



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

**SIÇANLARDA MONOKROTALİNLE OLUŞTURULMUŞ
PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON MODELİNDE
ALAMANDİN VE MELATONİN'İN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Seyhan POLAT**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR**

MALATYA-2021



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

**SIÇANLARDA MONOKROTALİNLE OLUŞTURULMUŞ
PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON MODELİNDE
ALAMANDİN VE MELATONİN'İN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Seyhan POLAT
ORCID ID: 0000-0002-8766-9094**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR**

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TCD-2020-2275 proje kodu ile desteklenmiştir.

MALATYA-2021

*Her zaman bilim insanı olmamı isteyen canım babam merhum Abuzer POLAT'a
ve canım annem Zübeyde POLAT'a ithafen...*



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pulmoner Hipertansiyon.....	4
2.1.1. PH Tanımı ve Son Gelişmeler	4
2.1.2. PH Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	6
2.1.3. PH Sınıflaması.....	6
2.1.4. PH Tanısı	7
2.2. Grup 1 PH: PAH	11
2.2.1. PAH Tanımı ve Sınıflaması.....	11
2.2.2. PAH Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	12
2.2.3. PAH Genetiği	13
2.2.4. PAH'ta Patolojik Değişiklikler.....	14
2.2.5. PAH Patogenezi.....	16
2.2.6. Monokrotalinle İndüklenen PAH Modeli.....	33
2.2.7. PAH Tedavisi	34
2.3. Alamandin	38
2.4. Melatonin	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1. Deney Hayvanlarının Temini, Barınma Koşulları ve Bakımı	44
3.2. Deney Dizaynı ve İlaç Uygulama Süreci	44
3.3. Ekokardiyografik Ölçümler	46
3.4. İnvazif Hemodinamik Ölçümler ve Cerrahi Uygulamalar.....	48
3.5. Histopatolojik Analizler	51
3.5.1. Histokimyasal Analizler	51
3.5.2. İmmünohistokimyasal Analizler	52

3.6. Biyokimyasal Analizler.....	53
3.6.1. ELISA.....	53
3.7. Western Blot.....	56
3.7.1. Protein İzolasyonu	56
3.7.2. Protein Konsantrasyon Tayini	57
3.7.3. Protein Jel Elektroforezi	57
3.7.4. Proteinlerin Membrana Transferi	58
3.7.5. Bloklama ve Antikor İnkübasyonu.....	59
3.7.6. Proteinlerin Görüntülenmesi ve Analizi	59
3.8. İstatistiksel Analizler.....	61
3.8.1. Histopatolojik İstatistiksel Analizler	61
3.8.2. Diğer İstatistiksel Analizler	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. Biyometrik Bulgular.....	62
4.2. Hemodinamik Bulgular	64
4.2.1. Sağ Ventrikül Sistolik Basıncı.....	64
4.2.2. Sistolik, Diyastolik ve Ortalama Arteriyel Basıncı	65
4.2.3. Kalp Hızı	66
4.3. Ekokardiyografik Bulgular.....	66
4.4. Histopatolojik Bulgular	71
4.4.1. Akciğer	71
4.4.2. Kalp	75
4.5. Biyokimyasal Bulgular (ELISA).....	76
4.6. Western Blot Bulguları	80
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR	99
EKLER.....	131
EK-1. Etik Kurul Onayı	131

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımnda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösterici olan saygıdeğer tez danışman hocam Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım esnasında değerli bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım kıymetli hocalarım Prof. Dr. H. Ahmet ACET'e, Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR'e ve Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

TCD-2020-2275 kodlu projeme destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca olduğu gibi zorlu tez sürecinde de desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Dr. Seyhan POLAT

ÖZET

Sıçanlarda Monokrotalinle Oluşturulmuş Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Modelinde Alamandin ve Melatonin'in Etkilerinin Araştırılması

Amaç: PAH güncel tedavilere rağmen progresif ve fatal seyretmektedir. Çalışmamızda, kardiyovasküler hastalıklarda faydalı etkileri daha önce gösterilen ALA, MEL ve ALAMEL kombinasyonunun PAH'taki olası koruyucu etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 10 haftalık erkek sıçanlar, basit randomize olarak kontrol (n=10), MCT (n=12), ALA (n=12), MEL (n=12) ve ALAMEL (n=12) gruplarına ayrıldı. 1. gün 60 mg/kg tek doz sc MCT ile PAH oluşturulurken; 1-35. günler arasında ALA grubuna 50 µg/kg/gün ip ALA, MEL grubuna 10 mg/kg/gün ip MEL ve ALAMEL grubuna ise ALAMEL kombinasyonu uygulandı. Deney sonunda ekokardiyografik ve invazif hemodinamik ölçümler yapıldı. Kalp ve akciğer dokuları alınarak morfometrik, histopatolojik, ELISA ve western blot analizleri gerçekleştirildi.

Bulgular: RV/LV, MCT grubunda artarken; ALA ve ALAMEL gruplarında azalmış bulundu. RVSP, MCT grubunda artarken; MEL grubunda düşme eğiliminde bulundu. MCT grubunda RV/LV+IVS artmış olup; MEL grubunda azalmış bulundu. Tüm tedavi gruplarında, inflamatuvar infiltrasyonda, TIM kalınlığı ($p<0,0001$) ile PCNA ve α -SMA immünoaktivitesinde azalma izlendi. Histopatolojik iyileşme MEL ve ALAMEL gruplarında ALA grubuna göre daha belirgindi. Artan LOX aktivitesi, tüm tedavi gruplarında MCT grubuna kıyasla azalırken; bu azalışın MEL grubunda ALA grubuna göre daha belirgin olduğu bulundu.

Sonuçlar: ALA ve özellikle MEL'in antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antiremodeling etkileriyle PAH gelişimini azalttığı, ALAMEL kombinasyonunun ise ek fayda sağlamadığı bulundu. ALA ve özellikle MEL'in, LOX inhibisyonuyla ECM remodelingini azaltmasının PAH'ın önlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Sonuçlarımızı destekleyecek ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Alamandin, melatonin, monokrotalin, pulmoner arteriyel hipertansiyon, sağ ventrikül sistolik basıncı.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Alamandin and Melatonin in a Monocrotalin-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Model in Rats.

Aim: PAH has a progressive and fatal course despite current treatments. We aimed to compare the possible protective effects of ALA, MEL, and ALAMEL combination, whose beneficial effects in cardiovascular diseases have been shown before, in PAH.

Material and Method: 10-week-old male rats were randomly divided into control (n=10), MCT (n=12), ALA (n=12), MEL (n=12) and ALAMEL (n=12) groups. PAH was induced by 60 mg/kg single dose sc MCT on day 1; 50 µg/kg/day ip ALA, 10 mg/kg/day ip MEL and ALAMEL combination were administered to the ALA, MEL and ALAMEL groups (respectively) between days 1-35. Echocardiographic and invasive hemodynamic measurements were performed. Hearts and lungs were taken and morphometric, histopathological, ELISA and western blot analyzes were performed.

Results: RV/LV was decreased in the ALA and ALAMEL groups compared to the MCT group. RVSP was tended to reduce and RV/LV+IVS was reduced in the MEL group. Inflammatory infiltration, TIM thickness, immunoreactivity of PCNA and α -SMA were decreased in all treatment groups. Histopathological improvement in the MEL and ALAMEL groups were higher compared to the ALA group. LOX activity was reduced in all treatment groups; especially in the MEL group.

Conclusion: ALA and especially MEL reduced the development of PAH with anti-inflammatory, antiproliferative and antiremodeling effects, while combination treatment did not provide additional benefit. The reduction of ECM remodeling by LOX inhibition by ALA, and especially MEL, is thought to be important in the prevention of PAH. Further studies are needed to support our results.

Key Words: Alamandine, melatonin, monocrotaline, pulmonary arterial hypertension, right ventricular systolic pressure.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADE2	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
AKG	: Arteriyel kan gazı
ALA	: Alamandin
ALK1	: Aktivin reseptör benzeri kinaz 1
Ang (1-7)	: Anjiyotensin 1-7
Ang (1-9)	: Anjiyotensin 1-9
AR	: Aldoz redüktaz
BMPR1B	: Kemik morfogenetik protein reseptör 1B
BMPR2	: Kemik morfogenetik protein reseptör tip 2
CAT	: Katalaz
CAV1	: Kaveolin 1
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CES	: Karboksilesteraz
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CHD	: Konjenital kalp hastalığı
CO	: Kardiyak output
COX	: Siklooksijenaz
CTD	: Bağ doku hastalığı
CTED	: Kronik tromboembolik hastalık
CTEPH	: Kronik tromboembolik PH
DAP	: Diyastolik arteriyel basınç
ECL	: Gelişmiş kemilüminesans sistemi
EF	: Ejeksiyon fraksiyonu
EH1	: Mikrozomal epoksit hidrolaz
EKG	: Elektrokardiyografi
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ERA	: Endotelin reseptör antagonisti
ERK	: ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
ESC/ERS	: Avrupa Kardiyoloji Derneği/Avrupa Solunum Derneği
ETZ	: Elektron taşıma zinciri

FEV1	: 1 sn'deki zorlu vital kapasite
GCL	: Glutamat-sistein ligaz
GGT	: Gama-glutamil transpeptidaz
GPX2	: Glutasyon peroksidaz 2
GR	: Glutasyon redüktaz;
GST	: Glutasyon S-transferaz
HIV	: İnsan immünyetmezlik virüsü
HO-1	: Hem oksijenaz 1
HRCT	: Yüksek çözünürlüklü toraks bilgisayarlı tomografisi
HRP	: Horseradish Peroksidaz
IL	: İnterlökin
ip	: İntraperitoneal
İPAH	: İdiyopatik pulmoner arteriyel hipertansiyon
iv	: İntravenöz
KCNK3	: Potasyum kanalı alt ailesi K üyesi 3
KH	: Kalp hızı
KKB	: Kalsiyum kanal blokeri
LHD	: Sol kalp hastalığı
LOX	: Lizil oksidaz
MAP	: Ortalama arteriyel basınç
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MCT	: Monokrotalin
MDA	: Malondialdehit
MEK	: MAPK/ERK kinaz
MEL	: Melatonin
MLCP	: Miyozin hafif zincir fosfataz
MMP	: Matriks metalloproteinaz
mPAP	: Ortalama pulmoner arter basıncı
MPO	: Miyeloperoksidaz
MrgD	: Mas ile ilişkili G protein bitişik reseptör üye D
Mrp	: Çoklu ilaç direnci proteini
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	: Nitrik oksit

NOX	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
NOX4	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz 4
NQ01	: NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz
Nrf2	: NF-E2 ile ilişkili faktör 2
PA	: Pulmoner arter
PADKH	: Pulmoner arteriyel düz kas hücresi
PAH	: Pulmoner arteriyel hipertansiyon
PAP	: Pulmoner arter basıncı
PAWP	: Pulmoner arteriyel wedge basıncı
PDE-5	: Fosfodiesteraz tip 5
PDH	: Piruvat dehidrogenaz
PDK	: Piruvat dehidrogenaz kinaz
PGI₂	: Prostaglandin I ₂
PGIS	: Prostatiklin sentaz
PH	: Pulmoner hipertansiyon
PI3K	: Fosfoinositid-3 kinaz
PVDF	: Poliviniliden florür
PVOD	: Pulmoner veno-oklüzif hastalık
PVR	: Pulmoner vasküler direnç
RAS	: Renin anjiyotensin sistemi
rhADE2	: Rekombinant insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
RHC	: Sağ kalp kateterizasyonu
RKÇ	: Randomize kontrollü çalışma
RV	: Sağ ventrikül
RVH	: Sağ ventrikül hipertrofisi
RVSP	: Sağ ventrikül sistolik basıncı
SAP	: Sistolik arteriyel basınç
sc	: Subkutan
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SFT	: Solunum fonksiyon testi
sGC	: Çözünebilir guanilat siklaz
SMAD9	: SMAD Family Member 9
SOD	: Süperoksit dismutaz

SOD1	: Süperoksit dismutaz 1
Srx1	: Sülfiredoksin 1
TBS-T	: Tris-Buffered Saline
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming growth factor- β)
TIM	: Tunika intima-medya
TNB	: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü- α
TRV	: Triküspit regürjitasyon velositesi
Trx	: Tioredoksin
TrxR	: Tioredoksin redüktaz
UGT	: UDP-glukuronosiltransferaz
V/Q	: Ventilasyon/perfüzyon
WU	: Wood ünitesi
XO	: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. PAH gelişiminde rol oynayan major patojenik bileşenler.....	15
Şekil 2.2. PAH patogeneğinde NO, oksidatif stres ve inflamasyonun rolü	17
Şekil 2.3. Vazodilatör-vazokonstriktör maddeler arasındaki dengenin vazokonstriktörler lehine bozulması	18
Şekil 2.4. PAH'ta endotel ile vasküler düz kas arasındaki etkileşim	18
Şekil 2.5. Pulmoner arterlerde ROS'un moleküler kaynakları ve NOX tipleri	25
Şekil 2.6. Pulmoner vasküler hücrelerde redoks duyarlı sinyal yolları ve pulmoner hipertansiyonda ROS'un rolü.....	27
Şekil 2.7. Ekstraselüler CypA'nın farklı hücre tipleri üzerindeki hücreye özgü etkileri ve intraselüler CypA'nın işlevi	29
Şekil 2.8. Elektrofil stres yanıtına aracılık eden Keap1/Nrf2 sinyal yolağı	31
Şekil 2.9. Renin anjiyotensin sistem yolağı.....	40
Şekil 2.10. Melatonin'in kimyasal yapısı	41
Şekil 3.1. Monokrotalin, alamandin ve melatonin.....	45
Şekil 3.2. MEL grubuna ait bir sıçan ekokardiyografisinde E ve A dalgalarının görünümü	47
Şekil 3.3. Ekokardiyografide sıçan kalbine ait M mod parasternal uzun eksen görünümü	47
Şekil 3.4. Ekokardiyografide sıçan kalbinin apikal dört boşluk görünümü	48
Şekil 3.5. Sol karotis kanülasyonu yoluyla invazif KB ölçümü	49
Şekil 3.6. Sağ juguler ven kanülasyonu yoluyla invazif RVSP ölçümü.....	50
Şekil 3.7. Biopac MP-100 Veri Kayıt Sistemi ile KB, KH ve EKG kaydı.....	50
Şekil 3.8. Fulton indeksi belirleme aşamaları.....	51
Şekil 3.9. Akciğer dokusunda biyokimyasal analiz (ELISA) çalışmaları	54
Şekil 3.10. Protein konsantrasyon ölçümünde kullanılan Qubit 3.0 Fluorometer cihazı.....	57
Şekil 3.11. Jel elektroforez sistemi	58
Şekil 3.12. Trans-blot turbo transfer sistemi	59
Şekil 3.13. Chemidoc MP görüntüleme sistemi	60
Şekil 4.1. RV/LV+IVS'nin gruplar arası karşılaştırılması	64

Şekil 4.2. RVSP'nin gruplar arası karşılaştırılması	65
Şekil 4.3. LVEF'nin gruplar arası karşılaştırılması	67
Şekil 4.4. PAAT'nin gruplar arası karşılaştırılması.....	68
Şekil 4.5. RV çapı (mm)/LV çapı (mm)'nin gruplar arası karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.6. MEL grubuna ait bir sıçanda sağ kalp dilate görünümde.....	69
Şekil 4.7. MEL grubuna ait bir sıçanda pulmoner velosite zarfı çentikli görünümde....	70
Şekil 4.8. MEL grubuna ait bir sıçanda ana pulmoner arter dilate görünümde	70
Şekil 4.9. Akciğer dokularının histopatolojik görünümü	72
Şekil 4.10. Pulmoner arteriyollerin histopatolojik görünümü	72
Şekil 4.11. Pulmoner arteriyollerde PCNA immünoaktivitesi	73
Şekil 4.12. Pulmoner arteriyollerde α -SMA immünoaktivitesi.....	74
Şekil 4.13. Sağ ventriküllerin histopatolojik görünümü	76
Şekil 4.14. LOX değerinin gruplar arası karşılaştırılması	77
Şekil 4.15. ADE2 değerinin gruplar arası karşılaştırılması	78
Şekil 4.16. MPO değerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.17. NOX4 değerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.18. Siklofilin A protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması	80
Şekil 4.19. RhoA protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması	80
Şekil 4.20. ROCK1 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.21. ROCK2 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.22. MMP-2 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması	82
Şekil 4.23. MMP-9 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması	82
Şekil 4.24. Nrf-2 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması	83

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Revize edilmiş PH tanımına göre hemodinamik PH sınıflaması.....	7
Tablo 2.2. PAH sınıflaması	12
Tablo 2.3. PAH'ı indükleyen ilaç ve toksinlerin risk seviyeleri	13
Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar	53
Tablo 4.1. Biyometrik bulguların gruplar arası karşılaştırılması	63
Tablo 4.2. Hemodinamik bulguların gruplar arası karşılaştırılması.....	65
Tablo 4.3. Ekokardiyografik bulguların gruplar arası karşılaştırılması	68
Tablo 4.4. Histopatolojik değerlendirme sonuçları ve ortalama TIM kalınlıkları	73
Tablo 4.5. PCNA ve α -SMA immünreaktivite değerlendirme sonuçları	75
Tablo 4.6. Kalpte histopatolojik değerlendirme sonuçları ve kardiyomiyosit çapı.....	76
Tablo 4.7. Biyokimyasal bulguların gruplar arası karşılaştırılması	77
Tablo 4.8. NOX4'ün gruplar arası karşılaştırılması	79

1. GİRİŞ

Pulmoner hipertansiyon (PH), pulmoner dolaşımın küçük damarlarını etkileyen kronik, progresif ve ölümcül bir hastalık grubudur. PH'nin, genel popülasyonun %10-20'sini etkilediği tahmin edilmektedir (5). PH, 2015 Avrupa Kardiyoloji Derneği/Avrupa Solunum Derneği (ESC/ERS) kılavuzunda; dinlenme halinde, sağ kalp kateterizasyonu ile ölçülen ortalama pulmoner arter basıncının (mPAP) ≥ 25 mmHg olması şeklinde tanımlanmaktaydı (5). Fakat 2018 yılında gerçekleştirilen 6. Dünya Pulmoner Hipertansiyon Sempozyumunda revize edilmiş bir PH tanımı önerilmiştir. Bu revize tanımda PH için dinlenme sırasında sağ kalp kateterizasyonu (RHC) ile ölçülen mPAP eşiğinin 25 mmHg'den 20 mmHg'ye düşürülmesi önerilmiştir (6).

PH'de artan sağ ventrikül (RV) içi basınç nedeniyle hastalık ilerlerken sırasıyla; RV hipertrofisi (RVH), disfonksiyonu ve sağ kalp yetmezliği meydana gelmektedir. PH kliniğinde, gaz değişiminde bozulma ve venöz kanın oksijenizasyonunda yetersizlik, dispne, yorgunluk, göğüs ağrısı ve senkop görülebilmektedir (5).

ESC ve ERS'nin 2015'te yayımladığı ortak kılavuzda yer alan klinik sınıflamada PH, 5 gruba ayrılmıştır (5).

Grup 1. PAH

Grup 2. Sol kalp hastalığına bağlı PH

Grup 3. Akciğer hastalığı ve/veya hipoksiye bağlı PH

Grup 4. Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon (CTEPH) ve diğer pulmoner arter obstrüksiyonları

Grup 5. Multifaktöriyel ve/veya mekanizması belli olmayan PH

PH klinik sınıflamasında Grup 1 olarak ifade edilen pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), küçük pulmoner arter ve arteriyolleri etkileyen, nadir, kronik, progresif ve fatal bir hastalıktır. PAH; akciğer hastalıkları, CTEPH veya diğer nadir hastalıklara bağlı PH gibi diğer prekapiller PH nedenlerinin yokluğunda, hemodinamik olarak prekapiller PH (mPAP ≥ 25 mmHg olmasına ilaveten pulmoner arter kama basıncı ≤ 15 mmHg, PVR > 3 Wood ünitesi) varlığıyla karakterize bir grup hastayı tanımlamaktadır. PAH'ta sağ kalım tedavisiz ortalama 2,8 yıl iken; güncel tedavilerle ancak 9 yıla çıkabilmektedir. RV disfonksiyonu ve yetmezliği mortalitenin ana sebebidir (5). PAH güncel tedavisinde ilk sıra ilaçlar; endotelin reseptör antagonistleri (ERA; bosentan, ambrisentan, masitentan), fosfodiesteraz 5 (PDE-5) inhibitörleri

(sildenafil, tadalafil) ve çözünebilir guanilat siklaz (sGC) stimülatörü riosiguattır. Daha ciddi PAH hastalarının tedavisinde ise en potent pulmoner vazodilatörler olan parenteral formda epoprostenol ve treprostinil kullanılır. Bu tedavilerin ise maalesef embriyo-fetotoksiste, infertilite, hipotansiyon ve kanama gibi ciddi yan tesirleri bulunmaktadır. Mevcut ilaçların etkililiğinin yetersizliği ve yan tesirler nedeniyle klinik kullanımının sınırlı olması PAH tedavisine yönelik ilaç araştırmalarının artmasına yol açmıştır (7).

PAH'ı başlatan olay henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Fizyolojik koşullarda, pulmoner arteriyel düz kas hücreleri (PADKH) üzerine etkili vazokonstriktör/proliferatif sinyaller (endotelin-1 [endotel kaynaklı] ve hücre içi kalsiyum vb.) ile vazodilatör/antiproliferatif sinyaller (endotel kaynaklı prostaglandin I₂ [PGI₂] ve nitrik oksit [NO] vb.) denge halindedir. PAH'ta ise bu denge vazokonstriktör/proliferatif sinyaller lehine bozulmaktadır. Bu bozulma sonucunda sürekli pulmoner vazokonstriksiyon, pulmoner vasküler remodeling, in situ tromboz ve pulmoner vasküler duvar sertleşmesi ortaya çıkmaktadır. Bu değişikliklere bağlı olarak küçük pulmoner arter ve arteriyollerde PVR ve mPAP'ta artış meydana gelmektedir. PADKH membranında K⁺ kanal sayısında azalmanın da PAH gelişiminde rolü olduğu ileri sürülmektedir (7). PAH patogenezinde çok sayıda faktör etkili olmakla birlikte oksidatif stres artışının da önemli bir yeri vardır. Reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretimindeki artış, pulmoner vasküler endotelial hasara yol açmaktadır. Ayrıca; PADKH'lerde apoptozis direnci ve proliferasyon artışına; sonuç olarak yukarıda da bahsedilen pulmoner vasküler remodeling sürecinin hızlanmasına neden olmaktadır (8). PAH patogenezinde inflamasyonun da önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (9).

Alamandin (ALA); renin anjiyotensin sistemi (RAS)'nin protektif koluna ait peptit yapılı bir endojen moleküldür. Anjiyotensin (1-7)'nin dekarboksilasyonu ile meydana gelir. Membranda bulunan Mas ile ilişkili G protein bitişik reseptör üye D (MrgD) reseptörüne bağlanarak etki gösterir. MrgD reseptörü arteriyel düz kas hücrelerinde, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) pozitif endotelial hücrelerde ve kardiyomiyositlerde bulunmaktadır. ALA'nın antihipertansif, kardiyoprotektif, antifibrotik ve vazodilatör etkililiği deneysel olarak ortaya konmuştur (10).

Melatonin (MEL); pineal bezde ışık uyarısı azaldığında üretilip salgılanan, indol halkası içeren, küçük ve lipofilik yapılı bir moleküldür. G protein bitişik M1 ve M2 reseptörleri ile kinon redüktaz ailesine ait M3 reseptörleri bulunmakta olup M1 ve M2 vasküler sistem etkilerine aracılık etmektedir (11). MEL'in serbest radikal süpürücü,

antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve vazodilatör etki gösterdiği bulunmuştur (8).

Mevcut literatür verileri doğrultusunda vazodilatör, antiproliferatif, antioksidan ve antiinflamatuvar etkili ilaçların potansiyel olarak PAH gelişimini ve progresyonunu durdurabileceği veya en azından yavaşlatabileceği kanısına varılmıştır. Kapsamlı bir literatür taraması neticesinde, antihipertansif, kardiyoprotektif ve antifibrotik etkileri çeşitli hayvan modellerinde ortaya konmuş olan ve vazodilatör etkili ALA (10) ile serbest radikal süpürücü, antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve vazodilatör etkileri olduğu bilinen ve aynı zamanda saat farkı değişikliklerine bağlı uyku bozukluklarının tedavisi için günümüzde klinik kullanımda olan MEL'in (8) PAH'a karşı etkili olabileceği ve kombine edildiğinde benzer etki paternleri aracılığıyla sinerjistik etki yapabilecekleri öngörülmüştür. Bu bağlamda, ALA ve MEL'in deneysel PAH modelinde koruyucu etkilerinin hemodinamik, histopatolojik ve biyokimyasal açıdan araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilecek verilerin, bu olası etkileri meydana getiren moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sunacağı, deneysel ve klinik araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pulmoner Hipertansiyon

2.1.1. PH Tanımı ve Son Gelişmeler

PH, 2015 ESC/ERS kılavuzunda; dinlenme halinde, sağ kalp kateterizasyonu ile ölçülen ortalama pulmoner arteriyel basıncın (mPAP) ≥ 25 mmHg olması şeklinde tanımlanmaktaydı (5). Ancak, 2018 yılında gerçekleştirilen 6. Dünya Pulmoner Hipertansiyon Sempozyumunda revize edilmiş bir pulmoner hipertansiyon (PH) tanımı önerilmiştir (12). Bu revize tanımda PH için dinlenme sırasında RHC ile ölçülen mPAP eşiğinin 25 mmHg'den 20 mmHg'ye düşürülmesi önerilmiştir (Tablo 2.1). Bu önerilen değişiklik, 1973'te 1. Dünya Pulmoner Hipertansiyon Sempozyumunda >25 mmHg olarak tanımlanan ve 2009'da ≥ 25 mmHg'ye güncellenen (13) eşik değerlerin, aşırı teşhis ve aşırı tedaviyi önlemek için konservatif olarak seçilen değerler olduğunu kabul etmektedir (12). Aksine, >20 mmHg eşiği bilimsel kanıtlarla desteklenmektedir (6). Sağlıklı bireylerde RHC çalışmalarından elde edilen tüm mevcut verilerin dahil edildiği bir sistematik derlemede, istirahatte ölçülen normal mPAP (mean $\pm$ 6 SD) 14.0 ± 3.3 mmHg olarak tanımlanmıştır. Normalin üst sınırı mean value + 2 SD olarak kabul edilirse, mPAP >20 mmHg'nin normalin üzerinde olduğu düşünülmelidir (14).

Revize edilmiş tanım, tüm pre-kapiller PH formlarının (Grup 1, 3, 4 ve 5) tanımına pulmoner vasküler direnç (PVR) ≥ 3 Wood ünitesinin (WU) dahil edilmesini içerir (Tablo 2.1). PVR'nin pulmoner vasküler hastalığın bir belirtisi olduğuna dair kesin bir kanıt olmamasına rağmen, revize edilmiş tanım, mPAP >20 mmHg'yi pulmoner vasküler hastalığa dayandırmakta ve pulmoner arteriyel wedge basıncı (PAWP) ile PVR kombinasyonunun pre-kapiller PH'yi post-kapiller PH'den ayırmada mevcut en iyi kriter olduğunu kabul etmektedir (12).

Revize PH tanımının hasta yönetimi üzerindeki ana etkisinin PH'nin daha erken belirlenmesi olacağı tahmin edilmektedir. mPAP'ı 21-24 mmHg olan hastalar; mPAP'ı ≥ 25 mmHg olan hastalara göre, hastalığın daha erken bir aşamasında tespit edilirse, yakından izlenebilir ve klinik olarak endike olduğu anda önerilen tedavi başlanabilir (6). Yüksek ancak 25 mmHg'nin altında anormal bir mPAP'ın normal bir mPAP ile karşılaştırıldığında artmış morbidite, mortalite ve semptomatik PH'ye ilerleme riski ile ilişkili olduğuna dair çok sayıda kanıt vardır (15-17). Akciğer hastalığı,

sol kalp hastalığı veya bağ dokusu hastalığı olanlar gibi PH geliştirme riski taşıyan çeşitli hasta gruplarında 21-24 mmHg'lik yüksek mPAP tespit edilmiştir (18) ve bu basınç değerleri sistemik skleroz (SSc)'lu hastalarda PH'ye progresyonun prediktif bir göstergesidir (19, 20).

PH teşhisi genellikle hastalığın ileri safhalarında konulur; bunun nedeni ise ilk semptomların nonspesifik olmasıdır (21). Bu nedenle, mPAP 21-24 mmHg aralığındayken PH'nin erken teşhisi kısıtlı durumlarda mümkündür. Örneğin; yüksek PH riski taşıdığı bilinen ve PH gelişiminin erken belirtileri için tarama programlarında yakından izlenen hasta popülasyonlarında erken teşhis konulabilmektedir (5). Pratikte, bu monitörizasyon ve taramaların ağırlıklı olarak PAH (Grup 1 PH) gelişme riski yüksek olan hastalarda, örneğin SSc hastalarına ve PAH ile ilişkili mutasyonları olan bireylerde uygulanması muhtemeldir (22). Örneğin, SSc hastaları için yapılan DETECT tarama algoritması; ekokardiyografi (EKO) ihtiyacını belirleyen altı değerlendirmeyi ve ardından RHC (tanı için) ihtiyacını belirleyen iki ekokardiyografik değişkeni kullanır. Özetle SSc hastalarına, PAH varlığını/yokluğunu belirlemek üzere yapılan DETECT taraması kapsamında önce EKO sonra da ihtiyaç varsa RHC gerçekleştirilir (23). DETECT algoritmasını uygulayan Norveç'teki bir merkezde, şüpheli PAH tanısı için RHC yapılan SSc hastalarının %31'inde mPAP 20-24 mmHg bulunmuştur. Aksine, DETECT taramaları yapılmazken, RHC yapılan hastaların sadece %17'sinde mPAP 20-24 mmHg bulunmuştur. Bu bağlamda, tarama programlarında, erken PAH teşhisi için 21-24 mmHg'lik yüksek mPAP kriterinin kullanılması büyük önem taşımaktadır (22).

SSc'li hastaların yanı sıra PAH geliştirme riski yüksek olan başka bir popülasyon, kemik morfogenetik protein reseptör tip 2 (BMP2) gen mutasyonları gibi PAH ile ilişkili mutasyonların taşıyıcıları olan hastalardır. BMP2 mutasyonları olan PAH hastaları, teşhis anında daha genç ve daha şiddetli hastalık ile daha yüksek ölüm riskine sahip olma eğilimindedir. Ailesel PAH'a neden olan genetik mutasyonlu hastaların taranması, ESC/ERS kılavuzları tarafından önerilmektedir. Ayrıca, BMP2 mutasyonlarının asemptomatik taşıyıcıları bazı merkezlerde klinik tarama programlarına dahil edilmesi için sunulmuştur. BMP2 mutasyonları olan hastalarda PAH gelişimini saptamak amacıyla en uygun tarama stratejilerini bulma çalışmaları devam etmektedir (6).

2.1.2. PH Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

PH epidemiyolojisiyle ilgili veriler sınırlıdır. Birleşik Krallık'ta PH görülme sıklığı milyonda 97 vaka şeklinde rapor edilmiş olup vakalarda kadın/erkek oranı 1,8 olarak tespit edilmiştir. ABD'de yaşa göre standardize edilmiş PH'ye bağlı ölüm oranının 100.000 kişide 4,5-12,3 olduğu bildirilmiştir. Farklı PH gruplarının prevalansına ilişkin karşılaştırmalı epidemiyolojik veriler az olsa da, sol kalp hastalığına bağlı PH (grup 2 PH)'nin en yaygın PH tipi olduğuna inanılmaktadır. Grup 2 PH'de şiddetli hastalık nispeten nadir görülmektedir. Grup 2 ve 3'e ait hastalar klinik pratikte önemli bir kısmı temsil etse de, bu hasta gruplarına ait demografik veriler ve klinik seyir hakkındaki bilgiler oldukça azdır. Küresel olarak şistosomiyazis ile ilişkili PAH ve yüksek rakımla ilişkili PH, insanlık için önemli bir yükü temsil etmektedir (5).

2.1.3. PH Sınıflaması

Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) ve Avrupa Solunum Derneği (ERS)'nin 2015'te yayımladığı ortak kılavuzda yer alan klinik sınıflamada PH 5 gruba ayrılmıştır (5):

- Grup 1. PAH
- Grup 2. Sol kalp hastalığına bağlı PH
- Grup 3. Akciğer hastalığı ve/veya hipoksiye bağlı PH
- Grup 4. CTEPH ve diğer pulmoner arter obstrüksiyonları
- Grup 5. Multifaktöriyel ve/veya mekanizması belli olmayan PH

PH, klinik sınıflamanın yanı sıra hemodinamik olarak da kategorize edilmiştir. Revize edilmiş PH tanımına göre hemodinamik PH sınıflaması Tablo 2.1'de verilmiştir (12).

Tablo 2.1. Revize edilmiş PH tanımına göre hemodinamik PH sınıflaması

	Klinik gruplar	Dinlenme halindeki tanımı	
		Eski	Revize
Prekapiller PH	Grup 1,3,4,5	mPAP $\geq$ 25mmHg PAWP $\leq$ 15mmHg*	mPAP>20mmHg PAWP $\leq$ 15mmHg PVR $\geq$ 3WU
İzole postkapiller PH	Grup 2,5	mPAP $\geq$ 25mmHg PAWP>15mmHg DPG<7mmHg ve/veya PVR $\leq$ 3WU	mPAP>20mmHg PAWP>15mmHg PVR <3WU
Kombine postkapiller ve prekapiller PH	Grup 2,5	mPAP $\geq$ 25mmHg PAWP>15mmHg DPG $\geq$ 7mmHg ve/veya PVR>3WU	mPAP>20mmHg PAWP>15mmHg PVR $\geq$ 3WU

* PVR>3WU prekapiller PH eski tanımında sadece Grup 1 için geçerliydi.

DPG, diyastolik basınç gradiyenti; mPAP, ortalama pulmoner arter basıncı; PAH, pulmoner arteriyel hipertansiyon; PAWP, pulmoner arteriyel wedge basıncı; PH, pulmoner hipertansiyon; PVR, pulmoner vasküler rezistans; WU, Wood ünitesi

2.1.4. PH Tanısı

PH tanısı, kapsamlı bir değerlendirme gerektirmektedir. Öncelikle, semptomlara ve fizik muayeneye dayalı klinik bir şüphenin ardından hemodinamik kriterlerin karşılandığı doğrulanmalıdır. Daha sonra, PH etiyolojisi ile beraber hastalığın hemodinamik ve fonksiyonel şiddeti ortaya konmalıdır (5).

Klinik Prezantasyon: PH semptomları spesifik değildir. Esas olarak progresif sağ ventriküler (RV) disfonksiyon ile ilişkilidir. İlk semptomlar tipik olarak eforla ortaya çıkar. Nefes darlığı, yorgunluk, halsizlik, anjina ve senkop bu semptomlar arasındadır. Daha seyrek olarak hastalar kuru öksürük ve egzersize bağlı bulantı ve kusma tanımlayabilir. Dinlenme sırasında ortaya çıkan semptomlar yalnızca ileri vakalarda görülür. Abdominal distansiyon ve ayak bileği ödemi ilerleyen RV yetmezliği ile gelişecektir. PH etiyolojisinde yer alan veya PH ile ilişkili hastalıklar ve komorbid durumlar, PH'nin prezentasyonunu değiştirebilir. Bazı hastalarda klinik prezentasyon, PH'nin mekanik komplikasyonları ve pulmoner vasküler yataktaki kan akımının anormal dağılımı ile ilişkili olabilir. Bunlar, hipertrofik bronşiyal arterlerin rüptürüne bağlı hemoptizinin yanı sıra, sol rekürren laringeal sinirin kompresyonunun neden

olduğu ses kısıklığı, büyük hava yolu kompresyonunun neden olduğu hırıltı ve sol ana koroner arterin kompresyonunun neden olduğu miyokardiyal iskemiye bağlı anjina gibi pulmoner arteriyel dilatasyona atfedilebilen semptomları kapsar. PA'nın önemli ölçüde genişlemesi; rüptürü veya diseksiyonu ile sonuçlanarak kardiyak tamponad belirti ve semptomlarına yol açabilir. PH'nin fizik muayene bulguları arasında sol parasternal lift, ikinci kalp sesinin vurgulu bir pulmoner bileşeni, bir RV üçüncü kalp sesi, triküspit regürjitasyonuna bağlı pansistolik bir üfürüm ve pulmoner regürjitasyona bağlı diyastolik bir üfürüm bulunur. Yüksek juguler venöz basınç, hepatomegali, asit, periferik ödem ve soğuk ekstremiteler ilerlemiş hastalığı karakterize eder. Hırıltı ve çattırlar genellikle yoktur. Fizik muayene, PH etiyolojisini belirlemede yardımcı olabilir. Telanjiektazi, dijital ülserasyon ve sklerodaktili sklerodermada görülür. İnspiratuar çattırlar interstisyel akciğer hastalığına işaret edebilir. Spider nevüs, testiküler atrofi ve palmar eritem ise karaciğer hastalığını düşündürür. Çomak parmakla karşılaşıldığında, pulmoner venooklüzif hastalık (PVOD), siyanotik konjenital kalp hastalığı (CHD), interstisyel akciğer hastalığı veya karaciğer hastalığı düşünülmelidir (5).

Elektrokardiyografi: Elektrokardiyografi (EKG), PH için destekleyici kanıtlar sağlayabilir; ancak normal bir EKG tanımı dışlamaz. Hafiften şiddetliye kadar tüm PH formlarında EKG anormallikleri görülebilir. Bu EKG anormallikleri; P pulmonale, sağ aks sapması, RV hipertrofisi, RV gerilimi, sağ dal bloğu ve düzeltilmiş QT (QTc) uzamasını içerebilmektedir. RV hipertrofisi bir tarama aracı olmak için yetersiz duyarlılığa (%55) ve özgüllüğe (%70) sahipken; RV gerilimi daha duyarlıdır (24). QRS kompleksinin ve QTc'nin uzaması ciddi hastalığı düşündürür (25, 26). EKG ayırıcı tanısı anterolateral miyokardiyal iskemiye içerir. İskemi, PH'den farklı olarak daha çok lateral ve inferior derivasyonları etkiler. Anterior göğüs derivasyonlarında değişiklik olduğunda ise genellikle V1, V2, V3'te Q dalgası bulunur. Sağ aks sapması nadir görülür. İlerlemiş PH'de, atriyal flutter ve atriyal fibrilasyon gibi supraventriküler aritmiler ortaya çıkabilir ve prognoz daha da kötüleşir. PH'de ventriküler aritmiler nadirdir (5, 27).

Akciğer Grafisi: PH'li birçok hastada, akciğer grafisi teşhis sırasında anormallikler gösterir. Bu anormallikler, merkezi pulmoner arter genişlemesi ve periferik kan damarlarının silikleşmesini (budanma) içerebilir (28). Daha ileri vakalarda RA ve RV genişlemesi görülebilir (5). Bununla birlikte, normal bir akciğer grafisi PH'yi dışlamaz. PH teşhisinde akciğer grafisinin kanıt değeri düşüktür (28).

Transtorasik Ekokardiyografi: Transtorasik ekokardiyografi, PH teşhisinde önemli bir yer tutmaktadır. EKO aracılığıyla, PH'nin neden olduğu kardiyak değişiklikler görülebilmekte ve sürekli dalga Doppler ölçümleri yoluyla sistolik PAP tahmin edilebilmektedir. ESC/ERS kılavuzları, istirahatte ölçülen triküspit regürjitasyon velositesi (TRV) ve ek ekokardiyografik değişkenler aracılığıyla “yüksek, orta veya düşük olasılıklı PH” tahmini yapılmasını önermektedir. Bu ekokardiyografik değerlendirme ve klinik duruma dayanarak RHC'nin gerekli olup olmadığına karar verilmektedir (28).

EKO, PH teşhisi için en önemli non-invazif test olmasına rağmen; kısıtlılıkları da vardır. Deneyimli uzmanlar tarafından yapılan testlerde bile PH'li hastaların sadece %90'ında triküspit regürjitasyonu tespit edilmiştir (28). Bu nedenle EKO'nun sistolik PAP tahmini için her zaman kullanılamayacağı anlamına gelir. Bazı komorbiditelerin (örn, pulmoner amfizem) varlığında ekokardiyografik incelemenin kalitesi sınırlıdır ve bu da yorumlamada belirsizliğe neden olabilir (28, 29). Yakın zamanda, ekokardiyografik sağ kalp parametreleri için standart değerler tanımlanmıştır. Bu standart değerler aracılığıyla patolojik değişikliklerin saptanması kolaylaşmıştır (28, 30-32) ancak söz konusu ekokardiyografik eşikler tüm parametreler için (örn, merkezi pulmoner arter çapı) henüz belirlenmemiştir.

Bununla birlikte, rutin klinik uygulamada, hastalar arasında ekokardiyografik teşhis açısından büyük farklılıklar gözlenebilmektedir (28, 33). Klinik açıdan PH şüpheli semptomatik hastaların %10-30'unda, indirekt belirtiler dikkate alınsa bile EKO ile PH teşhisi atlanabilmektedir (23, 28). Bu nedenlerden dolayı, PAH veya CTEPH için risk faktörü olan semptomatik hastalarda ekokardiyografik açıdan PH olasılığı düşük olsa bile ek testler (örn, kardiyopulmoner egzersiz testi) yapılmalıdır. Son yıllarda, bazı ekokardiyografik doku Doppler parametrelerinin PAH ile prognostik olarak ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (28, 34-36) ancak bu durumun ileriye dönük olarak değerlendirilmesi ve daha iyi standardize edilmesi gerekir.

Solunum Fonksiyon Testleri ve Arteriyel Kan Gazı Analizi: Solunum fonksiyon testleri (SFT'ler) ve arteriyel kan gazı (AKG) analizi, PH'de altta yatan hava yolu veya parankimal akciğer hastalıklarına dair kanıt sağlar ve ayırıcı tanı koymada yardımcı olabilir. Vital kapasite ve 1 sn'deki zorlu vital kapasite (FEV1) PH hastalarında, solunum kaslarındaki kısıtlılık nedeniyle azalabilir (28, 37).

Ventilasyon/Perfüzyon Akciğer Sintigrafisi: CTEPH'yi kesin olarak dışlamak veya CTEPH tanısı konması için yapılmalıdır (28).

Yüksek Çözünürlüklü Toraks Bilgisayarlı Tomografisi: Altta yatan akciğer hastalığı veya CTEPH'si olan hastaların belirlenmesine yardımcı olur. PVOD'u saptamada önemli rol oynar. Yapılan son çalışmalar, pulmoner arter çapı için 29 mm'lik bir eşik değer ve pulmoner arter çapı/aort çapı (38) için 1'lik bir oran önerilerek PH hastalarının yüksek duyarlılık ve özgüllük ile belirlenebildiğini göstermektedir (28, 39). Ancak, pulmoner arter çapı/aort çapı oranı, özellikle hipertansiyona bağlı aort genişlemesi olan yaşlı hastalarda PH açısından yanlış bir değerlendirmeye neden olabilir (28, 40).

