayrıca AT2 reseptör defisit farelerde, novokinin hipotansif etki gösterememiştir. Novokinin spontan hipertansif rat mesenterik arterlerinde AT2 reseptörü aracılığıyla vazodilatör etki göstermiştir. Mesenterik arterlerdeki vazodilatör etkisi PD123319, siklooksijenaz inhibitörü indometazin ve prostaglandin reseptör antagonisti CAY10441 tarafından anlamlı şekilde bloke edilmiştir (43).

1.5. Çalışmanın Amacı

Yeni bir hipotansif peptid olan AT2 agonisti Novokin'in, NOS blokajı ve tuz ile oluşturulan HT da kan basıncına etkisi bilinmemektedir. Yine Novokin'in kontrol ve hipertansiyon oluşturulduğunda, eNOS, NADPH oksidaz, ADMA ve Rho kinaz düzeylerine etkisi ve RAAS'ı etkileyen diğer antihipertansif tedavilerle karşılaştırıldığında damar tonusunu nasıl etkileyebileceği (Phe kasılma ACH gevşeme cevapları ve AngII indüklü kasılmalarda AT2 reseptörleri, rhokinazın rolü) bizim bilgilerimize göre henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada NOS inhibisyonu ve Tuz yüklemesi ile oluşturulan HT'da Rhokinaz, NADPH oksidaz aktivitelerinin, eNOS, ADMA düzeylerinin rolü ve ADE inhibisyonu (perindopril), ARB (losartan), AT2 (novokin) agonistinin kan basıncı ve bu parametreler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak HT oluşturulmuş ve farmakolojik tedavi almış ratların damarlarında (aortlarında in vitro) Phe kasılma, Ach gevşeme cevapları ve Ang indüklü kasılmalarda rhokinaz ve ATII reseptörlerinin rolü araştırılmıştır. RAAS etkileyen 3 ayrı etki mekanizmasına sahip ilacın kan basıncı ve damar duyarlılıkları üzerine etkinlikleri karşılaştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Denekler

Araştırmada 220-260 gr ağırlığında Spraque-Dawley cinsi erkek ratlar (n=56) kullanıldı. Ratlar standart şartlarda (12 saat günışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısı odalarda) kafeslerde barındırıldı.

2.2. Deney protokolü

2.2.1. HT oluşturulması

4 hafta boyunca L-NAME ve Tuz uygulaması ile hipertansiyon oluşturuldu

Tuz uygulama:

Ratların normal diyetlerine ilave olarak %1'lik tuz içme suyu ile 28 gün boyunca verildi.

L-NAME uygulamaları

İntraperitoneal i.p. olarak 40mg/kg/gün dozunda 28 gün uygulandı.

Gruplar: Her bir grupta 7 rat olacak şekilde 8 gruba ayrıldı (n=56).

1.Grup: **Kontrol** serum fizyolojik (SF) (0,5cc/gün i.p. 4 hafta boyunca)

2.Grup: **Perindopril** SF (İlk 2 hafta 0,5cc/gün i.p.) perindopril (2mg/kg/gün i.p. 2.Haftadan sonra)

3.Grup: **Losartan** SF (İlk 2 hafta 0,5cc/gün i.p.), losartan (2 mg/kg/gün i.p. 2.haftadan sonra)

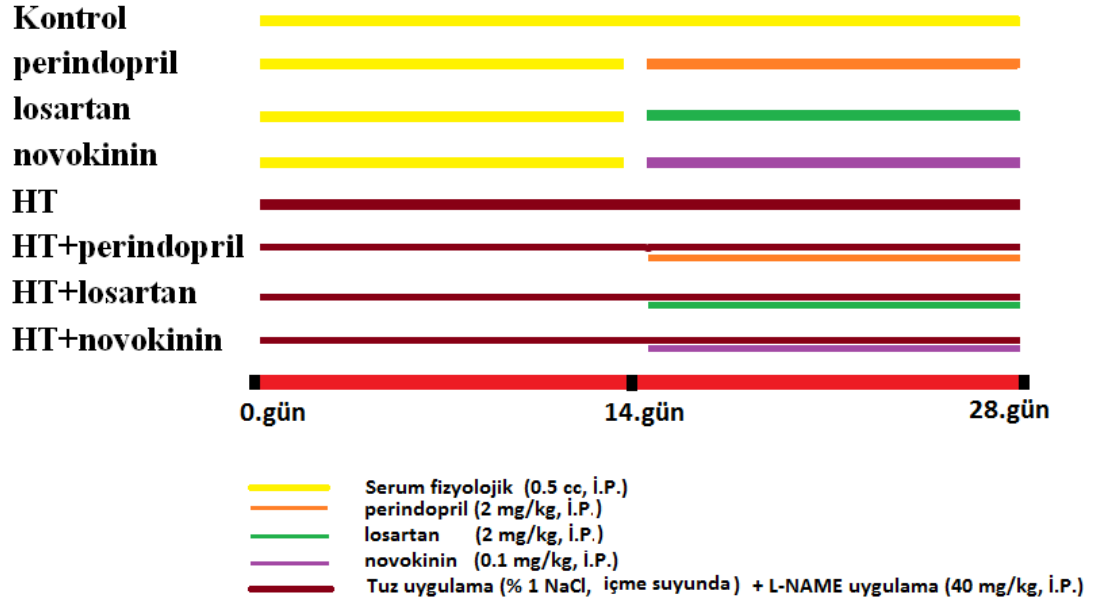
4.Grup: **Novokinin** SF (İlk 2 hafta 0,5cc/gün i.p.), novokinin(0,1 mg/kg/gün i.p. 2 hafta boyunca)

5.Grup: **Hipertansiyon** (HT) Ratlara 4 hafta boyunca içme suyunda % 1 tuz ve 40 mg/kg/gün dozda L-NAME i.p. verildi.

6.Grup: **HT + perindopril** Ratlara 4 hafta boyunca içme suyunda % 1 tuz ve 40 mg/kg/gün dozda L-NAME i.p. verildi 2. haftadan sonra (14. gün) perindopril 2 mg/kg/gün i.p.2 hafta,

7.Grup: **HT + Losartan** Ratlara 4 hafta boyunca içme suyunda % 1 tuz ve 40 mg/kg/gün dozda L-NAME i.p. verildi. 2. haftadan sonra (14. gün) losartan 2 mg/kg/gün i.p. 2 hafta,

8.Grup: **HT + Novokinin** Ratlara 4 hafta boyunca içme suyunda % 1 tuz ve 40 mg/kg/gün dozda L-NAME i.p. verildi. 2.haftadan sonra (14. gün) novokinin 0,1 mg/kg i.p. 2 hafta uygulandı.



Şekil 1. Deney grupları ve ilaç uygulamaları

2.2.3. Kan basıncı ölçümleri

Bilinci açık ratların kan basıncı ölçümleri (sistolik kan basıncı) kuyruktan indirekt tail cuff yöntemi ile yapıldı (MAY BPHR 9610-PC TAIL-CUFF Indirect Blood Pressure Recorder, Ankara, Türkiye) Tüm gruptaki ratların kan basıncı ölçümleri 0., 14. ve 28.günlerde yapıldı. Alınan kan basıncı değerleri bilgisayara kaydedildi. Her ratdan 5 ölçüm alındı ve ortalamaları hesaplandı.

2.2.4. Cerrahi uygulamalar

Deney sonunda, denekler dekapite edilerek kan örnekleri alındı. Daha sonra çabuk bir biçimde abdomen ve toraks orta hattan açıldı. Torasik aorta diafragmanın üzerinden başlayarak arkus aortaya doğru diseke edilerek çıkarıldı ve soğuk krebs solüsyonu içine alındı. Torasik aorta çevre bağ ve destek dokularından dikkatlice temizlenerek arkusa yakın uçtan 4 mm boyunda halka halinde kesildi.

2.2.5. İn vitro deneyler

Hazırlanan 4 mm boyundaki torasik aorta halkaları, lümeninden birbirine paralel iki paslanmaz çengel geçirilerek içerisinde 37°C'ta ısıtılmış ve %95 O₂ + %5

CO₂ karışımı ile gazlandırılan Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu bulunan 10 ml'lik izole organ banyosuna asıldı. Alt çengel izole organ banyosunun tutma kısmına tutturularak üst çengel de izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için force-displacement transducerlerine (FT 0.03) bağlandı. Kayıtlar BIOPAC marka (Model MP36) poligrafla yapıldı. İzole organ banyosuna asılan torasik aorta halkaları 2 gramlık istirahat gerimi altında 1 saat boyunca dengelendi. İzole organ banyosundaki Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu metabolik son ürünlerin birikimini önlemek için her 15 dakikada bir taze solüsyonla yenilendi. İn vitro torasik aorta çalışmaları endotel varlığında çalışıldı.

2.2.5.1. Fenilefrin (phe) kasılma cevapları

Aortik halkalarda artan konsantrasyonda fenilefrin (10^{-9} - 10^{-4} mol/L) uygulamasına kasılma yanıtları değerlendirildi.

2.2.5.2. Asetilkolin (Ach) Gevşeme cevapları

Artan dozlarda fenilefrin uygulamasıyla elde edilen eğriden submaximal doz belirlendi. Sonrasında submax phe dozu ile kasılma yapıldıktan sonra artan konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) asetilkolin uygulamasıyla doz bağımlı gevşeme cevapları alındı.

2.2.5.3. AT1 ve AT2 reseptör rolünün belirlenmesi

AT2 reseptörlerinin rolünü belirlemek için

-Submaksimal fenilefrin dozu ile kasılma yapıldıktan sonra, asetilkolin gevşeme cevaplarında olduğu gibi artan konsantrasyonda (10^{-11} - 10^{-6} mol/L) AngII uygulamasıyla damar cevapları elde edildi.

-Fenilefrin uygulamadan 15 dk önce AT1 antagonisti losartan verilip submaksimal fenilefrin dozu ile kasılma yapıldıktan sonra anjiotensin II doz bağımlı cevapları alındı.

-Fenilefrin uygulamadan 15 dk önce AT1 antagonisti losartan ve AT2 antagonisti PD123319 verilip submaksimal fenilefrin dozu ile kasılma yapıldıktan sonra anjiotensin II doz bağımlı cevapları alındı.

2.2.5.4. Rho kinaz yolunun rolü

Organ banyosuna submaksimal dozda fenilefrin verildikten sonra Rho kinaz inhibitörü fasudile bağlı gevşeme cevapları alındı.

2.2.6. Biyokimyasal analizler

2.2.6.1. Doku ADMA, eNOS, NADPH oksidaz, RhoA aktiviteleri

Her bir örnek için torasik aortadan 0,5 µm kesitler hazırlanarak, Magnalaser ile dokular parçalandı. Genomik RNA purifikasyon kiti (High Pure PCR RNA Tissue Kit kat. No. 12 033 674 0019) kullanarak kit protokollerine göre RNA izole edildi. İzole edilen total RNA kullanılarak, Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile cDNA sentezi yapıldı. İlgili parametreler ve bu parametrelerin mRNA dizileri spesifik primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Amplifikasyon için ilgili kit (eNOS assay Id 500228, PRMT3 assay Id 502043, NADPH assay Id 502973, Rho kinaz assay Id 500277 Roche) ve Light Cycler Taqman Master Kiti (Roche kat. No. 04535286001 veya 04735536001) kullanıldı, amplifikasyonlar RT-PCR cihazında (Light cycler Roche) gerçekleştirildi.

2.3. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler ortalama (ort) ±standart hata (SH) olarak belirtildi. Ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılık düzeylerini belirlemek için SPSS paket istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel farklar bağımsız gruplarda “one-way ANOVA” ve “independent-t” testleri ile hesaplandı. Aynı grubun farklı zaman noktalarındaki değerleri arasındaki fark değerlendirmek için “paired t test” kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.4. Kullanılan Kimyasallar

Fenilefrin, Asetilkolin, L-NAME, Perindopril, Losartan, Novokinin, PD123319, Fasudil, AnjiotensinII (Sigma Aldrich Inc.St. Louis, MO. A.B.D) dan; satın alındı.

3.BULGULAR

3.1. Kan basınçları

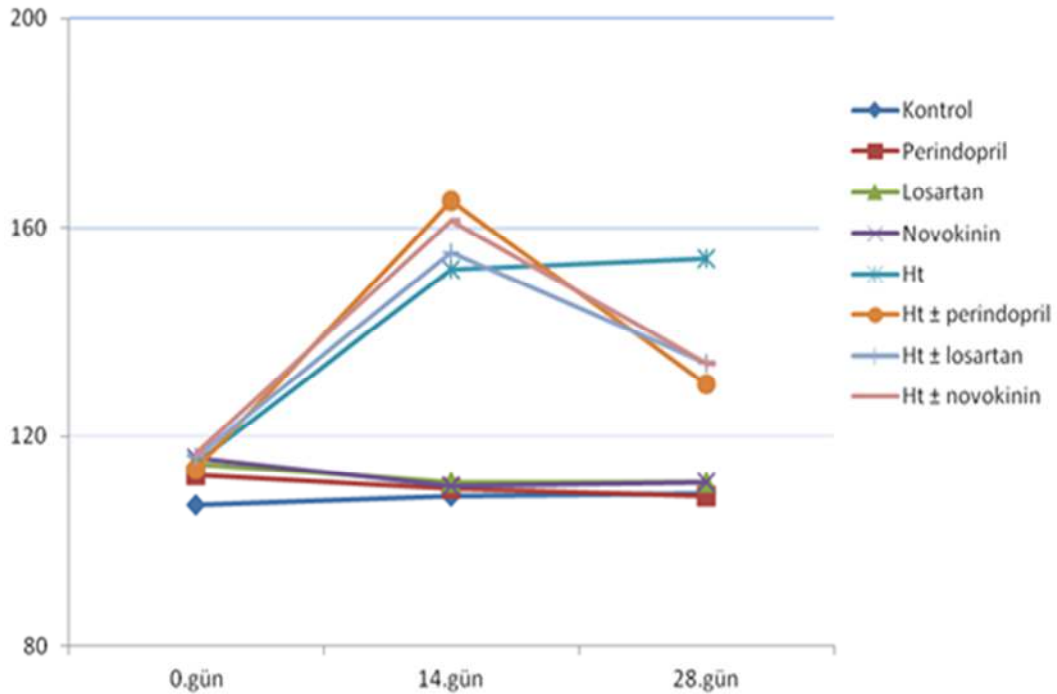
Tüm gruplarda tuz ve L-NAME uygulamasının 14.gün ve 28.günde sistolik kan basınçları üzerine etkisi Tablo-1 de verilmiştir.

Tablo 1. 0, 14 ve 28.günde kan basıncı değerleri

Gruplar	0.gün	14.gün	28.gün
Kontrol	107,09±2,46	108,54±3,58	109,07±3,70
Perindopril	112,65±1,05	110,06±1,42	108,71±1,57
Losartan	114,58±0,6	111,07±0,85	111,17±2,62
Novokinin	115,84±5,05	110,43±4,81	111,28±4,16
HT	114,89±2,59	152,07±5,02 abcd	154,16±8,72 abcd
HT + perindopril	113,79±1,42	165,01±3,35 abcd	130,10±4,50 abe
Ht + losartan	116±1,56	155,37±1,80 abcd	134,13±1,72 abcde
Ht + novokinin	116,69±2,01	161,29±7,01 abcd	134,00±3,84 abcde

Veriler ort ±SHolarak ifade edilmiştir.

- a, Kontrol grubuna göre,
- b, Perindopril grubuna göre
- c, Losartan grubuna göre
- d, Novokinin grubuna göre
- e, Hipertansiyon grubuna göre



Şekil 2. 0, 14 ve 28.günde kan basıncı değişimleri

3.1.1. L-NAME ve tuz uygulamasının sistolik kan basıncı üzerine etkisi

14 gün boyunca 40mg/kg/gün dozunda NOS inhibitörü (L-NAME) ve tuz uygulaması bütün gruplarda bazala göre anlamlı artışlara neden oldu. L-NAME ve tuz uygulaması sonucunda meydana gelen kan basınçları 28.günde 14.güne göre karşılaştırıldığında anlamlı farklılık oluşturmamasına karşın, 0.güne göre karşılaştırıldığında anlamlı oranda yüksekti (Şekil 2; Tablo 1).

3.1.2. Perindopril uygulamasının etkisi

Perindopril uygulaması tek başına 28. günlerde sistolik kan basıncında anlamlı değişiklik oluşturmadi. HT oluşturulan ratlarda perindopril uygulaması (14 gün, 2 mg/kg/gün), 14.güne göre 28. günde anlamlı düşüş sağladı $p<0,001$. Fakat tedavi sonu kan basıncı değerleri 0. güne göre hala anlamlı derecede yüksekti (Şekil 2;Tablo 1).

3.1.3. Losartan uygulamasının etkisi

Tek başına losartan uygulaması 28. günlerde sistolik kan basıncında anlamlı değişiklik oluşturmadi. HT oluşturulan ratlarda losartan verilmesi (14 gün, 2 mg/kg/gün), 14.güne göre 28.günde anlamlı düşüş sağladı. Fakat tedavi sonu kan basıncı değerleri 0. güne göre hala anlamlı düzeyde yüksekti (Şekil 2; Tablo 1) $p<0,001$.

3.1.4. Novokinin uygulamasının etkisi

Novokinin uygulaması tek başına 28. günlerde sistolik kan basıncında anlamlı değişiklik oluşturmadi. Hipertansif ratlarda novokinin uygulaması (14 gün, 2 mg/kg/gün), 14.güne göre 28.günde anlamlı düşüş sağladı. Fakat tedavi sonu kan basıncı değerleri 0. güne göre hala anlamlı derecede yüksekti (Şekil 2;Tablo 1) ($p<0,001$).

3.1.5. Kan basıncına etki açısından ilaç gruplarının kendi arasında karşılaştırılması

Gruplar arasında 14. ve 28.günler arasında kan basıncı değişim yüzdeleri incelendiğinde tedavili hipertansiyon grupları hariç anlamlı değişim olmadığı, tedavili gruplar arasında ise perindopril grubunun 2 haftalık tedavi boyunca en yüksek değişim etkisi yaptığı gözlenmiştir ($\Delta p=\%21$).