Kardiyak Manyetik Rezonans Görüntüleme: RV'nin boyutu, morfolojisi ve işlevi hakkında doğru ve tekrarlanabilir değerlendirmeler sağlar. Ayrıca elde edilen veriler RHC ile iyi koreledir (28).

Laboratuvar Testleri, İmmünolojik Testler ve Abdominal Ultrasonografi: PH tanısında primer olarak kullanılmasa da etiyolojisini ve uç organ hasarını belirlemek için gereklidir (28).

Sağ Kalp Kateterizasyonu: İnvazif bir test olan RHC, deneyimli merkezlerde gerçekleştirildiğinde komplikasyon oranları çok düşüktür (28, 41). RHC, PAH veya CTEPH tanısının doğrulanması, hemodinamik bozukluğun ciddiyetinin değerlendirilmesi ve seçilmiş hastalarda pulmoner vazoreaktivite testi için esansiyeldir. Pulmoner vazoreaktivite testi, İPAH, kalıtsal PAH ve ilaca bağlı PAH hastalarında kalsiyum kanal blokerleri (KKB) ile tedavi edilebilecek hastaları belirlemek için yapılmalıdır. Vazoreaktivite testleri çoğunlukla nitrik oksit (NO) kullanılarak yapılır. Pulmoner basınçlar, aralıksız solunum sırasında ekspirasyonun sonunda veya 3–4 solunum döngüsü boyunca değerlerin ortalaması alınarak ölçülmelidir. PVR'nin hesaplanması önemlidir; çünkü PAH teşhisi için ESC/ERS kılavuzlarında belirtilen gerekli parametrelerdendir (28).

Tanısal Algoritma: ESC/ERS kılavuzlarına göre teşhis süreci; anamnez, semptomlar, klinik bulgular ve PH ile uyumlu EKO sonuçlarına dayanan şüpheyile başlar. EKO'ya dayalı düşük PH olasılığı varlığında, PH kılavuzlarına göre ek araştırmalar gerekli değildir ve semptomların diğer nedenleri düşünülmelidir. Ek olarak, PAH veya CTEPH için risk faktörleri olan semptomatik hastalarda, ekokardiyografik açıdan PH olasılığı düşük olsa bile, sadece EKO ile PH tanısı atlanabileceğinden ek testler (örn, kardiyopulmoner egzersiz testi) yapılmalıdır. EKO yüksek veya orta düzeyde PH

olasılığını gösteriyorsa, kılavuzlarda ilişkili sol kalp hastalığı (Grup 2) veya akciğer hastalığı (Grup 3) açısından EKG, AKG analizi, SFT, akciğer grafisi ve yüksek çözünürlüklü toraks bilgisayarlı tomografisi (HRCT) önerilmektedir. Önemli bir sol kalp hastalığı veya akciğer hastalığı doğrulanırsa, bu hastalık için uygun tedavi başlanmalıdır. Şiddetli PH ve/veya RV işlev bozukluğu varlığında hastalar daha ileri değerlendirme için ileri bir PH merkezine sevk edilmelidir (28).

Önemli bir sol kalp hastalığı veya akciğer hastalığı bulunmazsa, CTEPH ile PAH ayırıcı tanısı için ventilasyon/perfüzyon (V/Q) sintigrafisi yapılmalı ve hastalar ileri bir PH merkezine sevk edilmelidir. V/Q sintigrafisinde segmental perfüzyon defektleri varsa, bu CTEPH'yi düşündürür. CTEPH'nin kesin tanısı için (ve pulmoner endarterektomi veya balon pulmoner anjiyoplasti için uygunluğun değerlendirilmesi) BT pulmoner anjiyografi, RHC ve selektif pulmoner anjiyografi gerekmektedir (28).

PAH, perfüzyon sintigrafisinde dikkat çekici olmayan veya yaygın heterojen bir görünüm ile karakterizedir. PAH, özellikle pozitif aile öyküsü, bağ dokusu hastalığı, konjenital kalp defektleri, HIV enfeksiyonu, portal hipertansiyon veya PAH'ı indüklediği bilinen ilaçların veya toksinlerin kullanım öyküsü gibi risk faktörleri varsa düşünülmelidir. RHC ile hemodinamik teşhis konulur. Hematoloji, biyokimya, immünoloji, seroloji, ultrasonografi ve genetik dahil olmak üzere ek spesifik tanı testleri kullanılarak nihai teşhis konulabilir (28).

2.2. Grup 1 PH: PAH

2.2.1. PAH Tanımı ve Sınıflaması

PAH, hemodinamik olarak pre-kapiller PH (ortalama PAP $\geq$ 25mmHg, PAWP $\leq$ 15 mmHg ve PVR $>$ 3 WU) varlığı ve akciğer hastalıkları, CTEPH veya diğer nadir hastalıklara bağlı PH gibi prekapiller PH nedenleri dışlandığında kalan PH hastası grubu olarak tanımlanmaktaydı (5). Revize edilen yeni PH tanımı dikkate alındığında PAH, pre-kapiller PH (mPAP $>$ 20 mmHg, PAWP $\leq$ 15 mmHg ve PVR $>$ 3 WU) varlığı ve akciğer hastalıkları, CTEPH veya diğer nadir hastalıklara bağlı PH gibi prekapiller PH nedenleri dışlandığında kalan PH hastası grubu olarak değiştiği söylenebilir (6). PAH, benzer bir klinik tabloyu paylaşan ve akciğer mikrosirkülasyonunda hemen hemen aynı patolojik değişiklikleri içeren farklı formları kapsar (Tablo 2.2) (5).

Tablo 2.2. PAH sınıflaması

1. İdiyopatik
2. Kalıtsal
 - 2.1. BMPR2 mutasyonu
 - 2.2. Diğer mutasyonlar
3. İlaç ve toksinle indüklenen
4. İlişkili durumlar
 - 4.1. Bağ doku hastalığı
 - 4.2. HIV enfeksiyonu
 - 4.3. Portal hipertansiyon
 - 4.4. Konjenital kalp hastalığı
 - 4.5. Şistozomiyazis

BMPR2, kemik morfogenetik protein reseptör tip 2; HIV, insan immünyetmezlik virüsü.

2.2.2. PAH Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

PAH ve idiyopatik PAH (İPAH) prevalansının, sırasıyla milyon yetişkin nüfus başına 15 vaka ve 5,9 vaka'dan daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. PAH insidansının ise milyon yetişkin nüfus başına yılda 2,4 vaka'yı geçtiği düşünülmektedir. Avrupa'da, PAH prevalansı ve insidansı sırasıyla milyon nüfus başına 15-60 vaka ve yılda 5-10 vakadır. Kayıtlara göre, PAH hastalarının yaklaşık yarısı İPAH, kalıtsal PAH veya ilaca bağlı PAH'tır. PAH ile ilişkili durumların başında bağ doku hastalığı (CTD) gelirken; en önemlisi sistemik skleroz (SSc)'dur (5, 42-44).

İPAH, herhangi bir ailesel PAH öyküsü veya bilinen tetikleyici faktör olmaksızın sporadik hastalığa karşılık gelir. 1981'de oluşturulan ilk ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri kayıtlarında İPAH'lı hastaların ortalama yaşı 36 iken PAH'ta yeni ortalama tanı yaşı mevcut kayıtlarda 50-65 olarak belirlenmiştir. Kadın predominansı kayıtlar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Hatta yaşlı hastalarda bu predominans mevcut olmayabilir. Hastalık sağkalımı ise zamanla iyileşmiş gibi görünmektedir (5).

PAH gelişimi için bir dizi risk faktörü tanımlanmıştır. Kesin klinik ilişkiler Tablo 2.2'de "İlişkili durumlar" başlığı altında listelenirken; farklı ilaçların ve toksinlerin risk seviyeleri Tablo 2.3'te gösterilmiştir (5).

Tablo 2.3. PAH'ı indükleyen ilaç ve toksinlerin risk seviyeleri

Kesin	Muhtemel	Mümkün
Aminoreks	Amfetaminler	Kokain
Fenfluramin	Dasatinib	Fenilpropanolamin
Deksfenfluramin	L-triptofan	St John's Wort
Toksik kolza yağı	Metamfetaminler	Amfetamin benzeri ilaçlar
Benfluoreks		İnterferon α ve β
SSRI ^a		Alkilleyici ajanlar gibi bazı kemoterapötik ajanlar (mitomisin C, siklofosfamid) ^b

SSRI, selektif serotonin geri alım inhibitörleri.

^a SSRI kullanan annelerin yenidoğanlarında persistan PH riski artmıştır.

^b Alkilleyici ajanlar PVOD'a sebep olabilmektedir.

2.2.3. PAH Genetiği

Kalıtsal PAH, PAH'lı hastaların yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (45). Kalıtsal PAH patofizyolojisinde çok sayıda mutasyon belirlenmiş olup önemlileri aşağıda belirtilmiştir.

TGF- β Yolağı Mutasyonları

- **BMPR2:** Heterozigot BMPR2 mutasyonları, ailesel PAH'ın yaklaşık %75'ini ve sporadik PAH vakalarının yaklaşık %25'ini oluşturur (5, 46). BMPR2 mutasyon taşıyıcılarının yaşam boyu PAH geliştirme riski yaklaşık %20'dir (28, 46). BMPR2, vasküler hücre proliferasyonunun kontrolünde yer alan kemik morfogenetik proteinleri için bir tip 2 reseptörü kodlar (5). SMAD ve LIM kinazın intraselüler yollarını aktive ederek vasküler düz kas hücresi büyümesini düzenler. BMPR2 geninin fonksiyon kaybı mutasyonu, SMAD aktivasyonunun azalmasına ve sonuçta PAKDH'lerin proliferasyonunun artmasına yol açar (47).
- **ALK1:** Aktivasyonu PAKDH'lerin proliferasyonunun artmasına yol açar (48) (49)

- **Endoglin:** Aktivasyonu hücresel replikasyonu indükleyen membrana bağlı TGF- β reseptörüdür (49).

Kaveolin-1 (CAV1) Mutasyonu

Kaveola oluşturan bir membran proteinidir. Kaveola, membran trafiğini, hücre sinyalini, kolesterol homeostazisini ve mekanotransdüksiyonu düzenler (50).

KCNK3 Mutasyonu

PAKDH'lerinde eksprese edilen iki porlu potasyum kanalıdır. Bu potasyum kanalı, istirahat membran potansiyelini, pulmoner vasküler tonusu ve hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonu modüle eder (51).

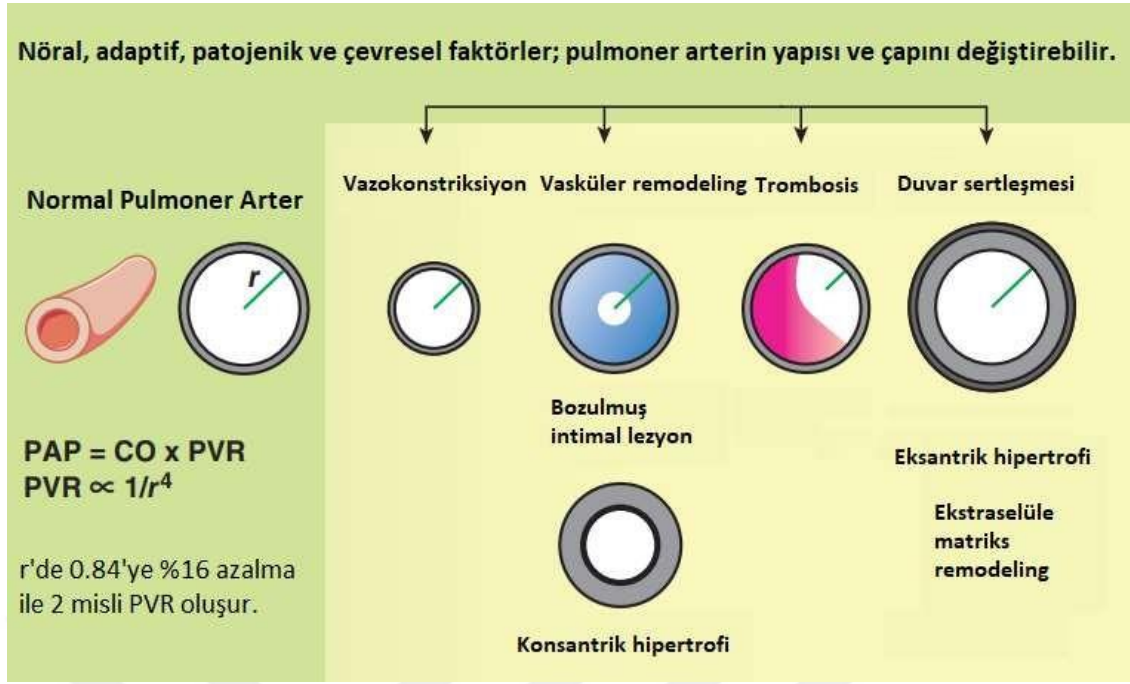
Genetik test ve danışmanlık açısından, ilk olarak BMPR2, ALK1 ve endoglin kodlayan genlerin mutasyonlarının test edilmesi gerekir. Testler negatifse, KCNK3 veya CAV1 gibi diğer genler için test yapılması düşünülebilir (28).

2.2.4. PAH'ta Patolojik Değişiklikler

Pulmoner Vasküler Değişiklikler

PAH predominant olarak küçük rezistans pulmoner arterleri etkilemekte olup bu yapılarda görülen intimal hiperplazi, medial hipertrofi, adventisyal proliferasyon, in situ tromboz ve inflamasyon ile karakterizedir (Şekil 2.1). PAH'ın patognomonik lezyonu olan pleksiform arteriyopati, küçük müsküler arterlerin lümenindeki kapiller benzeri, anjiyoproliferatif vasküler kanalları ifade etmektedir. Pleksiform lezyonlar genellikle dallanma noktalarında görünür. Sıklıkla lümen içinde fibrin trombüsü vardır ve değişen kanal çaplarına sahiptir, bu da onlara düzensiz bir görünüm verir (45).

Vasküler remodelingin erken evreleri medial hipertrofi ve hiperplaziyi içerirken; ilerlemiş PAH'lı hastaların arteriyolları, intimal hiperplaziden kaynaklanan kompleks pleksiform lezyonlarla karakterizedir (52). Bu değişiklikler lüminal oklüzyon ve arteriolar budanmaya yol açmaktadır (53).



PAP, Pulmoner arter basıncı; CO, Kardiyak output; PVR, Pulmoner vasküler direnç (54)

Şekil 2.1. PAH gelişiminde rol oynayan major patojenik bileşenler

Sağ Ventriküler Değişiklikler

RVH ve RV yetmezliği PAH'ın neden olduğu önemli patolojik değişikliklerdendir. Artmış PVR nedeniyle RV afterload'undaki kronik yükselme, adaptif veya maladaptif olabilen RVH'ı indükler. Adaptif RVH, minimal eksantrik dilatasyon ve fibrozis ile birlikte konsantrik hipertrofi ile karakterizedir. Adaptif RVH'de ejeksiyon fraksiyonu (EF), kalp debisi ve dolum basınçları korunur. Buna karşın, maladaptif RVH'de, eksantrik dilatasyon, fibroziste artış, EF ve kalp debisinde azalma, dolum basınçlarında yükselme ve kapiller seyreklik vardır. Maladaptif RVH artan aerobik glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve glutaminolizde artış ile karakterizedir. Maladaptif RVH, ayrıca RV kardiyomiyositlerinde sempatik aktivite artışı ve α , β ve dopaminerjik reseptörlerin down regülasyonu ile ilişkilidir. Maladaptif RVH, fetal kalbe benzer şekilde, β -miyozin ağır zincirlerinde artış (hipokontraktil) ve azalmış α -miyozin ağır zincirlerinde azalış (hiperkontraktil) ile ilişkilidir (45).

Bazı hastalar, özellikle konjenital kalp hastalığı ile ilişkili PAH olanlar, uzun süre adaptif RVH ile stabil kalır (55, 56). Bununla birlikte, PAH'lı hastaların bir bölümünde, özellikle skleroderma ile ilişkili PAH'ı olanlarda, maladaptif RVH nispeten erken gelişerek RV yetmezliğine ve ölüme yol açar (57). RV'nin adaptif ve kompensatuvar hipertrofisinden maladaptif RV dilatasyonuna ve nihayetinde RV

yetmezliğine geçişe aracılık eden mekanizmalar açık değildir ve araştırılmaktadır (58, 59).

2.2.5. PAH Patogenezi

PAH ve PAH'ın neden olduğu RV disfonksiyonu patogenezinin birden fazla mekanizmanın aracılık ettiği düşünülmektedir (Şekil 2.2). Bu mekanizmalar temelde aşağıdaki başlıklar halinde toplanabilir (45).

- Pulmoner vasküler disfonksiyon
- Pulmoner vasküler proliferasyon
- Pulmoner vasküler ECM remodelingi
- Pulmoner vasküler inflamasyon
- Sağ ventriküler metabolik düzensizlikler
- Sağ ventrikül iskemisi
- Sağ ventrikülde kalsiyumun yanlış kullanımı
- Sağ ventriküler sarkomer remodelingi
- Sağ ventriküler hücre iskeleti remodelingi
- Oksidatif stres

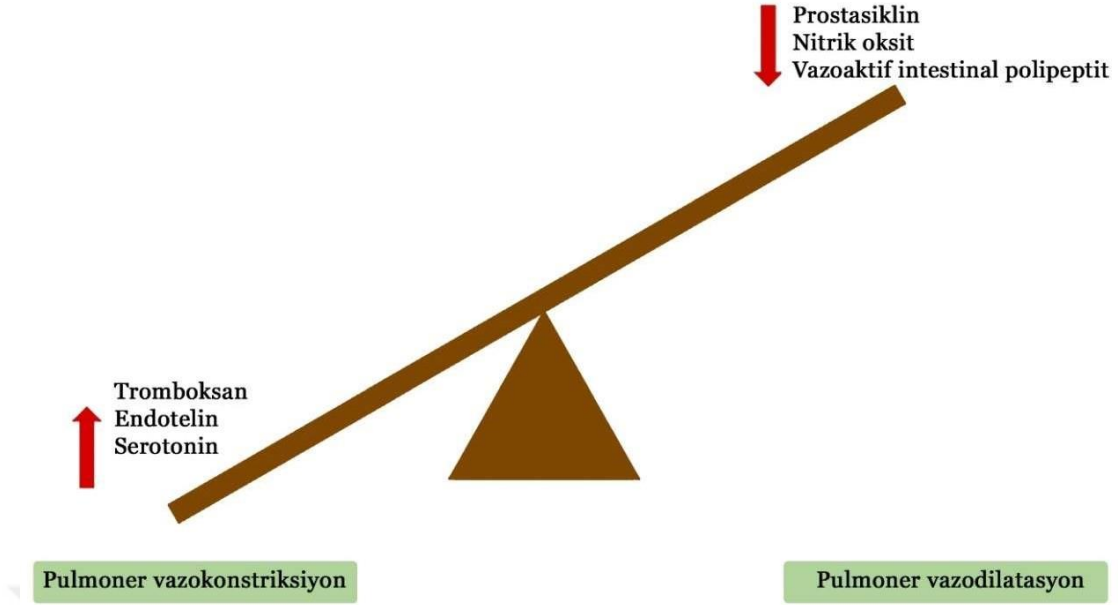


eNOS, Endotelial nitrik oksit sentaz; NO, Nitrik oksit; cGMP, Siklik guanozin monofosfat; PGI₂, Prostaglandin I₂; NOX, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz; Mito. ROS, Mitokondriyal reaktif oksijen türleri; H₂S, Hidrojen sülfid; 5-HT, 5-hidroksitriptamin; ET-1, Endotelin-1; CX3CL1, C-X3-C motif kemokin ligant 1; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; IL, interlökin; PDE, Fosfodiesteraz; PDGF, Trombosit türevi büyüme faktörü; VEGF, Vasküler endotelial büyüme faktörü; PVR, Pulmoner vasküler direnç; PAP, Pulmoner arter basıncı. (60).

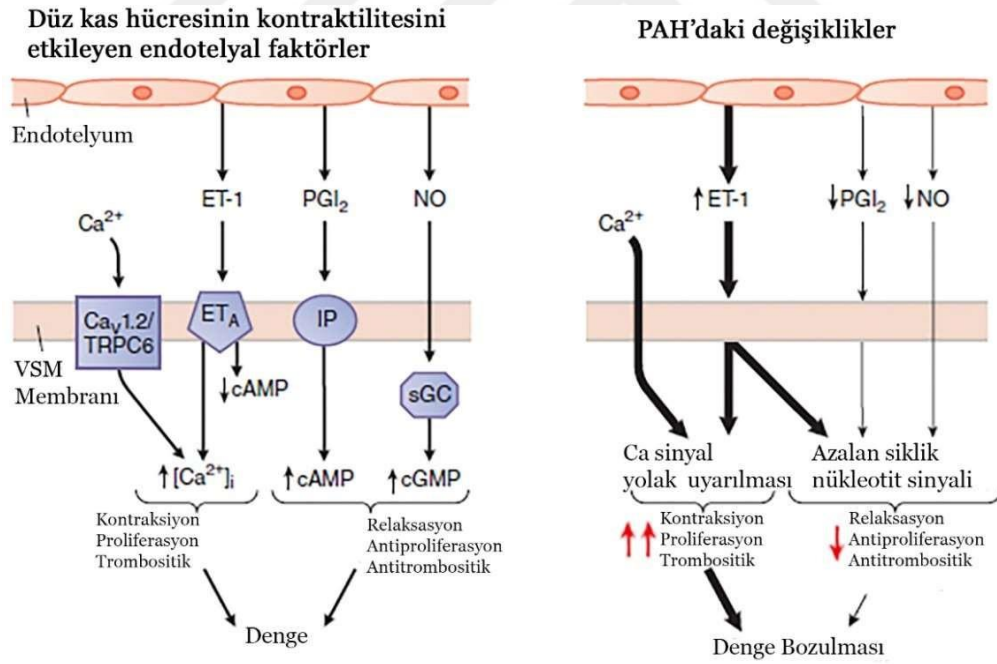
Şekil 2.2. PAH patogeneğinde NO, oksidatif stres ve inflamasyonun rolü

Pulmoner Vasküler Disfonksiyon

PAH'ta küçük pulmoner arterlerde vazokonstriktör ve vazodilatör maddeler arasındaki denge vazokonstriktörler lehine bozulmuştur (Şekil 2.3) (45). PAH'lı hastalarda vazokonstriktör tromboksan, endotelin ve serotonin üretimi artarken; vazodilatör prostasiklin, NO ve VİP sentezinin azaldığı bildirilmiştir. PAH'ta vazokonstriktörler lehine olan bu dengesizliğin, küçük pulmoner arterlerde vazokonstriksiyona neden olmasının dışında birçok önemli etkileri olabilmektedir (Şekil 2.4). Örneğin, tromboksan trombosit proliferasyonunu; endotelin ise düz kas hücre proliferasyonunu indüklemektedir. Antiproliferatif ve antitrombotik özellikli prostasiklin ve NO'daki azalma söz konusu etkileri daha da şiddetlendirmektedir (61).



Şekil 2.3. Vazodilatör-vazokonstriktör maddeler arasındaki dengenin vazokonstriktörler lehine bozulması.



ET-1, Endotelin-1; PGI₂, Prostaglandin I₂; NO, Nitrik oksit; TRPC6, transient reseptör potansiyel katyon kanalı 6; ET_A, Endotelin reseptörü tip A; cAMP, Siklik adenosin monofosfat; IP, Prostasiklin reseptörü; sGC, Çözünebilir guanilat siklaz; cGMP, Siklik guanozin monofosfat (54).

Şekil 2.4. PAH'ta endotel ile vasküler düz kas arasındaki etkileşim.

PH'de pulmoner arterler, endotel bağımlı gevşemenin azalmasıyla bağlantılı olarak artan kasılma ile karakterizedir. Bu durum endotelyal disfonksiyonun yol açtığı vazokonstriktif/vazodilatör mediatörlerin üretiminde/biyoaktivitesinde bir dengesizliğin sonucudur (62). Bunun yanı sıra, pulmoner arter düz kas aktivitesi, RhoA/ROCK yolu (63) gibi kontraktıl sinyal yollarındaki değişiklikler ve voltaj kapılı potasyum kanalları gibi iyon kanallarının ekspresyonunun/aktivitesindeki azalma sonucunda değişebilmektedir (64, 65). Bu değişiklikler sonucunda, pulmoner arterlerde aşırı vazokonstriksiyon tablosu ortaya çıkmaktadır.

Pulmoner Vasküler Proliferasyon

PADKH'lerde hücrel replikasyonu destekleyen ve pulmoner vasküler proliferasyona katkıda bulunan antiapoptotik yollarda değişiklikler vardır. Düz kas proliferasyonunu stimüle eden mekanizmalara örnekler:

- Transkripsiyon faktörleri hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)-1 α ve aktive T hücrelerinin nükleer faktörü'nün uygunsuz aktivasyonu
- Voltaj kapılı potasyum kanallarının ekspresyonunun azalması (örn, Kv1.5 ve Kv2.1)
- Antiapoptotik protein survivin'in ekspresyonunun artması
- Geçici reseptör potansiyel kanallarının (TRPC6) artan ekspresyonu (kalsiyum overload'una yol açar).

Aşırı mitokondriyal fizyona yol açan mitokondriyal fizyon/füzyon dengesizliğinin de PADKH proliferasyonunu uyardığına dair güçlü kanıtlar vardır. Sonuç olarak PAH'ta, birden fazla mekanizmanın katkısıyla aşırı PADKH proliferasyonu uyarılır (45).

Pulmoner Vasküler ECM Remodelingi

ECM remodelinginin PAH patofizyolojisindeki tetikleyici olaylardan biri olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur (45). Monokrotalin (MCT) ile indüklenen sıçan PAH modelinde, MCT enjeksiyonundan 2 gün sonra ve pulmoner arter düz kas hipertrofisinden 14 gün önce, hiler pulmoner arterlerdeki internal elastik laminada fragmantasyon gerçekleştiği bildirilmiştir (66). Bu modelde, internal elastik laminanın bozulması, serin elastazların ve matriks metalloproteinaz (MMP)'ların artan elastolitik aktivitesi ile ilişkilidir. Serin elastazların inhibisyonu ile deneysel modellerde PAH gelişiminin önlenmesi, ECM remodelinginin distal pulmoner arter düz kas proliferasyonundaki patojenik rolünü göstermektedir (67, 68).

ECM remodelinginde lizil oksidaz (LOX)'lar da önemli yer tutmaktadır. LOX'lar, lizin ve hidroksilizin kalıntılarının oksidatif deaminasyonunu katalize eden, elastin ve kollajen moleküllerinde molekül içi ve moleküller arası kovalent çapraz bağlar oluşturmak üzere yoğunlaşan reaktif semialdehitler üreten bakır bağımlı amin oksidazlardır. Bu süreç, ECM'ye yapısal stabilite kazandırarak lif olgunlaşmasını sağlar. Şimdiye kadar 5 tip LOX tanımlanmıştır. Prototip olan LOX'un yanısıra 4 adet LOX-benzeri (LOXL) form (LOXL1'den LOXL4'e kadar) bulunmaktadır. Tüm LOX formları kollajen ve elastin çapraz bağlanmasını başlatma yeteneğine sahiptir. ECM çapraz bağlama enzimleri olan LOX'ların PH'deki pulmoner vasküler remodeling patogenezinde patojenik bir rol üstlendiği düşünülmektedir. Pulmoner vasküler sistemdeki yüksek LOX aktivitesinin, ECM bileşenlerinin (kollajen ve elastin lifleri gibi) kalıcılığına ve aşırı bolluğuna katkıda bulunduğu, liflerin uygun olmayan şekilde remodelingine (aşırı çapraz bağlanma) neden olduğu ve böylece vasküler hastalığa katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Bu liflerin proteolitik yıkıma dirençli olmasının ise, matriks sentezi ve yıkımı arasındaki dengeyi bozmakta olduğu ve bu durumun vasküler hasara eşlik ettiği tahmin edilmektedir (69).

Pulmoner Vasküler İnflamasyon

Hem PH hayvan modelleri hem de PAH'lı hastaların pulmoner damarlarında inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmesi inflamasyonun pulmoner vasküler remodelinge katkıda bulunabileceğini göstermektedir (70). Ayrıca, PAH'lı hastalarda serum inflamatuvar sitokin (interlökin [IL]-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ve tümör nekroz faktörü- α [TNF- α]) seviyelerinin arttığı (71, 72); IL-6, IL-8, IL-10 ve IL-12 serum seviyelerinin PAH'ta sağkalımı öngördüğü (72) rapor edilmiştir. IL-6, PAH'ta en yoğun çalışılan inflamatuvar sitokin olmuştur. IL-6-knockout fareler hipoksi ile indüklenen PH'ye karşı dirençliyken (73); IL-6 aşırı ekspresyonunun PH'yi indüklediği (74) bildirilmiştir. Ayrıca, IL-6 reseptör antikoru tosilizumab kullanımının, Castleman hastalığı olan bireylerde PH'nin şiddetini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, yüksek IL-6 düzeylerinin daha şiddetli bir PAH fenotipi ile ilişkili olduğuna dair daha fazla kanıt sağlamıştır (45, 75, 76).

Sağ Ventriküler Metabolik Düzensizlikler

Pulmoner vasküler remodelingde olduğu gibi, PAH'ın neden olduğu RV disfonksiyonunda da birden fazla mekanizma rol oynamaktadır. Metabolik düzensizliklerin adaptif RVH'den maladaptif RVH'ye geçişte muhtemel rolü olduğu

düşünülmektedir. PAH'ın neden olduğu RV disfonksiyonunda, oksidatif metabolizmada azalma ve ektopik glutaminolizin işaret ettiği mitokondriyal disfonksiyonun önemli rol oynadığı gösterilmiştir (77, 78). PAH'ın neden olduğu RV disfonksiyonuna aracılık eden muhtemel metabolik değişiklikler aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

- PAH'ın etkilediği RV'de glikozun oksidatif metabolizmasından anaerobik metabolizmasına geçiş meydana gelir. Anaerobik metabolizma, aerobik metabolizmadan daha az ATP ürettiği için enerji açlığı durumu ortaya çıkabilir. Kompanzasyon amacıyla RV'nin glikoz uptake'si artar (45).
- Kanseri hücrelerine benzer şekilde, PAH'ın etkilediği RV'de piruvat dehidrogenaz kinazı (PDK) aktive eden HIF-1 α 'nın (Warburg etkisi) normoksik aktivasyonu vardır. PDK'nın aktivasyonu, aerobik glikoz oksidasyonu için hız sınırlayıcı enzim olan piruvat dehidrogenazı (PDH) inhibe eder. Dikloroasetat kullanılarak PDK inhibisyonu yoluyla oksidatif metabolizmanın aktivasyonunun, hayvan PAH modellerinde RV fonksiyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu rapor edilmiştir (79, 80).
- PAH'ın etkilediği RV'de yağ asidi oksidasyonu artmıştır. PH hayvan modellerinde, ranolazin veya trimetazidin'in sebep olduğu yağ asidi oksidasyonundaki inhibisyonun, glikoz oksidasyonunda reziprokal artışa ve RV fonksiyonunda iyileşmeye yol açtığı bildirilmiştir (81).
- Genellikle sadece kanser hücrelerinde tespit edilen metabolik bir yol olan glutaminoliz, deneysel olarak hipertrofik RV'lerde belirlenmiştir. Glutaminoliz'in inhibisyonunun, glikoz oksidasyonunu artırdığı, RV fonksiyonunda iyileşme sağladığı ve egzersiz kapasitesini artırdığı bildirilmiştir (78).

Sağ Ventrikül İskemisi

Maladaptif RV remodelingine ve metabolik değişikliklere katkıda bulunan diğer bir faktör, azalmış sağ koroner arter epikardiyal akışına ve PAH ile ilişkili kapiller seyrekliğe bağlı RV iskemisidir (45). RV iskemisine katkıda bulunan süreçler aşağıdaki gibi açıklanabilir:

- Normal RV'de sistol ve diyastol sırasında sağ koroner arterden perfüzyon sağlanır. Bununla birlikte, PAH'ta yüksek sağ ventrikül sistolik basıncı

(RVSP), sağ koroner arter ve aort arasındaki basınç farklarını en aza indirir ve böylece dolum süresini ve RV perfüzyonunu azaltır (82).

- Anjiyogenezdeki bozulma (kapiller ve intramüsküler arteriol sayısında azalma) RV iskemisine katkıda bulunabilir (83).

Sağ Ventrikülde Kalsiyumun Yanlış Kullanımı

Kalsiyumun yanlış kullanımının PAH'taki RV disfonksiyonuna katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (45).

- Pulmoner artere bant uygulanmasıyla oluşturulan bir köpek PH modelinde, artan afterload ile ilişkili olarak SERCA-2a ve fosforile fosfolamban miktarlarında azalma bildirilmiştir (84).
- MCT ile indüklenmiş bir sıçan PAH modelinde, RV'de SERCA-2a protein seviyesi ile fosfolamban ve ryanodin reseptörünün mRNA seviyelerinde azalma rapor edilmiştir (85).
- MCT ile indüklenmiş başka bir sıçan PAH modelinde, kalsiyum geçişlerinin daha yavaş zirve ve bozunma kinetiği ile daha küçük olduğu rapor edilmiş olup bu durumun L-tipi kalsiyum kanalı protein seviyelerindeki azalma ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (86).

Sağ Ventriküler Sarkomer Remodelingi

Sol ventriküldeki kardiyomiyosit disfonksiyonunda da gözlendiği gibi, PAH'ın etkilediği RV'de sarkomerik proteinlerde düzensizlikler vardır (45).

- PAH ve RV yetmezliği olan hastalardan alınan örneklerde β -miyozin ağır zincir mRNA'sında artış; α -miyozin ağır zincir mRNA'sında ise azalma olduğu bildirilmiştir (87). Benzer miyozin izoform değişiminin izlendiği hayvan modellerinde kontraktilitede azalma olduğu da rapor edilmiştir. Bu durum, α -miyozin ve β -miyozin ağır zincirlerinin farklı ATPaz aktivitelerine sahip olması ile ilişkilendirilmiştir (45, 88).
- Yüksek irtifa-PH hayvan modelinde RV'deki iskelet kası α -aktin mRNA miktarında 10 kat artış bulunduğu bilinmektedir (89).

Sağ Ventriküler Hücre İskeleti Remodelingi

Preklinik PH modellerinde, artan mikrotübül stabilizasyonuna müteakip mikrotübül hücre iskeletinin proliferasyonu raporlanmıştır. Bununla birlikte, RV'de mikrotübül proliferasyonunun literatürde tutarlı olmayan patolojik sonuçları vardır (45).

- PA-bantlama kedi modelinde mikrotübül stabilizasyonu ve proliferasyonu belgelenmiştir. İzole kardiyomiyositlerde, mikrotübül depolimerizasyonunun kardiyak kontraktiletiyi normalleştirdiği bildirilmiştir (90, 91).
- MCT ile indüklenmiş sıçan PAH modelinde mikrotübül proliferasyonu olurken; kolşisinle indüklenen mikrotübül depolimerizasyonunun izole kardiyomiyositlerde kasılmayı artırmadığı raporlanmıştır (92).

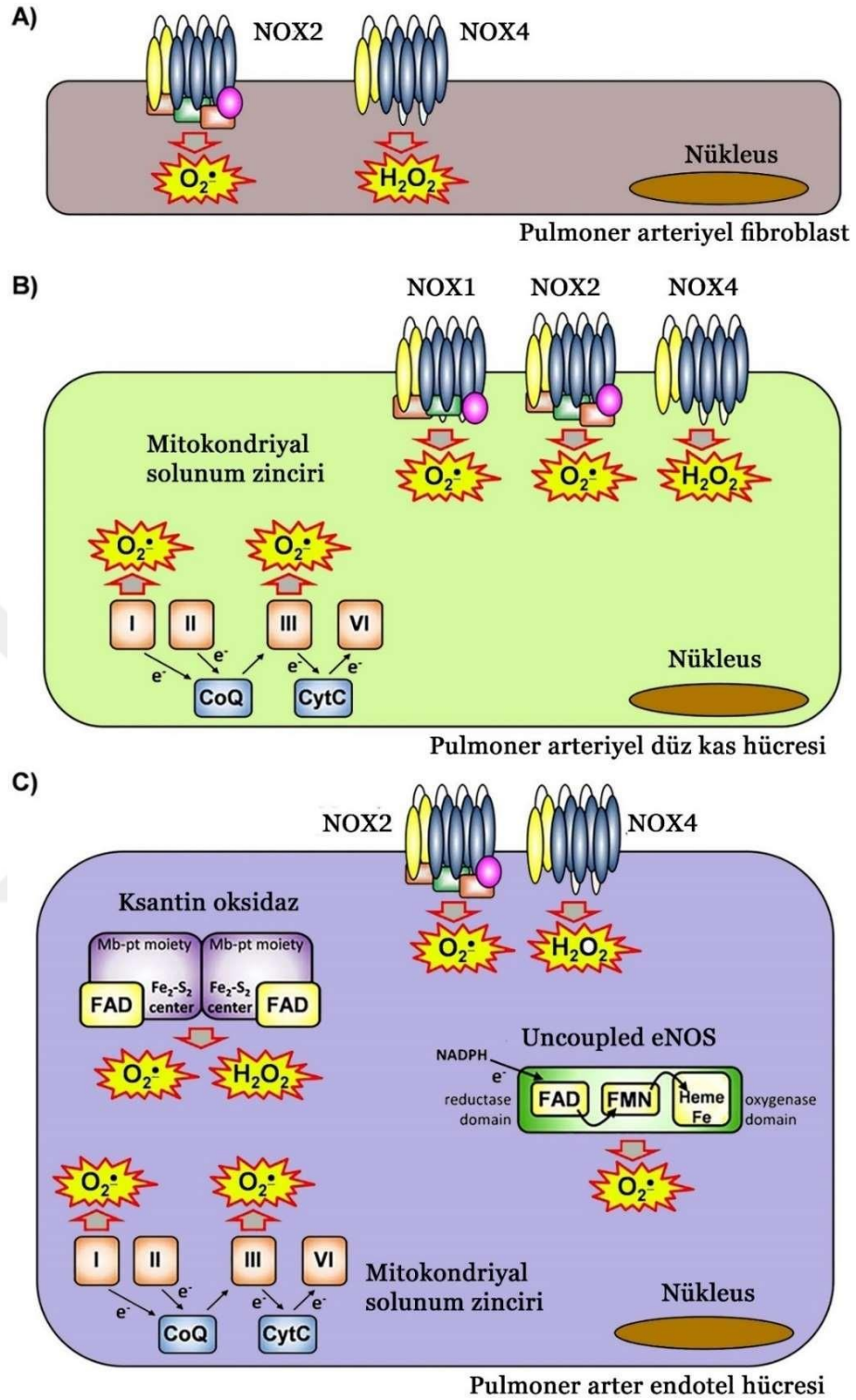
Vasküler Duvarda Oksidatif Stres

Vasküler duvardaki hücreler içinde süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ürettiği bilinen birçok enzimatik ve metabolik kaynak vardır (93, 94). Bunlar arasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (NOX)'lar (95), mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETZ) kompleksleri, ksantin oksidaz (XO) (96, 97), sitokrom P450, siklooksijenaz (COX) (98) ve bağlanmamış (uncoupled) nitrik oksit sentaz bulunur (99, 100). Hipertansiyon gibi hastalık durumlarında, NOX'lar (101), XO (102) ve NOS'lar, özellikle damar sisteminde başlıca ROS kaynakları haline gelir ve hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve kayma (shear) stresi (103) tarafından aktive edilir. Hastalık ile mitokondri elektron taşıma kompleksleri bozulabilir ve hücresel yaşlanma, nekroz veya apoptozisi artıran bir ROS kaynağı haline gelebilir (93). ROS'un bu çeşitli kaynaklarına rağmen, NOX'ların hastalık sırasında damar sisteminde süperoksitin ana üreticisi olmasının yanı sıra aktivitelerinin diğer ROS üreten oksidazların (XO, eNOS gibi) aktivitelerini düzenlediği ve ROS üreten fagositik hücrelerin alımında önemli olduğu konusunda fikir birliği vardır (53).

Pulmoner damar sisteminde, ROS'un ana kaynakları NOX'lar, uncoupled eNOS, XO ve mitokondriyal ETZ'dir (2, 104, 105) (Şekil 2.5). NOX'lar, elektron donörü olarak NADPH kullanarak O_2 indirgemesinden sonra $O_2^{\bullet-}$ üretimini katalize eden birden fazla alt birimden oluşan enzimlerdir (106). Bu genellemeye rağmen, NOX1 ve NOX2 önce $O_2^{\bullet-}$ üretilip ardından H_2O_2 'ye dönüştürürken; NOX4, doğrudan H_2O_2 üretir (2) (Şekil 2.5). Kardiyovasküler sistemde NOX1, NOX2, NOX4 ve NOX5 tespit edilmiştir (107). Diğer NOX izoformlarının aksine, NOX5 insanlarda eksprese

edilirken; kemirgenlerde eksprese edilmez (108). Pulmoner arter hücre tiplerinin tümü ROS üretebilmektedir (2). Pulmoner arter endotel hücrelerinde (PAEC'ler) (109, 110), adventisyal fibroblastlarda (111) ve PADKH'lerde (112, 113) NOX2 ve NOX4 ekspresyonu rapor edilmiştir. Bu hücrelerin tümünde, eksprese edilen baskın NOX izoformu NOX4'tür (114). NOX1 ekspresyonu, PADKH'lerle sınırlı gibi görünmektedir ve bu hücrelerin bazal durumlarında düşük konsantrasyonlarda mevcuttur (113). Farelerde hipoksi ile indüklenen PH, akciğerlerde NOX4 seviyelerinin artmasıyla ilişkili bulunmuştur (113, 115). İPAH'lı hastaların akciğerlerinde, NOX4 ekspresyonunun upregüle olduğu bildirilmiştir (113). In vitro olarak, insan pulmoner arter adventisyal fibroblastlarında (116) ve PADKH'lerinde (113) hipoksik koşullar altında NOX4 ekspresyonunda önemli bir artış rapor edilmiştir.





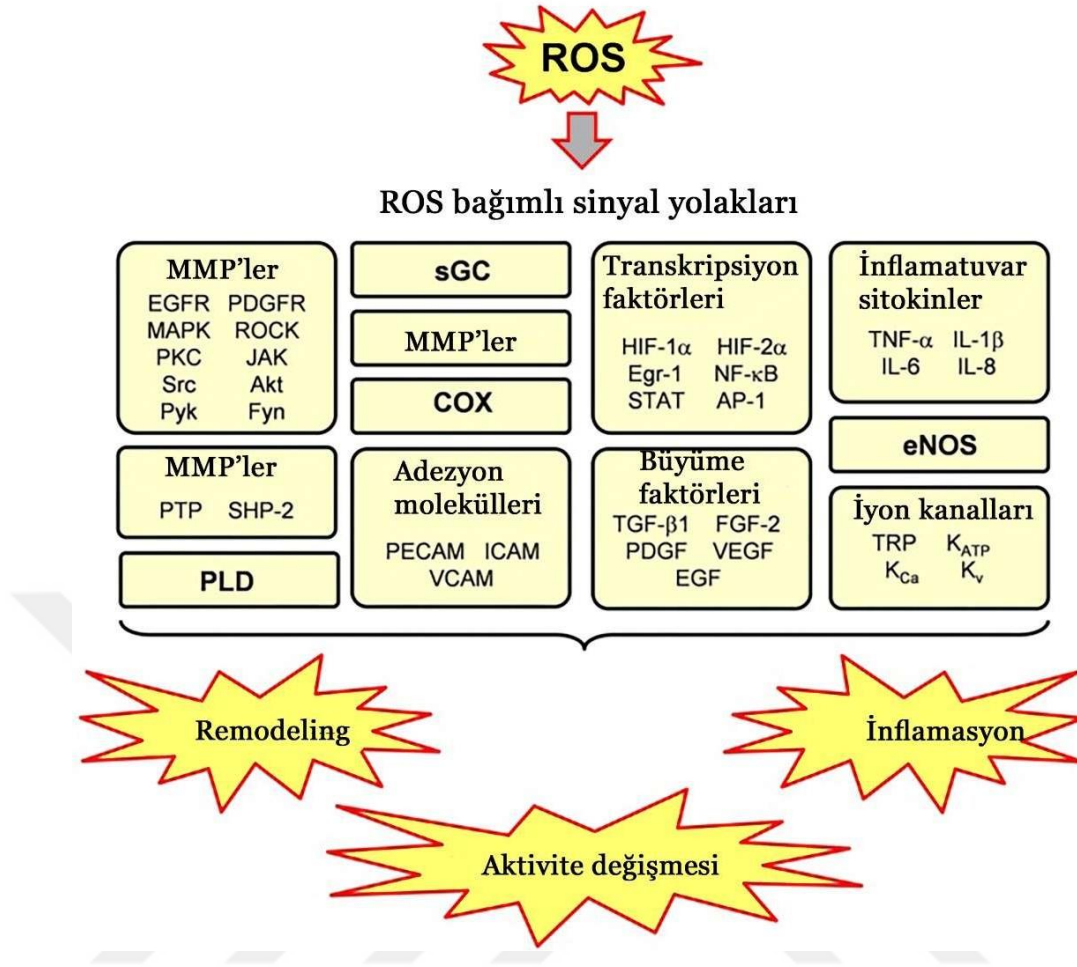
NOX, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz; CoQ, Koenzim Q; CytC, Sitokrom C; FAD, Flavin adenin dinükleotit; FMN, flavin mononükleotit; eNOS, Endotelyal nitrik oksit sentaz (2).

Şekil 2.5. Pulmoner arterlerde ROS'un moleküler kaynakları ve NOX tipleri.

Oksidatif stres, H_2O_2 ile indüklenen tirozin nitrasyonu yoluyla eNOS ve prostasiklin sentaz (PGIS)'da hasara yol açabilmektedir. Böylece, damarların NO ve

PGI2'yi sentezleme kapasitesini azaltarak vazodilatasyonu bozabilmektedir (117). Ayrıca eNOS'a verilen peroksinitrit hasarı, sentaz aktivitesini NO'dan süperoksit oluşumuna yönlendirir ve bu şekilde sentezlenen süperoksit, PGIS'nin eNOS'a bağımlı tirozin nitrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (118).

ROS tarafından aktive edilen ve pulmoner vasküler remodelinge katkı sağlayan mekanizmalar çeşitlidir (Şekil 2.6) ve tüm pulmoner vasküler hücre tiplerini içerir (119). Pulmoner arteriyel remodelingde gözlenen medial kalınlaşma, özellikle PADKH'lerin artan proliferasyonu ve azalmış apoptozisiyle karakterizedir (70). PADKH proliferasyonu, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi ROS'lar tarafından doğrudan uyarılabilir (120). Tersine, süperoksit dismutaz (SOD) veya katalaz (CAT) gibi antioksidanlar, PADKH'nin proliferasyonunu inhibe edebilir ve hatta uzun vadede apoptozislerini indükleyebilir (120-122). ROS ayrıca bazı vazoaktif mediatörler tarafından indüklenen PADKH proliferasyonuna da katkıda bulunur. Örneğin endotelin-1, NOX aracılı ROS üretimi yoluyla PADKH proliferasyonunu uyarır (120). Ang II (123) ve PDGF (124) dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörlerinin vasküler düz kas hücrelerinde NOX'u aktive ettiği de gösterilmiştir. PADKH'lerde, TGF- β 1 NOX4'ü aktive eder ve TGF- β 1 ile indüklenen hücre proliferasyonuna katkıda bulunan ROS üretimini artırır (125, 126). ROS ayrıca endotel hücrelerinin aşırı çoğalmasına aracılık ederek pulmoner vasküler yeniden şekillenmede rol oynayabilir. ROS'un doğrudan PAEC proliferasyonunu uyardığı (127-129) ve anjiyogenezi tetiklediği (130) gösterilmiştir. Tersine, antioksidanlar PAEC proliferasyonunu inhibe edebilir (128, 131).



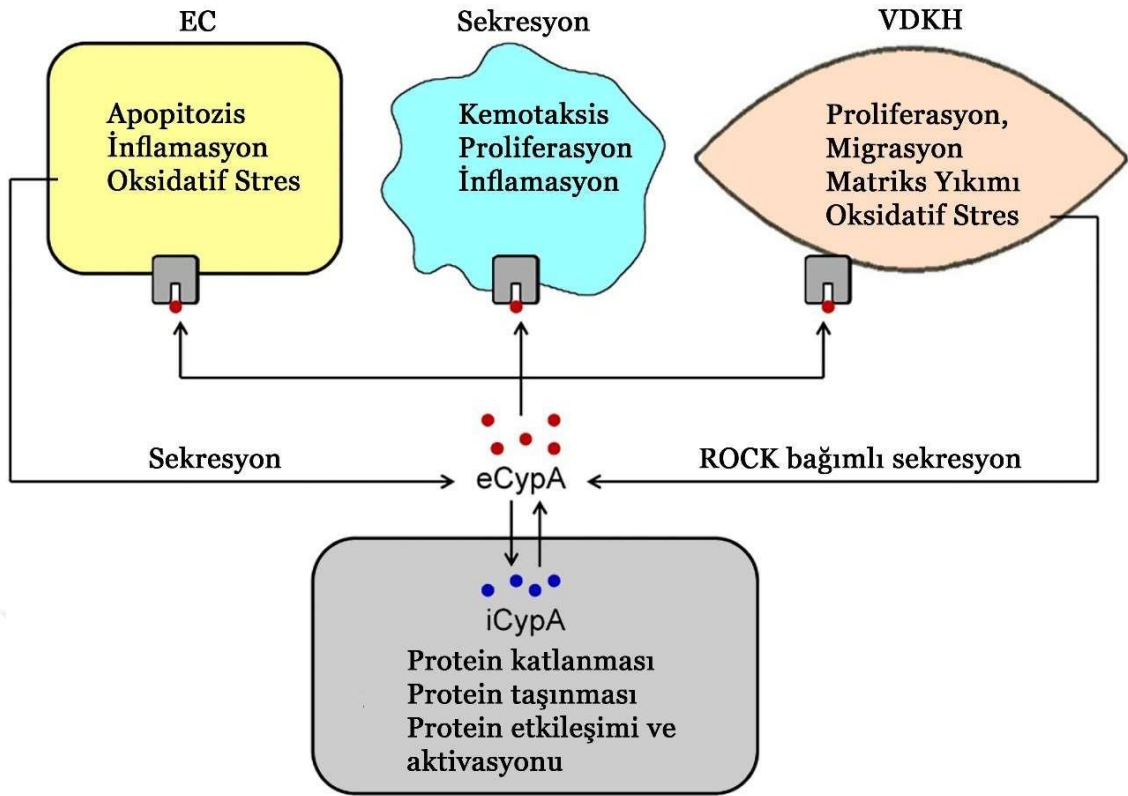
MMP, Matriks metalloproteinaz; EGF, Epidermal büyüme faktörü; EGFR, Epidermal büyüme faktör reseptörü; PDGF, Trombosit türevi büyüme faktörü; PDGFR, Trombosit türevi büyüme faktör reseptörü; MAPK, Mitojenle aktive olan protein kinaz; ROCK, Rho kinaz; PKC, Protein kinaz C; JAK, Janus kinaz; Pyk, Prolinden zengin tirozin kinaz; PTP, Protein tirozin fosfataz; SHP-2, SH2 domaini içeren protein tirozin fosfataz 2; PLD, Fosfolipaz D; sGC, Çözünebilir guanilat siklaz; COX, Siklooksijenaz; PECAM, Trombosit/endotelial hücre adezyon molekülü; ICAM, İntraselüler adezyon molekülü; VCAM, Vasküler hücre adezyon molekülü; HIF, Hipoksi ile indüklenen faktör; Egr-1, Erken büyüme yanıtı-1 transkripsiyon faktörü; STAT, transkripsiyonun sinyal ileticisi ve aktivatörü; NF-κB, nükleer faktör-κB; AP-1, Aktivatör protein-1; TGF-β1, Transforme edici büyüme faktörü-β1; FGF-2, Fibroblast büyüme faktörü-2; VEGF, Vasküler endotelial büyüme faktörü; TNF-α, Tümör nekroz faktörü-α; IL, İnterlökin; eNOS, Endotelial nitrik oksit sentaz; TRP, Transient reseptör potansiyel kanalı; K_{ATP}, ATP'ye duyarlı potasyum kanalı; K_{Ca}, Kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı; K_V, Voltaj kapılı potasyum kanalı (2).

Şekil 2.6. Pulmoner vasküler hücrelerde redoks duyarlı sinyal yolları ve pulmoner hipertansiyonda ROS'un rolü.

Rho kinazlar (ROCK), vasküler tonusun düzenlenmesinde ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan serin/treonin kinazlardır (114). İki izoform tanımlanmış ve ROCK-1 ve ROCK-2 olarak adlandırılmıştır. Her ikisi de vasküler düz kasta eksprese edilir (132). ROCK'lar küçük G proteini RhoA tarafından aktive edilir ve daha sonra miyozin hafif zincir fosfataz (MLCP)'ı fosforile ederek

inaktif hale getirir. Bu nedenle miyozin fosforilasyonu artar, böylece sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarındaki herhangi bir artıştan bağımsız olarak düz kasın kasılması artar. Bu durum kalsiyum sensitizasyonu olarak ifade edilir (133). RhoA/ROCK yolunun aktivasyonu ile oluşan kalsiyum sensitizasyonu, PH'de gözlenen düz kas disfonksiyonuna katkıda bulunabilir. Pulmoner arterlerde ROS ile RhoA/ROCK yolunun ilişkili olduğu bildirilmiştir (63, 134). Kronik hipokside, RhoA aktivitesi artar ve bu artış artan ROS üretimi ile ilişkilidir (135, 136). Süperoksitin sıçan pulmoner arterlerinde nükleusa ROCK-2 translokasyonuna neden olduğu ve ROCK inhibitörüne duyarlı vazokonstriksiyona neden olduğu (137) gösterilmiştir. Hidrojen peroksit, PAEC'lerde ve PASMC'lerde RhoA aktivitesini de artırabilir (138). Bu bağlamda tartışılmalı sonuçlar da bildirilmiştir (114, 139).

RhoA/ROCK/Siklofilin A (CyPA)/Basigin (Bsg) yolunun aktivasyonu PAH patogeneğinde önemli bir yer tutmaktadır. ROCK'un aşırı ve sürekli aktivasyonu, vasküler düz kas hücrelerinden CyPA sekresyonunu artırır ve ekstraselüler CyPA, vasküler düz kas hücresi proliferasyonunu uyarır. Ek olarak, ekstraselüler CyPA, endotelial hücre adezyon moleküllü ekspresyonunu ve endotelial apoptozisi indükler (Şekil 2.7). CyPA, reseptörü Bsg aracılığıyla etki göstermektedir. Sağlıklı kontrollere kıyasla PAH hastalarında plazma CyPA seviyesi önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Ayrıca plazma CyPA düzeyi, hastalık şiddeti ve uzun süreli sağkalım oranı ile korele bulunmuştur. Oksidatif stres'in PAH'lı hastaların PADKH'lerinden CyPA sekresyonunu indüklediği gösterilmiştir. CyPA'nın PAH'lı hastaların PADKH'lerinden sitokin/kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin sekresyonunu, inflamatuvar hücre göçünü ve PADKH proliferasyonunu artırdığı raporlanmıştır. Ayrıca, MCT ile indüklenen erkek Sprague-Dawley sıçan PAH modelinde, PAH'lı sıçanların akciğerdeki RhoA, ROCK, CyPA ve Bsg protein seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir. Benzer şekilde, Sugen/hipoksi erkek Sprague Dawley sıçan PAH modelinde de PAH'lı sıçanlarda akciğer RhoA, ROCK, CyPA ve Bsg protein seviyeleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca, CyPA ve Bsg'nin hipoksi ile indüklenen PH'yi artırdığı gösterilmiştir (140).



EC, endotel hücresi; eCypA, ekstraselüler siklofilin A; iCypA, intraselüler siklofilin A; VKDH, vasküler düz kas hücresi; ROCK, Rho kinaz (3).

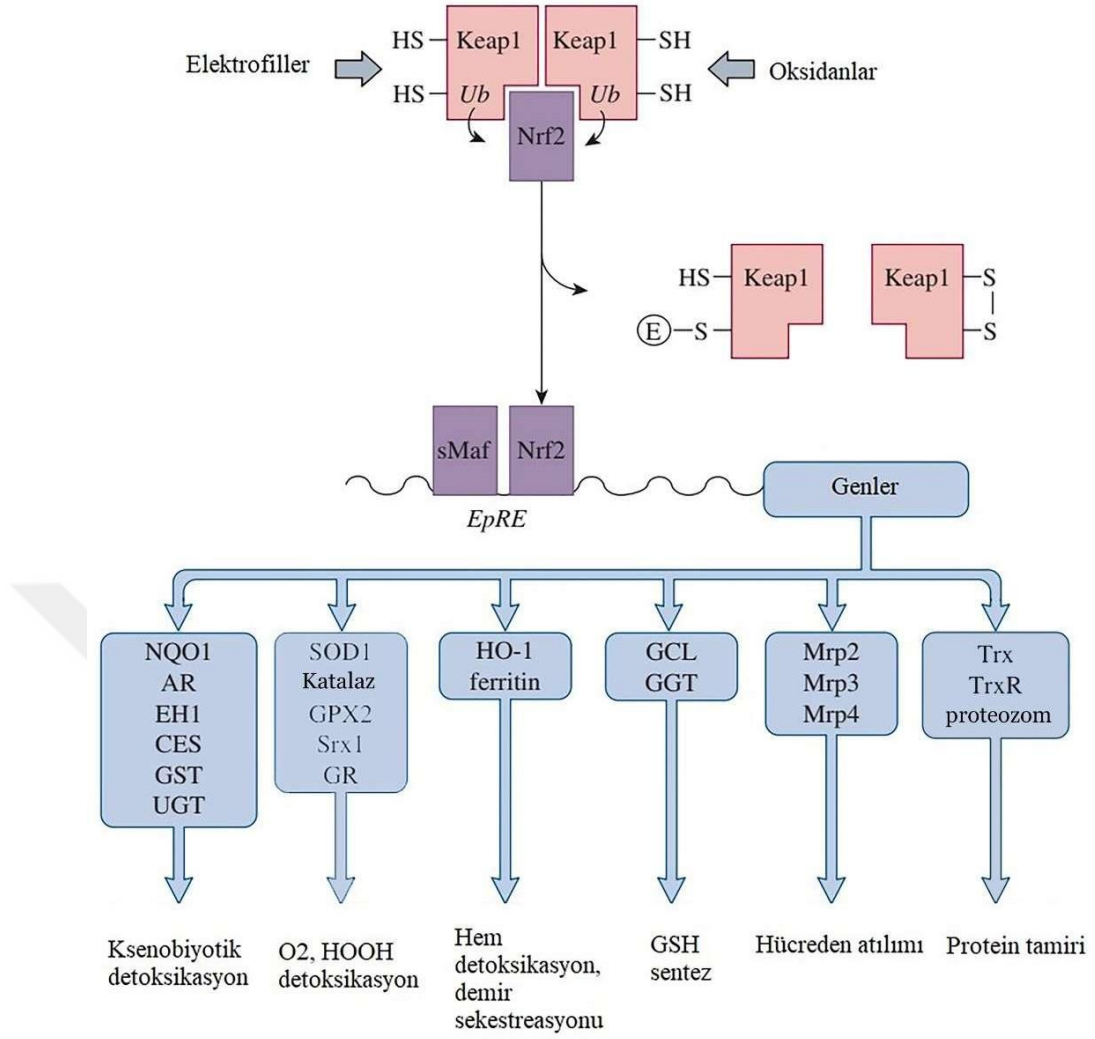
Şekil 2.7. Ekstraselüler CypA'nın farklı hücre tipleri üzerindeki hücreye özgü etkileri ve intraselüler CypA'nın işlevi.

PAH'lı Akciğer ve RV'de Oksidatif Stres

PAH'ta yüksek intrapulmoner ve RV süperoksit seviyeleri (141-145) varken; LV'de oksidatif stres bulgularına rastlanmamaktadır (146). Ayrıca, antioksidan tedavi, MCT ile indüklenen PAH ve RVH gelişimini azaltabilmektedir. Örneğin, insan ekstraselüler SOD genini içeren adenovirüsün intratrakeal uygulanmasının, bir antioksidan görevi görerek MCT ile indüklenen PAH gelişimini azalttığı rapor edilmiştir (143). Bir SOD/CAT mimetiği olan EUK-134'ün ip uygulamasının RV'de oksidatif stresi, interstisyel fibrozisi ve proapoptotik sinyali azalttığı ve RV fonksiyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir (146). Ayrıca, antioksidan bir ajan olan resveratrolün, pulmoner damar sistemine lökosit infiltrasyonunu, PADKH proliferasyonunu, NOX'un neden olduğu oksidatif stresi azalttığı ve MCT ile indüklenen PAH ve RVH gelişimini önlediği bildirilmiştir (145). Sonuç olarak, birçok antioksidan tedavi modalitesi MCT ile indüklenen PAH'ın ilerlemesini azaltmada etkili gibi görünmektedir (53).

Bir MCT ile indüklenen sıçan PAH modelinde, RV'de NOX bağımlı ROS üretiminin arttığı; fakat aynı artışın LV'de bulunmadığı rapor edilmiştir (147). Böylece, RV yetmezliği gelişiminde NOX bağımlı ROS üretiminin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, PAH'lı sıçan RV'lerinde SOD1 ve SOD2 gen ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir (147). Bu bağlamda, PAH'a bağlı olarak RV'de antioksidan kapasitenin de olumsuz yönde etkilendiği söylenebilir.

PAH'ta, antioksidan yanıtın ana düzenleyici faktörü olan NF-E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)'in patofizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir. PAH'lı sıçan akciğerinde Nrf2 protein düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Nrf2, hem oksijenaz-1 (HO-1)'i içeren bir dizi antioksidan enzimin ekspresyonunu düzenlemektedir (148). Fizyolojik koşullarda Nrf2, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1) ile etkileşime girerek inaktif ve düşük hücre içi düzeyde tutulur. Elektrofiller, Keap1'in reaktif tiyol gruplarına oksitlenirken; oksidanlar kovalent olarak bağlanır ve Keap1'in Nrf2'yi salmasına neden olur. Alternatif olarak, Nrf2 salınımı, protein kinazlar tarafından fosforilasyonunu takip edebilir. Keap1 salındıktan sonra aktif Nrf2 hücrede birikir, çekirdeğe yer değiştirir ve promotör bölgelerinde elektrofil yanıt elemanı (EpRE) içeren genleri aktive etmek için küçük Maf proteinleri ile bir heterodimer oluşturur. Bunlara enzimler, bağlayıcı proteinler ve ksenobiyotiklerin, ROS'ların ve endojen reaktif kimyasalların detoksikasyonu ve eliminasyonunda işlev gören taşıyıcılar ile oksitlenmiş proteinleri onarabilen veya ortadan kaldırabilen bazı proteinler de dahildir. Bu tür proteinlerin uyarılması, çok çeşitli toksik maddelere karşı koruma sağlayan bir elektrofil stres tepkisini temsil eder (Şekil 2.8) (149).



AR, aldoz redüktaz; CES, karboksilesteraz; EH1, mikrozomal epoksit hidrolaz; GCL, glutamat-sistein ligaz; GGT, gama-glutamil transpeptidaz; GPX2, glutatyon peroksidaz 2; GR, glutatyon redüktaz; GST, glutatyon S-transferaz; HO-1, hem oksijenaz 1; NQ01, NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz; Mrp2, Mrp3 ve Mrp4, çoklu ilaç direnci proteini 2, 3 ve 4; SOD1, süperoksit dismutaz 1; Srx1, sülfiredoksin 1; UGT, UDP-glukuronosiltransferaz; Trx, tioredoksin; TrxR, tioredoksin redüktaz (149).

Şekil 2.8. Elektrofil stres yanıtına aracılık eden Keap1/Nrf2 sinyal yolağı.

İPAH'lı hastaların plazmasında, ROS kaynağı XO aktivitesinin sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek bulunduğu bildirilmiştir (150). İPAH'lı 133 hastanın dahil edildiği bir başka çalışmada ise, üç SOD alt tipinin (bakır-çinko [Cu/Zn-SOD], manganez [Mn-SOD] ve hücre dışı SOD) de plazma aktivitelerinin sağlıklı kontrollere göre daha düşük bulunduğu rapor edilmiştir (151). Ayrıca, serum CAT aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeyi gibi oksidatif stresin serum belirteçlerinin, PAH'lı hastalarda olumsuz klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (152).

Şiddetli PH hastalarından alınan akciğer biyopsi örneklerinin immünohistokimyasal çalışmaları, 3-Nitro tirozinin her yerde ve şiddetli bir şekilde

yükseldiğini göstermektedir. 3-Nitrotirozin, peroksinitritin proteinler üzerindeki tirozin rezidüleri ile reaksiyonundan kaynaklanan oksidatif hasarın yaygın olarak kullanılan bir biyolojik belirteçidir. 3-Nitrotirozin ayrıca NO'nun süperoksit tarafından süpürülmesinin kanıtı olarak kabul edilir. Şiddetli PH hastalarında ekshale NO seviyesi düşüktür. Bu durum kısmen, süperoksitle reaksiyona giren NO kaybına bağlı olabilir. PAH'lı hastalarda pleksiform ve konsantrik lezyonlardaki endotelial hücrelerde 8-hidroksiguanozin boyaması mevcuttur. 8-Hidroksiguanozin, süperoksitin guanin ile reaksiyonundan kaynaklanan oksidatif hasarın bir biyolojik belirteçidir. Aynı PH hastalarının akciğerlerinde Mn-SOD miktarı ve aktivitesinin düşük bulunması süperoksiti süpürme kapasitesinin azaldığına işaret etmektedir. Bu veriler, şiddetli PH hastalarının akciğerlerinin kronik oksidatif stres altında olduğunu göstermektedir (153).

ADE2 Enzimi ve PAH İçin Önemi

ADE'nin bir homologue olan ADE2, anjiyotensin II (Ang II) ve anjiyotensin I (Ang I)'i sırasıyla anjiyotensin 1-7 (Ang (1-7)) ve anjiyotensin 1-9 (Ang (1-9))'a indirgeyen hücre dışı katalitik alanı ile bir monokarboksipeptidaz olarak çalışır. Ek olarak, ADE2'nin apelin, des-arginin bradikinin ve nörotensin gibi farklı substratlar üzerinde de enzimatik aktivite gösterdiği tahmin edilmektedir. ADE2 esas olarak akciğerde (hava yolları ve tip II alveolar hücreler), kalp, böbrek ve bağırsakta bulunur. Ayrıca ağız ve burun mukozasında, deride, lenf nodlarında, timusta, kemik iliğinde, dalakta, karaciğerde, testiste ve beyinde de bulunur (1).

Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, ADE2'nin PH patofizyolojisi için önemini işaret etmektedir. CHD ile ilişkili PAH'ı olan 104 hastanın dahil edildiği bir çalışmada, hastaların serum ADE2 protein seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, ADE2 düzeyleri ile hastaların mPAP değerlerinin negatif şekilde korele olduğu rapor edilmiştir (154). Hipoksik PH sıçan modelinde, PH'li sıçanlarda plazma ADE2 ve Ang (1-7) seviyelerinin, RV ADE2 ve Mas protein düzeyleri ile gen ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir (155). Başka bir deneysel çalışmada, hipoksik PH sıçan modelinde 3 hafta hipoksiye maruz bırakılan sıçanların akciğerinde ADE2 gen ekspresyonu ve protein düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (156). ADE2'nin PH patofizyolojisindeki öneminin giderek daha fazla anlaşılması sonucunda PH tedavisi için önemli bir hedef olabileceği öngörülmüştür. Böylece çalışmalar ADE2'nin PH'deki terapötik etkililiğini araştırmaya odaklanmıştır.

Yamazato ve arkadaşları, 5-6 haftalık erkek C57/BL6 farelerde, ADE2 gen transferinin, MCT ile indüklenen PAH modelinde RVSP'yi ve pulmoner arteriyel duvar kalınlığını azalttığını göstermişlerdir (157).

Hemnes ve arkadaşları, PAH'lı hastalarda tek doz intravenöz (iv) rekombinant insaan ADE2 (rhADE2) uygulamasının kardiyat output (CO)'u artırdığını, PVR'yi azaltmakla beraber mPAP'ı değiştirmedini bildirmişlerdir. rhADE2 uygulamasının PAH'lı hastalarda sistolik arteriyel basınç (SAP), diyastolik arteriyel basınç (DAP) ve kalp hızı (KH)'nı değiştirmedini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, PAH'lı hastalarda rhADE2'nin SOD2 plazma protein seviyesini artırdığı bildirilmiştir.

2.2.6. Monokrotalinle İndüklenen PAH Modeli

İnsan PH'sini tam olarak yansıtan mükemmel bir hayvan modeli bulunmasa da, MCT ile indüklenen PAH, en yaygın kullanılan klasik PH modelidir (158). Belki de en sık kullanılan rodent PH modeli, MCT ile indüklenen sıçan PAH modelidir (53, 68, 85, 92, 145, 159). MCT, genellikle 60 mg/kg dozunda tek seferlik ip enjeksiyon ile uygulanan bir pirolizidin alkaloididir (53). MCT uygulanan sıçanlarda, enjeksiyondan 8-16 saat sonra pulmoner rezistans arteriyollerin adventisiasında inflamatuvar monositlerde belirgin artışlarla birlikte hızlı bir intrapulmoner inflamatuvar yanıt (160) gerçekleşir.

Medial duvar kalınlığında artış, 7.gün önce dış çapı 300 μ 'dan küçük arterlerde saptanır ancak 10. gün anlamlı hale gelir. Daha sonra sadece dış çapı 50-100 μ ve 200-300 μ olan arterlerde saptanır. Medial duvar kalınlığı 35. güne kadar artmaya devam eder ve 14. günden itibaren 500-1000 μ arasındakiler de dahil olmak üzere tüm büyüklükteki arterlerde anlamlılığa ulaşır (161). Küçük arteriyol sayısının alveol sayısına normalleştirilmiş oranındaki azalma, 21. günde belirgindir ve bu azalma, arteriyel budanma olduğunu gösterir. RVH 21. günde belirginleşir ve giderek daha şiddetli hale gelir (161). MCT ile indüklenen bir rodent PAH çalışmasında, normalde 35 mmHg civarında olan sistolik PAP'ın MCT enjeksiyonundan 12 gün sonra artmaya başladığı ve kademeli olarak 28 gün sonra 60-65 mmHg'ye yükseldiği bildirilmiştir. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, RVH'nin 21. günde belirginleşmeye başladığı, enjeksiyondan yaklaşık 4 hafta sonra başlayan RV yetmezliği nedeniyle ölüm meydana geldiği ve MCT enjeksiyonunu takiben 5. haftadan sonra az sayıda sıçanın hayatta kalabildiği rapor edilmiştir (162).

MCT ile indüklenen PAH modeli, MCT'ye bağı vasküler toksik etkilerin pulmoner sisteme spesifik olması bakımından insan PAH'ına uygun bir deneysel modeldir. Sirmagül ve ark., erkek Sprague-Dawley sıçan PAH modelinde, tek doz sc 60 mg/kg MCT uygulanan hayvanların pulmoner arter ve aortalarındaki asetilkolin gevşeme ve serotonin kasılma yanıtlarını test etmişlerdir. MCT'nin, pulmoner arterde asetilkolin gevşeme yanıtını azaltırken; serotonin kasılma yanıtını artırdığını göstermişlerdir. Diğer yandan, aortanın asetilkolin gevşeme ve serotonin kasılma yanıtları üzerine MCT'nin etkisiz olduğunu bildirmişlerdir (158).

2.2.7. PAH Tedavisi

PAH hastalarında genel tedavi hedefleri; egzersiz kapasitesinde iyileşme sağlanması, yaşam kalitesinin artırılması, RV fonksiyonlarının iyileştirilmesi ve mortalite riskinde düşüş sağlanmasıdır (5).

PAH hastaları için mevcut tedavi stratejisi sırasıyla üç basamağa ayrılabilir;

1. Genel önlemler (doğum kontrolü, egzersiz eğitimi vb.), destekleyici tedaviler (oral antikoagülanlar, diüretikler, oksijen, digoksin), ileri merkezlere sevk ve uzun süreli KKB tedavisinin endikasyonu için akut vazoreaktivite testi yapılması,
2. Vazoreaktif hastalarda yüksek doz KKB ile başlangıç tedavisi veya vazoreaktif olmayan hastalarda onaylanmış PAH ilaçlarıyla tedavi,
3. Başlangıç tedavisine verilen yanıtın yetersiz olduğu durumlarda, onaylanmış ilaç kombinasyonları veya akciğer transplantasyonu.

Genel Önlemler

1. Doğum kontrolü,
2. İnfluenza ve pnömokok enfeksiyonlarına karşı aşılama,
3. Psikososyal destek,
4. Egzersiz eğitimi,
5. Seyahat önerileri,
6. Uçuş esnasında oksijen desteği,
7. Elektif cerrahide mümkünse genel anesteziye ziyade epidural anestezinin tercih edilmesi,

8. Aşırı fiziksel aktiviteden kaçınılması,
9. Genetik danışmanlık,
10. Tedavilere uyumun artırılması (5).

Destekleyici Tedaviler

Oral Antikoagülanlar: İPAH'lı hastaların postmortem incelemelerinde vasküler trombotik lezyonların görülme sıklığı yüksektir (5, 163). Pıhtılaşma ve fibrinolitik yollarda anormallikler de bildirilmiştir (5, 164-166). Bu durumlara kalp yetmezliği ve hareketsizliğin eklenmesi nedeniyle venöz tromboembolizm riski artmaktadır. Bu nedenle PAH'ta oral antikoagülasyon gereklidir.

Diüretikler: Dekompanse sağ kalp yetmezliği; sıvı tutulması, santral venöz basıncın artması, hepatik konjesyon, asit ve periferik ödeme neden olur. Aşırı sıvı yükü olan PAH'lı hastalarda diüretik tedavinin semptomatik iyileşme sağladığı bilinmektedir (5).

Oksijen: PAH hastalarında oksijen uygulamasının PVR'yi düşürdüğü gösterilse de uzun süreli O₂ tedavisinin yararlı olduğunu gösteren randomize veri bildirilmemiştir. PAH hastalarının çoğunda (CHD'li ve pulmoner-sistemik şantlı hastalar hariç), patent foramen ovale olmadığı sürece, istirahat halinde arteriyel hipoksemi derecesi düşüktür. Nokturnal O₂ tedavisinin ilerlemiş Eisenmenger sendromunun doğal seyrini değiştirmedığı rapor edilmiştir (5, 167). Ambulatuvar O₂, egzersiz sırasında oluşan desatürasyonun düzeltilebildiğine ve semptomatik fayda sağlandığına dair kanıt varlığında düşünülebilir (5).

Digoksin: Digoksinin, İPAH'ta CO'yu akut olarak iyileştirdiği gösterilmiştir. Ancak, uzun süreli uygulamadaki etkililiği bilinmemektedir (5, 168). Atriyal taşiaritmi gelişen PAH hastalarında ventrikül hızını azaltmak için kullanılabilir (5).

Demir Eksikliği ve Anemi: PAH'lı hastalarda demir eksikliği yaygındır. İPAH'lı hastaların %43'ünde, SSc ile ilişkili PAH hastalarının %46'sında ve Eisenmenger sendromlu hastaların %56'sında demir eksikliği bildirilmiştir (5, 169-171). Demir eksikliğinin tüm bu durumlarda, azalmış egzersiz kapasitesi, anemi varlığı veya şiddetinden bağımsız şekilde mortaliteyi artırabileceği düşünülmektedir (5, 169, 170, 172, 173). Bu nedenle, PAH'lı hastalarda demir durumunun düzenli olarak izlenmesi önerilmektedir. Demir eksikliği olan hastalarda demir replasmanı düşünülmelidir. Bazı çalışmalar, PAH'lı hastalarda oral demir emiliminin bozulduğunu ileri sürmektedir. Bu

nedenle iv demir uygulaması tercih edilebilir (5, 169, 172, 174). Fakat bu tercihi destekleyen yeterli sayıda kontrollü çalışma bulunmamaktadır (5).

Spesifik Farmakolojik Tedavi

Kalsiyum Kanal Blokerleri: RHC sırasında yapılan pulmoner vazoreaktivite testi pozitif olan İPAH'lı hastaların çok az bir kısmının KKB'lerden fayda gördüğü anlaşılmıştır. Bildirilen çalışmalarda ağırlıklı olarak kullanılan KKB'ler nifedipin, diltiazem ve amlodipin olup özellikle nifedipin ve diltiazem vurgulanmıştır (5, 175, 176). Hastanın bazal kalp atım hızı, KKB seçiminde önemlidir. Taşikardik hasta için diltiazem; bradikardik hasta için ise nifedipin ve amlodipin tercih edilebilir. İPAH tedavisinde etkili olan bu ilaçların günlük dozları nispeten yüksektir. Günlük dozlar; nifedipin için 120-240 mg, diltiazem için 240-720 mg ve amlodipin için 20 mg'ye kadardır. Tedaviye daha düşük dozlarla başlanması tavsiye edilir; örneğin günde iki kez 30 mg yavaş salımlı nifedipin veya günde üç kez 60 mg diltiazem veya günde bir kez 2.5 mg amlodipin gibi. İlaç dozunun tolere edilen maksimum doza dikkatli ve aşamalı olarak yükseltilmesi önerilir. Doz artırımı için sınırlayıcı faktörler genellikle sistemik hipotansiyon ve alt ekstremitelerde periferik ödemdir. KKB tedavisi alan İPAH'lı hastalar güvenlik ve etkililik açısından yakından izlenmeli ve 3-4 aylık tedaviden sonra RHC'yi de içeren tam bir yeniden değerlendirme yapılmalıdır (5).

Endotelin Reseptör Antagonistleri (ERA): PAH'lı hastaların hem plazma hem de akciğer dokusunda endotelin sisteminin aktive olduğu gösterilmiştir (177). Endotelin-1 plazma seviyelerindeki artışların PH'nin bir nedeni mi yoksa bir sonucu mu olduğu belirsiz olsa da (178), bu veriler PAH patogeneğinde endotelin sisteminin önemli rolünü desteklemektedir (179). Endotelin-1, PADKH'lerinde iki farklı reseptör izoformuna, endotelin reseptörleri tip A ve B'ye bağlanarak vazokonstriktör ve mitojenik etkiler gösterir (180). PAH'ın spesifik farmakolojik tedavisinde ERA'lar önemli bir rol oynamaktadır. Mevcut ERA'lar, ambrisentan, bosentan ve masitentan'dır (54).

Fosfodiesteraz Tip 5 İnhibitörleri ve Guanilat Siklaz Stimülatörleri: PDE-5, siklik guanozin monofosfat (cGMP)'ın parçalanmasında görevli enzimdir. PDE-5 inhibisyonu, bu enzimi eksprese eden bölgelerde NO/cGMP yolağı aracılığıyla vazodilatasyona yol açar. Pulmoner damar sistemi önemli miktarlarda PDE-5 içerdiğinden, PDE-5 inhibitörlerinin PAH'a karşı potansiyel klinik faydaları üzerine araştırmalar yapılmıştır. Ek olarak, PDE-5 inhibitörleri antiproliferatif etkiler gösterirler (181, 182). Her üç PDE-5 inhibitörü (sildenafil, tadalafil ve vardenafil) önemli pulmoner vazodilatasyona

neden olur ve maksimum etkileri sırasıyla 60, 75-90 ve 40-45 dk sonra gözlemlenir (183).

Sildenafil, tadalafil ve vardenafil gibi PDE-5 inhibitörleri NO-cGMP yolunu güçlendirerek cGMP yıkımını yavaşlatırken; riosiguat gibi sGC stimülatörleri cGMP üretimini artırır (184). Ayrıca, çeşitli hayvan modellerinde sGC stimülatörlerinin antiproliferatif ve antiremodeling özellikleri rapor edilmiştir (5).

PAH tedavisinde riosiguat kullanımını inceleyen klinik çalışmalar mevcuttur. Örneğin, günde 3 kez 2,5 mg'ye kadar riosiguat ile tedavi edilen 443 PAH hastasında (hastaların %44'ü ERA alırken; %6'sı prostanoid tedavisi almaktadır) gerçekleştirilen bir RKÇ'de egzersiz kapasitesi, hemodinami, Dünya Sağlık Örgütü fonksiyonel sınıfı ve klinik kötüleşmeye kadar geçen süre üzerinde olumlu sonuçlar bildirilmiştir (185). ERA veya prostanoid tedavisi almakta olan hastalarda egzersiz kapasitesinde artış rapor edilmiştir. Plasebo ve 2,5 mg riosiguat grubunda en sık görülen ciddi advers olay olarak senkop (sırasıyla %4 ve %1) bildirilmiştir. Riosiguat ve PDE-5 inhibitör kombinasyonu, hipotansiyon ve diğer yan tesirleri nedeniyle kontrendikedir (186).

Prostasiklin Analogları ve Prostasiklin Reseptör Agonistleri: Prostasiklin, predominant olarak endotelial hücreler tarafından üretilir ve tüm vasküler yatakların güçlü vazodilatasyonunu indükler. Bu bileşik, trombosit agregasyonunun en güçlü endojen inhibitörüdür ve ayrıca hem sitoprotektif hem de antiproliferatif özelliklere sahip görünmektedir (187). PAH'lı hastalarda prostasiklin metabolik yollarının disregülasyonu gösterilmiştir. Ayrıca bu hastaların pulmoner arterlerinde prostasiklin sentaz ekspresyonu ve prostasiklin üriner metabolitlerinin azaldığı gösterilmiştir (188). PAH'lı hastalarda prostasiklinin klinik kullanımı, farklı farmakokinetik özelliklere sahip; ancak kalitatif olarak benzer farmakodinamik etkileri paylaşan stabil analogların senteziyle genişletilmiştir (5).

Beraprost, kimyasal olarak stabil ve oral olarak aktif ilk prostasiklin analogudur. Yapılan çalışmalarda beraprostun egzersiz kapasitesinde 3-6 aya kadar devam eden bir iyileşme gösterdiği; fakat hemodinamik iyileşme veya uzun vadeli yarar sağlamadığı bildirilmiştir. En sık görülen yan tesirler baş ağrısı, yüzde kızarma, çene ağrısı ve diyare olarak rapor edilmiştir (5, 188, 189).

Epoprostenol (sentetik prostasiklin), kısa bir yarı ömre (3-5 dk) sahiptir ve oda sıcaklığında sadece 8 saat stabil kalabilmektedir (5). Epoprostenol ile tedaviye 2-4 ng/kg/dk'lik bir dozda başlanır. İlaç dozu, yüzde kızarma, baş ağrısı, ishal ve bacak

ağrısı gibi yan tesirleri nedeniyle sınırlı bir şekilde artırılır. Optimal doz, çoğunlukla 20-40 ng/kg/dk'dir (190, 191).

İloprost, kimyasal olarak stabil bir prostasiklin analogudur (5). İntravenöz, oral veya inhalasyon yoluyla kullanılabilir. İn hale iloprostun (6-9 inhalasyon/gün [2,5-5 mg/inhalasyon]) PAH'ta egzersiz kapasitesi, semptomlar, PVR ve klinik sonuçlar üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (192). İn hale iloprost genel olarak iyi tolere edilmekte olup en sık görülen yan tesirleri yüzde kızarma ve çene ağrısıdır (193).

Treprostinil, epoprostenolün bir trisiklik benzidin analogudur ve ambient sıcaklıkta uygulanabilecek yeterli kimyasal stabiliteye sahiptir. İntravenöz ve sc yolla uygulanabilir. İn haler ve oral formülasyonları da mevcuttur (5). Treprostinilin PAH'lı hastalarda egzersiz kapasitesi, hemodinami ve semptomlarda iyileşme sağladığı bildirilmiştir. Treprostinilin en sık görülen yan etkisi infüzyon bölgesinde ağrıdır. Bu durum hastaların azımsanmayacak bir kısmında doz artışlarının sınırlandırılmasına hatta tedavinin kesilmesine yol açabilmektedir (194). Subkutan treprostinil başlangıç dozu 1-2 ng/kg/dk olup yan tesirler (lokal ağrı, kızarma, baş ağrısı) dikkate alınarak ortalama 20-80 ng/kg/dk'lik optimal doza ulaşılabilir (5). Treprostinilin iv dozu epoprostenolün iv dozundan 2-3 kat daha fazladır (195, 196).

Seleksipag, oral selektif prostasiklin IP reseptör agonistidir. Seleksipag ve metaboliti, endojen prostasikline benzer etkilere sahip olsalar da prostasiklinden kimyasal olarak farklıdır (5). PAH hastalarında (stabil ERA ve/veya PDE-5 inhibitörü tedavisi alan) seleksipag'ın, 17 hafta sonra PVR'yi azalttığı bildirilmiştir (197).