Tablo 2. Kan basıncı değişimi yüzdesi

Gruplar	Kan basıncı değişimi yüzdesi (% Δp)
Kontrol	-0,0047±0,0038
Perindopril	0,0044±0,0023
Losartan	-0,0182±0,0099
Novokinin	-0,0095±0,0085
HT	0,0074±0,0564
HT+perindopril	0,2097±0,0315 abcde
Ht + losartan	0,1337±0,0233 abcdef
Ht + novokinin	0,1642±0,0235 abcde

Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir.

a, Kontrol grubuna göre,

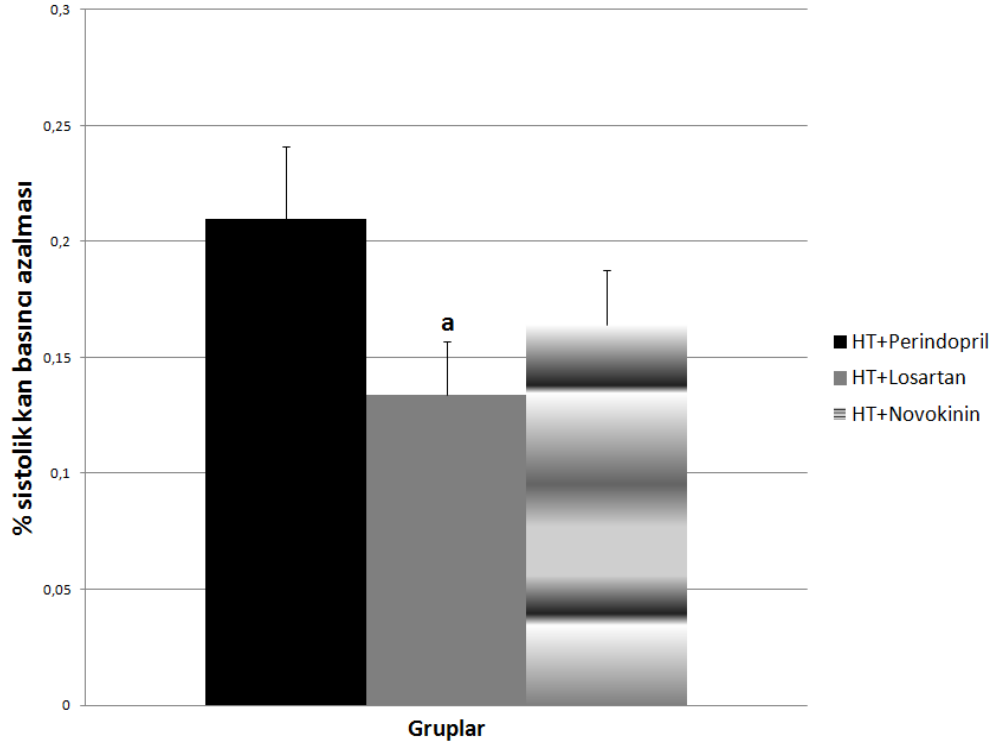
b, Perindopril grubuna göre

c, Losartan grubuna göre

d, Novokinin grubuna göre

e, Hipertansiyon grubuna göre

f, Ht+perindopril grubuna göre anlamlılık vardır, p<0,001



Şekil 3. Hipertansif gruplarda ilaçların antihipertansif etkilerinin karşılaştırılması

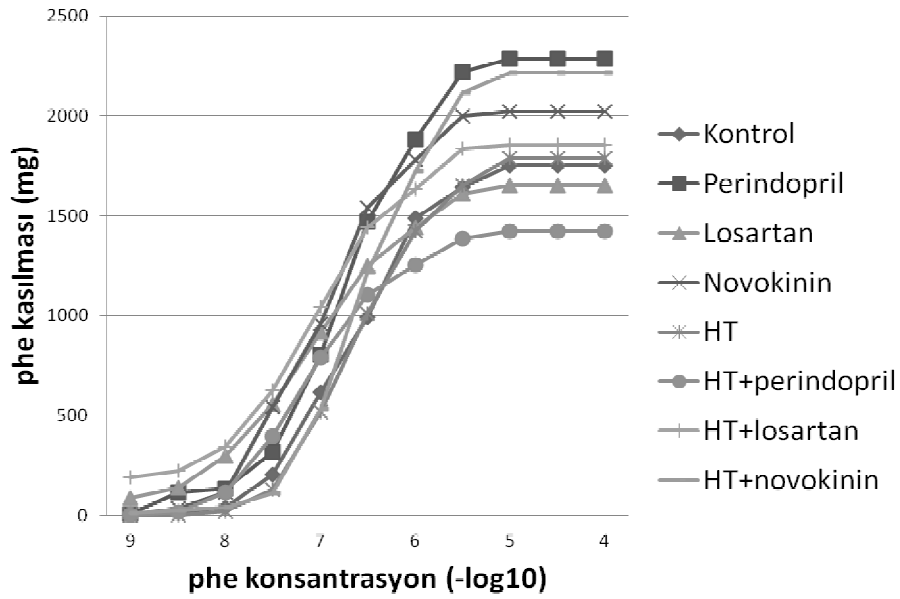
a; HT+perindopril grubuna göre anlamlılık vardır. p<0,001

Şekil 3’de görüldüğü gibi üç tedavi grubunda da hipertansif gruba göre kan basıncı değerlerinde düşüş görülmüştür. HT+perindopril grubundaki % kan basıncı azalması en fazla iken, bu değişim losartan uygulamasına göre anlamlı farklı (p<0,001) ancak novokinin uygulamasından anlamlı farklı değildi.

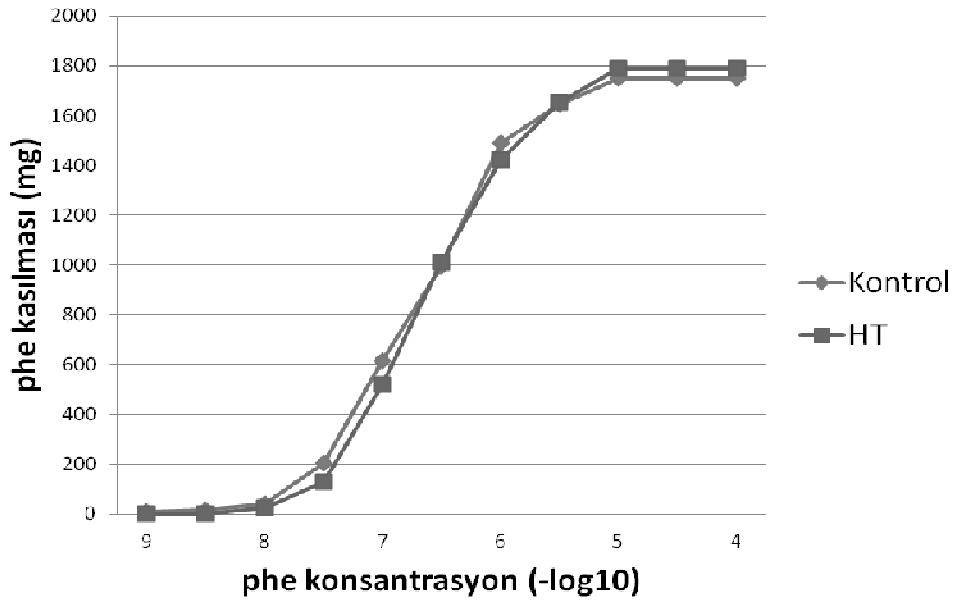
3.2. Torasik aortada kasilma-gevşeme yanıtları

3.2.1. Fenilefrin kasilma cevapları

Artan konsantrasyonlarda fenilefrin uygulamasına karşı elde edilen torasik aorta kasilma yanıtları arasında fark bulunmadı. Aynı zamanda Emax ve EC50 değerleri arasında da fark yoktu (Şekil 4, Tablo 3).



Şekil 4. Fenilefrin Doz Cevap Eğrisi



Şekil 5. Kontrol ve HT grubunda phe doz cevap eğrisi

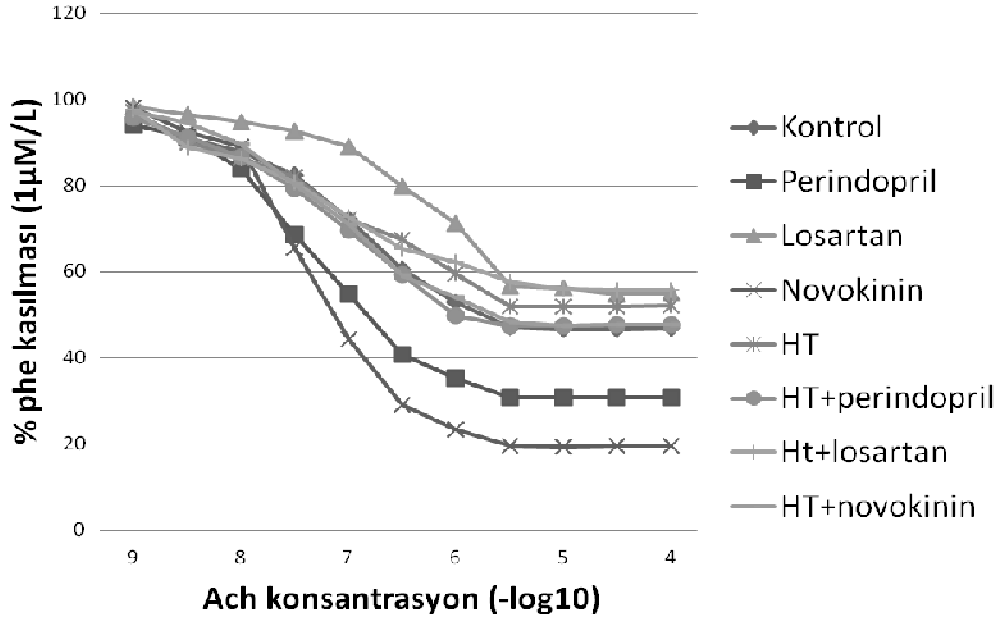
Tablo 3. Fenilefrin Kasılma Yanıtları

Dozlar	Kontrol	Perindopril	Losartan	Novokinin	HT	HT+perindopril	HT+losartan	HT+novokinin
10 ⁻⁹	9,01±5,21	9,39±5,88	85,86±31,58	2,27±2,27	3,11±3,11	4,58±4,58	190,86±183,4	12,73±8,79
5.10 ⁻⁹	17,33±7,74	115,1±68,02	140,76±59,08	38,6±27,16	3±3	17,02±11,12	223,29±177,93	25,76±15,79
10 ⁻⁸	42,44±15,91	136,74±77,58	300,08±121,18	116,94±61,48	23,68±13,45	113,91±40,87	344,88±173,02	43,18±19,84
5.10 ⁻⁸	206,29±61,31	319,02±131,60	556,33±200,83	544,02±179,622	129,61±76,45	395,78±126,15	627,66±189,84	109,3±25,95
10 ⁻⁷	617,23±169,66	804,17±190,82	915,71±263,67	961,17±235,379	520,91±190,04	789±163,76	1044±190,83	531,24±170,46
5.10 ⁻⁷	994±179,45	1469,3±233,08	1249,5±255,27	1538,2±274,34	1012,4±217,13	1104,4±127,56	1442,6±137,5	1215,1±182,97
10 ⁻⁶	1489,7±255,93	1883±222,41	1440,7±263,01	1778,8±309,217	1422,7±216,07	1255,9±97,25	1632,1±141,04	1723,1±192,97
5.10 ⁻⁶	1645,5±254,04	2217,3±279,04	1610,6±240,73	2000±330,554	1652,7±226,43	1385,9±96,5	1836,1±149,59	2115,3±225,4
10 ⁻⁵	1749,9±257,90	2283,2±280,08	1653,2±222,25	2022,7±336,17	1790,2±233,67	1423,6±102,61	1854,6±155,18	2216,9±259,24
5.10 ⁻⁵	1749,9±257,90	2283,2±280,08	1653,2±222,25	2022,7±336,17	1790,2±233,67	1423,6±102,61	1854,6±155,18	2216,9±259,24
10 ⁻⁴	1749,9±257,90	2283,2±280,08	1653,2±222,25	2022,7±336,17	1790,2±233,67	1423,6±102,61	1854,6±155,18	2216,9±259,24
Ec50(μM)	0,32±0,061	0,26±0,087	0,16±0,095	0,16±0,027	0,4±0,106	0,18±0,078	0,1±0,041	0,39±0,118

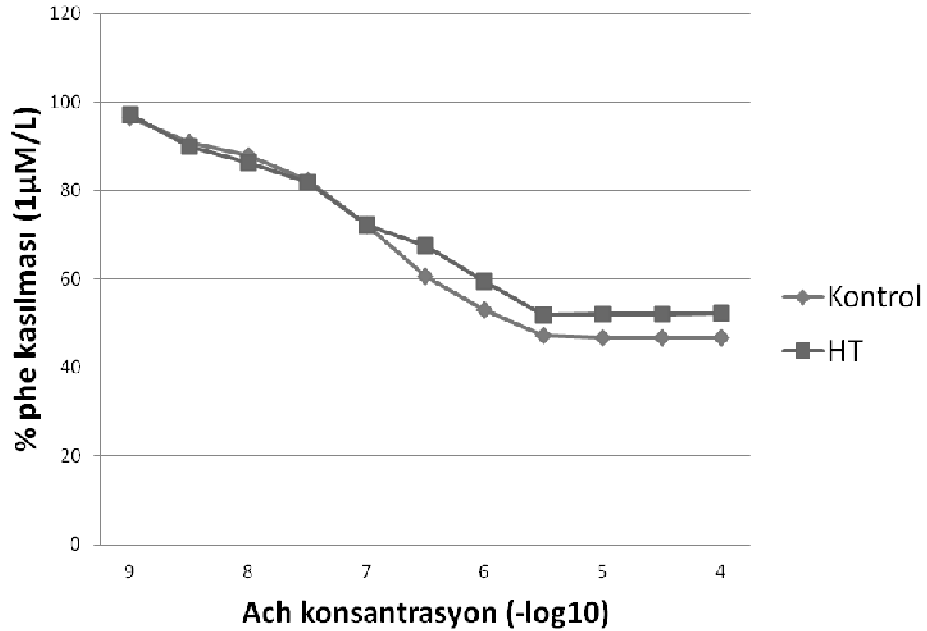
Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir.

3.2.2. Asetilkolin gevşeme cevapları (%)

Torakik aortada submaksimal doz Phe kasılması sonrası artan dozlarda Ach uygulamasına gevşeme cevapları şekil 6 de, bu değerlerden elde edilen Emax ve Ec50 değerleri Tablo 4 ve 5 de verilmiştir.



Şekil 6. Asetilkolin gevşeme cevapları



Şekil 7. Kontrol ve HT gruplarında ach gevşeme cevapları

Tablo 4. Ach gevşeme yanıtları (%)

Dozlar	Kontrol	Perindopril	Losartan	Novokinin	HT	HT+perindopril	HT+losartan	HT+novokinin
9	3,58±1,34	5,97±2,82	4,65±0,61	2,99±1,03	2,78±0,66	4,28±2,19	2,44±0,7	2,84±0,78
59	9,07±2,84	8,89±2,48	9,52±1,38	10,63±3,2	10,06±0,36	8,85±5,41	11,08±4,2	5,52±1,58
8	12,09±3,36	16,11±1,68	18,24±2,17	21,02±4,51	13,62±2,69	13,39±8,1	13,83±4,93	10,54±3,62
58	17,59±4,91	31,47±4	23,38±2,78	34,49±10,91	18,1±3,83	20,58±9,69	19,35±8	19,75±6,96
7	27,73±8,71	45,09±4,86	36,03±4,05	55,66±13,32	27,78±10,22	30,52±10	27,39±13	29,1±9,87
57	39,49±10	59,31±6,22	44,24±7,33	70,96±10,94	32,57±10,03	40,8±12,68	34,83±12,86	40,81±12,06
6	47,02±10,13	64,78±4,58	53,77±9,72	76,71±8,71	40,46±11,21	50,16±12,46	37,89±14,12	45,86±12
56	52,82±9,5	69,19±2,82	57,26±11,05	80,54±7,55	48,1±9,61	52,49±12,03	42,37±13,71	51,58±11,38
5	53,39±9,37	69,25±2,8	57,26±13,05	80,58±7,55	48,1±9,61	52,62±12,05	48,07±13,57	52,49±10,67
55	53,39±9,37	69,25±2,8	57,26±13,95	80,58±7,55	48,1±9,61	52,62±12,05	51,07±13,57	52,49±10,67
4	53,39±9,37	69,25±2,8	57,26±13,95	80,58±7,55	48,1±9,61	52,62±12,05	51,07±13,57	52,49±10,67

Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir.

Tablo 5. Ach gevşeme yanıtları Emax ve Ec50 değerleri

Ach Gevşeme Yanıtları								
Dozlar	Kontrol	Perindopril	Losartan	Novokinin	Ht	Ht+perindopril	Ht+losartan	Ht+novokinin
Emax	53,17±0,87	69±0,63 ^a	57±13,95 ^b	80,5±0,89abc	47,83±0,54 ^{abd}	52,33±0,99 ^{bcd}	51±3,18 ^{bdf}	52,33±0,98 ^{bcdeg}
Ec50 (µM)	0,18±0,006	0,057±0,009 ^a	0,15±0,01 ^{ab}	0,1±0,005abc	0,58±0,007 ^{abcd}	0,14±0,008 ^{abcde}	0,41±0,006 ^{abcef}	0,26±0,006 ^{abcdefg}

Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir.

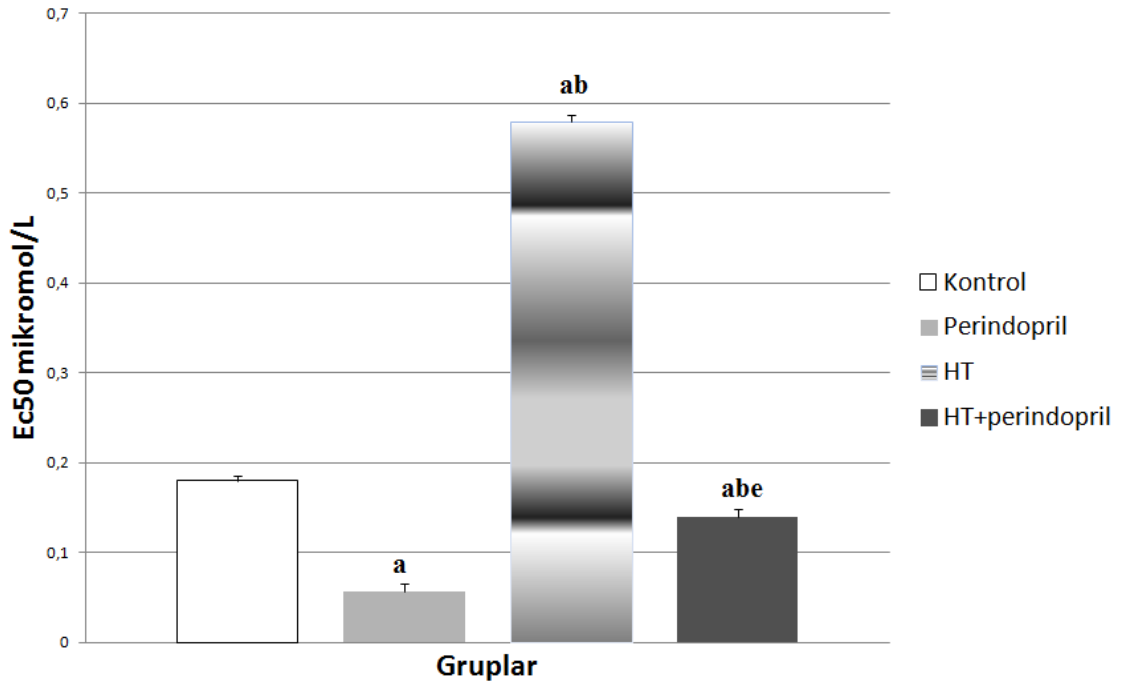
- a, Kontrol grubuna göre,
b, Perindopril grubuna göre
c, Losartan grubuna göre
d, Novokinin grubuna göre

- e, Hipertansiyon grubuna göre
f, HT+Perindopril grubuna göre
g, HT+Losartan grubuna göre

3.2.2.1. Ach gevşeme cevapları üzerine perindopril tedavisinin etkileri

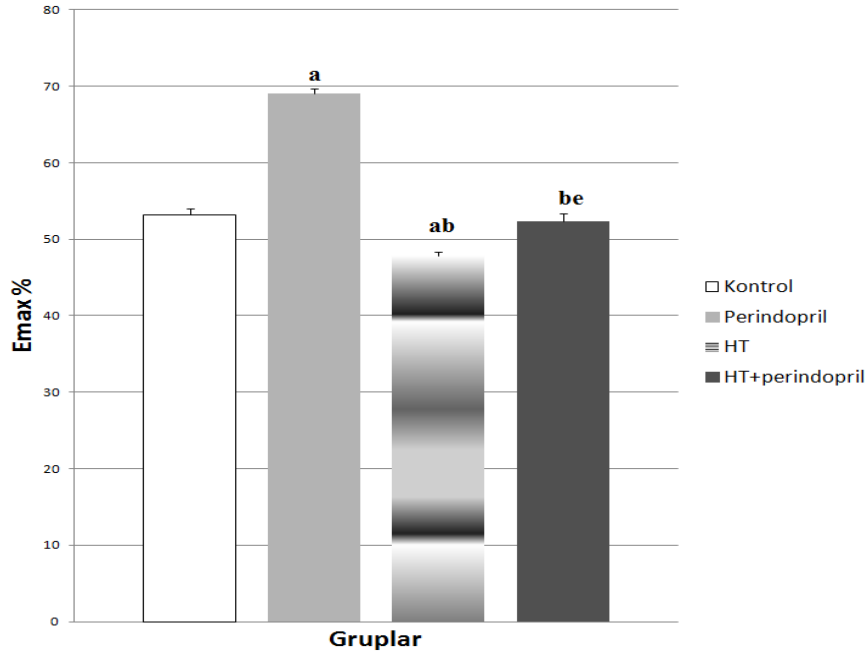
Ach uygulamasına damar gevşeme yanıtlarının perindopril tedavisiyle etkileşimi EC50 ve Emax değerleri üzerinden şekil 8 ve 9 da gösterilmiştir. Şekil 8 de gösterildiği gibi 4 hafta L-NAME ve tuz uygulamasının aortik Ach gevşeme cevaplarının EC50 değerlerinde anlamlı oranda artışa neden olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). 2 hafta tek başına perindopril tedavisiyle ise EC50 değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu görüldü ($p<0,05$). L-NAME ve tuz uygulamasına son iki hafta perindopril uygulaması ilavesi, L-NAME ve tuz ile meydana gelen EC50 artışını kontrol grubu değerlerine geri döndürdü ($p<0,05$).

Şekil 9’da Emax değerleri incelendiğinde L-NAME ve tuz uygulamasının kontrol grubuna göre anlamlı azalmaya neden olduğu, perindopril uygulamasının tek başına Emax değerlerini anlamlı şekilde artırdığı ve dahası perindopril uygulaması L-NAME ve tuz ile beraber olduğunda L-NAME ve tuzun meydana getirdiği azalmayı kontrolden daha üst seviyelere artırdığı gözlemlendi ($p<0,05$).