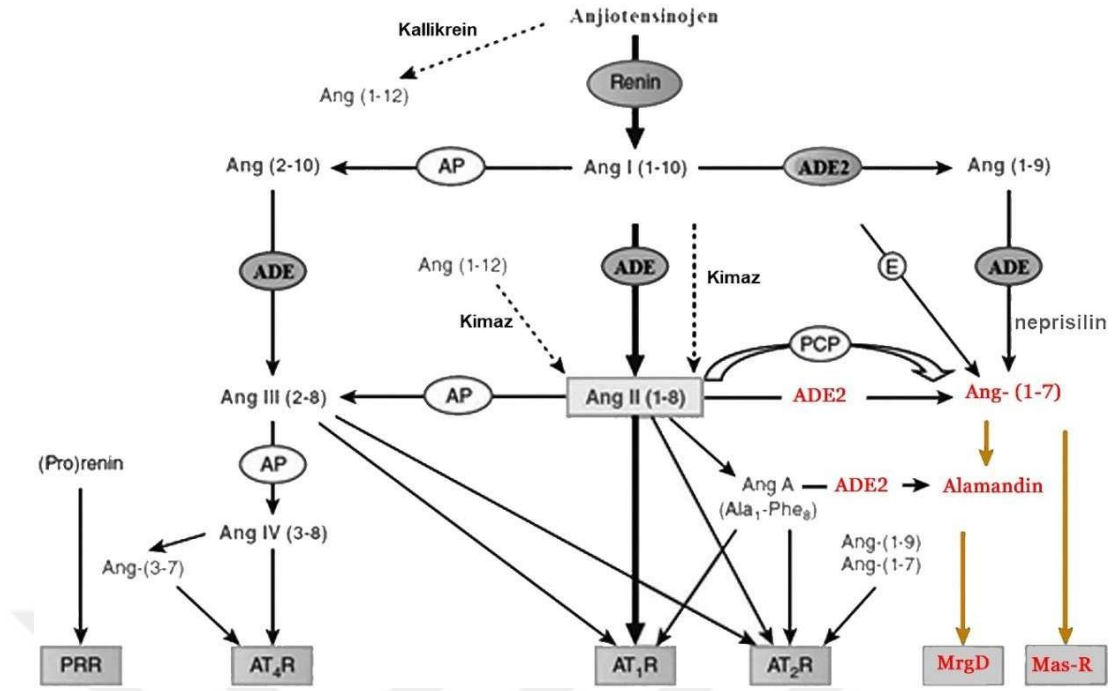
2.3. Alamandin

ALA [Ala¹-anjiyotensin-(1-7)]; renin anjiyotensin sistemi (RAS)'ın protektif koluna ait peptit yapılı bir endojen moleküldür (10, 198) (Şekil 2.9). Yeni bir RAS heptapeptidi olan ALA, 2013'te Lautner ve ark. tarafından keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir (198). ALA, Ang A üzerinde ADE2 ile veya anjiyotensin-(1-7) [Ang-(1-7)]'nin N-terminal amino asidi Asp¹'in Ala¹'e (199) dekarboksilasyonu ile sentezlenebilmektedir (Şekil 2.9). Ang-(1-7) ile ALA çok benzer moleküler yapılarda (200) olmasına rağmen; Lautner ve ark. ALA'nın farelerde izole edilmiş aort halkalarında ve anestezi altındaki sıçanlarda vazorelaksan ve hipotansif etkilerinin Mas reseptör antagonisti tarafından değil, MrgD reseptör antagonisti tarafından bloke edildiğini göstermişlerdir (198). Bu durum, ALA'nın yeni bir sinyal yolu olan MrgD

membran reseptörüne bağlanarak etkili olduğunu göstermiştir. MrgD reseptörü, TGR7 veya hGPCR45 olarak da bilinmektedir. Birçok farklı dokuda MrgD reseptörüne rastlanmıştır. Örneğin; arteriyel düz kas hücrelerinde, eNOS pozitif endotelial hücrelerde, aterosklerotik plaklarda, kardiyomiyositlerde ve fare beyninin kardiyovasküler merkezinde MrgD reseptörü tespit edilmiştir (10). Bunun yanı sıra akciğerde de MrgD reseptör varlığı bilinmektedir (201-203).

ALA ve reseptörü MrgD'nin keşfinden bu yana, bu yolun aktivasyonunun kardiyovasküler sistem üzerindeki koruyucu etkilerini kanıtlamak için bir dizi çalışma yapılmıştır (204-206). Apolipoprotein E knockout farelerde, ALA uygulanması, nötrofilik enzimler olan matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve MPO'nun serum seviyelerinde bir azalmaya yol açmıştır. Bunun yanı sıra, çıkan aortanın başlangıç kısmındaki plaklarda MMP-9 ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur (207). Oliveira ve ark., MrgD-knockout farelerde, LV remodelingi ve belirgin bir dilate kardiyomiyopati varlığını rapor etmişlerdir (208). Yapılan çalışmalar, ALA'nın kardiyovasküler sistemin yanı sıra akciğer patolojilerine karşı da faydalı etkileri olduğunu göstermiştir. Liu ve ark., ALA'nın, MrgD reseptörü aracılığıyla, oksidatif hasarın zayıflatılması ve otofaji indüksiyonu üzerinden C57B/6 farelerde bleomisinle indüklenen pulmoner fibrozisini zayıflattığını bildirmişlerdir (201).

ALA, vazodilatör etkili endojen bir maddedir. ALA-MrgD reseptör eşleşmesi, NOS'ların ekspresyonunda artışa neden olmakta, bu durum da NO aracılı vazodilatasyon ile sonuçlanmaktadır. İndüklenen vazodilatasyon, vasküler endotelial disfonksiyonun tersine çevrilmesi ve kalbe venöz dönüşün hafifletilmesi için yeterlidir, böylece kalbin preloadunu azaltır. Ayrıca, ALA, plazma ANP seviyelerinde artışa neden olarak vazodilatasyona katkı sağlar (10).



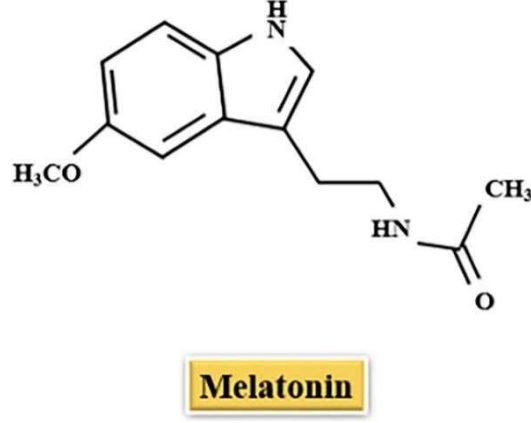
AP; aminopeptidaz, E; endopeptidaz, PCP: Prolilkarboksi peptidaz (4).

Şekil 2.9. Renin anjiyotensin sistem yolağı.

ALA'nın vazodilatör, antihipertansif, kardiyoprotektif, antifibrotik, antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve vasküler antiremodeling etkileri deneysel olarak ortaya konmuştur (10, 209-211). Ayrıca ALA'nın farelerde oksidatif hasarı zayıflatıcı etkisi ve otofaji indüksiyonu üzerinden pulmoner fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (201). Yapılan çalışmalar, ALA ile indüklenen MrgD reseptör aktivasyonunun, kardiyovasküler sistem ve akciğer üzerinde çeşitli koruyucu etkilere yol açtığını göstermektedir (10, 201). Bununla beraber, ALA'nın PAH'taki etkileri ve olası mekanizmalar hala bilinmemektedir. Bu bağlamda, MCT ile indüklenen sıçan PAH modelinde MEL ile birlikte, ALA'nın olası koruyucu etkilerini ve altta yatan mekanizmaları araştırmayı amaçladık.

2.4. Melatonin

MEL; pineal bezde ışık uyarısı azaldığında üretilip salgılanan, indol halkası içeren, küçük ve lipofilik yapı bir moleküldür (Şekil 2.10). G protein bitişik M1 ve M2 reseptörleri ile kinon redüktaz ailesine ait M3 reseptörleri bulunmakta olup M1 ve M2 vasküler sistem etkilerine aracılık etmektedir (11). MEL'in serbest radikal süpürücü, antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve vazodilatör etki gösterdiği bulunmuştur (8).



Şekil 2.10. Melatonin'in kimyasal yapısı.

Yapılan çalışmalar MEL'in iskemi-reperfüzyon (IR) hasarı, miyokardiyal kronik intermittan hipoksik hasar, PH, hipertansiyon, kalp kapak hastalıkları, ateroskleroz ve lipid metabolizması üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Ucuz ve iyi tolere edilen bir ilaç olarak MEL, kardiyovasküler hastalıklar için yeni bir tedavi seçeneği olabilir (212). MEL'in, kalp (213), böbrek (214) ve karaciğer (215) dahil olmak üzere çeşitli organlarda IR hasarına karşı koruyucu etkileri raporlanmıştır. Bir in vivo çalışmada, profilaktik MEL uygulamasının miyokardiyal IR hasar modelinde kardiyak fonksiyonu önemli ölçüde iyileştirdiği, oksidatif hasarı ve miyokardiyal apoptozisi azalttığı bildirilmiştir (216). Liu ve ark., sıçan miyokardiyal IR modelinde MEL'in antioksidan etkileri aracılığıyla miyokardiyal apoptozisi inhibe ettiğini, miyokardiyal hücrelerde mitokondrinin yapısal bütünlüğünü koruduğunu, ATP sentezini artırdığını ve sonuçta miyokardiyal IR hasarını önlediğini bildirmişlerdir (217).

Ayrıca MEL'in PH'ye karşı etkililiği sınırlı sayıda deneysel çalışmada gösterilmiştir. Aşağıdaki çalışmalar bunlara örnek olarak verilebilir:

Zhang ve ark (218), MEL'in PAH'a karşı etkililiğini araştıran geniş kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. PAH'lı 15 hastada gündüz serum MEL düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğunu; serum IL-1 β seviyesinin ise ters orantılı şekilde yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, MEL'in etkileri MCT ile indüklenen PAH, hipoksi ile indüklenen PH ve Sugen/hipoksi PAH modelini içeren 3 farklı fare PH modelinde incelenmiştir:

- Hipoksi ile indüklenen C57BL/6J fare PH modelinde 2 haftalık oral profilaktik MEL (5-8,75 mg/kg/gün), RVSP, RVH ve remodeling oranını azaltarak PAH gelişimini önlemede etkili bulunmuştur. MEL'in, pulmoner

arter duvarında hipoksi kaynaklı kalınlaşmayı ve vasküler remodelingi azalttığını bildirmişlerdir.

- Sugen/hipoksi C57BL/6J fare PAH modelinde MEL'in profilaktik ve terapötik etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Profilaksi modelinde, 3 haftalık 10 mg/kg oral MEL uygulamasının, RVSP, RVH ve remodeling oranını azalttığı bulunmuştur. Terapötik modelde ise, 2 haftalık 10 mg/kg oral MEL tedavisi, RVSP ve remodeling oranını azalttığını göstermişlerdir.
- MCT ile indüklenen C57BL/6J fare PAH modelinde, 4 haftalık 10 mg/kg oral profilaktik MEL uygulamasının, RVSP ve RVH'yi azalttığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada, hipoksinin, endotel geçirgenliğini artırdığı ve endoteli aktive ettiği; bu durumun ise akciğerde makrofaj infiltrasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Hipoksi ile indüklenen inflamazom aktivasyonu (makrofajda) IL-1 β üretiminde aşırı artışla sonuçlanmış olup bu artışın hipoksi ile indüklenen endotelyal sızıntıyı daha da belirginleştirdiği rapor edilmiştir. MEL'in endotelyal kemokin ve adezyon faktörlerini azaltarak ve membran reseptörleri aracılığıyla makrofajlardaki hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu azaltarak hipoksi ile indüklenen inflamazom aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. MEL'in, akciğerde makrofaj infiltrasyonunu, IL-1 β sekreyonunu ve endotelyal sızıntıyı azalttığı gösterilmiştir. MEL, sonuç olarak makrofajlardaki inflamazom inhibisyonu yoluyla PAH'a karşı etkili bulunmuştur.

Maarman ve ark'nın (159) erkek Long Evans sıçanlarında, 80 mg/kg MCT tek sefer sc enjeksiyonuyla oluşturdukları PAH modelinde, 28. günde PAH ve RVH gelişmiştir. MEL 6 mg/kg/gün dozunda içme suyuna katılarak 33 gün (profilaktik; MCT enjeksiyonundan 5 gün önce başlanarak) veya 14 gün (tedavi edici olarak; MCT enjeksiyonundan 14 gün sonra başlanarak) uygulanmıştır. Hemodinamik ölçümler izole kalp perfüzyonu düzeneğinde ex vivo olarak yapılmıştır. Sıçanlar, MCT enjeksiyonundan 28 gün sonra RV hipertrofisi, kardiyak disfonksiyon, plazma oksidatif stresinde artış ve kardiyak interstisyel fibrozis sergilemiştir. 6 mg/kg/gün MEL, hem profilaktik hem de tedavi edici olarak verildiğinde PAH'lı sıçanlarda RVH'yi, plazma oksidatif stresini ve kardiyak interstisyel fibrozisi azaltmış ve RV fonksiyonunu iyileştirmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, MCT ile indüklenen PAH modelinde MEL'in antioksidan, antifibrotik ve kardiyoprotektif etkilerini göstermesi açısından önemlidir. Fakat bu çalışmada, MEL'in PAH hemodinamikleri (in vivo PAP veya RVSP ölçümü

veya ekokardiyografik inceleme) üzerindeki etkileri in vivo olarak incelenmemiş olup PAH'lı akciğer histopatolojik olarak değerlendirilmemiştir. MEL'in MCT ile indüklenen PAH modelinde PAH hemodinamikleri ve akciğer histopatolojisi üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir. MEL'in MCT ile indüklenen PAH modelinde etkililiğini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup olası etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda, MCT ile indüklenen sıçan PAH modelinde ALA ile birlikte, MEL'in olası koruyucu etkilerini ve altta yatan mekanizmaları araştırmayı amaçladık.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini, Barınma Koşulları ve Bakımı

Çalışma için, İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 02.04.2020 tarihli toplantıda 2020/5-4 karar sayısı ile onay alınmış olup İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: TCD-2020-2275).

Çalışmada kullanılan deney hayvanları, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜDEHÜM)'nden temin edildi. Polikarbon tabanlı kafesler içerisindeki sıçanlar, patojen içermeyen, 20-25 °C sıcaklık ve %60 nem düzeyine sahip ortamda, 12 saat/12 saat aydınlık/karanlık döngüsü altında barındırıldı. Hayvanlar, su ve 8 milimetre (mm)'lik standart pellet yem ile ad libitum beslendi. Hayvanların beslenme ve periyodik bakımları İNÜDEHÜM sorumlu veteriner hekimi, veteriner teknikerleri ve personelleri tarafından yapıldı. Sprague Dawley ırkı, 220-380 g ağırlığında, 10-11 haftalık 58 adet erkek sıçan, basit rasgele yöntemle 5 gruba ayrıldı: Kontrol grubu (n=10), MCT grubu (n=12), ALA grubu (n=12), MEL grubu (n=12) ve ALAMEL grubu (n=12).

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı ve İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nın katkılarıyla gerçekleştirildi.

3.2. Deney Dizaynı ve İlaç Uygulama Süreci

Çalışma gruplarımız:

1. Kontrol grubu (n=10): 1. gün tek sefer subkutan (sc) distile su ve 1.-35. günlerde etanol'ün salindeki (%0.09 NaCl, w/v) %2,5'luk çözeltisi intraperitoneal (ip) yolla uygulandı.

2. MCT grubu (n=12): 1. gün, 60 mg/kg tek doz sc MCT ve 1.-35. günlerde etanol'ün salindeki (%0.09 NaCl, w/v) %2,5'luk çözeltisi ip yolla uygulandı.

3. MCT+MEL grubu (n=12): 1. gün 60 mg/kg tek doz sc MCT ve 1.-35. günlerde 10 mg/kg/gün ip yolla uygulandı.

4. MCT+ALA grubu (n=12): 1. gün 60 mg/kg tek doz sc MCT ve 1.-35. günlerde 50 µg/kg/gün ALA ile etanol'ün salindeki (%0.09 NaCl, w/v) %2,5'luk çözeltisi ip yolla uygulandı.

5. MCT+ALA+MEL (n=12): 1. gün 60 mg/kg tek doz sc MCT ve 1.-35. günlerde 50 µg/kg/gün ALA ve 10 mg/kg/gün MEL ip yolla uygulandı.

MCT (Sigma-Aldrich ABD; CAS numarası: 315-22-0) (Şekil 3.1) 300 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 1 N HCl içerisinde çözöldü. 1 N NaOH eklenerek nötrale edildi ve 20 mg/ml'lik final konsantrasyona ulaşılana kadar steril distile su ile dilüe edildi. Enjeksiyon hacmi 3 ml/kg olacak şekilde 60 mg/kg dozunda tek sefer uygulandı (219). MCT dozu daha önce yapılan doz-yanıt çalışmalarına göre belirlendi (220, 221).

MEL (Sigma-Aldrich ABD; CAS numarası: 73-31-4) (Şekil 3.1) absolu etanol (≥%99.9) (Isolab chemicals; CAS numarası: 64-17-5) içinde çözöldü. %2.5'lik final konsantrasyona ulaşılana kadar salin (%0.09 NaCl, w/v) ile dilüe edildi (222). MEL dozu (10 mg/kg/gün) daha önce yapılan doz-yanıt çalışmalarına göre belirlendi (223, 224).

ALA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. ABD; CAS numarası: 1176306-10-7) (Şekil 3.1) steril salinde çözöldü (225, 226). Stok çözelti hazırlanarak 0,5 ml'lik ependorflar içerisinde alınıp kullanım zamanına kadar -20°C'de muhafaza edildi. Kullanım esnasında, ependorflar, +4°C'de çözödüröldükten sonra salin ile dilüe edilerek istenen konsantrasyona ulaşıldı. Ependorflar sadece bir kez kullanıldı (225). ALA dozu (50 µg/kg/gün) daha önce yapılan doz-yanıt çalışmasına göre belirlendi (227).



Şekil 3.1. Monokrotalin, alamandin ve melatonin.

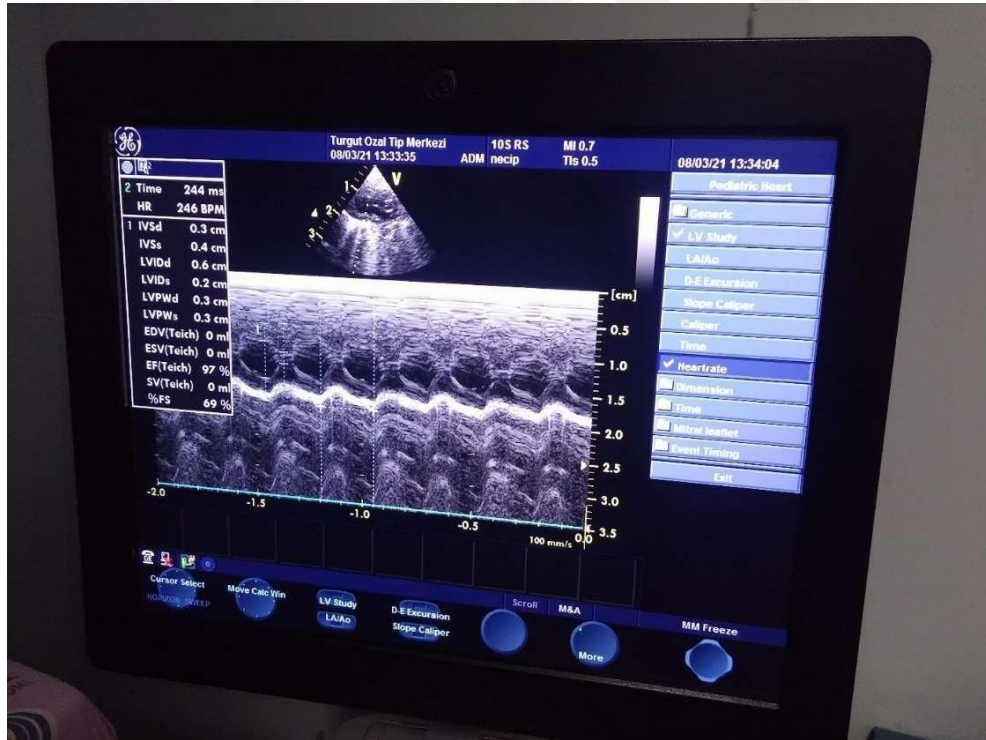
3.3. Ekokardiyografik Ölçümler

Deneyin son gününde sıçanlar, 1,2 mg/kg etil karbamat (Acros Organics, New Jersey, ABD; CAS numarası: 51-79-6)'ın distile sudaki çözeltisinin ip yolla uygulanmasıyla ile anestezi edildi. Anestezi altındaki sıçanlar, transtorasik ekokardiyografi ile kardiyak açıdan incelendi. Ekokardiyografik incelemeler, Turgut Özal Tıp Merkezi Kardiyoloji Anabilim Dalı'ndaki Vivid S6 marka cihazda 10S sektör prob aracılığıyla (GE Healthcare, Amerika Birleşik Devletleri), daha önceden tanımlanan yöntemlerle yapıldı (228).

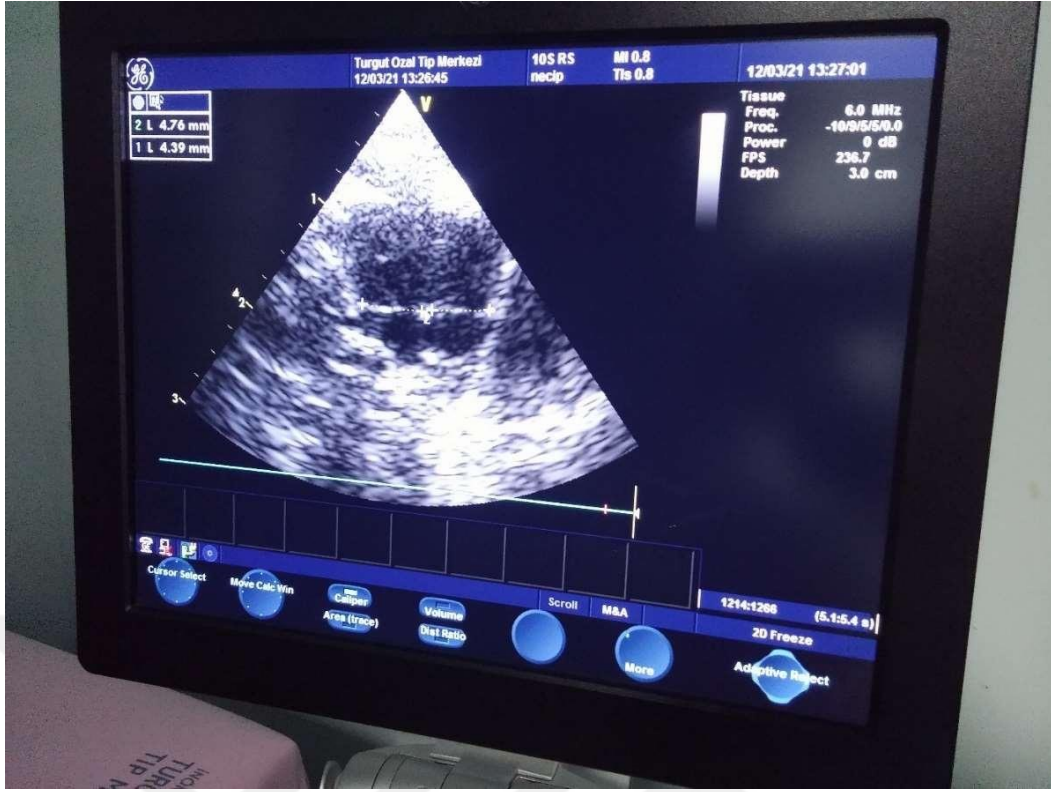
Öncelikle, anestezi altındaki sıçanların göğüs bölgesindeki kıllar tıraş edildi. Sıçanlar sol lateral dekübit pozisyonda iken 2D-MMode ve Doppler ölçümleri gerçekleştirildi. Aortik velosite, erken diyastolik transmitral akımın pik velositesi (E) (Şekil 3.2), LA çapı, sistol ve diyastol sonu interventriküler septal kalınlık (IVSs ve IVSd), sistol ve diyastol sonu sol ventrikül iç çapı (LVIDs ve LVIDd), sistol ve diyastol sonu sol ventrikül posterior duvar kalınlığı (LVPWs ve LVPWd), sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonu (LVEF), KH, pulmoner arter akselerasyon zamanı (PAAT), triküspit kapağın anüler planda sistolik yer değiştirmesi (TAPSE), RV çapı ve RV/LV oranı ölçüldü. Mitral kapak ve/veya aort çıkış yolunun 2D ve renk akışı görüntülenmesi ve spektral Doppler değerlendirmesi amacıyla parasternal uzun eksen (Şekil 3.3) ve apikal dört/beş odacık görüntüleri (Şekil 3.4) dikkate alındı. Parasternal uzun eksen kullanılarak LA, LV ve aort ile ilgili ölçümler yapıldı. PAAT ölçümü parasternal kısa eksen üzerinden alındı. Doppler spektrumları, 5-10 kalp siklusu boyunca, tarama hızı 100 mm/s olacak şekilde kayıt altına alındı. Renkli Doppler 0.44 m/s Nyquist sınırındaki ön ayarda çalışıldı. Ekokardiyografi üzerinden tahmini sistolik PAP ölçülmesi, pratik ve doğru sonuca ulaştırmadığından yapılmadı.



Şekil 3.2. MEL grubuna ait bir sıçan ekokardiyografisinde E ve A dalgalarının görünümü.



Şekil 3.3. Ekokardiyografide sıçan kalbine ait M mod parasternal uzun eksen görünümü



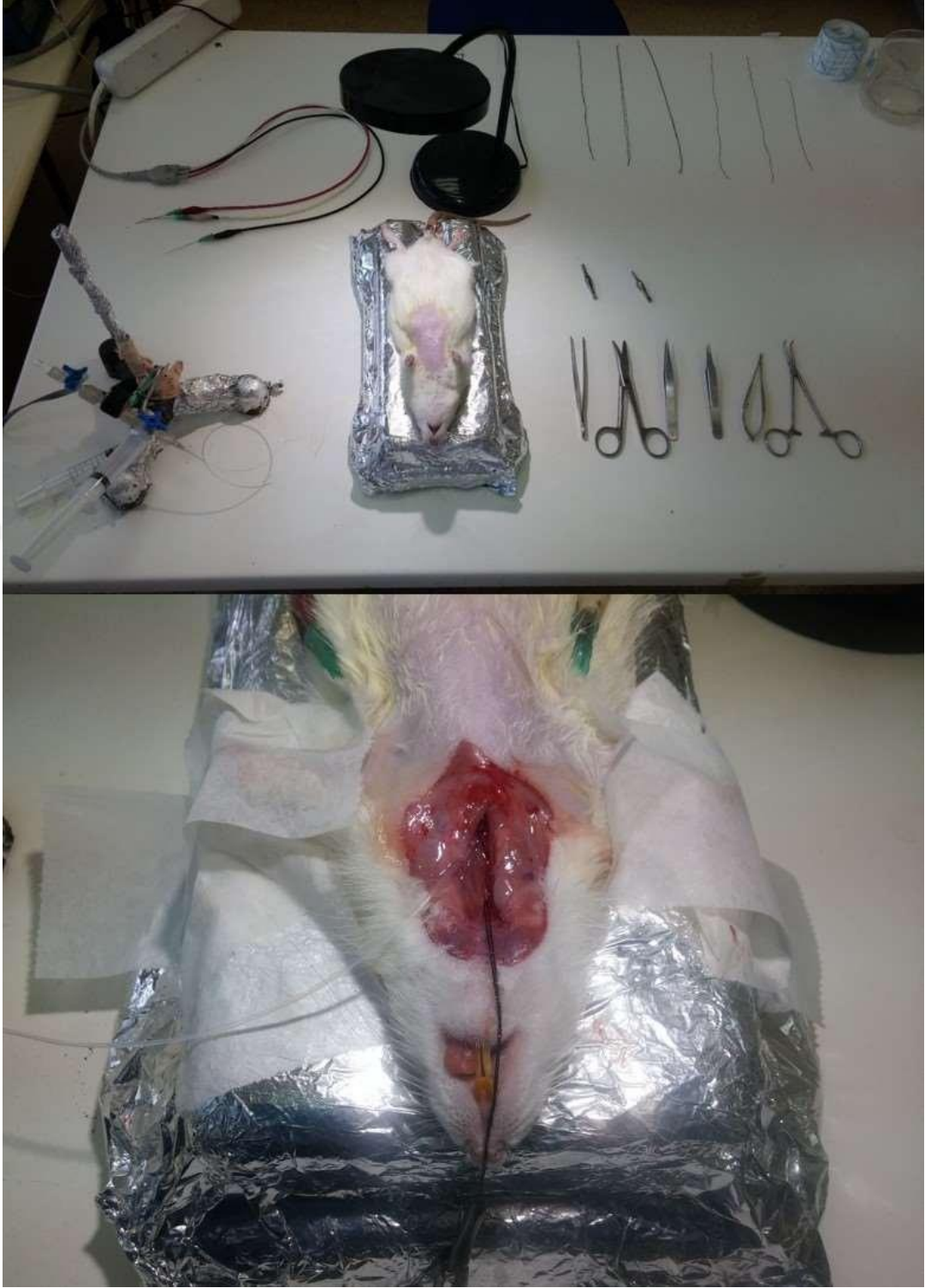
Şekil 3.4. Ekokardiyografide sıçan kalbinin apikal dört boşluk görünümü

3.4. İnvazif Hemodinamik Ölçümler ve Cerrahi Uygulamalar

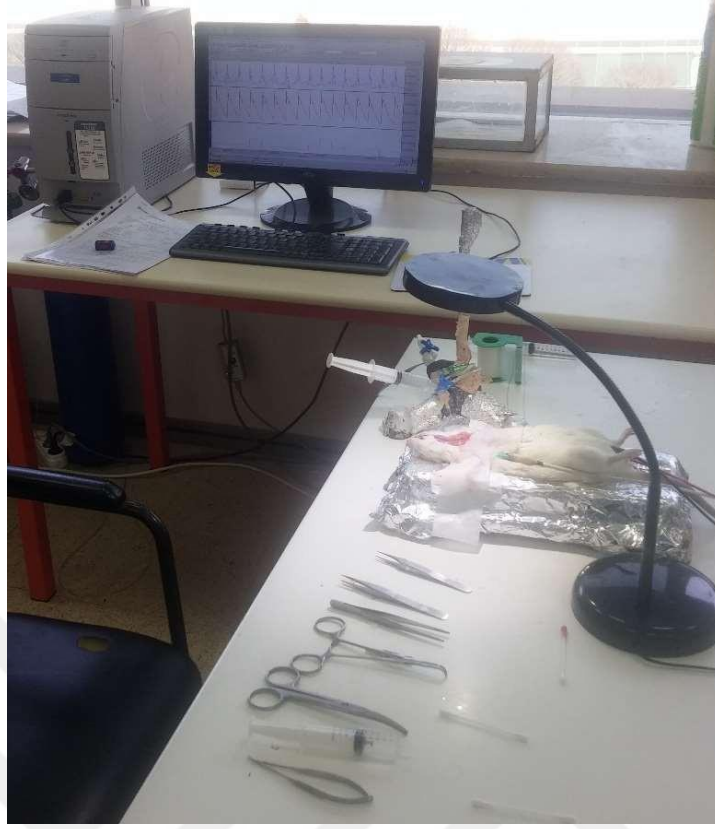
Ekokardiyografik ölçümlerin hemen ardından, anestezi altındaki sıçanlarda invazif hemodinamik ölçümler (EKG, karotis kanülasyonu ile SAP ve DAP ve juguler ven kanülasyonu ile RVSP ölçümü) gerçekleştirildi. Bu ölçümler İnönü Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında yapıldı.

Sol karotis arterine yerleştirilen kanül, transdüser ve kayıt sistemi (Biopac MP-100 Veri Kayıt Sistemi) aracılığıyla SAP ve DAP, KH ve EKG kaydı (3 derivasyonlu EKG elektrotları ile) alındı (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Ortalama arteriyel basınç (MAP), $MAP=(2 \times DAP + SAP)/3$ formülüyle hesaplandı.

Sağ juguler vene yerleştirilen ucu hafif kavisli kanül, transdüser ve kayıt sistemi (Biopac MP-100 Veri Kayıt Sistemi) aracılığıyla RVSP, KH ve EKG kaydı alındı (Şekil 3.7).



Şekil 3.5. Sol karotis kanülasyonu yoluyla invazif KB ölçümü.



Şekil 3.6. Sağ juguler ven kanülasyonu yoluyla invazif RVSP ölçümü.



Şekil 3.7. Biopac MP-100 Veri Kayıt Sistemi ile KB, KH ve EKG kaydı.

Anestezi altındaki sıçanlarda kalp bir bütün halinde çıkarılarak ötenazi yapıldı. Sağ ve sol akciğerler bir bütün halinde çıkarıldı. Alınan kalp ve akciğer dokuları hassas elektronik terazide tartılıp ağırlıkları kaydedildi. Sol akciğer histopatolojik incelemeler için bir bütün halinde %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Sağ akciğer biyokimyasal incelemeler için (ELISA ve Western blot) ayrıldı. Bu numuneler analizler yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Alınan kalp dokuları bir bütün halinde %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildikten sonra kalp bisturi yardımıyla transvers kesilerek atriyumlar ventriküllerden ayrıldı. Daha sonra RV serbest duvarı, LV+IVS'den bisturi yardımıyla kesilerek ayrıldı. RV serbest duvarı ile LV+IVS hassas elektronik terazide ayrı ayrı tartıldı. RV serbest duvarının ağırlığı LV+IVS ağırlığına bölünerek Fulton indeksi hesaplandı (Şekil 3.8).



Soldaki fotoğrafta atriyumların ventrikülden ayrılması görünmekte. Sağdaki fotoğrafta LV+IVS (sol) ile RV serbest duvarı (sağ) görünmektedir.

Şekil 3.8. Fulton indeksi belirleme aşamaları.

3.5. Histopatolojik Analizler

3.5.1. Histokimyasal Analizler

Deney sonunda alınan dokular %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit sonunda çeşme suyunda yıkanan dokular, dehidrasyon ve parlatma işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitler, genel değerlendirme için hematoksilen-eozin (H-E) ile boyandı. Boyanan preparatlar Leica DFC-280

araştırma mikroskobu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.,Cambridge, UK) kullanılarak incelendi.

Akciğer kesitleri inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveoler makrofaj yoğunluğu, alveoler septa kalınlaşması ve interstisyel ödem yönünden değerlendirildi. Rasgele seçilen 10 alan incelendi ve alanlar histopatolojik değişikliklerin derecesine göre; 0: değişiklik yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli değişiklik olarak skorlandı (229). Ayrıca, her bir akciğer örneğinde rasgele seçilen 20 adet pulmoner arterin tunika intima-medya (TIM) kalınlığı ölçüldü (230).

Kalp kesitleri interstisyel ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve granülasyon dokusunun varlığı yönünden değerlendirildi. Rasgele seçilen 10 alan incelendi ve alanlar histopatolojik değişikliklerin derecesine göre; 0: değişiklik yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli değişiklik olarak skorlandı (231). Ayrıca, her bir kalp örneğinde rasgele seçilen 20 adet kardiyomiyositin nükleus seviyesindeki çapı ölçüldü (232).

3.5.2. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler için deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen doku kesitleri 10 dk boyunca tripsin enzimi ile inkübe edildi. Endojen peroksidaz enzim aktivitesini bloke etmek için kesitlere 12 dk boyunca %3'lük H₂O₂ uygulandı. PBS ile yıkanan kesitlere 5 dk süresince protein blok (ultra V blok) uygulaması yapıldı. Daha sonra kesitler, 37 °C'de 60 dk primer antikor (PCNA ve α -SMA) ile inkübe edildi. PBS ile yıkanan dokulara 37 °C'de 20 dk boyunca biyotinli sekonder antikor uygulandı. Bu işlem sonrasında kesitler 37 °C'de 20 dk streptavidin peroksidaz ile inkübe edildi. Ardından kromojen uygulaması yapılan kesitler hematoksilin ile boyanarak su bazlı kapatıcı ile kapatıldı. Analizlerde, Leica DFC-280 araştırma mikroskobu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) kullanıldı.

PCNA ve α -SMA immünreaktivite değerlendirmesi, her bir kesitten 40'lık büyütmede rasgele seçilen 20 pulmoner arterde gerçekleştirildi. Boyanma, immünreaktivitenin yaygınlığı (0: boyanma yok, 1: 1-%25, 2: %26-50, 3: %51-75, 4: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +1: hafif, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak semikantitatif olarak skorlandı. Toplam boyanma skoru; yaygınlık x şiddet hesaplanarak elde edildi (233).

3.6. Biyokimyasal Analizler

3.6.1. ELISA

Akciğer dokusundaki gerçekleştirilen ELISA çalışmalarının bir bölümü Şekil 3.9’da gösterilmiştir.

Kullanılan cihazların listesi Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz	Bulunduğu Kurum/Kuruluş
Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Nüve, NF 800 R)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Homojenizatör	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Manyetik Karıştırıcı ısıtıcı (Daihan, HP-LP1)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Elektronik terazi (Shimadzu ATX224)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Mikroplate Reader (BioTek)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Millipore Ultrasaf Su Cihazı	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Dokuların Homojenizasyonu

Akciğer dokusu 0.1 g tartılarak plastik tüplere alınmış olup üzerine 1 mL proteaz inhibitörü içeren fosfat tamponlu salin (PBS), pH 7.4) çözeltisi eklenmiştir. Tartılan doku örnekleri buz izolasyonu altında bir homojenizatör yardımıyla tamamen parçalanıncaya kadar homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar daha sonra 14000 rpm’ de soğutmalı santrifüj yardımıyla +4 °C’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Son olarak, elde edilen süpernatantlar ölçüm işlemleri yapıncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Total Protein Tayini

Örneklerdeki total protein konsantrasyonu hızlı ve basit bir yöntem olan Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (234). Homojenat örneklerine Bradford reaktifi eklenerek 550 nm'deki absorbans değişimi ölçülerek total protein miktarı belirlenmiştir. Standart protein olarak sığır serum albümini kullanılmıştır.



Şekil 3.9. Akciğer dokusunda biyokimyasal analiz (ELISA) çalışmaları.

LOX Aktivitesi Tayini

Akciğer doku homojenatında LOX aktivitesi, ticari bir florometrik LOX aktivitesi test kiti (Katalog no: ab112139; Abcam) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre ölçüldü. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi. Numune hazırlama tamponu ile total hacim 50 μ L olacak şekilde dilüe edilen

numuneler (1-50 μ L) kuyucuklara eklendi. Toplam test hacminin 100 μ L olması için her kuyucuğa 50 μ L LOX reaksiyon karışımı eklenerek karıştırıldı ve ışıktan korunarak 37°C’de 10-40 dk inkübe edildi. Ex/Em=530-570/590-600 nm’de otomatik plak okuyucusunda (Mikroplate Reader, BioTek) floresan artışı okundu (maksimum Ex/Em=540/590 nm, cut off değeri=570 nm). Elde edilen sonuçlar kalibrasyon grafiği kullanılarak μ g/mg protein cinsinden ifade edildi.

ADE2 Aktivitesi Tayini

Akciğer doku homojenatında ADE2 aktivitesi, ticari bir florometrik ADE2 aktivitesi test kiti (Katalog no: ab273297; Abcam) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre ölçüldü. Numune için, kuyucuklara 1-5 μ L lizat eklendi. Gerekli hallerde lizat, ADE2 lizis tamponu ile seyreltildi. Arka plan kontrol için aynı hacimde lizis tamponu eklendi. Pozitif kontrol için kuyucuklara 2 μ L dilüe ADE2 pozitif kontrol eklendi. Negatif kontrol için, numune ve/veya ADE2 pozitif kontrol içeren kuyucuklara 2 μ L seyreltilmiş ADE2 inhibitörü eklendi. Numune, arka plan kontrol, negatif kontrol ve pozitif kontrol hacmi ADE2 test tamponu ile 50 μ L/kuyucuk’a ayarlandı. Kuyucuklar iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Her kuyucuk için, 50 μ L substrat karışımı hazırlandı. Numune, arka plan kontrol, negatif kontrol ve pozitif kontrol kuyucuklarının her birine 50 μ L ADE2 substrat karışımı eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk-2 saat boyunca kinetik modda floresan (Ex/Em=320/420 nm) ölçüldü. Elde edilen sonuçlar kalibrasyon grafiği kullanılarak pmol/dk/mg protein cinsinden ifade edildi.

NOX4 Tayini

Akciğer doku homojenatında NOX4 düzeyi, piyasada bulunan bir NOX4 ELISA kiti (Katalog no: SEB924Ra, USCN) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre ölçüldü. Tüm reaktifler, numuneler ve standartlar hazırlandı. Her kuyucuğa 100 μ L standart veya numune eklenip 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Aspire edildikten sonra 100 μ L saptama reaktifi A eklenip 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Aspire edilip 3 kez yıkandı. 100 μ L saptama reaktifi B eklenip 37°C’de 30 dk inkübe edildi. Aspire edilip 5 kez yıkandı. 90 μ L substrat solüsyonu eklenip 37°C’de 10-20 dk inkübe edildi. 50 μ L durdurma solüsyonu eklenip, renk değişimi hemen otomatik plak okuyucusunda (Mikroplate Reader, BioTek) 450 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak okutuldu. Elde edilen sonuçlar kalibrasyon grafiği kullanılarak ng/mg protein cinsinden ifade edildi.

MPO Aktivitesi Tayini

Akciğer doku homojenatında MPO aktivitesi, ticari bir kolorimetrik MPO aktivitesi test kiti (Katalog no: ab105136; Abcam) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre belirlendi. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi. Her kuyucuğa numune, standart veya pozitif kontrol eklendi. Numune ve pozitif kontrol kuyucuklarına 50 µL reaksiyon karışımı eklenip karıştırılarak 25°C'de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra, tüm kuyucuklara 2 µL durdurma karışımı eklenip karıştırılarak 25°C'de 10 dk inkübe edildi. Son olarak, tüm kuyucuklara 50 µL 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid (TNB) reaktifi eklenip karıştırılarak 25°C'de 10 dk inkübe edildi. Renk değişimi otomatik plak okuyucusunda (Mikroplate Reader, BioTek) 412 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak okutuldu. Elde edilen sonuçlar kalibrasyon grafiği kullanılarak nmol/dk/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.7. Western Blot

3.7.1. Protein İzolasyonu

Sakrifiye edilen sıçanlardan akciğer doku örnekleri alınarak aynı gruptaki örnekler protein izolasyonu için bir araya getirildi. Örneklerin homojenizasyonu, proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (5872; Cell Signaling, Massachusetts, ABD) eklenmiş lizis solüsyonu (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5 EDTA, protease inhibitor cocktail: 20-101, Milipore, ABD) ilave edilerek yapıldı.

3.7.2. Protein Konsantrasyon Tayini



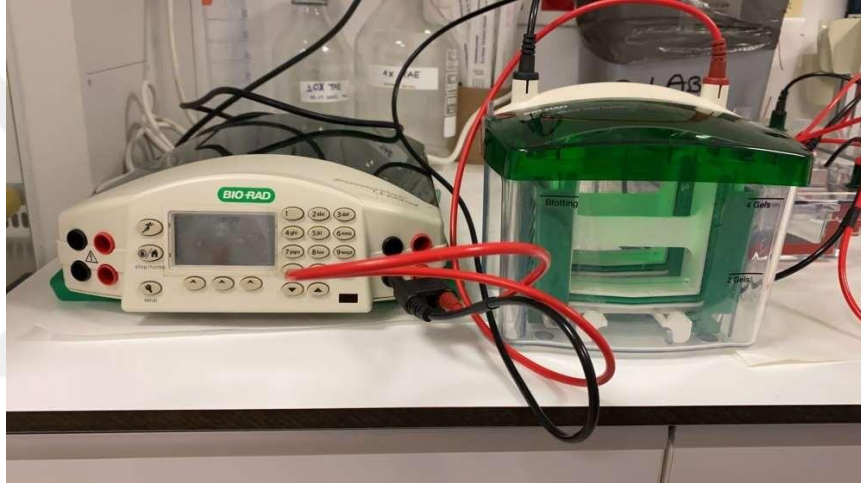
Şekil 3.10. Protein konsantrasyon ölçümünde kullanılan Qubit 3.0 Fluorometer cihazı.

Örneklerin protein konsantrasyonları Qubit Protein Assay Kit (Q33211, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ve Qubit 3.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen Life Technologies Corporation, ABD) ile ölçüldü. Protein ölçümü yapılacak olan 5 farklı grup (Kontrol, MCT, ALA, MEL ve ALAMEL) ve Qubit cihazının kalibrasyonu için kullanılan 3 farklı standart solüsyonu olmak üzere toplam 8 örnek için tampon solüsyonu hazırlandı. Qubit protein analiz kitinde bulunan Qubit protein tamponu ve aynı kit içerisinde bulunan Qubit bileşimi karıştırıldı. Kalibrasyonda kullanılacak olan standart 1, standart 2 ve standart 3 tüplerine 190 µl tampon solüsyonu eklendikten sonra üzerlerine standart çözeltilerinden 10 µl eklendi. Protein ölçümü yapılacak olan 5 farklı örneğin her biri için 198 µl tampon çözeltisi ve üzerlerine 2 µl protein örneği konuldu. Örnekler 2-3 saniye vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Örneklerdeki protein konsantrasyonları Qubit 3.0 Fluorometer cihazı ile ölçüldü (Şekil 3.10).

3.7.3. Protein Jel Elektroforezi

Protein konsantrasyonu ölçülen örneklerden (Kontrol, MCT, ALA, MEL ve ALAMEL) her biri için 20 µg protein karışımı, 2.5 ul 4X laemmli tampon solüsyonu (1610747, Biorad, Kaliforniya, ABD) ve kalanı ddH₂O olacak şekilde hazırlanan 10 µl

protein karışımı 95°C’de 5 dk inkübe edildi. Örnekler, inkübasyonun ardından jel elektroforez yapılınca kadar +4°C buz üzerinde tutuldu. 4’lü dikey jel elektroforez tankı (1658004, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) içerisine 4-20% mini-Protean TGX Stain-Free Precast protein jeli (4561096, Biorad, ABD) yerleştirildi. Dikey elektroforez için gerekli olan tampon solüsyonu (25 mM Tris, 192mM glisin, %0.1 sodyum dodesilsülfat (SDS), pH 8.3) (1610732, Biorad Life Sciences Research, California, ABD) eklendi. Protein örnekleri ve dikey elektroforezin süresini belirlemek için kullanılan protein işaretçisi Precision Plus Protein-All blue standards (163-0393, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) jel içerisine yüklendi. Sonrasında güç kaynağı (1645070, Biorad Life Sciences Research, California, ABD) kullanılarak proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Jel elektroforez sistemi

3.7.4. Proteinlerin Membrana Transferi

Elektroforez sonunda proteinler jelden Trans-Blot Turbo RTA Mini 0.2 µm PVDF Transfer Kit (1704272, Biorad, California, ABD) içerisinde bulunan PVDF membrana transfer edebilmek için aynı kit içerisinde bulunan transfer tampon solüsyonu kullanıldı.

Aynı kit içerisinde bulunan PVDF membran ve filtre kâğıtları transfer tampon solüsyonu içerisinde ıslatıldıktan sonra Trans-blot turbo transfer sistemi (1704155, Biorad Life Sciences Research, California, ABD) (Şekil 3.12) kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış olan proteinler jelden PVDF membrana transfer edildi.



Şekil 3.12. Trans-blot turbo transfer sistemi.

3.7.5. Bloklama ve Antikor İnkübasyonu

PDVF membranlar 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS-T) (%0.1 Tween içeren tamponlanmış Tris salin) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (sc-2325, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandıktan sonra TBS-T ile yıkandı. Membranlar bir gece poliklonal siklofilin A (2175S; Cell Signaling, Massachusetts, ABD), monoklonal RhoA (2117S; Cell Signaling, Massachusetts, ABD), monoklonal ROCK1 (4035S; Cell Signaling, Massachusetts, ABD), monoklonal ROCK2 (9029S; Cell Signaling, Massachusetts, ABD), rekombinant monoklonal MMP2 (sc-13595; Santacruz Biotechnology, Teksas, ABD), rekombinant monoklonal MMP9 (sc-393859; Santacruz Biotechnology, Teksas, ABD) ve monoklonal Nrf2 (sc-365949; Santacruz Biotechnology, Teksas, ABD) primer antikorları ile inkübe edildi. Sonraki gün membranlar TBS-T ile üç kere yıkandıktan sonra %5 yağsız süt tozu içerisinde Horseradish Peroksidaz (HRP) bağlı sekonder antikor (Anti-rabbit IgG, HRP-Linked Antibody [R-05072-001; Advansta, Kaliforniya, ABD] ve Anti-mouse IgG, HRP-Linked Antibody [R-05071-001; Advansta, Kaliforniya, ABD]) ile muamele edildi.

3.7.6. Proteinlerin Görüntülenmesi ve Analizi

Membranlar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra üç kere TBS-T ile yıkandı. Ardından, membranlar gelişmiş kemilüminesans sistemi (ECL) Western

görüntüleme solüsyonu (1705060, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) ile 5 dk inkübe edildi. Proteinler, Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) kullanılarak görüntülendi (Şekil 3.13).

Proteinlerin normalizasyonu, yöntem kontrolü ve antikorların değerlendirilebilmesi için primer ve sekonder antikorların görüntüleme süreci tamamlanan membranlardan ayrılması amacıyla membranlar strip solüsyonu ile 50 °C'deki su banyosunda 20 dk inkübe edildi. Membranlar inkübasyon bitiminde 5 kere 10 dk boyunca TBS-T ile yıkandı. Ardından, yeniden bloklama yapıldı ve membranlar oda sıcaklığında 2 saat boyunca monoklonal β -Aktin (4970, Cell Signaling, Massachusetts, ABD) antikoruna ile inkübe edildi. Uygun sekonder antikor eklenmesinin ardından görüntüleme cihazı ile β -Aktin görüntüleri elde edildi. Western Blot sonunda elde edilen membran görüntüleri bilgisayar programı (ImageJ; National Institute of Health, Bethesda, MD, ABD) aracılığıyla yoğunluk farkına göre analiz edildi. Her protein için en az üç tekrar olacak şekilde Western Blot yapıldı (235, 236).



Şekil 3.13. Chemidoc MP görüntüleme sistemi.

3.8. İstatistiksel Analizler

3.8.1. Histopatolojik İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 22) ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma, normal dağılım gösteren veriler için ANOVA (Tamhane veya Tukey) testi ile; normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis H testi ile yapıldı. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Veriler dağılıma bağlı olarak medyan (minimum-maksimum) (Med (Min-Maks)) veya aritmetik ortalama±standart sapma ($AO\pm SS$) olarak ifade edildi.

3.8.2. Diğer İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından geliştirilen <http://biostatapps.inonu.edu.tr/> web uygulaması üzerinden Kruskal-Wallis H testi yazılımı ile yapıldı (237). $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Veriler Med (Min-Maks) olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyometrik Bulgular

Biyometrik bulgular Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

Deney başı sıçan ağırlıkları açısından tüm gruplar benzer bulundu ($p>0,05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ALA ve ALAMEL gruplarında deney sonu sıçan ağırlığı daha düşük bulundu ($p<0,001$). MCT grubu ile karşılaştırıldığında, ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında deney sonu sıçan ağırlığı daha düşük bulundu ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL gruplarında deney sonu sıçan ağırlığı, MEL grubuna göre daha düşük bulundu ($p<0,001$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT, ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında akciğer ağırlığı daha yüksek bulundu ($p<0,001$). ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında akciğer ağırlığı MCT grubuna göre daha düşük bulundu ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL gruplarında akciğer ağırlığı MEL grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0,001$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT grubunda kalp ağırlığı daha yüksek bulundu ($p=0,016$). ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında ise kalp ağırlığı MCT grubuna göre daha düşük bulundu ($p=0,016$). ALA, MEL ve ALAMEL grupları kontrol grubuna benzer bulundu ($p>0,05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT grubunda RV serbest duvar ağırlığı daha yüksek bulundu ($p=0,042$). MEL grubunda ise MCT grubuna göre RV serbest duvar ağırlığı daha düşük bulundu ($p=0,042$). ALAMEL grubunda RV serbest duvar ağırlığı MEL grubuna göre daha yüksek bulundu ($p=0,042$). ALAMEL grubunda RV serbest duvar ağırlığı kontrol grubuna göre artış eğilimindeydi ($p=0,054$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT, ALA ve ALAMEL gruplarında LV+IVS ağırlığı daha düşük bulundu ($p=0,019$). MEL grubunda ise LV+IVS ağırlığı kontrol grubuna göre düşüş eğilimindeydi ($p=0,056$). ALAMEL grubunda LV+IVS ağırlığı MEL grubuna göre azalış eğilimindeydi ($p=0,093$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT, ALA ve ALAMEL gruplarında Fulton indeksi ($RV/LV+IVS$) daha yüksek bulundu ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL grupları Fulton indeksi açısından MCT grubuna benzer ($p>0,05$) iken; MEL grubunda MCT grubuna göre daha düşük bulundu ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL gruplarında

Fulton indeksi MEL grubuna göre daha yüksek ($p<0,001$) iken; birbirine benzer bulundu ($p>0,05$) (Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Biyometrik bulguların gruplar arası karşılaştırılması.

Parametreler	Gruplar					
	Kontrol	MCT	ALA	MEL	ALAMEL	
Deney başı sıçan ağırlığı (g)	272 (224-340)	302 (273-334)	274,5 (245-343)	309 (217-382)	277 (239-334)	0,054
Deney sonu sıçan ağırlığı (g)	340 (295-414)	363 (313-407)	259 ^{a,b,c} (215-373)	317 ^b (256-400)	255 ^{a,b,c} (193-333)	<0,001
Akciğer ağırlığı (g)	1,74 (1,17-2,05)	2,9 ^d (2,40-3,54)	2,41 ^{b,d,e} (1,94-3,27)	1,93 ^{b,d} (1,5-2,92)	2,36 ^{b,d,e} (2,11-3,18)	<0,001
Kalp ağırlığı (g)	1,24 (0,97-1,67)	1,56 ^d (1,15-1,85)	1,21 ^b (0,84-1,46)	1,15 ^b (0,9-1,72)	1,2 ^b (0,83-1,59)	0,016
RV serbest duvar ağırlığı (g)	0,15 (0,13-0,2)	0,21 ^d (0,15-0,3)	0,17 (0,13-0,25)	0,12 ^b (0,1-0,25)	0,18 ^e (0,15-0,25)	0,042
LV+IVS ağırlığı (g)	0,7 (0,57-0,73)	0,59 ^a (0,50-0,73)	0,58 ^a (0,4-0,73)	0,63 (0,51-0,73)	0,53 ^a (0,44-0,66)	0,019
Fulton indeksi (RV/LV+IVS)	0,22 (0,20-0,27)	0,34 ^d (0,26-0,41)	0,3 ^{d,e} (0,26-0,41)	0,24 ^b (0,16-0,37)	0,33 ^{d,e} (0,27-0,47)	<0,001

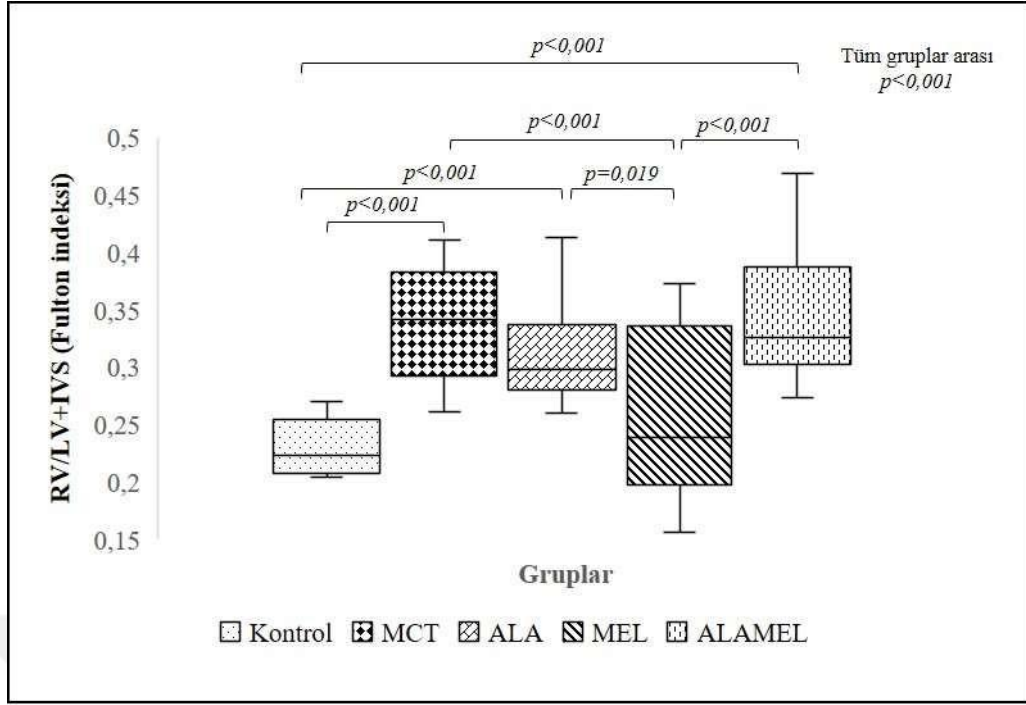
Kısaltmalar: RV, sağ ventrikül; LV, sol ventrikül; IVS, interventriküler septum.

a: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$); b: MCT grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$);

c: MEL grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$); d: Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,05$);

e: MEL grubuna göre anlamlı artış ($p<0,05$).

Değişkenler “ortanca (min.-maks.)” şeklinde özetlenmiştir.



MCT, ALA ve MEL’de kontrol’e göre artış ($p<0,001$); ALA ve MEL’de MEL’e göre artış ($p<0,001$).

Şekil 4.1. RV/LV+IVS’nin gruplar arası karşılaştırılması.

4.2. Hemodinamik Bulgular

Hemodinamik bulgular, Tablo 4.2’de özetlenmiştir.

4.2.1. Sağ Ventrikül Sistolik Basıncı

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT ve ALAMEL gruplarında RVSP değeri daha yüksek bulundu ($p=0,008$).

MEL grubunda RVSP değeri, MCT grubuna göre düşüş eğilimi göstermekle beraber bu düşüş istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadı ($p=0,062$). ALAMEL grubunda RVSP değeri MCT grubuna benzer bulundu ($p>0,05$).

MEL grubundaki RVSP değeri, ALAMEL grubuna göre düşükken ($p=0,008$); Kontrol ve ALA gruplarına benzer bulundu ($p>0,05$).

ALA grubundaki RVSP değeri Kontrol grubuna göre artış eğilimindeyken ($p=0,065$); ALAMEL grubuna göre azalış eğiliminde bulundu ($p=0,054$) (Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Hemodinamik bulguların gruplar arası karşılaştırılması.

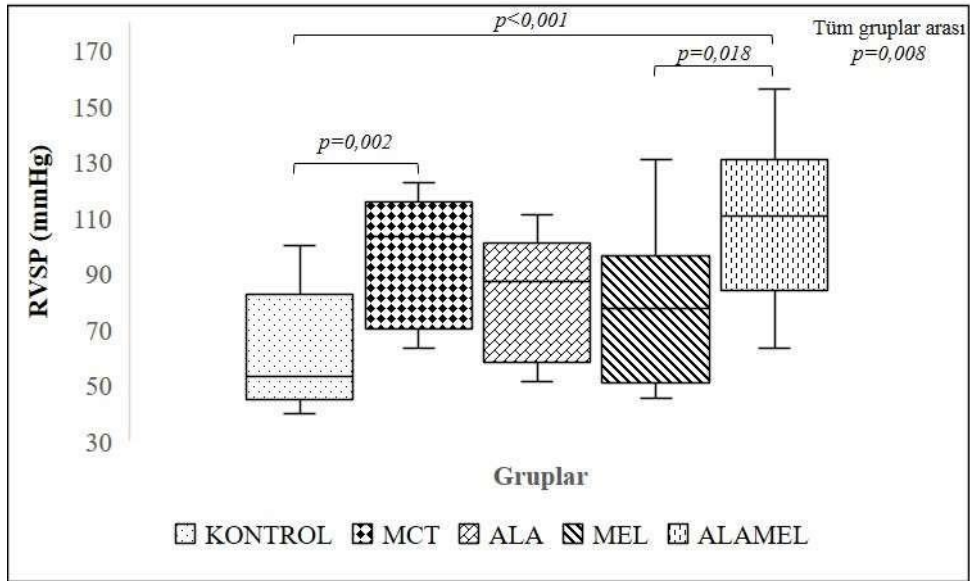
Parametreler	Gruplar					p değeri
	Kontrol	MCT	ALA	MEL	ALAMEL	
RVSP (mmHg)	53 (40-100)	103 ^a (63-122)	87 (51-111)	78 ^b (45-131)	110 ^a (63-156)	0,008
SAP (mmHg)	133 (77-154)	80 ^c (72-113)	94 ^c (78-116)	93 ^c (81-116)	97 ^c (49-136)	0,015
DAP (mmHg)	80 (65-102)	54 ^c (47-91)	50 ^{b, c} (33-85)	61 ^c (33-87)	71 (26-116)	0,019
MAP (mmHg)	98 (69-110)	62 ^c (55-69)	66 ^c (52-82)	71 ^c (40-87)	77 (24-122)	0,01
KH (atım/dk)	262 (246-395)	262 (205-310)	319 (247-570)	249 (159-303)	307 (205-486)	0,067

Kısaltmalar: RVSP, Sağ ventrikül sistolik basıncı; SAP, Sistolik arteriyel basınç; DAP, ortalama; MAP, Ortalama arteriyel basınç; KH, Kalp hızı.

a: Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,05$); b: ALAMEL grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$);

c: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$).

Değişkenler “ortanca (min-maks)” şeklinde özetlenmiştir.



MCT ve ALAMEL’de kontrol’e göre artış ($p=0,008$); MEL’de ALAMEL’e göre azalış ($p=0,008$). MEL, MCT’ye göre düşüş eğiliminde ($p=0,062$). ALA, kontrol’e göre artma eğiliminde ($p=0,065$). ALA, ALAMEL’e göre azalma eğiliminde ($p=0,054$).

Şekil 4.2. RVSP’nin gruplar arası karşılaştırılması.

4.2.2. Sistolik, Diyastolik ve Ortalama Arteriyel Basınç

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT, ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında SAP değeri daha düşük bulundu ($p=0,015$). ALAMEL grubunda SAP

değeri MCT ile karşılaştırıldığında artış eğiliminde olmakla birlikte bu artış istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadı ($p=0,066$). MCT, ALA ve MEL grupları SAP değeri açısından benzerdi ($p>0,05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT, ALA ve MEL gruplarında DAP değeri daha düşük bulundu ($p=0,019$). ALAMEL grubu, DAP değeri açısından kontrol grubuna benzer bulundu ($p>0,05$). ALA grubundaki DAP değeri ALAMEL grubuna göre daha düşük bulundu ($p=0,019$). ALA ile MEL grupları DAP değeri açısından benzer bulundu ($p>0,05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT, ALA ve MEL gruplarında MAP değeri daha düşük bulundu ($p=0,01$). ALAMEL grubunda MAP değeri kontrol grubuna göre azalış eğilimindeyken ($p=0,062$); ALA grubuna göre artış eğilimi gösterdi ($p=0,094$).

4.2.3. Kalp Hızı

KH açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

4.3. Ekokardiyografik Bulgular

Sonuçlarımız Tablo 4.3’de sunulmuştur. Kısaca;

MCT grubunda LVIDs değeri kontrol grubuna benzerdi ($p>0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ALAMEL grubunda LVIDs daha düşük bulundu ($p=0,002$). ALA ve ALAMEL gruplarında LVIDs MCT ve MEL gruplarına göre daha düşük bulundu ($p=0,002$).

IVSd, LVIDd, LVPWd, LVPWs değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT grubunda LVEF daha düşük bulundu ($p<0,001$). ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında LVEF MCT grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL gruplarında LVEF MEL grubuna göre daha yüksek ($p<0,001$) iken; ALAMEL grubunda LVEF kontrol grubuna göre de daha yüksek bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.3).

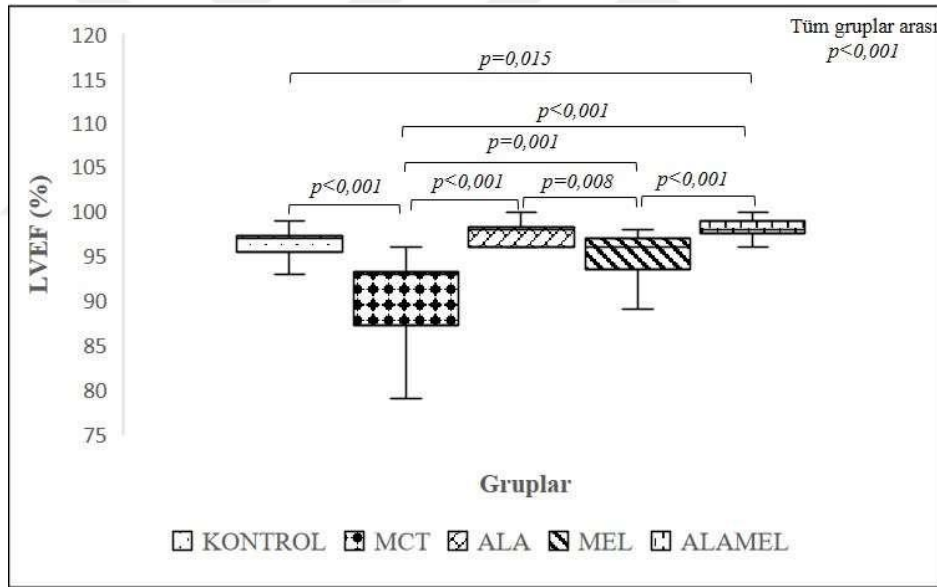
PAAT, MCT grubunda kontrol grubuna göre düşüş eğiliminde olmakla birlikte bu düşüş istatistiksel anlamlılık seviyesinde bulunmadı ($p=0,067$). ALA ve ALAMEL gruplarında ise PAAT hem kontrol grubuna göre hem de MEL grubuna göre daha düşük

bulundu ($p=0,015$). ALAMEL grubunda PAAT MCT grubuna göre artış eğilimindeydi ($p=0,086$) (Şekil 4.4).

MEL grubunda PAAT, RVSP ve Fulton indeksi (RV ağırlığı/(LV+IVS ağırlığı)), kalp ağırlığı kontrol grubuna benzer bulundu.

MCT grubunda RV çapı, kontrol grubuna göre artış eğiliminde olmakla birlikte bu artış istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadı ($p=0,069$). MEL grubunda RV çapı, kontrol ve MCT gruplarına göre daha yüksek bulundu ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL gruplarında RV çapı, MCT ve MEL gruplarına göre daha düşük bulundu ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL grupları RV çapı açısından birbirine benzerdi ($p>0,05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT grubunda RV çapı/LV çapı daha yüksek bulundu ($p<0,001$). MEL grubunda RV çapı/LV çapı MCT grubuna benzer şekilde, Kontrol grubuna göre yüksek seyretti ($p<0,001$). ALA ve ALAMEL gruplarında RV çapı/LV çapı MCT ve MEL gruplarına göre daha düşük bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.5).



MCT'de kontrol'e göre azalış ($p<0,001$); ALA, MEL ve ALAMEL'de MCT'ye göre artış ($p<0,001$); ALAMEL'de kontrol'e göre artış ($p<0,001$).

Şekil 4.3. LVEF'nin gruplar arası karşılaştırılması.

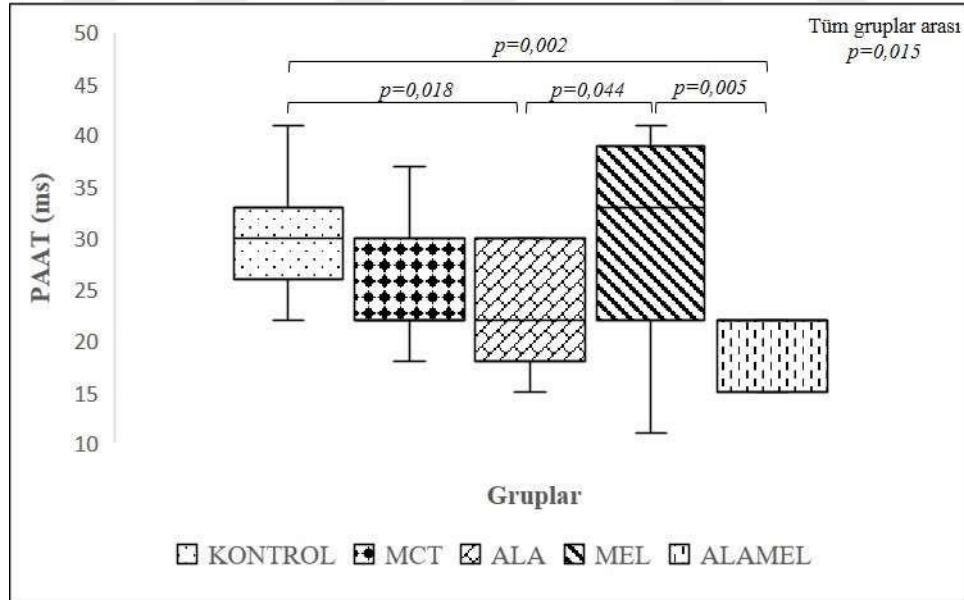
Tablo 4.3. Ekokardiyografik bulguların gruplar arası karşılaştırılması

Parametreler	Gruplar					p değeri
	Kontrol	MCT	ALA	MEL	ALAMEL	
IVSd (mm)	2 (1-3)	2 (2-3)	2 (1-2)	2 (1-3)	2 (2-3)	0,514
LVIDd (mm)	5,5 (3-6)	4 (3-5)	4 (3-6)	5 (4-6)	4 (3-5)	0,067
LVIDs (mm)	2 (1-2)	2 (1-3)	1 ^{a,b} (1-2)	2 (1-3)	1 ^{c,a,b} (1-1)	0,002
LVPWd (mm)	2,5 (2-3)	2 (1-3)	2 (2-3)	2 (2-3)	2 (2-3)	0,651
LVPWs (mm)	3 (1-4)	3 (2-4)	3 (3-4)	3 (3-3)	3 (3-4)	0,074
LVEF (%)	97 (93-99)	93 ^c (79-96)	98 ^{d,e} (96-100)	96 ^d (89-98)	98 ^{d,e,f} (96-100)	<0,001
PAAT (ms)	30 (22-41)	22 (18-37)	22 ^{c,b} (15-30)	33 (11-41)	22 ^{c,b} (15-22)	0,015
RV çapı (mm)	4,12 (3,85-5,04)	4,56 (3,6-5,1)	4,03 ^{a,b} (3,52-4,52)	4,82 ^{d,f} (4,65-5,53)	4,12 ^{a,b} (3,79-4,61)	<0,001
RV çapı/LV çapı (mm/mm)	0,87 (0,84-1,03)	1,16 ^f (0,76-1,29)	0,87 ^{a,b} (0,78-1,01)	1,1 ^f (0,93-1,25)	0,92 ^{a,b} (0,84-1,08)	<0,001

Kısaltmalar: IVSd, diyastol sonu interventriküler septal kalınlık; LVIDd, diyastol sonu sol ventrikül iç çapı; LVIDs, sistol sonu sol ventrikül iç çapı; LVPWd, diyastol sonu sol ventrikül posterior duvar kalınlığı; LVPWs, sistol sonu sol ventrikül posterior duvar kalınlığı; LVEF, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu; PAAT, pulmoner arter akselerasyon zamanı; RV, sağ ventrikül; LV, sol ventrikül.

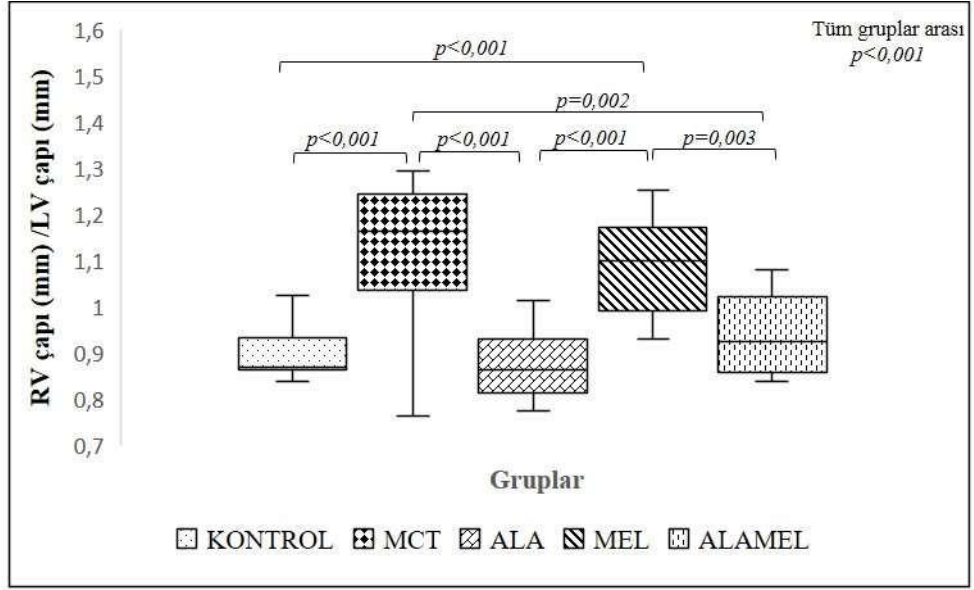
a: MCT grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$); b: MEL grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$); c: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$); d: MCT grubuna göre anlamlı artış ($p<0,05$); e: MEL grubuna göre anlamlı artış ($p<0,05$); f: Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,05$).

Değişkenler “ortanca (min.-maks.)” şeklinde özetlenmiştir.



ALA ve ALAMEL gruplarında hem kontrol grubuna göre hem de MEL grubuna göre azalış ($p=0,015$). PAAT, MCT’de kontrol grubuna göre azalma eğiliminde ($p=0,067$); ALAMEL’de MCT’ye göre azalma eğiliminde ($p=0,086$).

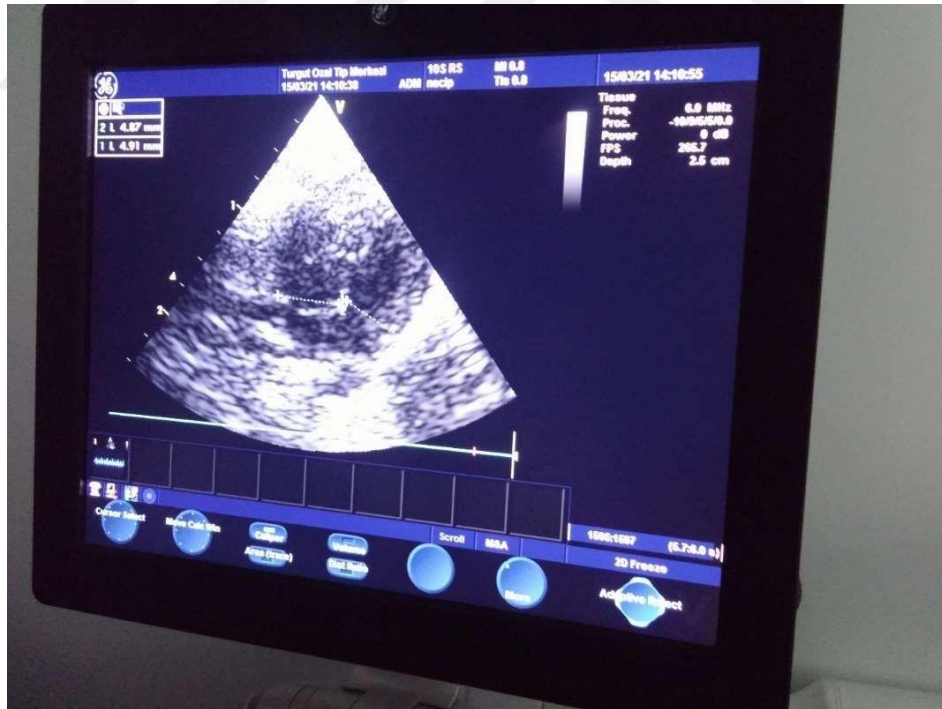
Şekil 4.4. PAAT’nin gruplar arası karşılaştırılması.



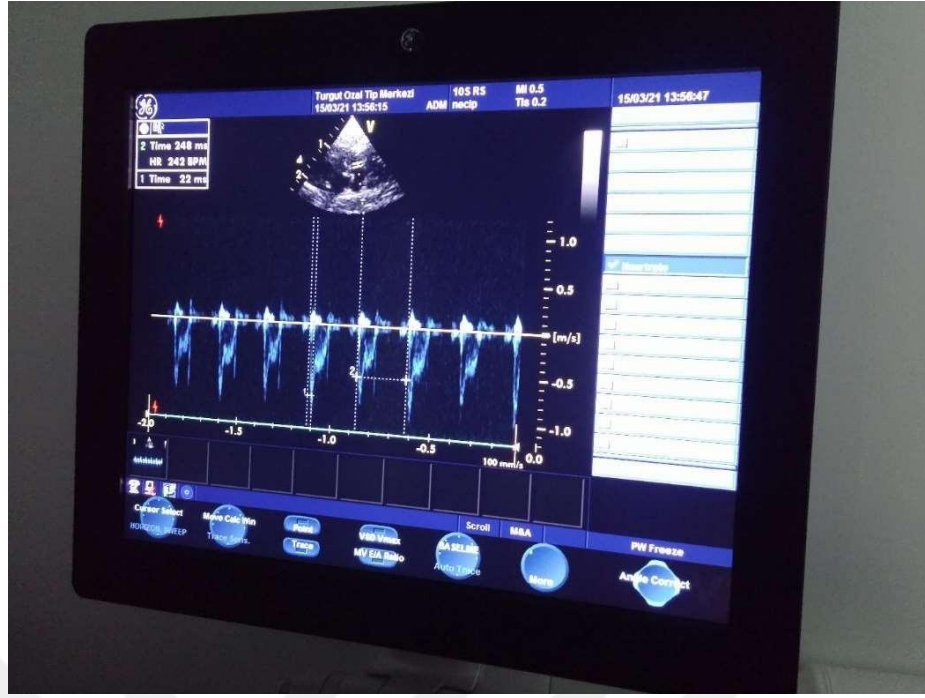
MCT ve MEL’de kontrol’e göre artış ($p<0,001$); ALA ve ALAMEL’de MCT ve MEL’e göre düşüş ($p<0,001$).

Şekil 4.5. RV çapı (mm)/LV çapı (mm)’nin gruplar arası karşılaştırılması.

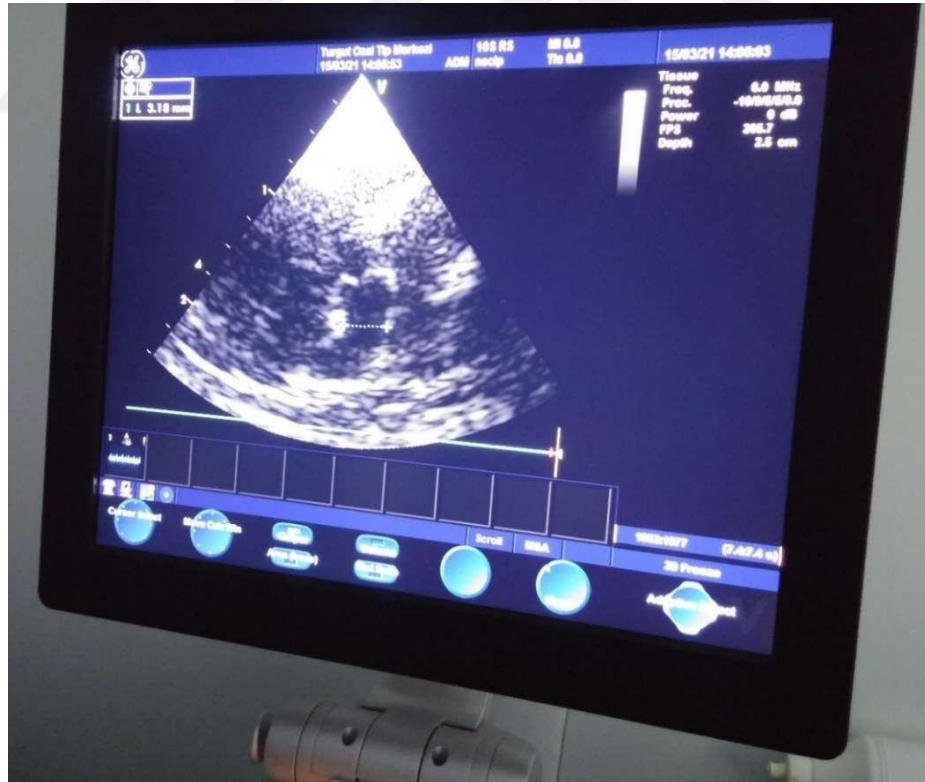
PAH ile uyumlu ekokardiyografik görüntülere demonstratif örnekler verilmiştir (Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.6. MEL grubuna ait bir sıçanda sağ kalp dilate görünümde.



Şekil 4.7. MEL grubuna ait bir sıçanda pulmoner velosite zarfı çentikli görünümde.



Şekil 4.8. MEL grubuna ait bir sıçanda ana pulmoner arter dilate görünümde.

4.4. Histopatolojik Bulgular

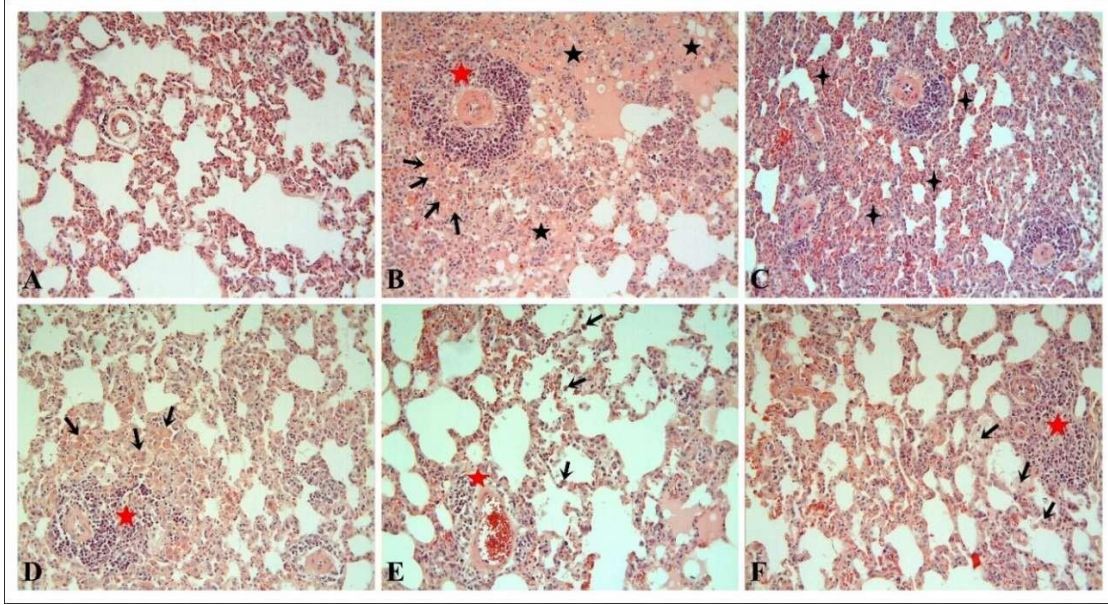
4.4.1. Akciğer

Kontrol grubuna ait akciğer doku kesitlerinde hafif düzeydeki inflamatuvar hücre infiltrasyonu dışında bronş, bronşiyol, alveol ve pulmoner interstisyumun normal histolojik görünümde olduğu izlendi (Şekil 4.9. A). Kontrol grubunda pulmoner arteriyollerde ortalama TIM kalınlığı $12,6 \pm 3,5$ μm olarak elde edildi (Şekil 4.10. A).

MCT uygulanan grupta kontrol grubuna göre belirgin histopatolojik değişiklikler gözlemlendi ($p < 0,0001$) (Şekil 4.9. B ve C). MCT grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun belirgin bir şekilde arttığı dikkat çekti. İnfiltrasyon, pulmoner interstisyum boyunca diffüz olarak izlenmekle beraber perivasküler alanda daha belirgindi. Bu grupta gözlenen bir diğer bulgu alveoler makrofaj yoğunluğundaki artışı. Alveol duvarında yoğun bir şekilde izlenen alveoler makrofajlar, alveol lümeni içerisinde de gruplar halinde dikkat çekti. MCT grubunda gözlenen diğer bulgular alveoler septumlarda kalınlaşma ve interstisyel ödemdi. Bu grupta pulmoner arteriyollerin TIM kalınlığında ($23,4 \pm 4,9$ μm) kontrol grubuna göre belirgin bir artışın olduğu tespit edildi ($p < 0,0001$) (Şekil 4.10. B).

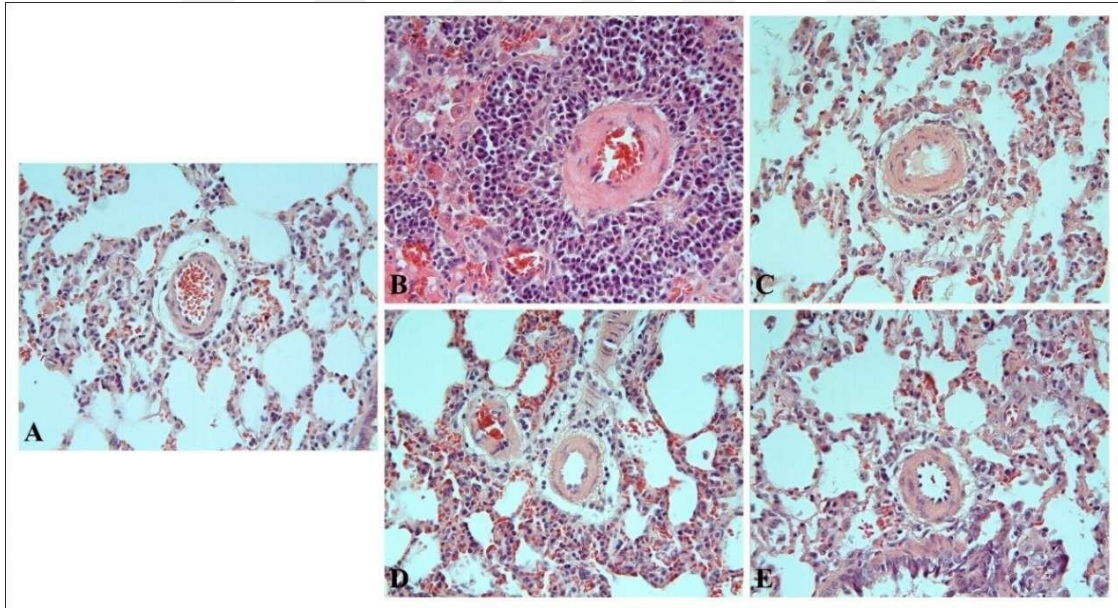
ALA, MEL ve ALA+MEL uygulamalarıyla MCT grubunda izlenen histopatolojik değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0,0001$) (Şekil 4.9. D, E ve F). Diğer yandan, MEL ve ALAMEL gruplarındaki histopatolojik değişikliklerin ALA grubuna göre istatistiksel olarak daha hafif düzeyde olduğu saptandı ($p < 0,0001$). Pulmoner arteriyollerin ortalama TIM kalınlığı ALA grubunda $18,8 \pm 4,5$ μm , MEL grubunda $17,5 \pm 4,1$ μm , ALAMEL grubunda $18,5 \pm 4,2$ μm olarak ölçüldü. Tüm tedavi gruplarında TIM kalınlığının, MCT grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($p < 0,0001$). Diğer yandan TIM kalınlığı yönünden tedavi grupları benzer bulundu (Şekil 4.10. C, D ve E).