Şekil 8. Ach gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine perindopril etkisi

- a, Kontrol grubuna göre,
- b, Perindopril grubuna göre
- e, Hipertansiyon grubuna göre anlamlılık vardır. $p<0,05$

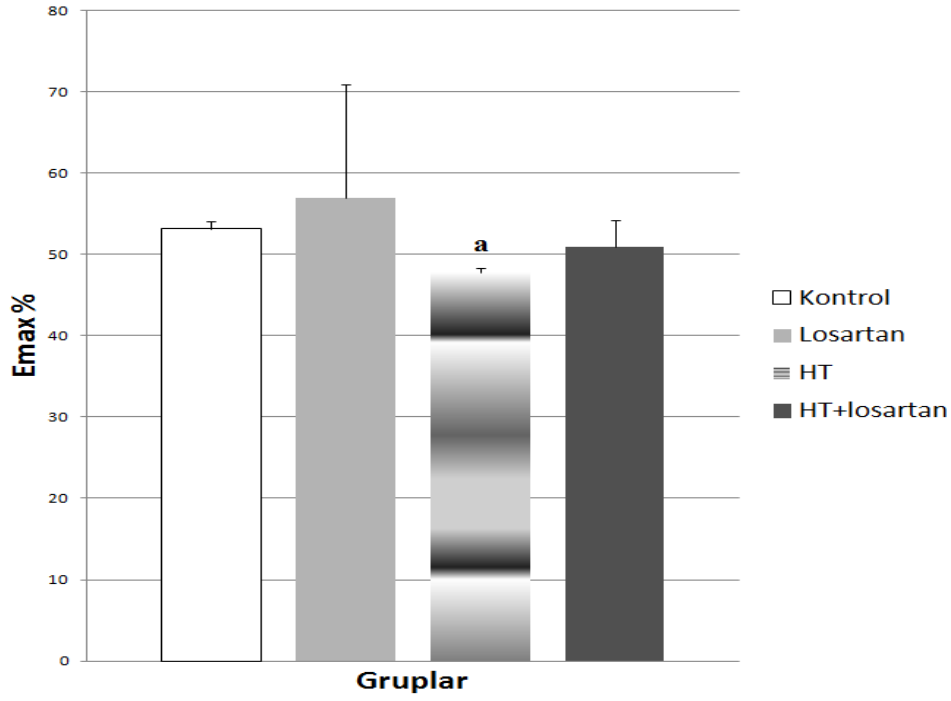


Şekil 9. Asetilkolin gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine perindopril etkisi

- a, Kontrol grubuna göre,
b, Perindopril grubuna göre,
e, Hipertansiyon grubuna göre anlamlılık vardır. $p < 0,05$

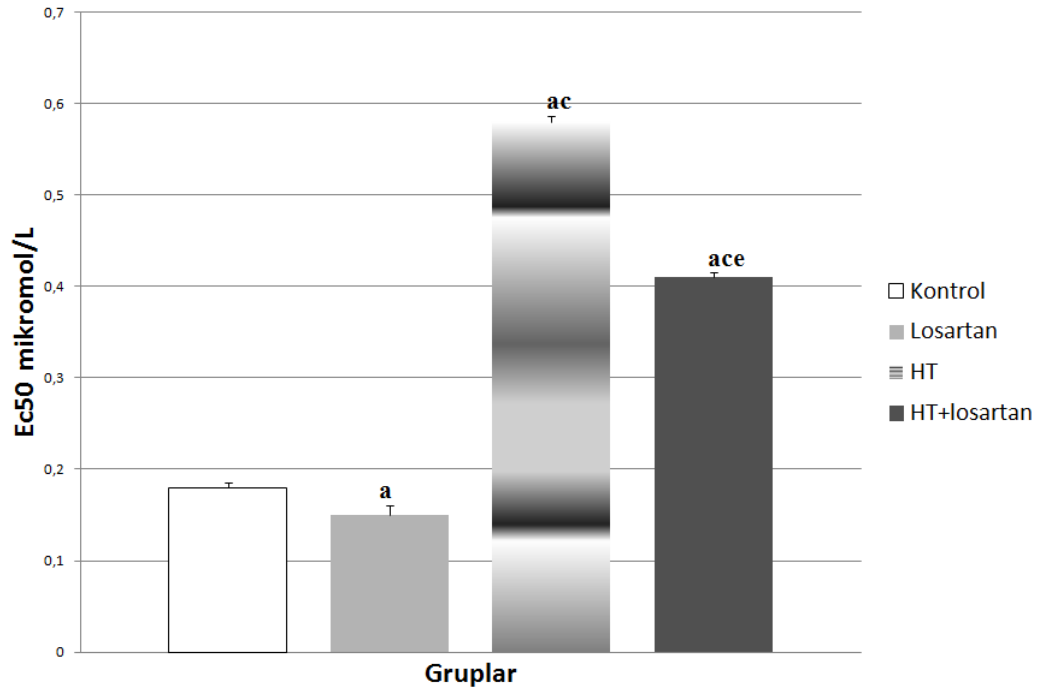
3.2.2.2. Ach gevşeme cevapları üzerine losartan tedavisinin etkileri

Asetilkolin uygulaması sonucunda meydana gelen damar gevşeme yanıtlarının EC50 ve Emax değerlerinin nasıl etkilendiği Şekil 10 ve 11’de gösterilmiştir. Şekil 10’da Emax değerleri incelendiğinde, tek başına 4 hafta L-NAME uygulaması kontrol grubuna göre Emax değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Tek başına losartan verilmesi Emax değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değiştirmedir. Losartan uygulaması L-NAME ve tuz ile beraber olduğunda L-NAME ve tuzun meydana getirdiği Emax değerlerindeki azalmayı da değiştirmedir ayrıca kontrol grubuyla arasında anlamlı fark bulunmadır. Şekil 11’de ise 4 hafta L-NAME ve tuz uygulamasının aortik Ach gevşeme cevaplarının Ec50 değerlerinde anlamlı oranda artışa neden olduğu gözlemlendi. Tek başına losartan uygulaması EC50 değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalttı. L-NAME ve tuz uygulamasına son iki hafta losartan tedavisi eklenmesi, 4 hafta L-NAME ve tuz uygulamasıyla meydana gelen EC50 artışını anlamlı miktarda azaltırken, kontrol grubuna göre EC50 değerleri hala anlamlı derecede yüksekti.



Şekil 10. Asetilkolin gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine losartan etkisi

a. Kontrol grubuna göre anlamlılık vardır. $p < 0,05$

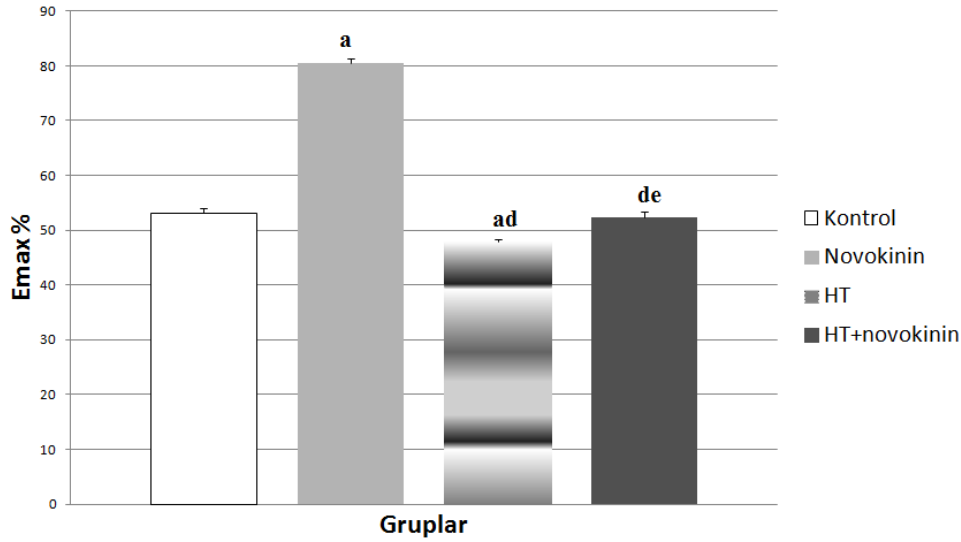


Şekil 11. Asetilkolin gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine losartan etkisi

a, Kontrol grubuna göre,
c, Losartan grubuna göre,
e, Hipertansiyon grubuna göre anlamlılık vardır. $p < 0,05$

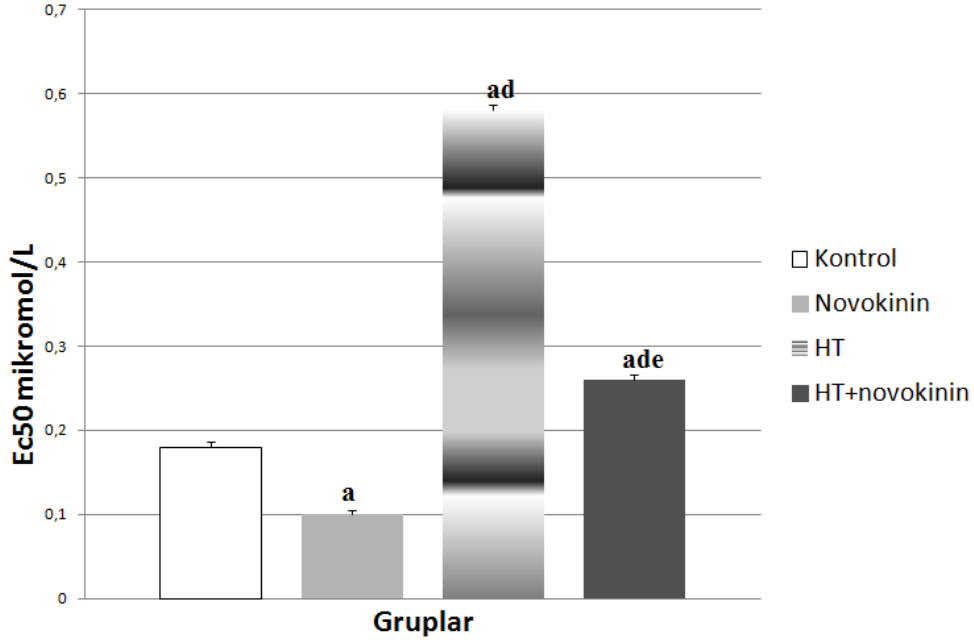
3.2.2.3. Ach gevşeme cevapları üzerine novokinin tedavisinin etkileri

Asetilkolin uygulaması sonucunda meydana gelen damar gevşeme yanıtlarının EC50 ve Emax değerlerinin nasıl etkilendiği Şekil 12 ve 13’de gösterilmiştir. Şekil 12’de Emax değerleri incelendiğinde, tek başına 4 hafta L-NAME uygulaması kontrol grubuna göre Emax değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Novokinin uygulaması tek başına Emax değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0,05$). Novokinin uygulaması L-NAME ve tuz ile beraber olduğunda L-NAME ve tuzun meydana getirdiği azalmayı anlamlı şekilde artırırken kontrol seviyesine yakın bir düzeye getirmiş, fakat sadece novokinin alan gruptan ise hala anlamlı derecede düşüktür. Şekil 13’de gösterildiği gibi 4 hafta L-NAME ve tuz uygulamasının aortik Ach gevşeme cevaplarının Ec50 değerlerinde anlamlı oranda artışa neden olduğu gözlemlendi. 2 hafta tek başına novokinin uygulaması EC50 değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalttı ($p<0,05$). L-NAME ve tuz uygulamasına son iki hafta novokinin tedavisi eklenmesi, 4 hafta L-NAME ve tuz uygulamasıyla meydana gelen EC50 artışını anlamlı miktarda azaltırken, kontrol grubuna göre EC50 değerleri hala anlamlı derecede yüksekti ($p<0,05$).



Şekil 12. Asetilkolin gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine novokinin etkisi

- a, Kontrol grubuna göre,
- d, Novokinin grubuna göre,
- e, Hipertansiyon grubuna göre anlamlılık vardır. $p<0,05$

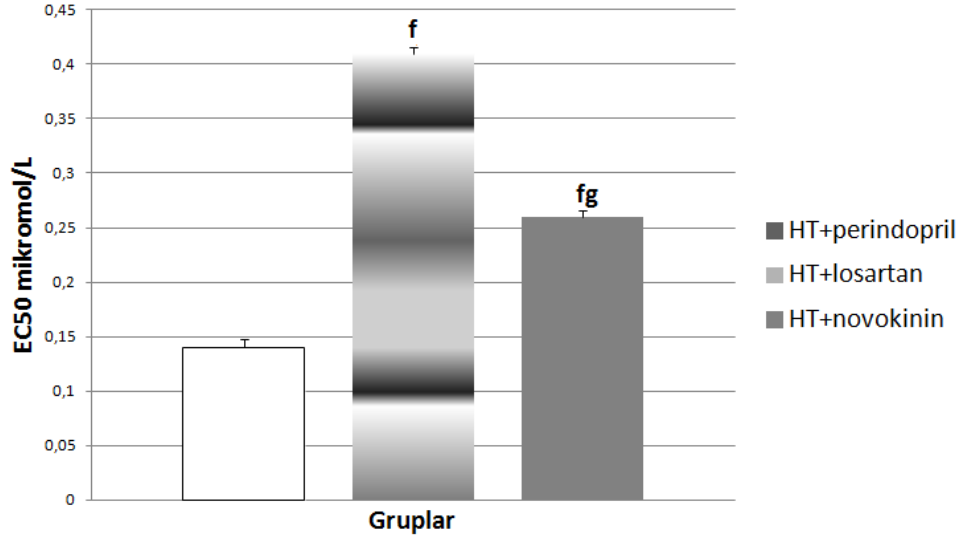


Şekil 13. Asetilkolin gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine novokinin etkisi

- a, Kontrol grubuna göre,
- d, Novokinin grubuna göre
- e, Hipertansiyon grubuna göre anlamlılık vardır. $p < 0,05$

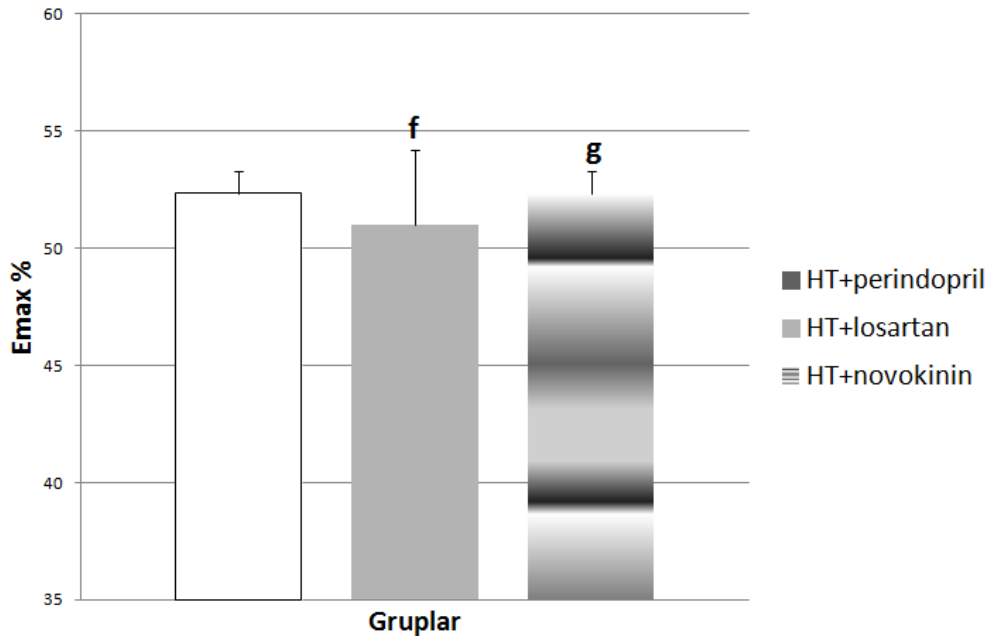
3.2.2.4. Hipertansif gruplarda asetilkolin gevşeme cevapları üzerine ilaç etkinliklerinin karşılaştırılması

Şekil 14’de görüldüğü gibi perindopril tedavisi alan hipertansif grupta EC50 değerleri losartan ve novokinin tedavisi alan gruba göre düşüktü ve sonuçlar anlamlıydı. Novokinin tedavisi alan grubun EC50 değerleri losartan tedavili gruba göre anlamlı düzeyde düşüktü. Şekil 15’de ise tedavi gruplarının Emax değerleri görülmektedir. Perindopril ve novokinin tedavisi alan gruplar arasında anlamlı fark yoktu fakat her iki grup Emax değerleri losartan tedavisi alan gruba göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0,05$).



Şekil 14. Ach gevşeme cevapları EC50 değerleri üzerine hipertansif gruplarda ilaç tedavilerinin etkileri

f, HT+Perindopril grubuna göre
g, HT+Losartan grubuna göre anlamlılık vardır. $p < 0,05$

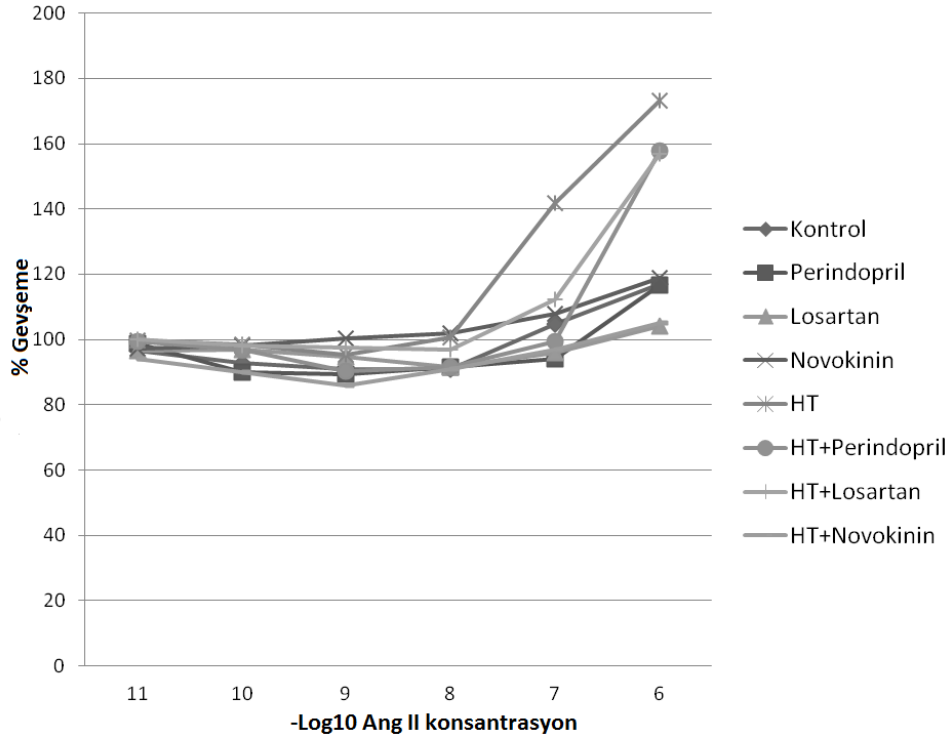


Şekil 15. Ach gevşeme cevapları Emax değerleri üzerine hipertansif gruplarda ilaç tedavilerinin etkileri

f, HT+Perindopril grubuna göre
g, HT+Losartan grubuna göre anlamlılık vardır. $p < 0,05$

3.2.3. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II cevapları

Şekil 16'da phe önkasılması sonrası artan dozlarda (10^{-11} - 10^{-6}) anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisi görülmektedir.



Şekil 16. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisi

Tablo 6. Phe önkasılması sonrası angII yanıtları

Dozlar	Kontrol	Perindopril	Losartan	Novokinin	HT	HT+Perindopril	HT+losartan	HT+Novokinin
11	-3,6±1,487	-1,25±3,77	-3,53±1,71	-2,76±2,34	-0,43±1,35	-0,7±3,18	0,04±0,6	-6±9,11
10	-7,1±2,22	-9,98±1,16	-3±2,73	-1,92±1,73	-1,56±2,78	-3,11±2,64	-1,85±0,46	-10±9,24
9	-9,15±2,68	-10,75±0,89	-5,33±2,9	0,39±3,53	-4,57±2,89	-9,74±7,91	-2,37±1,12	-14±11,86
8	-9,08±3,23	-8,33±3,65	-8,41±1,23	2±8,03	0,66±2,42	-8,36±6,28	-3,13±1,63	-9±15,07
7	4,58±3,13	-5,92±3,61	-3,99±2,67	8±10,65	41,87±11,05abcdefg	-0,48±7,36	12,18±4	-3±15,6
6	17,1±7,67	16,63±5,52	4,09±4,73	19±9,19	73,33±13,34abdfg	57,79±36,02ab	56,79±12,95da	5±10,58ce

Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir.

a; Kontrol grubuna göre anlamlılık

b; Perindopril grubuna göre anlamlılık

c; HT+ Perindopril grubuna göre anlamlılık vardır, p<0,05

d; Losartan grubuna göre anlamlılık

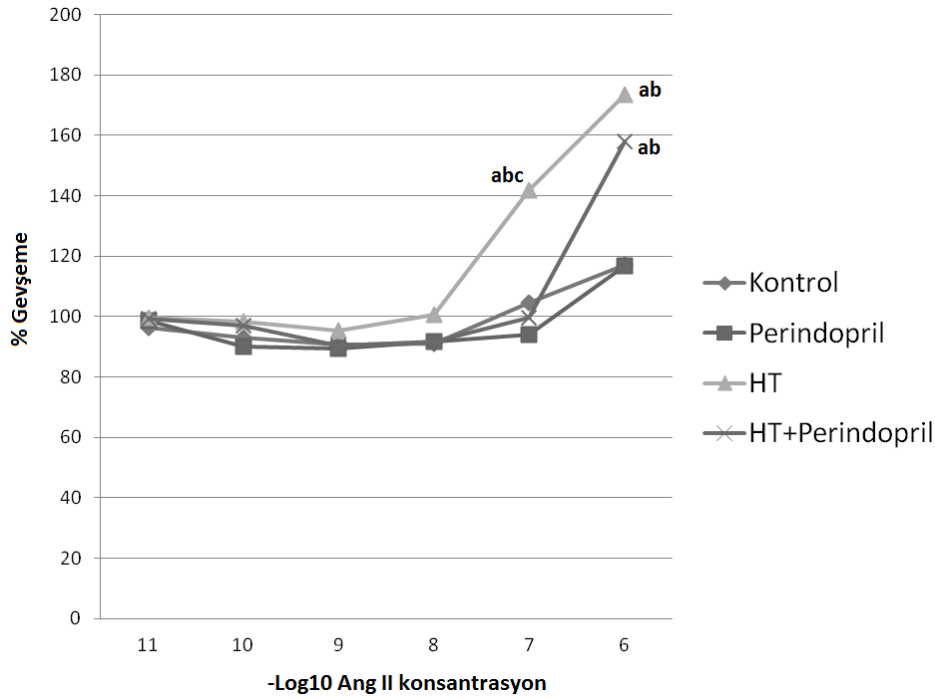
e; HT+ Losartan grubuna göre anlamlılık vardır

f; novokinin grubuna göre anlamlılık

g; HT+novokinin grubuna göre anlamlılık vardır. p<0,05

3.2.3.1. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine perindopril etkisi

Şekil 17’de phe önkasılması yapılmış damarlarda Anjiotensin II’nin meydana getirdiği doz cevap eğrisi görülmektedir. Artan dozlarda anjiotensin uygulanması hipertansiyon grubunda kontrol ve perindopril grubuna göre ilerleyen dozlarda (10^{-7} ve 10^{-6}) belirgin kasılma cevabı oluşturdu ve farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Perindopril tek başına kontrol grubuna göre anlamlı fark oluşturmadı. Hipertansiyon grubuna perindopril ilave edildiğinde angII’nin kasıcı etkisinin 10^{-7} M dozda kontrol grubu değerlerine yaklaştığı fakat 10^{-6} M dozda tekrar HT grubuna değerlerine ulaştığı gözlemlendi.

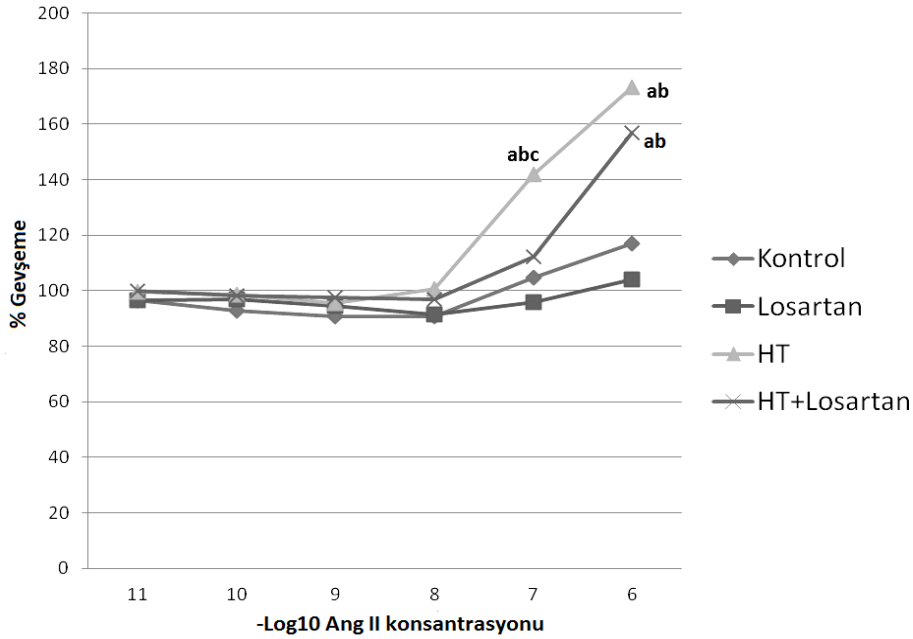


Şekil 17. Phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine perindopril etkisi

- a; Kontrol grubuna göre anlamlılık
- b; Perindopril grubuna göre anlamlılık
- c; HT+ Perindopril grubuna göre anlamlılık vardır, $p<0,05$

3.2.3.2. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine losartan etkisi

Şekil 18’de phe önkasılması yapılmış damarlarda Anjiotensin II’nin meydana getirdiği doz cevap eğrisi görülmektedir. Artan dozlarda anjiotensin uygulanması hipertansiyon grubunda kontrol ve losartan grubuna göre ilerleyen dozlarda (10^{-7} ve 10^{-6}) belirgin kasılma cevabı oluşturdu ve farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Losartan tek başına artan dozlarda kontrol grubunun altında değerlere ulaştı fakat anlamlı değildi. Hipertansiyon grubuna losartan ilave edildiğinde angII’nin kasıcı etkisinin 10^{-7} M dozda kontrol grubu değerlerine yaklaştığı fakat 10^{-6} M dozda tekrar HT grubu değerlerine ulaştığı gözlemlendi.

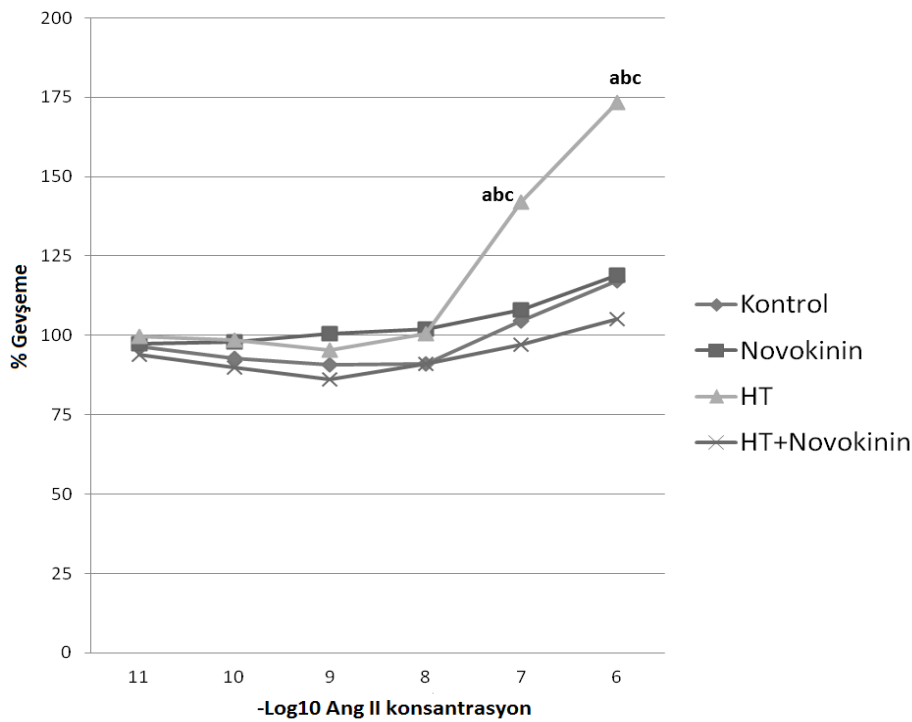


Şekil 18. Phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisine losartanın etkisi

- a; Kontrol grubuna göre anlamlılık
- b; Losartan grubuna göre anlamlılık
- c; HT+ Losartan grubuna göre anlamlılık vardır, $p<0,05$

3.2.3.3. Phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine novokininin etkisi

Şekil 19’da phe önkasılması yapılmış damarlarda Anjiotensin II’nin meydana getirdiği doz cevap eğrisi görülmektedir. Artan dozlarda anjiotensin uygulanması hipertansiyon grubunda kontrol, novokinin ve HT+novokinin gruplarına göre artan dozlarda (10^{-7} ve 10^{-6}) belirgin kasılma cevabı oluşturdu ve farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Novokinin tek başına ve hipertansif grupla beraber olduğunda kontrole göre anlamlı farklı değildi.

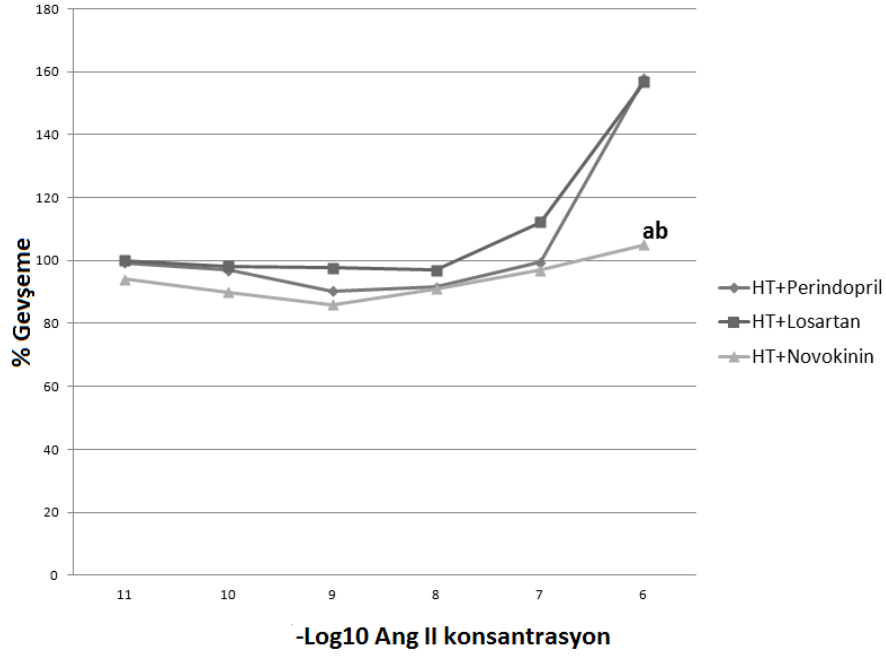


Şekil 19. Phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine novokininin etkisi

- a; kontrol grubuna göre anlamlılık
- b; novokinin grubuna göre anlamlılık
- c; HT+novokinin grubuna göre anlamlılık vardır. $p<0,05$

3.2.3.4. Phe önkasılması sonrası AngII cevaplarına ilaç etkinliklerinin karşılaştırılması

Şekil 20’de görüldüğü gibi submaksimal phe kasılması sonrası Ang II doz cevap eğrisi alındığında novokinin tedavili grupta 10^{-6} M dozda perindopril ve losartan tedavili gruplara göre daha az kasılma cevabı olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.



Şekil 20. Phe önkasılması sonrası angII cevaplarına hipertansif gruplarda ilaçların etkisi

a; Hipertansiyon+perindopril grubuna göre anlamlılık
b; Hipertansiyon+losartan grubuna göre anlamlılık $p < 0,05$

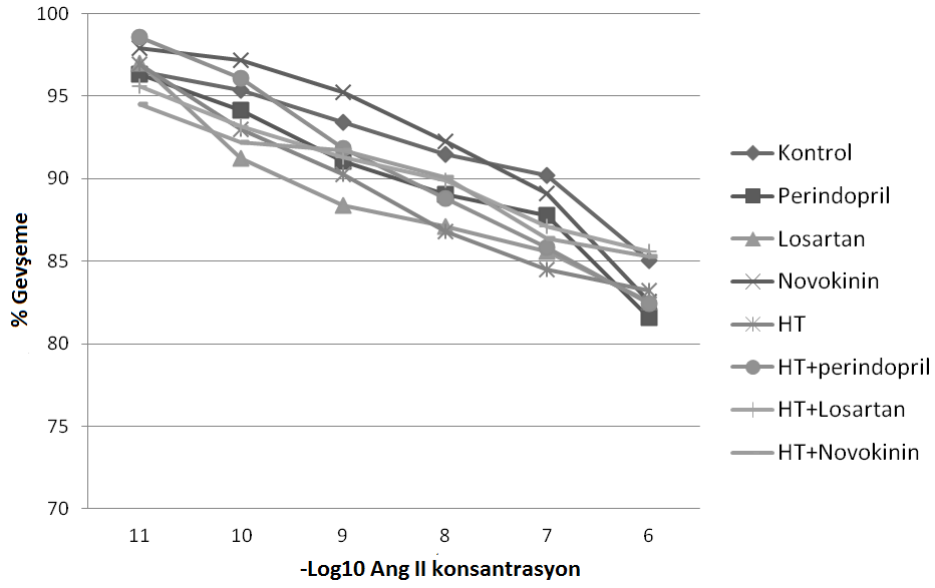
3.2.4. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisi

Şekil 21'de anjiotensin AT1 reseptör antagonisti losartan varlığında phe önkasılması yapılmış damarlarda anjiotensin II'nin (10^{-11} mol/l- 10^{-6} mol/l) meydana getirdiği doz cevap eğrisi görülmektedir. Anjiotensin II damarlarda gevşeme yönünde etki gösterdi, oluşan cevaplar bütün gruplarda benzerdi ve gruplar arası anlamlı fark gözlemlenmedi.

Tablo 7. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII yanıtları

Dozlar	Kontrol	Perindoril	Losartan	Novokinin	HT	HT perindopril	HT losartan	HT novokinin
11	-3,52±2,77	-3,68±1,74	-3±4,57	-2,11±0,74	-3,05±2,53	-1,43±0,74	-4,4±2,35	-5,5±14,83
10	-4,65±2,73	-5,85±1,99	-8,8±5,12	-2,8±0,76	-7,03±3,65	-3,9±1,55	-6,8±3,55	-7,8±13,6
9	-6,61±3	-8,96±2,16	-11,6±5	-4,79±0,81	-9,76±3,74	-8,14±2,73	-8,7±4,16	-8,3±12,89
8	-8,5±2,78	-10,97±2,08	-12,9±4,59	-7,73±1,58	-13,21±5,41	-11,18±2,96	-10,1±5,87	-9,9±13,52
7	-9,79±2,57	-12,23±2,3	-14,4±4	-10,92±2,04	-15,5±5,91	-14,2±4,19	-12,9±6,79	-13,6±19,75
6	-14,98±2,9	-18,42±3,66	-17,46±5,09	-17,46±5,02	-16,8±6,63	-17,6±7,29	-14,4±11,34	-14,7±13,01

Veriler Ort±SH olarak ifade edilmiştir.



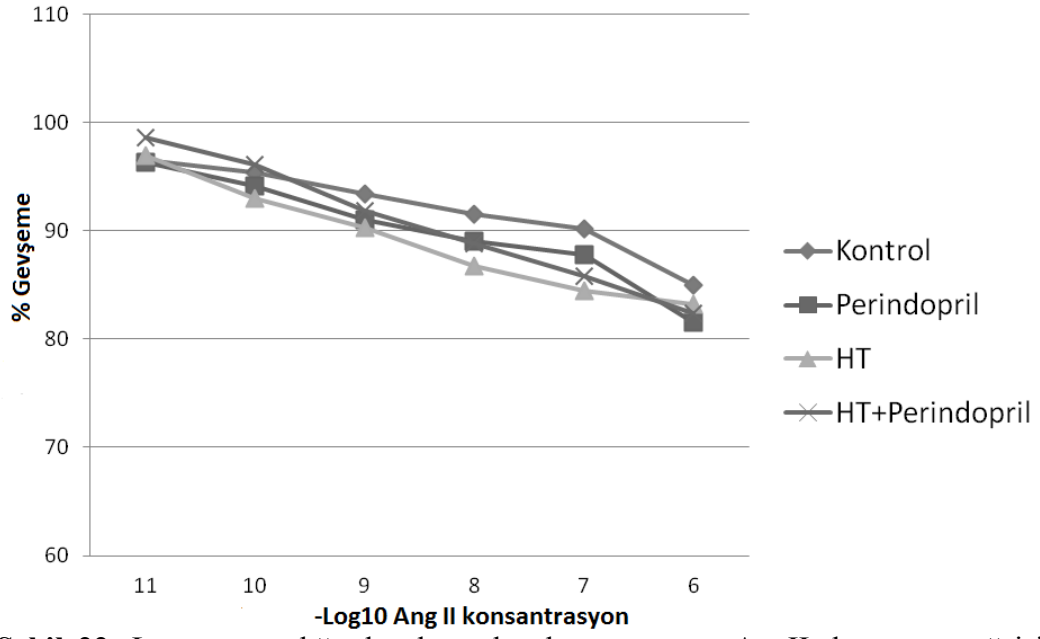
Şekil 21. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisi

3.2.4.1. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine perindopril etkisi

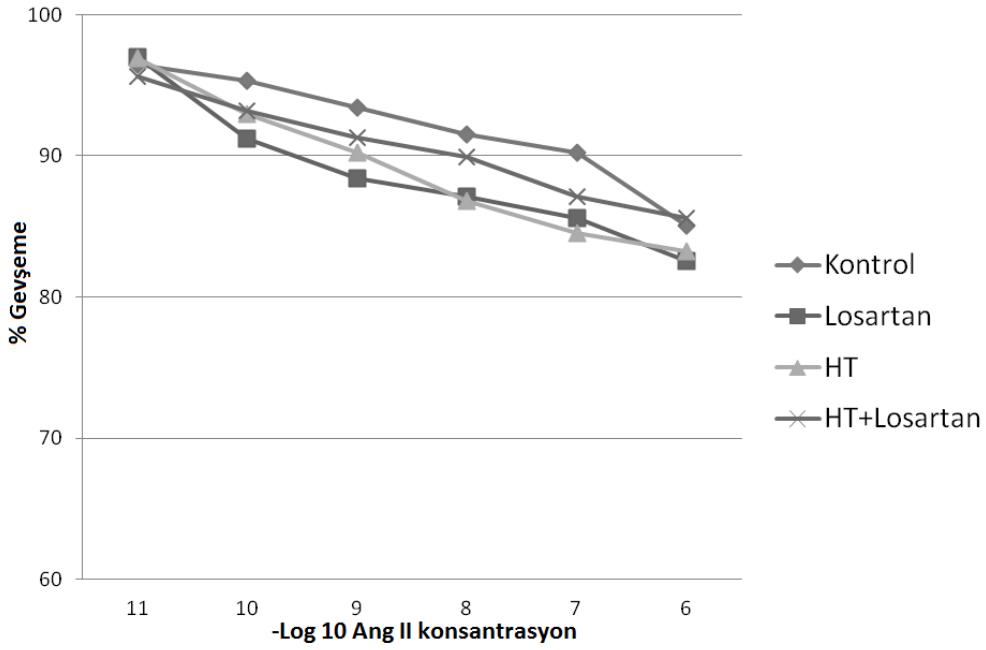
Şekil 22'de losartan varlığında phe önkasılması yapılmış damarlarda anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine perindopril etkisi görülmektedir. 2 hafta yalnızca perindopril verilen grup ile, 4 hafta L-NAME son iki hafta yine perindopril tedavisi alan gruplar arasında, ayrıca bahsedilen perindopril uygulanmış gruplar ile kontrol ve hipertansiyon grubu (yalnızca 4 hafta L-NAME uygulaması) arasında anjiotensin II'ye verilen dilatasyon cevapları benzerdi ve gruplar arası anlamlı fark bulunamadı.