Histopatolojik değerlendirme sonuçları ve ortalama TIM kalınlığı Tablo 4.4'te sunuldu.



Kontrol grubunda (A) akciğerin normal histolojik görünümde olduğu izlenmekte. MCT grubunda (B ve C) perivasküler infiltrasyon (kırmızı yıldız), alveol lümeninde gruplar oluşturmuş alveolar makrofajlar (ok) interstisyel ödem (siyah yıldız) ve alveoler septumlarda kalınlaşma (dört köşeli yıldız) dikkat çekmekte. ALA (D), MEL (E) ve ALAMEL (F) gruplarında histopatolojik değişikliklerin belirgin şekilde azaldığı izlenmekte. H-E; X200.

Şekil 4.9. Akciğer dokularının histopatolojik görünümü.



Kontrol (A), MCT (B), ALA (C), MEL (D) ve ALAMEL (E) gruplarında pulmoner arteriyol izlenmekte. MCT grubunda kontrol grubuna göre arteriyol duvarında belirgin bir kalınlaşma; ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında arteriyol duvar kalınlığında MCT grubuna göre belirgin azalma dikkati çekmekte. H-E; X400.

Şekil 4.10. Pulmoner arteriyollerin histopatolojik görünümü.

Tablo 4.4. Histopatolojik değerlendirme sonuçları ve ortalama TIM kalınlıkları.

Gruplar	Histopatolojik skor	TIM
	Med (min-maks)	AO±SD
Kontrol	1 (0-2)	12,6±3,5
MCT	3 (2-3) ^a	23,4±4,9 ^a
ALA	3 (0-3) ^b	18,8±4,5 ^b
MEL	2 (0-3) ^{b, c}	17,5±4,1 ^b
ALAMEL	2 (0-3) ^{b, c}	18,5±4,2 ^b

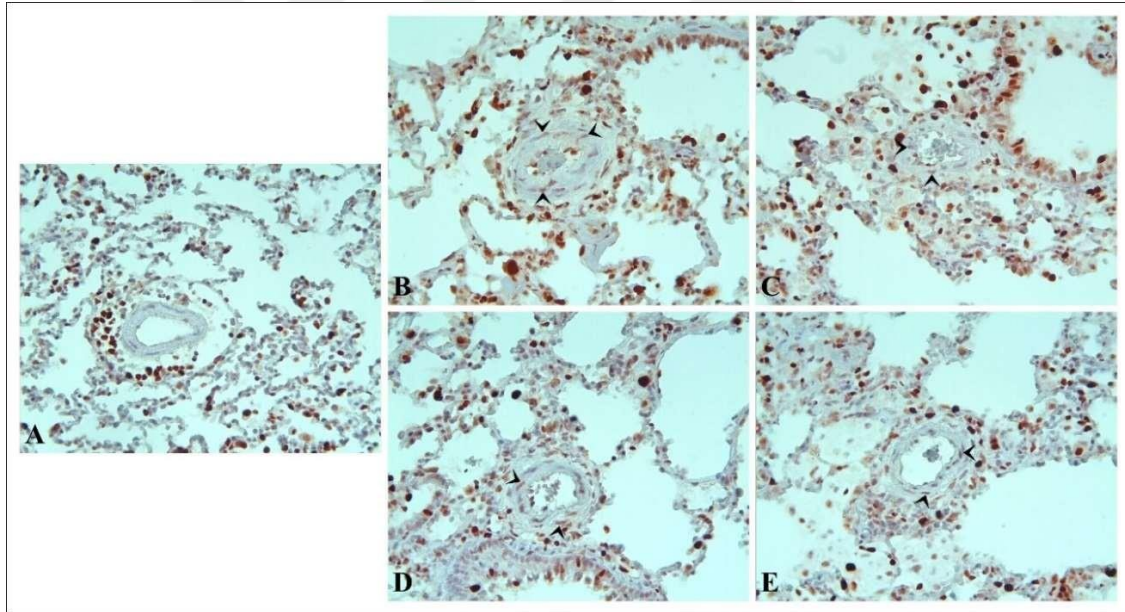
^aKontrol grubuna göre yüksek ($p<0,0001$).

^bMCT grubuna göre düşük ($p<0,0001$).

^cALA grubuna göre düşük ($p<0,0001$).

PCNA İmmünoreaktivitesi

İmmünohistokimyasal boyamaya bağlı olarak PCNA pozitif hücre nükleusları kahverengi boyandı (Şekil 4.11).



Kontrol (A), MCT (B), ALA (C), MEL (D) ve ALAMEL (E) gruplarında vasküler düz kas hücrelerinde PCNA immünoreaktivitesi (ok başı). PCNA immünohistokimyasal boyama X400.

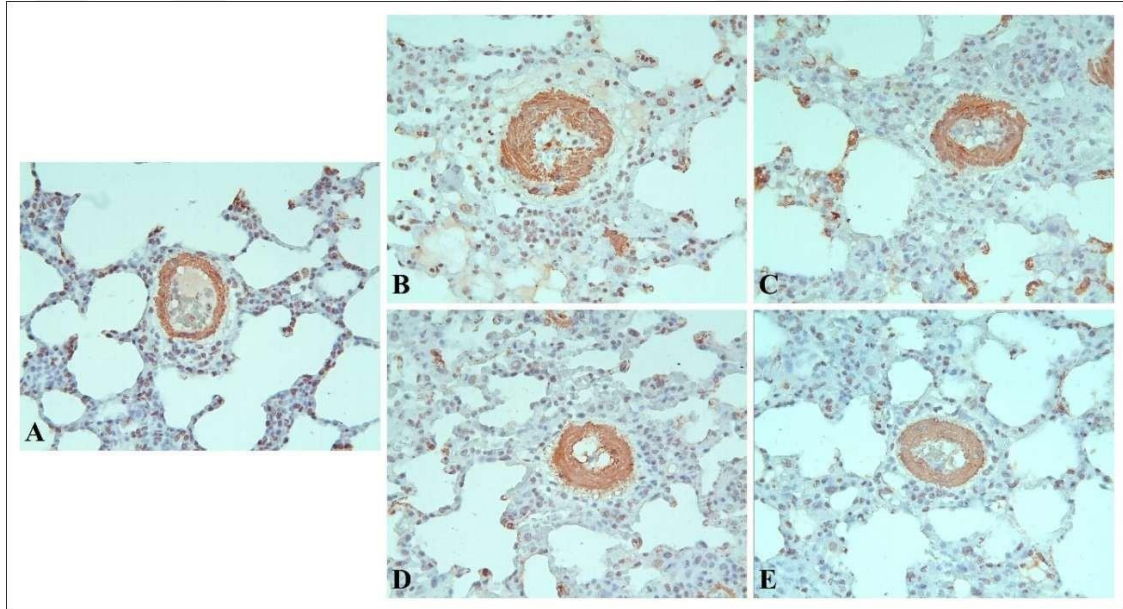
Şekil 4.11. Pulmoner arteriyollerde PCNA immünoreaktivitesi.

Kontrol grubunda PCNA immünoreaktivitesinin yaygınlık ve şiddetinin hafif düzeyde olduğu izlendi. Diğer yandan, MCT grubunda immünoreaktivite şiddetinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında immünoreaktivite şiddetinde MCT grubuna göre

anlamlı bir azalma izlendi ($p<0,05$). Ancak ALA, MEL ve ALAMEL grupları immünoreaktivite şiddeti yönünden benzer bulundu (Tablo 4.5).

α -SMA İmmünoreaktivitesi

İmmünohistokimyasal boyamaya bağlı olarak α -SMA pozitif hücre sitoplazması kahverengi boyandı (Şekil 4.12). MCT grubunda α -SMA immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p<0,0001$). ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında immünreaktivite şiddetinde MCT grubuna göre anlamlı bir azalma izlendi ($p<0,0001$). İmmünreaktivite şiddeti yönünden ALA ve MEL grupları benzer bulunurken; ALAMEL grubunda izlenen immünreaktivite şiddetinin ALA ve MEL gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde düşük olduğu saptandı ($p<0,005$) (Tablo 4.5).



Kontrol (A), MCT (B), ALA (C), MEL (D) ve ALAMEL (E) gruplarında vasküler düz kas hücrelerinde α -SMA immünreaktivitesi. α -SMA immünohistokimyasal boyama X400.

Şekil 4.12. Pulmoner arteriyollerde α -SMA immünoreaktivitesi.

Tablo 4.5. PCNA ve α -SMA immünreaktivite değerlendirme sonuçları.

Gruplar	PCNA	α -SMA
	Med (min-maks)	Med (min-maks)
Kontrol	0 (0-2)	8 (8-12)
MCT	1 (0-9) ^a	12 (8-12) ^a
ALA	1 (0-9) ^b	8 (8-12) ^c
MEL	0 (0-9) ^b	8 (8-12) ^c
ALAMEL	0 (0-9) ^b	8 (8-12) ^{c, d}

aKontrol grubuna göre yüksek ($p<0,0001$).

bMCT grubuna göre düşük ($p<0,05$).

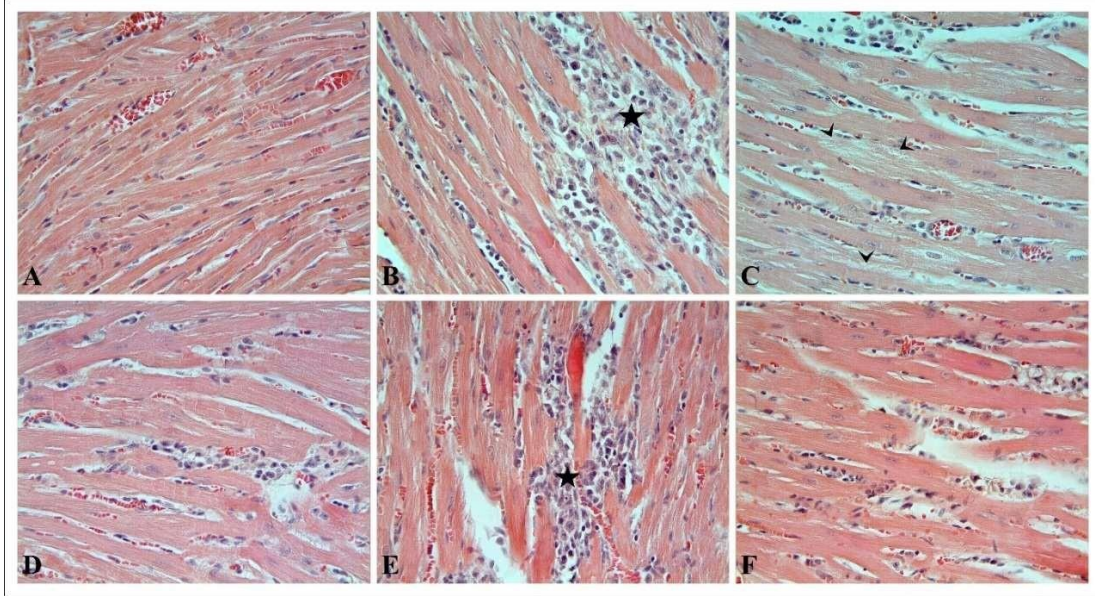
cMCT grubuna göre düşük ($p<0,0001$).

dALA ve MEL gruplarına göre düşük ($p<0,005$).

4.4.2. Kalp

Kontrol grubunda miyokardial doku normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.13. A). Bu grupta ortalama kardiyomiyosit çapı $14,2\pm 2,7$ μm olarak ölçüldü. MCT grubunda, kontrol grubundan farklı olarak miyokardiyumda kardiyomiyositlerde miyofibril kaybı, yer yer ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve granülasyon dokusunun varlığı dikkat çekti ($p<0,0001$) (Şekil 4.13. B ve C). MCT grubunda kardiyomiyosit çapında da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,0001$). ALA ve ALAMEL gruplarında histopatolojik değişikliklerin özellikle granülasyon dokusunun MCT grubuna göre belirgin şekilde azaldığı izlendi ($p<0,005$) (Şekil 4.13. D ve F). Diğer yandan, MEL grubunda izlenen histopatolojik değişikliklerin MCT grubuna göre daha hafif düzeyde olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Şekil 4.13. E). Ortalama kardiyomiyosit çapları yönünden ALA, MEL ve ALAMEL grupları MCT grubuna benzer bulundu.

Histopatolojik değerlendirme sonuçları ve ortalama kardiyomiyosit çapı Tablo 4.6'da verildi.



Kontrol grubunda (A) miyokardiyumun normal histolojik görünümde olduğu izlenmekte. MCT grubunda kardiyomiyositler arasında yer alan geniş granülasyon dokusu (B, yıldız), bazı kardiyomiyositlerde miyofibril kaybı (C, ok başı) dikkat çekmekte. ALA grubu (D) ile ALAMEL grubunda (F) histopatolojik değişikliklerin belirgin şekilde azaldığı, MEL grubunda (E) granülasyon dokusunun belirgin şekilde devam ettiği izlenmekte. H-E; X200.

Şekil 4.13. Sağ ventriküllerin histopatolojik görünümü

Tablo 4.6. Kalpte histopatolojik değerlendirme sonuçları ve kardiyomiyosit çapı

Gruplar	Histopatolojik skor	Kardiyomiyosit çapı AO±SD
	Med (min-maks)	
Kontrol	0 (0-0)	14,2±2,7
MCT	1 (0-3) ^a	19,3±3,9 ^a
ALA	0 (0-3) ^b	18,4±2,9
MEL	0 (0-3)	18,0±3,9
ALAMEL	0 (0-3) ^b	18,3±3,5

^aKontrol grubuna göre yüksek (p<0,0001).

^bMCT grubuna göre düşük (p<0,005).

4.5. Biyokimyasal Bulgular (ELISA)

Sonuçlarımız Tablo 4.7 ve 4.8’de özetlenmiştir. Kısaca, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT grubunda LOX değeri (Şekil 4.14) daha yüksek bulundu (p<0,001). ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında LOX, MCT grubuna göre daha düşüktü (p<0,001). MEL grubunda LOX değeri kontrol (p=0,06) ve ALA (p=0,088) gruplarına göre azalış eğilimindeydi. ALA ve ALAMEL grupları LOX açısından benzerdi (p>0,05).

ADE2 açısından (Şekil 4.15) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,053$).

Tablo 4.7. Biyokimyasal bulguların gruplar arası karşılaştırılması (LOX, ADE2, MPO).

Parametreler	Gruplar					p değeri
	Kontrol	MCT	ALA	MEL	ALAMEL	
LOX ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	5,576 (5,093-11,135)	8,624 ^a (8,105-11,37)	6,052 ^b (4,089-7,974)	4,9855 ^b (3,964-7,264)	4,981 ^b (4,701-6,314)	<0,001
ADE2 (pmol/dk/mg protein)	15,276 (9,664-15,754)	13,147 (12,345-14,713)	13,7245 (10,74-15,942)	10,592 (7,472-13,653)	11,632 (6,003-13,028)	0,053
MPO (nmol/dk/mg protein)	8,019 (5,843-8,247)	6,0925 (5,491-11,288)	5,306 ^c (4,675-8,533)	6,6965 (3,404-8,925)	5,1125 ^{b,c,d} (4,421-6,342)	0,019

Kısaltmalar: LOX, Lizil oksidaz; ADE2, Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2, MPO, Miyeloperoksidaz.

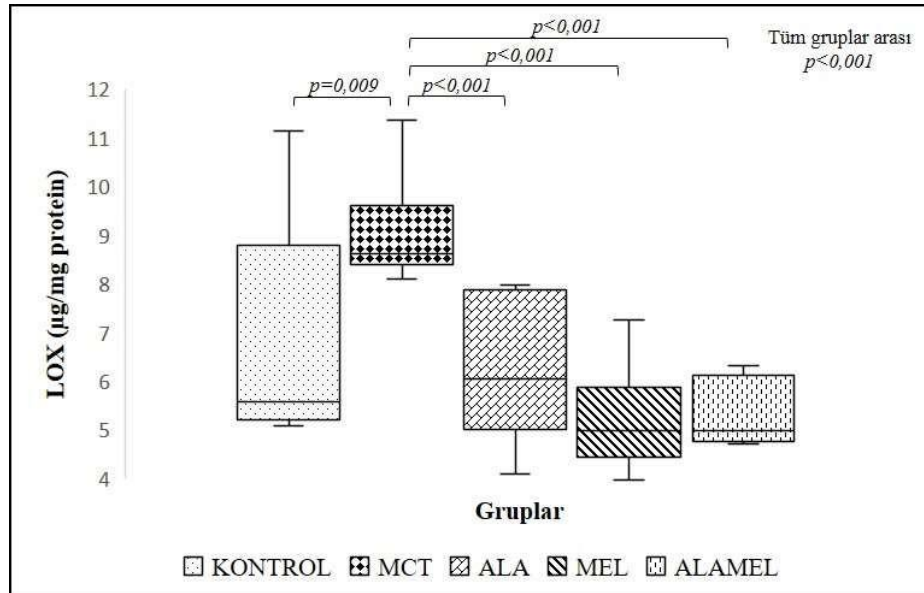
a: Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,05$); b: MCT grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$)

c: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$); d: MEL grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$)

Değişkenler “ortanca (min.-maks.)” şeklinde özetlenmiştir.

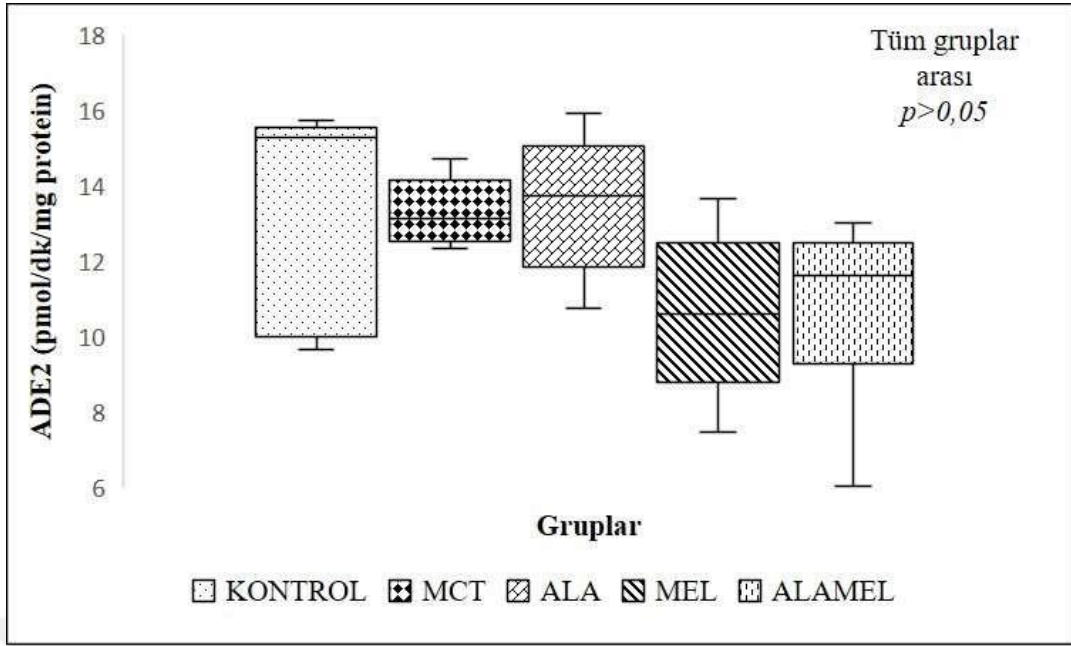
Kontrol grubu ile MCT, MPO değeri açısından (Şekil 4.16) benzer bulundu ($p>0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ALA ve ALAMEL gruplarında MPO değeri daha düşük bulundu ($p=0,019$). ALAMEL grubunda MPO değeri, MCT ve MEL gruplarına göre daha düşük bulundu ($p=0,019$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MCT, ALA, MEL ve ALAMEL gruplarında NOX4 (Şekil 4.17) daha düşük bulundu ($p=0,004$).



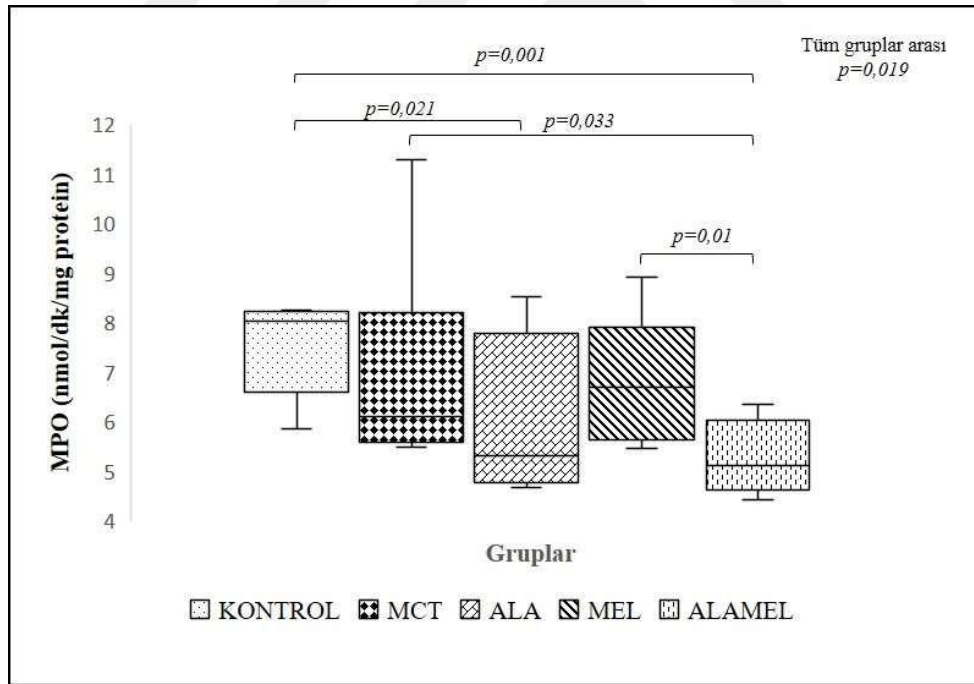
MCT’de kontrol’e göre artış ($p<0,001$). MEL ALA’ya göre azalma eğiliminde ($p=0,088$); MEL kontrol’e göre azalma eğiliminde ($p=0,06$).

Şekil 4.14. LOX değerinin gruplar arası karşılaştırılması.

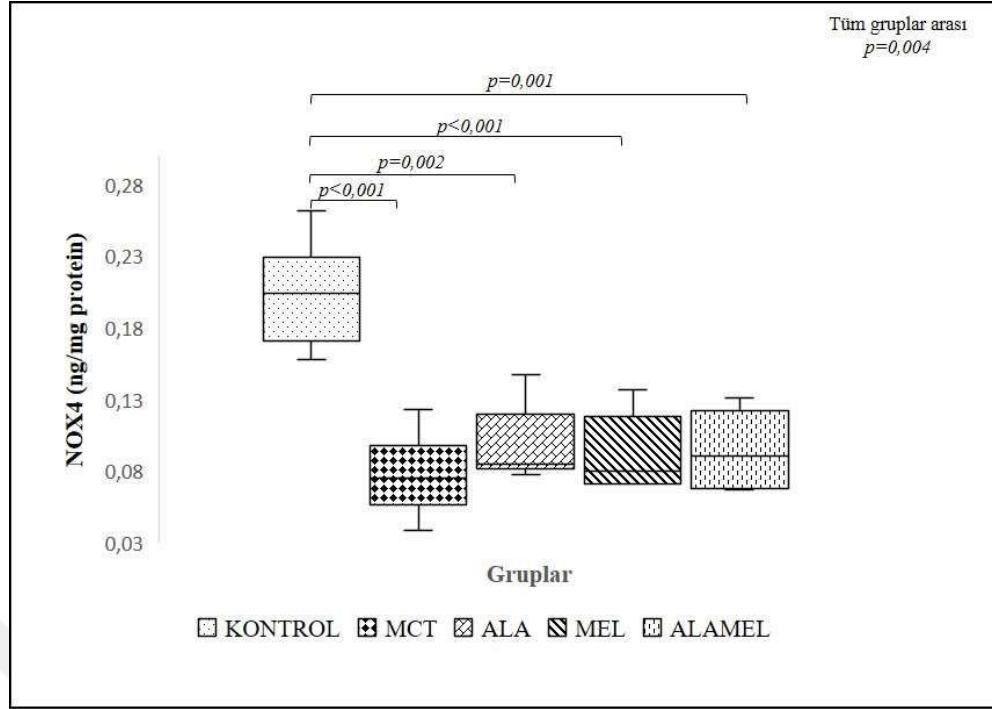


Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

Şekil 4.15. ADE2 değerinin gruplar arası karşılaştırılması.



Şekil 4.16. MPO değerinin gruplar arası karşılaştırılması.



MCT, ALA, MEL ve ALAMEL’de kontrol’e göre düşüş ($p=0,004$).

Şekil 4.17. NOX4 değerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Tablo 4.8. NOX4’ün gruplar arası karşılaştırılması.

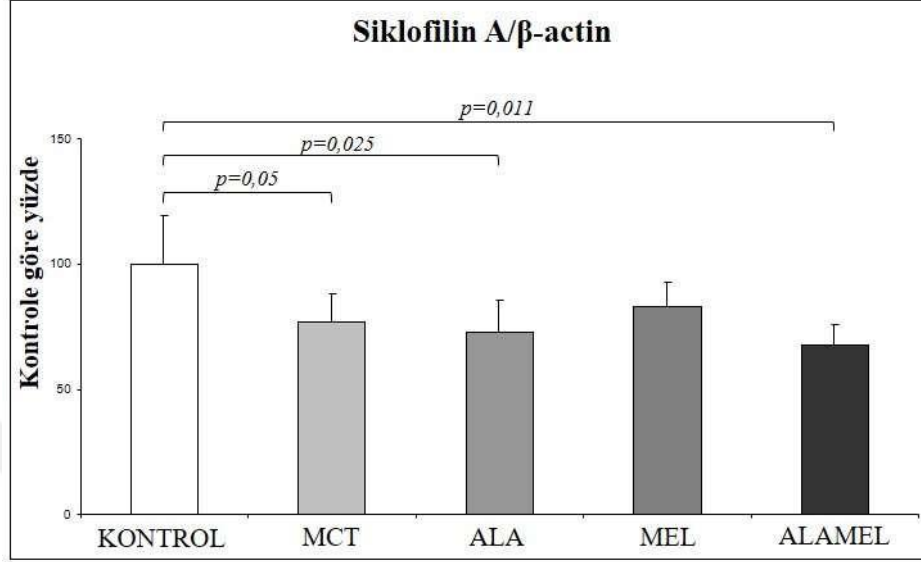
Parametreler	Gruplar					p değeri
	Kontrol	MCT	ALA	MEL	ALAMEL	
NOX4 (ng/mg protein)	0,2 (0,16-0,26)	0,08 ^a (0,04-0,12)	0,09 ^a (0,08-0,15)	0,08 ^a (0,07-0,14)	0,09 ^a (0,07-0,13)	0,004

Kısaltmalar: NOX4, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz 4.

a: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış ($p<0,05$).

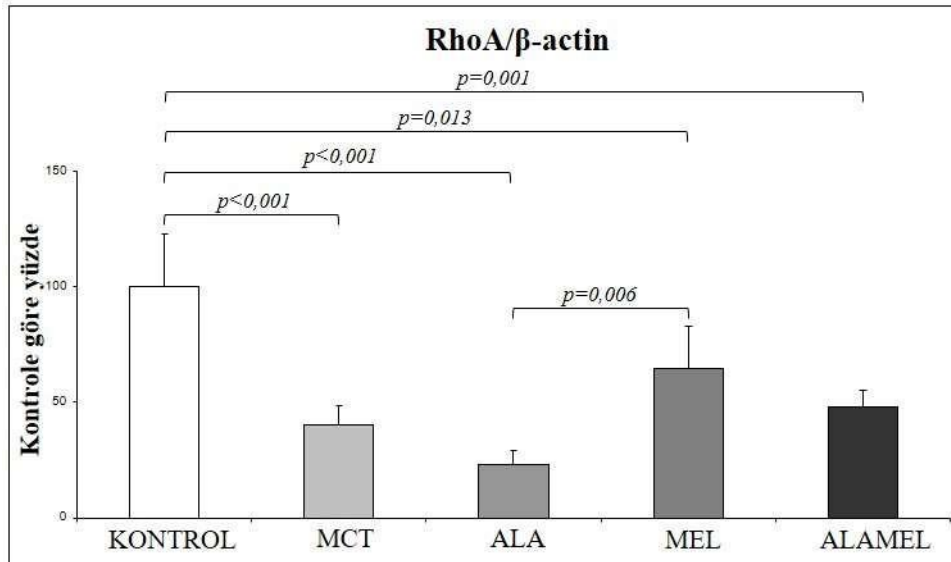
Değişkenler “ortanca (min-maks)” şeklinde özetlenmiştir.

4.6. Western Blot Bulguları



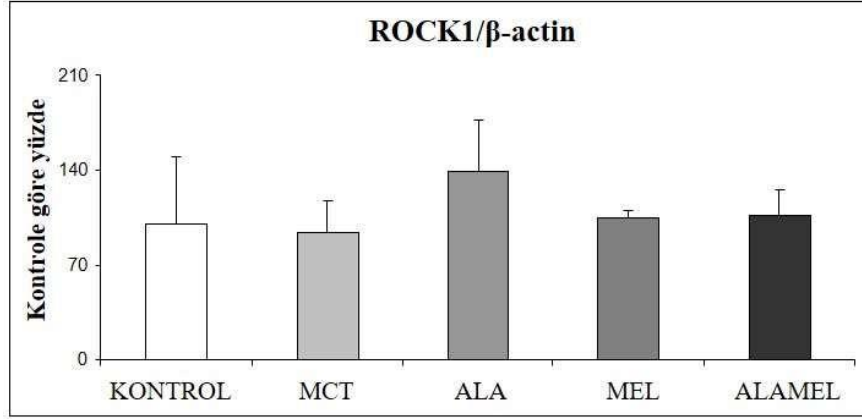
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Şekil 4.18. Siklofilin A protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.



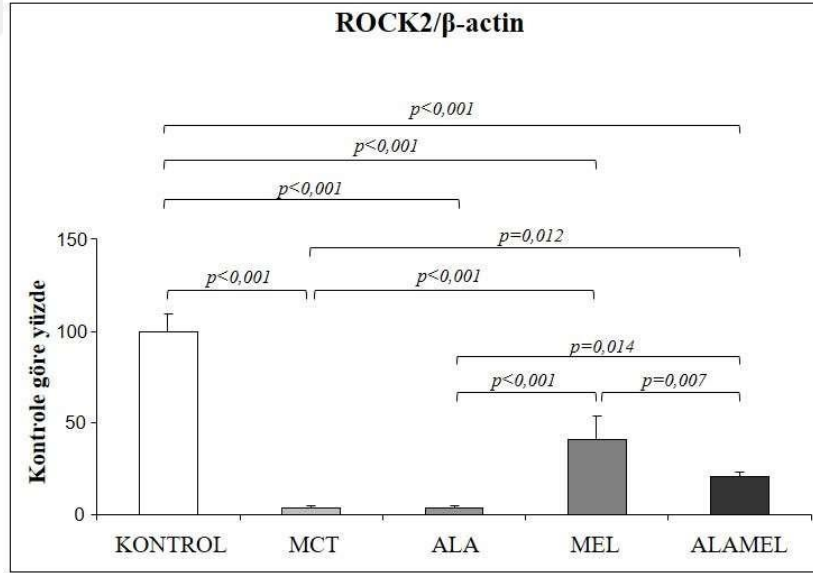
MEL, MCT'ye göre artma eğiliminde ($p=0,068$); ALAMEL, ALA'ya göre artma eğiliminde ($p=0,059$).

Şekil 4.19. RhoA protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.

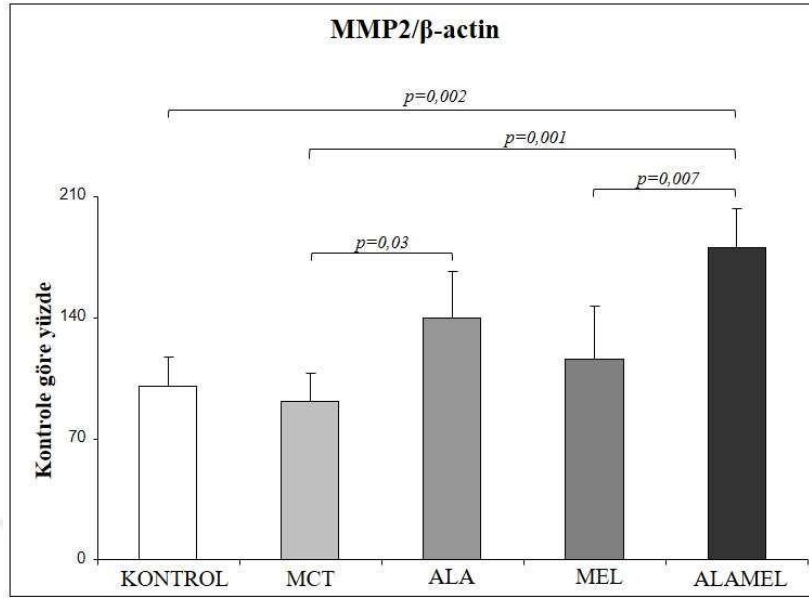


Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Şekil 4.20. ROCK1 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.

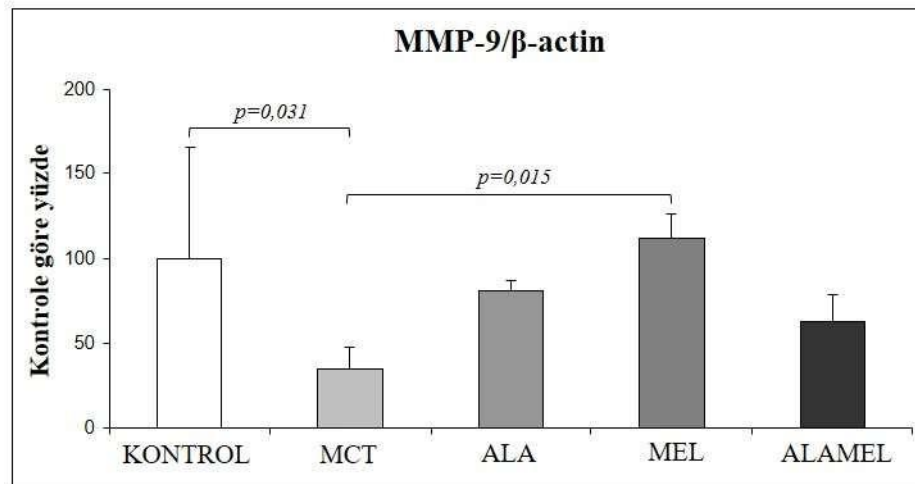


Şekil 4.21. ROCK2 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.

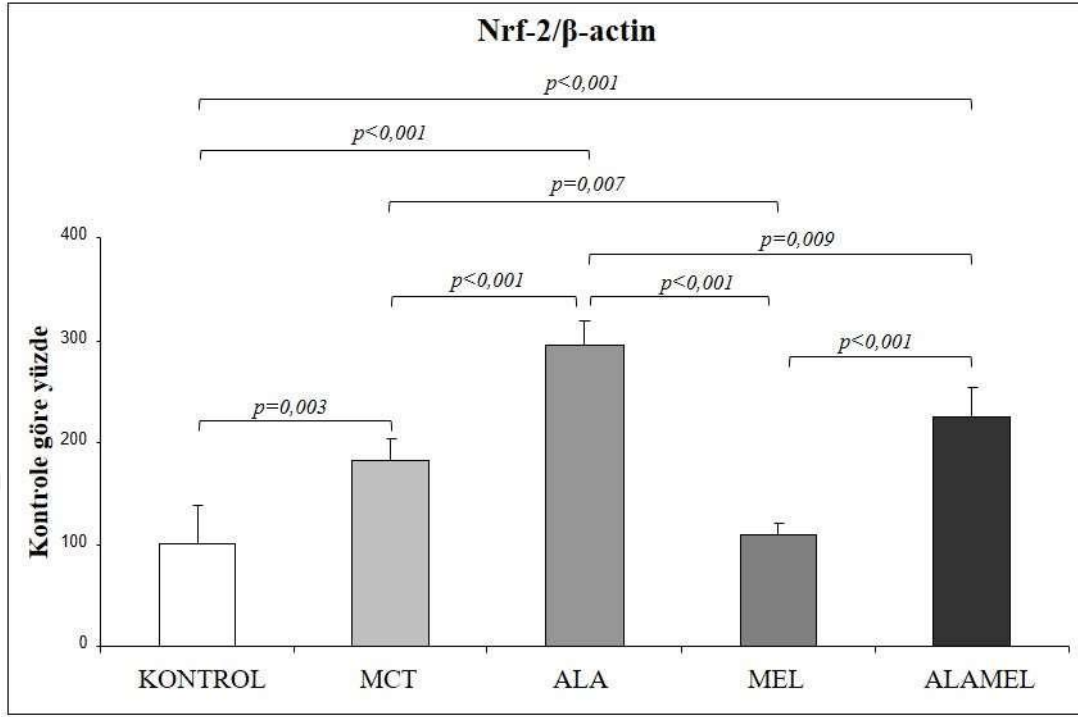


ALA, kontrol'e göre artma eğiliminde ($p=0,062$); ALAMEL, ALA'ya göre artma eğiliminde ($p=0,057$).

Şekil 4.22. MMP-2 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.



Şekil 4.23. MMP-9 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.



Şekil 4.24. Nrf-2 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

MCT ile PAH oluşturduğumuz bu deneysel çalışmamızda, daha önceki çalışmalarla (220, 238, 239) tutarlı şekilde, MCT'nin RVSP'de belirgin bir artışa yol açtığı bulundu (Şekil 4.2). MEL, RVSP'yi istatistiksel anlamlılık sınırına yakın şekilde ($p=0,062$) düşürürken; ALA ve ALAMEL kombinasyonunun RVSP'yi azaltmadığı bulundu. MEL RVSP'yi azaltırken; beklenenin aksine ALAMEL kombinasyonunun RVSP'te düşüşe neden olmayışı dikkat çekici bir bulgudur. Ayrıca RVSP ALA grubunda, ALAMEL grubuna göre istatistiksel anlamlılık sınırına yakın şekilde ($p=0,054$) düşük bulundu. Bu iki durum birlikte değerlendirildiğinde, MEL ile ALA arasında bir antagonizma olabileceği tahmin edilmektedir. Çalışmamızda MCT, SAP, DAP ve MAP'ta belirgin bir azalmaya yol açarken (Tablo 4.2); ALA, MEL veya ALAMEL grupları MCT'ye benzer bulundu. DKB'nin beklenenin aksine ALA grubunda ALAMEL grubuna göre daha düşük bulunması, MEL ile ALA arasında bir antagonizma olabileceği ihtimalini daha da kuvvetlendirmektedir. Ayrıca çalışmamızda, MCT, ALA, MEL ve ALAMEL kombinasyonunun KH üzerine (Tablo 4.2) etkili olmadığı bulundu.

Ekokardiyografik olarak çalışmamızda, MCT LVEF'yi düşürürken (Tablo 4.3); tüm tedavi gruplarında LVEF'nin yükseldiği bulundu. ALA ve ALAMEL kombinasyonunun LVEF'yi yükseltici etkileri MEL'e göre daha belirgin iken; birbirine benzer bulundu. Bu durum, ALAMEL kombinasyonunun tek başına ALA'ya göre LVEF'yi yükseltme açısından ek bir yarar sağlamadığına işaret etmektedir. MCT'nin, PAH lehine olacak şekilde PAAT'yi (Tablo 4.3) istatistiksel anlamlılık sınırına yakın olarak ($p=0,067$) azalttığı bulunurken; tedavi gruplarının herhangi birinde PAAT'de artış bulunmadı. Ancak, MEL grubunda ALA ve ALAMEL gruplarına göre PAAT'nin belirgin şekilde yüksek olduğu bulundu. MEL grubunda ALAMEL grubuna göre PAAT'nin daha yüksek oluşu, daha önce de ifade edildiği üzere bir antagonizma olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir. Çalışmamızda, MCT'nin, daha önceki çalışmalarla (240) tutarlı şekilde, PAH lehine olacak şekilde RV çapı/LV çapı oranını (Tablo 4.3) belirgin bir şekilde artırdığı bulundu. ALA ve ALAMEL kombinasyonu bu oranı düşürürken; MEL'in düşüş sağlamadığı bulundu. Bu durum, ALAMEL kombinasyonunun RV çapı/LV çapı oranını düşürmek açısından tek başına ALA'ya göre ek bir yarar sağlamadığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda, MCT'nin daha önceki çalışmalarla (220, 238, 239) tutarlı şekilde, RV/(LV+IVS) oranını yükselttiği (Tablo 4.1) bulundu. MEL, RV/(LV+IVS) oranını belirgin bir şekilde azaltırken; ALA ve ALAMEL kombinasyonunun RV/(LV+IVS) oranı üzerine etkili olmadığı bulundu. Bu durum, MEL'in MCT ile indüklenen PAH nedeniyle oluşan RVH'yi azalttığını; ALA ve ALAMEL kombinasyonunun ise RV üzerinde antihipertrofik etkili olmadığını yansıtmaktadır. Ayrıca, MEL'in belirgin antihipertrofik etkisine karşın ALAMEL kombinasyonunun etkisiz kalışı MEL ile ALA arasında bir antagonizma olabileceği ihtimalini artırmaktadır.