3.2.4.2. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine losartan etkisi

Şekil 23'de losartan varlığında phe önkasılması yapılmış damarlarda anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine losartanın etkisi görülmektedir. 2 hafta yalnızca losartan verilen grup ile 4 hafta L-NAME son iki hafta ilave olarak losartan tedavisi alan gruplar arasında, ayrıca bahsedilen losartan uygulanmış gruplar ile kontrol ve hipertansiyon grupları (yalnızca 4 hafta L-NAME uygulaması) arasında anjiotensin II'ye verilen dilatasyon cevapları benzerdi ve gruplar arası anlamlı fark bulunamadı.



Şekil 22. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine perindopril etkisi



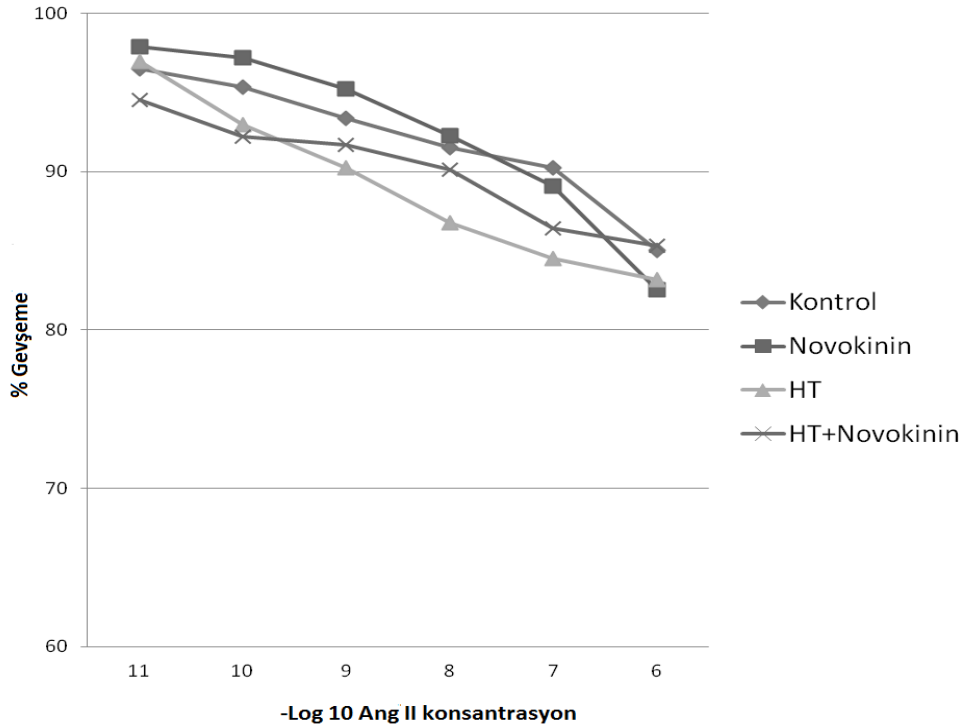
Şekil 23. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisine losartan tedavisinin etkisi

3.2.4.3. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine novokininin etkisi

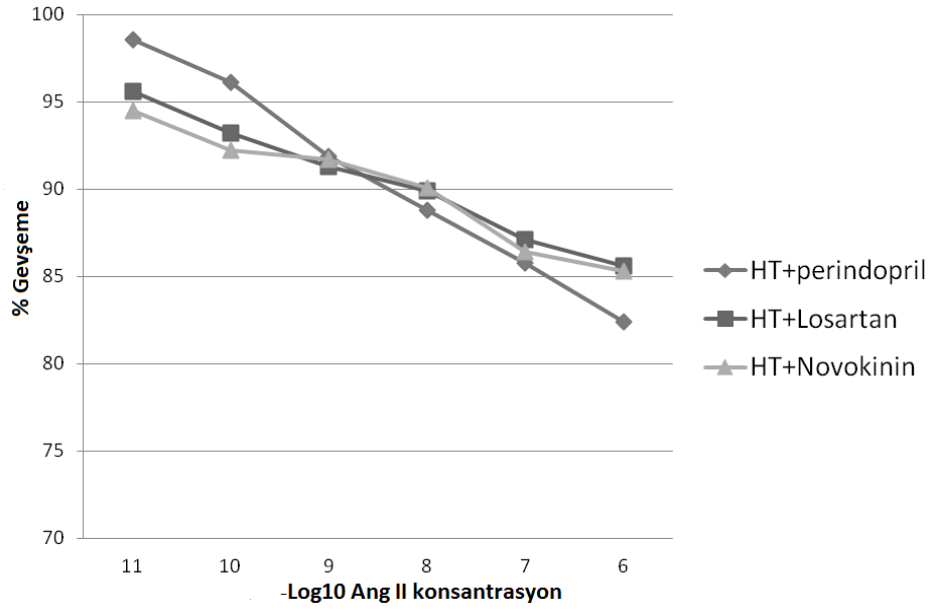
Şekil 24'de losartan varlığında phe önkasılması yapılmış damarlarda anjiotensin II'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine novokininin etkisi görülmektedir. 2 hafta yalnızca novokinin verilen grup ile 4 hafta L-NAME ve tuz son iki hafta ilave olarak novokinin tedavisi alan gruplar arasında, ayrıca bahsedilen novokinin uygulanmış gruplar ile kontrol ve hipertansiyon grupları (4 hafta L-NAME ve tuz uygulaması) arasında anjiotensin II'ye verilen dilatasyon cevapları benzerdi ve gruplar arası anlamlı fark bulunamadı.

3.2.4.4. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası AngII'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine ilaç etkinliklerinin karşılaştırılması

Şekil 24'de Losartan varlığında phe önkasılması sonrası AngII'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine hipertansif gruplarda ilaç tedavilerinin etkisi görülmektedir. Tedavi grupları arasında anjiotensin II ye cevap yönünden anlamlı fark görülmemiştir.



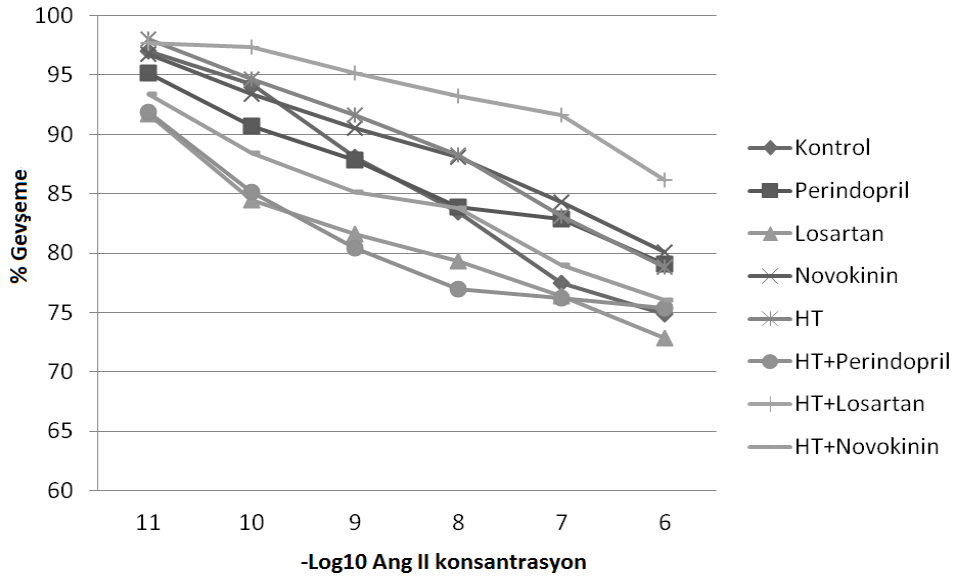
Şekil 24. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası angII doz cevap eğrisine novokinin tedavisinin etkisi



Şekil 25. Losartanlı ortamda phe önkasılması sonrası angII cevaplarına hipertansif gruplarda ilaçların etkisi

3.2.5. Losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisi

Şekil 25'de losartanlı ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması yapılmış damarlarda 10^{-11} - 10^{-6} arası dozlarda anjiotensinII'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisi görülmektedir. Damar cevapları bütün gruplarda benzer şekilde gevşeme eğilimdedir ve gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir.



Şekil 26. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisi

Tablo 8. Losartan ve PD123319 varlığında Phe önkasılması sonrası angII cevapları ortalama

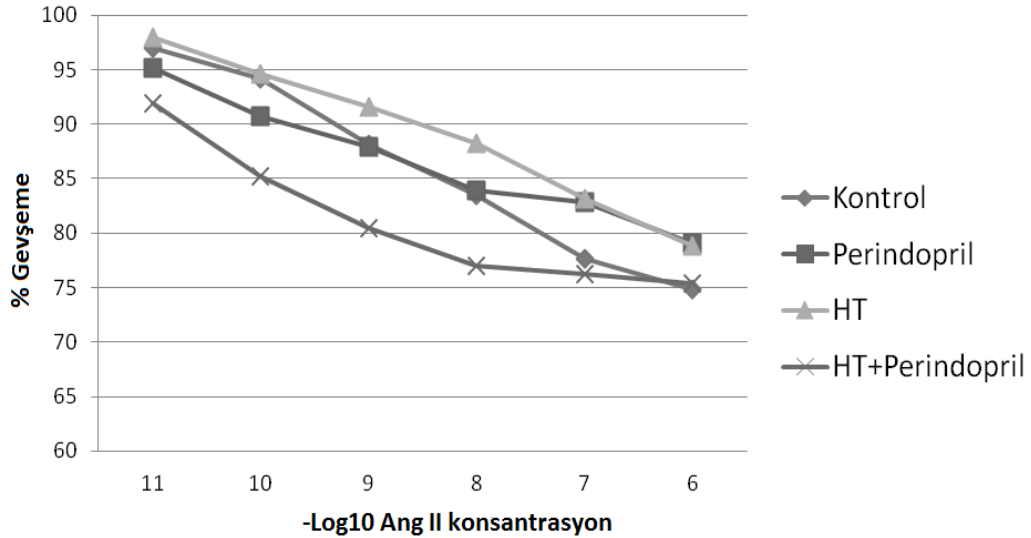
Dozlar	Kontrol	Perindopril	Losortan	Novokinin	Ht	Ht+perindopril	Ht+losartan	Ht+novokinin
11	-3±1,53	-4,8±2,24	-8,31±4,11	-3,27±1,95	-2±2,45	-8,12±1,76	-2,34±2,66	-6,6±7,74
10	-5,8±3,5	-9,3±3,23	-15,57±5,77	-6,62±2,42	-5,34±2,75	-14,82±2,6	-2,6±3,22	-11,6±7,35
9	-11,87±3,48	-12,13±3,29	-18,41±2,94	-9,44±2,96	-8,36±4,21	-19,54±2,3	-4,8±4,1	-14,9±7,62
8	-16,55±6,01	-16,12±4,97	-20,67±5,13	-11,88±1,5	-11,77±4,32	-22,99±4,65	-6,78±5,01	-16,2±9,6
7	-22,49±5,97	-17,16±5,34	-23,58±8,28	-15,66±1,25	-16,87±5,45	-23,8±4,23	-8,4±6,52	-21±8,51
6	-25,14±8,68	-20,9±7,14	-27,17±6,57	-19,93±1,04	-21,18±11,3	-24,6±6,24	-13,87±8,76	-24±4,98

Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir

.

3.2.5.1. Losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine perindopril etkisi

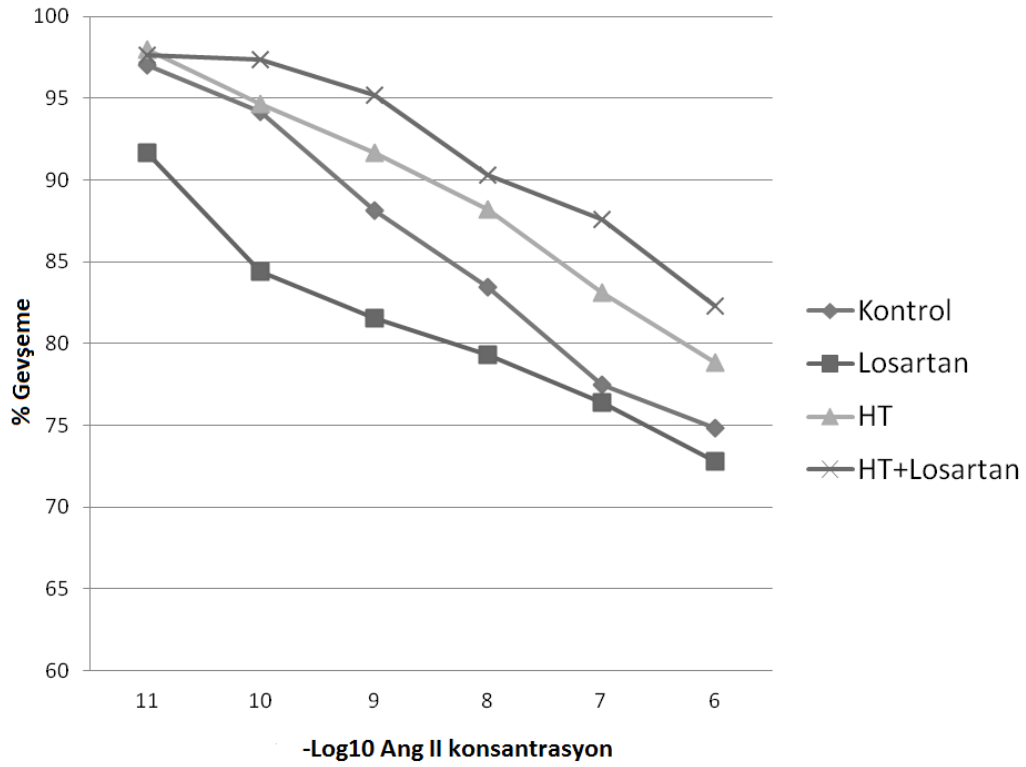
Şekil 27'de losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası Ang II nin damarlarda meydana getirdiği yanıtlar görülmektedir. Perindopril tedavisi alan gruplarla kontrol ve hipertansiyon (4 hafta L-NAME ve tuz) grupları arasında Ang II'ye verilen cevaplarda anlamlı fark görülmemiştir.



Şekil 27. Losartan ve P123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine perindopril etkisi

3.2.5.2. Losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine losartan etkisi

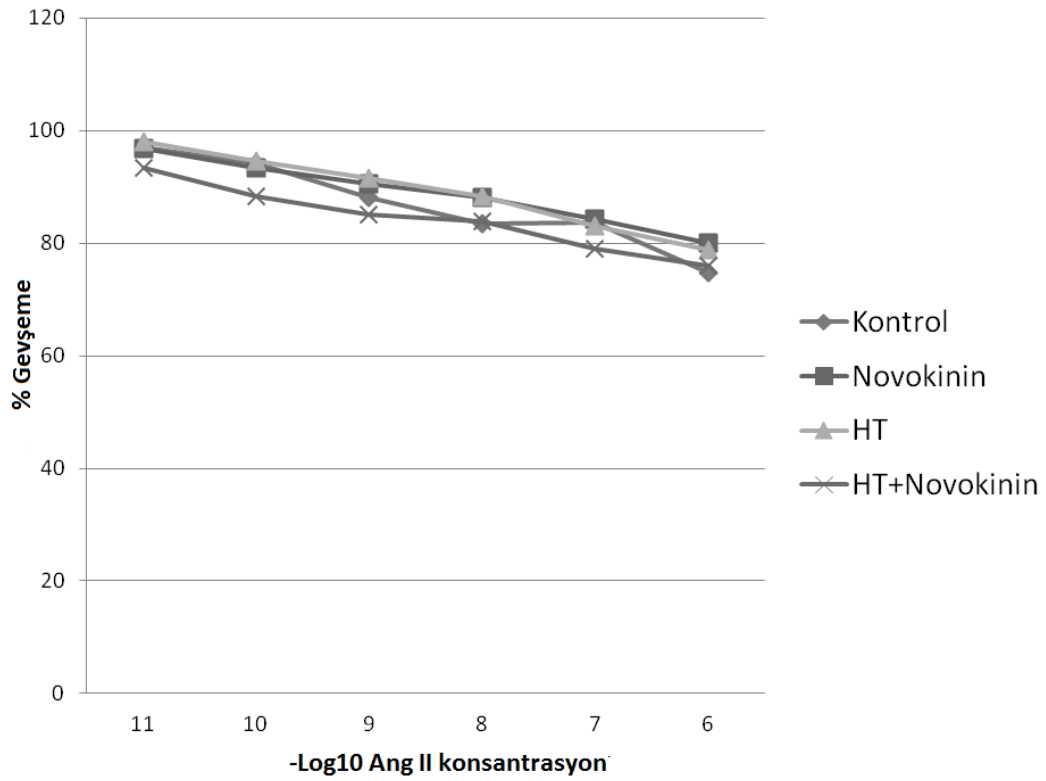
Şekil 28'de losartan ve PD123319'lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensinII'nin damarlarda meydana getirdiği yanıtlar görülmektedir. Losartan tedavisi alan gruplarla kontrol ve hipertansiyon (4 hafta L-NAME ve tuz alan grup) grupları arasında Ang II'ye verilen cevaplarda anlamlı fark görülmemiştir.



Şekil 28. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine losartan etkisi

3.2.5.3. Losartan ve PD123319’lu ortamda phe önkasılması sonrası anjiotensin II doz cevap eğrisine novokininin etkisi

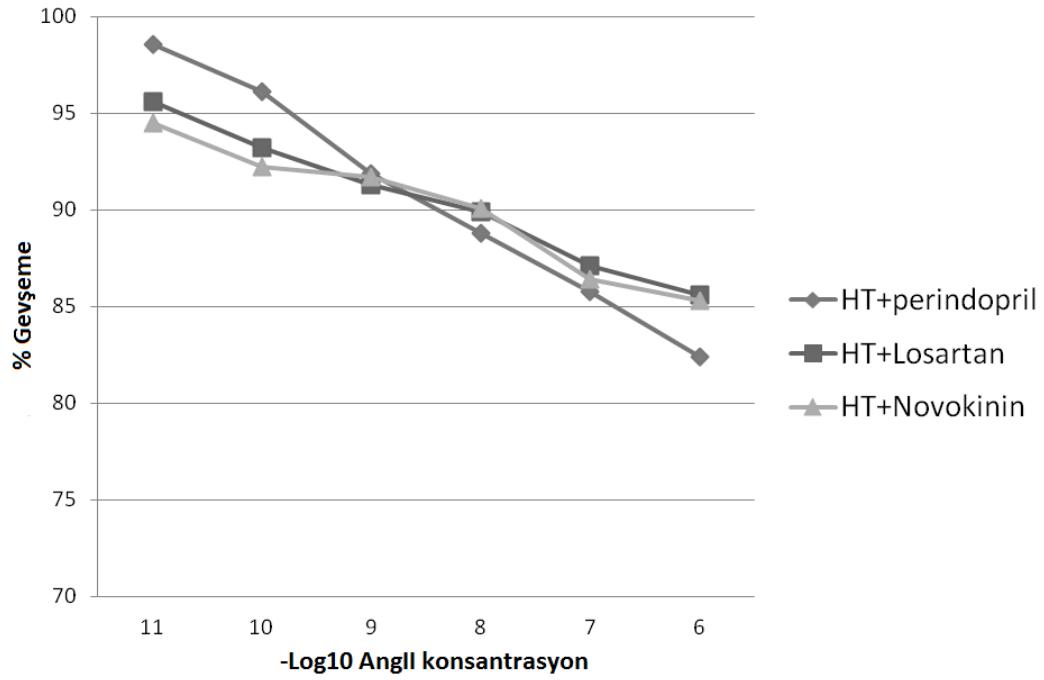
Şekil 29’da losartan ve PD123319’lu ortamda phe önkasılması sonrası Ang II’ nin damarlarda meydana getirdiği yanıtlar görülmektedir. Novokinin tedavisi alan gruplarla kontrol ve hipertansiyon (4 hafta L-NAME ve tuz alan grup) grupları arasında anjiotensin II’ye verilen cevaplarda anlamlı fark görülmemiştir.



Şekil 29. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII doz cevap eğrisine novokininin etkisi

3.2.5.4. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine ilaç etkilerinin karşılaştırılması

Şekil 30'da Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası AngII'nin meydana getirdiği doz cevap eğrisine hipertansif gruplarda ilaç tedavilerinin etkisi görülmektedir. Tedavi grupları arasında anjiotensin II ye cevap yönünden anlamlı fark görülmemiştir.



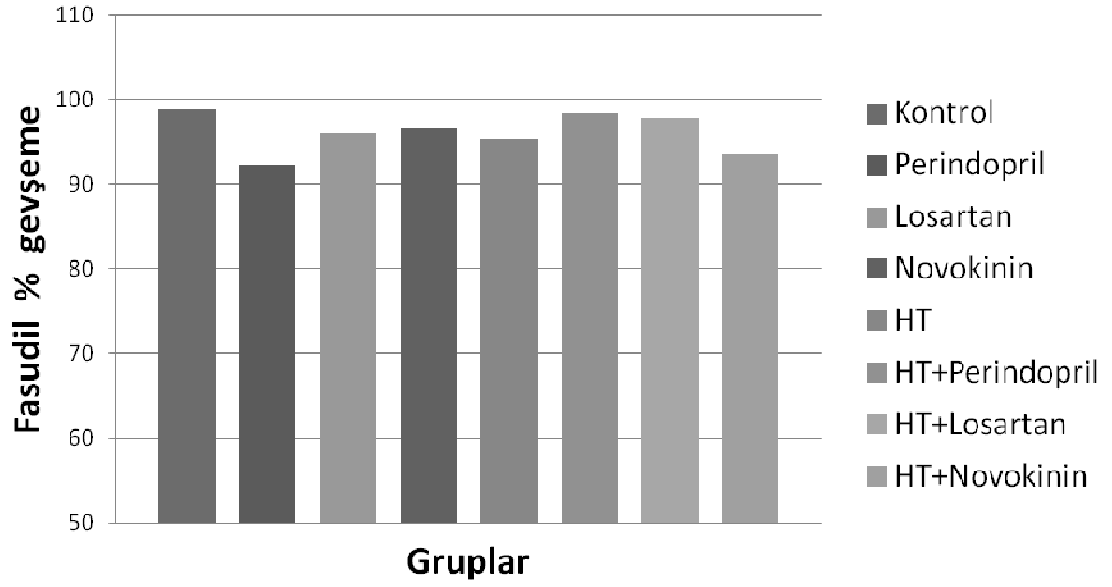
Şekil 30. Losartan ve PD123319 varlığında phe önkasılması sonrası angII cevaplarına hipertansif gruplarda ilaçların etkisi

3.2.6. Losartan varlığında phe önkasılması sonrası fasudil (10-5mol/l) cevapları

Şekil 31’de losartan varlığında phe önkasılması sonrası 10^{-5} mol/l dozda fasudilin meydana getirdiği dilatasyon cevapları grafiksel olarak görülmektedir. Gruplar arasında dilatasyon yanıtı açısından anlamlı fark görülmedi.

Tablo 9. Phe önkasılması sonrası 10^{-5} dozda fasudil uygulamasına verilen cevapların ortalama değerleri

Kontrol	98,8±1,68
Perindopril	92,26±4,21
Losartan	95,96±4,21
Novokinin	96,56±2,05
HT	95,41±4,33
HT+Perindopril	98,33±2
HT+Losartan	97,86±6,24
HT+Novokinin	93,55±2,39



Şekil 31. Fenilefrin ön kasılması sonrası fasudile bağlı gevşeme cevapları

3.3.Aortik dokularda gen ekspresyon çalışmaları

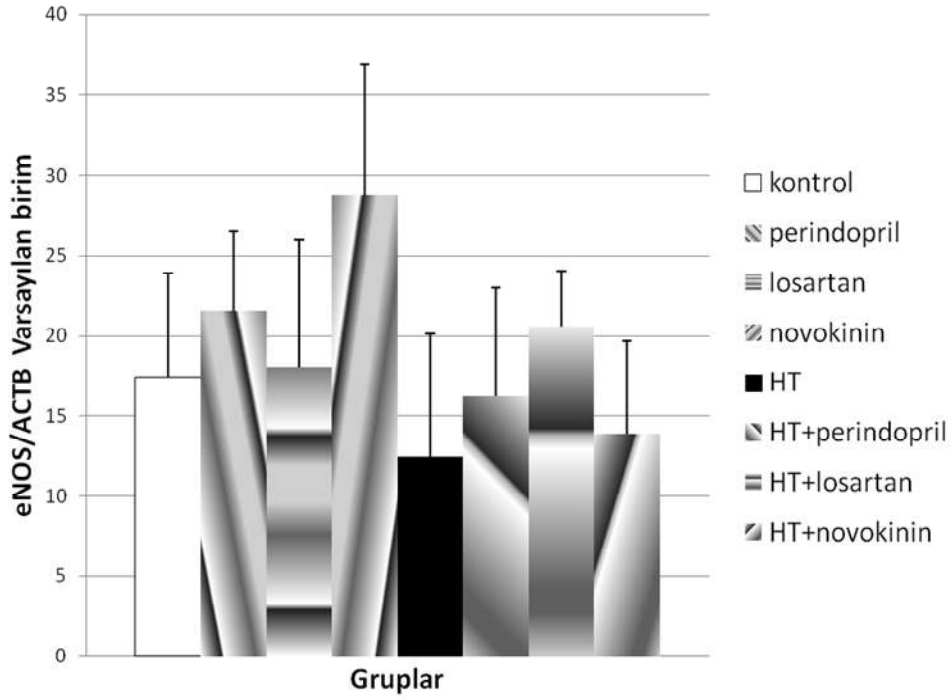
Tablo 10. Rho kinaz, eNOS, PRMT, NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri

	Rhokinaz ekspresyon	eNOS ekspresyon	PRMT ekspresyon	NADPH ekspresyon
Kontrol	9,15±2,35	17,4±6,54	34,56±18,23	47,2±14,3
Perindopril	8,1±2,2	21,6±4,89	28,7±13,7	35,4±15,8
Losartan	6,6±2,7	18,04±7,96	24,8±14,1	24,67±8,6
Novokinin	7,6±6,13	28,78±8,13	29,1±12,6	47,1±11,8
HT	22,7±13,3	12,45±7,69	57,87±18,02	57,4±17,6
HT+perindopril	11,57±2,79	16,25±6,78	40,75±14,23	39,85±12,7
HT+losartan	14,84±6,44	20,56±3,5	38,67±11,8	33,2±9,4
HT+novokinin	9,95±2,86	13,89±5,82	41,5±10,7	52±8

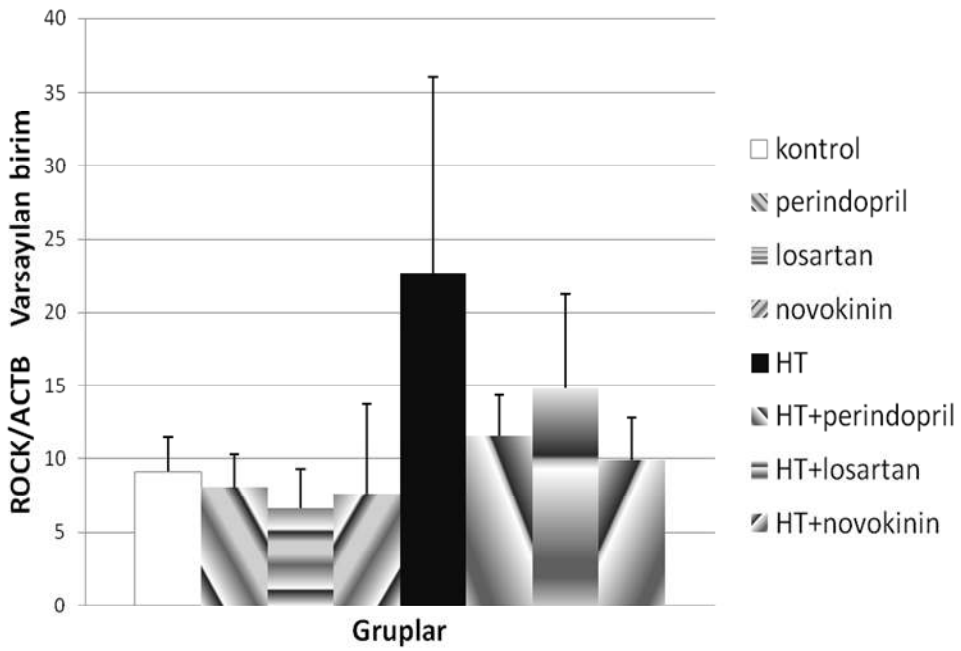
Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir

Şekil 32’da deney gruplarında eNOS ekspresyon düzeyleri görülmektedir. Hipertansif grupta azalma, sadece novokinin alan grupta ise ekspresyon düzeylerinde artış gözlemlenirken gruplar arasında anlamlı fark belirlenmedi.

Rho kinaz ekspresyon düzeyleri Şekil 33 de görülmektedir. Hipertansif grupta ekspresyon düzeylerinde artış görüldü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi.



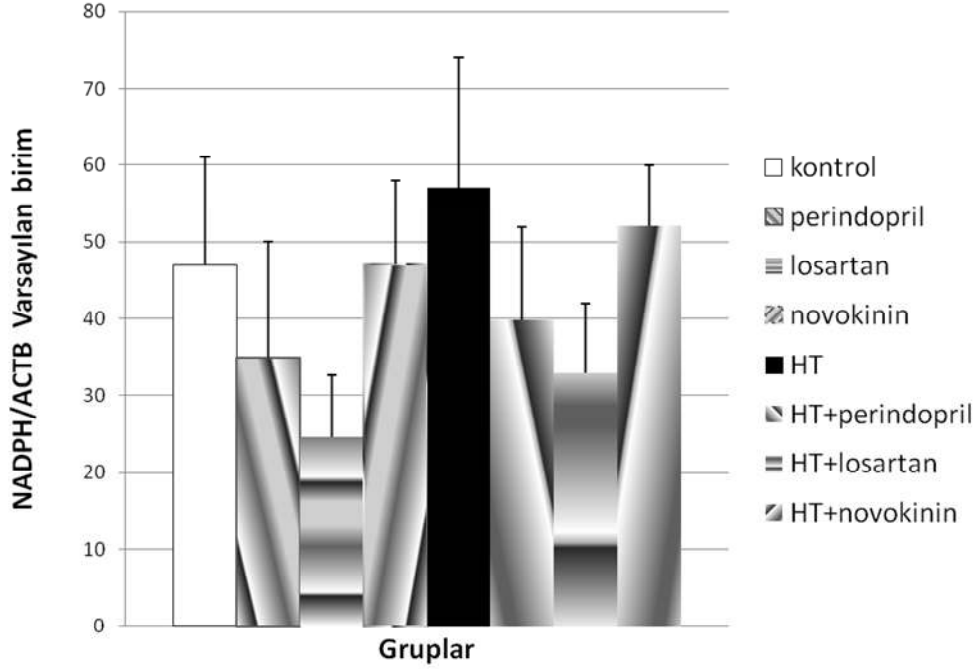
Şekil 32. Aort dokusunda eNOS ekspresyon düzeyleri



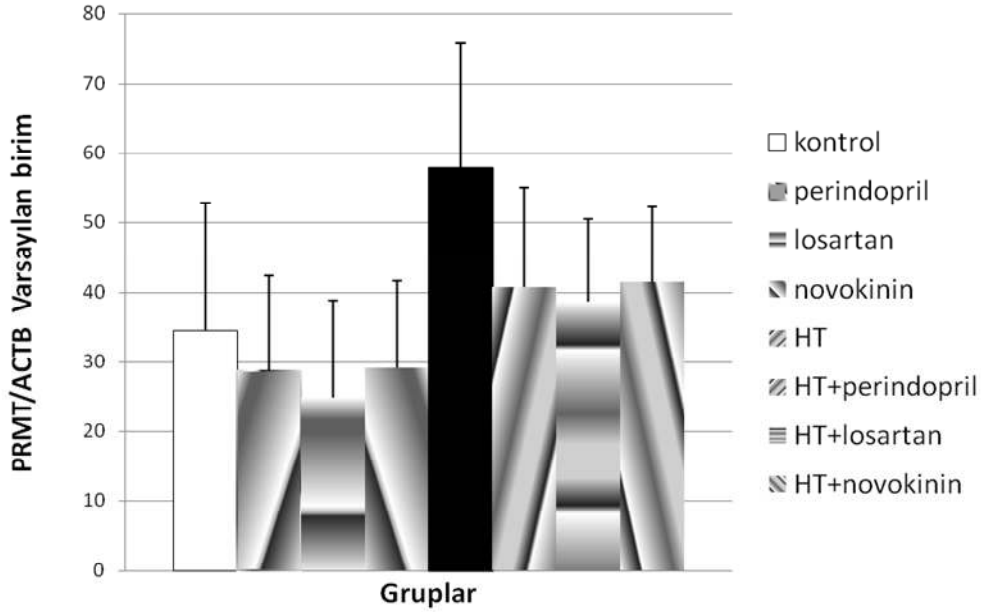
Şekil 33. Aort dokusunda Rho kinaz ekspresyon düzeyleri

Deney gruplarında NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri Şekil 34’de görülmektedir. Gruplar arasında ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı fark görülmüdü.

Şekil 35’de ADMA’yı sentezleyen protein arginin metiltransferaz (PRMT)RA enzimi ekspresyon düzeyleri görülmektedir. Hipertansif grupta ekspresyon düzeylerinde artış görülürken, artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 34. Aort dokusunda NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri



Şekil 35. Aort dokusunda PRMT ekspresyon düzeyleri

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda, kan basınçları L-NAME ve tuz alan gruplarda 14. ve 28. günde anlamlı yüksek, tedavi gruplarının hepsinde 28. günde anlamlı düşüktü. Kan basıncında en yüksek değişim perindopril tedavisi alan grupta gözlemlendi. Hipertansif grupta PRMT ve Rho kinaz ekspresyon düzeylerinde artış, eNOS da ise azalma, tedavi gruplarında ise PRMT, NADPH oksidaz ve Rho kinaz ekspresyonunda azalma, eNOS düzeylerinde ise artış gözlemlendi, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ach EC50 değerleri hipertansif grupta anlamlı yüksek, Emax değerleri ise anlamlı düşüktü. Tedavi alan hipertansif gruplarda Ach EC50 değerleri anlamlı düşük, Emax değerleri ise anlamlı yüksekti. Tek başına ilaç alan gruplarda ölçülen parametrelerde bir değişiklik gözlenmedi.

Sekiz hafta 60 mg/kg L-NAME verilen ratlarda kan basıncı bazal seviyeye göre anlamlı miktarda yükselmiştir (167). Diğer bir çalışmada ratlar iki gruba ayrılarak 10mg/kg/gün ve 100mg/kg/gün dozlarında 14 gün boyunca L-NAME verilmiş, 14.gün sistolik kan basınçları sırasıyla 167 ± 7 , 172 ± 10 olarak elde edilmiştir (168). Bu çalışmada ratlara 4 hafta boyunca NOS inhibitörü L-NAME ve içme suyu ile tuz verilmiş, kan basınçlarında 0.güne göre 14.günde anlamlı artışlar elde edilmiştir. 28. gündeki kan basınçlarıyla 14.gün arasında anlamlı fark bulunmazken, başlangıca göre yine kan basınçları yüksekti.

Losartan, perindopril ve novokinin ile 2 hafta tedavi alan gruplarda kan basınçlarında 14.güne göre 28.günde anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir. Ayrıca tedavi grupları arasında en fazla yüzde kan basıncı azalması perindopril tedavisi alan grupta gözlemlendi, bu azalma losartan alan gruba göre anlamlı fakat novokinin alan gruba göre anlamlı değildi. Elde edilen sonuçlar literatürle benzerlik göstermektedir. Spontan hipertansif ratlarda yapılan bir çalışmada farklı dozlarda oral ve intravenöz olmak üzere iki farklı yolla novokinin verilmesi sistolik kan basıncında anlamlı düşüşler sağlamış, AT2 reseptör antagonisti PD123319 verilmesi ise hipotansif etkiyi bozmuştur (166). AT2 reseptör defisit ratlarda novokinin kan basıncını düşürememiştir. Siklooksijenaz inhibitörü indometazin ve prostaglandin IP3 reseptör antagonisti CAY10441 verildiğinde de yine novokininin hipotansif etkisi bloke olmuştur. Bu da AT2 reseptörü ile prostaglandinler ve reseptörleri arasındaki etkileşimi ortaya koymaktadır. AT2 reseptörünün özellikle böbreklerde vazodilatör

prostaglandinlerle etkileşimi böbrek kan akımını artırmakta, basınç natriürezisi sağlamakta, renin sentezini ve Ang II oluşumunu azaltabilmektedir (17, 169). Özellikle AT2 reseptörünün renin sentezini baskılayabilmesi, bu reseptörün agonizmasının hipertansif tedavideki önemini daha da artırmıştır.

On hafta losartan tedavisi alan 14 haftalık spontan hipertansif ratlarda yapılan çalışmada kan basıncı anlamlı düzeyde düşmüştür (170). Farklı bir çalışmada 8 hafta 60 mg/kg L-NAME verilen ratlarda kan basıncı bazal seviyeye göre anlamlı miktarda yükselmiş, 4 hafta losartan tedavisi alan grupta ise hipertansif gruba göre kan basıncı anlamlı düzeyde düşmüş fakat bu düşüş bazal seviyeye inememiştir (171). Aynı çalışmada ADE inhibitörü enalapril tedavisi alan ratlarla losartan tedavisi alan grup arasında kan basıncı değerleri benzerdi. Losartan tedavisi alan gruba bradikinin B₂ reseptör antagonisiti ikatibant verildiğinde ise antihipertansif etki bloke olmuş, kan basıncı değerleri hipertansif grup düzeylerinde kalmıştır (171). Bu durum AT1 reseptör antagonizması sonucu AT2 reseptörlerinin uyarılması, AT2 reseptörlerinin ise bradikinin ile etkileşerek vazodilatör etki göstermesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir (171). Dolayısıyla AT2 reseptörleri AT1 antagonistlerinin efikasitesine katkıda bulunmaktadır (172). Spontan hipertansif ratlarda yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca candesartan (2mg/kg), hidralazin (16mg/kg) ve perindopril (3mg/kg) tedavi grupları oluşturulmuş, ortalama kan basıncı değerlerinde hipertansif gruba göre en fazla azalma perindopril grubunda belirlenmiştir (176). Yüksek doz hidralazin (24mg/kg) ve candesartan (2mg/kg) ile hidralazin (16mg/kg) alan gruplarda ortalama kan basıncı değerleri perindopril tedavisi alan gruba göre çok daha fazla azalma göstermiştir (173). Ayrıca bu çalışmada diğer bir çok çalışmadan farklı olarak, hipertansif grup rezistan arterlerinde AT2 reseptör ekspresyonunda azalma, antihipertansif tedavi alan gruplarda ise AT2 reseptör ekspresyonunda ve vazodilatör fonksiyonlarda artış belirlenmiştir.

Kuşkusuz NO vasküler hemostazın korunmasında anahtar role sahiptir; platelet agregasyonunu, endotele monosit adezyonunu, anormal düz kas proliferasyonunu inhibe ederek bunu gerçekleştirir. Vazodilatörlerin özellikle NO'nun varlığındaki azalmalar endotelial disfonksiyonla sonuçlanmaktadır. NO düzeyindeki azalmalar sempatik sistem hiperaktivasyonuna ve katekolamin

düzeyinde artışa sebep olmakta, sempatik hiperaktivasyon ise endotelial disfonksiyon gelişimine katılımcı olmaktadır.

Bu çalışmanın in-vitro kısmının ilk aşamasında organ banyosuna artan dozlarda fenilefrin verilerek torasik aortta meydana gelen kasılma cevapları izlendi. Fenilefrinle olan kasılma cevapları hipertansif grupta kontrole göre artmıştı fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. Diğer gruplar arasında fenilefrine verilen cevaplar yönünden anlamlı fark bulunamadı. Benzer şekilde Kalliovalkama ve ark. (174) yaptıkları çalışmalarda da içme suyu ile 4 hafta L-NAME verilen grupla kontrol grubu arasında noradrenaline verilen kasılma cevaplarında anlamlı fark bulunamamıştır. Spontan hipertansif ratlarda yapılan diğer bir çalışmada organ banyosuna 10^{-5} M dozda losartan verildikten sonra yapılan fenilefrin kasılmasında kontrol grubuna göre azalma gözlemlenmiştir (175). Buna göre AT1 reseptörlerinin fenilefrin etkisini kolaylaştırabileceği tahmin edilmiştir. Ayrıca ortamda L-NAME varlığında bu durumun bozulması losartanın bu etkisinin NO ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bir böbrek, bir klip (1b,1k) modeliyle hipertansiyon oluşturulan diğer çalışmada hipertansif grubun izole organ banyosuna asılan aortik halkalarının noradrenaline verdiği kasılma cevapları kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti (140, 176). Ayrıca kontrol grubuyla hipertansif grubun noradrenalin kasılması EC50 değerleri anlamlı derecede farklı bulunmuştur. ADE inhibitörü enalapril veya AT1 antagonisti losartan tedavisi alan hipertansif gruplarda ise anlamlı farklılıklar bozulmuştur. Bu hipertansiyon modelinde RAAS'ın hızlıca aktivasyonu ve bu sistem ile endotel disfonksiyon arasındaki ilişki elde edilen sonuçların nedeni olarak gösterilmiştir (176). Yapılan çalışmada da hipertansif grupta fenilefrin Emax değeri kontrole göre artma eğilimi gösterdi fakat artışlar anlamlı değildi. Diğer bir çalışmada spontan hipertansif ratlarda kontrol grubuna göre fenilefrine daha fazla kasılma cevabı elde edilmiştir (177).