Çalışma gruplarımız histopatolojik olarak incelendiğinde MCT pulmoner arteriyollerin TIM kalınlığını artırırken (Tablo 4.4); perivasküler alanda daha belirgin olmak üzere pulmoner interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, interstisyel ödem, alveoler makrofaj yoğunluğu ve alveoler septum kalınlığında artışla karakterize histopatolojik skorda (Tablo 4.4) yükselişe neden oldu. Ayrıca, vasküler duvarda PCNA ve α -SMA immünoaktivitesinde (Tablo 4.5) belirgin artışa yol açtı. Bu değişiklikler daha önce yapılan MCT ile oluşturulmuş sıçan PAH çalışmalarıyla paralellik göstermektedir (239, 241, 242). Tüm tedavi gruplarında, TIM kalınlığı belirgin bir şekilde azalmakla beraber ALAMEL kombinasyonunun tek başına ALA veya MEL'e bu etki açısından üstün olmadığı bulundu. Buna paralel olarak, tüm tedavi gruplarında PCNA immünoaktivitesi aynı derecede düşüş gösterdi. Bu durum, ALA ve MEL'in pulmoner vasküler duvar kalınlığını vasküler hücreler üzerindeki antiproliferatif etkileri aracılığıyla azaltmış olabileceğine, antiproliferatif etki derecelerinin benzer olduğuna ve kombinasyonun monoterapiye kıyasla ek bir antiproliferatif etkiye yol açmadığına işaret etmektedir. Tüm tedavi gruplarında, α -SMA immünoaktivitesi önemli derecede azaldı. Bu azalış ALA ve MEL gruplarında benzer derecede iken; ALAMEL grubunda en yüksek seviyede gerçekleşti. α -SMA immünoaktivitesindeki azalma, ALA ve MEL'in vasküler duvar kalınlığını azaltmasında PADKH'ler üzerindeki antiproliferatif ve/veya antihipertrofik etkilerin dikkate değer katkı sağlamış olabileceğini yansıtmaması açısından önemlidir. Ayrıca tüm tedavi gruplarında MCT'ye bağlı histopatolojik skorun belirgin bir şekilde azaldığı bulundu. Tek başına MEL veya ALAMEL kombinasyonunun tek başına ALA'ya göre histopatolojik skoru daha fazla azalttığı bulundu. Bu durum, MEL'in birçok çalışma (243-247) ile raporlanan güçlü antiinflamatuvar özelliklerini doğrular şekilde belirgin antiinflamatuvar etkiler sergilemesinin yanı sıra akciğerdeki antiinflamatuvar etkilerinin ALA'ya kıyasla daha güçlü olduğunu anlamak açısından önemlidir. Ayrıca, ALAMEL kombinasyonunun

vasküler duvar kalınlığını azaltma etkisinde olduğu gibi antiinflamatuvar etki açısından da tek başına MEL'e göre ek bir yarar sağlamadığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda, daha önceki çalışmalarla (248, 249) uyumlu şekilde, RV miyokardında da MCT'ye bağlı önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. MCT grubunda kardiyomiyositlerde miyofibril kaybı, interstisyel ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve granülasyon dokusu ile karakterize histopatolojik skorda (Tablo 4.6) artış bulundu. Bu duruma, kardiyomiyosit çapında (Tablo 4.6) artış da eşlik etti. MEL, histopatolojik skorda değişikliğe yol açmazken; ALA ve ALAMEL kombinasyonunun histopatolojik skoru birbirine benzer derecede düşürdüğü bulundu. Bu durum, daha önce antiinflamatuvar etkileri raporlanmış olan (209, 250, 251) ALA'nın akciğerde olduğu gibi RV miyokardında da antiinflamatuvar etkileri olduğunu göstermektedir. MEL'in akciğerde belirgin antiinflamatuvar etkiler göstermesine karşın RV miyokardında inflamasyonda azalma sağlamaması dikkat çekici bir bulgudur. ALAMEL kombinasyonunun ALA'ya benzer antiinflamatuvar etkililik göstermesi de MEL'in antiinflamatuvar etki göstermeyişi desteklemektedir. Çalışmamızda, ALA, MEL veya ALAMEL kombinasyonunun kardiyomiyosit çapı üzerine etkili olmadığı bulundu.

Pulmoner vasküler sistemdeki yüksek LOX aktivitesinin, kollajen ve elastin liflerinde aşırı çapraz bağlanmaya yol açarak ECM remodelinginde rol oynadığı ve böylece PAH patogenezinde önemli bir yer tuttuğu ileri sürülmüştür (69). Literatürde, hipoksi ile oluşturulmuş PH'de LOX'un araştırıldığı çok sayıda çalışma (252-254) bulunmasına karşın; MCT ile oluşturulmuş sıçan PAH modelinde bu bağlamda sınırlı sayıda çalışma vardır. Nave ve arkadaşları (69) MCT ile PAH oluşturulmuş sıçan akciğer ve PADKH'lerinde LOX gen ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, bu çalışma ile tutarlı şekilde, MCT'nin, akciğer LOX aktivitesinde (Şekil 4-14) belirgin bir artışa neden olduğu bulundu. Tüm tedavi gruplarında LOX azalırken; MEL'in LOX'u ALA'ya göre istatistiksel anlamlılık sınırına yakın şekilde daha fazla düşürdüğü bulundu. Bu bağlamda, ALA ve özellikle de MEL'in LOX aktivitesinin inhibisyonu üzerinden pulmoner arteriyollerde ECM remodelingini azaltmış ve bu şekilde PAH gelişimini önlemiş olabileceği tahmin edilmektedir.

ADE2'nin PH patofizyolojisi için önemini araştırarak önemli sayıda deneysel ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, ADE2'deki azalmanın hipoksik PH ve PAH patogenezinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. Örneğin, CHD ile ilişkili PAH'ı olan 104 hastanın dahil edildiği bir çalışmada, hastaların serum ADE2

protein seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (154). Başka bir çalışmada, hipoksik PH sıçan modelinde 3 hafta hipoksiye maruz bırakılan sıçanların akciğerinde ADE2 gen ekspresyonu ve protein düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (156). Çalışmamızda ise, MCT'nin akciğer ADE2 aktivitesinde (Şekil 4.15) değişikliğe neden olmadığı; bununla beraber tedavi gruplarının herhangi birinin de ADE2 aktivitesini değiştirmede olduğu bulundu. Shenoy ve arkadaşları (255) MCT ile indüklenen erkek Sprague-Dawley sıçan PAH modelinde, PAH'lı sıçan akciğerinde ADE mRNA seviyesinin artarken ADE2 mRNA seviyesinin değişmediği fakat ADE/ADE2 oranının arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, PAH'lı sıçan akciğerinde AT1R ve AT2R mRNA seviyeleri değişmezken; AT1R/AT2R oranında artış raporlanmıştır. Haga ve arkadaşları (256) Sprague-Dawley erkek sıçanlarda MCT ile indüklenmiş PAH modelinde bir ADE2 aktivatörü olan NCP-2454'nin profilaktik etkisini araştırmışlardır. MCT uygulanan sıçanlarda akciğer ADE, AT1R, ADE2 ve MAS mRNA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca ADE2/ADE oranının kontrol grubuna göre azaldığı; MAS/AT1R oranının ise değişmediği raporlanmıştır. Bu durum, PAH'ta ADE/AT1R aksı ile ADE2/MAS aksı arasındaki dengenin ADE2 artışına rağmen ADE/AT1R lehine bozulduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmalar beraber değerlendirildiğinde, PAH patogenezinde tek başına ADE2'deki değişimden ziyade ADE/ADE2 oranındaki artışın (veya ADE2/ADE oranındaki azalış) dikkate alınması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda ADE aktivitesi ölçülmediğinden bu oranlar hesaplanmadı. Bu bağlamda, ADE aktivitesini ölçmemiş olmamız, çalışmamızın limitasyonlarından biri olarak değerlendirilebilir.

MPO, birçok inflamatuvar patolojide oksitadif stresi artıran bir nötrofil enzimidir (257). H_2O_2 'nin hipokloroz aside dönüşümünü katalize etmektedir (258). Hipokloroz asit, protein, lipid ve DNA ile reaksiyona giren güçlü bir oksidan maddedir (259). Hücrelerde tiyollerini oksitleyerek apoptozis ve nekroza yol açmaktadır (260, 261). MPO'nun daha önce yapılmış MCT ile indüklenen PAH çalışmalarında (262-264) arttığı bildirilmiştir. Çalışmamızda ise MCT'nin akciğer MPO aktivitesinde (Şekil 4.16) değişikliğe neden olmadığı bulundu. ALA ve MEL monoterapilerinin MPO aktivitesi üzerinde değişikliğe neden olmadığı; ancak ALAMEL kombinasyonunun MPO aktivitesini azalttığı hatta kontrol grubundaki değerlerin de altına indirdiği bulundu. Chapman ve arkadaşları (257) seruloplazminin MPO aktivitesini, MPO'nun bir ara formu olan compound I'i azaltarak ve ardından MPO'yu aktif olmayan compound II formunda tutarak inhibe ettiğini raporlamışlardır. Seruloplazminin, inflamasyon

sırasında MPO kaynaklı oksidan üretimine karşı endojen bir koruyucu mekanizma olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Sun ve arkadaşları, SSc ile ilişkili PAH hastalarında diğer inflamatuvar hastalıklarla uyumlu şekilde serum seruloplazmin düzeyinin arttığı bildirilmiştir (265). Bizim çalışmamızda da seruloplazmin düzeyinin artarak PAH'ta artmasını beklediğimiz MPO aktivitesindeki artışı baskılamış olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalar ise MPO'nun inflamatuvar etkilerinin yanı sıra aşırı inflamatuvar hasarın engellenmesinde de rol oynuyor olabileceği üzerinde durmaktadır. Rehring ve arkadaşları (266) MPO'nun nötrofil yüzeyine direkt bağlanarak nötrofil adezyon ve migrasyonunu azalttığını, bu yolla inflame dokuda daha fazla nötrofil infiltrasyonunu baskıladığını bildirmişlerdir. Bu etkilerin, nötrofil kemotaksisinde önemli rol oynayan ERK (267) aktivasyonundan (fosforilasyon) bağımsız şekilde ve nötrofil yüzeyindeki CD11b harici bir liganda bağlanarak meydana geldiğini öne sürmüşlerdir. Haegens ve arkadaşları (268) ise MPO'nun bronşiyal epitelde IL-8 üretimini azalttığını bildirmişlerdir. Bu durumun nötrofil infiltrasyonunu azaltma yönünde bir feedback mekanizması olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda PAH'lı sıçan akciğerinde MPO'nun değişmemiş bulunması, MPO'nun IL-8 üretimini azaltarak ve/veya nötrofil yüzeyine direkt bağlanıp dokuda nötrofil infiltrasyonunu azaltarak koruma mekanizmalarını aktive etmesi ve azalan nötrofil sayısı ile birlikte kendi ekspresyonu/aktivasyonu üzerinde negatif feedback etkisi yapması ile açıklanabilir. Bunu doğrulamak için IL-8 düzey tayinine ihtiyaç vardır.

Pulmoner arteriyel duvarda ROS'un ana kaynaklarından olan NOX'lar içerisinde baskın eksprese edilen izoform NOX4'tür (2, 104, 105, 114). NOX4'ün NOX1 ve NOX2'den önemli bir farklılığı bulunmaktadır. NOX1 ve NOX2 önce süperoksit üretip ardından H_2O_2 'ye dönüştürürken; NOX4, doğrudan H_2O_2 üretir (2). NOX1 ve NOX2 kaynaklı süperoksit, NO ile reaksiyona girebilir veya SOD'ların varlığında H_2O_2 'ye dönüştürülebilir. NOX4'ün ise süperoksitten ziyade predominant olarak H_2O_2 ürettiği bildirilmiştir (269-275). Sıçanlarda MCT ile indüklenen PAH modelinde, akciğer NOX4 protein düzeyinin arttığı bildirilmiştir (239). Farelerde hipoksi ile indüklenen PH, akciğerlerde NOX4 seviyelerinin artmasıyla ilişkili bulunmuştur (113, 115). İPAH'lı hastaların akciğerlerinde, NOX4 ekspresyonunun upregüle olduğu bildirilmiştir (113). Çalışmamızda ise MCT'nin akciğer NOX4 aktivitesini (Şekil 4.17) azalttığı; bu durumun tüm tedavi gruplarında da benzer düzeyde devam ettiği bulundu. Ray ve arkadaşları (276) çalışmalarında, NOX4 ilişkili H_2O_2 üretiminin hiperpolarizasyon artışı yoluyla vazodilatasyonu artırdığı ve kan basıncı düşürdüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca,

NOX4'ün süperoksitten ziyade predominant olarak H₂O₂ üretmesi ve böylece süperoksit kaynaklı NO inaktivasyonunun hiç olmaması veya çok az olmasının da bu etkide rolü olduğu öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda ise akciğer NOX4 aktivitesinin azalması ve böylece NOX4 ilişkili H₂O₂ üretimindeki düşüş nedeniyle vasküler hiperpolarizasyonun azalması artan pulmoner arter basıncını yansıtan RVSP artışıyla ilişkilendirilebilir.

ROCK1 ve ROCK2, vasküler düz kasta eksprese edilmekte olup vasküler tonusun düzenlenmesinde ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan serin/treonin kinazlardır (114, 132). ROCK'lar küçük G proteini RhoA tarafından aktive edilir ve daha sonra MLCP'yi fosforile ederek inaktif hale getirir. Bu nedenle miyozin fosforilasyonu artar, böylece sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarındaki herhangi bir artıştan bağımsız olarak düz kasın kasılması artar. Bu durum kalsiyum sensitizasyonu olarak ifade edilir (133). RhoA/ROCK yolunun aktivasyonu ile oluşan kalsiyum sensitizasyonu, PH'de gözlenen düz kas disfonksiyonuna katkıda bulunabilir. Pulmoner arterlerde ROS ile RhoA/ROCK yolunun ilişkili olduğu bildirilmiştir (63, 134). Kronik hipokside, RhoA aktivitesi artar ve bu artış artan ROS üretimi ile ilişkilidir (135, 136). Süperoksitin sıçan pulmoner arterlerinde nükleusa ROCK2 translokasyonuna neden olduğu ve ROCK inhibitörüne duyarlı vazokonstriksiyona neden olduğu (137) gösterilmiştir. Hidrojen peroksit, PAEC'lerde ve PAKDH'lerde RhoA aktivitesini de artırabilir (138). Bu bağlamda tartışılmalı sonuçlar da bildirilmiştir (114, 139).

RhoA/ROCK/CyPA/Bsg yolunun aktivasyonu PAH patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır. ROCK'un aşırı ve sürekli aktivasyonu, vasküler düz kas hücrelerinden CyPA sekresyonunu artırır ve ekstraselüler CyPA, vasküler düz kas hücresi proliferasyonunu uyarır. Ek olarak, ekstraselüler CyPA, endotelial hücre adezyon moleküllü ekspresyonunu ve endotelial apoptozisi indükler. CyPA, reseptörü Bsg aracılığıyla etki göstermektedir. Sağlıklı kontrollere kıyasla PAH hastalarında plazma CyPA seviyesi önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Ayrıca plazma CyPA düzeyi, hastalık şiddeti ve uzun süreli sağkalım oranı ile korele bulunmuştur. Oksidatif stres'in PAH'lı hastaların PADKH'lerinden CyPA sekresyonunu indüklediği gösterilmiştir. CyPA'nın PAH'lı hastaların PADKH'lerinden sitokin/kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin sekresyonunu, inflamatuvar hücre göçünü ve PADKH proliferasyonunu artırdığı raporlanmıştır (140).

Siddique ve arkadaşları 6 haftalık 160-200 g Sprague-Dawley erkek sıçanlarda MCT (60 mg/kg tek doz, sc) ile indüklenmiş PAH modelinde emetin (0,05 mg/kg/gün, po, 3 hafta boyunca)'ın profilaktik etkilerini araştırmışlardır. MCT uygulamasının RVSP'yi artırırken; SAP'ı değiştirmedeği ayrıca RV/(LV+S) oranını artırdığı gösterilmiştir. PAH'lı sıçanlarda PA medial duvar kalınlığında artış gösterilmiş olup bu durum pulmoner vasküler remodelingi yansıtmaktadır. Ayrıca MCT uygulamasının, akciğerde RhoA, ROCK1, ROCK2, CyPA ve Bsg protein düzeyini artırdığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada emetin Sugen/hipoksi sıçan PAH modelindeki terapötik etkisi de incelenmiştir. VEGF reseptör inhibitörü SU5416 (20 mg/kg, tek doz, sc) uygulamasının ardından 3 hafta hipoksik ortamda (%10 O₂) barındırılan sıçanlar 6 hafta normoksik (%21 O₂) ortamda tutulduktan sonra 4 hafta boyunca emetin (0,05 mg/kg/gün, po) uygulanmıştır. Yapılan ekokardiyografik incelemelerde PAH'lı sıçanlarda RV diyastolik çapında artış gözlenirken; TAPSE ve PAAT'de azalış rapor edilmiştir. PAH'lı sıçanlarda RVSP, mPAP ve total pulmoner rezistans (TPR)'de artış görülürken; CO'da azalma izlenmiştir. RV/(LV+S) oranının ve PA medial duvar kalınlığının arttığı bu sıçanlarda akciğer RhoA, ROCK1, ROCK2, CyPA ve Bsg protein düzeylerinin MCT modeli ile uyumlu şekilde yükseldiği bildirilmiştir (140).

Elias-Al-Mamun ve arkadaşları 6 haftalık 150-170 g Sprague-Dawley erkek sıçanlarda MCT (60 mg/kg tek doz, sc) ile indüklenmiş PAH modelinde fasudil (30 mg/kg/gün), sildenafil (10 mg/kg/gün) ve bunların kombinasyonunun profilaktik ve terapötik etkilerini araştırmışlardır. MCT uygulamasından 3 hafta sonra yapılan ekokardiyografik görüntülemelerde, RV enddiastolik çap (RVEDD) ($p<0,001$) ve RV endsistolik çap (RVESD)'ın ($p<0,001$) kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı bildirilmiş olup bu durum RV dilatasyona işaret etmektedir. RV kontraktilesinin bir ölçüsü olarak kullanılan RV fraksiyonel kısalma değerinin ($p<0,05$) kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir. Profilaksi (3 hafta) ve tedavi protokollerinde (9 hafta) MCT uygulamasından sonraki 3 hafta içerisinde hayvan ölümü görülmezken; 9 hafta içerisinde %79'luk mortalite bildirilmiştir. MCT uygulamasının vücut ağırlığı, su ve gıda alımında anlamlı azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir. MCT uygulamasının RVSP'yi anlamlı şekilde artırırken ($p<0,001$) SAP'ı değiştirmedeği rapor edilmiştir. MCT uygulamasının RV/(LV+S) ile RV/BW oranlarını anlamlı şekilde artırdığı ($p<0,001$) gösterilmiş olup bu durum RVH'ye işaret etmektedir. MCT uygulamasının PA medial duvar kalınlığını anlamlı şekilde artırdığı ($p<0,001$) gösterilmiş olup bu durum pulmoner vasküler remodelingi yansıtmaktadır. Ayrıca MCT uygulamasının, PA

gövdesi (trunk) ($p<0,01$), akciğer ($p<0,001$) ve RV'de ($p<0,001$) Rho kinaz aktivitesinde anlamlı artışa yol açtığı gözlenmiştir (277).

Jasińska-Stroschein ve arkadaşları 8-10 haftalık Wistar erkek sıçanlarda MCT (60 mg/kg tek doz, sc) ile indüklenmiş PAH modelinde fasudil (15 mg/kg/gün, po, 14 gün boyunca), rosuvastatin (10 mg/kg/gün, po, 14 gün boyunca) ve bunların kombinasyonunun terapötik etkilerini araştırmışlardır. Fasudil ve rosuvastatin MCT enjeksiyonundan 14 gün sonra başlanmak üzere 14 gün boyunca uygulanmıştır. Deney süresi boyunca herhangi bir grupta sıçan ölümü görülmemiştir. MCT uygulamasından 28 gün sonra yapılan ölçümlerde, PAH indüklenen sıçanlarda mPAP kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunurken; SAP, MAP ve DAP ile KH'de kontrol grubuna göre anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Ayrıca, PAH indüklenen sıçanlarda RV/(LV+IVS) oranı ile akciğer ROCK aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunduğu; akciğer eNOS konsantrasyonunun ise kontrol grubuna göre düşük bulunduğu bildirilmiştir (278).

Çalışmamızda, MCT'nin akciğer RhoA protein seviyesini (Şekil 4.19) azalttığı bulundu. MEL RhoA düzeyini istatistiksel anlamlılık sınırına yakın şekilde ($p=0,068$) düşürdüğü; ALA ve ALAMEL kombinasyonunun ise RhoA düzeyini değiştirmediği bulundu. Çalışmamızda, MCT'nin akciğer ROCK1 protein seviyesini (Şekil 4.20) değiştirmediği, ALA, MEL ve ALAMEL kombinasyonunun ROCK1 protein seviyesi üzerine etkili olmadığı bulundu. Çalışmamızda, MCT'nin akciğer ROCK2 protein seviyesini (Şekil 4.21) belirgin şekilde azalttığı bulundu. MEL ve ALAMEL kombinasyonu ROCK2 seviyesini belirgin şekilde artırırken; ALA etkisiz bulundu. MEL'in ROCK2'yi düşürücü etkisinin ALAMEL kombinasyonuna göre daha belirgin oluşu, ALA'nın MEL'in bu etkisini antagonize etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, MCT'nin akciğer siklofilin A protein seviyelerini (Şekil 4.18) azalttığı bulundu. Her ne kadar herhangi bir tedavi grubunda siklofilin A değeri farklı olmasa da ALA ve ALAMEL gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük siklofilin A düzeyi varken MEL grubunun kontrol grubuna benzer bulunması dikkat çekicidir. Bu durum, istatistiksel olarak anlamlı değilse de MEL'in siklofilin A düzeyini artırıcı etkisi olabileceğini düşündürmektedir. ROS üretiminin RhoA/ROCK yolağını aktive ettiği (63, 134-137) ve NOX4'ün pulmoner arteriyel duvarda ROS'un ana kaynağı olduğu (2, 104, 105, 114) düşünüldüğünde, çalışmamızda RhoA/ROCK yolağının aktive olmaması, azalan NOX4 seviyeleri ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, çalışmamızdaki düşük siklofilin A seviyeleri ise siklofilin A sekresyonunun RhoA/ROCK yolağındaki aktivasyona bağlı olması ile açıklanabilir.

MMP'ler, çinko bağımlı bir proteinaz grubudur. Aktivasyonları, amino terminallerinin proteolitik olarak çıkarılmasıyla gerçekleşmektedir. Etkileri, MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP) tarafından inhibe edilir (279). MMP-2 ve MMP-9, sırasıyla 72-kDa jelatinaz A ve 92-kDa jelatinaz B olarak adlandırılırlar ve bazal membranın ana bileşeni olan tip IV kollajeni parçalarlar (280). MMP-2 ve MMP-9 protein seviyelerinin MCT ile indüklenmiş PAH modellerinde arttığı bilinmektedir (281-283). Çalışmamızda, MCT'nin akciğer MMP-2 protein seviyesini (Şekil 4.22) değiştirmediği; ALA ve ALAMEL kombinasyonunun ise MMP-2 seviyesini artırdığı bulundu. ALAMEL kombinasyonu, tek başına ALA'ya göre MMP-2 seviyesini daha fazla artırma eğiliminde bulundu ($p=0,057$). MCT'nin akciğer MMP-9 protein seviyesini (Şekil 4.23) belirgin bir şekilde azalttığı bulundu. ALA ve ALAMEL kombinasyonu MMP-9 düzeyini etkilemezken; MEL'in MMP-9 düzeyini belirgin şekilde artırdığı bulundu. MEL'in MMP-9 düzeyini artırıcı etkisine karşın ALAMEL kombinasyonunun etkisiz kalması, ALA'nın MEL'in bu etkisini antagonize edebilme olasılığını düşündürmektedir.

Kim ve arkadaşları (280), sıçanlarda bleomisin ile indüklenmiş pulmoner fibrozis modelinde, BAL sıvısında MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini ölçmüşlerdir. MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin, hastalığın erken fazında hızla artarak bleomisin uygulamasının 4. gününde pik yaptığını, sonrasında azalarak 28. günde bazal seviyelere indiğini raporlamışlardır. MMP-9 aktivitesindeki azalmanın MMP-2'ye göre çok daha hızlı bir şekilde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, MMP-2 aktivitesi değişmemiş bulunurken MMP-9 aktivitesinin azalmış bulunması bu çalışmanın sonuçlarıyla açıklanabilir. Oggionni ve arkadaşları (284), sıçanlarda bleomisin ile indüklenmiş pulmoner fibrozis modelinde, MMP-2 ve MMP-9 aktiviteleri artarak bleomisin uygulamasının 7. gününde pik yaparken; MMP'lerin doku inhibitörleri olan TIMP1 ve TIMP2 konsantrasyonlarındaki artışın 14. gün belirgileştiği bildirilmiştir. Bu durum, MMP-2 ve MMP-9 ile TIMP1 ve TIMP2'nin pulmoner fibroziste birlikte aktif olduklarını göstermektedir. Bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da hastalığın geç evrelerinde (onarım fazında) belirginleşmesi muhtemel olan TIMP konsantrasyon artışının MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin yüksek bulunmamasını açıklayabileceği düşünülmektedir. Öte yandan bazı veriler, TIMP dışında bazı endojen inhibitör faktörlerin de MMP aktivitesi üzerinde etkili olabileceğine işaret etmektedir. Asghar ve arkadaşları (285), sfingozin 1 fosfatın insan anaplastik tiroit kanser C643 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 ekspresyon, sekresyon ve aktivitelerini azalttığını bildirmişlerdir.

Chen ve arkadaşları (286), sfingozin kinaz 1/sfingozin 1 fosfat yolağının, PAH'ta pulmoner vasküler remodelingde majör rol oynayan PADKH proliferasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Zhai ve arkadaşları (287) da sfingozin 1 fosfatın PADKH proliferasyonunu artırdığını raporlamışlardır. Gairhe ve arkadaşları (288) ise İPAH'lı hastalarda ve PAH indüklenmiş sıçanlarda sfingozin 1 fosfat plazma konsantrasyonunun arttığını raporlamışlardır. Bizim çalışmamızda, MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinde artış bulunmaması, muhtemel sfingozin 1 fosfat artışının inhibitör etkisiyle de açıklanabilir. MMP'lerin bilinenin aksine pulmoner arteriyel remodelinge karşı koruyucu rol oynadığı da ileri sürülmüştür. Vieillard-Baron ve arkadaşları (289) kronik hipoksi ile indüklenen PH sıçan modelinde, akciğer MMP inhibisyonunun daha yüksek pulmoner arteriyel basınç ve daha şiddetli RVH ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla bizim çalışmamızda şiddetli PAH bulgularına rağmen MMP'lerde artış yerine MMP-2'nin değişmeyip MMP-9'un azalması, bahse konu çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

PAH'ta, antioksidan yanıtın ana düzenleyici faktörü olan Nrf2'nin patofizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir. PAH'lı sıçan akciğerinde Nrf2 protein düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Nrf2, hem oksijenaz-1 (HO-1)'i içeren bir dizi antioksidan enzimin ekspresyonunu düzenlemektedir (148). Çalışmamızda MCT'nin akciğer Nrf2 protein seviyesini (Şekil 4.24) belirgin bir şekilde artırdığı bulundu. ALA'nın Nrf2 düzeyini artırdığı, MEL'in Nrf2 düzeyini azalttığı, ALAMEL kombinasyonunun ise Nrf2 düzeyini artırma eğiliminde olduğu bulundu. Veit ve arkadaşları (290), MCT ile PAH indüklenmiş sıçanlara ait PADKH'lerinde Nrf2 ve Nrf2 hedef geni NADPH kinon oksidoredüktaz 1'in ekspresyonlarında artış bildirmişlerdir. Martin ve arkadaşları (291) ise Sugan/hipoksi PAH sıçan modelinde Nrf2 protein seviyesinde artış raporlamışlardır. Ayrıca Lopez-Bernardo ve arkadaşları yüksek derecede sitotoksik bir lipid peroksidasyon ürünü olan 4-hidroksinonenal'in fare kardiyomiyositlerinde Nrf2 ekspresyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Bu veriler, bizim çalışmamızdaki Nrf2 artışını destekler niteliktedir. Çalışmamızdaki Nrf2 artışı, PAH'lı sıçan akciğerinde muhtemel oksidatif strese karşı gelişen bir kompanzasyona bağlanabilir.

ALA'nın vazodilatör, antihipertansif, kardiyoprotektif, antifibrotik, antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve vasküler antiremodeling etkileri deneysel olarak ortaya konmuştur (10, 209-211). de Souza-Neto ve arkadaşları, TAC modeli oluşturulmuş erkek C57BL/6J farelerde, ALA'nın asendan aorta remodelingine karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Farelere, TAC prosedüründen 3 gün önce

başlanarak cerrahi sonrası 14 gün boyunca da devam edecek şekilde 30 µg/kg/gün oral ALA-HPβCD [(2-4 Hidroksipropil)-β-siklodekstrin] uygulanmıştır. TAC cerrahisi yapıp 14 gün sonra sakrifiye edilen farelerde, asendan aortanın lümen çapında, medya tabakası kalınlığında ve toplam vasküler duvar alanında bir artış ile karakterize, pozitif ve hipertrofik bir remodeling tipi indüklenmiştir. ALA, asendan aortanın medya tabakasındaki kalınlık artışını önlemiştir. TAC, asendan aortanın adventisya tabakasındaki hücre dansitesinde önemli bir artışa neden olmuş olup bu etki ALA tarafından önlenmiştir. ALA, asendan aortada TAC'ın indüklediği total kollajen birikimi ve düzensizliği azaltırken TGF-β gen ekspresyonundaki TAC'a bağlı artışı azaltmıştır. ALA böylece TAC ile indüklenen arteriyel remodeling ve vasküler duvar fibrozisini hafifletmiştir. Ek olarak ALA, asendan aortada, kollajen tip III transkriptinin vasküler ekspresyonunda, toplam MMP jelatinolitik aktivitesinde ve MMP-2 protein seviyelerinde azalma sağlamıştır. TAC'ın neden olduğu basınç yükü artışı asendan aorta MrgD reseptör ekspresyonunu etkilemezken ALA, TAC uygulanmış farelerde asendan aorta MrgD reseptör ekspresyonunda artışa yol açmıştır. Ek olarak ALA, asendan aortada AT1R'yi kodlayan gendeki ekspresyon artışını önlemiştir. TAC ve/veya ALA uygulanması plazma ve asendan aortada ölçülen ALA konsantrasyonlarını değiştirmemiştir. Aynı çalışmada, asendan aortada proinflamatuvar ve antiinflamatuvar gen ekspresyonları analiz edilmiştir. TAC; asendan aortada CCL2, TNF-α ve IL-1β proinflamatuvar gen ekspresyonlarını artırmıştır. Oral ALA uygulaması ise görülen bu etkiyi geri çevirmiştir. Ayrıca, MRC1, FIZZ1 ve YM1 antiinflamatuvar gen ekspresyonları TAC prosedüründen etkilenmezken; ALA MRC1 ve FIZZ1 gen ekspresyonlarını artırmıştır. Bahse konu çalışma, ALA'nın asendan aorta üzerindeki antiremodeling, antifibrotik ve antiinflamatuvar etkilerini göstermesi açısından önemlidir (209). Bizim çalışmamızda da bahse konu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu şekilde antiproliferatif, antiremodeling ve antiinflamatuvar etkileri bulundu.

MEL'in PH'ye karşı etkililiği sınırlı sayıda deneysel çalışmada gösterilmiştir. Zhang ve ark (218), MEL'in PAH'a karşı etkililiğini araştıran geniş kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. PAH'lı 15 hastada gündüz serum MEL düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğunu; serum IL-1β seviyesinin ise ters orantılı şekilde yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, MEL'in etkileri MCT ile indüklenen PAH, hipoksi ile indüklenen PH ve Sugen/hipoksi PAH modelini içeren 3 farklı fare PH modelinde incelenmiştir:

- Hipoksi ile indüklenen C57BL/6J fare PH modelinde 2 haftalık oral profilaktik MEL (5-8,75 mg/kg/gün), RVSP, RVH ve remodeling oranını azaltarak PAH gelişimini önlemede etkili bulunmuştur. MEL'in, pulmoner arter duvarında hipoksi kaynaklı kalınlaşmayı ve vasküler remodelingi azalttığını bildirmişlerdir.
- Sugen/hipoksi C57BL/6J fare PAH modelinde MEL'in profilaktik ve terapötik etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Profilaksi modelinde, 3 haftalık 10 mg/kg oral MEL uygulamasının, RVSP, RVH ve remodeling oranını azalttığı bulunmuştur. Terapötik modelde ise, 2 haftalık 10 mg/kg oral MEL tedavisinin RVSP ve remodeling oranını azalttığını göstermişlerdir.
- MCT ile indüklenen C57BL/6J fare PAH modelinde, 4 haftalık 10 mg/kg oral profilaktik MEL uygulamasının, RVSP ve RVH'yi azalttığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada, hipoksinin, endotel geçirgenliğini artırdığı ve endoteli aktive ettiği; bu durumun ise akciğerde makrofaj infiltrasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Hipoksi ile indüklenen inflamazom aktivasyonu (makrofajda) IL-1 β üretiminde aşırı artışla sonuçlanmış olup bu artışın hipoksi ile indüklenen endotelial sızıntıyı daha da belirginleştirdiği rapor edilmiştir. MEL'in endotelial kemokin ve adezyon faktörlerini azaltarak ve membran reseptörleri aracılığıyla makrofajlardaki hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu azaltarak hipoksi ile indüklenen inflamazom aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. MEL'in, akciğerde makrofaj infiltrasyonunu, IL-1 β sekreyonunu ve endotelial sızıntıyı azalttığı gösterilmiştir. MEL, sonuç olarak makrofajlardaki inflamazom inhibisyonu yoluyla PAH'a karşı etkili bulunmuştur.

Maarman ve ark'nın (159) erkek Long Evans sıçanlarında, 80 mg/kg MCT tek sefer sc enjeksiyonuyla oluşturdukları PAH modelinde, 28. günde PAH ve RVH gelişmiştir. MEL 6 mg/kg/gün dozunda içme suyuna katılarak 33 gün (profilaktik; MCT enjeksiyonundan 5 gün önce başlanarak) veya 14 gün (tedavi edici olarak; MCT enjeksiyonundan 14 gün sonra başlanarak) uygulanmıştır. Hemodinamik ölçümler izole kalp perfüzyonu düzeneğinde ex vivo olarak yapılmıştır. Sıçanlar, MCT enjeksiyonundan 28 gün sonra RV hipertrofisi, kardiyak disfonksiyon, plazma oksidatif stresinde artış ve kardiyak interstisyel fibrozis sergilemiştir. 6 mg/kg/gün MEL hem profilaktik hem de tedavi edici olarak verildiğinde PAH'lı sıçanlarda RVH'yi, plazma oksidatif stresini ve kardiyak interstisyel fibrozisi azaltmış ve RV fonksiyonunu iyileştirmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, MCT ile indüklenen PAH modelinde MEL'in antioksidan, antifibrotik ve

kardiyoprotektif etkilerini göstermesi açısından önemlidir. Fakat bu çalışmada, MEL'in PAH hemodinamikleri (in vivo PAP veya RVSP ölçümü veya ekokardiyografik inceleme) üzerindeki etkileri in vivo olarak incelenmemiş olup PAH'lı akciğer histopatolojik olarak değerlendirilmemiştir. Bizim çalışmamızda da MEL'in literatürle uyumlu şekilde antiproliferatif, antiremodeling ve antiinflamatuvar etkileri gözlemlendi.

Ekokardiyografik olarak RV fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla TAPSE ve sağ ventrikül fraksiyone alan değişimi gibi parametrelerin bakılmamış olması, çalışmamızın limitasyonlarından biridir. Bir diğer limitasyon ise hemodinamik olarak PAP yerine PAP'ı yansıtan RVSP ölçümünün yapılmış olması, PVR ve CO gibi parametrelerin ölçülmemiş olmasıdır. ALA ve MEL'in, çalışmamızda bulunan antiproliferatif etkilerinin mekanizmalarını açıklayabilmek için Cyclin-D–CDK4/6, cyclin-E–CDK2, Ras-Raf-MEK-ERK ve PI3K/Akt/mTOR gibi proliferatif sinyal yollarının incelenmesi gerekir. Ayrıca çalışmamızda, akciğerde ADE aktivitesinin ölçülmemiş olması RAS içerisindeki dengeler hakkında fikir yürütmeyi güçleştirmektedir. Akciğer ADE/ADE2 oranının bilinmesi, ALA ve MEL'in ADE/AT1R aksı ile ADE2/Mas reseptör aksı arasındaki denge üzerine olan olası etkilerini anlamak açısından önemlidir. Serum seruloplazmin düzeyinin ölçülmemiş olması da çalışmamızın limitasyonlarından biridir. MPO aktivitesindeki değişimlerin daha iyi anlaşılması açısından serum seruloplazmin düzeyinin bakılması hastalık patogenezi ve verilen tedavi edici ajanların etkililiğini değerlendirebilmek açısından gereklidir. Çalışmamızda akciğer NOX4 aktivitesinin yanısıra H₂O₂ seviyeleri de ölçülerek uyguladığımız tedavi protokollerinin PAP'ı yansıtan RVSP üzerindeki etkileri daha iyi açıklanabilirdi. İnflamasyonun belirgin olduğu bir patoloji olan PAH modelimizde, altta yatan mekanizmaları daha iyi anlamak amacıyla proinflamatuvar belirteçlerden serum IL-1 ve/veya IL-6 ile IL-8 düzeyleri ve antiinflamatuvar sitokinlerden serum IL-10 ve/veya IL-13 düzeyleri ölçülebilirdi. Hastalıkların erken ve geç fazlarında düzeyleri değişebilen MMP2 ve 9 ile beraber endojen MMP inhibitörleri olan sfingozin 1 fosfat ve TIMP'lerin seviyeleri de ölçülebilirdi.

Çalışmamızın bulguları bir bütün olarak değerlendirildiğinde ALA, MEL ve ALAMEL kombinasyonunun PAH gelişimini azalttığı tespit edilmiş olup MEL'in ALA'ya göre PAH'ı önlemede daha etkili olduğu sonucuna varıldı. Ek olarak, ALAMEL kombinasyonunun monoterapilere herhangi bir üstünlük sağlamadığı söylenebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Daha önce yapılan çalışmalarla (292, 293) RAS'ın proktetik koluna ait Ang 1-7/Mas reseptör yolağı aktivasyonunun PAH'taki faydalı etkileri raporlansa da bu kola ait bir diğer yolak olan ALA/MrgD reseptör aksının etkilerinin araştırılmadığı bilinmektedir. MEL'in PAH'a karşı etkililiğı sınırlı sayıda deneysel çalışmada gösterilirken; bu sayı MCT ile oluşturulmuş sıçan PAH modelinde daha da azdır. Çalışmamızda, tek başına MEL'in PAP'ı yansıtan RVSP'yi anlamlılık sınırına yakın şekilde azalttığı bulundu. Histopatolojik olarak, ALA, MEL ve ALAMEL kombinasyonunun antiproliferatif ve antiremodeling etkileriyle pulmoner arteriyel duvar kalınlığını ve antiinflamatuvar etkileriyle inflamasyonu azaltarak PAH gelişimini azalttığı bulundu. ALA ve MEL antiproliferatif ve antiremodeling etkileri açısından benzer iken; akciğerdeki antiinflamatuvar etki açısından MEL; ALA'ya üstün bulundu. Ayrıca, çalışmamızda tüm tedavi modalitelerinin LOX aktivitesini azalttığı; MEL'in ALA'ya göre daha belirgin inhibisyon yaptığı bulundu. Bu bağlamda, ALA ve özellikle de MEL'in LOX aktivitesinin inhibisyonu üzerinden pulmoner arteriyollerde ECM remodelingini azaltmış ve bu şekilde PAH gelişimini önlemiş olabileceğı tahmin edilmektedir. ALAMEL kombinasyonunun tek başına ALA veya MEL'e akciğerde antiproliferatif, antiremodeling ve antiinflamatuvar etkileri açısından ek bir faydasının olmadığı bulundu. Burdan hareketle MEL'in hem hemodinamik hem de histopatolojik düzeyde; ALA ve ALAMEL kombinasyonunun ise hemodinamik düzeyde olmasa da histopatolojik olarak PAH gelişimini azalttığı sonucuna varılabilir.

Çalışmamızda ayrıca, MEL'in PAH'ın bir komplikasyonu olan RVH'yi de azalttığı bulundu. Bu etkisinin antiinflamatuvar etkiden bağımsız bir şekilde gerçekleşmiş olabileceğı düşünülmektedir. ALA ve ALAMEL ise RV'de antiinflamatuvar etkili bulunurken; RVH'yi azaltmadıkları bulundu.

Çalışmamızda 35 gün boyunca günde 1 kez 10 mg/kg dozunda ip yolla uygulanan MEL'in PAP'ı yansıtan RVSP'yi istatistiksel anlamlılık sınırına yakın şekilde düşürdüğü görülmekle beraber bundan sonra yapılacak çalışmalarda daha yüksek doz ve/veya daha uzun süre MEL uygulanması bu düşüşün istatistiksel anlamlılık derecesine ulaşmasını sağlayabilecektir. Bunun yanısıra MEL'in PAH üzerindeki doz bağımlı etkilerinin tespiti amacıyla yeni çalışmalar planlanabilir. Ayrıca, 35 gün boyunca günde

1 kez 50 µg/kg/gün dozunda ip yolla uygulanan ALA'nın RVSP'yi düşürmemesine rağmen PAH gelişimini histopatolojik düzeyde azaltması umut vericidir. İleride yapılacak çalışmalarda ALA'nın daha yüksek doz ve/veya daha uzun süre kullanımı ile PAH gelişiminin hemodinamik düzeyde de azalabileceği düşünülmektedir. Bazı bulgularımız MEL ve ALA'nın birbirlerinin etkilerini antagonize etmiş olabileceğine işaret etmektedir. Bundan sonra, bu olası durumu aydınlatmaya yönelik ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Sonuç olarak hem ALA hem de MEL'in tek başına ve kombine kullanımlarında PAH gelişimini azalttığı; fakat MEL'in ALA'ya kıyasla daha etkili olduğu bulundu. Ayrıca, ALAMEL kombinasyonunun monoterapilere bir üstünlük sağlamadığı söylenebilir. Bu alanda ALA ve MEL ile yapılan çok az sayıda çalışma olduğundan, sonuçlarımızı destekleyecek iyi dizayn edilmiş deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Parlakpınar H, Polat S, Acet HA. Pharmacological agents under investigation in the treatment of coronavirus disease 2019 and the importance of melatonin. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2021;35(1):62-75.
2. Freund-Michel V, Guibert C, Dubois M, Courtois A, Marthan R, Savineau JP, et al. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Ther Adv Respir Dis*. 2013;7(3):175-200.
3. Xue C, Sowden MP, Berk BC. Extracellular and Intracellular Cyclophilin A, Native and Post-Translationally Modified, Show Diverse and Specific Pathological Roles in Diseases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(5):986-93.
4. Hilal-Dandan R. Renin and Angiotensin. In: Laurence L. Brunton RH-D, Björn C. Knollmann, editor. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. Thirteenth Edition ed. New York: McGraw-Hill; 2018. p. 471-88.
5. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016;37(1):67-119.
6. Simonneau G, Hoeper MM. The revised definition of pulmonary hypertension: exploring the impact on patient management. *European heart journal supplements : journal of the European Society of Cardiology*. 2019;21(Suppl K):K4-k8.
7. Dustin R. Fraidenburg AAD, and Jason X.-J. Yuan. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. In: Laurence L. Brunton RH-DaBCK, editor. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. Thirteenth Edition ed. New York: McGraw-Hill; 2018. p. 573-84.
8. Maarman GJ. Natural Antioxidants as Potential Therapy, and a Promising Role for Melatonin Against Pulmonary Hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2017;967:161-78.

9. Jin H, Wang Y, Zhou L, Liu L, Zhang P, Deng W, et al. Melatonin attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting the inflammation and the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of pineal research*. 2014;57(4):442-50.
10. Schleifenbaum J. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:107.
11. Baker J, Kimpinski K. Role of melatonin in blood pressure regulation: An adjunct anti-hypertensive agent. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(8):755-66.
12. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 2019;53(1).
13. Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(1 Suppl):S55-s66.
14. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *The European respiratory journal*. 2009;34(4):888-94.
15. Assad TR, Maron BA, Robbins IM, Xu M, Huang S, Harrell FE, et al. Prognostic Effect and Longitudinal Hemodynamic Assessment of Borderline Pulmonary Hypertension. *JAMA cardiology*. 2017;2(12):1361-8.
16. Kovacs G, Avian A, Tscherner M, Foris V, Bachmaier G, Olschewski A, et al. Characterization of patients with borderline pulmonary arterial pressure. *Chest*. 2014;146(6):1486-93.
17. Maron BA, Hess E, Maddox TM, Opatowsky AR, Tedford RJ, Lahm T, et al. Association of Borderline Pulmonary Hypertension With Mortality and Hospitalization in a Large Patient Cohort: Insights From the Veterans Affairs Clinical Assessment, Reporting, and Tracking Program. *Circulation*. 2016;133(13):1240-8.
18. Heresi GA, Minai OA, Tonelli AR, Hammel JP, Farha S, Parambil JG, et al. Clinical characterization and survival of patients with borderline elevation in pulmonary artery pressure. *Pulmonary circulation*. 2013;3(4):916-25.

19. Valerio CJ, Schreiber BE, Handler CE, Denton CP, Coghlan JG. Borderline mean pulmonary artery pressure in patients with systemic sclerosis: transpulmonary gradient predicts risk of developing pulmonary hypertension. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(4):1074-84.
20. Coghlan JG, Wolf M, Distler O, Denton CP, Doelberg M, Harutyunova S, et al. Incidence of pulmonary hypertension and determining factors in patients with systemic sclerosis. *The European respiratory journal*. 2018;51(4).
21. Kiely DG, Lawrie A, Humbert M. Screening strategies for pulmonary arterial hypertension. *European heart journal supplements : journal of the European Society of Cardiology*. 2019;21(Suppl K):K9-k20.
22. Hoffmann-Vold AM, Fretheim H, Midtvedt Ø, Kilian K, Angelshaug M, Chaudhary A, et al. Frequencies of borderline pulmonary hypertension before and after the DETECT algorithm: results from a prospective systemic sclerosis cohort. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2018;57(3):480-7.
23. Coghlan JG, Denton CP, Grünig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1340-9.
24. Bonderman D, Wexberg P, Martischnig AM, Heinzl H, Lang MB, Sadushi R, et al. A noninvasive algorithm to exclude pre-capillary pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 2011;37(5):1096-103.
25. Rich JD, Thenappan T, Freed B, Patel AR, Thisted RA, Childers R, et al. QTc prolongation is associated with impaired right ventricular function and predicts mortality in pulmonary hypertension. *International journal of cardiology*. 2013;167(3):669-76.
26. Sun PY, Jiang X, Gomberg-Maitland M, Zhao QH, He J, Yuan P, et al. Prolonged QRS duration: a new predictor of adverse outcome in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012;141(2):374-80.
27. Olsson KM, Nickel NP, Tongers J, Hoeper MM. Atrial flutter and fibrillation in patients with pulmonary hypertension. *International journal of cardiology*. 2013;167(5):2300-5.

28. Kovacs G, Dumitrescu D, Barner A, Greiner S, Grünig E, Hager A, et al. Definition, clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: Updated recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018. *International journal of cardiology*. 2018;272s:11-9.
29. Fisher MR, Criner GJ, Fishman AP, Hassoun PM, Minai OA, Scharf SM, et al. Estimating pulmonary artery pressures by echocardiography in patients with emphysema. *The European respiratory journal*. 2007;30(5):914-21.
30. D'Andrea A, Naeije R, Grünig E, Caso P, D'Alto M, Di Palma E, et al. Echocardiography of the pulmonary circulation and right ventricular function: exploring the physiologic spectrum in 1,480 normal subjects. *Chest*. 2014;145(5):1071-8.
31. Grünig E, Henn P, D'Andrea A, Claussen M, Ehlken N, Maier F, et al. Reference values for and determinants of right atrial area in healthy adults by 2-dimensional echocardiography. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013;6(1):117-24.
32. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28(1):1-39.e14.
33. Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T, Champion HC, Girgis RE, et al. Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;179(7):615-21.
34. Kittipovanonth M, Bellavia D, Chandrasekaran K, Villarraga HR, Abraham TP, Pellikka PA. Doppler myocardial imaging for early detection of right ventricular dysfunction in patients with pulmonary hypertension. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008;21(9):1035-41.
35. Sachdev A, Villarraga HR, Frantz RP, McGoon MD, Hsiao JF, Maalouf JF, et al. Right ventricular strain for prediction of survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2011;139(6):1299-309.

36. Haeck ML, Scherptong RW, Marsan NA, Holman ER, SchaliJ MJ, Bax JJ, et al. Prognostic value of right ventricular longitudinal peak systolic strain in patients with pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2012;5(5):628-36.
37. Meyer FJ, Lossnitzer D, Kristen AV, Schoene AM, Kübler W, Katus HA, et al. Respiratory muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2005;25(1):125-30.
38. Truong QA, Massaro JM, Rogers IS, Mahabadi AA, Kriegel MF, Fox CS, et al. Reference values for normal pulmonary artery dimensions by noncontrast cardiac computed tomography: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2012;5(1):147-54.
39. Dornia C, Lange TJ, Behrens G, Stiefel J, Müller-Wille R, Poschenrieder F, et al. Multidetector computed tomography for detection and characterization of pulmonary hypertension in consideration of WHO classification. *J Comput Assist Tomogr*. 2012;36(2):175-80.
40. Ng CS, Wells AU, Padley SP. A CT sign of chronic pulmonary arterial hypertension: the ratio of main pulmonary artery to aortic diameter. *J Thorac Imaging*. 1999;14(4):270-8.
41. Hoeper MM, Lee SH, Voswinckel R, Palazzini M, Jais X, Marinelli A, et al. Complications of right heart catheterization procedures in patients with pulmonary hypertension in experienced centers. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(12):2546-52.
42. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(9):1023-30.
43. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2007;30(1):104-9.
44. McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D51-9.

45. Prins KW, Thenappan T. World Health Organization Group I Pulmonary Hypertension: Epidemiology and Pathophysiology. *Cardiol Clin*. 2016;34(3):363-74.
46. Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grünig E, Aldred M, Geraci M, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D13-21.
47. Best DH, Austin ED, Chung WK, Elliott CG. Genetics of pulmonary hypertension. *Curr Opin Cardiol*. 2014;29(6):520-7.
48. Abdalla SA, Gallione CJ, Barst RJ, Horn EM, Knowles JA, Marchuk DA, et al. Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *The European respiratory journal*. 2004;23(3):373-7.
49. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, et al. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 2003;40(12):865-71.
50. Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, 3rd, et al. Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(3):336-43.
51. Ma L, Chung WK. The genetic basis of pulmonary arterial hypertension. *Hum Genet*. 2014;133(5):471-9.
52. Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation*. 1958;18(4 Part 1):533-47.
53. Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol*. 2010;2(10):316-24.
54. Dustin R. Fraidenburg AAD, and Jason X.-J. Yuan. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. 2018. In: Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [Internet]. McGraw-Hill Education. 13. [573-84].

55. Reddy S, Bernstein D. Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure. *Circulation*. 2015;132(18):1734-42.
56. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D22-33.
57. Tedford RJ, Mudd JO, Girgis RE, Mathai SC, Zaiman AL, Houston-Harris T, et al. Right ventricular dysfunction in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Circulation Heart failure*. 2013;6(5):953-63.
58. Piao L, Fang YH, Parikh KS, Ryan JJ, D'Souza KM, Theccanat T, et al. GRK2-mediated inhibition of adrenergic and dopaminergic signaling in right ventricular hypertrophy: therapeutic implications in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2012;126(24):2859-69.
59. Drake JI, Gomez-Arroyo J, Dumur CI, Kraskauskas D, Natarajan R, Bogaard HJ, et al. Chronic carvedilol treatment partially reverses the right ventricular failure transcriptional profile in experimental pulmonary hypertension. *Physiological genomics*. 2013;45(12):449-61.
60. Crosswhite P, Sun Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Journal of hypertension*. 2010;28(2):201-12.
61. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2004;351(16):1655-65.
62. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12 Suppl S):13s-24s.
63. Connolly MJ, Aaronson PI. Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24(1):1-14.
64. Guibert C, Marthan R, Savineau JP. Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Curr Pharm Des*. 2007;13(24):2443-55.
65. Rhodes CJ, Davidson A, Gibbs JS, Wharton J, Wilkins MR. Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther*. 2009;121(1):69-88.

66. Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, McCready L, Keeley FW, Rabinovitch M. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(1):213-23.
67. Ilkiw R, Todorovich-Hunter L, Maruyama K, Shin J, Rabinovitch M. SC-39026, a serine elastase inhibitor, prevents muscularization of peripheral arteries, suggesting a mechanism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation research*. 1989;64(4):814-25.
68. Ye CL, Rabinovitch M. Inhibition of elastolysis by SC-37698 reduces development and progression of monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1991;261(4 Pt 2):H1255-67.
69. Nave AH, Mižíková I, Niess G, Steenbock H, Reichenberger F, Talavera ML, et al. Lysyl oxidases play a causal role in vascular remodeling in clinical and experimental pulmonary arterial hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(7):1446-58.
70. Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(1 Suppl):S10-s9.
71. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(5):1628-31.
72. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010;122(9):920-7.
73. Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, et al. Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. 2009;10(1):1-13.
74. Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circulation research*. 2009;104(2):236-44, 28p following 44.

75. Taniguchi K, Shimazaki C, Fujimoto Y, Shimura K, Uchiyama H, Matsumoto Y, et al. Tocilizumab is effective for pulmonary hypertension associated with multicentric Castleman's disease. *International journal of hematology*. 2009;90(1):99-102.
76. Arita Y, Sakata Y, Sudo T, Maeda T, Matsuoka K, Tamai K, et al. The efficacy of tocilizumab in a patient with pulmonary arterial hypertension associated with Castleman's disease. *Heart and vessels*. 2010;25(5):444-7.
77. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circulation research*. 2014;115(1):176-88.
78. Piao L, Fang YH, Parikh K, Ryan JJ, Toth PT, Archer SL. Cardiac glutaminolysis: a maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(10):1185-97.
79. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, et al. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circulation research*. 2004;95(8):830-40.
80. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, et al. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation*. 2002;105(2):244-50.
81. Fang YH, Piao L, Hong Z, Toth PT, Marsboom G, Bache-Wiig P, et al. Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(1):31-43.
82. van Wolferen SA, Marcus JT, Westerhof N, Spreeuwenberg MD, Marques KM, Bronzwaer JG, et al. Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2008;29(1):120-7.
83. Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation*. 2009;120(20):1951-60.

84. Moon MR, Aziz A, Lee AM, Moon CJ, Okada S, Kanter EM, et al. Differential calcium handling in two canine models of right ventricular pressure overload. *J Surg Res.* 2012;178(2):554-62.
85. Kögler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen van P, Schott P, Brodde OE, et al. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circulation research.* 2003;93(3):230-7.
86. Xie YP, Chen B, Sanders P, Guo A, Li Y, Zimmerman K, et al. Sildenafil prevents and reverses transverse-tubule remodeling and Ca(2+) handling dysfunction in right ventricle failure induced by pulmonary artery hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979).* 2012;59(2):355-62.
87. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *The Journal of clinical investigation.* 1997;100(9):2315-24.
88. Herron TJ, McDonald KS. Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. *Circulation research.* 2002;90(11):1150-2.
89. Bakerman PR, Stenmark KR, Fisher JH. Alpha-skeletal actin messenger RNA increases in acute right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol.* 1990;258(4 Pt 1):L173-8.
90. Tsutsui H, Ishihara K, Cooper Gt. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science.* 1993;260(5108):682-7.
91. Tsutsui H, Tagawa H, Kent RL, McCollam PL, Ishihara K, Nagatsu M, et al. Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes. *Circulation.* 1994;90(1):533-55.
92. Stones R, Benoist D, Peckham M, White E. Microtubule proliferation in right ventricular myocytes of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;56:91-6.
93. Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA. The sources of oxidative stress in the vessel wall. *Kidney Int.* 2005;67(5):1659-61.

94. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept.* 2000;91(1-3):21-7.
95. Mohazzab KM, Wolin MS. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol.* 1994;267(6 Pt 1):L815-22.
96. Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei D, et al. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(8):3362-6.
97. Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US, Michael JR, Hoidal JR. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *The Journal of clinical investigation.* 1992;89(1):197-202.
98. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, et al. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2007;27(4):943-8.
99. Chalupsky K, Cai H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(25):9056-61.
100. Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, Oishi P, Azakie A, Fineman JR, et al. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2006;290(6):L1069-77.
101. Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol.* 2004;165(1):219-26.

102. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285(6):H2290-7.
103. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(10):2175-83.
104. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(5):R1014-30.
105. Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:269-80.
106. Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(2):122-7.
107. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine*. 2010;49(5):687-706.
108. Jagnandan D, Church JE, Banfi B, Stuehr DJ, Marrero MB, Fulton DJ. Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(9):6494-507.
109. Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(8):1903-11.
110. Griffith B, Pendyala S, Hecker L, Lee PJ, Natarajan V, Thannickal VJ. NOX enzymes and pulmonary disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(10):2505-16.
111. Haurani MJ, Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovascular research*. 2007;75(4):679-89.

112. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular research*. 2005;65(1):16-27.
113. Mittal M, Roth M, König P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, et al. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circulation research*. 2007;101(3):258-67.
114. Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Moreno L. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;174(3):212-20.
115. Nisbet RE, Graves AS, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Reed AL, Fan TH, et al. The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;40(5):601-9.
116. Li S, Tabar SS, Malec V, Eul BG, Klepetko W, Weissmann N, et al. NOX4 regulates ROS levels under normoxic and hypoxic conditions, triggers proliferation, and inhibits apoptosis in pulmonary artery adventitial fibroblasts. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(10):1687-98.
117. Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium*. 2004;11(2):89-97.
118. Nie H, Wu JL, Zhang M, Xu J, Zou MH. Endothelial nitric oxide synthase-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in diabetes in vivo. *Diabetes*. 2006;55(11):3133-41.
119. Frazziano G, Champion HC, Pagano PJ. NADPH oxidase-derived ROS and the regulation of pulmonary vessel tone. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(11):H2166-77.
120. Wedgwood S, Dettman RW, Black SM. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281(5):L1058-67.
121. Wedgwood S, Black SM. Role of reactive oxygen species in vascular remodeling associated with pulmonary hypertension. *Antioxidants & redox signaling*. 2003;5(6):759-69.

122. Wedgwood S, Black SM. Combined superoxide dismutase/catalase mimetics alter fetal pulmonary arterial smooth muscle cell growth. *Antioxidants & redox signaling*. 2004;6(1):191-7.
123. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1994;74(6):1141-8.
124. Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation*. 1997;96(7):2361-7.
125. Ismail S, Sturrock A, Wu P, Cahill B, Norman K, Huecksteadt T, et al. NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296(3):L489-99.
126. Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, et al. Transforming growth factor- β 1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(4):L661-173.
127. Browning EA, Chatterjee S, Fisher AB. Stop the flow: a paradigm for cell signaling mediated by reactive oxygen species in the pulmonary endothelium. *Annual review of physiology*. 2012;74:403-24.
128. Milovanova T, Chatterjee S, Manevich Y, Kotelnikova I, Debolt K, Madesh M, et al. Lung endothelial cell proliferation with decreased shear stress is mediated by reactive oxygen species. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;290(1):C66-76.
129. Milovanova T, Manevich Y, Haddad A, Chatterjee S, Moore JS, Fisher AB. Endothelial cell proliferation associated with abrupt reduction in shear stress is dependent on reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*. 2004;6(2):245-58.

130. Nijmeh J, Moldobaeva A, Wagner EM. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;299(4):L535-41.
131. Han YH, Moon HJ, You BR, Kim SZ, Kim SH, Park WH. Pyrogallol-induced endothelial cell death is related to GSH depletion rather than ROS level changes. *Oncology reports*. 2010;23(1):287-92.
132. Loirand G, Guérin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circulation research*. 2006;98(3):322-34.
133. Resta TC, Broughton BR, Jernigan NL. Reactive oxygen species and RhoA signaling in vascular smooth muscle: role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2010;661:355-73.
134. Oka M, Fagan KA, Jones PL, McMurtry IF. Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*. 2008;155(4):444-54.
135. Broughton BR, Jernigan NL, Norton CE, Walker BR, Resta TC. Chronic hypoxia augments depolarization-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle through superoxide-dependent stimulation of RhoA. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;298(2):L232-42.
136. Jernigan NL, Walker BR, Resta TC. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(3):L515-29.
137. Knock GA, Snetkov VA, Shaifta Y, Connolly M, Drndarski S, Noah A, et al. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(5):633-42.
138. Chi AY, Waypa GB, Mungai PT, Schumacker PT. Prolonged hypoxia increases ROS signaling and RhoA activation in pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12(5):603-10.
139. Knock GA, Ward JP. Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1531-47.

140. Siddique MAH, Satoh K, Kurosawa R, Kikuchi N, Elias-Al-Mamun M, Omura J, et al. Identification of Emetine as a Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension: Novel Effects of an Old Drug. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2019;39(11):2367-85.
141. Pichardo J, Palace V, Farahmand F, Singal PK. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol Cell Biochem*. 1999;196(1-2):51-7.
142. Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem*. 2004;260(1-2):21-9.
143. Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Koide S, Nakata S, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(2):219-26.
144. Mathew R, Yuan N, Rosenfeld L, Gewitz MH, Kumar A. Effects of monocrotaline on endothelial nitric oxide synthase expression and sulfhydryl levels in rat lungs. *Heart Dis*. 2002;4(3):152-8.
145. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, et al. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2009;54(3):668-75.
146. Redout EM, van der Toorn A, Zuidwijk MJ, van de Kolk CW, van Echteld CJ, Musters RJ, et al. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(3):H1038-47.
147. Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJ, van Hardeveld C, et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovascular research*. 2007;75(4):770-81.
148. Chen Y, Yuan T, Zhang H, Yan Y, Wang D, Fang L, et al. Activation of Nrf2 Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling via Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition: an Insight from a Plant Polyphenol. *International journal of biological sciences*. 2017;13(8):1067-81.

149. Lehman-McKeeman LD. Mechanisms of Toxicity. In: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's TOXICOLOGY The Basic Science of Poisons. 9 ed: McGraw-Hill Education; 2019. p. 110.
150. Spiekermann S, Schenk K, Hoeper MM. Increased xanthine oxidase activity in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2009;34(1):276.
151. Zhang R, Wang L, Zhao QH, Jiang R, Gong SG, Jiang X, et al. Alteration of Extracellular Superoxide Dismutase in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:509.
152. Smukowska-Gorynia A, Rzymiski P, Marcinkowska J, Poniedziałek B, Komosa A, Cieslewicz A, et al. Prognostic Value of Oxidative Stress Markers in Patients with Pulmonary Arterial or Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019:3795320.
153. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, et al. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(6):764-9.
154. Dai HL, Guo Y, Guang XF, Xiao ZC, Zhang M, Yin XL. The changes of serum angiotensin-converting enzyme 2 in patients with pulmonary arterial hypertension due to congenital heart disease. *Cardiology*. 2013;124(4):208-12.
155. Dang Z, Su S, Jin G, Nan X, Ma L, Li Z, et al. Tsantan Sumtang attenuated chronic hypoxia-induced right ventricular structure remodeling and fibrosis by equilibrating local ACE-AngII-AT1R/ACE2-Ang1-7-Mas axis in rat. *Journal of ethnopharmacology*. 2020;250:112470.
156. Zhang R, Su H, Ma X, Xu X, Liang L, Ma G, et al. MiRNA let-7b promotes the development of hypoxic pulmonary hypertension by targeting ACE2. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2019;316(3):L547-l57.
157. Yamazato Y, Ferreira AJ, Hong KH, Sriramula S, Francis J, Yamazato M, et al. Prevention of pulmonary hypertension by Angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2009;54(2):365-71.

158. Sirmagul B, Ilgin S, Atli O, Usanmaz SE, Demirel-Yilmaz E. Assessment of the endothelial functions in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Clinical and experimental hypertension* (New York, NY : 1993). 2013;35(3):220-7.
159. Maarman G, Blackhurst D, Thienemann F, Blauwet L, Butrous G, Davies N, et al. Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension. *Journal of pineal research*. 2015;59(3):343-53.
160. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res*. 1989;38(1):57-80.
161. Meyrick B, Reid L. Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. *Am J Pathol*. 1979;94(1):37-50.
162. Hess P, Clozel M, Clozel JP. Telemetry monitoring of pulmonary arterial pressure in freely moving rats. *J Appl Physiol* (1985). 1996;81(2):1027-32.
163. Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 1984;70(4):580-7.
164. Herve P, Humbert M, Sitbon O, Parent F, Nunes H, Legal C, et al. Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clin Chest Med*. 2001;22(3):451-8.
165. Hoeper MM, Sosada M, Fabel H. Plasma coagulation profiles in patients with severe primary pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 1998;12(6):1446-9.
166. Huber K, Beckmann R, Frank H, Kneussl M, Mlczoch J, Binder BR. Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;150(4):929-33.
167. Sandoval J, Aguirre JS, Pulido T, Martinez-Guerra ML, Santos E, Alvarado P, et al. Nocturnal oxygen therapy in patients with the Eisenmenger syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(9):1682-7.
168. Rich S, Seidlitz M, Dodin E, Osimani D, Judd D, Genthner D, et al. The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension. *Chest*. 1998;114(3):787-92.

169. Ruiter G, Lankhorst S, Boonstra A, Postmus PE, Zweegman S, Westerhof N, et al. Iron deficiency is common in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2011;37(6):1386-91.
170. Ruiter G, Lanser IJ, de Man FS, van der Laarse WJ, Wharton J, Wilkins MR, et al. Iron deficiency in systemic sclerosis patients with and without pulmonary hypertension. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(2):285-92.
171. Broberg CS, Bax BE, Okonko DO, Rampling MW, Bayne S, Harries C, et al. Blood viscosity and its relationship to iron deficiency, symptoms, and exercise capacity in adults with cyanotic congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(2):356-65.
172. Rhodes CJ, Howard LS, Busbridge M, Ashby D, Kondili E, Gibbs JS, et al. Iron deficiency and raised hepcidin in idiopathic pulmonary arterial hypertension: clinical prevalence, outcomes, and mechanistic insights. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(3):300-9.
173. Van De Bruaene A, Delcroix M, Pasquet A, De Backer J, De Pauw M, Naeije R, et al. Iron deficiency is associated with adverse outcome in Eisenmenger patients. *Eur Heart J*. 2011;32(22):2790-9.
174. Viethen T, Gerhardt F, Dumitrescu D, Knoop-Busch S, ten Freyhaus H, Rudolph TK, et al. Ferric carboxymaltose improves exercise capacity and quality of life in patients with pulmonary arterial hypertension and iron deficiency: a pilot study. *International journal of cardiology*. 2014;175(2):233-9.
175. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1992;327(2):76-81.
176. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111(23):3105-11.
177. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1993;328(24):1732-9.

178. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Annals of internal medicine*. 1991;114(6):464-9.
179. Galié N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular research*. 2004;61(2):227-37.
180. Wu W, Platoshyn O, Firth AL, Yuan JX. Hypoxia divergently regulates production of reactive oxygen species in human pulmonary and coronary artery smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(4):L952-9.
181. Wharton J, Strange JW, Møller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(1):105-13.
182. Tantini B, Manes A, Fiumana E, Pignatti C, Guarnieri C, Zannoli R, et al. Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*. 2005;100(2):131-8.
183. Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadaş B, et al. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(7):1488-96.
184. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1995;333(4):214-21.
185. Ghofrani HA, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing ZC, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2013;369(4):330-40.
186. Galiè N, Müller K, Scalise AV, Grünig E. PATENT PLUS: a blinded, randomised and extension study of riociguat plus sildenafil in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2015;45(5):1314-22.

187. Galiè N, Manes A, Branzi A. Prostanoids for Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory Medicine*. 2003;2(2):123-37.
188. Galiè N, Humbert M, Vachiéry JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, et al. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(9):1496-502.
189. Barst RJ, McGoon M, McLaughlin V, Tapson V, Rich S, Rubin L, et al. Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(12):2119-25.
190. Sitbon O, Humbert M, Nunes H, Parent F, Garcia G, Hervé P, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(4):780-8.
191. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation*. 2002;106(12):1477-82.
192. Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 2002;347(5):322-9.
193. Ewert R, Gläser S, Bollmann T, Schäper C. Inhaled iloprost for therapy in pulmonary arterial hypertension. *Expert review of respiratory medicine*. 2011;5(2):145-52.
194. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, et al. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;165(6):800-4.
195. Tapson VF, Gombert-Maitland M, McLaughlin VV, Benza RL, Widlitz AC, Krichman A, et al. Safety and efficacy of IV treprostinil for pulmonary arterial hypertension: a prospective, multicenter, open-label, 12-week trial. *Chest*. 2006;129(3):683-8.

196. Sitbon O, Manes A, Jais X, Palladini M, Humbert M, Presotto L, et al. Rapid switch from intravenous epoprostenol to intravenous treprostinil in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49(1):1-5.
197. Simonneau G, Torbicki A, Hoeper MM, Delcroix M, Karlócai K, Galiè N, et al. Selexipag: an oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2012;40(4):874-80.
198. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation research*. 2013;112(8):1104-11.
199. Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
200. Qaradakh T, Apostolopoulos V, Zulli A. Angiotensin (1-7) and Alamandine: Similarities and differences. *Pharmacol Res*. 2016;111:820-6.
201. Liu Q, Zheng B, Zhang Y, Huang W, Hong Q, Meng Y. Alamandine via MrgD receptor attenuates pulmonary fibrosis via NOX4 and autophagy pathway. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2021:1-9.
202. Nishimura S, Uno M, Kaneta Y, Fukuchi K, Nishigohri H, Hasegawa J, et al. MRGD, a MAS-related G-protein coupled receptor, promotes tumorigenesis and is highly expressed in lung cancer. *PloS one*. 2012;7(6):e38618.
203. Li Z, Xie Y, Zhong T, Zhang X, Dang Y, Gan T, et al. Expression and clinical contribution of MRGD mRNA in non-small cell lung cancers. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2015;20(4):1101-6.
204. Habiyakare B, Alsaadon H, Mathai ML, Hayes A, Zulli A. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *Int J Exp Pathol*. 2014;95(4):290-5.
205. Soltani Hekmat A, Javanmardi K, Kouhpayeh A, Baharamali E, Farjam M. Differences in Cardiovascular Responses to Alamandine in Two-Kidney, One Clip Hypertensive and Normotensive Rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2017;81(3):405-12.

206. Uchiyama T, Okajima F, Mogi C, Tobo A, Tomono S, Sato K. Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue. *PloS one*. 2017;12(6):e0178769.
207. Da Silva AR, Lenglet S, Carbone F, Burger F, Roth A, Liberale L, et al. Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. *Eur J Clin Invest*. 2017;47(2):117-28.
208. Oliveira AC, Melo MB, Motta-Santos D, Peluso AA, Souza-Neto F, da Silva RF, et al. Genetic deletion of the alamandine receptor MRGD leads to dilated cardiomyopathy in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2019;316(1):H123-h33.
209. de Souza-Neto FP, Silva MME, Santuchi MC, de Alcântara-Leonídio TC, Motta-Santos D, Oliveira AC, et al. Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(5):629-43.
210. Park BM, Phuong HTA, Yu L, Kim SH. Alamandine Protects the Heart Against Reperfusion Injury via the MrgD Receptor. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2018;82(10):2584-93.
211. Li P, Chen XR, Xu F, Liu C, Li C, Liu H, et al. Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways. *Life sciences*. 2018;206:106-16.
212. Sun H, Gusdon AM, Qu S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Current opinion in lipidology*. 2016;27(4):408-13.
213. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiological research*. 2005;54(5):491-5.
214. Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Urological research*. 2003;31(3):188-93.
215. Kang JW, Lee SM. Melatonin inhibits type 1 interferon signaling of toll-like receptor 4 via heme oxygenase-1 induction in hepatic ischemia/reperfusion. *Journal of pineal research*. 2012;53(1):67-76.

216. Yu L, Liang H, Lu Z, Zhao G, Zhai M, Yang Y, et al. Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vivo and in vitro studies. *Journal of pineal research*. 2015;59(4):420-33.
217. Liu LF, Qin Q, Qian ZH, Shi M, Deng QC, Zhu WP, et al. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion induced myocardial damage and hemodynamic recovery in rats. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2014;18(23):3681-6.
218. Zhang J, Lu X, Liu M, Fan H, Zheng H, Zhang S, et al. Melatonin inhibits inflammasome-associated activation of endothelium and macrophages attenuating pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular research*. 2020;116(13):2156-69.
219. Rey M, Hess P, Clozel M. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension in Wistar rats. *Current protocols in pharmacology*. 2009;Chapter 5:Unit 5.56.
220. Cheng CC, Chi PL, Shen MC, Shu CW, Wann SR, Liu CP, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Rescues Pulmonary Arterial Hypertension through the Inhibition of AKT/ERK-Dependent PDGF/HIF-1 α In Vitro and In Vivo. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(6).
221. Lee Y, Pai SB, Bellamkonda RV, Thompson DH, Singh J. Cerivastatin Nanoliposome as a Potential Disease Modifying Approach for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2018;366(1):66-74.
222. Uzbay T, Parlakpınar H, Akdag E, Celik T, Yararbas G, Ulusoy G, et al. Chronic melatonin treatment reverses disruption of prepulse inhibition in pinealectomized and pinealectomized-plus-ovariectomized rats. *Behavioural brain research*. 2013;239:1-7.
223. Hung MW, Yeung HM, Lau CF, Poon AMS, Tipoe GL, Fung ML. Melatonin Attenuates Pulmonary Hypertension in Chronically Hypoxic Rats. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6).
224. Wang ML, Wei CH, Wang WD, Wang JS, Zhang J, Wang JJ. Melatonin attenuates lung ischaemia-reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2018;26(5):761-7.

225. Soares ER, Barbosa CM, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS, Alzamora AC. Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats. *Peptides*. 2017;96:67-75.
226. Hekmat AS, Zare N, Moravej A, Meshkibaf MH, Javanmardi K. Effect of Prolonged Infusion of Alamandine on Cardiovascular Parameters and Cardiac ACE2 Expression in a Rat Model of Renovascular Hypertension. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2019;42(6):960-7.
227. Wang L, Liu C, Chen X, Li P. Alamandine attenuates long-term hypertension-induced cardiac fibrosis independent of blood pressure. *Molecular medicine reports*. 2019;19(6):4553-60.
228. Galderisi M, Cosyns B, Edvardsen T, Cardim N, Delgado V, Di Salvo G, et al. Standardization of adult transthoracic echocardiography reporting in agreement with recent chamber quantification, diastolic function, and heart valve disease recommendations: an expert consensus document of the European Association of Cardiovascular Imaging. *European heart journal Cardiovascular Imaging*. 2017;18(12):1301-10.
229. Ermis H, Parlakpınar H, Elbe H, Vardi N, Polat A, Gulbas G. Effects of varenicline on lung tissue in the animal model. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2020;46(2):e20180406.
230. Kose A, Parlakpınar H, Ozhan O, Ermis N, Yildiz A, Vardi N, et al. Therapeutic effects of dexpanthenol on the cardiovascular and respiratory systems following cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 2020;95(6):428-37.
231. Selçuk EB, Sungu M, Parlakpınar H, Ermiş N, Taslıdere E, Vardı N, et al. Evaluation of the cardiovascular effects of varenicline in rats. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:5705-17.
232. Hautefort A, Mendes-Ferreira P, Sabourin J, Manaud G, Bertero T, Rucker-Martin C, et al. Bmpr2 Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2019;139(7):932-48.

233. Parlakpınar H, Özhan O, Ermis N, Vardi N, Cigremis Y, Tanrıverdi LH, et al. Acute and Subacute Effects of Low Versus High Doses of Standardized Panax ginseng Extract on the Heart: An Experimental Study. *Cardiovascular toxicology*. 2019;19(4):306-20.
234. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
235. Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Yulug B, et al. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget*. 2015;6(31):30604-14.
236. Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, et al. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox biology*. 2017;12:657-65.
237. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Yoloğlu SJÜSBD. Shiny Paketi ile Kruskal Wallis H Testi için İnteraktif Bir Web Uygulaması. 2018;7:49-55.
238. Lee H, Yeom A, Kim KC, Hong YM. Effect of Ambrisentan Therapy on the Expression of Endothelin Receptor, Endothelial Nitric Oxide Synthase and NADPH Oxidase 4 in Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension Rat Model. *Korean circulation journal*. 2019;49(9):866-76.
239. Wu F, Hao Y, Yang J, Yao W, Xu Y, Yan L, et al. Protective effects of alopurinol on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;89:632-41.
240. Vázquez-Garza E, Bernal-Ramírez J, Jerjes-Sánchez C, Lozano O, Acuña-Morín E, Vanoye-Tamez M, et al. Resveratrol Prevents Right Ventricle Remodeling and Dysfunction in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension with a Limited Improvement in the Lung Vasculature. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020:1841527.

241. de Lima-Seolin BG, Hennemann MM, Fernandes RO, Colombo R, Bonetto JHP, Teixeira RB, et al. Bucindolol attenuates the vascular remodeling of pulmonary arteries by modulating the expression of the endothelin-1 A receptor in rats with pulmonary arterial hypertension. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;99:704-14.
242. Zhu N, Zhao X, Xiang Y, Ye S, Huang J, Hu W, et al. Thymoquinone attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension via inhibiting pulmonary arterial remodeling in rats. *International journal of cardiology*. 2016;221:587-96.
243. Taslidere E, Vardi N, Parlakpınar H, Yıldız A, Taslidere B, Karaaslan MG. Effects of melatonin on acetylsalicylic acid induced gastroduodenal and jejunal mucosal injury. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 2018;93(7):485-95.
244. Altıntaş R, Polat A, Parlakpınar H, Vardi N, Beytut A, Oguz F, et al. The effect of melatonin on acetylsalicylic acid-induced kidney and testis damage. *Human & experimental toxicology*. 2014;33(4):383-95.
245. Tasdemir S, Parlakpınar H, Vardi N, Kaya E, Acet A. Effect of endogen-exogenous melatonin and erythropoietin on dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2013;27(3):299-307.
246. Parlakpınar H, Ozer MK, Sahna E, Vardi N, Cigremis Y, Acet A. Amikacin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. *Journal of pineal research*. 2003;35(2):85-90.
247. Sahna E, Parlakpınar H, Ozer MK, Ozturk F, Ozugurlu F, Acet A. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *Journal of pineal research*. 2003;35(4):257-61.
248. Gewehr DM, Salgueiro GR, Noronha L, Kubrusly FB, Kubrusly LF, Coltro GA, et al. Plexiform Lesions in an Experimental Model of Monocrotalin-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2020;115(3):480-90.

249. Lima-Seolin BG, Colombo R, Bonetto JHP, Teixeira RB, Donatti LM, Casali KR, et al. Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance. *European journal of pharmacology*. 2017;798:57-65.
250. de Carvalho Santuchi M, Dutra MF, Vago JP, Lima KM, Galvão I, de Souza-Neto FP, et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages In Vitro and In Vivo. *Mediators of inflammation*. 2019;2019:2401081.
251. Hekmat AS, Navabi Z, Alipanah H, Javanmardi K. Alamandine significantly reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Human & experimental toxicology*. 2021;40(10):1781-95.
252. Zhu TT, Zhang WF, Luo P, Qian ZX, Li F, Zhang Z, et al. LOX-1 promotes right ventricular hypertrophy in hypoxia-exposed rats. *Life sciences*. 2017;174:35-42.
253. Yu X, Li T, Liu X, Yu H, Hao Z, Chen Y, et al. Modulation of Pulmonary Vascular Remodeling in Hypoxia: Role of 15-LOX-2/15-HETE-MAPKs Pathway. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;35(6):2079-97.
254. Xia XD, Lee J, Khan S, Ye L, Li Y, Dong L. Suppression of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension Through the Downregulation of Lysyl Oxidase. *DNA and cell biology*. 2016;35(10):599-606.
255. Shenoy V, Kwon KC, Rathinasabapathy A, Lin S, Jin G, Song C, et al. Oral delivery of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1-7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2014;64(6):1248-59.
256. Haga S, Tsuchiya H, Hirai T, Hamano T, Mimori A, Ishizaka Y. A novel ACE2 activator reduces monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF- β cascades with restored caveolin-1 expression. *Experimental lung research*. 2015;41(1):21-31.

257. Chapman AL, Mocatta TJ, Shiva S, Seidel A, Chen B, Khalilova I, et al. Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(9):6465-77.
258. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(6):642-60.
259. Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(7):1199-234.
260. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, et al. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(2):554-62.
261. Pullar JM, Vissers MC, Winterbourn CC. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. *IUBMB life*. 2000;50(4-5):259-66.
262. Chen F, Wang H, Zhao J, Yan J, Meng H, Zhan H, et al. Grape seed proanthocyanidin inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via attenuating inflammation: in vivo and in vitro studies. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2019;67:72-7.
263. Ahmed LA, Obaid AA, Zaki HF, Agha AM. Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *European journal of pharmacology*. 2014;740:379-87.
264. Ahmed LA, Obaid AA, Zaki HF, Agha AM. Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2014;62:161-70.
265. Sun Q, Hackler J, Hilger J, Gluschke H, Muric A, Simmons S, et al. Selenium and Copper as Biomarkers for Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis. *Nutrients*. 2020;12(6).

266. Rehring JF, Bui TM, Galán-Enríquez CS, Urbanczyk JM, Ren X, Wiesolek HL, et al. Released Myeloperoxidase Attenuates Neutrophil Migration and Accumulation in Inflamed Tissue. *Frontiers in immunology*. 2021;12:654259.
267. Zhang ER, Liu S, Wu LF, Altschuler SJ, Cobb MH. Chemoattractant concentration-dependent tuning of ERK signaling dynamics in migrating neutrophils. *Science signaling*. 2016;9(458):ra122.
268. Haegens A, Vernooy JH, Heeringa P, Mossman BT, Wouters EF. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. *The European respiratory journal*. 2008;31(2):252-60.
269. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular signalling*. 2006;18(1):69-82.
270. Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *The Biochemical journal*. 2007;406(1):105-14.
271. Anilkumar N, Weber R, Zhang M, Brewer A, Shah AM. Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(7):1347-54.
272. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(9):1340-51.
273. Helmcke I, Heumüller S, Tikkanen R, Schröder K, Brandes RP. Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(6):1279-87.
274. Nisimoto Y, Jackson HM, Ogawa H, Kawahara T, Lambeth JD. Constitutive NADPH-dependent electron transferase activity of the Nox4 dehydrogenase domain. *Biochemistry*. 2010;49(11):2433-42.
275. von Löhneysen K, Noack D, Wood MR, Friedman JS, Knaus UG. Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(4):961-75.

276. Ray R, Murdoch CE, Wang M, Santos CX, Zhang M, Alom-Ruiz S, et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(6):1368-76.
277. Elias-Al-Mamun M, Satoh K, Tanaka S, Shimizu T, Nergui S, Miyata S, et al. Combination therapy with fasudil and sildenafil ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and survival in rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2014;78(4):967-76.
278. Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Sołtysiak U, Orszulak-Michalak D. Rosuvastatin intensifies the beneficial effects of rho-kinase inhibitor in reversal of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Archives of medical science : AMS*. 2016;12(4):898-905.
279. Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1992;7(2):120-5.
280. Kim JY, Choeng HC, Ahn C, Cho SH. Early and late changes of MMP-2 and MMP-9 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Yonsei medical journal*. 2009;50(1):68-77.
281. Wu Y, Cai C, Yang L, Xiang Y, Zhao H, Zeng C. Inhibitory effects of formononetin on the monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Molecular medicine reports*. 2020;21(3):1192-200.
282. Wen J, Wang J, Tang X, Deng S, Dai J, Li X, et al. DHT deteriorates the progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: effects of endogenous and exogenous androgen. *American journal of translational research*. 2019;11(9):5752-63.
283. Bai Y, Wang HM, Liu M, Wang Y, Lian GC, Zhang XH, et al. 4-Chloro-DL-phenylalanine protects against monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and lung inflammation. *International journal of molecular medicine*. 2014;33(2):373-82.
284. Oggionni T, Morbini P, Inghilleri S, Palladini G, Tozzi R, Vitulo P, et al. Time course of matrix metalloproteases and tissue inhibitors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *European journal of histochemistry : EJH*. 2006;50(4):317-25.

285. Asghar MY, Kemppainen K, Lassila T, Törnquist K. Sphingosine 1-phosphate attenuates MMP2 and MMP9 in human anaplastic thyroid cancer C643 cells: Importance of S1P2. *PloS one*. 2018;13(5):e0196992.
286. Chen J, Tang H, Sysol JR, Moreno-Vinasco L, Shioura KM, Chen T, et al. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(9):1032-43.
287. Zhai C, Feng W, Shi W, Wang J, Zhang Q, Yan X, et al. Sphingosine-1-phosphate promotes pulmonary artery smooth muscle cells proliferation by stimulating autophagy-mediated E-cadherin/CDH1 down-regulation. *European journal of pharmacology*. 2020;884:173302.
288. Gairhe S, Joshi SR, Bastola MM, McLendon JM, Oka M, Fagan KA, et al. Sphingosine-1-phosphate is involved in the occlusive arteriopathy of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*. 2016;6(3):369-80.
289. Vieillard-Baron A, Frisdal E, Eddahibi S, Deprez I, Baker AH, Newby AC, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats. *Circulation research*. 2000;87(5):418-25.
290. Veit F, Pak O, Egemnazarov B, Roth M, Kosanovic D, Seimetz M, et al. Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(18):2213-31.
291. Martin B, Vanderpool RR, Henry BL, Palma JB, Gabris B, Lai YC, et al. Relaxin Inhibits Ventricular Arrhythmia and Asystole in Rats With Pulmonary Arterial Hypertension. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2021;8:668222.
292. Chen L, Xiao J, Li Y, Ma H. Ang-(1-7) might prevent the development of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2011;15(1):1-7.
293. Breitling S, Krauszman A, Parihar R, Walther T, Friedberg MK, Kuebler WM. Dose-dependent, therapeutic potential of angiotensin-(1-7) for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*. 2015;5(4):649-57.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