Yapılan çalışmanın in vitro kısmının ikinci aşamasında grupların asetilkoline verdikleri gevşeme cevapları gözlemlendi. Hipertansiyon grubunun asetilkolin EC50 değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı artma, Emax değerlerinde ise anlamlı azalma belirlendi. Tedavi gruplarında maksimum EC50 değerleri hipertansiyon grubuna göre anlamlı miktarda azalma gösterdi. Asetilkolin EC50 değerleri ile kan basınçlarındaki düşüşlerin birbirine paralel olduğu görüldü. Antihipertansif tedavi ile

endotelial disfonksiyon arasındaki ilişkinin önemi de gözlemlendi. Ayrıca perindopril ve novokinin tedavisi alan gruplarda Emax değerleri hipertansif gruba göre anlamlı olarak yüksekti. Perindopril tedavisi alan grubun Emax değerleri losartan tedavili gruptan anlamlı olarak yüksek, novokinin tedavili gruptan ise farksızdır. EC50 değerleri perindopril tedavisi alan grupta diğer tedavi gruplarına göre anlamlı olarak düşüktür. Novokinin tedavili grubun EC50 değerleri ise losartan tedavisi alan gruptan anlamlı düzeyde düşüktür. Başka bir çalışmada spontan hipertansif rat aortlarında asetilkoline bağlı gevşeme cevapları kontrole göre anlamlı miktarda düşmüştür (178). Bu ise spontan hipertansif ratlarda aortta NO salınımındaki azalmaya bağlanmıştır. Diğer bir çalışmada ratlar iki gruba ayrılarak 10mg/kg/gün ve 100mg/kg/gün dozlarda 14 gün boyunca L-NAME verilmiş, 14.gün sistolik kan basınçları sırasıyla 167 ± 7 , 172 ± 10 olarak elde edilmiştir (168). Her iki grubun asetilkoline verdiği dilatasyon cevaplarında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu sonuçlara göre her iki doz L-NAME yeteri kadar NO salınımını azaltabildiği, kan basıncını yükseltebildiği ve dolayısıyla asetilkolin gevşeme cevabını benzer şekilde düşerebildiği sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada 10mg/kg L-NAME alan grupta fenilefrin ve anjiotensinII'ye olan kasılma cevapları kontrol grubuyla fark göstermemişken, 100mg/kg L-NAME alan grupta ise kasılma cevaplarında azalma görülmüştür. Yüksek doz L-NAME'nin damarları vazokonstriktör ajanlara karşı duyarsızlaştırabileceği, bunu ise membranda bulunan farklı reseptörler aracılığıyla yapabileceği düşünülmüştür. Spontan hipertansif ratlarda yapılan diğer bir çalışmada, 8 hafta boyunca losartan tedavisi alan grupta tedavi almayan gruba göre asetilkolin gevşeme cevapları anlamlı şekilde düzelmiştir (69). Buna göre renin anjiotensin sisteminin baskılanması endotelial disfonksiyonun düzeltilmesi açısından önemli bir hedef olduğu önerilebilir. Kaptopril ve losartan tedavisi alan iki farklı spontan hipertansif rat grubunun her ikisinde de asetilkoline verilen dilatasyon cevapları tedavi almayan gruba göre anlamlı şekilde artmıştır (179). Sonuçlar renin anjiotensin sistemini baskılayan ilaçların NO'nun biyoyararlanımını artırabilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmada kan basınçlarındaki düşüslere benzer olarak, aach Emax değerlerindeki en fazla yükselme ve Ec50 değerlerindeki en fazla düşüş yine perindopril alan grupta elde edilmiştir. Bu sonuç antihipertansif etki ile asetilkoline duyarlılık artışı arasındaki ilişkiden kaynaklanabilir.

Bu çalışmanın in vitro kısmının daha sonraki protokollerinden birinde fenilefrin önkasılması sonrası anjiotensin doz cevap eğrisi elde edildi. Hipertansif grupta Ang II kasılmaları 10^{-7} ve 10^{-6} 'lı dozlarda kontrol grubuna göre artış gösterdi ve artışlar anlamlıydı. Bu sonuç L-NAME indüklü kan basıncındaki artışların yüksek dozlarda Ang II'ye olan aorttaki vazokonstriktör etkiyi artırabileceğini düşündürmüştür.

Perindopril tedavisi alan grup ve losartan tedavili grup ile hipertansiyon grupları arasında sadece 10^{-7} M Ang II dozunda anlamlı fark meydana geldi. Novokinin tedavili grup aortları ise hipertansif gruba göre 10^{-7} ve 10^{-6} 'lı dozların her ikisinde de anlamlı şekilde az kasılmıştı. Bu sonuca göre novokininin etkisiyle AT2 reseptör üzerindeki agonistik etkinin artışı, AT1 reseptörü aracılığıyla olan vazokonstriktör etkiyi azalttığı düşünülebilir. Başka bir çalışmada 2k1c modeliyle hipertansiyon yapılmış ratların aortik halkalarının Ang II'ye olan kasılma cevaplarında azalma belirlenmiştir (14). Hipertansif grupta AT2 reseptör upregulasyonun kasılma cevaplarında azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir (14).

Bundan sonraki protokolde losartan varlığında fenilefrin önkasılması sonrası Ang II doz cevap eğrisi elde edildi ve gruplar arası anlamlı fark gözlemlenmedi. Diğer aşamada losartan ve AT2 reseptör antagonisti PD123319'lu ortamda fenilefrin önkasılması sonrası Ang II doz cevap eğrisi çıkarıldı, gruplar arası anlamlı fark bulunamadı. Sonraki protokolde ise fenilefrin önkasılması sonrası ortama fasudil verilerek gevşeme cevapları karşılaştırıldı ve gruplar arası anlamlı fark bulunamadı. Buna göre Rho kinaz bütün gruplarda fenilefrin indüklediği $\alpha 1$ reseptör aracılı kasılmada benzer oranda etkili olduğu ileri sürülebilir. Farklı bir çalışmada spontan hipertansif ratlar iki gruba ayrılmış, losartan ve kaptopril ile tedavi grupları oluşturulmuştur. 12 hafta boyunca tedavi alan ratların aortları izole organ banyosuna asılarak Ang II kasılma cevapları incelenmiştir. Losartan tedavili grupta Ang II kasılmaları tedavi almayan gruba göre azalmıştı, fakat kaptopril tedavisi alan grupta Ang II kasılmalarında tedavi almayan gruba göre artış belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre kronik ADE inhibisyonu AT1 reseptörü upregulasyonuna neden olabilirken, losartan AT1 reseptör down regülasyonuna neden olabilmektedir (179). Spontan hipertansif rat ve Wistar kyoto cinsi ratlarda yapılan bir çalışmada 14 gün boyunca ratlara valsartan uygulanmış, daha sonra dekapite edilen ratların süperior mezenterik

arterlerinde fenilefrin, asetilkolin ve Ang II doz cevap eğrileri oluşturulmuştur (180). Fenilefrin ve asetilkolin cevaplarında gruplar arası fark gözlenmemiştir. Spontan hipertansif rat gruplarında valsartanlı ortamda fenilefrin önkasılması sonrası Ang II verilmesi dilatasyon cevaplarına yol açmıştır. Ortama L-NAME verildiğinde valsartan tedavisi alan hipertansif grupta dilatasyon cevapları daha fazla bozulmuştur. Elde edilen bu verilerden AT1 antagonistlerinin AT2 reseptör ekspresyonunu artırabildiği ve AT2 nin dilatör etkisine NO'nun katkıda bulunabildiği sonuçları çıkarılmıştır (180). Benzer başka bir çalışmada valsartan verilmiş SHR'lerde verilmeyen gruba göre organ banyosuna valsartan verildiğinde fenilferin önkasılması sonrası Ang II anlamlı düzeyde daha fazla gevşemeye neden olmuştur (140). Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmadan mezenterik arterler kullanılmıştır. İn vitro ortama AT2 antagonisti PD123319 verildiğinde Ang II'nin meydana getirdiği gevşeme cevapları bozulmuştur. Tedavi almayan SHR grubuna in vitro ortamda rho kinaz inhibitörü fasudil verildiğinde Ang II'nin indüklediği dilatasyon artmıştır ve hipertansiyonda rho kinazın damar tonusu üzerindeki etkisi böylece ortaya çıkmıştır. Tedavi alan hipertansif gruba in vitro fasudil eklenmesi dilatasyonu etkilememiştir. Yine bu çalışmada da AT1 reseptör blokajının AT2 reseptör upregülasyonuna neden olabileceği vurgulanmış ve upregüle olan AT2 reseptörünün Rhokinaz inhibisyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (140).

Mevcut çalışmadan elde edilen RT-PCR sonuçları incelendiğinde, L-NAME ve tuz ile oluşturulan hipertansif grupta Rho kinaz, PRMT gibi hipertansiyonla ilişkili enzimlerin ekspresyon düzeylerinde artış görüldü, fakat artışlar bizim modelimizde istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Yine hipertansif grupta endotel üzerinde koruyucu etkileri olan eNOS enzimi ekspresyon düzeyleri azalma eğiliminde olmakla birlikte istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı.

Benzer bir çalışmada 8 hafta L-NAME (60mg/kg/gün) verilen ratlarla, 8 hafta L-NAME ile 4.haftadan sonra 4 hafta losartan (10mg/kg/gün) verilen ratlarda aortik dokuda eNOS ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Sadece L-NAME alan grupta eNOS düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşmüştür. L-NAME ile birlikte losartan tedavisi alan grupta eNOS ekspresyonu L-NAME ve kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur (167). Colonna ve ark. (171) tarafından yapılan bir çalışmada yine 8 hafta L-NAME verilen ratlarla L-NAME'ye ilaveten 4 hafta

enalapril verilmiş ratlarda eNOS ekspresyon düzeyleri ölçülmüş, L-NAME alan grupta ekspresyon düşerken tedavi grubunda ekspresyon düzeyleri kontrol seviyesine gelmiştir. RAAS baskılayan ilaçların bu etkileri endotelial disfonksiyonu geri çevirmelerinde rol oynamaktadır. Başka bir çalışmada perindoprilin eNOS ekspresyonunu artırdığı, oksidatif stresi azalttığı gözlemlenmiştir (181). SHR'lerde yapılan diğer bir çalışmada iki tedavi grubu oluşturulmuş, bir gruba telmisartan (1mg/kg/gün) 2 hafta boyunca, diğer gruba losartan (10mg/kg/gün) aynı sürede verilmiştir (182). Tedavi sonunda elde edilen kan basınçları her iki tedavi grubunda birbirine yakın bulunmuştur. Aortta eNOS ekspresyon düzeyi tedavi gruplarında anlamlı olarak artış gösterirken, NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri ise yine tedavi gruplarında anlamlı olarak azalmıştır. β 1 selektif blokörü nebivolol ile spontan hipertansif ratlarda yapılan bir çalışmada kan basıncında anlamlı düşmenin yanı sıra aort dokusunda eNOS ekspresyonunda artış, PRMT ekspresyonunda ise azalma belirlenmiştir (183). Yapılan başka bir çalışmada, fasudilin ön koldaki vazodilatör etkisinin, hipertansif hastalarda normotansiflere göre daha çok olduğu gösterilmiştir. Sodyum nitroprusit (SNP) vazodilatör etkisinin ise her iki grupta benzer olduğu bildirilmiştir (184). Fasudilin ve SNP'nin arter içi infüzyonu ile kalp hızında ve sistemik arteriyel basıncında önemli bir değişikliğe yol açtığı belirlenmemiştir (185). Bu sonuçlar, hipertansif hastalarda periferik damar direncindeki artışın patojenezinde Rho/ROCK yolunun etkin rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Anjiotensin II indüklü hipertansiyonda farelere NADPH oksidaz inhibitörü gp91-dstat peptidi verilmesi kan basıncını ve süperoksit üretimini anlamlı şekilde düşürmüştür (186). İnsanlarla yapılan çalışmalarda, esansiyel hipertansiyonla ilişkili artmış vasküler NADPH oksidaz ekspresyonu arasındaki ilişki arterlerden alınan biyopsilerle gösterilmiştir (187). Ayrıca hipertansif hastalardaki endotelial disfonksiyon artmış NADPH oksidaz bağımlı ROS üretimine bağlanmaktadır (111).

Deneyisel hayvan modellerinde vasküler NO sentezindeki değişimlerin, ateroskleroz ve restenozun ilerlemesine yol açtığı gözlemlenmiştir (83). Nitrik oksit sentezinin bozulması, kardiyovasküler olaylar için bağımsız bir gösterge olduğu kabul edilmiştir. Son dönem böbrek hastalarında renal klirensin azalması sonucu yükselen plazma ADMA düzeyleri, diyaliz ile düşürülmesi sonucu endotel fonksiyonunda düzelme gerçekleşmiştir (188, 189). Daha sonra yapılan birçok

araştımda, yükselen ADMA düzeyleri ile endotelial disfonksiyon arasındaki güçlü ilişki birçok defa gösterilmiştir (83). Klinik olarak sağlıklı 115 kişide yapılan çalışmada yüksek ADMA düzeyleri ile karotid arter intima- media kalınlığı arasında anlamlı ilişki gözlemlenmiştir (190). Orta yaşlı 150 kişiyi içeren çalışmada yüksek ADMA düzeylerinin, akut koroner hastalık riskini 3.9 kat arttırdığı bildirilmiştir (191). Ayrıca yüksek ADMA düzeylerine sahip hastalarda, çeşitli kardiyovasküler komplikasyon gelişme riskinin artmış olduğu saptanmıştır. Bu bilgilere bağlı olarak ADMA yeni bir kardiyovasküler risk faktörü olarak tanımlanmakta ve buna göre ADMA düşürmeye yönelik stratejiler yeni farmakolojik yaklaşımlar arasında yerini alabileceği düşünölmektedir (89).

Arteriyel hipertansiyon iskemik kalp hastalığı, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği ve serebrovasküler olayların gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Arteriyel hipertansiyon periferik dirençte artışla karakterizedir, bu artış hipertansiyonun ve komplikasyonlarının gelişimde oldukça önemlidir. Etiyolojisi hala yeterince açık olmayan esansiyel hipertansiyonun gelişiminde birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle RAAS aktivasyonu hipertansiyon gelişiminde önemli rol oynar (192). Bu nedenle RAAS antihipertansif tedavide önemli bir terapötik hedefdir (193). ADE inhibitörleri ve ARB'ler bu sistemi baskılamada kullanılan major ilaç gruplarıdır. Bu ilaçlar kan basıncı düşürmede başarılı olmalarına rağmen hipertansif hastalarda kardiyovasküler komplikasyonları yeterince azaltamamaktadırlar. Bunun nedenleri ise tedaviye uyum sorunları, hipertansiyona yol acabilecek başka fizyopatolojik durumlara bağlı olabilse de bir ölçü de RAAS'nin yetersiz blokajına bağlı olabileceği düşünölmektedir. Buna bağlı olarak RAAS'ı baskılayacak yeni tedavi arayışlarına gidilmiştir. AT2 reseptörü vazodilatasyon, renal sodyum reabsorpsiyonda azalma, inflamasyonda ve myosit hipertrofisinde azalma gibi etkiler göstererek AT1 reseptörüne zıt etkiler oluşturur (194, 195). Dolayısıyla selektif AT2 reseptör agonizması kardiyovasküler korunma için yeni bir yaklaşım olarak önerilebilir.

Günümüzde hipertansiyon tedavisinde renin anjiotensin sistemini baskılamak için anjiotensin reseptör blokörleri ve enzim inhibitörleri çok sık olarak reetelendirilmektedir. Çünkü RAAS hipertansiyon fizyopatolojisinde AT1 reseptörü aracılığıyla baskın etki göstermektedir. Diğer taraftan AT2 ve Mas reseptörü gibi

RAAS üyeleri ise ihmal edilmiştir. Her iki reseptörde AT1'e, sitokinlere ve büyüme faktörlerine ters etkiler oluşturarak renin anjiotensin sisteminin koruyucu kısmını oluşturabilirler (196). AT2 ve Mas reseptörü AT1'e göre daha az ilgi görsede gelecekte bu değişebilir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar bu reseptörlerin ilaçlar için potansiyel bir hedef olabileceğini ortaya çıkarmıştır (197, 198). Mas reseptörünün anjiotensin (1-7) indüksiyonu aracılığı vazodilatasyon yaptığı ve bunda NO'nunda rol oynadığı belirlenmiştir (199). Spontan hipertansif ratlarda anjiotensin (1-7) analoglarının kan basıncını düşürdüğü görülmüştür (200).

Sonuç olarak çalışmamızda NOS inhibisyonu ve tuz ile oluşturulan hipertansiyonda asetilkolin EC50 ve Emax değerlerinde anlamlı düşme; artan dozlarda anjiotensin II kasılma cevaplarında anlamlı artış (AT1 reseptör duyarlılığında artış) tespit edilmiştir. Yine bu model hipertansiyonda Rho kinaz, PRMT ekspresyon düzeylerinde (ADMA) artma eNOS ekspresyonunda ise azalma eğilimi (istatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte) gözlemlendi.

Kan basıncında en fazla düşüşün perindopril tedavisi alan grupta olduğu, ayrıca perindopril tedavisi alan grupta asetilkolin EC50 değerinin hipertansif gruba ve diğer tedavi gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük olduğu, asetilkolin Emax değerinin ise hipertansiyon ve losartan tedavisi alan gruptan yüksek olduğu belirlendi.

AT2 agonisti novokinin'in NOS inhibisyonu ve tuz ile oluşturulan hipertansiyonda kan basıncında anlamlı düşme sağladığı, ilave olarak kan basıncı düşürmede perindopril ve losartan tedavi grupları ile arasında anlamlı fark olmadığı,

Novokinin tedavisi alan grupta asetilkolin Emax ve EC50 değerlerinin hipertansiyon ve losartan tedavili gruptan anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir. Rho kinaz, PRMT ekspresyon düzeylerinde azalma, eNOS ekspresyonunda ise artış eğilimi görülmüştür.

Klinikte uzun yıllardır başarı ile kullanılan ADE inhibisyonu ve AT1 reseptör blokajının yanında AT2 agonistleri için yukardaki etkiler ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir.

Rhokinaz, NADPH oksidaz, eNOS, ADMA düzeylerinin NOS inhibisyonu ve tuz uygulaması ile hipertansiyon oluşumuna katılımları tedavi planlamada önemli hedefler olabileceğini göstermektedir.

Novokinine ait sonuçlar değerlendirildiğinde ve etkinliği RAAS'ı etkileyen diğer ilaçlar ile karşılaştırıldığında novokininin AT1 antagonisti losartanla aynı düzeyde kan basıncını düşürmesi, asetilkoline duyarlılığı losartandan daha fazla artırması, bu parametreleri perindopril ile yakın değerlerde etkilemesi kalp damar sistemi hastalıkları için ileri çalışmalara ihtiyaç olmakla birlikte mevcut tedavilere alternatif yada destekleyici olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın eksik kısımları;

Renin anjiotensin sistemi için ilaç hedefi olabilecek bir diğer mekanizma renin inhibisyonudur. Yeni antihipertansif olan direkt renin inhibitörü aliskiren (çalışmamız planlanırken temin edilemediği için dışarda bırakılmış) RAAS'ı başlangıç aşamasında bloke ederek AngII oluşumunu engelleyebileceği gibi, renin aktivitesini düşürerek reninin kendi reseptörleri üzerinden organ patolojilerini provake etmesini engelleyebilmektedir. Renin inhibisyonu ve AT2 reseptör agonistlerinin (aliskiren ve novokinin) hipertansiyonda plazma renin düzeylerine, organ patolojilerine çalışmamızda kullandığımız parametrelere, AT1 ve AT2 reseptör ekspresyonları, ADE₁, ADE₂ düzeyleri ve kan basınçlarına etkileri (kombine uygulamaları) karşılaştırılması gereken ilaçlar olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızın da eksik kısımları olarak düşünülmekte ve ileri çalışmalar olarak planlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

1. Muller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 221-228.
2. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003; 42: 1206-1252.
3. Jenum AK, Anderssen SA, Birkeland KI, Holme I, Graff-Iversen S, Lorentzen C, et al. Promoting physical activity in a low-income multiethnic district: effects of a community intervention study to reduce risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease: a community intervention reducing inactivity. *Diabetes Care* 2006; 29: 1605-1612.
4. Farsang C. Indications for and utilization of angiotensin receptor II blockers in patients at high cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 605-622.
5. Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002; 89: 3-9.
6. Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 2001; 37: 1047-1052.
7. Dzau VJ, Antman EM, Black HR, Hayes DL, Manson JE, Plutzky J, et al. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). *Circulation* 2006; 114: 2850-2870.
8. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 2007; 369: 1208-1219.
9. Porrello ER, Delbridge LM, Thomas WG. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci* 2009; 14: 958-972.
10. Oro C, Qian H, Thomas WG. Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 210-226.

11. Mason RP. Optimal therapeutic strategy for treating patients with hypertension and atherosclerosis: focus on olmesartan medoxomil. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 405-416.
12. Cagnoni F, Njwe CA, Zaninelli A, Ricci AR, Daffra D, D'Ospina A, et al. Blocking the RAAS at different levels: an update on the use of the direct renin inhibitors alone and in combination. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 549-559.
13. Probstfield JL, O'Brien KD. Progression of cardiovascular damage: the role of renin-angiotensin system blockade. *Am J Cardiol*. 2010; 105: 10-20.
14. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999; 33: 613-621.
15. Yayama K, Okamoto H. Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 312-318.
16. Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 2337-2365.
17. Siragy HM, Xue C, Abadir P, Carey RM. Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation. *Hypertension* 2005; 45: 133-137.
18. Eleuteri E, Magno F, Gnemmi I, Carbone M, Colombo M, La Rocca G, et al. Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure. *Front Biosci* 2009; 14: 2230-2237.
19. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1045-1059.
20. Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 2011; 106: 735-747.
21. Wingler K, Schmidt HH. Good stress, bad stress--the delicate balance in the vasculature. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 677-684.
22. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated

vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 2009; 30: 1142-1150.

23. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 33-40.
24. Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 1993; 7: 193-194.
25. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1997; 1: 65-73.
26. Veresh Z, Racz A, Lotz G, Koller A. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway. *Hypertension* 2008; 52: 960-966.
27. Zhou Q, Liao JK. Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 3108-3115.
28. Aoki H, Izumo S, Sadoshima J. Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation. *Circ Res* 1998; 82: 666-676.
29. Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, Yamakawa Y, Motley ED, Ichihara S, et al. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2000; 35: 313-318.
30. Guilluy C, Rolli-Derkinderen M, Loufrani L, Bourge A, Henrion D, Sabourin L, et al. Ste20-related kinase SLK phosphorylates Ser188 of RhoA to induce vasodilation in response to angiotensin II Type 2 receptor activation. *Circ Res* 2008; 102: 1265-1274.
31. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-1135.
32. Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: 287-296.

33. Sağlam K. Primer Hipertansiyon. first ed. Sağlam K, editor. Ankara: GATA 2003.
34. Kannel WB, Zhang T, Garrison RJ. Is obesity-related hypertension less of a cardiovascular risk? The Framingham Study. *Am Heart J* 1990; 120: 1195-1201.
35. Kaplan NM. Hypertension in General Population. Pine JW, editor. New York The William and Wilkins Co.; 1998.
36. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1455-1459.
37. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* 2006; 47: 894-900.
38. Gaddam KK, Oparil S. Renin inhibition: should it supplant ACE inhibitors and ARBS in high risk patients? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 484-490.
39. Pimenta E, Oparil S. Role of aliskiren in cardio-renal protection and use in hypertensives with multiple risk factors. *Ther Clin Risk Manag*. 2009; 5: 459-464.
40. Akhrass PR, McFarlane SI. Telmisartan and cardioprotection. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 677-683.
41. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415-472.
42. Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens* 2003; 21: 1429-1443.
43. Yamada Y, Yamauchi D, Yokoo M, Ohinata K, Usui H, Yoshikawa M. A potent hypotensive peptide, novokin, induces relaxation by AT2- and IP-receptor-dependent mechanism in the mesenteric artery from SHR. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 257-259.

44. Widdop RE, Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T. Differential blockade of central effects of angiotensin II by AT₂-receptor antagonists. *Am J Physiol* 1993; 265: 226-31.
45. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000; 275: 21722-21729.
46. Gudi T, Chen JC, Casteel DE, Seasholtz TM, Boss GR, Pilz RB. cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions. *J Biol Chem* 2002; 277: 37382-37393.
47. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT₂ receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT₁ receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34: 1112-1116.
48. Siragy HM, Inagami T, Carey RM. NO and cGMP mediate angiotensin AT₂ receptor-induced renal renin inhibition in young rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: 1461-1467.
49. Wesseling S, Ishola DA, Jr., Joles JA, Bluysen HA, Koomans HA, Braam B. Resistance to oxidative stress by chronic infusion of angiotensin II in mouse kidney is not mediated by the AT₂ receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: 1191-1200.
50. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20: 298-303.
51. Jonsdottir IH, Jungersten L, Johansson C, Wennmalm A, Thoren P, Hoffmann P. Increase in nitric oxide formation after chronic voluntary exercise in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 1998; 162: 149-153.
52. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48: 489-509.
53. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Ferlazzo AM, Calatroni A. Reduction of DNA fragmentation and hydroxyl radical production by hyaluronic acid and

chondroitin-4-sulphate in iron plus ascorbate-induced oxidative stress in fibroblast cultures. *Free Radic Res* 2004; 38: 601-611.

54. Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1321-1332.
55. Ignarro LJ. Nitric oxide-mediated vasorelaxation. *Thromb Haemost* 1993; 70: 148-151.
56. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992; 65: 287-346.
57. Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, et al. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* 1986; 261: 7236-7241.
58. Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 2009; 122: 216-238.
59. Hathaway DR, Konicki MV, Coolican SA. Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 841-850.
60. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
61. Calver A, Collier J, Vallance P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol* 1993; 78: 303-326.
62. Benjamin N, Dutton JA, Ritter JM. Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 847-850.
63. Bath PM, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RM, Martin JF. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 254-260.

64. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2006; 13: 129-142.
65. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 339-352.
66. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23: 7-17.
67. Mason RP. Nitric oxide mechanisms in the pathogenesis of global risk. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006; 8: 31-38.
68. Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. Effects of calcium channel and renin-angiotensin system blockade on intravascular and neurohormonal mechanisms of hypertensive vascular disease. *Am J Hypertens* 2008; 2: 1076-1085.
69. Demirci B, McKeown PP, Bayraktutan U. Blockade of angiotensin II provides additional benefits in hypertension- and ageing-related cardiac and vascular dysfunctions beyond its blood pressure-lowering effects. *J Hypertens* 2005; 23: 2219-2227.
70. Dias RG, Negrao CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arq Bras Cardiol* 2011; 96: 68-75.
71. Goodwin BL, Solomonson LP, Eichler DC. Argininosuccinate synthase expression is required to maintain nitric oxide production and cell viability in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 18353-18360.
72. Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC, Goodwin BL, Eichler DC. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J Exp Biol* 2003; 206: 2083-2087.
73. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, et al. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2000; 275: 5179-5187.

74. McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 2000; 275: 6123-6128.
75. Schulz E, Anter E, Zou MH, Keaney JF, Jr. Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation* 2005; 111: 3473-3480.
76. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9: 1370-1376.
77. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 2010; 459: 923-939.
78. Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Sugano N, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2. *Circ Res* 2007; 101: 2-10.
79. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037.
80. Pope AJ, Karuppiiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res* 2009; 60: 461-465.
81. Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2039-2044.
82. Isıklar OM, I. Asymmetric Dimethylarginine and its Clinical Significance. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2010; 8: 75-89.
83. McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997; 272: 31213-31216.

84. Alacam HD, Z. Dogan, P. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) metabolizması ve ADMA'nın oksidatif hasar, endotel hasarı ve çeşitli hastalıklarla ilişkisi. Hacettepe Tıp Dergisi 2010; 41: 75-81.
85. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. J Biol Chem 1989; 264: 10205-10209.
86. Boger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. Altern Med Rev 2005; 10: 14-23.
87. Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? Diabetologia 2002; 45: 1609-1616.
88. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res 2003; 59: 824-833.
89. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the uber marker? Circulation 2004; 109: 1813-1818.
90. Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: regulation and action. Pharmacol Res 2009; 60: 448-460.
91. Fickling SA, Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Vallance P, Whitley GS. Regulation of macrophage nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for NG,NG-dimethylarginine. Acta Physiol Scand 1999; 167: 145-150.
92. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. J Nutr 2004; 134: 2842-2847.
93. Erbil KK, Y. Yaman, H. Cakır, E. Akgul, O. Caycı, T. Metabolism of asymmetric dimethylarginine and its clinical significance. Turk J Biochem 2012; 37: 99-105.
94. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 1023-1030.

95. Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, et al. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation* 2004; 110: 3680-3686.
96. Ruilope LM, Lahera V, Rodicio JL, Romero JC. Participation of nitric oxide in the regulation of renal function: possible role in the genesis of arterial hypertension. *J Hypertens* 1994; 1: 625-631.
97. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109: 172-177.
98. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 41-51.
99. Sonmez A, Celebi G, Erdem G, Tapan S, Genc H, Tasci I, et al. Plasma apelin and ADMA Levels in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2010; 32: 179-183.
100. Xia W, Feng W, Guan M, Yu Y, Li J, Qu X. Increased levels of asymmetric dimethylarginine and C-reactive protein are associated with impaired vascular reactivity in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2010; 32: 43-48.
101. Sasser JM, Moninka NC, Cunningham MW, Jr., Croker B, Baylis C. Asymmetric dimethylarginine in angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: 740-746.
102. Cooke JP. A novel mechanism for pulmonary arterial hypertension? *Circulation* 2003; 108: 1420-1421.
103. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.
104. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181-189.
105. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 302: 148-158.

106. Hur J, Lee P, Kim MJ, Kim Y, Cho YW. Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp91phox NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1526-1530.
107. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: 277-297.
108. Park Y, Yang J, Zhang H, Chen X, Zhang C. Effect of PAR2 in regulating TNF-alpha and NAD(P)H oxidase in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Basic Res Cardiol* 2011; 106: 111-123.
109. Li JM, Wheatcroft S, Fan LM, Kearney MT, Shah AM. Opposing roles of p47phox in basal versus angiotensin II-stimulated alterations in vascular O₂⁻ production, vascular tone, and mitogen-activated protein kinase activation. *Circulation* 2004; 109: 1307-1313.
110. Viridis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; 22: 535-542.
111. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000; 86: 85-90.
112. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 32-39.
113. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208.
114. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 1992; 267: 8719-8722.
115. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1767-1775.

116. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti SM. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem* 2000; 275: 17974-17978.
117. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; 70: 401-410.
118. Rikitake Y, Liao JK. ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 441-51.
119. Shimokawa H, Rashid M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 296-302.
120. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007; 55: 61-75.
121. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, et al. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 1996; 15: 1885-1893.
122. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 446-456.
123. Dong M, Yan BP, Liao JK, Lam YY, Yip GW, Yu CM. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 2010; 15: 622-629.
124. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* 2001; 15: 1062-1064.
125. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 2000; 522: 177-85.
126. Sarı AS, S. Tunçtan, B. Rho kinaz ve kardiyovasküler hastalıklar. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2010; 3: 1-7.

127. Rolfe BE, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005; 183: 1-16.
128. Tachibana E, Harada T, Shibuya M, Saito K, Takayasu M, Suzuki Y, et al. Intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride for treating vasospasm following subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir* 1999; 141: 13-9.
129. Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med* 2002; 80: 629-638.
130. Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K, Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 462-467.
131. Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, Gong Y, Scalia R, et al. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1842-1847.
132. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 8467-8477.
133. Suzuki H, Kimura K, Shirai H, Eguchi K, Higuchi S, Hinoki A, et al. Endothelial nitric oxide synthase inhibits G12/13 and rho-kinase activated by the angiotensin II type-1 receptor: implication in vascular migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 217-224.
134. Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 2006; 98: 322-334.
135. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: 661-668.
136. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997; 29: 366-373.

137. Suzuki H, Motley ED, Frank GD, Utsunomiya H, Eguchi S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3: 305-322.
138. Yin G, Yan C, Berk BC. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 780-783.
139. Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima H, Dhobale S, Frank GD, Motley ED, et al. Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2006; 48: 534-540.
140. Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005; 23: 1037-1045.
141. Kawada N, Moriyama T, Kitamura H, Yamamoto R, Furumatsu Y, Matsui I, et al. Towards developing new strategies to reduce the adverse side-effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Exp Nephrol* 2012; 16: 25-29.
142. Swan CE, Breyer RM. Prostaglandin E2 modulation of blood pressure homeostasis: studies in rodent models. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; 96:10-13.
143. Pravenec M, Zidek V, Landa V, Kostka V, Musilova A, Kazdova L, et al. Genetic analysis of cardiovascular risk factor clustering in spontaneous hypertension. *Folia Biol* 2000; 46: 233-240.
144. Crofton JT, Share L, Shade RE, Lee-Kwon WJ, Manning M, Sawyer WH. The importance of vasopressin in the development and maintenance of DOC-salt hypertension in the rat. *Hypertension* 1979; 1: 31-38.
145. Intengan HD, Park JB, Schiffrin EL. Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: role of endothelin. *Hypertension* 1999; 34: 907-913.
146. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32: 958-964.

147. Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *Eur J Pharmacol* 1992; 213: 449-451.
148. Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: 913-935.
149. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42: 1075-1081.
150. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 72-77.
151. Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-487.
152. Majid DS, Nishiyama A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension* 2002; 39: 293-297.
153. Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 27-32.
154. Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Superoxide scavenging attenuates renal responses to ANG II during nitric oxide synthase inhibition in anesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: 412-419.
155. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844.
156. Majid DS, Kopkan L. Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 946-952.
157. Ilhan S, Oktar S, Sahna E, Aksulu HE. Salt and nitric oxide inhibition induced hypertension: the role of prostacycline and 8-isoprostane. *Clin Exp Hypertens*. 2011; 33: 84-88.

158. Deniz E, Sahna E, Aksulu HE. Nitric oxide synthase inhibition in rats: melatonin reduces blood pressure and ischemia/reperfusion-induced infarct size. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40: 248-252.
159. Deniz E, Colakoglu N, Sari A, Sonmez MF, Tugrul I, Oktar S, et al. Melatonin attenuates renal ischemia-reperfusion injury in nitric oxide synthase inhibited rats. *Acta Histochem* 2006; 108: 303-309.
160. Sinaiko AR, Steinberger J, Moran A, Prineas RJ, Vessby B, Basu S, et al. Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence. *Circulation* 2005; 111: 1985-1991.
161. Li F, Shi R, Liao M, Li J, Li S, Pan W, et al. Losartan attenuates vascular remodeling of the aorta in spontaneously hypertensive rats and the underlying mechanism. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010; 35: 807-813.
162. Adler S, Huang H. Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287: 907-913.
163. Li D, Xia K, Li NS, Luo D, Wang S, Jiang DJ, et al. Reduction of asymmetric dimethylarginine involved in the cardioprotective effect of losartan in spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 783-789.
164. de Cavanagh EM, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. *Am J Hypertens* 2010; 23: 1318-1325.
165. Baumann M, Megens R, Bartholome R, Dolff S, van Zandvoort MA, Smits JF, et al. Prehypertensive renin-angiotensin-aldosterone system blockade in spontaneously hypertensive rats ameliorates the loss of long-term vascular function. *Hypertens Res* 2007; 30: 853-861.
166. Yamada Y, Yamauchi D, Usui H, Zhao H, Yokoo M, Ohinata K, et al. Hypotensive activity of novokinin, a potent analogue of ovokinin(2-7), is mediated by angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin IP receptor. *Peptides* 2008; 29: 412-418.
167. De Gennaro Colonna V, Fioretti S, Rigamonti A, Bonomo S, Manfredi B, Muller EE, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves endothelial vasodilator

- function in L-NAME-induced hypertensive rats by a kinin-dependent mechanism. *J Hypertens* 2006; 24: 95-102.
168. Lopez RM, Ortiz CS, Ruiz A, Velez JM, Castillo C, Castillo EF. Impairment of smooth muscle function of rat thoracic aorta in an endothelium-independent manner by long-term administration of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18: 669-677.
 169. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261-271.
 170. Landgraf SS, Wengert M, Silva JS, Zapata-Sudo G, Sudo RT, Takiya CM, et al. Changes in angiotensin receptors expression play a pivotal role in the renal damage observed in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: 499-510.
 171. De Gennaro Colonna V, Rigamonti A, Fioretti S, Bonomo S, Manfredi B, Ferrario P, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 516: 253-259.
 172. Cosentino F, Savoia C, De Paolis P, Francia P, Russo A, Maffei A, et al. Angiotensin II type 2 receptors contribute to vascular responses in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Am J Hypertens* 2005; 18: 493-499.
 173. You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2005; 111: 1006-1111.
 174. Kalliovalkama J, Jolma P, Tolvanen JP, Kahonen M, Hutri-Kahonen N, Wu X, et al. Arterial function in nitric oxide-deficient hypertension: influence of long-term angiotensin II receptor antagonism. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 773-782.
 175. Maeso R, Navarro-Cid J, Munoz-Garcia R, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, et al. Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from

- spontaneously hypertensive rats. Role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension* 1996; 28: 967-972.
176. Hoshino J, Nakamura T, Kurashina T, Saito Y, Sumino H, Ono Z, et al. Antagonism of ANG II type 1 receptors protects the endothelium during the early stages of renal hypertension in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: 1950-1957.
 177. Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Perez-Giron JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 926-935.
 178. Inoue K, Nishimura H, Kubota J, Kitaura Y. Nitric oxide mediates inhibitory effect of losartan on angiotensin-induced contractions in hamster but not rat aorta. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000; 1: 180-183.
 179. Rodrigo E, Maeso R, Munoz-Garcia R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, et al. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J Hypertens* 1997; 15: 613-618.
 180. Savoia C, Ebrahimian T, He Y, Gratton JP, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens* 2006; 24: 2417-2422.
 181. Cousin M, Custaud MA, Baron-Menguy C, Toutain B, Dumont O, Guihot AL, et al. Role of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2010; 55: 109-115.
 182. Takai S, Kirimura K, Jin D, Muramatsu M, Yoshikawa K, Mino Y, et al. Significance of angiotensin II receptor blocker lipophilicities and their protective effect against vascular remodeling. *Hypertens Res* 2005; 28: 593-600.
 183. Wang Y, Zhang M, Liu Y, Chen M. The effect of nebivolol on asymmetric dimethylarginine system in spontaneously hypertension rats. *Vascul Pharmacol* 2011; 54: 36-43.
 184. Disli OM, Ozdemir E, Berkan O, Bagcivan I, Durmus N, Parlak A. Rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil prevent agonist-induced vasospasm in human radial artery. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87: 595-601.

185. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension* 2001; 3: 1307-1310.
186. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001; 89: 408-414.
187. Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 2001; 19: 1245-1254.
188. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992 ; 339: 572-575.
189. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Schaffer J, Barbey M, Koch KM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 594-600.
190. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-1146.
191. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127-2128.
192. Savoia C, D'Agostino M, Lauri F, Volpe M. Angiotensin type 2 receptor in hypertensive cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20: 125-132.
193. Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006; 7: 3-14.
194. Steckelings UM, Widdop RE, Paulis L, Unger T. The angiotensin AT₂ receptor in left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 2010; 28: 50-55.

195. Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens* 2005; 18: 134-141.
196. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* 2009; 32: 533-536.
197. Katovich MJ, Grobe JL, Raizada MK. Angiotensin-(1-7) as an antihypertensive, antifibrotic target. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10: 227-232.
198. Steckelings UM, Larhed M, Hallberg A, Widdop RE, Jones ES, Wallinder C, et al. Non-peptide AT2-receptor agonists. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11: 187-192.
199. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008; 264: 224-236.
200. Unger T, Paulis L, Sica DA. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *Eur Heart J* 2011; 32: 2739-2747.

6. ÖZGEÇMİŞ

11.07.1982 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2006 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesinden mezun oldum. 2007-2009 yılları arasında yaklaşık 1,5 yıl süreyle Bingöl ili merkezinde sağlık ocağı tabipliği görevinde bulundum. 2008 yılı Eylül dönemi TUS sınavında başarılı olarak, 14 Ocak 2009 tarihinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım.