



**ALAMANDİN VE AVE0991'İN ANJİYOTENSİN II İLE
İNDÜKLENMİŞ DENEYSEL HİPERTANSİYON
MODELİNDE KARDİYAK REMODELİNG, VASKÜLER
PROLİFERASYON VE DAMAR KASILMA-GEVŞEME
CEVABI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Lokman Hekim TANRIVERDİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR**

Doktora Tezi - 2021

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALAMANDİN VE AVE0991'İN ANJİYOTENSİN II İLE İNDÜKLENMİŞ
DENEYSEL HİPERTANSİYON MODELİNDE KARDİYAK REMODELİNG,
VASKÜLER PROLİFERASYON VE DAMAR KASILMA-GEVŞEME CEVABI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Lokman Hekim TANRIVERDİ

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR**

Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TCD-2020-2172 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2021**

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTIMA DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Dolaşım Sistemi.....	8
2.1.1. Kalp.....	8
2.1.2. Aort.....	9
2.2. Hipertansiyon.....	9
2.2.1. Tanımı.....	10
2.2.2. Alt Tipleri.....	11
2.2.3. Hipertansiyonun Komplikasyonları.....	13
2.2.4. Patofizyolojik Yolaklar.....	13
2.3. En Yaygın Deneysel Hipertansiyon Modelleri.....	17
2.3.1. Genetik olarak Tetiklenmiş Rat Modelleri.....	17
2.3.2. Girişimsel Hipertansiyon Modelleri.....	18
2.3.3. Farmakolojik Yöntemlerle Oluşturulan Hipertansiyon Modelleri.....	18
2.4. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi.....	21
2.4.1. Renin.....	22
2.4.2. Anjiyotensin II.....	23
2.4.3. Anjiyotensin II Tip 1 ve Tip 2 Reseptör.....	25
2.4.4. Mas Reseptör.....	25
2.4.5. Mas Reseptör İlişkili G-protein Bağlı Reseptör Membran D.....	27
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. Deneysel Hayvanlarının Özellikleri ve Yaşam Koşulları.....	29
3.2. Çalışma Tasarımı.....	29
3.2.1. Deneysel Hayvanlarının ve Kalp Ağırlık Ölçümlerinin Yapılması.....	31
3.3. Anjiyotensin II İnfüzyonu ile İndüklenmiş Deneysel Hipertansiyon Modelinin Oluşturulması.....	31
3.3.1. Ozmotik Pompalara Konulacak İlaç Dozlarının Hesaplanması.....	31

3.3.2. Ozmotik Pompaların Yerleştirilmesi.....	32
3.4. Hemodinamik Ölçümler.....	33
3.4.1. Kan Basıncı Ölçümü Hazırlıkları.....	33
3.4.2. NIBP250 Cihazı ile Hemodinamik Parametrelerin Ölçümü.....	34
3.4.3. NIBP250 ile Elde Edilen Verilerin Analizi.....	35
3.5. Deney Gruplarının Su Tüketiminin Takibi.....	36
3.6. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılıp Hazırlanması.....	36
3.7. İzole Organ Banyosunun Hazırlanması ve Kasılma-Gevşeme Cevaplarının Değerlendirilmesi.....	36
3.7.1. Krebs-Henseleit Solüsyonunun Hazırlanması.....	36
3.7.2. Kasılma-Gevşeme Cevaplarının Oluşturulması ve Değerlendirilmesi.....	37
3.7.3. Fenilefrin Kasılma Cevapları.....	38
3.7.4. Asetilkolin Gevşeme Cevapları.....	39
3.8. Doku Homojenatlarının Oluşturulması ve Biyokimyasal Analizleri.....	40
3.8.1. Kalp ve Aort Dokularının Homojenizasyonu.....	40
3.8.2. ACE-2, CYP-A, MMP-2, MMP-9 ve NOX-4 Belirteçlerinin ELİSA Yöntemiyle Tayin Edilmesi ve Analizi.....	41
3.8.1. LOX Belirtecinin ELİSA Yöntemiyle Tayin Edilmesi ve Analizi.....	44
3.8.2. MCP-1 Belirtecinin ELİSA Yöntemiyle Tayin Edilmesi ve Analizi.....	44
3.9. Histopatolojik Analizler.....	46
3.10. Örneklem Büyüklüğü ve Güç Analizlerinin Hesaplanması ve İstatistiksel Analiz.....	46
4. BULGULAR.....	48
4.1. Deney Hayvanlarının Vücut ve Kalp Ağırlıkları.....	48
4.2. Deney Gruplarının Su Tüketim Miktarları.....	48
4.3. Hemodinamik Cevaplar.....	49
4.4. Torasik Aort Kasılma-Gevşeme Cevapları.....	52
4.4.1. Fenilefrin Kasılma Cevapları.....	52
4.4.2. Fenilefrin pD ₂ ve Maksimal Kasılma Cevapları.....	55
4.4.3. Asetilkolin Gevşeme Cevapları.....	56
4.4.4. Asetilkolin pD ₂ ve Maksimal Gevşeme Cevapları.....	58
4.5. Kalp ve Damar Dokularının Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	59
4.5.1. ACE-2 Düzeyleri.....	59

4.5.2. CYP-A Düzeyleri.....	60
4.5.3. NOX-4 Düzeyleri.....	60
4.5.4. LOX Düzeyleri.....	61
4.5.5. MCP-1 Düzeyleri.....	62
4.5.6. MMP-2 Düzeyleri.....	62
4.5.7. MMP-9 Düzeyleri.....	63
4.6. Histopatolojik Bulgular.....	63
4.6.1. Kalp.....	63
4.6.2. Damar.....	66
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR.....	80
EKLER.....	105
Ek-1. Etik Kurul Onayı.....	105
Ek-2. Özgeçmiş.....	106

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca derin bilgi ve engin tecrübeleri ile yol gösteren kıymetli danışman Hocam **Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR**'a,

Gerek eğitim süresince gerek akademik anlamda desteğini esirgemeyen başta kıymetli Hocam **Prof. Dr. Hacı Ahmet ACET** ve **Doç. Dr. Seda TAŐDEMİR**'e,

Deneysel çalışmalarındaki desteklerinden dolayı değerli büyüğüm **Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN**'a ve bölümdeki asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmamda biyokimyasal analizlerin yapılması ve değerlendirilmesi sürecinde katkıları olan kıymetli hocalarım **Prof. Dr. Burhan ATEŐ** ve **Prof. Dr. BarıŐ OTLU** ve çalışma arkadaşlarına,

Yine tez çalışmamın histopatolojik analizlerinin yapılmasında emeği geçen kıymetli hocam **Prof. Dr. Nigar VARDI** ve büyüğüm **Dr. Öğr. Üyesi Azibe YILDIZ**'a,

Tez deneyimdeki ilaç uygulamaları ve deney hayvanı bakım sürecindeki emeklerinden dolayı Deneysel Hayvanları Üretim Merkezi çalışanları **Onur ÖZKAYA**, **Gamze ÖZKAYA** ve **Engin KORKMAZ**'a,

Çalışmamızı maddi olarak destekleyen **İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Birimi**'ne,

Hayat boyu gelişimime destek veren başta **babam** ve **annem** başta olmak üzere çok değerli **aileme**,

Ve ihtisas eğitimi ile birlikte zorlu pandemi koşullarında fedakarlıklarını ve desteğini unutmayacağım eşim **Dr. Elif Seren TANRIVERDİ**'ye

gönülden teşekkürü bir borç bilirim. İyi ki varsınız...

ÖZET

Alamandin ve AVE0991'in Anjiyotensin II ile İndüklenmiş Deneysel Hipertansiyon Modelinde Kardiyak Remodeling, Vasküler Proliferasyon ve Damar Kasılma-Gevşeme Cevabı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Mas reseptör ilişkili G-protein bağlı reseptör agonisti, alamandin (ALA) ve Mas reseptör agonisti AVE0991, yakın zamanda renin-anjiyotensin sisteminin koruyucu bileşenleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, ALA ve AVE0991'in anjiyotensin (Ang) II ile oluşturulmuş hipertansiyonda kardiyovasküler fonksiyon ve yeniden şekillenme üzerindeki etkilerini değerlendirildi.

Materyal ve Metot: *Sprague Dawley* ırkı ratlar, 4 haftalık subkutan Ang II (80 ng/kg/dk) infüzyonlarına veya salin kontrolüne tabi tutuldu ve son 2 hafta süresince ALA (50 mcg/kg), AVE0991 (576 mcg/kg) veya ALA+AVE0991 ile tedavi edildi. Sistolik kan basıncı (KB) ve kalp atım hızı (KH) değerleri, tedaviden 1, 15 ve 29 gün sonra kuyruk manşet pletismografisi kullanılarak kaydedildi. Ötenaziden sonra, biyokimyasal ve histopatolojik analizler ve ayrıca vasküler cevaplar için kalp ve torasik aort çıkarıldı.

Bulgular: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Ang II grubunda sistolik KB anlamlı olarak arttı. Ayrıca, Ang II kardiyak ve aortik siklofilin-A (CYP-A), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve kardiyomiyosit dejenerasyonunda artışa neden oldu, ancak vasküler gevşemede azalmaya neden oldu. KH, matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9, NADPH oksidaz-4 ve lizil oksidaz seviyeleri gruplar arasında benzer düzeylerdeydi. ALA, AVE0991 ve ilaç kombinasyonu, antihipertansif etkilerinin yanında vasküler cevapları da iyileştirdi. Ang II+ALA+AVE0991 grubunun kalplerinde sırasıyla enflamasyon ve oksidatif yolak ile ilişkili MCP-1 ve CYP-A seviyeleri ile ilgili azaldı. Vasküler anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 seviyeleri, Ang II uygulamasıyla azaldı ancak kardiyak düzeyler benzerdi. Ang II+ALA+AVE0991 grubunda bu değerler Kontrol grubuna benzerdi.

Sonuç: Deneysel verilerimiz, ALA ve AVE0991 kombinasyonunun, Ang II'nin neden olduğu hipertansiyonda sistolik KB, oksidatif stres, enflamasyon ve vasküler gevşeme cevaplarını azaltmada tekli kullanımlarına göre daha etkili olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: ACE-2, Alamandin, Ang II, AVE0991, CYP-A, Hipertansiyon.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Alamandine and AVE0991 on Cardiac Remodeling, Vascular Proliferation, and Vascular Contraction-Relaxation Response in Angiotensin II-Induced Experimental Hypertension Model

Aim: Mas-related G protein-coupled receptor agonist, alamandine (ALA) and Mas receptor agonist, AVE0991 have recently been identified as protective components of the renin-angiotensin system. In this study, we evaluated the effects of ALA and AVE0991 on cardiovascular function and remodeling in angiotensin (Ang) II-induced hypertension.

Material and Method: Sprague Dawley rats were subject to 4-week subcutaneous infusions of Ang II (80 ng/kg/min) or saline control after which they were treated with ALA (50 mcg/kg), AVE0991 (576 mcg/kg), or ALA+AVE0991 during last 2 weeks. Systolic blood pressure (BP) and heart rate (HR) values were recorded at 1, 15, and 29 days post-treatment using tail-cuff plethysmography. After euthanization, the heart and thoracic aorta were removed for subsequent biochemical and histopathological analysis and also for vascular responses.

Results: Systolic BP significantly increased in Ang II group when compared to the control group. Furthermore, Ang II also caused an increase in cardiac and aortic cyclophilin-A (CYP-A), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and cardiomyocyte degeneration, but produced a decrease in vascular relaxation. HR, matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9, NADPH oxidase-4, and lysyl oxidase levels were comparable among groups. ALA, AVE0991, and the drug combination produced antihypertensive effects and alleviate vascular responses. The inflammatory and oxidant process related to MCP-1 and CYP-A levels, respectively, decreased in the hearts of the Ang II+ALA+AVE0991 group. Vascular but not cardiac angiotensin-converting enzyme-2 levels decreased with Ang II administration but were similar to the Ang II+ALA+AVE0991 group.

Conclusion: Our experimental data showed the combination of ALA and AVE0991 was more effective on reducing systolic BP, oxidative stress, inflammation, and vascular-relaxation responses than their single use in Ang II-induced hypertension.

Keywords: ACE-2, Alamandin, Ang II, AVE0991, CYP-A, Hypertension.

SİMGELER VE KISALTIMA DİZİNİ

α	: Alfa
δ	: Gama
2K1C	: 2 böbrek-1 klips
A779	: Mas reseptör antagonisti
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
Ach	: Asetilkolin
AHA	: Amerikan Hipertansiyon Cemiyeti
ACC	: Amerikan Kalp Cemiyeti
ESC	: Avrupa Kardiyoloji Topluluğu
ALA	: Alamandin
Ala1	: Alanin-1
AMPK	: 5'-adenozin monofosfat ile aktive edilmiş protein kinaz
Ang	: Anjiyotensin
ANP	: Atriyal natriüretik peptit
Apo	: Apolipoprotein
ARB	: Anjiyotensin reseptör blokerleri
Asp1	: L-Asparajinaz-1
AT1R	: Anjiyotensin II tip 1 reseptör
AT2R	: Anjiyotensin II tip 2 reseptör
AVE0991	: Mas reseptör agonisti
AVP	: Arjinin vazopressin
AVT	: Avrupa Hipertansiyon Topluluğu
BNP	: Beyin natriüretik peptit
Ca²⁺	: Kalsiyum
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
Cl⁻	: Klor
CNP	: C tipi natriüretik peptit
CYP-A	: Siklofilin-A
dk	: Dakika
DOCA	: Deoksikortikosteron asetat
DSS	: Dahl duyarlı tür
EC50	: Maksimal etkinin %50'sinin görüldüğü konsantrasyon

ECM	: Ekstraselüler matriks
ELİSA	: Enzim bağlantılı immünosorbent değerlendirme
Emax	: Maksimal etki
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentetaz
FDA	: Amerikan İlaç Ajansı
g	: Gram
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
GPCR	: G protein bağlı reseptör
H-E	: Hematoksilen eozin
H₂O	: Su
HELLP	: Hemoliz, yükselmiş karaciğer enzimleri, düşük trombosit sayısı ile seyreden sendrom
HRP	: Bayır turpu (Horseradish) peroksidaz
HT	: Hipertansiyon
İL-1β	: İnterlökin-1β
İP₃	: İnositol-3-fosfat
iNOS	: İndükenebilir nitrik oksit sentetaz
ip	: İntraperitoneal
JG	: Jukstaglomerüler
K⁺	: Potasyum
KAH	: Koroner arter hastalığı
KB	: Kan Basıncı
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
KCI	: Potasyum klorür
kD	: Kilodalton
kg	: Kilogram
KH	: Kalp atım hızı
KH₂PO₄	: Mono potasyum fosfat
KKB	: Kalsiyum kanal blokerleri
KY	: Kalp yetmezliği
L	: Litre
L-NAME	: L-NG-nitro arginin metil ester
L-NMMA	: L-NG-monometil arjinin sitrat

LOX	: Lizil oksidaz
Mas	: Mitokondriyal assembly
mcg	: Mikrogram
mcl	: Mikrolitre
MCP-1	: Monosit kemo-çekici protein-1
Mg⁺²	: Magnezyum
MgSO₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmHg	: Milimetre civa
MMP	: Matriks metalloproteaz
MrgD	: Mas reseptör ilişkili G-protein bağlı reseptör membran D
Na⁺	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NE	: Norepinefrin
NEP	: Neprilsin
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
ng	: Nanogram
NIBP250	: Non-invazif kan basıncı ölçüm cihazı modeli
NO	: Nitrik oksit
NOX	: NADPH Oksidaz
OSH	: Ortalama salım hızı
PD123319	: Anjiyotensin II tip 2 reseptör antagonisti
pD₂	: -log(EC ₅₀)
Phe	: Fenilefrin
PLC	: Fosfolipaz C
PPAR	: Peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör
PRR	: Prorenin reseptör
RAAS	: Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikaki devir sayısı

sa	: Saat
SHR	: Spontan hipertansif rat
SVH	: Sol ventrikül hipertrofisi
TİM	: Tunika intima-medya
TNF-α	: Tümör nekrosis faktör alfa
TPD	: Total periferik direnç
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Hipertansiyon patofizyolojisi	14
Şekil 2.2. Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi elementleri	22
Şekil 2.3. Ang II'nin yavaş ve hızlı presör etkileri	24
Şekil 3.1. Deney akış şeması	29
Şekil 3.2. Deney hayvanlarına ozmotik pompaların yerleştirilmesi işlemi	33
Şekil 3.3. Deney sürecinde kan basıncı ölçüm anına ilişkin görsel	34
Şekil 3.4. NIBP cihazı ile ölçülmüş hemodinamik sonuçlara ait çıktı örneği	35
Şekil 3.5. İzole organ banyosu sistemi	38
Şekil 3.6. ACE-2 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi	42
Şekil 3.7. CYP-A absorbans-konsantrasyon standart eğrisi	42
Şekil 3.8. MMP-2 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi	43
Şekil 3.9. MMP-9 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi	43
Şekil 3.10. NOX-4 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi	44
Şekil 3.11. MCP-1 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi	45
Şekil 4.1. Bireysel hemodinamik parametrelere ait değerler	51
Şekil 4.2. Fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrisi	55
Şekil 4.3. Ach konsantrasyon-cevap eğrisi	58
Şekil 4.4. Kontrol (A), Ang II (B), Ang II+AVE0991 (C), Ang II+ALA (D) ve Ang II+ALA+AVE0991 (E) gruplarında miyokardiyal dokunun görünümü	65
Şekil 4.5. Kontrol (A), Ang II (B), Ang II+AVE0991 (C), Ang II+ALA (D) ve Ang II+ALA+AVE0991 (E) gruplarında damar duvarının görünümü	66
Şekil 4.6. Kontrol (A), Ang II (B), Ang II+AVE0991 (C), Ang II+ALA (D) ve Ang II+ALA+AVE0991 (E) gruplarında damar duvarının görünümü	67

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. ESC/ESH ve ACA/AHA güncel hipertansiyon kılavuzlarının kan basıncı eşik değerleri	10
Tablo 2.2. Esansiyel hipertansiyonda sorumlu yolaklar ve risk faktörleri	11
Tablo 2.3. Ang II'nin farklı dokular üzerindeki etkileri	25
Tablo 3.1. Krebs-Henseleit çözeltisi içeriği	37
Tablo 3.2. İzole organ banyolarına eklenen fenilefrin konsantrasyonları ve hazırlanma bilgileri	39
Tablo 3.3. İzole organ banyolarına eklenen Ach konsantrasyonları ve hazırlanma bilgileri	40
Tablo 4.1. Deney gruplarındaki rat vücut ve kalp ağırlıklarının karşılaştırılması	48
Tablo 4.2. Deneyde son 7 güne ait grup rat ağırlığına göre düzeltilmiş su tüketim miktarları	49
Tablo 4.3. Sistolik kan basıncı ve kalp atım hızının gruplarda zamanla değişimi	50
Tablo 4.4. Fenilefrin kasılma cevapları (mg)	53
Tablo 4.5. Fenilefrin kasılma cevapları (%)	54
Tablo 4.6. Fenilefrin için pD_2 ve E_{max} değerleri	56
Tablo 4.7. Ach gevşeme cevapları (mg)	57
Tablo 4.8. Ach gevşeme cevapları (%)	57
Tablo 4.9. Ach için pD_2 ve E_{max} değerleri	59
Tablo 4.10. Kalp ve damar dokusunda ACE-2 düzeyleri	59
Tablo 4.11. Kalp ve damar dokusunda CYP-A düzeyleri	60
Tablo 4.12. Kalp ve damar dokusunda NOX-4 düzeyleri	61
Tablo 4.13. Kalp ve damar dokularındaki semi-kantitatif LOX düzeyleri	61
Tablo 4.14. Kalp dokusunda MCP-1 düzeyleri	62
Tablo 4.15. Kalp ve damar dokusunda MMP-2 düzeyleri	63
Tablo 4.16. Kalp ve damar dokusunda MMP-9 düzeyleri	63
Tablo 4.17. Miyokardiyal dokuya ait histopatolojik skorlar	64
Tablo 4.18. Damar dokusuna ait histopatolojik skorlar ve TİM kalınlığı	68

1. GİRİŞ

Tekrarlanan arteriyel kan basıncı (KB) ölçümlerinin 140/90 mmHg'den daha yüksek olması hipertansiyon (HT) olarak tanımlanmaktadır. HT'nin hedeflenen KB değerlerine ulaşamayan hastalarda kalp yetmezliği, koroner kalp hastalığı, hemorajik ve tromboembolik inme, böbrek yetmezliği, periferik arter hastalığı ve aort diseksiyonu riskini artırarak mortalite ve morbiditeyi artırdığı bilinmektedir. Ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda erişkin yaş grubunda HT prevalansının %30-35 arasında olduğu tespit edilmiştir.

İleri yaş, obezite, diyet alışkanlığı, fiziksel aktivite ve diyabet gibi risk faktörlerinin HT gelişimi arasında önemli bir ilişki olduğu bilinmektedir (1). Yaşla birlikte artan görülme sıklığının yanında HT komplikasyonları ve buna bağlı ölüm oranı da artmaktadır. Yirmi yaş altı bireylerde orta-ileri yaş grubundaki hastalar ile karşılaştırıldığında sekonder HT daha sık görülmektedir. HT sıklığı aynı zamanda ırk ve coğrafyaya göre de değişim göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri ve pek çok Avrupa ülkesinde erişkin nüfusun yaklaşık %25-30'unda HT bulunmaktadır (1, 2). Türk Kardiyoloji Derneği tarafından Türkiye'de yapılan çalışmada, erişkin yaş grubunda HT prevalansı %33 olarak bildirilmiştir (3). "Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri, TEKHARF" çalışmasında ise HT prevalansının %33.7 olduğu ve yaş ilerledikçe bu prevalansın arttığı saptanmıştır (4). Benzer şekilde, Türk Hipertansiyon Prevalans Çalışması (Prevalence, awareness and treatment of hypertension in Turkey, PatenT), verilerine göre ülkemizde erişkin yaş grubunda HT prevalansı %31.8 olarak bildirilmiştir. Ayrıca, HT'li hastaların sadece %40.7'sinin hastalıklarının farkında olduğu tespit edilmiş, %31.1'inin antihipertansif tedavi aldığı ve tedavi alanların sadece %20.7'sinin KB değerlerinin kontrol altında olduğu ifade edilmiştir (5).

18 ile 65 yaş aralığında olup sistolik KB'si 140 mmHg üzerindeki hipertansif hastalar için uygun yaşam tarzı değişiklikleri ve/veya farmakolojik tedavi yöntemlerine başlanması önerilmektedir (2, 6-8). 65 ile 80 yaş arasındaki yaşlı hastalarda, farmakolojik tedavi evre 1 HT değerlerinde başlanması gerektiği belirtilmiştir (140-159 mmHg). 80 yaşın üzerindeki hastalarda ise sistolik KB \geq 160 mmHg olduğunda kombine antihipertansif ilaç tedavisi ve yaşam tarzı değişiklikleri önerilmiştir. Tüm bu yaş kategorilerinde tedavi için diyastolik KB eşiği \geq 90 mmHg'dir. Farklı yıllarda farklı

organizasyonlarca yayımlanmış rehberlerdeki tanımsal farklılıklara rağmen; Avrupa ve Amerikan kılavuzları HT’de farmakolojik tedavinin başlangıcı için aynı eşikleri önermektedir (2, 6-9). HT tedavisindeki güncel yaklaşımların yanında patogenezinin araştırılması ve HT ile ilişkili komplikasyonların daha etkili, maliyet etkin yönetiminin sağlanabilmesi için deneysel çalışmalar devam etmektedir.

Güncel HT rehberlerinde; tuz kısıtlaması, alkol tüketiminin azaltılması, sebze ve meyve tüketimi, kilo kaybı, ideal vücut ağırlığının korunması ve düzenli fiziksel aktiviteden oluşan yaşam tarzı değişikliklerinin başlangıçtaki KB seviyelerinden bağımsız olarak tüm hipertansif hastalara önerilmesi gerektiği üzerinde durulmuştur. Antihipertansif ilaç tedavisinin, evre 2 veya 3 HT’li hastaların tahmini kardiyovasküler risk skorundan bağımsız, hemen başlanması önerilmektedir. Hedeflenen KB hedefine evre 2 ve 3 HT’lerde 3 ay içinde ve evre 1 HT’li hastalarda 3-6 ay içinde ulaşılmasının hedeflenmesi belirtilmiştir (9, 10).

Amerikan Kalp Cemiyeti (ACC) ile Amerikan Hipertansiyon Cemiyeti (AHA) (11) ve Avrupa Kardiyoloji Topluluğu (ESC) ile Avrupa Hipertansiyon Topluluğu’nun (ESH) (9) 2018 yılında yayımladıkları HT rehberlerinde, önceki rehberlerdeki gibi HT tedavisinde KB ve kardiyovasküler mortalite ve morbidite üzerinde etkili olmaları nedeniyle ilk basamakta kullanılacak beş ana ilaç grubu önermektedir. Bunlar; anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB), beta blokerler, kalsiyum kanal blokerleri (KKB) ve diüretikler (tiyazidler ve klortalidon ve indapamid gibi tiyazid benzeri diüretikler)’dir. Ayrıca HT patogenezinin araştırılması ve HT ile ilişkili komplikasyonların daha etkili, maliyet etkin yönetiminin sağlanabilmesi için yeni terapötik yaklaşımlar ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (12).

HT dahil olmak üzere birçok hastalığa ait yeni patofizyolojik yolların tanımlanması ile birlikte muhtemel yeni tedavi hedeflerinin belirlenebilmesi ve yeni farmakolojik tedavilerin uygulanabilmesi için deney hayvanı çalışmalarının yapılması ihtiyaçtan öte zorunluluk halini almıştır. Çalışmamızın konusu olması itibariyle HT patogenezinin klinik uyumluluğu, kardiyovasküler komplikasyonlarının önlenmesi ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi için Anjiyotensin II (Ang II) ile indüklenmiş deneysel HT modeli tercih edilmiştir.

Ang II ile indüklenmiş deneysel HT modeli, Ang II Tip 1 reseptörün doğrudan aktivasyonu ile vazokonstriksiyon, endotel hasarı ve enflamasyonun tetiklenmesi esasına dayanır (13). Bu deney modeli özellikle farelerde ve rodent türlerinde sıkça

kullanılmaktadır. Özellikle ratlarda, diğer deney hayvanlarına kıyasla Ang II uygulaması sonucu daha belirgin uç organ ve endotel hasarı geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca ratlarda KB ölçümünün gerek kuyruktan yapılabilmesi gerekse telemetrik ölçümler için cerrahi müdahalenin farelere göre daha kolay olması da önemli bir avantaj olarak kabul edilebilir (12). Böbrek hasarı ve tuza duyarlılığın ekarte edilerek HT patogenezinin araştırılmasında ise C57BL/6 fareleri hem tuza duyarlı olmadıklarından hem de yapılan çalışmalarda böbrek hasarına karşı daha dirençli oldukları tespit edildiğinden tercih edilebilir. Bir diğer fare türü olan 129SVE fareleri ise tuza duyarlı, böbrek hasarına daha duyarlıdır ve C57BL/6 farelere göre benzer dozdaki Ang II infüzyon sürelerine daha yüksek KB cevabı oluşturdukları bildirilmiştir (14). Bu nedenle, uzun vadeli Ang II infüzyonu kullanan deneylerin tasarımında tür ve suş seçimleri anahtar hususlardır.

HT'nin kronik bir hastalık olmasından dolayı deneyde kullanılacak uzun süreli Ang II infüzyonunun birçok avantajı bulunmaktadır. Birincisi, esansiyel HT patogenezinde önemli bir yere sahip olan Ang II reseptör tiplerinin fizyolojik ve patolojik etkilerinin araştırılabilmesi ve yeni yaklaşımlar kazandırabilme potansiyeli açısından çok önemlidir. İkincisi, Ang II infüzyonu ile diğer farmakolojik yöntemlerle oluşturulan deneysel HT modellerindeki patofizyolojik ve hemodinamik farklılıkların tespit edilmesi ve bunun renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS) aktivasyonu ile ilişkili kardiyovasküler ve diğer sistemler üzerindeki etkilerinin incelenmesine imkan sağlamasıdır. Ayrıca, yakın geçmişte FDA tarafından azalmış TPD'nin hayati organ hipoperfüzyonlarının eşlik ettiği hipotansif şoktaki hastalarda Ang II infüzyonu ile KB'nin artırılmasına onay verilmiştir (15). Bu modelin bir diğer avantajı, farklı deney hayvanlarında uygulanabilir ve deney protokolünün revize edilebilme kolaylığıdır. Özetle, uzun süreli Ang II infüzyonunun, tüm kardiyovasküler mekanizmalar ile doğrudan ilişkili olmasının yanında santral sempatik aktivasyon, sistemik ve renal vazokonstriksiyon ve elektrolit dengesi üzerindeki etkilerinin araştırılmasına imkan sağlaması ve bu bağlamda yeni terapötik yaklaşımlara açık olması bu deney modelini ön plana çıkarmaktadır.

Son çeyrek yüzyılda RAAS'ın fizyopatolojisi önemli derecede aydınlanmaya başlamıştır. Temel ve klinik araştırmalar bu sistemin içerisinde renin, Ang II, ACE ve Ang II reseptörlerinden başka önemli diğer bileşiklerin de bulunduğunu göstermiştir. *In vitro* ve *in vivo* yapılan birçok çalışmada RAAS'de Ang (1-7) komponentleri olarak bilinen alamandin (ALA) ve AVE0991'in kardiyovasküler sistem üzerinde yararlı etkileri

gösterilmiştir. Nonpeptit yapıdaki Mas reseptör agonisti AVE0991'in etkilerinin daha net anlaşılabilmesi, kardiyovasküler hastalıklar üzerine ilaç geliştirmeye çalışan araştırmacılar için önemli bir basamak olarak görülmektedir. Bunun yanında kısa yarılanma süresi ve kendine özgü Mas reseptör ilişkili G-protein bağlı reseptör membran D (MrgD) üzerinden etkisini gösteren ALA'nın kardiyak fibrozis ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda antienflamatuvar ve antifibrotik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu açıdan, çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, Ang-(1-7)-Mas-MrgD yolu üzerinde etkisini gösteren bu ilaçlar ve bunların kombinasyonunun gerek evre 2 HT gerekse hipertansif kriz yönetimi açısından değerlendirilmesini sağlayacak ve ilaçların etki mekanizmalarına yönelik yeni bilimsel çalışmalara zemin hazırlayacaktır.

Çalışmamızı özgün kılan bir diğer özellik ise, antihipertansif ve kardiyoprotektif özellikleri araştırılan ALA ve AVE0991'in ACE-2, siklofilin-A (CYP-A), lizil oksidaz (LOX), monosit kemo-çekici protein-1 (MCP-1), matriks metaloproteaz (MMP)-2, MMP-9 ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (NOX)-4 belirteçleri üzerindeki potansiyel etkililiklerinin gösterilerek ilgili yolakların tanımlanmasıdır. Söz konusu belirteçler ile ilgili genel bilgiler ve başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere deneysel HT çalışmalarındaki verileri aşağıda özetlenmiştir:

ACE-2, çoğunlukla akciğer, böbrek, damar ve kalp dokularında bulunan, sentezlenen ve membrana yerleşimli bir glikoproteindir (16). Yapıca ACE'ye oldukça benzese de aktivitesi, klinik pratikte de sıkça kullanılan ACE inhibitörleri tarafından antagonize edilemez. ACE-2'nin temel substratı Ang I ve II'dir ancak bradikinin, Apelin-13 ve Apelin-36'yı da dönüştürebilmektedir (13). Ayrıca, ACE-2'nin anjiyotensinaz aktivitesinden bağımsız olarak integrin fonksiyonunun olduğu da bildirilmiştir (17). ACE-2'nin aterosklerozdan kalp yetmezliğine kadar birçok farklı kardiyovasküler patolojide rol aldığı bilinmektedir (18). Substratı olan Ang II'nin önceki bölümlerde de belirtildiği üzere birçok kardiyovasküler patolojiye sebep olduğunun bilinmesinin yanında ACE-2'nin Ang II'den dönüştürdüğü Ang 1-7'nin antioksidan, antienflamatuvar, kardiyak ve vasküler koruyucu etkilerinin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (19-22). Cassis ve arkadaşlarının, ApoE *knock-out* farelerde, ACE-2 eksikliğinin, Ang II infüzyonunu takiben gözlemlenen aterosklerotik plak birikimini yaklaşık 2 kat artırdığı tespit edilmiş ve bunun plak oluşumuna ait patofizyolojideki ilk basamak olan proenflamatuvar cevap ile ilişkilendirilen lökosit adezyonundaki artış ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (23). Klinik pratikte kullanılan ARB ve ACE inhibitörlerinin kısmen de

olsa Ang II'yi veya etkilerini azaltma kabiliyetlerinin yanında dolaşımdaki Ang 1-7 seviyelerini yükselttiği bildirilmiştir (24). Dahası, L-NG-nitro arginin metil ester (L-NAME) verilen spontan hipertansif ratlara (SHR) Mas reseptör antagonisti A779 verildiğinde kaptopril'in kardiyovasküler koruyucu etkilerinin azaldığı gösterilmiştir (25). Ang 1-7'nin ana kaynağının ACE-2 olduğu göz önüne alındığında, bu veriler ACE-2'nin sonuç olarak sadece HT gelişimini değil, aynı zamanda potansiyel olarak tedavisine cevabı da etkilediğini düşündürmektedir. Ayrıca, literatür araştırma sonuçlarımıza göre ALA ve AVE0991 tedavilerinin ACE-2 düzeyleri üzerine etkilerinin çalışılmamış olması, çalışmamızda ACE-2 düzeylerinin araştırılmasının temelini oluşturmuştur.

CYP-A, reaktif oksijen türlerine (ROT) cevap olarak vasküler düz kas hücrelerinden salgılanan 20 kD'lik bir şaperon proteindir (26). Endotel hücre apoptozunu ve lökosit adezyon moleküllerinin hem hücre içi hem de hücre dışı ekspresyonunu artırarak enflamasyona sebep olduğu ve ateroskleroz, kardiyak fibrozis gibi birçok kardiyovasküler hastalığın patofizyolojisinde rol oynadığı bildirilmiştir (27). CYP-A, ayrıca T helper hücrelerin uyarılmasında (28), MMP aktivasyonunun upregülasyonunda (29) ve vasküler proenflamatuvar sinyallerin transdüksiyonunun artırılmasında ve makrofajların *in vitro* ve *in vivo* etkililiklerinde önemli bir rol oynar. CYP-A, Ang-II ile indüklenen ROT üretimi ve arteriyel vasküler düz kas hücrelerine enflamatuvar hücre cevabını artırdığı gösterilmiştir (30). Nigro ve arkadaşları, ekstraselüler CYP-A'nın endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve hücre dışı proliferasyonunu artırdığını göstermiştir (27). Sonuç olarak CYP-A'nın enflamatuvar hücre migrasyonu ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiş ve *in vivo* hipertansif vasküler hastalıklarda rol alabileceği ifade edilmiştir (29).

LOX, kolajen ve elastinin çapraz bağlanmasını katalize ederek vasküler yapıyı düzenleyen bakır bağımlı bir amin oksidazdır. LOX, lizin ve hidrosilizin rezidülerini reaktif semialdehitlere oksidatif olarak deamine eder (31). Reaktif semialdehitler, daha sonra kovalent çapraz bağlar oluşturarak vasküler yapının şekillenmesine neden olur (32). LOX ekspresyonu HT etyopatogenezinde önemli bir role sahip olan vasküler düz kas ve endotel fonksiyonları ile doğrudan ilişkilidir. LOX geni silinmiş farelerin vasküler yapıları ve solunum sistemlerinin tam olarak gelişmediği gösterilmiştir (31). Ayrıca, LOX'un uzun süreli sistemik inhibisyonunun damar bütünlüğünü azalttığı ve anevrizma gelişimine yol açtığı bildirilmiştir (33, 34).

MCP-1, monositlerin/makrofajların göçünü ve infiltrasyonunu düzenleyen önemli kemokinlerden biridir. Güçlü bir kemokin olan MCP-1, hemodinamiye ve hümmoral uyararlara (Ang II ve endotelin-1 gibi) cevap olarak vasküler, kardiyak ve böbrek hücreleri tarafından sentezlenir ve salınır. Birçok çalışmada MCP-1, kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkilendirmiştir. Ateroskleroza incelemek için yapılan bir çalışmada, MCP-1 geni silinmiş farelerde arteriyel lipid birikiminde önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (35). Yeni bulgular, artmış MCP-1 ekspresyonunun, Ang II ile indüklenmiş hipertansif kalp hastalığında hedef organ hasarı arasında önemli bir aracı olabileceğini de düşündürmektedir (36).

MMP'ler, iç peptit bağlarının ayrışmasıyla ekstraselüler matriks (ECM) protein yıkımına katılan endopeptidazlardır. Her MMP, kolajenaz, jelatinaz ve stromelizin gibi spesifik bir substrat hedefine sahiptir. MMP-2 ve MMP-9, endotelial hücreler, perisitler ve podositler, fibroblastlar ve miyofibroblastlar, monosit türevli makrofajlar ve lokal makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanır (37). Tip IV kollajen yıkımının vasküler proliferasyon, anjiyogenez, enflamasyon ve aterosklerotik plak rüptüründe rol oynadığı gösterilmiştir (38). MMP-2, hücre yüzeyi üzerinde yapısal olarak eksprese edilirken MMP-9, farklı hücre tiplerine ait granüllerde depolanır ve egzojen uyarılarla salınımı artabilmektedir (39). Hipertansif hastalarda, aort sertliği ile yüksek serum MMP-9 seviyeleri arasında önemli bir korelasyon saptanmıştır (40). MMP-9 aktivitesindeki artışın, kollajen yıkımı ve arteriyel disfonksiyona sebep olarak HT patofizyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir. Kontrol altında tutulan HT'de fibril kollajen ve MMP-9 aktivitesinin korele olduğu saptanmıştır (40). Artan arteriyel KB ve vasküler remodeling kalbin aşırı yüklenmesine neden olur. Bu koşullar altında hem vasküler hem de kardiyak dokularda remodeling ve proliferasyon şiddetlenir. MMP-9 aktivitesi yüksek basınçlı arterlerde normal basınç altındaki damarlara göre artmaktadır (41). HT'de aşırı yüklenmeye cevap olarak gelişen kardiyak hipertrofi, atriyal fibrilasyon, diyastolik ve sistolik kalp yetmezliği için bir risk faktörüdür (42). Kardiyak hipertrofi, artan MMP-9 aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Li ve arkadaşları, SHR'lerde kompensatuvar hipertrofi varlığında MMP-9 serum düzeylerinde artış saptamıştır (43). ECM'de bozulma, kompensatuvar süreçten sonra klinik olarak belirgin kalp yetmezliğine geçiş aşamasında arttığı ve bunun artmış MMP-9 aktivitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (43).

NOX'lar, vasküler dokulardaki başlıca oksidatif stres kaynaklarından biridir. Farklı izoformları, ayrı ayrı veya birlikte farklı işlevlere sahiptir. Vasküler düz kas hücreleri NOX-1, NOX-4 ve NOX-5 içeren enzimleri eksprese ederken, endotel hücreleri ek olarak NOX-2 proteinini eksprese eder (44-47). NOX-1'in diyabetik endotel disfonksiyonunda ve aterosklerotik osilatör kayma stresine endotel hücre cevabında rol oynadığı gösterilmiştir. NOX-2, Ang II ile indüklenen serebral endotel disfonksiyonunda rol aldığı gösterilmiştir. Bunun yanında, NOX-4'ün kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarında ve HT gelişiminde kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, NOX-1, NOX-2 ve NOX-4'ün farklı deneysel HT modellerinde patogeneze rol aldığı gösterilmiştir (48-50). Bu nedenle çalışmamızda, NOX izoformlarından NOX-4'ün Ang II ile indüklenmiş HT deney modelindeki değişimi ve ALA ve AVE0991 uygulamasının kalp ve aort dokularındaki NOX-4 düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmektedir.

Kontrol altında tutulamayan HT'nin, kalp yetmezliği, koroner kalp hastalığı, hemorajik inme, akut böbrek hasarı ve aort diseksiyonu gibi birçok klinik patolojiye sebep olduğu bilinmektedir. Çalışma kapsamında literatür ile uyumlu olarak 4 hafta boyunca 80 ng/kg/dk infüzyon hızında Ang II uygulanarak *in vivo* evre 2 HT modeli oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan ilaçlar -deneysel çalışmaları devam etmektedir- Ang 1-7 ve Ang A'nın substratı olduğu MrgD agonisti ALA ve Mas reseptör agonisti AVE0991'dir. Çalışmamızda bu iki ilacın ayrı ayrı ve kombine kullanımları sonucu sistolik KB üzerindeki etkilerinin yanında HT etyopatogenezinde yer alan vasküler kasılma-gevşeme cevapları, vasküler proliferasyonu, kardiyak yeniden şekillenme, enflamasyon ve oksidatif stres yolları üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dolaşım Sistemi

Dolaşım sisteminin temel işlevi, tüm vücut hücrelerine oksijen, besin ve diğer maddeleri iletmenin yanında hücresel metabolizmanın son ürünlerinin uzaklaştırılmasıdır. Bu işlevler, kanı damarlar aracılığı ile tüm vücuda ulaştıran kalp ile gerçekleştirilir (51).

Kalp, sağ ventrikül aracılığı ile akciğerlere, sol ventrikül aracılığı ile vücudun diğer tüm bölgelerine kan akışını sağlar. Bunlar, sırasıyla pulmoner dolaşım ve sistemik dolaşım olarak adlandırılır.

Başta aort olmak üzere arterler kan akışının kalpten vücudun tüm bölgelerine taşınmasında görev alır. Ardından, birçok dal verip nihayetinde ince bir kılcal ağ örgüsü haline gelirler. Venler ise kan akışını vücudun her yerindeki kılcal damarlardan kalbe geri dönüşünü sağlar. Plazma, kılcal damarların duvarlarından geçerek interstisyel boşluğa geçer ve son olarak lenfatik sistemin de katkısıyla sağ kalbe geri döner (52).

2.1.1.Kalp

Kalp, diyafram üst komşuluğunda ve akciğerler arasında yer almaktadır. İki atriyum ve iki ventrikül olmak üzere dört anatomik bölümden oluşur. Atriyumlar, ventriküllere göre hem boyut olarak daha küçük hem de daha ince duvarlara sahiptir. Her bir anatomik bölümün miyokard kalınlığı, kanı pompalamak için üstesinden gelmesi gereken basınç ve direnç miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Bu durumla ilişkili olarak her iki atriyum ventriküllere boşaltılan kan için geçiş birimleri olduklarından ince duvarlara sahiptir. Fizyolojik olarak, atriyumdan ventriküle geçişte karşılaşılan çok az direnç vardır. Ancak ventriküler miyokard, pulmoner veya sistemik damarlardaki basınçlara karşı pompalama yapacak kadar güçlü olması gerektiğinden sol ventrikül miyokardiyumu, sağ ventrikül ile karşılaştırıldığında birkaç kat daha kalındır (53).

Kalp duvarında; perikardiyum, miyokardiyum ve endokardiyum olmak üzere üç katman bulunmaktadır. Perikard, kalbi çevreleyen, fiziksel hareketlere bağlı yerçekimsel etkilenmelerden ve kalbi çevre dokulardan bulaşabilecek muhtemel enfeksiyöz patojenlere karşı koruyan membranöz bir kese olarak kabul edilmektedir.

Kalp duvarının en kalın tabakası olan miyokard, kalp kasından oluşur ve kalbin fibröz iskeleti ile bağlantılıdır. Miyokardiyal hücreler, kanın kalpten pulmoner ve sistemik dolaşıma aktarılabilmesi için gereken kasılma gücünü sağlar. Miyokardiyumun iç tarafında endokardiyum, bağ dokusu ve skuamöz hücreler bulunur (54).

2.1.2.Aort

Sol ventrikülün pompaladığı kan, aort ve dalları ile vücuda dağılır. Arterler, kan ve dokular arasında besin alışverişinin gerçekleştiği kılcal damarlara dallanan küçük arteriyollere dallanır. Kılcal damarlardan gelen kan, daha büyük damarları oluşturmak için birleşen küçük venüllere girer ve sonrasında bu venöz kan akciğerlere gitmek üzere sağ kalbe geri döner (52).

Genel olarak kan damarları histolojik olarak tunika intima (en içteki), tunika media (orta) ve tunika eksterna veya adventisya (en dış) olmak üzere üç katmandan oluşur. Damar duvarlarının kalınlığı, bu üç katmandan birinin veya daha fazlasının etkilenmesine bağlı olarak değişir. Özellikle tunika media ve intima kalınlığındaki artışın vasküler patolojiler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (55).

Aort, elastik bağ dokusu, lifli bağ dokusu ve düz kastan oluşur. HT başta olmak üzere birçok hastalıkta vasküler kompliyans (uyum) olumsuz etkilenir. Bu durum, kalpten kan pompalanırken aortun gerilme/esneme özellikleri ile ilişkilidir ve KB'nin regülasyonunda önemli bir yere sahiptir (56).

Damar endotelinde yer alan endotel hücreleri, vazodilatörler, vazokonstriktörler, antikoagülanlar ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere bir dizi temel kimyasal üretirler. Buradan anlaşılacağı üzere, damar endoteli, sentezlediği ve salgıdığı vazoaktif kimyasallar ile sadece KB değil birçok fizyolojik ve patolojik durumda aktif rol alır (57).

2.2. Hipertansiyon

Karaciğer, böbrek ve beyin başta olmak üzere merkez ve uç organların perfüzyonu için arteriyel KB'nin belli düzeylerde korunması gereklidir. Genel olarak, arteriyel KB aşağıdaki denklemle belirlenir:

$$Kan\ basıncı\ (KB) = Kardiyak\ output\ x\ Sistemik\ vasküler\ direnç$$

KB, farklı koşullarda, organ perfüzyonunu devam ettirebilebilmesi için birçok fizyolojik ve patolojik cevaptan etkilenir. KB'yi belirleyen en önemli faktörler, sempatik sinir sistemi, RAAS ve çoğunlukla böbrekler tarafından düzenlenen plazma hacmidir (58).

Yetişkinlerde yüksek KB'nin önlenmesi, saptanması, değerlendirilmesi ve yönetimine dair standartların yayımlandığı 2017 ACC/AHA (11) ve 2018 ESC/ESH (9) yönergelerinde HT, günümüzde en sık görülen kronik hastalık olduğu ifade edilmiş ve önemli derecede erken morbidite ve mortaliteye sebep olduğu bilinmektedir. Koroner arter hastalığı (KAH), serebrovasküler hastalık (SVH), kalp yetmezliği (KY), kronik böbrek hastalığı (KBY) ve demans için birincil risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, *Global Burden of Disease* çalışma grubunun 1990-2017 yılları arasını inceleyen raporuna göre yüksek KB'nin, küresel anlamda önde gelen morbidite nedeni olduğu ve yılda yaklaşık 10.4 milyon insanın ölümü ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada, küresel anlamda 2010 yılında yaklaşık 1.39 milyar insanın HT'den muzdarip olduğu bildirilmiştir (59).

2.2.1. Tanımı

2018 ESC/ESH yönergeleri, HT tanımını $\geq 140/90$ mmHg olarak tanımlamış ancak 130-139/85-89 mmHg aralığındaki KB'yi ise yüksek normal KB olarak tanımlamışlardır (9). Aksine 2017 ACC/AHA rehberi (11), 120-129/<80 mmHg KB seviyeleri için "yüksek KB" olarak kabul ederken ESC/ESH rehberi (9) bu kategoriyi "normal KB" olarak tanımlamaktadır. HT tanımı için Amerikan kılavuzunda sınır değer olarak $\geq 130/80$ mmHg kabul edilirken Avrupa kılavuzunda $\geq 140/90$ mmHg aralığı kabul edilmiştir (Tablo 2.1). Bununla birlikte, her iki rehber de KAH, KBY, diyabet ve SVH gibi eşlik eden hastalığa sahip HT'li hastalar için benzer KB hedeflerini (<130/80 mm Hg) paylaşmaktadır (11, 60).

Tablo 2.1. ESC/ESH ve ACC/AHA güncel hipertansiyon kılavuzlarının kan basıncı eşik değerleri.

	ESC/ESH (2018)	ACC/AHA (2017)
Hipertansiyon Tanımı (mmHg)	$\geq 140/90$	$\geq 130/80$
Normal Kan Basıncı (mmHg)	İdeal: <120/80 Normal: 120-129/80-84 Yüksek normal: 130-139/85-89	Normal: <120/80 Yüksek: 120-129/<80
Hipertansiyon Evreleri (mmHg)	Evre 1: 140-159/90-99 Evre 2: 160-179/100-109 Evre 3: $\geq 180/110$	Evre 1: 130-139/80-89 Evre 2: $\geq 140/90$

2.2.2. Alt Tipleri

Hipertansiyon alt tipleri aşağıda özetlenmiştir.

- **Esansiyel Hipertansiyon**

HT'li bireylerin çoğunda, yüksek KB'nin kesin nedeni belirlenmemektedir (61). Esansiyel (birincil) HT'ye, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, RAAS, natriüretik peptitler, enflamasyon, endotelial disfonksiyon, obezite ile ilişkili hormonlar ve insülin direnci dahil olmak üzere çoklu patofizyolojik mekanizmalar aracılık eder (62-64). Bunun yanında bu alt tip için sigara, alkol tüketimi, stres, ileri yaş, obezite, yetersiz egzersiz, yüksek NaCl tüketimi ve diyetle düşük potasyum alımının risk faktörü olduğu kabul edilmektedir (11, 58, 65) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Esansiyel hipertansiyonda sorumlu yollar ve risk faktörleri.

Sorumlu Yollar	Risk Faktörleri
Diyet ile Ca^{+2} , K^{+} ve Mg^{+2} alımında azalma	Genetik
Diyette Na^{+} alımının artması	Alkol tüketimi
Endotelial disfonksiyon	Yaş
İnsülin direnci	Stres
Natriüretik hormonların disfonksiyonu	Cinsiyet
RAAS sisteminin aktivasyonu	Yetersiz egzersiz
Renal glomerüller ve tübüller enflamasyon	Obezite
Sempatik sinir sisteminin aktivasyonu	Sigara

Esansiyel HT'nin tanımlanması, gelişimi ve/veya uzak organ hasarının önceden tahmin edilebilmesi için plazma renin- Na^{+} profili, vazokonstriktör inhibe edici faktör, simetrik dimetil arjinin, adrenomedullin, sistatin-C gibi birçok biyobelirteç üzerinde araştırmalar yapılsa da plazma verilerinden henüz istenen değerlere ulaşılamamıştır (66-70). Ayrıca, mevcut farmakolojik tedavilerin esansiyel HT tedavisinde büyük ölçüde ampirik kaldığı göz önüne alındığında hastalık şiddetini azaltmada ve/veya hastalığı ortadan kaldırmaya yönelik yeni farmakolojik yaklaşımların geliştirilmesi halen önemini korumaktadır (71).

- **Sekonder Hipertansiyon**

Sekonder HT, genellikle KB'nin artışına sebep olan bir hastalık veya total periferik vasküler direnci (TPD) veya kalp debisini artıran ilaçlardan kaynaklanır (72). Örneğin; renal, endokrin, kardiyovasküler veya nörojenik sistem kaynaklı HT'nin yanında ilaçların veya toksik maddelerin sebep olduğu HT de sekonder HT'nin başlıca ilgili sebepleri arasında yer alır (73-78).

Sekonder HT'nin genetik nedenlerinin genellikle tek gen bozukluklarından kaynaklandığı bildirilmiştir (79). Bunlar nadir ancak önemli sekonder HT nedenleridir çünkü genetik tanının belirlenmesiyle ilgili hastalığa bağlı spesifik patofizyoloji göz önünde tutularak uygun farmakolojik tedavi seçimi yapılabilir (72, 80). Bu genetik bozuklukların ortak özellikleri, çocuklarda, ergenlerde veya genç erişkinlerde genellikle HT ile ortaya çıkmasının yanında çoğu monogenik bozukluğun, sodyumun renal tübüler yeniden emilimini artırarak HT'yi tetiklemesidir. Bu nedenle, genellikle daha genç hastalar ve özellikle antihipertansif ilaçlarla tedavi edilenler, baskılanmış bir plazma renin konsantrasyonu veya plazma renin aktivitesi ile ilişkilendirilmişlerdir (9, 81).

KB'nin regülasyonu ile ilişkili sistemlerde kalıcı yapısal değişiklikler meydana gelmeden önce neden belirlenir ve ortadan kaldırılırsa, KB çoğunlukla normale döner.

- ◆ **Dirençli Hipertansiyon**

2018 ESC/ESH kılavuzunda tedaviye dirençli HT, önerilen farmakolojik tedavi stratejisi ile sistolik KB'nin <140 mmHg ve/veya diyastolik <90 mmHg değerlerine düşürülememesi olarak tanımlanır (9). Tedaviye dirençli HT'nin, tedavi edilen HT'li hastaların yaklaşık %10'unda gözlemlendiği bildirilmiştir. Dirençli HT'si olan hastalar, HT ile ilişkili uzak organ hasarı, kronik böbrek yetmezliği ve erken dönem kardiyovasküler komplikasyonlar gibi birçok patolojik durum açısından daha yüksek risk altındadır.

- ◆ **Gebelik ile İlişkili Hipertansiyon**

Gebelik ile ilişkili HT, gestasyonel HT'den preeklampsiye, HELLP sendromundan ve eklampsiye kadar birçok farklı patolojik durumu kapsar. Preeklampsi, gebeliklerin yaklaşık %7'sinde görülür ve küresel çapta anne ve fetüs morbidite ve mortalitesinin ana nedeni olarak bilinmektedir (82). Gestasyonel HT benzer sıklıkta görülmesinin yanında genellikle daha az komplikasyon ile sonuçlanır (83). Bununla birlikte, çok yüksek KB'ye yol açabilir ve/veya doğumdan sonra kronik HT olarak

komplike hale gelebilir. Bu nedenle, bu kadınların doğum sırasında ve sonrasında yakın bir takibe ihtiyacı vardır.

- **Hipertansif Aciller**

Şiddetli HT ile ilişkili acil durumları sınıflandırmak için birçok tanım kullanılmıştır (9). Hipertansif kriz, şiddetli HT'nin (evre 3) HT ile ilişkili akut organ hasarının saptandığı durumlardır ve bu durum, genellikle yaşamı tehdit eder ve kontrollü olarak KB'yi düşürmek için genellikle sistemik antihipertansif tedavi gerektirir. Hipertansif aciller aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Malign HT, funduskopik değişiklikler (kanamalar ve/veya papilödem), mikroanjiyopati, yaygın intravasküler pıhtılaşma ve ensefalopati ile ortaya çıkan ve çoğunlukla evre 3 HT ile karakterize (vakaların yaklaşık %15'inde) bir durumdur. Sıklıkla, akut kalp yetmezliği ve/veya böbrek fonksiyonunda akut bozulma eşlik eder. "Malign" terimi, tedavi edilmemesi durumunda çok kötü prognozu yansıtır (84, 85). KB'de acil bir düşüş gerektirmesi muhtemel diğer klinik durumlarla ilişkili şiddetli HT'si olan hastalıklara örnek olarak akut aort diseksiyonu, akut miyokardiyal iskemi veya akut kalp yetmezliği verilebilir (86).

Hipertansif atak ise acil servise başvuran ve HT ile ilişkili akut organ hasarına ilişkin kanıt olmayan hastalarda yüksek KB'yi tanımlamak için kullanılmıştır. Bu hastalarda KB'nin düşürülmesi gerekse de genellikle hastaneye yatış gerekmemektedir (9, 87).

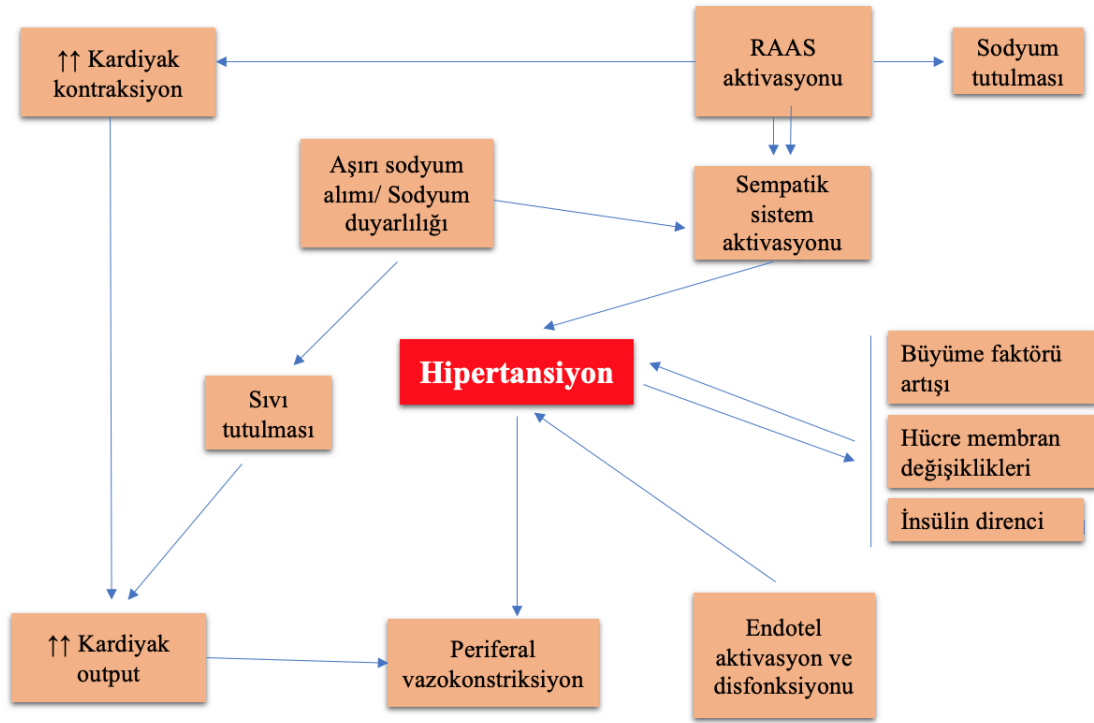
2.2.3. Hipertansiyonun Komplikasyonları

HT, başta kardiyovasküler olmak üzere birçok hastalığın risk faktörleri arasındadır (88). Örneğin, sol ventrikül hipertrofisi, düşük veya normal ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği, iskemik ve hemorajik inme, miyokardiyal enfarktüs gibi iskemik kalp hastalıkları, kronik böbrek yetmezliği gibi birçok patolojik olay HT varlığıyla yakından ilişkilidir (89-91).

2.2.4. Patofizyolojik Yolaklar

HT'nin patofizyolojisi oldukça karmaşık ve çok farklı mekanizmalar ile ilişkilendirilmiştir (92-94). Tanımlanabilir tek bir neden olmamasının yanında normal KB'nin korunmasında yer alan fizyolojik mekanizmalardaki anormalliklerin HT gelişiminde önemli rol aldığı düşünülebilir. HT, birbiriyle ilişkili olan ve daha sonra kısır

bir geribildirim döngüsü oluşturan çok sayıda karmaşık faktörün açığa çıkan sonucudur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hipertansiyon patofizyolojisi.

- **Sempatik Sinir Sisteminin Aktivasyonu**

Vazomotor merkezde, fiziksel, duygusal veya zihinsel stres varlığında ortaya çıkan sempatik cevapta arteriyel baroreseptörlerin deaktivasyonu sonucu sempatik sinir sistemi aktivitesi artar ve periferik vazokonstriksiyona ve dolayısıyla artmış KB'ye yol açar. Stres, artan sempatik tonusa karşı artmış bir kardiyovasküler reaktivite ortaya çıkarır ve uzun bir süre boyunca KB'nin yüksek kalmasına yol açabilir (95, 96).

- **Total Periferik Vasküler Direnç**

HT patogenezindeki en önemli sebeplerden biri artan TPD'dir. HT'nin ilk aşamalarında, artan intravasküler volüm nedeniyle perfüzyon basıncında artış meydana gelir. Periferik vazokonstriksiyon ile bu durum kompanse edilmeye çalışılır. Zamanla bu periferik vazokonstriksiyonun kalıcı hale gelmesi, yüksek KB'nin sürekliliğine sebep olur (97, 98). Otokrin ve parakrin faktörlerde olduğu gibi endotel fonksiyonundaki değişiklikler de bu artmış vasküler tonusun sürekliliğinde rol oynadığı bilinmektedir (99).

- **Böbrek Kaynaklı Sodyum ve Tuz Tutulumu**

Diyet ile aşırı sodyum alımı ve sodyum duyarlılığı, sıvı hacmini ve ön yükü artırarak HT'ye neden olabilir. Bu durum, kalp debisi ve ayrıca vasküler reaktivite ve kontraktilitede artış ile sonuçlanır (100). HT'nin tuz tüketiminin az olduğu toplumlarda nadir görülmesi düşük tuzlu diyetin HT'ye karşı koruyabileceğini düşündürse de tuzlu diyetin yaygın olduğu Batı dünyasında, sadece üçte bir oranında HT geliştiği göz önüne alındığında aradaki farklılığın sodyuma karşı değişken derecelerde duyarlılıktan kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (98). Duyarlı kişilerdeki böbreklerin artan sodyum yükünü atamaması ve bu nedenle, dolaşımdaki sıvı hacmini artıracak ve dolayısıyla HT'ye yol açabileceği bildirilmiştir (101).

- **Oksidatif Stres**

Oksidatif stres, ROT'a bağlı olarak kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Deneysel kanıtlar, serbest oksijen radikallerinin HT'de önemli bir rol oynadığını göstermektedir (102, 103). Bunlar arasında süperoksit, hidrojen peroksit ve peroksinitrit en çok üzerinde çalışılan maddelerdir. Bu serbest radikallerin normal hücre sinyalinin ve homeostazı sürdürmek için önemli işlevleri olmasına rağmen seviyeleri vücuttaki antioksidan mekanizmaları aştığında serbest oksijen radikalleri hücrelere ve dokulara zarar verebilmektedir (104, 105). Bazı HT formlarında, artmış serbest oksijen radikalleri, esas olarak NOX'lardan ve CYP-A'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. NOX enzim ailesinin dört üyesi olan NOX-1, NOX-2, NOX-4 ve NOX-5, damar yapısında önemli radikal kaynakları olarak tanımlanmıştır (106).

- **Endotel Disfonksiyonu**

HT, endotel aktivasyonu ve disfonksiyonu ile ilişkilidir. Bu durum, yüksek KB'nin hem nedeni hem de sonucu olarak kabul edilebilir. Endotel, diyabet, sigara, hiperlipidemi gibi birçok nedenin yanında yüksek KB'nin sürekliliği ile de aktive olabilir. Bu endotel aktivasyonu, daha sonra kendi içinde yükselen KB'yi devam ettiren değişikliklere neden olur (107). Bu aktive olmuş ve sonrasında hasar görmüş endotelin ana özelliklerinden biri nitrik oksit (NO) salgısındaki düzensizliktir. NO veya ilk adıyla endotelden salınan damar gevşetici faktör vasküler tonusu azaltmaya yardımcı olur. Endoteldeki hasar, azalmış NO üretimine neden olarak endotel-ilişkili vazodilatasyonun azalmasına neden olarak yüksek KB'ye bağlı lokal ve sistemik hasarın oluşmasına katkı

sağlar (108). Bu fenomen, izole organ banyosunda damar gevşeme cevapları esas alınarak da değerlendirilebilmektedir (109).

Oksidatif stres, ROT'ların aşırı üretimi ile endotel hasarına da neden olabilir (110). Endotel disfonksiyonu da oksidatif stresi artırarak daha fazla endotel hasarına ve disfonksiyona yol açabilecek bir kısır döngü oluşturabilmektedir. Oksidatif stresin, NO üretimini azaltabileceği ve KB'nin yüksek değerlerde seyretmesine sebep olabileceği güncel birçok çalışmada gösterilmiştir (110, 111). Gerek klinik (112, 113) gerek deneysel HT çalışmalarında (114, 115) endotelde meydana gelen bir diğer değişiklik, güçlü vazokonstriktör etkilere sahip olan ve endotel tarafından üretilen moleküller olan endotelinlerdeki artıştır. Ek olarak, endotelinlerin kardiyomiyositler üzerinde pozitif inotropik ve pozitif kronotropik etkileri, başta damar olmak üzere birçok doku üzerindeki proliferatif etkileri, hormon salımının uyarmaları ve sempatik sistem aktivasyonunun modülasyonu gibi etkileri olduğu göz önüne alındığında endotel hasarının HT patogenezindeki önemi daha iyi anlaşılacaktır (116). Bunun yanında, güçlü vazodilatör etkiye sahip olan bradikininler, yine endotel tarafından üretilen ACE seviyelerindeki artışla birlikte azalır (117). Kininlerin plazma konsantrasyonunun, KB'yi etkileyecek kadar yüksek olmadığı bildirilmişse de birçok çalışmada parakrin etkileri ile HT patofizyolojisinde rol aldıkları gösterilmiştir. Prostaglandinler gibi diğer endotel-kaynaklı vazodilatör özellikli maddelerin de HT'de azaldığı bildirilmiştir (118).

- **Basınç-Natriürez Geri Bildirim Mekanizması**

Basınç natriürez, arteriyel KB'nin yükselmesi durumunda böbreklerin daha fazla tuz ve su salgıladığı durumu ifade eder (119). Bunun nedeni, artmış arteriyel KB'nin peritübüler kılcal damarlara iletilmesidir ve sonuçta böbrek tübülleri ve glomerül içindeki hidrostatik basıncın artması ve dolayısıyla sodyum ve su geri emiliminin azalmasıdır. Bu durum, damar içi hacmin kapiler basıncı azaltmasına ve geri döndürmesine ve ardından negatif geri bildirim mekanizmasını önlemek için arter basıncının normale dönmesine neden olur. Daha yüksek basınçlara uyum sağlamak için bu geri bildirim mekanizmasının sıfırlanması, bir aşırı yük durumunda böbreklerin artan miktarda sodyum ve su salgılamasına neden olur ve bu da damar içi hacmin artmasına ve dolayısıyla KB'de artışa yol açabilir (98).

Bu geri bildirim mekanizmasına ilişkin muhtemel yollar; sürekli artan emilime bağlı olarak kandaki sodyum artışı ve desensitizasyon ile sonuçlanması, değişen böbrek

fonksiyonları, endotel fonksiyonundaki değişiklikler ve genetik yatkınlık olduğu düşünülmektedir (120-122).

2.3. En Yaygın Deneysel Hipertansiyon Modelleri

HT patogenezinin ait yeni yolların keşfi ve yeni potansiyel tedavi hedeflerine ulaşmak için zebra balığından tavşanlara köpeklerden maymunlara kadar birçok hayvan türü deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda, HT'nin oluşturulması genetik, farmakolojik veya cerrahi yöntemler ile mümkün olabilmektedir. Farmakolojik yöntemler arasında özellikle Ang II, glukokortikoidler, isoproterenol veya deoksikortikosteron asetat (DOCA) kullanılmaktadır (12). Kullanılan deney hayvanlarının ağırlık miktarlarına göre yüksek maliyete sahip olan bu çalışmalar genetik HT modelleri ile de bu açıdan benzer özelliklere sahiptir. Diğer yandan, HT'nin cerrahi olarak indüksiyonu, cerrahi beceri gereksiniminin yanında maliyet açısından oldukça uygun olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Deneysel HT modelleri aşağıda özetlenmiştir:

2.3.1. Genetik olarak Tetiklenmiş Rat Modelleri

Klinikteki farklı etyopatogeneze sahip HT türlerinin çokluğu, HT'nin poligenik özelliği ile birlikte düşünüldüğünde tek bir genetik HT modeli oluşturmak mümkün değildir. Bu nedenle, klinikte görülen HT türü ve patofizyolojisine göre uygun deneysel genetik olarak indüklenmiş HT modelini tercih etmek daha doğru bir yaklaşım olacaktır (123).

- **Dahl'ın Tuz Duyarlığı**

Dahl'ın tuza duyarlı ratları (DSS), 20. yüzyılın ortalarında farklı düzeylerdeki Na⁺ içeren diyetlerin, saf *Sprague Dawley* ırkı ratlardaki KB değerleri üzerine etkilerini inceleyen Lewis Dahl tarafından geliştirilmiştir. Bu ratlarda yüksek tuz içeren diyet ile indüklenmiş HT'nin tespit edilmesi ile elde edilen hipertansif ratlar kendi aralarında melezleştirilerek DSS HT modeli oluşturulmuştur. Bu genetik modelde, genellikle HT'nin böbrek, damar sistemi ve tuza duyarlılığın araştırıldığı çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (124).

- **Spontan Hipertansif Rat**

SHR türü, 1960'larda Okamoto ve arkadaşları tarafından yüksek KB'ye sahip erkek ve dişi Wistar-Kyoto ratların melezleştirilmesiyle elde edilmiştir. Genetik

yatkınlığı olan hipertansif ratların Kyoto ve Yeni Zelanda suşları üzerine yapılan çalışmalar, SHR'de, özellikle santral sinir sistemindeki sempatik aktivasyonun etkilerinin HT patogenezindeki etkilerinin araştırılmasına imkan sağlamıştır (125). Bu genetik model, esansiyel HT'nin bir rat modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanında, inme eğilimli SHR alt türleri de geliştirilmiş ve inme, vasküler hasar, otonomik regülasyon, böbrek dokusu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır (126).

2.3.2. Girişimsel Hipertansiyon Modelleri

İlk defa Goldblatt ve arkadaşları tarafından 1930'larda (127) renal arterlerin klips veya ligasyonu ile kan akımının azaltılmasına bağlı olarak oluşturulan cerrahi HT modeli ile başlamış ve HT araştırmaları için yeni bir sayfa açılmıştır. Bu çalışma ile başlayan süreçte hem böbrek hem de böbrek arterlerinin HT patofizyolojisindeki karmaşık rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır (128). Aynı zamanda başta RAAS başta olmak üzere çeşitli farmakolojik yaklaşımların geliştirilmesine de önemli katkıda bulunmuştur (129). Bu çalışmayı takiben, subtotal nefrektomi, suprarenal veya infrarenal kan akımının azaltılması, böbrek parankiminin kompresyonunu veya sinoaortik baroreseptör denervasyonunu uyararak da HT'nin cerrahi olarak indüksiyonu ile farklı deney modelleri oluşturulmuştur (12).

Renovasküler HT modellerinin ortak patogenezi, damar ve hedef organ hasarıdır. Bu durum, renal perfüzyon basıncının düşmesi, RAAS aktivasyonu sonucu oluşan vazokonstriksiyon ve sistemik Na⁺ ve su tutulumu ile açıklanmıştır (130). Sistemik HT; progresif endotel disfonksiyonu ve uç organ hasarına neden olurken böbreklere kan akışının uzun süreli azalması da doku iskemisine ve ardından hipoksi ile tetiklenen faktörler ve enflamasyonu aktive eden oksidatif stresin artışı ile sonuçlanır ve vasküler yeniden şekillenme, fibrozis ve böbrek fonksiyon kaybına neden olabilir (131).

2.3.3. Farmakolojik Yöntemlerle Oluşturulan Hipertansiyon Modelleri

- **Anjiyotensin II ile İndüklenmiş Hipertansiyon**

1980'ler; ACE inhibitörlerinin keşfi, Ang II reseptörlerinin tanımlanması ve Ang II analoglarının ve blokerlerinin keşfi ve ilgili amino asitlerinin kimyasal yapılarının ortaya çıkarılması ile HT alanındaki bilimsel çalışmalar açısından oldukça önemli bir dönüm noktasıdır (132). RAAS, vücutta sodyum ve su homeostazında oldukça önemlidir (133). Ang II ile indüklenmiş HT modeli, özellikle kemirgenlerde en yaygın olarak

kullanılan deneysel HT modelleri arasındadır. Bu model, klinik HT'nin hem hemodinamik özelliklerinin yanı sıra vasküler endotel hasarı, oksidatif stres, kardiyak ve vasküler hipertrofi ve RAAS aktivasyonundan dolayı sık tercih edilmektedir (12). RAAS'ın esansiyel HT'deki rolü ve etkileri, deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan Ang II dozları ile elde edilen yüksek KB değerleri ile ve patofizyolojik yollar incelendiğinde özellikle Evre 2 ve 3 HT ile oldukça benzerdir (134-136).

Ang II'nin vazokonstriktif etkisi, çoğunlukla sistemik arteriyollerde gerçekleşir. Burada, Ang II, G proteinine bağlı reseptörlere bağlanır ve güçlü arteriolar vazokonstriksiyon ile sonuçlanan ikincil bir haberci kaskadı oluşturur. Bu, TPD'yi artırarak KB'de artış ile sonuçlanır. Ang II, ayrıca adrenal korteks, özellikle *zona glomeruloza*'dan aldosteron salımını uyarır. Aldosteron, nefronun distal tübül ve toplama kanalında sodyum geri emilimini ve potasyum atılımını artıran bir steroid hormondur. Aldosteron, lümende yer alan Na⁺ kanallarının ve bazolateral Na-K ATPaz'ı uyararak çalışır. Net etki, sodyum reabsorpsiyon düzeyindeki artıştır. Ang II'nin vazokonstriktif ve sol ventrikül kasılma miktarını artırarak yaptığı KB yüksekliği hızlı etkileri olarak tanımlanırken aldosteronun etkilerinin başlaması saatler veya günler alabileceğinden yavaş presör etki olarak ifade edilmektedir (137). Bunların dışında Ang II, arka hipofizden antidiüretik hormon (ADH) salımını uyarır. ADH veya vazopressin, toplayıcı kanaldaki aquaporin kanalları üzerinden böbrekte suyun yeniden emilimini artırır (138). Son olarak, Ang II, baroreseptör refleksinin duyarlılığını azaltır. Bu, RAAS'ın amacına ters düşecek olan KB'deki bir artışa baroreseptör tepkisini azaltır (139).

Ciuceis ve arkadaşları, 220-225 g ağırlığındaki erkek *Sprague Dawley* ırkı ratlara 120 ng/kg/dk hızında 2 hafta boyunca Ang II infüzyonu ile deneysel HT modeli oluşturarak ve PPAR α agonisti fenofibrat ve PPAR γ agonisti rosiglitazonun etkililiğini araştırmışlardır. Ang II ile indüklenmiş HT grubunda ortalama KB 130 mmHg olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında Ang II ile indüklenmiş ratların damarlarının Kontrol grubuna kıyaslandığında asetilkoline (Ach) verdiği gevşeme cevabının anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (p<0.01). Benzer şekilde vasküler enflamasyon parametrelerinden NF- κ B ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)'in de Ang II ile indüklenen HT grubunda belirgin şekilde etkilendiği gösterilmiştir (140).

Hong ve arkadaşları, erkek *Sprague Dawley* ırkı ratlara ozmotik pompa ile 2 hafta boyunca 80 ng/kg/dk infüzyon hızında Ang II uygulamışlardır. Kontrol grubuna kıyaslandığında Ang II infüzyonu alan grupta KB'deki artışın yanında vasküler ve

miyokardiyal enflamasyon ve kardiyak fibrozis geliştiği gösterilmiştir. Bu durum fibronektin, kollajen birikimi, makrofaj infiltrasyonu, MCP-1 ekspresyon artışı ve ekokardiyografik analizlerle tespit edilmiştir (141).

Dange ve arkadaşlarının çalışmasında benzer şekilde *Sprague Dawley* ırkı erkek ratlara 2 hafta boyunca 80 ng/kg/dk infüzyon hızında Ang II uygulaması sonucunda miyokardiyal dokudaki tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), İL-1 β , indüklenbilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) ve NF- κ B düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı gösterilmiştir (142).

- **Mineralokortikoid-Tuz Bağımlı Hipertansiyon**

Yaklaşık 70 yıl önce Hans Selye tarafından (143) adrenal hormonların damar ve birçok dokuda granülasyon dokusunun oluşmasındaki rolü tanımlanmıştır. Ancak, Brilla ve Weber tarafından 1992'de uygunsuz aldosteron-tuz HT modeli geliştirilebilmiş ve mineralokortikoidler üzerindeki çalışmalar yaygınlaşmaya başlamıştır (144). Mineralokortikoid ve diyet ile yüksek tuz alımı kombinasyonunun, özellikle klinikte düşük renin düzeyleri ile seyreden HT'ye benzerlik göstermesi bu deney modelinin en önemli özelliğidir (145). Sekonder HT sebeplerinden biri olan hiperaldosteronizmi olmayan hastalarda bile, dirençli HT gelişmesi durumunda mineralokortikoid reseptör blokajının faydalı olabileceğine dair çalışmalar bu deney modeli ile ortaya çıkmıştır (12).

Diyette yüksek miktarlarda tuz alımına genellikle DOCA kombinasyonu, mineralokortikoid-tuz HT modeli için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Deoksikortikosteronun hem glikokortikoid hem de mineralokortikoid özelliklere sahip olmasının yanında sodyum atılımını önlemesi bu deney modeli açısından oldukça önemlidir. Diğer yandan, mineralokortikoidler aldosteronlara göre daha zayıf etkili olmalarına rağmen mineralokortikoid bağımlı HT'nin en yaygın klinik formu olan hiperaldosteronizm açısından bu deney modelini önemli kılar (146).

- **GFR-Bağımlı Hipertansiyon**

Bilateral nefrektomi yapılan köpeklerde HT oluşumu ilk olarak 1936'da Harrison ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (147). Bu çalışma sonrasında kronik böbrek yetmezliği ile HT prevalansı arasındaki ilişki, GFR-bağımlı (renoprival) modellerin yaygınlaşmasına neden olmuştur. Örneğin, terminal dönem böbrek yetmezliği olan hastaların büyük bir çoğunluğuna HT eşlik etmektedir. Bu nedenle kronik böbrek yetmezliğine giden hastalardaki HT etyopatogenezinin araştırılması için uygun bir deney

modeli olarak kabul edilmektedir. Ek olarak, nefron sayısındaki ve işlevselliğindeki azalmadan dolayı Na^+ ve Cl^- atılımındaki azalma da yine KBY kliniğindeki yaygın ödemi açıklamaktadır (12).

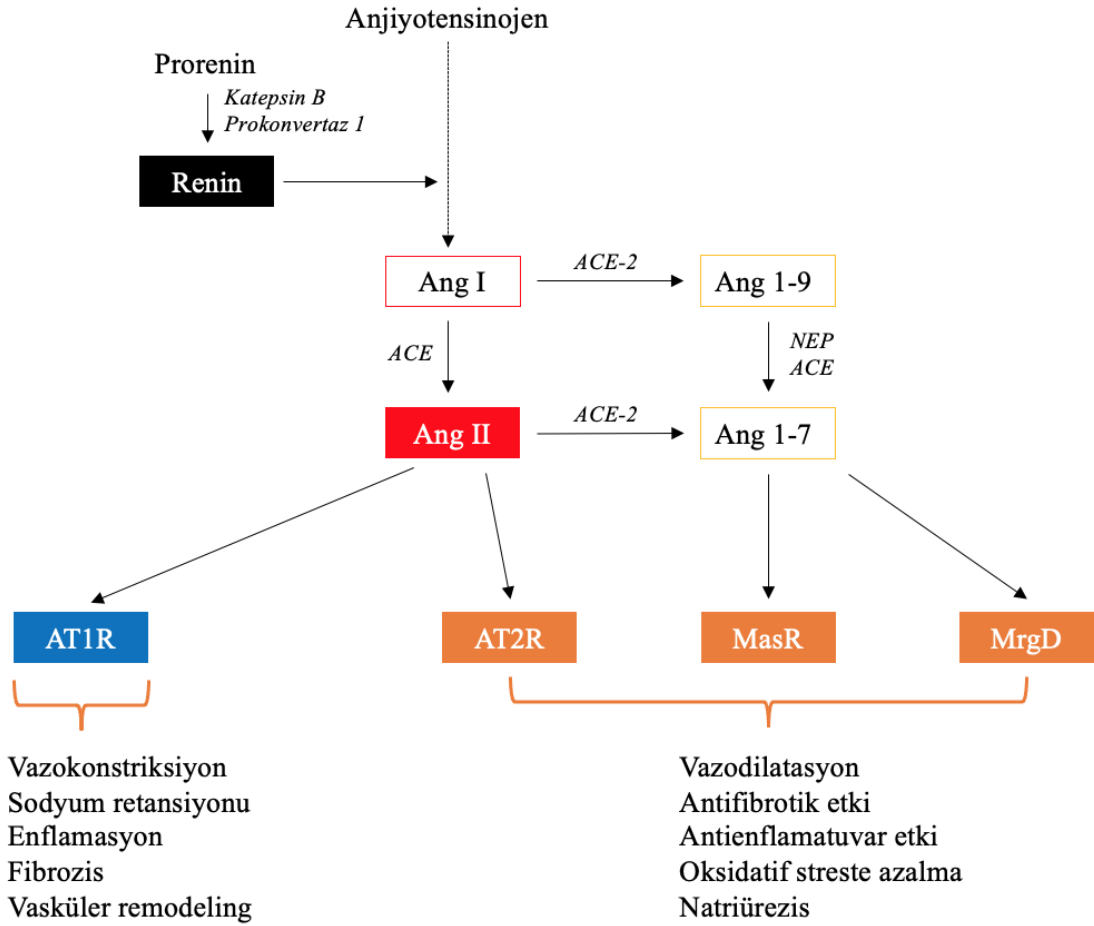
- **Nitrik Oksit İnhibisyonu ile Oluşturulan Hipertansiyon**

NO, lokal ve sistemik vazokonstriktörlerin etkilerini KB ve organ perfüzyonları açısından düzenler. Buradan yola çıkarak NO inhibisyonunun vazokonstriktörlerin KB üzerindeki etkilerinin belirginleşmesi esasına dayanarak yeni bir deneysel HT modeli oluşturulmuştur. 1990'da Gardiner ve arkadaşları, ratlarda NO sentaz inhibitörü olan L-NG-monometil arjinin sitrat (L-NMMA)'nın kısa süreli etkisinde KB'da artışa neden olduğunu göstermişlerdir (148). Ardından, Ribeiro ve arkadaşları, Wistar ratlara bir L-arginin nitro türevi olan NO inhibitörü L-NAME uygulamış ve sistolik KB'nin yaklaşık olarak 50-60 mmHg artmasının yanında bu ratlarda renal vazokonstriksiyon ve hipoperfüzyon geliştiğini bildirmişlerdir (149). Bu deney modeliyle endotel hasarının yanında uzun dönem kardiyak, vasküler ve renal fibrozis açısından önemli olabilecek birçok patogenezi çalışması yapılmıştır (103, 150).

2.4. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi

RAAS aktivasyonu, endotel hücre disfonksiyonu, vasküler ve kardiyak yeniden şekillenme, sol ventrikül hipertrofisi, aorttaki internal elastik laminanın genişlemesi, vasküler düz kas hipertrofisi, afferent arteriyollerdeki konstriksiyon ve renal Na^+ tutulumu gibi HT patofizyolojisinde rol alan birçok faktör ile doğrudan ilişkili olduğundan KB üzerinde oldukça önemli etkilere sahiptir (Şekil 2.2).

RAAS'ın günümüzde anlaşılması lokal (doku) RAAS'ı içerir; Ang II sentezi için alternatif yollar (ACE ve renin bağımsız); ACE/Ang II/AT1R ekseninin vazokonstriktör etkilerine karşı gelen bir ACE-2/Ang (1-7)/Mas reseptör eksenini; beyin fonksiyonlarında ve bilişte önemli olan bir Ang IV/AT4 reseptör eksenini; Ang (1-9), Ang III, Ang (3-7), Ang A ve ALA gibi çoklu biyolojik olarak aktif Ang peptitleri; Ang için çoklu reseptörler (AT1, AT2, Ang II tip 4 (AT4), Mas ve MrgD); ve prorenin reseptörü (PRR) olarak tanımlanmıştır. Bu yolların aktivasyonu kardiyovasküler ve renal hastalıkta patofizyolojik sonuçların temelini oluşturur (20, 151).



Şekil 2.2. Renin-anjyotensin-aldosteron sistemi elementleri.

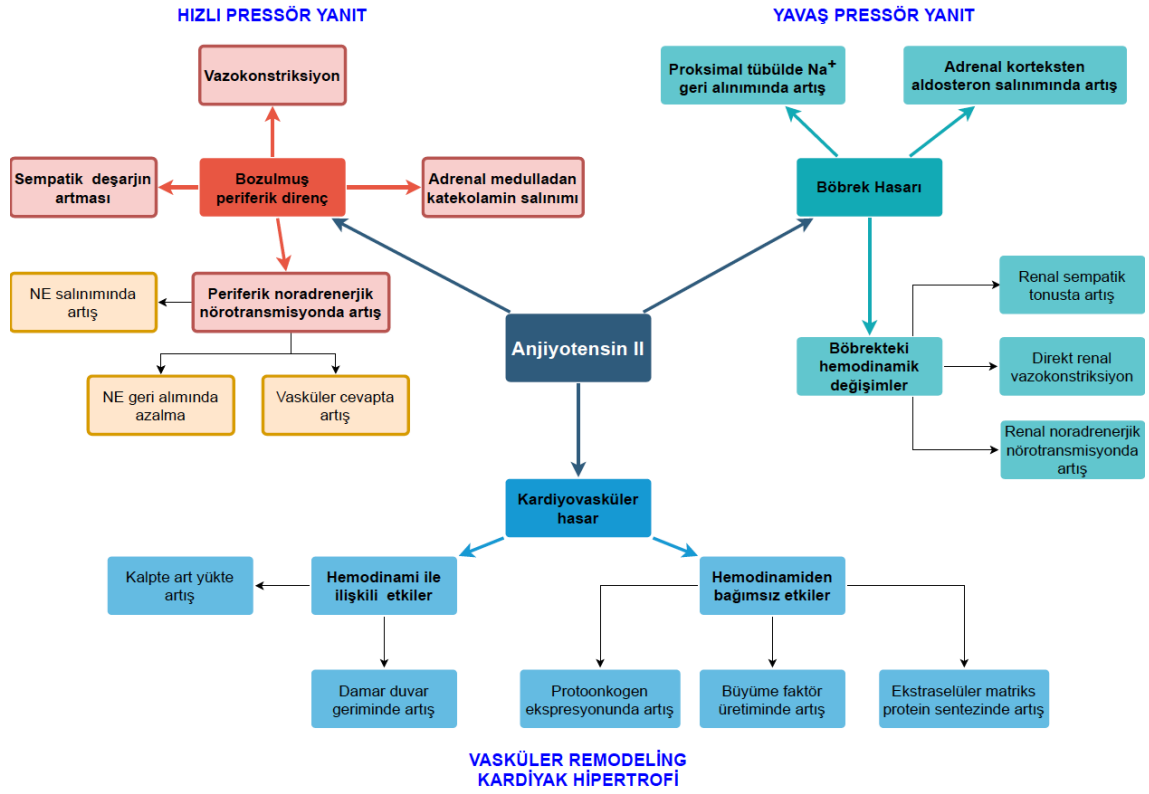
2.4.1. Renin

1940 yılında, Braun-Menéndez ve arkadaşları, renin'in eskiden "hipertensin" olarak adlandırılan ve yeni ismi "anjyotonin" olan gerçek bir presör peptit Ang I'in oluşumunu katalize eden bir enzim olduğunu bildirmişlerdir (152). Renin'in temel iki görevi, anjyotensinojeni Ang I'e dönüştürmek ve prorenin'in renin reseptörünü (PRR) uyarmaktır. Jukstaglomerüler (JG) hücrelerde depolanan renin, renal afferent arteriyol basıncında meydana gelecek bir azalmanın yanında makula densa tarafından algılanan Na^+ miktarındaki azalma ve β_1 -adrenerjik reseptörlerin uyarılması durumunda salımı artar ve KB artmaya başlar. Güncel çalışmalar, PRR'nin Ang II'nin etkilerinden bağımsız bir şekilde de HT'nin oluşumunda ve komplikasyonlarında rol aldığını göstermiştir (153).

2.4.2. Anjiyotensin II

Ang II, iki proteolitik basamakta anjiyotensinojenden sentezlenir (154). Önce böbreklerde JG hücrelerden dolaşıma salıverilen renin, karaciğer tarafından üretilen ve dolaşıma salınan bir α -2-globulin olan anjiyotensinojenin amino ucundan dekapeptit Ang I'i ayırır. Daha sonra endotelial hücre zarı üzerinde bulunan ACE, Ang I'in karboksil terminal dipeptidini uzaklaştırarak Ang II'yi oluşturur. Bu enzimatik basamaklar Şekil 2.2'de özetlenmiştir. Ang II, etkisini G protein bitişik AT1R ve AT2R'ye bağlanarak gösterir. Bunun yanında RAAS'ın parakrin, otokrin ve endokrin sistemler arasında da bağlantıları vardır (155).

Ang II'nin subpressor dozlarda infüzyon şeklinde uygulanması, birkaç gün içerisinde KB'de artışla sonuçlandığı birçok çalışmada gösterilmiştir (141, 156). Ang II'nin yavaş pressör yanıtta kalp ve aort dokularında fibrozis veya hipertrofi gibi yapısal değişikliklerin oluşması daha güçtür. Medyan etkin konsantrasyonu (EC_{50}) 0.3 nM olan Ang II, norepinefrin (NE)'e göre çok daha potent bir yapıya sahiptir. Genel olarak Ang II'nin intravenöz veya infüzyon şeklinde uygulanması, ortalama KB'yi artırdığından klinik pratikte sepsis başta olmak üzere şiddetli hipotansiyonun seyrettiği klinik durumlarda hidrasyon sonrasında NE, dopamin gibi pozitif inotropik ilaçlara alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ang II, kardiyomiyositlerdeki voltaja bağlı Ca^{+2} kanalları aracılığıyla kardiyak kontraktiliteyi ve sempatik sinir uçlarından NE salımını artırdığı, NE geri alımını azalttığı ve adrenal medulladan katekolamin salımını artırarak kalp atım hızını (KH) da doz bağımlı olarak artırdığı bilinmektedir. Arteriyel KB'deki Ang II'ye bağlı oluşan bu artış, fizyolojik olarak barorefleks duyarlılığı gibi negatif geri bildirim mekanizmalar ile sempatik tonusun azalması ve vagal tonusun artması ile sonuçlanması beklenirken Ang II, bu refleksin duyarlılığını da azaltarak ortalama KB'nin yüksek seyretmesini sağlar. Ancak, fizyolojik yollar ve Ang II'nin doz bağımlı etkilerini göz önüne aldığımızda, kardiyak kontraktilite, KH ve ejeksiyon fraksiyonunu artırabileceği, azaltabileceği veya etkilemeyebileceği unutulmamalıdır. Yavaş pressör yanıtta ise böbrek hasarına sekonder proksimal tübülden sodyum geri alımında artış ve adrenal korteksten aldosteron salımında artış olması gibi daha çok günler içerisinde ortaya çıkan etkiler görülür. Ortalama KB üzerindeki etkilerine ilaveten Ang II, kardiyak ve vasküler hipertrofi, damar ECM kompozisyonunda bozulma, kardiyomiyosit dejenerasyonu ve fibrozise de yol açabilmektedir (157, 158) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Ang II'nin yavaş ve hızlı presör etkileri. Şekil, Acet H.A. ve Parlakpınar H. (2020) ACET Kardiyovasküler Sistem Farmakolojisi, 1. Baskı. Malatya, İnönü Üniversitesi Yayınevi kitabından uyarlanmıştır.

Ang II, sistemik vasküler yapılar üzerinde direkt ve indirekt yolakla TPD'yi artırır. Direkt vazokonstriksiyon, damar düz kas hücreleri üzerinde bulunan ve AT1R bitişik Gq-PLC-IP₃-Ca²⁺ yolağını uyararak prekapiller arteriyolları ve postkapiller venülleri daraltır. Direkt vazokonstriksiyon, yavaş pressör yanıt olarak belirgin olarak renal arterlerde görülür (159). Bununla birlikte, Ang II ile indüklenmiş deneysel HT çalışmalarında doz ve süre bağımlı olarak enflamasyon, glomerüler hasar, büyüme faktörleri, apoptoz ve oksidatif stres açısından da artış saptanmıştır (Tablo 2.3) (12, 24, 160).

Tablo 2.3. Ang II'nin farklı dokular üzerindeki etkileri.

Aldosteron sentez ve salımında artış	İnterstisyel ödem ve fibrozis
Apopitozis	Kardiyak hipertrofi
Endotel aktivasyonu ve disfonksiyonu	Oksidatif stres
Glomerüler fibrozis	Renal Na ⁺ geri emiliminde artış
Hiperkoagülasyon	Vasküler hipertrofi
Enflamasyon	Vazokonstriksiyon

2.4.3. Anjiyotensin II Tip 1 ve Tip 2 Reseptör

Ang II tip 1 reseptörünün (AT1R) aracılık ettiği etkileri ile Ang II, TPD'nin yanı sıra artmış renovasküler direnç ve tuz duyarlılığının bir aracı olan medüller akışta azalmaya neden olan güçlü bir vasküler düz kas vazokonstriktörüdür. Ek olarak, renal, kardiyak ve vasküler hasara profibrotik ve proenflamatuvar değişiklikler ile sebep olabileceği bildirilmiştir. AT1R'nin aksine Ang II tip 2 reseptörü (AT2R) ise vazodilatasyon, natriürez ve antiproliferatif etkileri sayesinde kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu etkilere aracılık ettiği bilinmektedir. AT1a reseptörleri vasküler düz kaslarda bol miktarda bulunurken, AT1b reseptörleri ağırlıklı olarak hipofiz bezi, adrenal ve periventriküler serebral alanlarda bulunur. Bu nedenle, AT1a reseptörlerinin vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı ve AT1b reseptörlerinin hormonal kontrol ve ozmotik regülasyondan sorumlu olduğu varsayılmaktadır. AT1'in aksine, AT2R'nin doğumdan sonra ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı ve ekspresyonunun sadece adrenal medulla, kalp, over ve uterus ile sınırlı olduğu bildirilmiştir (161).

2.4.4. Mas Reseptör

Yaffe ve Schatz tarafından 1984 yılında yayımlanan çalışmada, proteinlerin mitokondriye aktarımında görev alan bir mutant keşfedilmiş ve "*mitochondrial assembly 1*" (Mas1) olarak isimlendirilmiştir (162). Ardından, Young ve arkadaşları, 1986'da proto-onkogen olarak tanımlanan bir insan epidermoid karsinom hücre dizisinin DNA'sından Mas olarak tanımladıkları yeni bir gen izole etmişlerdir (163). Bu keşif süreci, 1988'de Witte ve arkadaşlarının, mitokondriyal süreçlerde rol alan ve hücre canlılığı için gerekli olan bir proteazın katalitik alt birimini kodlayan Mas1 geni (YLR163C) ile devam etmiştir. Başlangıçta Mas proteininin işlevi kesin ve detaylı olarak

bilinmese de 2000'lerin başında Ang (1-7) sinyallerini sağlayan G protein bağlı reseptör (GPCR) olarak tanımlanmıştır (164).

- **Mas Reseptör Agonisti Olarak AVE0991**

AVE0991 (5-formil-4-metoksi-2-fenil-1-[[4-[2-etil-aminokarbonilsülfonamido-5-izobutil-3-tienil]-fenil]-metil]-imidiazol), Mas reseptörüne bağlanarak damarlar, böbrekler ve kalp üzerine koruyucu etkileri olan nonpeptit yapıda ve oral olarak aktif bir bileşiktir (22). Pinheiro ve ark., AVE0991'in hipervolemi oluşturulmuş C57/BL6 farelerde, üriner osmolarite artışının neden olduğu üriner hacmi önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (21). Ancak Mas reseptörleri baskılanmış farelerde AVE0991'in antidiüretik etkisi görülmemiştir. Ek olarak, AVE0991, SHR'lerde ek olarak L-NAME ile indüklenmiş HT modelinde, uç organ hasarına karşı koruyucu etkililik göstermiştir (165). AVE0991 uygulamasının izole edilmiş SHR'lerde sol ventrikül kontraktilitesini ve iskemi-reperfüzyon sonrası koroner kan akışını regüle ettiği, L-NAME ile indüklenen KB artışını önlediği, mezenterik arterde vazokonstriktör cevabı azalttığı, üriner protein atılımını azalttığı ve böbrekler, kalp, mezenterik arter ve KB'deki değişiklikler ile ortaya çıkan morfolojik hasarlardan koruduğu bildirilmiştir (166). Faria-Silva ve ark., Ang-(1-7) ile birlikte AVE0991'in de Wistar ratlarda Ach aracılı vazodilatasyon oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu etkiler Mas antagonisti A-779 ve L-NAME tarafından baskılanmıştır ve bu potansiyalize etkiler nitroprussit ile gözlenmemiştir. Bu bulgular, Mas stimülasyonunun NO salımını kolaylaştırarak endotel fonksiyonunu iyileştirdiğini göstermektedir (19). Bir diğer çalışmada, AVE0991'in 1000 ng/kg/dk Ang II infüzyonu uygulanan ApoE geni silinmiş farelerde, MCP-1, TNF- α , MMP-2 ve MMP-9 düzeylerini azaltarak abdominal aort anevrizması gelişme insidansını azalttığı bildirilmiştir (167). Ebermann ve arkadaşları tarafından streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik ratlarda, AVE0991'in etkilenmiş sistolik KB, sol ventrikül kasılma cevabı göstergesi olan dP/dt_{max} ve sol ventrikül gevşeme cevabı belirteci olan dP/dt_{min} 'yi anlamlı olarak iyileştirdiği gösterilmiştir (168). Yine *Sprague Dawley* ırkı ratlardan izole edilen kardiyomiyositlere 10^{-6} mol/L Ang II uygulanmış ve AVE0991'in miyokardiyal hipertrofi üzerindeki hücresel cevaplarının araştırıldığı çalışmada, koruyucu etkililiğin TGF- β 1/Smad2 yolağını inhibe etmesiyle ortaya çıktığı saptanmıştır (169).

2.4.5. Mas Reseptör İlişkili G-protein Bağlı Reseptör Membran D

MrgD, 2001 yılında kemirgen ve insan genomlarında yeni bir GPCR olarak tanımlanmıştır (170). HGPCR45 (171) veya TGR7 (172) olarak da isimlendirilmiştir.

Habiyakare ve arkadaşlarının tavşanlar üzerinde MrgD agonisti ALA'nın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, MrgD ekspresyonunun arteriyel düz kas hücrelerinde, eNOS-pozitif endotel hücrelerinde ve aterosklerotik plaklarda artış gösterdiği tespit edilmiştir (173). Başka bir çalışmada ise MrgD'nin vücutta en sık damarlarda ve kardiyomiyositlerde bulunduğu gösterilmiştir (174). Bu tespitler, MrgD'nin kardiyovasküler hastalıklar açısından önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, SHR'lerde kardiyak hipertrofi oluşturulan deneysel HT modelinde ALA, MrgD üzerinden bu etkiye karşı etkili bulunmuştur (175).

- **MrgD Agonisti olarak Alamandin**

ALA, Ang (1-7)'den Asp1 rezidüsünün N-terminalindeki Ala1 rezidüsüne dekarboksilasyonu sonucu oluşur. ALA, Ang (1-7)'ye benzer vazodilatör ve antifibrotik etkilerini MrgD üzerinden gösterir (176). ALA'ya bağlı MrgD aktivasyonunun KB üzerine etkisini gösteren birkaç çalışma yayımlanmıştır. Örneğin; renovasküler hipertansif ratlarda ALA infüzyonu, iki fazlı bir hemodinamik etki göstermiştir. Normotansif ratlarda AT1R aracılı sinyal, renovasküler HT modelinde (2K1C) ise PD123319'a duyarlı bir reseptör aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (177). PD123319, spesifik bir AT2R inhibitörü olarak biliniyor olsa da *knock-out* hayvanların kullanıldığı deneylerde MrgD'yi de inhibe ettiği gösterilmiştir (178). ALA'nın *in vivo* β -siklodekstrinli oral dozları, SHR'lerde uzun süreli bir antihipertansif etkinin yanında izoprotenerol uygulamasına karşı antifibrotik etki göstermiştir (176). ALA'nın 5'AMP ile aktive edilen protein kinaz (AMPK)/NO yolunu içeren MrgD aktivasyonu yoluyla Ang II ile indüklenen kardiyomiyosit hipertrofisini önlediği gösterilmiştir (179). Normotansif *Sprague Dawley* ırkı ratlarda, ALA uygulaması, *in vivo* olarak MrgD aktivasyonu yoluyla ANP plazma seviyesini artırmış ve apoptozu azaltmıştır. Bunun yanında antioksidan protein ekspresyonunu artırırken, postiskemik sol ventrikül basıncını regüle etmiş ve enfarkt alanını azaltmıştır (180). Benzer şekilde, 50 mcg/kg/gün infüzyon hızında 6 hafta ALA uygulanan SHR'lerde sistolik KB'nin düşmesinin yanında ANP'nin mRNA seviyelerinde sağladığı azalma ile kardiyak hipertrofiyi baskıladığı gösterilmiştir (175). Huang ve arkadaşlarının, karbon tetraklorid ile oluşturulmuş hepatik fibrozis modelinde, 25 mcg/kg/sa infüzyon hızında uygulanan ALA'nın oksidatif stres belirteçleri olan H₂O₂

ve NOX-4 düzeylerini baskıladığı gösterilmiştir (181). Transvers aortik konstriksiyon modeli ile arteriyel remodeling oluşturulan C57BL/6J farelerde, 30 mcg/kg/gün oral olarak verilen ALA'nın asendan aorttaki tunika media kalınlığını, tunika adventisyadaki enflamatuvar hücre göçünü, total kolajen miktarını, TGF- β , TNF- α ve İL-1 β düzeylerini azaltarak vasküler koruyucu etki göstermiştir (182). Yine aynı deney modelinde kardiyak remodeling üzerine aynı doz ve sürede uygulanan ALA'nın etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise ALA'nın ERK_{1/2} yolağı ve AMPK yolağı üzerindeki etkileri ile kardiyomiyosit hipertrofisini ve kardiyak fibrozisi önlediğini, bir önceki çalışma ile uyumlu olarak sol ventriküldeki total kolajen miktarı, TGF- β ve MMP-2 düzeylerini anlamlı olarak iyileştirerek kardiyak remodelingi önlediği gösterilmiştir (183). Li ve arkadaşlarının, sepsis ilişkili kardiyak disfonksiyon modelinde, ALA'nın eNOS ve iNOS ekspresyonlarını artırarak KB değerlerini iyileştirdiği ve lipopolisakkarit ile indüklenmiş miyokardiyal enflamasyon, apoptoz ve otofajiyi azalttığı saptanmıştır (184). Song ve Yang'ın miyokardiyal iskemi-reperfüzyon modelinde ALA'nın koruyucu etkililiğini araştırdığı çalışmalarında, ALA'nın iskemi-reperfüzyon hasarını C-Jun-N-terminal kinaz ve NF- κ B ekspresyonlarını ve TNF- α , İL-1 β ve İL-6 düzeylerini azaltarak hem kalp dokusundaki histopatolojik hasarı hem de hemodinamik parametreleri iyileştirdiği tespit edilmiştir (185).

Spesifik Mas ve MrgD agonistleri kullanılarak günümüzde Ang (1-7)/Mas ve Ang (1-7)/MrgD yolağı üzerinde etkili ilaçların kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere terapötik etkileri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda, etkililikleri araştırılan ilaçların henüz klinikte kullanılmamalarından dolayı deneysel çalışma ile kanıt düzeyi oluşturulması amaçlandı.

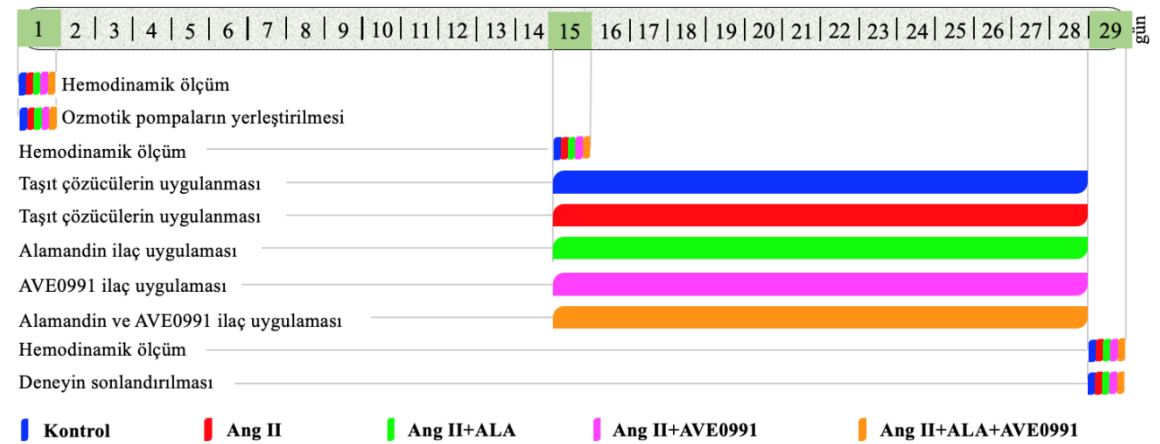
3.1. Deneysel Hayvanlarının Özellikleri ve Yaşam Koşulları

Anabilim dalımızda daha önceki kardiyovasküler çalışmalarımız (186, 187) erkek ratlarda yapılmış olup ölçülen KB ve KH gibi hemodinamik parametrelerin laboratuvarımızdaki ortalama değerlere uygunluğu, deney modelimiz hakkında bizi yönlendirmiş olup östrojenin antioksidan vb. özellikleri ile kardiyovasküler sistemde koruyucu etkilerinden dolayı erkek ratlar tercih edilmiştir (188).

Deneylere başlamadan önce, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na başvuru yapıldı ve 02.04.2020 tarihli toplantıda 2020/5-3 karar sayı ve 9739 HAYBİS kayıt no ile etik kurul onayı alındı. Deneylerde İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezince üretilen *Sprague Dawley* ırkı, 3-4 aylık, 300-400 g ağırlığında 40 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar, sıcaklık ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) ve nem ($55\pm 5\%$) kontrollü odalarda 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü altındaki yaşam odalarında barındırıldı. Ratların beslenmesinde 8 mm'lik standart pelet yem kullanıldı ve içme suyuna erişimi *ad libitum* olarak sağlandı.

3.2. Çalışma Tasarımı

40 adet 3-4 aylık *Sprague Dawley* ırkı erkek rat, basit randomizasyon tekniği ile 5 gruba (n=8) ayrıldı. Gruplar ve uygulama prosedürleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Deneysel akış şeması

Kontrol grubu (n=8): Deney öncesinde mini ozmotik pompalar (Alzet® 2004 model) Ang II çözücüsü SF ile dolduruldu. Ozmotik pompalar, 48 saat 37°C etüvde bekletildikten sonra intraperitoneal (ip) 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin uygulanan ratlarda interskapular bölgeye yerleştirildi ve 1, 15 ve 29. günlerde kuyruktan hemodinamik ölçümler yapıldı. Deneyin 15. gününden itibaren ratlara 0.4 ml %3'lük DMSO ip olarak uygulandı. 29. günde kalp ve damar dokuları ile kan numuneleri alınarak çalışma sonlandırıldı. Ratlar bu süre içerisinde normal içme suyu ve standart yem ile beslendi.

Ang II grubu (n=8): Deney öncesinde mini ozmotik pompalar (Alzet® 2004 model) Ang II içeren çözelti ile dolduruldu. Ozmotik pompalar, 48 saat 37°C etüvde bekletildikten sonra ip 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında interskapular bölgeye yerleştirildi ve 1, 15 ve 29. günlerde kuyruktan hemodinamik ölçümler yapıldı. Deneyin 15. gününden itibaren ratlara 0.4 ml %3'lük DMSO ip olarak uygulandı. 29. günde kalp ve damar dokuları ile kan numuneleri alınarak çalışma sonlandırıldı. Ratlar bu süre içerisinde normal içme suyu ve standart yem ile beslendi.

Ang II+ALA grubu (n=8): Deney öncesinde mini ozmotik pompalar (Alzet® 2004 model) Ang II içeren çözelti ile dolduruldu. Ozmotik pompalar, 48 saat 37°C etüvde bekletildikten sonra ip 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında interskapular bölgeye yerleştirildi ve 1, 15 ve 29. günlerde kuyruktan hemodinamik ölçümler yapıldı. Deneyin 15. gününden itibaren 0.4 mL %3'lük DMSO içerisinde çözünen ALA (50 mcg/kg) 2 hafta boyunca ip yolla verildi. 29. günde kalp ve damar dokuları ile kan numuneleri alınarak çalışma sonlandırıldı. Ratlar bu süre içerisinde normal içme suyu ve standart yem ile beslendi.

Ang II+AVE 0991 grubu (n=8): Deney öncesinde mini ozmotik pompalar (Alzet® 2004 model) Ang II içeren çözelti ile dolduruldu. Ozmotik pompalar, 48 saat 37°C etüvde bekletildikten sonra ip 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında interskapular bölgeye yerleştirildi ve 1, 15 ve 29. günlerde kuyruktan hemodinamik ölçümler yapıldı. Deneyin 15.gününden itibaren 0.4 mL %3'lük DMSO içeren SF içerisinde çözünen AVE0991 (576 mcg/kg) 2 hafta boyunca ip yolla verildi. 29. günde kalp ve damar dokuları ile kan numuneleri alınarak çalışma sonlandırıldı. Ratlar bu süre içerisinde normal içme suyu ve standart yem ile beslendi.

Ang II+ALA+AVE 0991 grubu (n=8): Deney öncesinde mini ozmotik pompalar (Alzet® 2004 model) Ang II içeren çözelti ile dolduruldu. Ozmotik pompalar, 48 saat

37°C etüvde bekletildikten sonra ip 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında interskapular bölgeye yerleştirildi ve 1, 15 ve 29. günlerde kuyruktan hemodinamik ölçümler yapıldı. Deneyin 15. gününden itibaren 0.4 mL %3'lük DMSO içeren SF içerisinde çözünen AVE0991 (576 mcg/kg) ve 0.4 mL SF içerisinde çözünen ALA (50 mcg/kg) 2 hafta boyunca ip yolla verildi. 29. günde kalp ve damar dokuları ile kan numuneleri alınarak çalışma sonlandırıldı. Ratlar bu süre içerisinde normal içme suyu ve standart yem ile beslendi.

3.2.1. Deney Hayvanlarının ve Kalp Ağırlık Ölçümlerinin Yapılması

Deney başlangıcında her gruptaki rat, kuyruğuna konulan boyalı işaretler ile numaralandırıldı. Böylelikle çalışmamızda her bir rata ait bireysel değişimlerin de kayıt altına alınması sağlandı. Deneyin 1, 15 ve 29. günlerinde deney hayvanlarının ağırlıkları ve deney sonlandırma aşamasında kan örneği alındıktan sonra SF içerisinde pıhtılardan arındırılan kalp ve torasik aort dokusu kurutulup kalp ağırlıkları ölçüldü.

3.3. Anjiyotensin II İnfüzyonu ile İndüklenmiş Deneysel Hipertansiyon Modelinin Oluşturulması

Ratlara, 80 ng/kg/dk salım yapacak miktarda önceden hazırlanmış Ang II (Angiotensin II (human), vasoconstrictor peptide, ab120183, Abcam, Cambridge, UK) çözeltisi mini ozmotik pompalara (Alzet® mini-ozmotik pompa, model 2004, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) dolduruldu. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi Ang II salımı 28 gün boyunca sürdürüldü.

3.3.1. Ozmotik Pompalara Konulacak İlaç Dozlarının Hesaplanması

Ozmotik pompalar, üretici firmanın yönergelerine göre hazırlandı ve doluluğundan emin olmak için rezervuarın taşması esas alındı. Ozmotik pompanın istenen düzeyde Ang II salabilmesi için gerekli olan konsantrasyon (C_{AngII}) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

$$C_{AngII} \text{ (mcg/mcl)} = \frac{\text{İstenen doz (mcg/kg/saat)} \times \text{Rat ağırlığı (kg)}}{\text{OSH (mcl/saat)}}$$

Hedeflenen doz 4.8 mcg/kg/saat (80 ng/kg/dk) olduğunda, ortalama salım hızı (OSH) 0.23 ± 0.02 mcl/saat idi ve ratın ağırlığı (kg) implantasyon işleminden 2 gün önce yani ozmotik pompanın dolununun gerçekleştiği gün ölçüldü. Kütle salım hızı, üretici tarafından önerildiği şekilde aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$K_0 = Q \times C_d$$

Bu formülde " K_0 ", kütle salım hızı (mcg/saat) iken " Q ", hacim salım hızı (mcl/saat) ve " C_d " ise taşıt çözücü içindeki ajanın konsantrasyonudur (mcg/mcl). Son olarak, ozmotik pompanın düzenli salım yapabileceği maksimum süre ise şu şekilde hesaplandı:

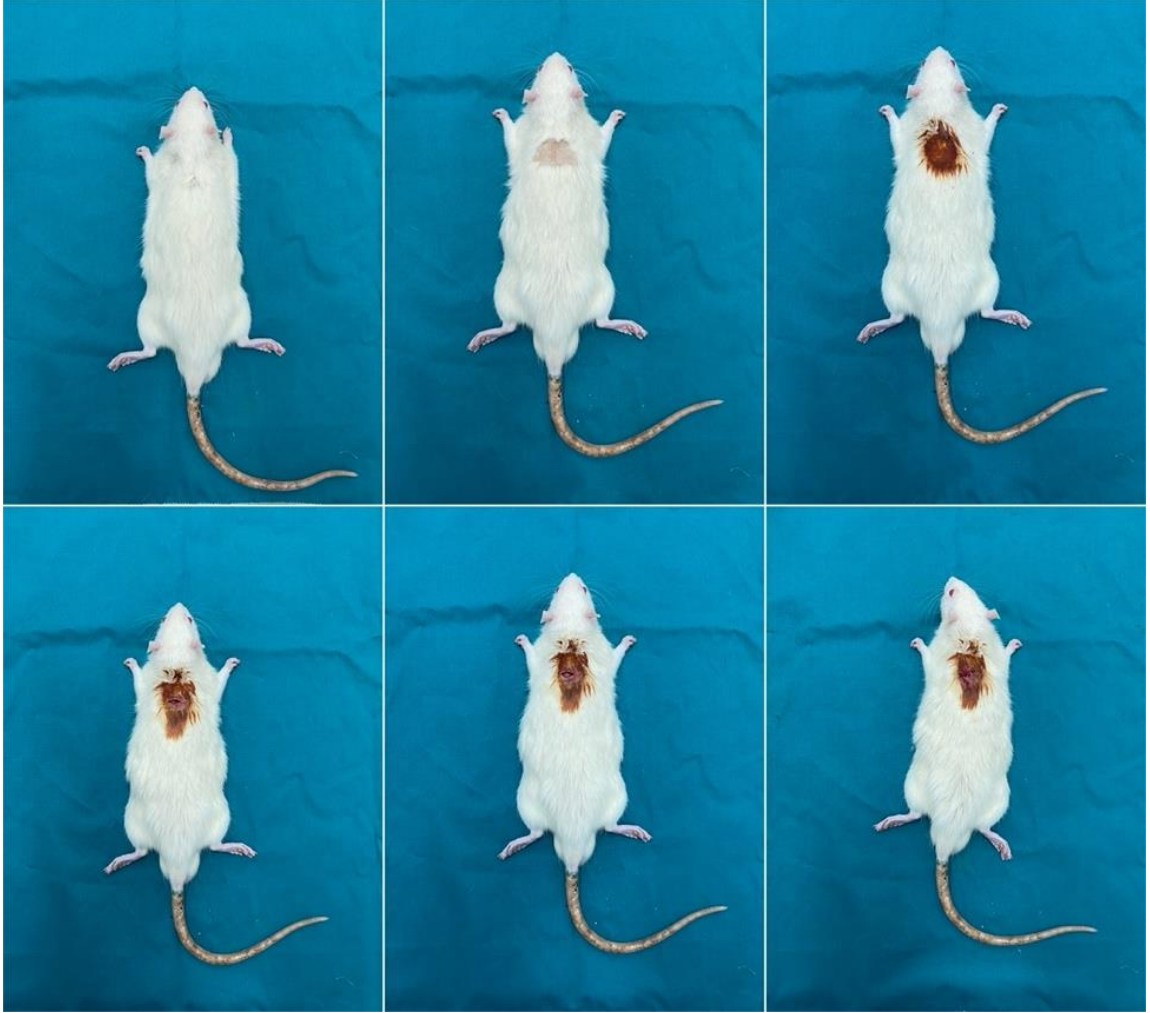
$$D = (V/Q) \times (0.95)$$

" D " süre (saat) olduğunda, " V " mini ozmotik pompanın rezervuar hacmidir (mcl) ve " Q " salım hızıdır (mcl/sa). Bu nedenle, 237 mcl ortalama dolun hacmi ve 0.23mcl/saat OSH'ye dayalı olarak, ilacın etkisiz hale geleceği maksimum süre yaklaşık 979 saattir (40.8 gün). Ozmotik pompanın doldurulması ile deneyin bitimi arasında geçen toplam sürenin 30 gün olduğu göz önüne alındığında ek bir işleme ihtiyaç duyulmadı.

Ozmotik pompalar dik pozisyonda tutularak, solüsyonu mini pompanın içine enjekte etmek için 1 mL hacimli insülin enjektörleri kullanıldı. Üretici tarafından ozmotik pompalar ile birlikte gönderilen steril, künt uçlu enjektör ile pompa rezervuarının dolunu yapıldı ve içindeki tüm havanın yer değiştirdiğinden emin olmak için taşması esas alındı. Son olarak, taşan Ang II çözeltisi, kuru bir bez ile yavaşça emildi. Ardından akış modülatörü yerleştirildi. Mini ozmotik pompalar, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda salım noktaları yukarı bakacak şekilde, steril 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine konuldu. Ardından ependorf tüpü, ozmotik pompanın yarı yüksekliğine kadar steril SF ile dolduruldu ve 48 saat sonra implante edilmek üzere 37°C'lik etüve konuldu. Mini ozmotik pompalar, cerrahi implantasyona kadar aynı ependorf içinde tutuldu.

3.3.2. Ozmotik Pompaların Yerleştirilmesi

Ratlara cerrahi işlem yapılmadan önce ip yolla 10 mg/kg ksilazin ve 50 mg/kg ketamin anestezisi uygulandı. Anestezi kontrolü, ayak kısıtma refleksi ile yapıldı. Ardından iki skapula arası elektrikli tıraş makinesi ile yavaşça tıraş edilerek cerrahi alan açığa çıkarıldı ve batikon ile temizlendi. Ardından skapula kemikleri ile aynı hizada yatay insizyonel cilt kesisi yapıldı. Deri ve kas düzlemi, mini ozmotik pompanın yerleştirildiği bir deri altı cep oluşturmak için cerrahi makasla künt diseksiyonla ayrıldı ve ozmotik pompa yerleştirildi. Kesi, 4.0 poliglaktin kaplı vikril sütürler (W9442, Ethicon®) kullanılarak kapatıldı (Şekil 3.2). Ratlar, implantasyon sonrasında lokal veya sistemik komplikasyon oluşma ihtimaline karşın deney süresince yakın gözlemlerde tutuldu.



Şekil 3.2. Deney hayvanlarına ozmotik pompaların yerleştirilmesi işlemi.

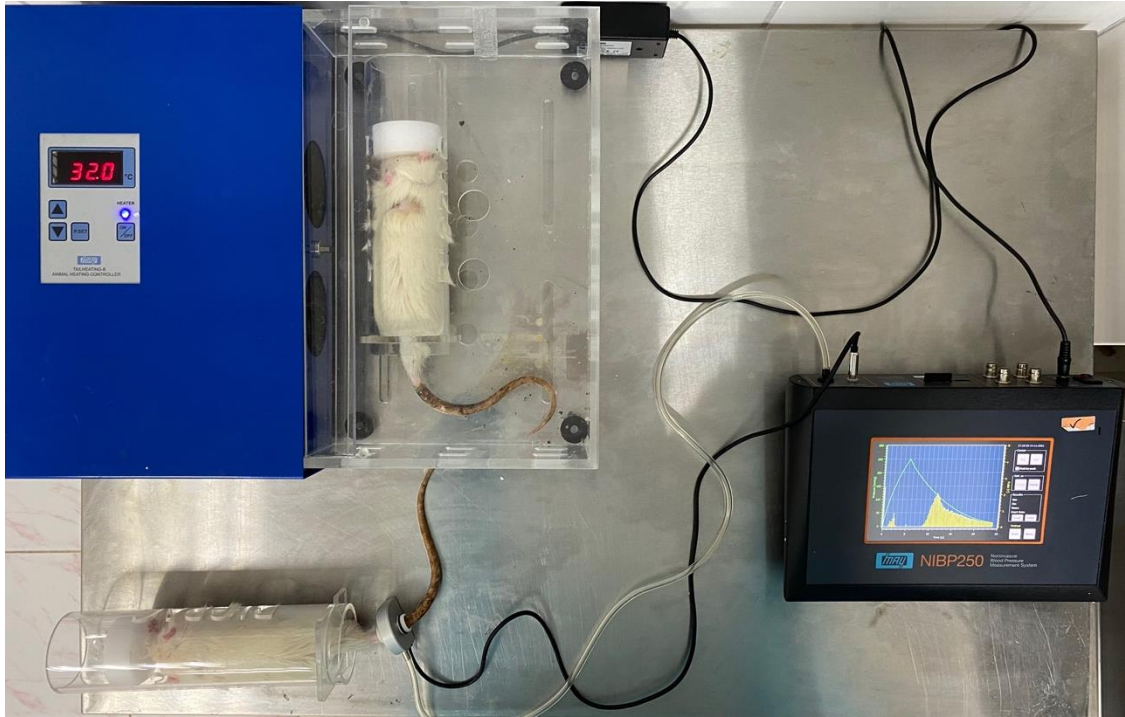
3.4. Hemodinamik Ölçümler

Sistolik KB ve KH, non-invazif KB sistemi (MAY NIBP-250, Commat Ltd Inc., Ankara, Türkiye) kullanılarak kuyruk manşet pletismografisi ile ölçüldü. Kuyruk manşetinin yanında kızılötesi sensör (RXTCUF-SENSOR13, Biopac System Inc.) kullanıldı. Her bir rat için ardışık en az 10 okumanın son 5 verisinin ortalama değeri alınarak ilgili değerler elde edildi. Ratlara, deneyler yapılmadan önce 7 gün boyunca bu işleme alışmaları sağlandı (189). Hemodinamik ölçümler, 1, 15 ve 29. günlerde yapıldı.

3.4.1. Kan Basıncı Ölçümü Hazırlıkları

Deneye başlamadan önce, ratları KB ölçüm koşullarına koşullandırmak için deneyden 7 gün önce başlayarak ratlar her gün günde bir kez uygun ebattaki tutacağı (restainer) içine konuldu ve gerçek ölçüm yapılacakmış gibi her seferinde ısıtma işlemi tekrarlandı. Isıtma işlemi, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda ısıtma kabini

30-40 dk süre ile tutacağın içinde 32°C’de bekletilerek yapıldı. Doğru non-invazif KB ölçümü için, hayvan veya kuyruğunun uygun sıcaklığa eriştiği, KB ölçümünün yapılabilmesiyle teyit edildi. Kuyruk ısıtma kabininin içinde ancak tutacağın dışında tutuldu. Hayvanın sınırlı hareket edebileceği bir konum elde edebilmek için tutacağın uzunluğu ayarlandı. Üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda hayvanın kilosu ile uyumlu seçilen kuyruk manşonu, kuyruk orta noktası ile kuyruk başlangıç bölgesi arasında konumlandırıldı. Isıtma kabini içinde belirtilen süre sonunda tutacak içindeki rat ile birlikte ısıtma kabiniinden çıkarıldı. Ölçümlere başlamadan önce hayvanın sıcak ortamın etkisiyle görece sakin ve hareketsiz kalmış olmasına dikkat edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Deney sürecinde kan basıncı ölçüm anına ilişkin görsel.

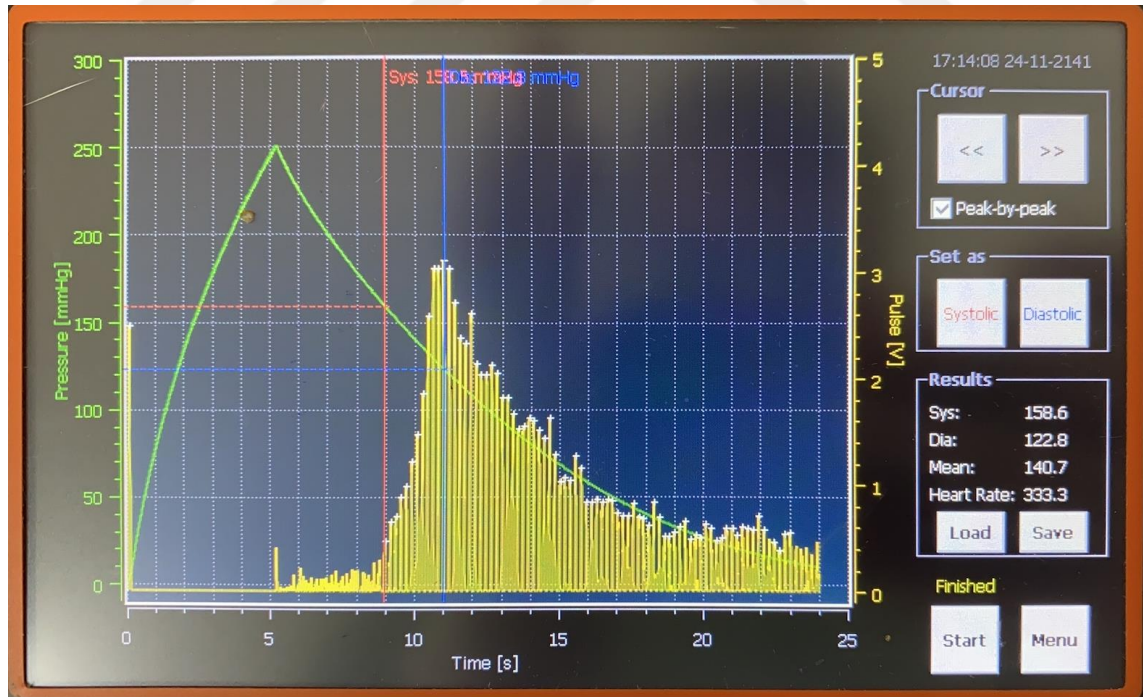
3.4.2. NIBP250 Cihazı ile Hemodinamik Parametrelerin Ölçümü

Üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda sensör ve manşet bağlantıları takılı iken cihaz aktif duruma getirildi. Temel işleyiş olarak, sistolik KB ölçümü fonksiyonu başlatıldığında cihaz, otomatik olarak sızıntı valfini kapatır ve manşonu şişirmeye başlar. Ardından, basınç maksimum seviyeye ulaştıktan sonra pompa durur ve basıncı boşaltmak için sızıntı valfini açar. Basınç tamamen kaybolduktan sonra ise KB ölçüm işlemi tamamlanmış olur. Kuyruk manşonu şişirilirken 250 mmHg basıncı standart üst değer olarak kullanıldı.

3.4.3. NIBP250 ile Elde Edilen Verilerin Analizi

Elde edilen her bir veri, NIBP250 cihaz yazılımındaki otomatik tepe algılama sistemi (peak-by-peak) aktifken değerlendirildi (Şekil 3.4). Bu sistem, her nabzın tepe noktasını beyaz bir çarpı ile işaretler ve ana ekranda "peak-by-peak" seçeneği seçilerek etkinleştirilir. Bu özellik, bireysel tanımlamayı oldukça kolaylaştırmaktadır. Sistolik KB ve kalp atım hızı (KH) değerlerini belirlemek için:

- Ana ekranda "peak-by-peak" seçeneği aktif edildi.
- İlk nabzın beyaz çarpısını bulmak için sağ imleç düğmesi kullanıldı ve ekranda "sistolik" düğmesine basılarak sistemin sistolik KB değerini kaydedip görüntülemesi sağlandı.
- En yüksek zirveye sahip atıma gitmek için yine imleç düğmesi kullanıldı ve ardından "diyastolik" düğmesine basılarak sistemin, diyastolik KB değerini kaydedip görüntülemesi sağlandı.
- Sistolik ve diyastolik KB değerleri girilince sistem tarafından otomatik KH değerleri ekranda gösterildiğinden anlık kayıt altına alındı.



Şekil 3.4. NIBP cihazı ile ölçülmüş hemodinamik sonuçlara ait çıktı örneği.

3.5. Deney Gruplarının Su Tüketiminin Takibi

Deneyin son 7 günü, ratların günlük ortalama tükettikleri su miktarları her gün sabah 8’da kontrol edilerek veriler kayıt altına alındı.

3.6. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılıp Hazırlanması

Deneyin sonlandırılması amacıyla ip yolla yüksek doz anestezi (225 mg/kg ketamin ve 24 mg/kg ksilazin) verildi. Parmak kısırtma hareketleri ile derin anestezinin kontrolü yapıldıktan sonra kalp ve damar dokuları ile kan numuneleri alınarak çalışma sonlandırıldı. Karın boşluğundan başlayıp göğüs kafesi açılarak torasik aort dikkatlice diseke edilerek bekletilmeden aynı gün hazırlanmış Krebs-Henseleit solüsyonu içeren petri kabına konuldu. Aort, perivasküler dokulardan dikkatlice temizlendikten sonra arkustan sonraki 3-5 mm uzunluğunda halka kesilerek izole organ banyosuna alındı. Asendan ve arkus aorta, biyokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere pıhtılardan arındırıldıktan sonra -80°C’ye alındı. Desendan torasik aort ve kalp kesitleri ise histopatolojik inceleme için %10’luk formaldehit içine alınarak tespit edildi.

3.7. İzole Organ Banyosunun Hazırlanması ve Kasılma-Gevşeme Cevaplarının Değerlendirilmesi

3.7.1. Krebs-Henseleit Solüsyonunun Hazırlanması

Oda sıcaklığında 2 L distile suya, manyetik karıştırıcı düzeneği çalışır durumda iken 13.8 g NaCl, 0.7 g KCl, 0.32 g KH₂PO₄, 0.592 g MgSO₄-2H₂O, 4.2 g NaHCO₃, 3.96 g glikoz eklendikten sonra 5 dk karbojen (%95 O₂+%5 CO₂) ile gazlandırıldı. Ardından 0.74 g CaCl₂-2H₂O eklenerek solüsyon hazırlandı ve çeperleri önceden 37°C’ye ısıtılmış izole organ banyo haznesine eklendi. Her 15 dk’da izole organ banyo haznelerindeki Krebs-Henseleit solüsyonu yenilendi ve çalışma süresince pH 7.4 değerini korumak için sürekli karbojen ile gazlandırıldı (Tablo 3.1) (190).

Tablo 3.1. Krebs-Henseleit çözeltisi içeriği.

Madde	Molekül ağırlığı (g/mol)	2 L distile suya eklenen toplam miktar (g)	Final mM
NaCl	58.44	13.8	118
KCl	74.55	0.7	4.7
KH ₂ PO ₄	136.1	0.32	1.2
MgSO ₄ -7H ₂ O	246.5	0.592	1.2
NaHCO ₃	84.21	4.2	25
Glikoz	180.156	3.96	11
CaCl ₂ -2H ₂ O	147.01	0.74	2.5

3.7.2. Kasılma-Gevşeme Cevaplarının Oluşturulması ve Değerlendirilmesi

Deney sonunda, yüksek doz anestezi uygulanan ratların diseke edilen torasik aort dokuları hızlıca bal mumu yatağındaki Krebs-Henseleit solüsyonu içeren yatay kaplara alınarak dikkatlice perivasküler dokulardan temizlendi. Arkus aortanın bitimi-desendan torasik aortun başlangıcından itibaren yaklaşık 3-5 mm uzunluğundaki halkalar, lümeninden birbirine paralel iki paslanmaz çengelden geçirilerek içerisinde 37°C'ye ısıtılmış ve karbojen ile gazlandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu bulunan 25 ml'lik izole organ banyosuna asıldı. Alt çengel izole organ banyosunun bağlantı kısmına tutturulurken üst çengel de izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için force-displacement transducerlerine (FDT-10-A, May) bağlandı. Kayıtlar veri işleme cihazı (Model MP100-A, BIOPAC, Goleta, CA, USA) ile yapıldı. İzole organ banyosuna asılan torasik aorta halkaları 3000 mg'lık bazal gerim altında 1 saat boyunca dinlendirildi. İzole organ banyosundaki Krebs-Henseleit solüsyonu, metabolik son ürünlerin birikimini önlemek için her 15-20 dk'da bir yenilendi (Şekil 3.5). *In vitro* torasik aorta çalışmaları endotel varlığında çalışıldı.



Şekil 3.5. İzole organ banyosu sistemi.

3.7.3. Fenilefrin Kasılma Cevapları

Aort halkalarının kasılma cevapları, artan Phe konsantrasyonları (3×10^{-9} - 10^{-4} mol/L) ile değerlendirildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. İzole organ banyolarına eklenen fenilefrin konsantrasyonları ve hazırlanma bilgileri.

Banyoya Eklenen Phe Miktarı	Banyodaki Final Konsantrasyon
75 mcl, 1×10^{-6} M	3×10^{-9} M
250 mcl, 1×10^{-6} M	10^{-8} M
75 mcl, 1×10^{-5} M	3×10^{-8} M
250 mcl, 1×10^{-5} M	1×10^{-7} M
75 mcl, 1×10^{-4} M	3×10^{-7} M
250 mcl, 1×10^{-4} M	1×10^{-6} M
75 mcl, 1×10^{-3} M	3×10^{-6} M
250 mcl, 1×10^{-3} M	1×10^{-5} M
75 mcl, 1×10^{-2} M	3×10^{-5} M
250 mcl, 1×10^{-2} M	1×10^{-4} M

3.7.4. Asetilkolin Gevşeme Cevapları

Artan dozlarda Phe uygulamasıyla elde edilen eğriden submaksimal doz belirlendi. Sonrasında submax Phe dozu ile kasılma yapıldıktan sonra artan konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) Ach uygulamalarıyla doz bağımlı gevşeme cevapları alındı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. İzole organ banyolarına eklenen Ach konsantrasyonları ve hazırlanma bilgileri.

Banyoya Eklenen Ach Miktarı	Banyodaki Final Konsantrasyon
250 mcl, 1×10^{-7} M	1×10^{-9} M
250 mcl, 1×10^{-6} M	1×10^{-8} M
250 mcl, 1×10^{-5} M	1×10^{-7} M
250 mcl, 1×10^{-4} M	1×10^{-6} M
250 mcl, 1×10^{-3} M	1×10^{-5} M
250 mcl, 1×10^{-2} M	1×10^{-4} M

3.8. Doku Homojenatlarının Oluşturulması ve Biyokimyasal Analizleri

3.8.1. Kalp ve Aort Dokularının Homojenizasyonu

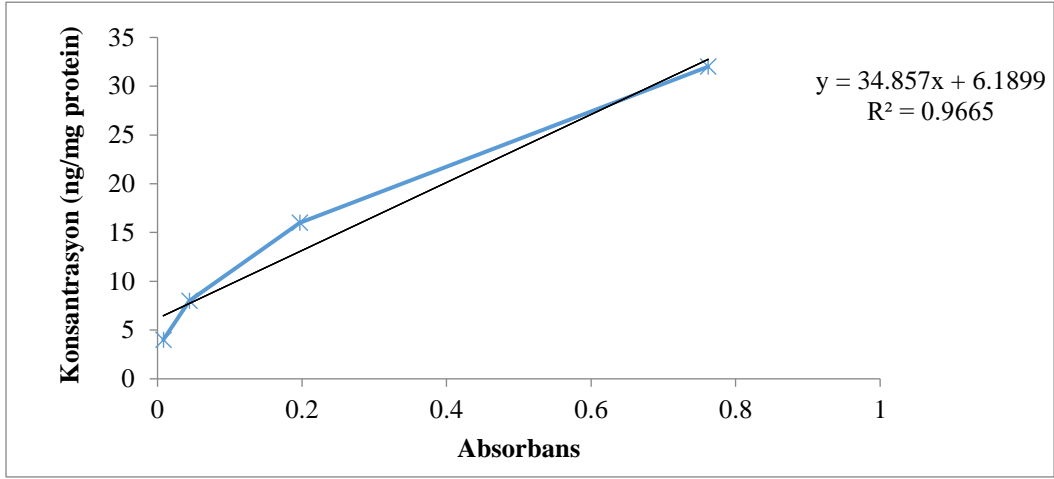
Kitlerin üretici firmalarının yönergeleri doğrultusunda kalp ve aort doku homojenatları oluşturulurken aşağıdaki basamaklar takip edildi:

- 30 ml fosfat tamponlu salin (50 mM, pH=7.4) içerisine 1:20 oranda 150 mcl proteaz inhibitörü (Protease inhibitor cocktail-EDTA free, Abcam; ab201111) eklenerek doku homojenat tamponu oluşturuldu. Bu tampondan 750 mcl alınarak ayrı plastik tüplere konuldu.
- Sol ventrikül orta kısımdan alınan 25 mg kalp dokusu, hazırlanan 750 mcl'lik tampona eklendi. 13500 rpm'de 30 sn boyunca (toplamda 4 defa) (Ultra-Turrax T25, IKA-Werke) santrifüj edildi.
 - 1. tur homojenizasyondan sonra LOX için 50 mcl ayrı bir ependorfa alınarak üzerine 450 mcl ekstraksiyon tamponu (6 M üre, 10 mM trips pH 7.4) eklendi. 25 mg doku için 0,25 ml olacak şekilde 10X RIPA (10X RIPA buffer, Abcam; ab156034) tamponu 1X konsantrasyona dilüe edildi. LOX için hazırlanan doku homojenatı, 15 sn boyunca 13500 rpm'de 1 tur daha santrifüj edildi.
- Ardından hazırlanan doku homojenatları +4°C'de 10 dk boyunca 15000 rpm'de santrifüj edildi. 150 mcl'lik 3 ependorfa bölündü. Geriye kalan 50 mcl'lik süpernatant içerisinden total protein tayini yapıldı. Dilüsyon oranı her bir homojenat için belirlenip sonraki gün kullanılmak üzere +4°C'de bekletildi.

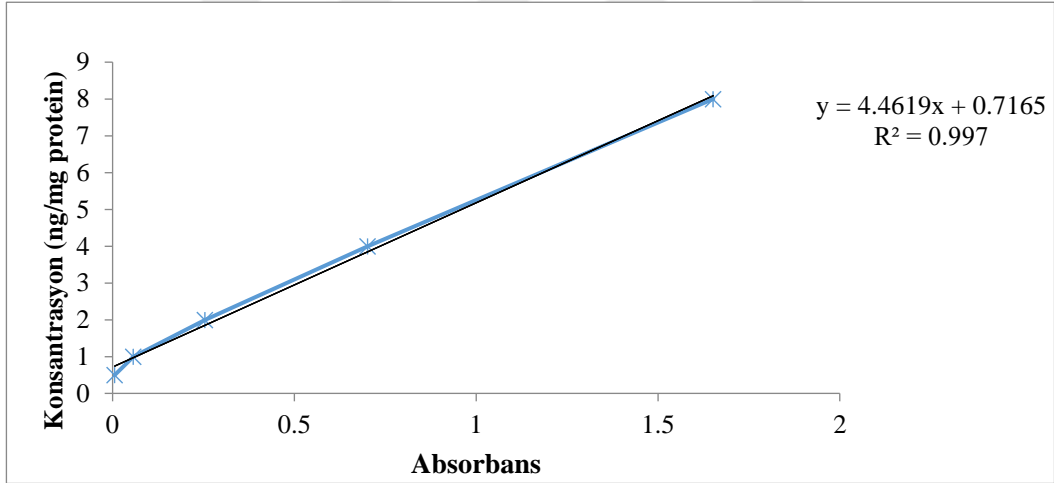
3.8.2. ACE-2, CYP-A, MMP-2, MMP-9 ve NOX-4 Belirteçlerinin ELİSA Yöntemiyle Tayin Edilmesi ve Analizi

Kitlere ait üretici firmanın (Bioassay Technology Lab., Shanghai, Çin) yönergeleri doğrultusunda:

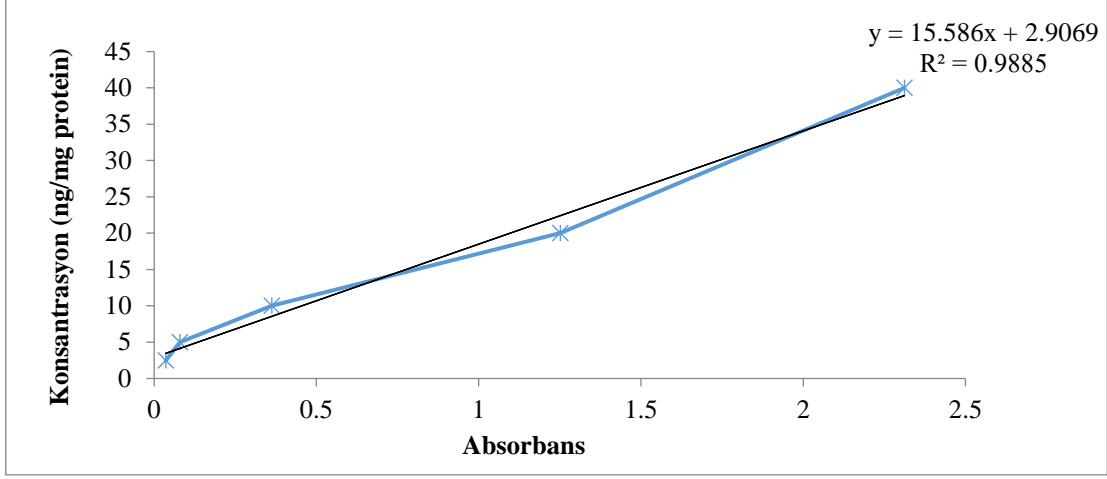
- Tüm reaktifler hazırlandı.
- Her biri kuyucuğa kit içerisinde bulunan standarttan 50 mcl eklendi.
- Ardından her bir kuyucuğa 40 mcl süpernatant eklendi. Üzerine 10 mcl spesifik antikor eklendi.
- Tüm kuyucuklara 50 mcl streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) eklenip iyice karıştırıldı. 37°C’de 60 dk inkübe edildi.
- Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra 5 kez kit içerisinde gelen yıkama tamponu ile yıkandı.
- Yıkama sonrasında tüm kuyucuklara önce 50 mcl substrat A, sonra 50 mcl substrat B eklenip 37°C’de 10 dk inkübe edildi.
- Son olarak tüm kuyucuklara 50 mcl stop solüsyonu eklenerek 450 nm’de optik dansite ölçüldü.
 - Ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğrileri oluşturuldu ve bu eğri üzerinden ACE-2 (Rat Angiotensin Converting Enzyme 2 ELISA Kit, Cat. No: E0968Ra, Shanghai, Çin), CYP-A (Rat Cyclophilin A, ELISA Kit, Cat. No: E1936Ra, Shanghai, Çin), MMP-2 (Rat Matrix Metalloproteinase 2/Gelatinase A, MMP-2 ELISA Kit, Cat. No: E0315Ra, Shanghai, Çin) MMP-9 (Rat Matrix Metalloproteinase 9/Gelatinase B, MMP-9 ELISA Kit, Cat. No: E0321Ra, Shanghai, Çin) ve NOX-4 (Rat NADPH Oxidase 4, NOX4 ELISA Kit, Cat. No: E1298Ra, Shanghai, Çin) belirteçlerinin konsantrasyon değerleri hesaplandı. Oluşturulan standart eğriye göre deney gruplarındaki her bir dokuda ait konsantrasyon değerleri, Microsoft Excel for Mac v.16.48 programında “=TREND(A1:A5;B1:B5;C)” formülü kullanılarak elde edildi. Formülde yer alan A1-A5 verileri üretici firma tarafından kit protokolünde sunulan önceden belirlenmiş absorbans verilerini, (B1-B5) verileri ACE-2 (Şekil 3.6), CYP-A (Şekil 3.7), MMP-2 (Şekil 3.8), MMP-9 (Şekil 3.9) ve NOX-4 (Şekil 3.10) belirteçlerine ait konsantrasyonlarını ve C ilgili dokuya ait absorbans değerini ifade etmektedir.



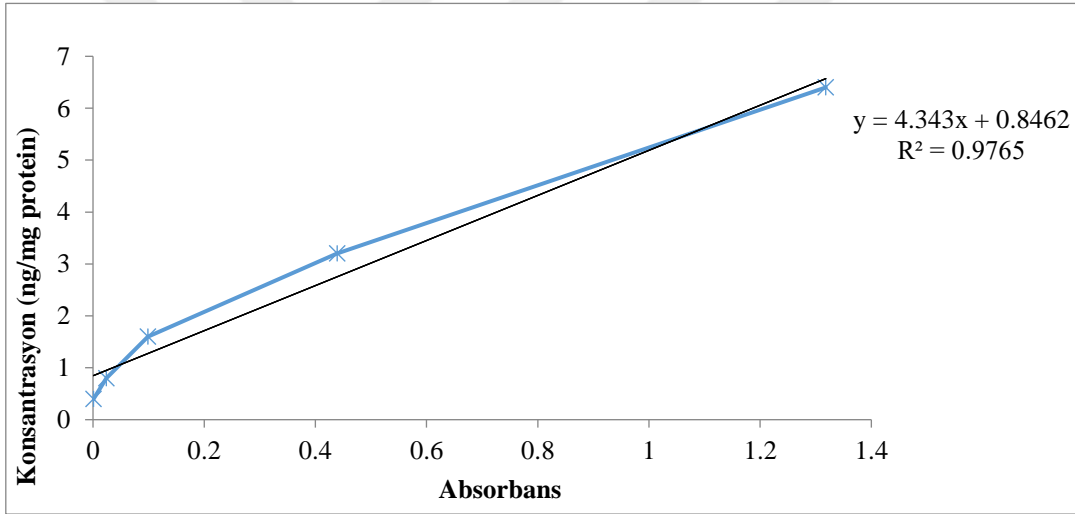
Şekil 3.6. ACE-2 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi.



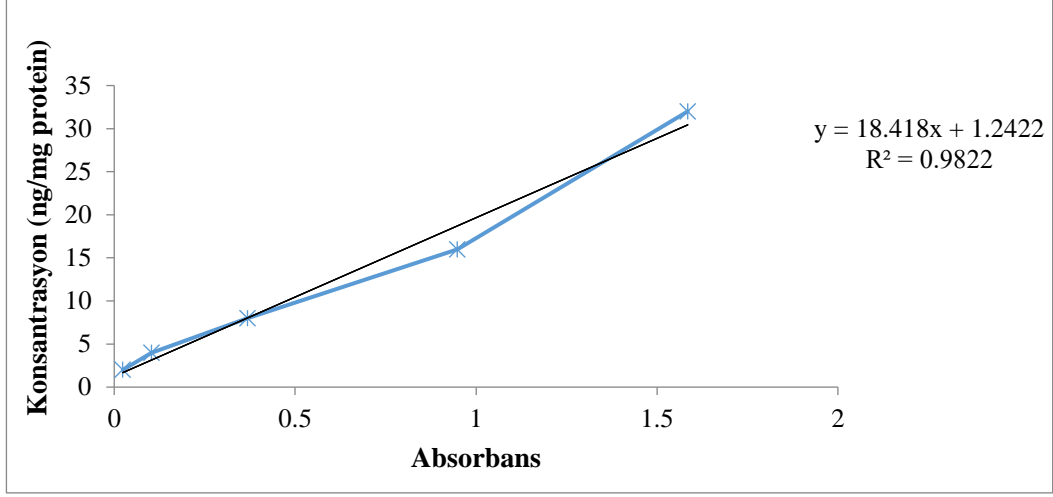
Şekil 3.7. CYP-A absorbans-konsantrasyon standart eğrisi.



Şekil 3.8. MMP-2 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi.



Şekil 3.9. MMP-9 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi.



Şekil 3.10. NOX-4 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi.

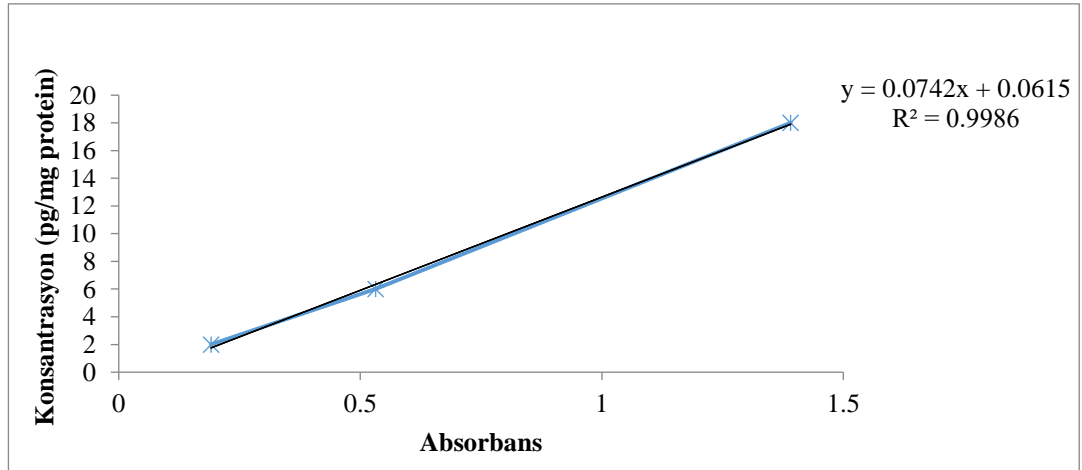
3.8.3. LOX Belirtecinin ELİSA Yöntemiyle Tayin Edilmesi ve Analizi

- Kit (Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (Fluorometric), ab112139, Abcam, Cambridge, UK) içerisinde gelen 250x HRP substrat stok solüsyonundan 20 mcl, 50 U/mL HRP stok solüsyonundan 20 mcl ve assay tamponundan 5 ml eklenerek 5.04 ml reaksiyon karışımı hazırlandı.
- Toplam hacmi 100 mcl yapmak için her kuyuya 50 mcl LOX karışımı eklendi.
- Karıştırıldıktan sonra ışıktan koruyarak 37°C'de 10-40 dk inkübe edildi.
- Semikantitatif değerleri elde etmek için kontrol olarak sadece stop solüsyonu eklendi. Ardından gruplara ait kalp ve damar dokularından hazırlanan çözeltiler kuyucuklara eklendi. Stop solüsyonu eklenen kuyucuklarda elde edilen değerler bazal değer olarak 1 kat kabul edildi. Sonraki kuyucuklardan elde edilen değerler stop solüsyonu değerleri ile oranlanarak hesaplandı. Mikroplate okuyucuda (Biotek, Synergy H1 microplate reader, Çin) floresan artışları analiz edildi.
- Floresan kırılmalar kit üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda “Ex/Em=530-570/590-600 nm (maksimum Ex / Em = 540/590 nm, 570 nm)” değerlendirildi.

3.8.4. MCP-1 Belirtecinin ELİSA Yöntemiyle Tayin Edilmesi ve Analizi

- Kit (Rat MCP1 ELISA Kit (CCL2), ab100778, Abcam, Cambridge, UK) içerisindeki standartlar ve örnekler her bir kuyucuğa 100 mcl eklendi. Üzeri örtülüp 2.5 saat oda ısısında çalkalanarak inkübe edildi.

- Ardından 4 kez yıkama tamponu ile yıkanıp iyice kurutuldu.
- Sonrasında 100 mcl MCP-tespit antikoru her kuyucuğa eklendi ve 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında 4 kez yıkama yapıldı.
- 100 mcl streptavidin solüsyonu her kuyucuğa eklendi ve 45 dk oda ısısında bekletildi.
- Tekrar 4 kez yıkama yapıldı.
- 100 mcl TMB substratı eklendi ve 30 dk oda ısısında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
- 50 mcl stop solüsyonu eklenerek 450 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.
- Ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu ve bu eğri üzerinden konsantrasyon değerleri hesaplandı. Oluşturulan standart eğriye göre deney gruplarındaki her bir dokuya ait konsantrasyon değerleri, Microsoft Excel for Mac v.16.48 programında “=TREND(A1:A4;B1:B4;C)” formülü kullanılarak elde edildi. Formülde yer alan A1-A4 verileri üretici firma tarafından kit protokolünde sunulan önceden belirlenmiş absorbans verilerini, (B1-B4) verileri MCP-1 belirteçlerine ait konsantrasyonlarını ve C ilgili dokuya ait absorbans değerini ifade etmektedir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. MCP-1 absorbans-konsantrasyon standart eğrisi.

3.9. Histopatolojik Analizler

Deney sonunda kalp ve damar dokuları %10'luk formaldehit içerisinde alınarak tespit edildi. Doku tespiti işlemlerinden sonra hazırlanan parafin bloklardan, 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kalp kesitleri genel morfolojik yapının belirlenmesi için hematoksilin-eozin (H-E) boyama metodu ile boyandı. Damar kesitlerine, genel morfolojik yapının belirlenmesi için H-E boyama metodu ve elastik lamellerin belirlenmesi için orsein boyama metodu uygulandı (187).

Kalp kesitleri, miyokardiyumda interstisyel ödem ve kardiyomiyosit dejenerasyonu (yoğun eozinofilik sitoplazma, piknotik nükleus) yönünden incelendi. x40'lık büyütmede rastgele seçilen 10 alan histopatolojik değişikliklerin şiddetine göre sağlam; 0, hafif; 1, orta; 2 ve şiddetli; 3 olacak şekilde skorlandı (191).

Damar için yapılan değerlendirmede; tüm alan incelenerek damar duvarında izlenen histopatolojik değişiklikler (düz kas hücrelerinde miyofibril kaybı, elastik lif dejenerasyonu) şiddetine göre sağlam; 0, hafif; 1, orta; 2 ve şiddetli; 3 olacak şekilde x40'lık büyütmede skorlandı. Ayrıca, H-E boyama metodu uygulanan her kesitten x20'lik büyütmede, rastgele 10 alan seçilerek tunika intima-medya (TİM) kalınlığı ölçüldü (192).

Analizler, Leica DFC-280 araştırma mikroskopu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) kullanılarak yapıldı.

3.10. Örneklem Büyüklüğü ve Güç Analizlerinin Hesaplanması ve İstatistiksel Analiz

Aynı deney modelinin kullanıldığı çalışmalarda elde edilen sistolik KB değerleri ve ESC/ESH'nin 2018 HT kılavuzundaki (9) hedef sistolik KB değerleri kullanılarak hesaplanan örneklem büyüklüğü testinde tip 1 hata miktarı (alfa) 0.05, testin gücü (1-beta) 0.8, ve etki büyüklüğü 0.78 iken bu test kullanılarak anlamlı bir fark bulunabilmesi için gerekli olan minimum örneklem büyüklüğü her bir grup için 8 olmak üzere toplamda 40 olarak hesaplandı. Hesaplamalar, İnönü Üniversitesi'nin web tabanlı örneklem büyüklüğü ve güç hesaplamaları uygulamasıyla yapıldı (193).

Histopatolojik veriler hariç istatistiksel analizler Jamovi programı ile yapılırken damar kasılma-gevşeme cevaplarının analizleri ise GraphPad Prism ver.8 kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında çoklu karşılaştırma için Welch düzeltilmeli tek yönlü bir ANOVA sonrasında post-hoc Dunnett T3 testleri kullanıldı. Veriler ortalama (%95

Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır) olarak sunuldu. Çalışmada, p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (191).

Histopatolojik verilere ait istatistiksel analizler için SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 22) kullanıldı. Normal dağılım gösteren veriler, gruplar arası ANOVA ve ikili gruplar arası karşılaştırmalarda post-hoc Tukey testi ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler için parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanıldı ve ikili gruplar arası karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmesiyle Mann-Whitney-U testi ile yapıldı. Veriler medyan (minimum-maksimum) ve aritmetik ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Çalışmada, p değerinin 0.05'in altında olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu kabul edildi (187).

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarının Vücut ve Kalp Ağırlıkları

Deney öncesinde ratlar, basit randomizasyon tekniği ile gruplara dağıtıldı. Dağıtıldıktan sonra ölçülen rat ağırlıkları incelendiğinde gruplar arasında deney öncesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Deneyin sonlandırılması aşamasında ölçülen rat ağırlıklarında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Kontrol grubundaki ratların, 28 günlük deney süresi boyunca grup ortalaması olarak yaklaşık 15 g ağırlık kazanmaları, benzer miktarlarda Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarında da gerçekleşmiş olup Ang II grubunda benzer durum görülmedi. Son olarak, deney sonu çıkarılan tüm kalp dokusuna ait ağırlıklar ile kalp/rat vücut ağırlıkları göstergelerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Veriler Tablo 4.1’de sunuldu.

Tablo 4.1. Deney gruplarındaki rat vücut ve kalp ağırlıklarının karşılaştırılması.

Değişkenler	Rat ağırlığı (1.gün, mg)	Rat ağırlığı (29.gün, mg)	Kalp ağırlığı (mg)	Kalp/Rat ağırlığı (x1000)
Kontrol	370 (359-380)	386 (372-399)	1.30 (1.2-1.4)	3.4 (3.2-3.5)
Ang II	363 (353-372)	361 (351-372)	1.23 (1.2-1.3)	3.4 (3.2-3.6)
Ang II+ALA	368 (356-380)	379 (365-393)	1.30 (1.2-1.4)	3.5 (3.1-3.8)
Ang II+ AVE0991	357 (343-370)	377 (365-390)	1.27 (1.2-1.3)	3.4 (3.2-3.5)
Ang II+ ALA +AVE0991	362 (350-375)	384 (373-396)	1.27 (1.2-1.3)	3.3 (3.2-3.4)

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.2. Deney Gruplarının Su Tüketim Miktarları

Deneyin 22-28. günleri arasında her bir kafes içerisindeki dört rata ait toplam su tüketimi günlük olarak ölçüldü. Ölçümler belirtilen gün aralıklarında aynı saatte yapıldı. Deney öncesi ve sonundaki rat ağırlıklarındaki artış ile de uyumlu olarak gruplardaki 7

günlük ortalama su tüketim miktarları dikkate alındığında Ang II grubunun belirgin olarak daha az su tükettiği görüldü (Tablo 4.2). Her bir kafeste 4 ratın bulunmasından dolayı bireysel su tüketim miktarı için istatistiksel analiz yapılamadan grup ortalama su tüketim miktarı sunuldu.

Tablo 4.2. Deneyde son 7 güne ait grup rat ağırlığına göre düzeltilmiş su tüketim miktarları.

Değişkenler	7 günlük ortalama su tüketim miktarı (ml)
Kontrol	467 (415-518)
Ang II	405 (379-432)
Ang II+ALA	459 (420-497)
Ang II+AVE0991	472 (437-507)
Ang II+ALA+AVE0991	442 (417-467)

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.3. Hemodinamik Cevaplar

Sprague Dawley ırkı ratlara, 28 gün boyunca 80 ng/kg/dk infüzyon hızında Ang II verildi. KB değerleri, kuyruk manşonu pletismografisi ile ölçüldü. Gruplar arasında çalışma başlangıcında sistolik KB ve KH’de istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ($p>0.05$). Kontrol grubuna ait veriler incelendiğinde, her iki belirteç açısından da deney süresince yapılan ölçümlerde benzer sonuçlar elde edildi ($p>0.05$). Ang II uygulanan gruplarda (Ang II, Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991) 15. gün ölçülen ortalama sistolik KB değerleri sırasıyla 173, 172, 172 ve 171 mmHg olarak istatistiksel anlamlı bir farklılığa ulaştığı görüldü ($p<0.05$). 15. günden sonra sonra başlanan ALA, AVE0991 ve kombinasyonlarının sistolik KB üzerindeki etkileri Tablo 4.3’te ve Şekil 4.1’de gösterildiği gibi deney sonunda tedavi uygulanan gruplarda ortalama sistolik KB’ler sırasıyla 136, 143 ve 119 mmHg olarak ölçüldü. Ang II+ALA grubunda uygulanan 50 mg/kg ALA’nın Ang II+AVE0991 grubundaki 576 mcg/kg AVE0991’e göre KB’yi istatistiksel olarak daha fazla düşürdüğü gözlemlendi ($p<0.05$). ALA ve AVE0991’in kombine kullanıldığı grupta (Ang II+ALA+AVE0991) sistolik KB Ang II+ALA ve Ang II+AVE0991 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha

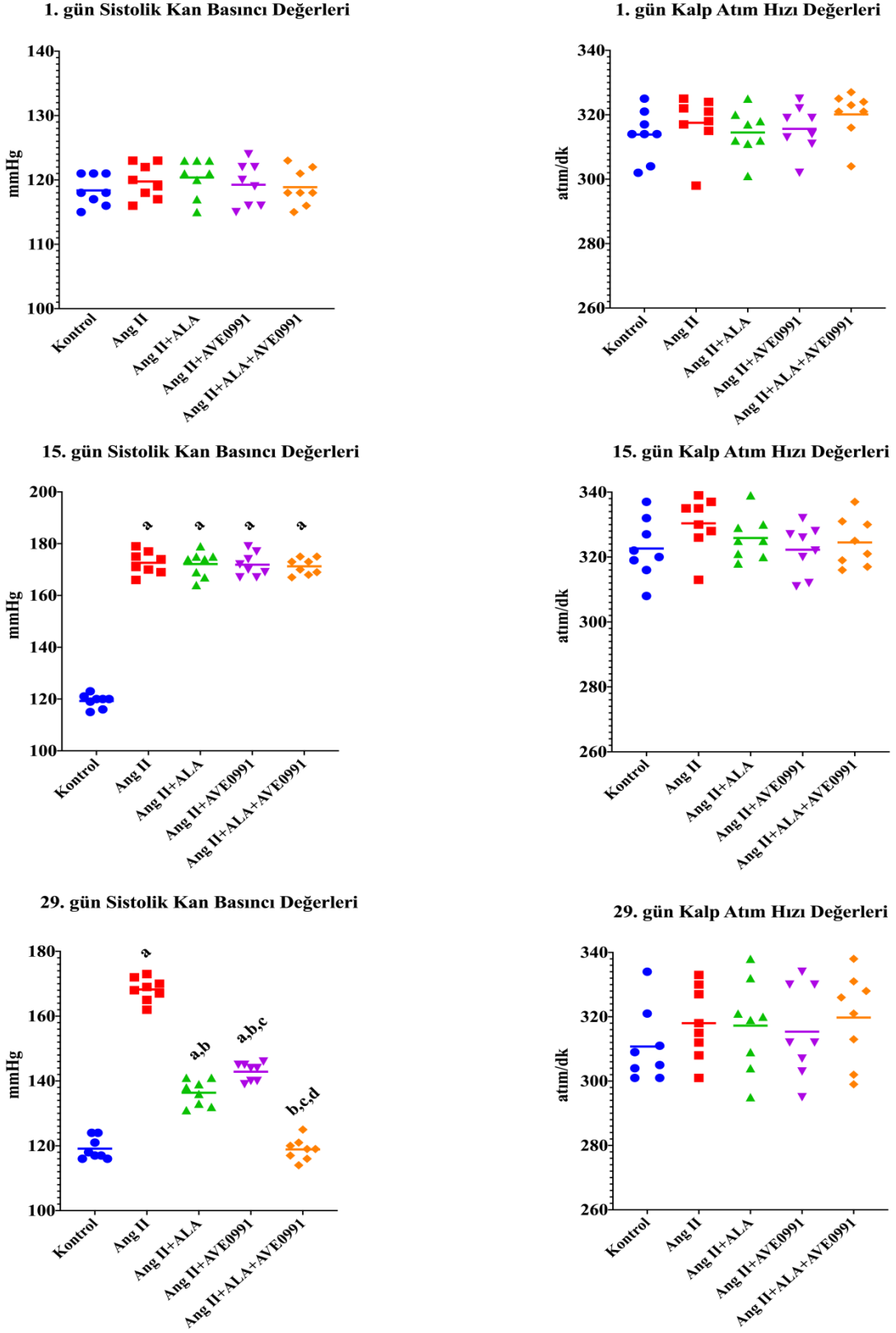
fazla düştüğü ($p<0.05$) ve Kontrol grubu verilerine benzer düzeylere ulaştığı görüldü ($p>0.05$).

KH ile ilgili veriler incelendiğinde ise Ang II uygulamasına bağlı olarak çalışma süresince yapılan farklı ölçümler arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.3. Sistolik kan basıncı ve kalp atım hızının gruplarda zamanla değişimi.

Değişken	1. gün	15. gün	29. gün
Sistolik kan basıncı (mmHg)			
Kontrol	118 (117-120)	119 (117-121)	119 (117-121)
Ang II	120 (118-122)	173 (170-176) ^a	168 (166-171) ^a
Ang II+ALA	120 (118-122)	172 (169-176) ^a	136 (134-139) ^{a,b}
Ang II+AVE0991	119 (117-122)	172 (169-175) ^a	143 (141-145) ^{a,b,c}
Ang II+ALA+AVE0991	119 (117-121)	171 (169-173) ^a	119 (117-121) ^{b,c,d}
Kalp atım hızı (atım/dk)			
Kontrol	314 (308-319)	323 (316-329)	311 (303-319)
Ang II	318 (312-323)	330 (325-336)	318 (310-326)
Ang II+ALA	315 (309-320)	326 (321-331)	317 (307-327)
Ang II+AVE0991	316 (311-321)	322 (317-327)	315 (305-325)
Ang II+ALA+AVE0991	320 (315-325)	325 (319-330)	320 (310-329)

Veriler "ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)" olarak verilmiştir.
^a: $p<0.05$ vs. Kontrol grubu, ^b: $p<0.05$ vs. Ang II grubu, ^c: $p<0.05$ vs. Ang II+ALA grubu, ^d: $p<0.05$ vs. Ang II+ALA+AVE0991 grubu.
Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.



Şekil 4.1. Bireysel hemodinamik parametrelere ait değerler.

^a: p<0.05 vs. Kontrol grubu, ^b: p<0.05 vs. Ang II grubu, ^c: p<0.05 vs. Ang II+ALA grubu, ^d: p<0.05 vs. Ang II+ALA+AVE0991 grubu. Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.4. Torasik Aort Kasılma-Gevşeme Cevapları

4.4.1.Fenilefrin Kasılma Cevapları

Phe uygulaması, torasik aort dokularınılarda uygulanan konsantrasyonlara bağlı olarak kasılmalar oluşturdu. Gruplara ait Phe kasılma cevapları, ağırlık cinsinden mg olarak (Tablo 4.4) ve yüzde olarak (Tablo 4.5) ayrı ayrı sunuldu. Sadece Ang II uygulanan grupta, sadece en düşük konsantrasyon olan 3×10^{-9} M/L uygulandığında diğer grupların aynı konsantrasyonlardaki kasılma miktarı (mg) ve yüzdeleri açısından diğer gruplara göre anlamlı bir yükselme gözlemlendi ($p < 0.05$). Bununla birlikte, aynı grupta Phe'nin ilk 3 konsantrasyon değerlerinde uygulanması eğriyi sola kaydırsa da (Şekil 4.2) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaşmadı ($p > 0.05$). Ang II+ALA+AVE0991 grubundaki kasılma değerleri tüm Phe konsantrasyonlarında Ang II grubu ile kıyaslandığında daha az kasılma ile sonuçlanırken ancak sadece 10^{-8} ve 3×10^{-8} Phe konsantrasyonlarında mg olarak kasılma miktarı, Ang II grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p < 0.05$). Ang II+AVE0991 grubunda, Ang II grubunda olduğu gibi eğrinin tüm Phe konsantrasyonlarda sola kaymış olması dikkat çekici olsa da gruplar arasında mg ve yüzde olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaşmadı ($p > 0.05$).

Tablo 4.4. Fenilefrin kasılma cevapları (mg).

Konsantrasyonlar (M/L)	Kontrol	Ang II	Ang II+ ALA	Ang II+ AVE0991	Ang II+ ALA+AVE0991
1.00E-09	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3.00E-09	189±91	536±155 ^a	203±46	341±81	73±31 ^{b,c}
1.00E-08	737±157	1077±160	549±108	1191±101 ^c	306±85 ^{b,d}
3.00E-08	1340±150	1268±162	939±105	1462±105 ^c	706±121 ^{a,d}
1.00E-07	1763±138	1445±138	1235±113	1640±129	1197±141
3.00E-07	1979±140	1598±138	1444±109	1781±153	1450±159
1.00E-06	2229±164	1772±134	1613±110	1851±150	1491±165
3.00E-06	2358±176	1873±134	1671±110	1915±156	1550±179
1.00E-05	2437±194	1926±133	1698±108	1931±155	1587±176
3.00E-05	2464±203	1946±135	1736±102	1946±153	1610±178
1.00E-04	2493±212	1966±135	1746±103	1951±151	1621±178

Veriler “ortalama±standart hata” olarak verilmiştir.

^a: p<0.05 vs. Kontrol grubu, ^b: p<0.05 vs. Ang II grubu, ^c: p<0.05 vs. Ang II+ALA grubu, ^d: p<0.05 vs. Ang II+AVE0991 grubu.

Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

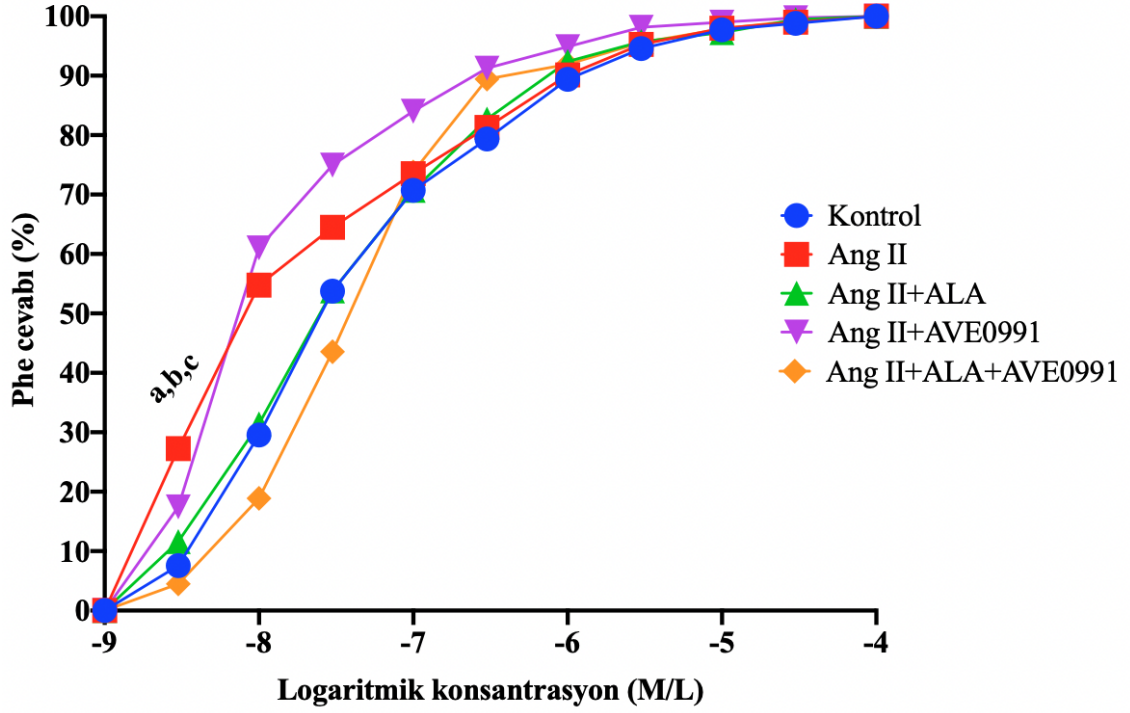
Tablo 4.5. Fenilefrin kasılma cevapları (%).

Konsantrasyonlar (M/L)	Kontrol	Ang II	Ang II+ ALA	Ang II+ AVE0991	Ang II+ ALA+AVE0991
1.00E-09	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
3.00E-09	7.6±3.6	27.3±7.9 ^a	11.6±2.6	17.5±4.1	4.5±1.9 ^{b,c}
1.00E-08	29.6±6.3	54.8±8.2	31.4±6.2	61.0±5.2	18.9±5.2
3.00E-08	53.7±6.0	64.5±8.2	53.8±6.0	74.9±5.4	43.6±7.5
1.00E-07	70.7±5.5	73.5±7.0	70.7±6.5	84.0±6.6	73.8±8.7
3.00E-07	79.4±5.6	81.3±7.0	82.7±6.3	91.3±7.8	89.4±9.8
1.00E-06	89.4±6.6	90.1±6.8	92.4±6.3	94.9±7.7	91.9±10.2
3.00E-06	94.6±7.1	95.3±6.8	95.7±6.3	98.2±8.0	95.6±11.0
1.00E-05	97.7±7.8	98.0±6.8	97.3±6.2	99.0±8.0	97.9±10.9
3.00E-05	98.8±8.1	99.0±6.9	99.4±5.8	99.8±7.8	99.3±11.0
1.00E-04	100±8.5	100±6.9	100±5.9	100±7.8	100±11.0

Veriler “ortalama±standart hata” olarak verilmiştir.

^a: p<0.05 vs. Kontrol grubu, ^b: p<0.05 vs. Ang II grubu, ^c: p<0.05 vs. Ang II+ALA grubu.

Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.



Şekil 4.2. Fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrisi.

a: Belirtilen konsantrasyon değerinde Kontrol grubu ile Ang II grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$).

b: Belirtilen konsantrasyon değerinde Ang II grubu ile Ang II+ALA+AVE0991 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$).

c: Belirtilen konsantrasyon değerinde Ang II+ALA grubu ile Ang II+ALA+AVE0991 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$).

Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin, Phe: Fenilefrin.

4.4.2. Fenilefrin pD_2 ve Maksimal Kasılma Cevapları

pD_2 değerleri karşılaştırıldığında Ang II+AVE0991 grubunda, Ang II grubu hariç diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). E_{max} değerleri karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Fenilefrin için pD₂ ve E_{max} değerleri.

Değişkenler	Kontrol	Ang II	Ang II+ ALA	Ang II+ AVE0991	Ang II+ ALA+AVE0991
pD ₂	7.47±0.08	7.83±0.10	7.52±0.07	8.01±0.07 ^{a,b}	7.41±0.09 ^c
E _{max}	2493±212	1966±135	1746±103	1951±151	1621±178

Veriler "ortalama±standart hata" olarak verilmiştir.
^a: p<0.05 vs. Kontrol grubu, ^b: p<0.05 vs. Ang II+ALA grubu, ^c: p<0.05 vs. Ang II+AVE0991 grubu.
 Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.4.3. Asetilkolin Gevşeme Cevapları

İzole organ banyosunun başlangıç aşamasında uygulanan farklı konsantrasyonlardaki Phe uygulamaları ile elde edilen kasılma cevaplarından hesaplanan submaksimal dozlar ile ön kasılma sağlandı ve Tablo 3.3'te belirtilen Ach konsantrasyonlar uygulanarak gevşeme cevapları kayıt altına alındı. Gevşeme cevapları ağırlık olarak mg (Tablo 4.7) ve yüzde olarak (Tablo 4.8) ayrı tablolarda verildi. Submaksimal doza verilen cevaplar karşılaştırıldığında Ang II+ALA ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarındaki cevapların diğer gruplara kıyaslandığında düşük olduğu gözlemlendi (p>0.05). Artan konsantrasyonlarda uygulanan Ach'ye bağlı olarak mg olarak cevaplarda 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ konsantrasyonlarda Ang II+ALA grubundaki ve 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ konsantrasyonlarda ise Ang II+ALA+AVE0991 grubundaki cevapların Ang II grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (p<0.05). Ach gevşeme cevapları yüzde olarak karşılaştırıldığında ise aynı konsantrasyonlarda Ang II grubundaki gevşeme cevapların diğer gruplara göre daha az olduğu (p>0.05), terapötik ilaç uygulanan gruplarda ise gevşeme cevaplarının Ang II grubuna göre daha fazla olduğu tespit edildi (p>0.05) (Şekil 4.3).

Tablo 4.7. Ach gevşeme cevapları (mg).

Konsantrasyonlar (M/L)	Kontrol	Ang II	Ang II+ ALA	Ang II+ AVE0991	Ang II+ ALA+AVE0991
Submax	2148±348	2173±191	1586±148	2140±267	1557±180
1.00E-09	2003±364	2066±183	1463±132	1937±235	1297±173
1.00E-08	1801±355	2005±177	1320±154	1751±208	1098±161 ^a
1.00E-07	1506±339	1808±143	941±119 ^a	1305±164	749±122 ^a
1.00E-06	1215±338	1490±76	502±156 ^a	848±124 ^a	336±98 ^a
1.00E-05	997±300	1047±76	315±133 ^a	626±123	238±91 ^a
1.00E-04	821±244	901±86	306±127 ^a	574±123	225±81 ^a

Veriler “ortalama±standart hata” olarak verilmiştir.

^a: p<0.05 vs. Ang II grubu.

Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

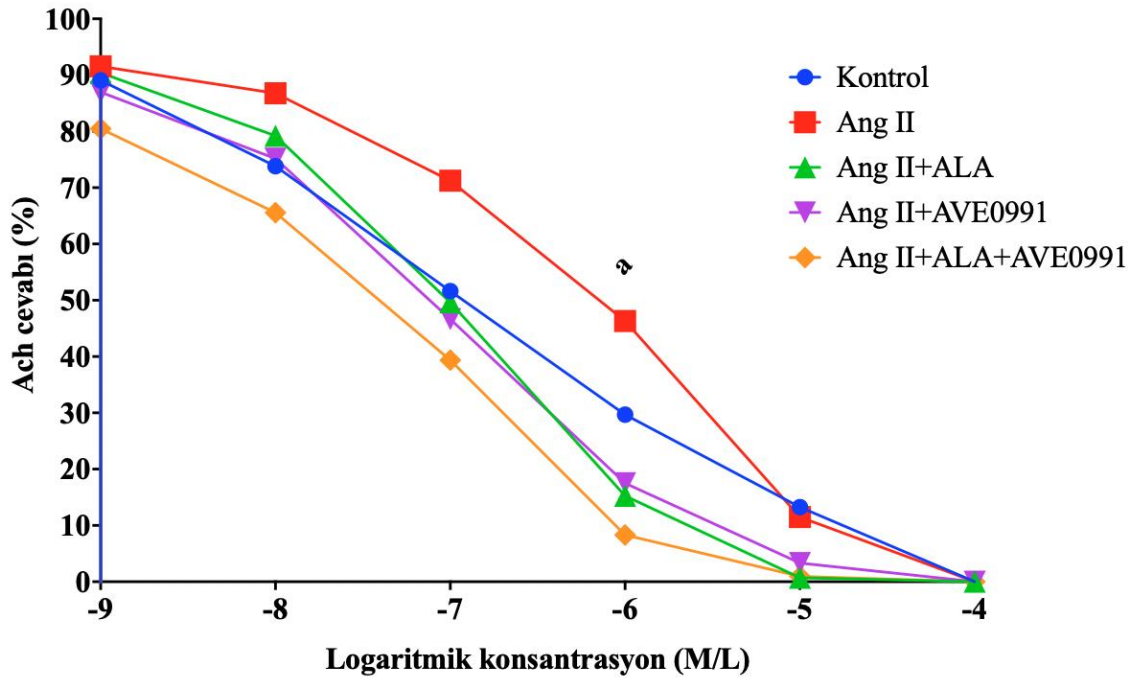
Tablo 4.8. Ach gevşeme cevapları (%).

Konsantrasyonlar (M/L)	Kontrol	Ang II	Ang II+ ALA	Ang II+ AVE0991	Ang II+ ALA+AVE0991
Submax	100±26.0	100±15.0	100±12.0	100±17.0	100±13.0
1.00E-09	89.1±27.0	91.5±14.0	90.4±10.0	87.0±15.0	80.5±13.0
1.00E-08	73.8±27.0	86.8±14.0	79.2±12.0	75.2±13.0	65.6±12.0
1.00E-07	51.6±26.0	71.3±11.0	49.6±9.0	46.7±10.0	39.4±9.0
1.00E-06	29.7±25.0	46.3±6.0	15.3±12.0	17.5±8.0	8.3±7.0 ^a
1.00E-05	13.2±23.0	11.5±6.0	0.7±10.0	3.3±8.0	0.9±7.0
1.00E-04	0±18.0	0±7.0	0±10.0	0±8.0	0±6.0

Veriler “ortalama±standart hata” olarak verilmiştir.

^a: p<0.05 vs. Ang II grubu.

Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.



Şekil 4.3. Ach konsantrasyon-cevap eğrisi.

a: Belirtilen konsantrasyon değerinde Ang II grubu ile Ang II+ALA+AVE0991 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$).

Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin, Ach: Asetilkolin.

4.4.4. Asetilkolin pD_2 ve Maksimal Gevşeme Cevapları

İzole organ banyosu sürecinde Ach'nin torasik aortta meydana getirdiği maksimum gevşeme cevabını tanımlayan E_{max} değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.9). Maksimum gevşeme cevabının yarısına ulaştıran pD_2 değerleri incelendiğinde, Ang II grubunda Kontrol grubuna göre belirgin bir azalma gözlenirken; Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarında ise Ang II grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p < 0.05$). Ang II+ALA+AVE0991 grubundaki pD_2 değeri, Ang II+ALA ve Ang II+AVE0991 gruplarına göre artmışsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaşmadı ($p > 0.05$).

Tablo 4.9. Ach için pD₂ ve E_{max} değerleri.

Değişkenler	Kontrol	Ang II	Ang II+ ALA	Ang II+ AVE0991	Ang II+ ALA+AVE0991
pD ₂	6.93±0.58	6.29±0.22	7.08±0.21 ^a	7.17±0.23 ^a	7.52±0.20 ^a
E _{max}	1327±135	1273±190	1280±136	1566±186	1331±150

Veriler “ortalama±standart hata” olarak verilmiştir.
^a: p<0.05 vs. Ang II grubu.
 Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.5. Kalp ve Damar Dokularının Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.5.1. ACE-2 Düzeyleri

Çalışmamızda, ALA ve AVE0991 uygulamalarının ACE-2 düzeyleri üzerindeki etkilerini görmek amacıyla kalp ve torasik aort dokularından ELİSA ile ACE-2 düzeyi tayini yapıldı (Tablo 4.10). Kardiyak ACE-2 düzeyleri, Ang II grubunda Kontrol grubuna göre benzerdi (p>0.05). Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 grubunda kalp dokusundaki ACE-2 düzeylerinde Ang II grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi (p>0.05).

Torasik aort dokusunda ise Ang II grubundaki ACE-2 düzeyleri, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ile sonuçlandı (p<0.05). Bu azalma, AVE0991 ve ALA+AVE0991 uygulamalarıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Kontrol grubuna ait değerlere ulaştı (p<0.05).

Tablo 4.10. Kalp ve damar dokusunda ACE-2 düzeyleri.

Değişkenler	Kardiyak ACE-2 (ng/mg protein)	Aort ACE-2 (ng/mg protein)
Kontrol	14.6 (14.0-15.3)	17.9 (17.3-18.4)
Ang II	14.3 (13.9-14.8)	15.5 (15.1-15.9) ^a
Ang II+ALA	15.6 (15.0-16.2)	16.4 (15.5-17.4)
Ang II+AVE0991	15.1 (14.4-15.8)	17.7 (17.2-18.3) ^b
Ang II+ALA+AVE0991	15.3 (14.3-16.3)	20.7 (19.6-21.8) ^b

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
^a: p<0.05 vs. Kontrol grubu, ^b: p<0.05 vs. Ang II grubu.
 Kısaltmalar: ACE-2: Anjiyotensin dönüştürücü enzim-2, Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.5.2.CYP-A Düzeyleri

Enflamasyon ve oksidatif stres mevcudiyetinde endotel ve vasküler düz kas hücreleri tarafından salınan ve hücre-içi bir protein olan CYP-A'nın ALA ve AVE0991 uygulamalarına verdiği cevap ELİSA tayini yapılarak araştırıldı (Tablo 4.11). Ang II uygulamasına bağlı olarak Ang II grubundaki kalp ve torasik aort dokularındaki CYP-A düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu ($p<0.05$). Sadece ALA ve AVE0991 uygulamalarına bağlı olarak her iki dokudaki CYP-A düzeyleri, Ang II grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldı ($p<0.05$). Kalp dokusundaki CYP-A düzeyleri Kontrol grubu değerlerine benzer iken ($p>0.05$) aort dokusundaki CYP-A düzeyleri istatistiksel olarak daha yüksek değerlerde tespit edildi ($p<0.05$). ALA ve AVE0991'in kombine uygulandığı Ang II+ALA+AVE0991 grubunda kalp ve damar dokularındaki CYP-A düzeylerinde belirgin bir azalma ile tespit edilmesinin yanında bu azalma kalp dokusunda Ang II grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılığa ulaşmamış olup ($p>0.05$) aort dokusunda ise anlamlı bir farklılığa ulaştı ($p<0.05$).

Tablo 4.11. Kalp ve damar dokusunda CYP-A düzeyleri.

Değişkenler	Kardiyak CYP-A (ng/mg protein)	Aort CYP-A (ng/mg protein)
Kontrol	1.53 (1.45-1.60)	1.83 (1.68-1.99)
Ang II	1.78 (1.68-1.87) ^a	2.84 (2.69-2.99) ^a
Ang II+ALA	1.55 (1.49-1.62) ^b	2.20 (2.08-2.33) ^{a,b}
Ang II+AVE0991	1.51 (1.44-1.59) ^b	2.33 (2.17-2.48) ^{a,b}
Ang II+ALA+AVE0991	1.62 (1.54-1.70)	2.38 (2.16-2.59) ^b

Veriler "ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)" olarak verilmiştir.
^a: $p<0.05$ vs. Kontrol grubu, ^b: $p<0.05$ vs. Ang II grubu.
Kısaltmalar: CYP-A: Siklofilin-A, Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.5.3.NOX-4 Düzeyleri

NOX-4, başta vasküler dokularda olmak üzere beyin, kalp gibi birçok dokudaki başlıca oksidatif stres kaynaklarından biridir. Gerek sadece Ang II uygulanan HT grubunda gerekse ALA, AVE0991 ve kombinasyonlarının uygulandığı gruplarda NOX-4 açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Kalp ve damar dokusunda NOX-4 düzeyleri.

Değişkenler	Kardiyak NOX-4 (ng/mg protein)	Aort NOX-4 (ng/mg protein)
Kontrol	8.19 (7.6-8.7)	8.38 (7.5-9.3)
Ang II	8.84 (6.4-11.3)	10.91 (8.6-13.2)
Ang II+ALA	7.86 (6.8-9.0)	9.53 (8.4-10.6)
Ang II+AVE0991	8.19 (6.7-9.6)	9.84 (8.6-11.1)
Ang II+ALA+AVE0991	7.47 (6.7-8.2)	10.43 (8.3-12.5)

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
 Verilerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).
 Kısaltmalar: NOX-4: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz-4, Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.5.4. LOX Düzeyleri

Ekstraselüler matriks proteinlerinin çapraz bağlı kararlı durumlarını sağlayan ve sağlam damar yapısında önemli bir rolü olan LOX enziminin semi-kantitatif ölçüm sonuçları Tablo 4.13’te paylaşıldı. Çalışmamızda, 80 ng/kg/dk Ang II infüzyon dozunun LOX aktivitelerinde Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü (p>0.05). Benzer şekilde, Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarında da Ang II grubuna göre benzer değerler saptandı (p>0.05).

Tablo 4.13. Kalp ve damar dokularındaki semi-kantitatif LOX düzeyleri.

Değişkenler	Kardiyak LOX (rölatif aktivite)	Aort LOX (rölatif aktivite)
Kontrol	3.34 (3.1-3.6)	2.54 (2.2-2.9)
Ang II	3.60 (3.2-4.0)	2.76 (2.4-3.1)
Ang II+ALA	4.09 (3.6-4.5)	3.29 (2.7-3.8)
Ang II+AVE0991	3.84 (3.6-4.1)	3.64 (2.9-4.3)
Ang II+ALA+AVE0991	3.49 (3.1-3.8)	3.37 (2.8-3.9)

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
 Verilerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).
 Kısaltmalar: LOX: Lizil oksidaz, Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.5.5.MCP-1 Düzeyleri

Kalp ve aort dokularındaki MCP-1 düzeylerindeki artış, HT başta olmak üzere birçok kardiyolojik hastalıklarda sorumlu mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda, Ang II grubuna ait kalp dokularındaki MCP-1 düzeyleri belirgin şekilde artmış olarak bulundu ($p<0.05$). Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarındaki kardiyak MCP-1 düzeyleri Ang II grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdi ($p<0.05$). Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarındaki azalma, Kontrol ve Ang II+ALA grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaştı ($p<0.05$) (Tablo 4.14). Torasik aort dokularındaki MCP-1 düzeylerinin tayini, homojenizasyon sürecindeki yaşanan yöntemsel sorunlardan dolayı yapılamadı.

Tablo 4.14. Kalp dokusunda MCP-1 düzeyleri.

Değişken	Kardiyak MCP-1 (pg/mg protein)
Kontrol	1.49 (1.2-1.7)
Ang II	3.18 (2.7-3.6) ^a
Ang II+ALA	1.77 (1.4-2.2) ^b
Ang II+AVE0991	0.80 (0.5-1.1) ^{a,b,c}
Ang II+ALA+AVE0991	0.73 (0.5-0.9) ^{a,b,c}

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
^a: $p<0.05$ vs. Kontrol grubu, ^b: $p<0.05$ vs. Ang II grubu, ^c: $p<0.05$ vs. Ang II+ALA grubu.
Kısaltmalar: MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1, Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.5.6.MMP-2 Düzeyleri

Kalp ve aort dokularında önemli bir jelatinaz olan MMP-2'nin kalp ve torasik aort dokularındaki düzeyleri ELİSA yöntemi ile tayin edildi. Ang II grubundaki kardiyak MMP-2 düzeyleri, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermiş olup ($p<0.05$) bu azalma Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarında daha belirgin idi ($p<0.05$). Diğer yandan torasik aort dokularındaki MMP-2 düzeyleri incelendiğinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Kalp ve damar dokusunda MMP-2 düzeyleri.

Değişkenler	Kardiyak MMP-2 (ng/mg protein)	Aort MMP-2 (ng/mg protein)
Kontrol	8.92 (8.6-9.3)	8.54 (7.8-9.2)
Ang II	8.04 (7.7-8.3) ^a	8.38 (7.6-9.1)
Ang II+ALA	8.25 (7.7-8.8)	9.09 (8.6-9.6)
Ang II+AVE0991	7.68 (7.5-7.9) ^{a,b}	9.03 (8.4-9.7)
Ang II+ALA+AVE0991	7.54 (7.1-8.0) ^a	9.03 (8.2-9.9)

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
^a: p<0.05 vs. Kontrol grubu, ^b: p<0.05 vs. Ang II grubu.
 Kısaltmalar: MMP-2: Matriks metalloproteaz-2, Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.5.7.MMP-9 Düzeyleri

Kalp ve torasik aort dokuları incelendiğinde MMP-9 değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (p>0.05) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Kalp ve damar dokusunda MMP-9 düzeyleri.

Değişkenler	Kardiyak MMP-9 (ng/mg protein)	Aort MMP-9 (ng/mg protein)
Kontrol	1.55 (1.5-1.6)	1.68 (1.6-1.8)
Ang II	1.55 (1.5-1.6)	1.86 (1.7-2.0)
Ang II+ALA	1.45 (1.4-1.5)	1.85 (1.8-1.9)
Ang II+AVE0991	1.56 (1.4-1.7)	1.86 (1.8-1.9)
Ang II+ALA+AVE0991	1.48 (1.4-1.6)	1.95 (1.8-2.1)

Veriler “ortalama (%95 Güven Aralığı, Alt Sınır-Üst Sınır)” olarak verilmiştir.
 Verilerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0.05).
 Kısaltmalar: MMP-9: Matriks metalloproteaz-9, Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

4.6. Histopatolojik Bulgular

4.6.1.Kalp

Kalp kesitleri miyokardiyumda interstisyel ödem ve kardiyomiyosit dejenerasyonu yönünden değerlendirildi. Kontrol grubunda hafif düzeydeki değişiklikler

dışında miyokardiyum normal histolojik görünümde izlendi (Şekil 4.4A). Diğer yandan, Ang II grubunda başta interstisyel ödem olmak üzere yer yer kardiyomiyosit dejenerasyonunun varlığı dikkat çekti. Ang II grubunda izlenen bu değişikliklerin (Şekil 4.4B) Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.0001$).

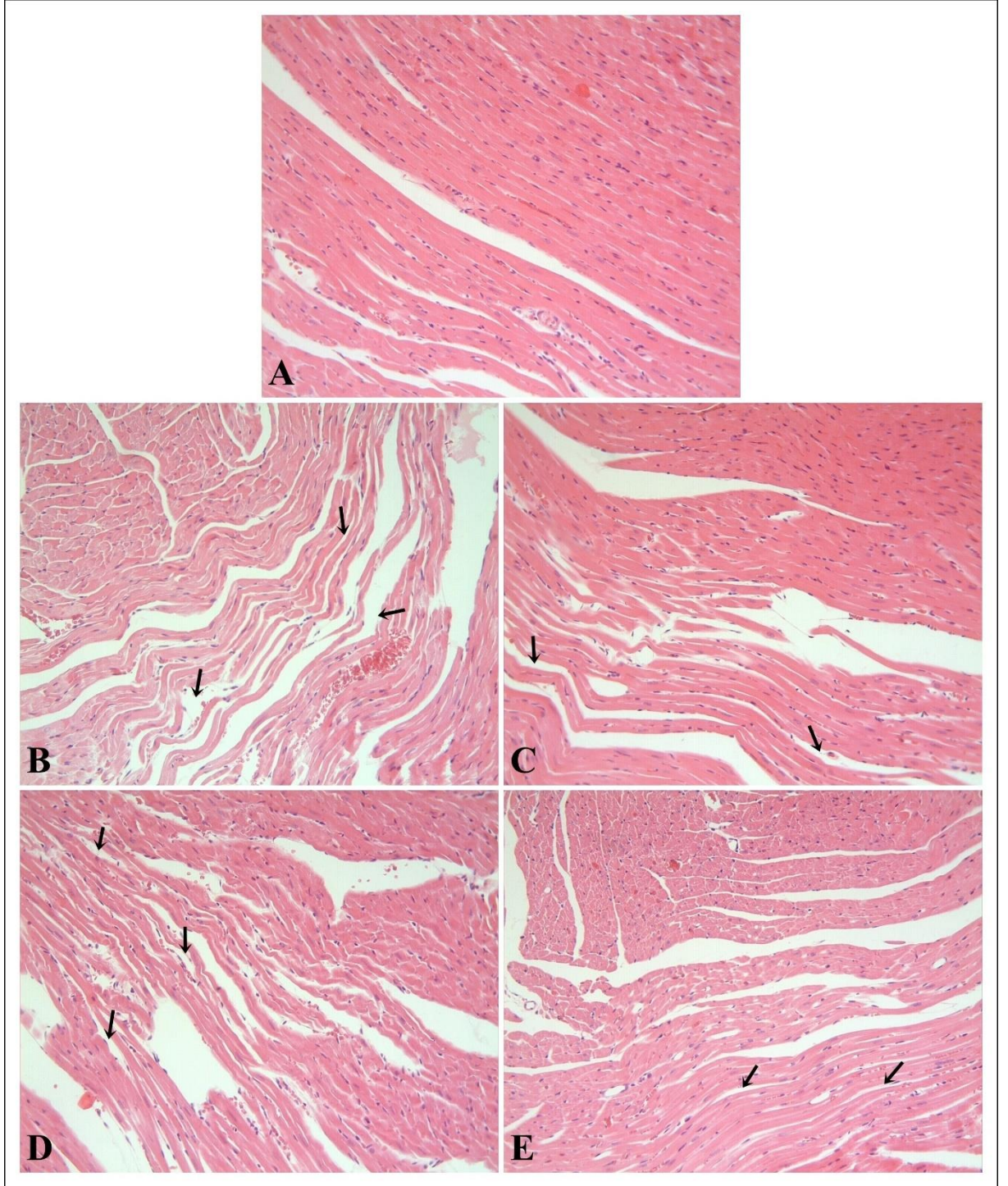
Ang II+AVE0991 ve Ang II+AVE0991+ALA gruplarında histopatolojik değişikliklerin Ang II grubu ile karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı izlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.4C ve E). Öte yandan, ALA grubunda interstisyel ödem ve kardiyomiyosit dejenerasyonunun Ang II grubuna benzer şekilde devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.4D). Ang II+ALA grubunda izlenen histopatolojik değişikliklerin Ang II+AVE0991 ve Ang II+AVE0991+ALA gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). Histopatolojik değişiklikler yönünden Ang II+AVE0991 ve Ang II+AVE0991+ALA gruplarının ise benzer olduğu tespit edildi.

Miyokardiyumun histopatolojik değerlendirme sonuçları Tablo 4.17’de sunuldu.

Tablo 4.17. Miyokardiyal dokuya ait histopatolojik skorlar.

Gruplar	Histopatolojik skor Ortanca (min-maks)
Kontrol	0 (0-1)
Ang II	2 (0-3) ^a
Ang II+ALA	2 (0-3)
Ang II+AVE0991	1 (0-3) ^{b, c}
Ang II+ALA+AVE0991	1 (0-3) ^{b, c}

Veriler “ortanca (minimum-maksimum)” olarak verilmiştir.
^a: $p<0.0001$ vs. Kontrol grubu, ^b: $p<0.05$ vs. Ang II grubu, ^c: $p<0.05$ vs. Ang II+ALA grubu.
Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin.

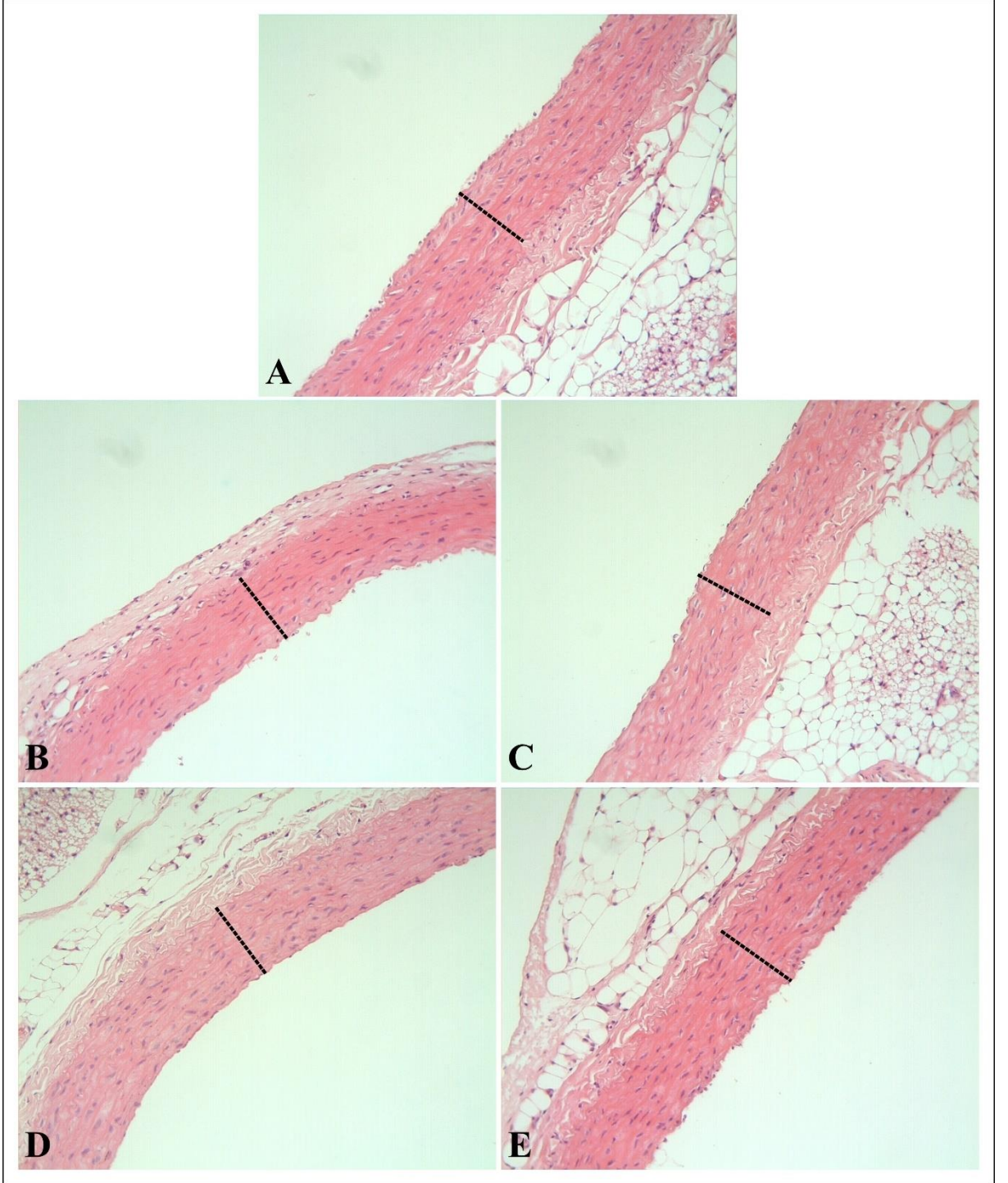


Şekil 4.4. Kontrol (A), Ang II (B), Ang II+AVE0991 (C), Ang II+ALA (D) ve Ang II+ALA+AVE0991 (E) gruplarında miyokardiyal dokunun görünümü.

Ang II grubunda belirgin şekilde interstisyel ödem (oklar) izlenmekte. Ang II+ALA grubunda interstisyel ödemin (oklar) Ang II grubuna benzer şekilde devam ettiği, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarında ise Ang II grubuna göre belirgin olarak azaldığı (oklar) dikkati çekmekte. H-E; x20.

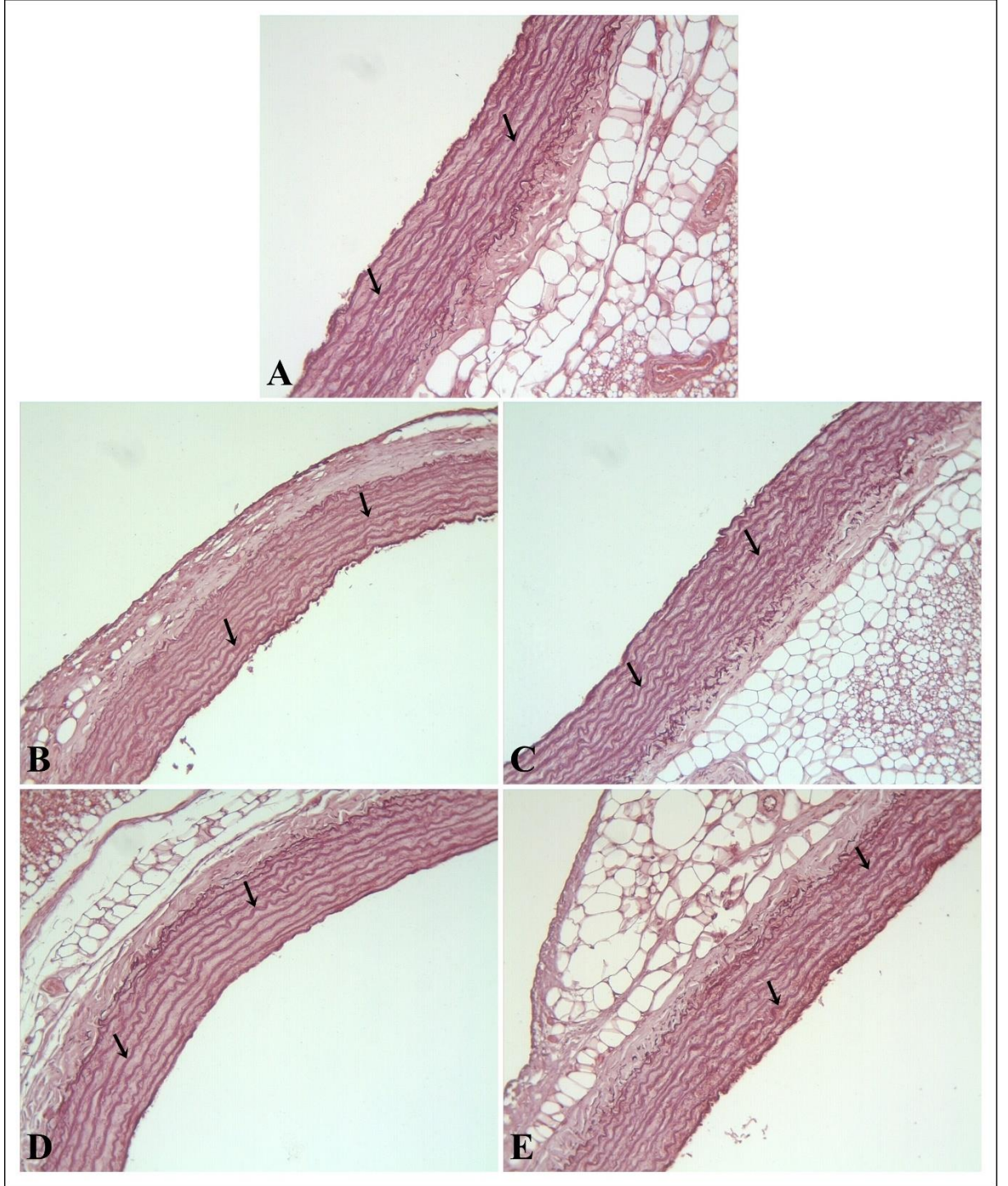
4.6.2.Damar

Tüm gruplarda damar duvarı, bazı kas hücrelerinde hafif düzeydeki miyofibril kaybı dışında normal histolojik görünümde izlendi (Şekil 4.5). Ortalama TİM kalınlıklarının da tüm gruplarda benzer olduğu tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Kontrol (A), Ang II (B), Ang II+AVE0991 (C), Ang II+ALA (D) ve Ang II+ALA+AVE0991 (E) gruplarında damar duvarının görünümü.

Kesikli çizgiler TİM'e işaret ediyor. H-E, x 20.



Şekil 4.6. Kontrol (A), Ang II (B), Ang II+AVE0991 (C), Ang II+ALA (D) ve Ang II+ALA+AVE0991 (E) gruplarında damar duvarının görünümü.

Oklar elastik lamellere işaret ediyor. Orsein x20.

Damar duvarının histopatolojik değerlendirme sonuçları ve TİM kalınlıkları Tablo 4.18'de verildi.

Tablo 4.18. Damar dokusuna ait histopatolojik skorlar ve TİM kalınlığı.

Gruplar	Histopatolojik skor	TİM (µm)
	Ortanca (min-maks)	Ortalama±Std Sapma
Kontrol	0 (0-1)	100.6±18.0
Ang II	0 (0-1)	99.7±10.3
Ang II+ALA	0 (0-1)	98.0±10.7
Ang II+AVE0991	0 (0-0)	97.5±12.7
Ang II+ALA+AVE0991	0 (0-1)	100.1±14.1

Veriler “ortanca (minimum-maksimum)” olarak verilmiştir.
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0.05).
Kısaltmalar: Ang II: Anjiyotensin II, ALA: Alamandin, TİM: Tunika intima-media kalınlığı.

5. TARTIŞMA

HT, dünya çapında tüm nedenlere bağlı ölümler incelendiğinde önde gelen önlenebilir risk faktörüdür (88). Mills ve arkadaşlarının 90 farklı ülkeden 135 çalışmayı dahil ederek yaptıkları çalışmada, 2010 yılında yaklaşık 1.38 milyar insanın (küresel yetişkin nüfusun %31.1'i), HT'ye sahip olduğu öngörülmüştür (194). HT prevalansı, nüfusun yaşlanması, diyet tercihleri ve sedanter yaşam tarzı gibi risk faktörleri nedeniyle de küresel olarak yaygınlığı artmaktadır (59). Mevcut tedavi yöntemlerine ek olarak yeni tedavi hedeflerinin belirlenebilmesi, ampirik tedaviden öte hastalık patofizyolojisini de düzeltmeye yönelik yeni farmakolojik tedavilerin belirlenebilmesi için farklı deneysel çalışma protokolleri devam etmektedir.

Ang II, FDA tarafından 2017 yılının sonunda septik şoklu hastalarda KB'yi yükseltmek için kullanılması amacıyla onaylanmıştır (195). Bilindiği üzere, bu hasta profilinde mevcut durumda yeterli sıvı desteği sağlandıktan sonra norepinefrin (NE), epinefrin, Phe, dopamin ve vazopressin gibi ilaçlar kullanılmaktadır (196). Sentetik insan Ang II'si (Giapreza, La Jolla Pharmaceuticals) ATHOS-3 klinik çalışmasından elde edilen veriler sonrasında onaylanmıştır (197, 198). Bu çalışmada, Ang II dozunun 20 ng/kg/dk ile başlanarak 80 ng/kg/dk dozunu geçmeyecek şekilde titre edilmesi önerilmektedir. Ang II alan hastaların, plasebo alan hastalarda görülenden 75 mmHg'lik bir ortalama arter basıncına veya ortalama arter basıncında 10 mmHg'lik bir artışa ulaşma olasılığının istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Çalışmamızda, hedeflenen yüksek sistolik KB değerlerini elde edebilmek için Ang II (80 ng/kg/dk) ile indüklenmiş HT modeli tercih edilmiştir. Ang II ile indüklenmiş HT modeli, ilaç ile indüklenmiş HT modelleri arasında en yaygın kullanılan modellerden biridir (12). Ancak KB üzerindeki etkileri, doz ve süre bağımlı uygulamasıyla farklılık göstermektedir. Örneğin, 80 ng/kg/dk infüzyon hızında 14 gün boyunca uygulanan Ang II uygulaması sonrası sistolik KB'nin, 115 mmHg'dan 186 mmHg'ya yükseldiği bildirilmiştir (199). Bir başka çalışmada, 4.2 ng/kg/dk infüzyon hızında 3 hafta boyunca Ang II verilmiş ve KB 115 mmHg'dan 145 mmHg düzeyine yükselmiştir (136). Bir diğer çalışmada, 200 ng/kg/dk infüzyon hızında 2 hafta boyunca osmotik pompa ile Ang II uygulanan *Sprague Dawley* ırkı ratlarda sistolik KB değerleri Kontrol grubunda 144 mmHg iken Ang II grubunda 201 mmHg olarak ölçülmüştür (200). Phillips ve

arkadaşlarının, Ang II ile oluşturulmuş deneysel anevrizma modelinde 1000 ng/kg/dk infüzyon hızında verilmiş ve 14. gün ölçülen sistolik KB değeri 210 mmHg olarak saptanmıştır (201).

Ang II uygulamasının, doğrudan KB artışına yol açan etki mekanizmaları arasında TPD, aldosteron salımı ve indirekt olarak kardiyak output üzerindeki artış etkisi olarak özetlenebilir. Daha önce de belirtildiği üzere; ortalama KB, kardiyak output ve TPD'nin çarpımı ile elde edilmektedir. Kardiyak output ise KH ve atım hacmi (*stroke* volüm) çarpımı sonucu elde edilir. Çalışmamızda, Ang II uygulanan ratlarda yükselen sistolik KB ve KH'de istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış ile gerçekleştiğinden kalbin kronotropisinden bağımsız bir etki ile oluştuğu gözlemlendi. Bu durum, KB'deki artışa sebep olan mekanizmanın atım hacmi ve/veya artmış TPD kaynaklı olduğunu göstermektedir. Ang II'nin atım hacmi üzerindeki etkisi, kalpteki sempatik sinir uçlarından ve adrenal medulladan NE salımını artırarak gerçekleşir (202-204). Hücresel olarak ise Ang II, AT1R üzerinden G_q , G_i ve G_o proteinlerini aktive eder. Agonist-bağlı reseptör, G proteininin α -alt biriminde GTP'nin GDP'ye dönüşümüne neden olur. GTP- $G_q\alpha$ kompleksi daha sonra fosfolipaz C'yi uyarırken G_i proteini, adenilat siklazı inhibe eder; G_o proteini nöronal ω -konotoksin duyarlı kalsiyum kanallarını inhibe eder ve boğmaca toksinine duyarlı G proteinleri, L-tipi Ca^{+2} kanallarını açar. α -alt biriminin intrinsik GTPaz aktivitesi, GTP'yi inaktif GDP'ye hidrolize ederek aktivasyon döngüsünü sonlandırır. Sonuç olarak, doz-bağımlı vazokonstriksiyon, enflamasyon, vasküler proliferasyon ve kardiyak remodeling gibi etkiler ortaya çıkar (205).

Ang II+ALA+AVE0991 grubunda sistolik KB'nin, Ang II+ALA ve Ang II+AVE0991 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla düşmüş olması, MrgD'nin Mas reseptörüne ilaveten ek bir KB düşüşü sağladığını göstermektedir. Bu durumun bir diğer muhtemel nedeni, Jesus ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (179) ile uyumlu olarak ALA'nın AVE0991'den farklı olarak AMPK/NO yolağını da aktive etmesinden kaynaklanabilir. Söz konusu çalışmada, MrgD'nin ALA ile ilişkili AMPK/NO yolağı aktivasyonunun AVE0991'in Mas reseptöründen bağımsız olarak gerçekleştiği; Mas geni silinmiş miyositlerde ALA'nın AMPK/NO yolağının korunmuş olması ve Mas antagonisti A-779'un ALA'nın bu etkisini ortadan kaldıramaması olarak açıklanmıştır. Çalışmamızdaki tüm veriler birlikte incelendiğinde ALA'nın RAAS içinde MrgD üzerinden yeni ve önemli bir koruyucu yolak ile ilişkili olduğu hipotezini ve Lautner ve arkadaşlarının ALA'yı keşfi ile başlayan süreci destekler niteliktedir (176).

Anke ve arkadaşları, erkek *Sprague Dawley* ırkı ratlarda, plazma Ang II düzeyi ile su içme cevabı arasındaki ilişkisini araştırdıkları çalışmada, 100 ng/kg/dk infüzyon hızından yüksek Ang II uygulanan gruplarda su içme refleksinin arttığını ancak 25, 50 ve 75 ng/kg/dk dozlarda belirgin olarak etkilenmediğini bildirmiştir (206). Çalışmamızda, deney sonu ölçülen su tüketim miktarları ölçüldüğünde Ang II grubunda diğer gruplara göre daha az su tüketim miktarı muhtemelen Ang II uygulamasına bağlı AT1R aktivasyonu ile artan aldosteron miktarına bağlı olarak Na⁺ tutulumunun artması ve buna bağlı olarak H₂O'nun atılımındaki azalma ile ilişkili olabilir. Zhuo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 80 ng/kg/dk infüzyon hızında Ang II uygulamasının 14. gün sonunda 24 saatlik idrardaki idrar Na⁺ düzeyi, Kontrol grubunda 1.91 mmol iken 1.64 mmol'e gerilemiştir (199). Bu da çalışmamızdaki KB artışında Ang II uygulamasına bağlı aldosteron salgısındaki artışın da katkısının olma ihtimalini göstermektedir.

Çalışmamızda, Phe kasılma cevapları incelendiğinde Ang II+AVE0991 grubundaki pD₂ değerinin Ang II grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermesinin muhtemel bir açıklaması AVE0991'in Ang II varlığında parsiyel agonistik etki göstermesi olabilir. Bu hipotezin doğrulanması amacıyla, Ang II+AVE0991 uygulaması ile SHR, DOCA+tuz gibi farklı bir deneysel HT modeli ile aynı çalışmada benzer koşullar sağlanarak yapılması ve Phe cevaplarının karşılaştırılmasına ihtiyaç vardır. Örneğin, çalışmamızdaki AVE0991'in daha önce bildirilmemiş bu parsiyel agonist özelliğini teyit edecek bulgu, bahsedilen farklı deney modellerindeki torasik aort kasılma cevapları ile elde edilen pD₂ değerlerinin daha düşük çıkması olacaktır. Mesela, intrinsik semptomimetik aktiviteye sahip olan pindolol, asebutolol veya penbutolol gibi beta blokerler; epinefrin ve NE'nin etkilerini taklit ederler. Bu da klasik olarak beta blokerlerden beklenen etkinin aksine istirahat halindeki KB ve KH üzerinde farklı etkileri oluşmasına sebep olmaktadır.

Çalışmamızdaki, Ach bağımlı gevşeme cevapları incelendiğinde hem ALA hem de AVE0991'in aortta gevşeme cevabı oluşturduğu, kombine verildiği Ang II+ALA+AVE0991 grubunda ise bu cevap ile ilişkili pD₂ değerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Lautner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ALA'nın hem FVB/N farelerde hem de Wistar ratlarda endotel bağımlı aort gevşemesi oluşturduğu bildirilmiştir (176). Aynı çalışmada, L-NAME ile eşzamanlı veya endotel hasarı varlığında ALA verildiğinde gevşeme cevabının oluşmadığı gösterilerek etki mekanizmasının NO aracılı olduğu ifade edilmiştir. ALA'nın endotel bağımlı NO aracılı gevşeme cevabı, Habiyakare

ve arkadaşları tarafından tavşan torasik aortunda da gösterilmiştir (173). Bu mekanizmanın AVE0991'in meydana getirdiği aort gevşeme cevabında da rol aldığı birçok çalışmada gösterilmiş (22, 207) ve L-NAME ile verildiğinde gevşeme cevabının oluşmadığı saptanmıştır (165).

ACE-2, damar endoteli dışında kardiyomiyositler ve kardiyak fibroblastlarda da bulunur (208). ACE-2 gen ve enziminin hem insanlarda hem de deney hayvanlarında kardiyovasküler sistem açısından oldukça önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (209). Crackower ve arkadaşlarının ACE-2 geni silinmiş fareler üzerinde yaptığı çalışmada, ACE-2 proteininin yokluğundan dolayı kalbin kasılma fonksiyonlarında bozulma, Ang II düzeylerinde ve hipoksi ile indüklen gen ekspresyonlarında artış gerçekleştiği bildirilmiştir (210). Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarda da ACE-2 düzeylerinin HT, kalp yetmezliği, obezite ve bağ doku hastalığı gibi birçok hastalıkta değişebileceği gösterilmiştir (211, 212). Hekmat ve arkadaşlarının yaptığı renovasküler HT modeli çalışmasında, 2 hafta boyunca 600 mcg/kg/gün ALA infüzyonu uygulanmış ve ACE-2 gen ekspresyonunun çalışmadaki normotansif seviyelere düştüğü bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada ALA'nın ACE-2'nin protein düzeylerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir (213). Literatürde AVE0991 ve ACE-2 ilişkisinin araştırıldığı Klein ve arkadaşlarının deneysel karaciğer siroz çalışmasında, AVE0991'in hemodinamik etkileri incelenmiş ve AVE0991'in karaciğerdeki ACE-2 düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (214). Çalışmamız, AVE0991 ile ACE-2 protein düzeyleri arasındaki ilişkiyi HT varlığında ortaya koyan ilk çalışma olması açısından da önemlidir.

Çalışmamızda Ang II ile oluşturulan HT grubunda, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kalp dokularındaki ACE-2 protein düzeyleri benzer düzeylerde iken aort dokularında bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi. Ang II+ALA grubunda Ang II grubu ile karşılaştırıldığında görece bir artış olsa da Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarındaki gibi anlamlı bir artış ile sonuçlanmadı. İlgili çalışmada kullanılan HT modelinin, ALA dozunun ve uygulama yönteminin çalışmamızdan farklı olmasının yanında bir gen ekspresyon seviyesinin protein seviyesi ile her zaman orantılı olmayabileceğinden de kaynaklanabilir. Transkripsiyon, translasyon veya protein yıkımı gibi birçok faktörün protein konsantrasyonlarını etkileyeceği iyi bilinen bir gerçektir (215). Bu nedenle 28 günlük HT modelimizde, artan Ang II konsantrasyonlarının, ACE-2 proteininin lizozomlar tarafından parçalanması ile

azalmış olabileceği kanaatindeyiz. Özellikle AVE0991 ve ALA+AVE0991 kombinasyonunun ACE-2 değerlerini artırdığı göz önüne alındığında, RAAS'ın kardiyoprotektif yolağının aktivasyonu ile HT tedavisinde önemli bir terapötik etki elde edilebilecektir.

Oksidatif stres, artan ROT üretimi nedeniyle HT dahil birçok kardiyovasküler hastalığın patogenezinde önemli bir rol alır. Çalışmamızda HT oluşturmak için kullandığımız Ang II'nin, nötrofilleri ve makrofajların etkilenen dokulara göçünü uyarmasının yanında İL-6, TNF- α gibi sitokinleri uyararak enflamasyonu ve ROT aracılı oksidatif hasar oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (216, 217). NOX'ların, Ang II'ye cevap olarak damar endoteli ve düz kas hücrelerinde ROT üretimini düzenleyen ana enzim sistemi olduğu kabul edilmektedir (218). Ancak Soe ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada CYP-A'nın NOX-bağımlı oksidatif stres yolağında öncül ve gerekli olduğunu göstermeleri (219), CYP-A'nın sadece HT değil oksidatif stresin patogenezinde rol aldığı hastalıklarda önemli bir terapötik hedef de olabileceğini göstermiştir (30, 220). Örneğin, NOX sitozolik (p47phox, p67phox, rac1) ve membran (NOX ailesi) alt birimlerinden oluştuğu ve düzenleyici alt birim p47phox'un plazma zarına (özellikle kaveolaya) yerleşmesi ve tam aktivasyonu için NOX'un diğer alt birimleriyle birleşmesi gerektiğinden yola çıkarak CYP-A geni silinmiş damar düz kas hücrelerine lentivirüs aracılığıyla CYP-A aktarılmış ve Ang II uygulamasına bağlı ROT üretiminin belirgin olarak arttığı gözlenmiş. Ardından CYP-A aracılı ROT üretiminde p47phox'un rolünü belirlemek için hemaglutinin-p47phox CYP-A geni silinmiş damar düz kas hücrelerine uygulandığında ROT üretimini artırmadığı görülmüş. Ancak, p47phox ve CYP-A'nın birlikte aktarıldığı düz kas hücrelerinde, ROT üretiminin, CYP-A aktarılmış hücrelere kıyasla belirgin bir şekilde arttığı, bunun da CYP-A'nın damar düz kas hücrelerinde Ang II ile indüklenen ROS üretimi için öncül ve gerekli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, NOX'un p47phox ve CYP-A tarafından düzenlenen ROT üretiminde yer alan ana enzim olduğunu kanıtlamak için, NOX inhibisyonunun, Ang II kaynaklı ROS üretimini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (219). Çalışmamızda, Ang II grubunda kalp ve aort dokularındaki CYP-A düzeylerinin Kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış göstermesi, HT oluşumunda oksidatif stres yolağının uyarıldığını gösterse de hem kalp hem de damar dokularındaki NOX-4 düzeylerinde herhangi bir artış sağlamamış olması çalışmamızdaki HT patofizyolojisinde NOX-4 bağımsız bir etkinin oluştuğunu göstermektedir. NOX-4'ün yanında NOX-2 başta olmak üzere diğer alt tiplerinin de HT patogenezinde rol aldığı

birçok çalışmada gösterilmiştir (221-223). Yapılacak ileri çalışmalarda, diğer alt tiplerin düzeylerinin incelenmesi, 80 ng/kg/dk infüzyon hızındaki Ang II uygulamasında ortaya çıkan oksidatif stres mekanizmasını aydınlatacaktır. Hem kardiyak hem aort dokusundaki CYP-A düzeylerinde Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarında Ang II grubuna göre daha düşük olması, ALA ve AVE0991'in CYP-A düzeylerini azalttığını gösteren literatürdeki ilk çalışma olması açısından da oldukça önemlidir.

Yine, Ang II uygulamasına bağlı NOX aktivasyonu sonucu artan ROT üretiminin, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını da artırarak HT ve kardiyak fibrozis patogenezinde rol alabileceği gösterilmiştir (12, 132, 224, 225). Ancak çalışmamızda, literatürden farklı olarak Ang II uygulanan grupta kalp ve aort dokularındaki MMP-2, MMP-9 ve NOX-4 düzeylerinde anlamlı bir yükselme tespit edilmemiştir. Bu durumun muhtemel bir açıklaması, çalışmamızda kullanılan Ang II dozunun -her ne kadar ilgili modelin oluşturduğu literatürlere dayanarak seçilmiş olsa da- (199) birçok çalışmadakine göre çok düşük olması düşünülebilir (222, 226-228). Nitekim çalışmamızda yer alan tüm grupların aort dokuları incelendiğinde vasküler hipertrofi göstergesi olarak TIM kalınlıkları ve elastin yapılarının da benzer olması bu durumu desteklemektedir.

LOX, lizin ve hidroksilizin kalıntılarının oksidatif deaminasyonu ile kollajen ve elastin liflerinde molekül içi ve moleküller arası kovalent çapraz bağlantıların oluşumunu sağlayarak ECM kompozisyonunda önemli bir rol oynar (229). Bu nedenle HT'den kalp yetmezliğine kadar birçok kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda ve takip süreçlerinde üzerinde araştırmalar devam etmektedir (230-232). LOX, yan ürün olarak H₂O₂ üreterek aynı zamanda vasküler ve kardiyak dokulardaki oksidatif strese artışa sebep olduğu gösterilmiştir (233, 234). Çalışmamızda, LOX tayini kalp ve aort dokularında, kit içerisindeki bazal LOX miktarı içeren kontrole göre semikantitatif olarak yapıldı. Bu ölçüm sonucunda kit yönergeleri ile orantılı olarak Kontrol grubunun kalp dokularında bazal değerlere göre 3 katlık bir artış gözlemlendi. Ancak çalışmamızdaki gruplardan elde ettiğimiz kalp ve damar dokularında LOX verileri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu bağlamda, çalışmamızdaki verinin aksine literatürde SHR'lerde LOX düzeylerinin normotansif Wistar ratlar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir (235). Bir diğer çalışmada, yüksek doz Ang II ile indüklenmiş HT çalışmasında, LOX'un farelerde *in vivo* olarak vasküler kompliyansı azaltarak HT gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

Aynı çalışmada, HT grubundaki vasküler *remodeling*in LOX inhibisyonu ile azaldığı gösterilmiştir (236). Çalışmamızdaki veriler bir bütün olarak incelendiğinde, gruplardaki aort yapısının ve elastin düzeylerinin Kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği göz önüne alındığında LOX-bağımlı oksidatif stres yolağının ve ECM kompozisyonunun etkilenmemesinin, çalışmamızda kullandığımız Ang II dozu ve deney modeli ile ilişki olabileceği kanaatindeyiz. Ancak bu ilişkinin tam olarak anlaşılabilmesi için yapılacak ileri bilimsel çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Ang II infüzyonunun, ROT üretimini artırmasının yanında kalp dokusunda ve aort tunika adventisiasında gerek adezyon moleküllerinin gerekse monositlerden MCP-1 gibi kemokinlerin ekspresyonunu artırarak monosit kemotaksisini indüklediği bilinmektedir (237). Koyanagi ve arkadaşlarının Wistar-Kyoto ratlara L-NAME verilerek oluşturulan HT ile ortaya çıkan kardiyovasküler remodeling çalışmasında, MCP-1'e spesifik monoklonal nötralize edici antikoru uygulanmasıyla ratların kalp dokularında makrofaj birikimini etkili bir şekilde önlediği gösterilmiştir (238). Behr ve arkadaşları, inme eğilimli SHR ve yüksek tuzlu, yüksek yağlı diyet ile indüklenmiş rat kardiyak hipertrofi çalışmasında, AT1R blokleri eprosartan uygulamasının MCP-1'i mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonunu baskılayarak sol ventrikülün monosit ve makrofaj infiltrasyonunu azaltarak kardiyak hipertrofiyi belirgin şekilde azalttığı ve ekokardiyografik belirteçlerde belirgin iyileşme sağladığı saptanmıştır (239). Çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak Ang II grubunda kardiyak MCP-1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. Her ne kadar, MCP-1 ve makrofaj düzeylerinin kardiyak hasar ile ilişkili olduğu bilgiler mevcut olsa da hipertansif ratlarda MCP-1'in azalması ile ilişkili makrofajdan yoksun kalp dokusunda CD4⁺ T lenfosit infiltrasyonunun arttığı ve yaygın kardiyomiyosit kaybı görülmesi ile hipertansif kardiyomiyopati ve son dönem kalp yetmezliğinin gelişmesini hızlandırabileceği de bildirilmiştir (240). HT'de makrofaj aktivasyonunun kardiyak hasar sonrası rejenerasyon süreçlerinde de rol oynadığı bu nedenle akut ve kronik hastalık süreçlerinde düzeylerinin değişebileceği bildirilmiştir (241). Literatürde çalışmamızdaki verilerle uyumlu olarak AVE0991'in farklı deney modellerinde MCP-1 düzeylerini azalttığına dair birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, AVE0991'in ovalbumin ile indüklenmiş astım modelinde c-Jun-N-terminal kinaz yolağı üzerinden MCP-1'i azaltarak bronş epitelinde artan enflamasyonu ve makrofaj göçünü azalttığı gösterilmiştir (242). Bir diğer çalışmada ise ApoE geni silinmiş farelere verilen 1000 ng/kg/dk Ang II infüzyonu sonrası abdominal

aorttaki makrofaj göçünde anlamlı bir azalma hem MCP-1 düzeylerinde hem de histopatolojik olarak gösterilmiştir (243). Jawien ve arkadaşları, aterosklerotik C57BL/6 farelerde, AVE0991'in MCP-1, İL-6 ve İL-12'i baskılayarak enflamasyonu güçlü bir şekilde baskıladığını bildirmiştir (244). ALA'nın transvers aortik konstriksiyon modelinde asendan aorttaki enflamasyonu ve makrofaj göçünü TNF- α , İL-1 β ve MCP-1'i azaltarak sağladığı raporlanmıştır (182). Bir diğer çalışmada ise Balb/c farelere intraplevral *Escherichia coli* enjeksiyonu ile oluşturulan *in vivo* plövrezi modelinde ve hücre kültürü çalışmasında ALA'nın doz bağımlı olarak MCP-1'in gen ve protein düzeyinde ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (245). Çalışmamızda Ang II+ALA, Ang II+AVE0991 ve Ang II+ALA+AVE0991 gruplarında MCP-1 düzeylerinin Ang II grubuna göre anlamlı olarak azalmış olması çalışmamızdaki diğer veriler ile de örtüşmektedir. Çalışmamız, ALA'nın HT varlığında kardiyak MCP-1 proteinin düzeylerini azalttığına gösterildiği ilk çalışma olması açısından önemlidir.

Ang II'nin kalp dokusu üzerindeki histopatolojik etkileri, doz ve süre bağımlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin, sol ventrikül hipertrofisi (246), kardiyak fibrozis (247), interstisyel ödem, kardiyomiyosit dejenerasyonu, enflamasyon ve hemoraji (248, 249) birçok farklı çalışmalarda bildirilmiştir. Çalışmamızda yer alan Ang II doz ve uygulama süresi göz önünde alındığında, literatür ile uyumlu olarak kardiyomiyosit dejenerasyonu ve interstisyel ödemde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Ancak çalışmamızın aksine Hekmat ve arkadaşlarının yaptıkları renovasküler HT modeli çalışmasında (250), 600 mcg/kg/gün infüzyon hızında verilen ALA'nın kalp dokusundaki kardiyomiyosit dejenerasyonunu önlediği bildirilmiştir. Bunun muhtemel bir nedeni, ALA'nın doz bağımlı değişen cevabı ve sürekli infüzyon yoluyla verilmiş olması olabilir. AVE0991'in Ang II ile indüklenmiş kardiyak hipertrofi ve renovasküler HT modeli çalışmalarında kardiyomiyosit dejenerasyonunu anlamlı olarak azalttığı literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir (251, 252).

Ang II'nin aort dokusu üzerindeki etkileri de benzer şekilde uygulanan dozlama göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, 28 gün süreyle 1000 ng/kg/dk infüzyon hızında Ang II uygulandığında aort dokusunda fibrozis, elastin kaybı, kolajen birikimi ve vasküler hipertrofi geliştiği bildirilmiştir (253). Gomolak ve Didion'un 50, 100, 200, 400, or 1000 ng/kg/dk infüzyon hızında, 14 ve 28 gün boyunca Ang II uygulanmasının torasik aort üzerindeki histopatolojik etkilerini araştırdıkları çalışmada (254), 200 ng/kg/dk ve üzeri uygulamalarda 14. günde vasküler hipertrofi geliştiği ancak 50 ve 100 ng/kg/dk

uygulamalarda vasküler yapının korunduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, vasküler hipertrofi göstergesi olarak ölçülen TİM kalınlığının Ang II uygulamasına bağlı olarak etkilenmemiş olması, literatür ile uyumludur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Terapötik etkilerini araştırdığımız MrgD agonisti ALA ve Mas reseptör agonisti AVE0991 kombinasyonunun, başta sistolik KB olmak üzere Ang II ile indüklenmiş HT ve patogenezinde yer alan CYP-A bağımlı oksidatif stres, aort dokusundaki ACE-2 düzeyleri, kalp dokusundaki MCP-1 düzeyleri, kalp dokularındaki kardiyomyosit dejenerasyonu ve interstisyel ödem ve damar-gevşeme cevaplarındaki olumlu etkileri göz önüne alındığında faydalı bulunmuştur.

Çalışmamızdaki deney protokolünün 28 gün olması, Ang II uygulamasının 1. günden itibaren başlaması, etkililikleri araştırılan ilaçların 14 gün boyunca verilmiş olması, sistolik KB'nin yükseldiği klinik durumlara uyarlanabilirliğini artırmaktadır. Deneysel HT çalışmalarına ait güncel literatür verileri incelendiğinde sıklıkla proflaktik yaklaşımlar üzerinde durulduğu görülmektedir. Ancak bu çalışmalardan elde edilen verilerin klinik uyarlanabilirliği oldukça düşük kalmaktadır. Örneğin, HT patogenezinde yer alan oksidatif stres, RAAS aktivasyonu, NO salımında azalma, endotel hasarı gibi yollar aktive edilir edilmez antioksidan, NO donörü veya direkt RAAS üzerinden etkililiği bilinen bir ilacın antihipertansif etkinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur. Bu durum, klinik uyarlanabilirlik açısından incelendiğinde çalışmamızı ve deney protokolümüzü önemli kılmaktadır.

Benzer çalışma protokolümüzün, 200 ng/kg/dk, 450 ng/kg/dk veya 1000 ng/kg/dk gibi daha yüksek dozlarda Ang II uygulaması ile HT patogenezinde yer alan ilgili yolların daha şiddetli aktivasyonu ile antihipertansif etkililiği araştırılan ilaçların etki mekanizmalarının daha belirgin bir şekilde tanımlanması mümkün olacaktır. Bu da Ang II'nin doz bağımlı etkilerinin daha iyi tanımlanmasını ve septik şok gibi klinik kullanımında karşılaşılabilecek durumların öngörülebilmesine de imkân sağlayacaktır.

Etkililiğini araştırdığımız ALA ile ilgili deneysel çalışmalar oldukça sınırlı olmasına rağmen gerek antihipertansif etki gerekse enflamasyon, fibrozis ve oksidatif stres belirteçleri üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız 50 mcg/kg dozun artırılmasının yanında oldukça kısa yarılanma süresi de göz önüne alındığında amaca uygun olacak şekilde daha uzun yarılanma ömrüne sahip telmisartan, benazepril gibi ilaçlar ile kombine olarak denenmesi durumunda da istenilen KB hedeflerine ulaşma noktasında etkili olacağı kanaatindeyiz. Benzer şekilde, kardiyak

dekompansasyonun veya sıvı yüklenmesinin eşlik ettiği HT modellerinde diüretik nitelikte bir ilaç ile kombine olarak faydalı olacağını öngörmekteyiz. Bir diğer alternatif ise HT patogenezinde oldukça önemli bir yere sahip olan oksidatif stres mekanizmaları üzerinde güçlü bir etki sağlayacak melatonin veya resveratrol gibi yüksek antioksidan aktiviteye sahip ilaçlar ile birlikte denenmesi de bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır.

Yapılacak ileri çalışmalarda, metabolik kafesin kullanılması, endotel bağımsız damar gevşeme cevapları ile NO aracısız damar gevşeme mekanizmalarının araştırılması AVE0991 ve ALA'ya yönelik bilgi birikiminin gelişmesini sağlayacaktır.

Çalışmamızdaki bir diğer önemli kimyasal olan Mas reseptör agonisti AVE0991'in bilinen antihipertansif ve terapötik etkililiği, literatür ile uyumlu bir şekilde doğrulanmıştır.



KAYNAKLAR

1. Ventura HO, Lavie CJ. Editorial: Epidemiology and managing aspects of hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2019, 34(4): 329-30.
2. Carey RM, Whelton PK. Prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: synopsis of the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association Hypertension Guideline. *Ann Intern Med* 2018, 168(5): 351-8.
3. Yurekli AA, Bilir N, Husain MJ. Projecting burden of hypertension and its management in Turkey, 2015-2030. *PLoS One* 2019, 14(9): e0221556.
4. Zoghi M, Kış M. Türkiye’de yaşlı hastalarla ilgili çalışmalar ve sonuçları. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2017, 45(5): 143-6.
5. Kiliçkap M, Barçın C, Göksülük H, Karaaslan D, Özer N, Kayıkçıoğlu M, Ural D, Yılmaz MB, Abacı A, Arıcı M, Altun B, Tokgözoğlu L, Şahin M. Türkiye’de hipertansiyon sikliği ve kan basıncı verileri: Kardiyovasküler risk faktörlerine yönelik epidemiyolojik çalışmaların sistematik derleme, meta-analiz ve meta-regresyonu. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2018: 525-45.
6. Khera R, Lu Y, Lu J, Saxena A, Nasir K, Jiang L, Krumholz HM. Impact of 2017 ACC/AHA guidelines on prevalence of hypertension and eligibility for antihypertensive treatment in United States and China: nationally representative cross sectional study. *BMJ* 2018, 362: k2357.
7. Muntner P, Carey RM, Gidding S, Jones DW, Taler SJ, Wright JT Jr, Whelton PK. Potential US population impact of the 2017 ACC/AHA high blood pressure guideline. *Circulation* 2018, 137(2): 109-18.
8. Reboussin DM, Allen NB, Griswold ME, Guallar E, Hong Y, Lackland DT, Miller EPR 3rd, Polonsky T, Thompson-Paul AM, Vupputuri S. Systematic review for the 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2018, 71(19): 2176-98.
9. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon

- J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J* 2018, 39(33): 3021-104.
10. Wright JM, Musini VM, Gill R. First-line drugs for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2018, 4(4): CD001841.
 11. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbiagele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2018, 71(19): e127-248.
 12. Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM. Animal models of hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 2019, 73(6): e87-120.
 13. Kaschina E, Steckelings UM, Unger T. Hypertension and the renin-angiotensin-aldosterone system. In: Huhtaniemi I (ed). *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 2nd ed. San Diego, Elsevier Editor; 2018: 505-10.
 14. Gurley SB, Riquier-Brison ADM, Schnermann J, Sparks MA, Allen AM, Haase VH, Snouwaert JN, Le TH, McDonough AA, Koller BH, Coffman TM. AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell Metab* 2011, 13(4): 469-75.
 15. Senatore F, Jagadeesh G, Rose M, Pillai VC, Hariharan S, Liu Q, McDowell TY, Sapru MK, Southworth MR, Stockbridge N. FDA approval of angiotensin II for the treatment of hypotension in adults with distributive shock. *Am J Cardiovasc Drugs* 2019, 19(1): 11-20.

16. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000, 87(5): E1-9.
17. Cohen-Segev R, Francis B, Abu-Saleh N, Awad H, Lazarovich A, Kabala A, Aronson D, Abassi Z. Cardiac and renal distribution of ACE and ACE-2 in rats with heart failure. *Acta Histochem* 2014, 116(8): 1342-9.
18. Tikellis C, Thomas MC. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) is a key modulator of the renin angiotensin system in health and disease. *Int J Pept* 2012, 2012: 256294.
19. Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension* 2005, 46(4): 948-52.
20. Ferrario CM, Cheng CP, Varagic J. Angiotensin-(1-7) and the Heart. In: Santos RAS (ed). *Angiotensin-(1-7)*, 1th ed. Cham, Springer, 2019: 83-104.
21. Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004, 44(4): 490-6.
22. Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension* 2002, 40(6): 847-52.
23. Cassis LA, Gupte M, Thayer S, Zhang X, Charnigo R, Howatt DA, Rateri DL, Daugherty A. ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, 296(5): H1660-5.
24. Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res* 2007, 73(3): 463-9.
25. Benter IF, Yousif MH, Al-Saleh FM, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) blockade attenuates captopril-or hydralazine-induced cardiovascular protection in spontaneously hypertensive rats-treated with L-NAME. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011, 57(5): 559.

26. Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth JD, Berk BC. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res* 2000, 87(9): 789-96.
27. Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, Soe NN, Cui Z, Mohan A, Abe J, Alexis JD, Sparks JD, Berk BC. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2011, 208(1): 53-66.
28. Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR, Bukrinsky MI, Constant SL. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol* 2005, 175(1): 517-22.
29. Yang Y, Lu N, Zhou J, Chen ZN, Zhu P. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008, 47(9): 1299-310.
30. Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, Mohan A, Yan C, Abe J, Illig KA, Berk BC. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med* 2009, 15(6): 649-56.
31. Craighead DH, Wang H, Santhanam L, Alexander LM. Acute lysyl oxidase inhibition alters microvascular function in normotensive but not hypertensive men and women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018, 314(3): H424-33.
32. Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2008, 79(1): 7-13.
33. Simpson CF, Kling JM, Palmer RF. The use of propranolol for the protection of turkeys from the development of β -aminopropionitrile-induced aortic ruptures. *Angiology* 1968, 19(7): 414-8.
34. Li JS, Li HY, Wang L, Zhang L, Jing ZP. Comparison of beta-aminopropionitrile-induced aortic dissection model in rats by different administration and dosage. *Vascular* 2013, 21(5): 287-92.
35. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009, 29(6): 313-26.

36. Zhuo JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator of angiotensin II-induced target organ damage in hypertensive heart disease? *J Hypertens* 2004, 22(3): 451-4.
37. Hopps E, Lo Presti R, Caimi G. Matrix metalloproteases in arterial hypertension and their trend after antihypertensive treatment. *Kidney Blood Press Res* 2017, 42(2): 347-57.
38. Kwiatkowska E, Domanski L, Bober J, Safranow K, Romanowski M, Pawlik A, Kwiatkowski S, Ciechanowski K. Urinary metalloproteinases-9 and -2 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 are markers of early and long-term graft function after renal transplantation. *Kidney Blood Press Res* 2016, 41(3): 288-97.
39. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010, 20(3): 161-8.
40. Tan J, Hua Q, Xing X, Wen J, Liu R, Yang Z. Impact of the metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system on large arterial stiffness in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2007, 30(10): 959-63.
41. Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 2004, 109(8): 1041-7.
42. Katholi RE, Couri DM. Left ventricular hypertrophy: major risk factor in patients with hypertension: update and practical clinical applications. *Int J Hypertens* 2011, 2011: 495349.
43. Li H, Simon H, Bocan TM, Peterson JT. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res* 2000, 46(2): 298-306.
44. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001, 269(1-2): 131-40.
45. Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000, 87(1): 26-32.

46. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007, 87(1): 245-313.
47. BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C, Görlach A. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2007, 42(4): 446-59.
48. Bouabou G, Ayme-Dietrich E, Jacob H, Champy MF, Birling MC, Pavlovic G, Madeira L, Fertak LE, Petit-Demoulière B, Sorg T, Herault Y, Mudgett J, Monassier L. Nox4 genetic inhibition in experimental hypertension and metabolic syndrome. *Arch Cardiovasc Dis* 2018, 111(1): 41-52.
49. Siu KL, Gao L, Cai H. Differential roles of protein complexes NOX1-NOXO1 and NOX2-p47phox in mediating endothelial redox responses to oscillatory and unidirectional laminar shear stress. *J Biol Chem* 2016, 291(16): 8653-62.
50. Welch WJ. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 2008, 52(1): 51-6.
51. Miller T. Structure and physiology of the circulatory system. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* 1985, 3: 289-353.
52. Hansen JT. *Netter's Clinical Anatomy*, 4th ed. Philadelphia, Elsevier, 2017: 216-38.
53. Hill AJ, Iaizzo PA. Comparative cardiac anatomy. In: Iaizzo PA (ed). *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices*, 3th ed. Cham, Springer, 2015: 89-114.
54. Buja LM, Butany J. *Cardiovascular pathology*, 4th ed. London, Academic Press, 2015: 1-51.
55. Vuong PN, Berry C. *The pathology of vessels*, 1th ed. Paris, Springer, 2013: 1-25.
56. McVeigh GE, Burns DE, Finkelstein SM, McDonald KM, Mock JE, Feske W, Carlyle PF, Flack J, Grimm R, Cohn JN. Reduced vascular compliance as a marker for essential hypertension. *Am J Hypertens* 1991, 4(3 Pt 1): 245-51.
57. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013, 9(10): 1057-69.
58. Ng FL, Lobo MD. Investigation and management of adult hypertension. *Heart* 2018, 104(18): 1543-51.

59. GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018, 392(10159): 1923.
60. Bakris G, Ali W, Parati G. ACC/AHA Versus ESC/ESH on Hypertension Guidelines: JACC Guideline Comparison. *J Am Coll Cardiol* 2019, 73(23): 3018-26.
61. Saxena T, Ali AO, Saxena M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2018, 16(12): 879-87.
62. Garfinkle MA. Salt and essential hypertension: pathophysiology and implications for treatment. *J Am Soc Hypertens* 2017, 11(6): 385-91.
63. Chaudhary P, Pandey A, Azad CS, Tia N, Singh M, Gambhir IS. Association of oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Anal Biochem* 2020, 590: 113535.
64. Sasaki N, Ozono R, Higashi Y, Maeda R, Kihara Y. Association of insulin resistance, plasma glucose level, and serum insulin level with hypertension in a population with different stages of impaired glucose metabolism. *J Am Heart Assoc* 2020, 9(7): e015546.
65. Ferdinand KC, Nasser SA. Management of essential hypertension. *Cardiol Clin* 2017, 35(2): 231-46.
66. Pizoń T, Rajzer M, Wojciechowska W, Wach-Pizoń M, Drożdż T, Wróbel K, Gruszka K, Rojek M, Kameczura T, Jurczynszyn A, Kąkol J, Czarnecka D. The relationship between plasma renin activity and serum lipid profiles in patients with primary arterial hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2018, 19(4): 1470320318810022.
67. Cabarkapa V, Ilincic B, Deric M, Vucaj Cirilovic V, Kresoja M, Zeravica R, Sakac V. Cystatin C, vascular biomarkers and measured glomerular filtration rate in patients with unresponsive hypertensive phenotype: a pilot study. *Ren Fail* 2017, 39(1): 203-10.
68. Kohno M, Hanehira T, Kano H, Horio T, Yokokawa K, Ikeda M, Minami M, Yasunari K, Yoshikawa J. Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 1996, 27(1): 102-7.

69. Kalantari S, Khalili D, Asgari S, Fahimfar N, Hadaegh F, Tohidi M, Azizi F. Predictors of early adulthood hypertension during adolescence: a population-based cohort study. *BMC Public Health* 2017, 17(1): 915.
70. Shere A, Eletta O, Goyal H. Circulating blood biomarkers in essential hypertension: a literature review. *J Lab Precis Med* 2017, 2(99): 1-11.
71. Togliatto G, Lombardo G, Brizzi MF. The Future challenge of reactive oxygen species (ROS) in hypertension: from bench to bed side. *Int J Mol Sci* 2017, 18(9): 1988.
72. Chrysaidou K, Chainoglou A, Karava V, Dotis J, Printza N, Stabouli S. Secondary hypertension in children and adolescents: novel insights. *Curr Hypertens Rev* 2020, 16(1): 37-44.
73. Charles L, Triscott J, Dobbs B. Secondary hypertension: discovering the underlying cause. *Am Fam Physician* 2017, 96(7): 453-61.
74. Grossman A, Messerli FH, Grossman E. Drug induced hypertension-an unappreciated cause of secondary hypertension. *Eur J Pharmacol* 2015, 15;763(Pt A): 15-22.
75. Foy MC, Vaishnav J, Sperati CJ. Drug-induced hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019, 48(4): 859-73.
76. Caldeira D, Alves D, Costa J, Ferreira JJ, Pinto FJ. Ibrutinib increases the risk of hypertension and atrial fibrillation: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2019, 14(2): e0211228.
77. Li M, Kroetz DL. Bevacizumab-induced hypertension: Clinical presentation and molecular understanding. *Pharmacol Ther* 2018, 182: 152-60.
78. Cohen DL, Fishbein L. Secondary hypertension: pheochromocytoma and paraganglioma. In: Bakris GL, Sorrentino M (eds). *Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, 3th ed. Philadelphia, Elsevier, 2017: 136.
79. Burrello J, Monticone S, Buffolo F, Tetti M, Veglio F, Williams TA, Mulatero P. Is there a role for genomics in the management of hypertension? *Int J Mol Sci* 2017, 18(6): 1131.
80. Raina R, Krishnappa V, Das A, Amin H, Radhakrishnan Y, Nair NR, Kusumi K. Overview of monogenic or mendelian forms of hypertension. *Front Pediatr* 2019, 7: 263.

81. Aggarwal A, Rodriguez-Buritica D. Monogenic hypertension in children: a review with emphasis on genetics. *Adv Chronic Kidney Dis* 2017, 24(6): 372-9.
82. American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' task force on hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013, 122(5): 1122-31.
83. Sava RI, March KL, Pepine CJ. Hypertension in pregnancy: Taking cues from pathophysiology for clinical practice *Clin Cardiol* 2018, 41(2): 220-7.
84. Shantsila A, Lip GY. Malignant hypertension revisited—does this still exist? *Am J Hypertens* 2017, 30(6): 543-9.
85. Van Laecke S, Van Biesen W. Severe hypertension with renal thrombotic microangiopathy: what happened to the usual suspect? *Kidney Int* 2017, 91(6): 1271-4.
86. Gosse P, Boulestreau R, Brockers C, Puel C, Rubin S, Cremer A. The pharmacological management of malignant hypertension. *J Hypertens* 2020, 38(11): 2325-30.
87. Peixoto AJ. Acute Severe Hypertension. *N Engl J Med* 2019, 381(19): 1843-52.
88. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol* 2020, 16(4): 223-37.
89. Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cifkova R, Dominiczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A, Whelton PK. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* 2018, 4: 18014.
90. Kjeldsen SE. Hypertension and cardiovascular risk: General aspects. *Pharmacol Res* 2018, 129: 95-9.
91. Fuchs FD, Whelton PK. High blood pressure and cardiovascular disease. *Hypertension* 2020, 75(2): 285-92.
92. Harrison DG, Coffman TM, Wilcox CS. Pathophysiology of hypertension: the mosaic theory and beyond. *Circ Res* 2021, 128(7): 847-63.
93. Di Giosia P, Giorgini P, Stamerra CA, Petrarca M, Ferri C, Sahebkar A. Gender differences in epidemiology, pathophysiology, and treatment of hypertension. *Curr Atheroscler Rep* 2018, 20(3): 13.
94. Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ* 2001, 322(7291): 912-6.

95. Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J* 2012, 33(9): 1058-66.
96. Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hypertens* 1998, 16(12 Pt 2): 1979-87.
97. Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension* 1986, 8(3): 181-3.
98. Acefajado MC, Calhoun DA, Oparil S. Pathogenesis of hypertension. In: Bakris GL, Sorrentino M (eds). *Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, 3th ed. Philadelphia, Elsevier, 2017: 12-26.
99. Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, Hall JL, Le TH, Isakson BE. Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018, 38(9): 1969-85.
100. Frame AA, Wainford RD. Renal sodium handling and sodium sensitivity. *Kidney Res Clin Pract* 2017, 36(2): 117-31.
101. Weinberger MH. Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension* 1996, 27(3 Pt 2): 481-90.
102. Ozdemir B, Gulhan MF, Sahna E, Selamoglu Z. The investigation of antioxidant and anti-inflammatory potentials of apitherapeutic agents on heart tissues in nitric oxide synthase inhibited rats via Nomega-nitro-L-arginine methyl ester. *Clin Exp Hypertens* 2021, 43(1): 69-76.
103. Salmas RE, Gulhan MF, Durdagi S, Sahna E, Abdullah HI, Selamoglu Z. Effects of propolis, caffeic acid phenethyl ester, and pollen on renal injury in hypertensive rat: An experimental and theoretical approach. *Cell Biochem Funct* 2017, 35(6): 304-14.
104. Sinha N, Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. *Curr Hypertens Rev* 2015, 11(2): 132-42.
105. Rababa'h AM, Guillory AN, Mustafa R, Hijjawi T. Oxidative stress and cardiac remodeling: an updated edge. *Curr Cardiol Rev* 2018, 14(1): 53-9.
106. Camargo LL, Harvey AP, Rios FJ, Tsiropoulou S, Da Silva RNO, Cao Z, Graham D, McMaster C, Burchmore RJ, Hartley RC, Bulleid N, Montezano AC, Touyz RM. Vascular Nox (NADPH Oxidase) compartmentalization, protein

- hyperoxidation, and endoplasmic reticulum stress response in hypertension. *Hypertension* 2018, 72(1): 235-46.
107. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1996, 14(5): S83-93.
 108. Brandes RP. Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension* 2014, 64(5): 924-8.
 109. Mutlu E, Ilhan S, Onat E, Kara M, Sahna E. The effects of novokinin, an AT₂ agonist, on blood pressure, vascular responses, and levels of ADMA, NADPH oxidase, and Rho kinase in hypertension induced by NOS inhibition and salt. *Turk J Med Sci* 2016, 46(4): 1249-57.
 110. Schulz E, Gori T, Munzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 2011, 34(6): 665-73.
 111. Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front Physiol* 2012, 3: 441.
 112. Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990, 322(3): 205.
 113. Shichiri M, Hirata Y, Ando K, Emori T, Ohta K, Kimoto S, Ogura M, Inoue A, Marumo F. Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension* 1990, 15(5): 493-6.
 114. Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 2001, 37(2 Pt 2): 511-5.
 115. Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 1994, 24(2): 183-8.
 116. Schiffrin EL. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1995, 25(6): 1135-43.
 117. Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the B1 bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res* 2001, 88(3): 275-81.
 118. Frolich JC. Prostacyclin in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1990, 8(4): S73-8.
 119. Granger JP, Alexander BT, Llinas M. Mechanisms of pressure natriuresis. *Curr Hypertens Rep* 2002, 4(2): 152-9.

120. Ivy JR, Bailey MA. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. *J Physiol* 2014, 592(18): 3955-67.
121. Evans RG, Majid DS, Eppel GA. Mechanisms mediating pressure natriuresis: what we know and what we need to find out. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005, 32(5-6): 400-9.
122. Cowley AW Jr. Renal medullary oxidative stress, pressure-natriuresis, and hypertension. *Hypertension* 2008, 52(5): 777-86.
123. Stoll M, Jacob HJ. Genetic rat models of hypertension: relationship to human hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2001, 3(2): 157-64.
124. Rapp JP. Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats. A review. *Hypertension* 1982, 4(6): 753-63.
125. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963, 27(3): 282-93.
126. Ngarashi D, Fujikawa K, Ferdaus MZ, Zahid HM, Ohara H, Nabika T. Dual inhibition of NADPH oxidases and xanthine oxidase potently prevents salt-induced stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2019, 42(7): 981-9.
127. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934, 59(3): 347-79.
128. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991, 17(5): 707-19.
129. Douglas SA, Ohlstein EH, Johns DG. Techniques: Cardiovascular pharmacology and drug discovery in the 21st century. *Trends Pharmacol Sci* 2004, 25(4): 225-33.
130. Herrmann SM, Textor SC. Renovascular hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019, 48(4): 765-78.
131. Boutari C, Georgiou E, Sachinidis A, Katsimardou A, Christou K, Piperidou A, Karagiannis A. Renovascular hypertension: novel insights. *Curr Hypertens Rev* 2020, 16(1): 24-9.
132. Ferrario CM, Ahmad S, Nagata S, Simington SW, Varagic J, Kon N, Dell'italia LJ. An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clin Sci (Lond)* 2014, 126(7): 461-9.

133. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000, 35(6): 1183-8.
134. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(47): 17985-90.
135. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997, 95(3): 588-93.
136. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 2001, 104(3): 346-51.
137. Brown AJ, Casals-Stenzel J, Gofford S, Lever AF, Morton JJ. Comparison of fast and slow pressor effects of angiotensin II in the conscious rat. *Am J Physiol* 1981, 241(3): H381-8.
138. Keil LC, Summy-Long J, Severs WB. Release of vasopressin by angiotensin II. *Endocrinology* 1975, 96(4): 1063-5.
139. Tan PS, Killinger S, Horiuchi J, Dampney RA. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, 293(6): R2267-78.
140. De Ciuceis C, Amiri F, Iglarz M, Cohn JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Synergistic vascular protective effects of combined low doses of PPARalpha and PPARgamma activators in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Br J Pharmacol* 2007, 151(1): 45-53.
141. Hong MN, Li XD, Chen DR, Ruan CC, Xu JZ, Chen J, Wu YJ, Ma Y, Zhu DL, Gao PJ. Renal denervation attenuates aldosterone expression and associated cardiovascular pathophysiology in angiotensin II-induced hypertension. *Oncotarget* 2016, 7(42): 67828-40.
142. Dange RB, Agarwal D, Masson GS, Vila J, Wilson B, Nair A, Francis J. Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res* 2014, 103(1): 17-27.

143. Selye H. Production of hypertension and hyalinosis by desoxocortisone. *Br Med J* 1950, 1(4647): 203-6.
144. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992, 120(6): 893-901.
145. Burrello J, Burrello A, Pieroni J, Sconfienza E, Forestiero V, Rabbia P, Adolf C, Reincke M, Veglio F, Williams TA, Monticone S, Mulatero P. Development and validation of prediction models for subtype diagnosis of patients with primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2020, 105(10): e3706-e17.
146. Young MJ, Rickard AJ. Mechanisms of mineralocorticoid salt-induced hypertension and cardiac fibrosis. *Mol Cell Endocrinol* 2012, 350(2): 248-55.
147. Merrill JP, Schupak E. Mechanisms of hypertension in renoprival man. *Can Med Assoc J* 1964, 90(4): 328-32.
148. Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *Eur J Pharmacol* 1992, 213(3): 449-51.
149. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992, 20(3): 298-303.
150. Simko F, Baka T, Krajcirovicova K, Repova K, Aziriova S, Zorad S, Poglitsch M, Adamcova M, Reiter RJ, Paulis L. Effect of melatonin on the renin-angiotensin-aldosterone system in l-NAME-Induced hypertension. *Molecules* 2018, 23(2): 265.
151. Miller AJ, Arnold AC. The renin-angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. *Clin Auton Res* 2019, 29(2): 231-43.
152. Braun-Menendez E. Pharmacology of renin and hypertensin. *Pharmacol Rev* 1956, 8(1): 25-55.
153. Ramkumar N, Kohan DE. The (pro)renin receptor: an emerging player in hypertension and metabolic syndrome. *Kidney Int* 2019, 95(5): 1041-52.
154. Belova LA. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Mosc)* 2000, 65(12): 1337-45.
155. Ferrario CM, Mullick AE. Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 2017, 125(Pt A): 57-71.

156. Li X, Lin Y, Zhou H, Li Y, Wang A, Wang H, Zhou MS. Puerarin protects against endothelial dysfunction and end-organ damage in Ang II-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2017, 39(1): 58-64.
157. Ueda Y, Hopper K. Sodium and Water Balance. In: Drobatz KJ, Hopper K, Rozanski E, Silverstein DC (eds). *Textbook of Small Animal Emergency Medicine*, 1th ed. New Jersey, Wiley, 2018: 690-9.
158. Reid IA, Morris BJ, Ganong WF. The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1978, 40(1): 377-410.
159. Laurent S. Antihypertensive drugs. *Pharmacol Res* 2017, 124: 116-25.
160. Hilgers KF, Mann JF. Role of angiotensin II in glomerular injury: lessons from experimental and clinical studies. *Kidney Blood Press Res* 1996, 19(5): 254-62.
161. Izumi Y, Iwao H. Angiotensin II Peptides. In: Kastin AJ (ed). *Handbook of Biologically Active Peptides*, 2nd ed. Boston, Academic Press, 2013: 1369-76.
162. Yaffe MP, Schatz G. Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81(15): 4819-23.
163. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986, 45(5): 711-9.
164. Witte C, Jensen RE, Yaffe MP, Schatz G. MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. *EMBO J* 1988, 7(5): 1439-47.
165. Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005, 46(3): 274-9.
166. Povlsen AL, Grimm D, Wehland M, Infanger M, Kruger M. The Vasoactive Mas receptor in essential hypertension. *J Clin Med* 2020, 9(1): 267.
167. Ma H, Wang Y-L, Hei N-H, Li J-L, Cao X-R, Dong B, Yan WJ. AVE0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) mimic, inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E knockout mice. *J Mol Med* 2020, 98(4): 541-51.
168. Ebermann L, Spillmann F, Sidiropoulos M, Escher F, Heringer-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Walther T. The angiotensin-(1-7) receptor agonist

- AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2008, 590(1-3): 276-80.
169. He JG, Chen SL, Huang YY, Chen YL, Dong YG, Ma H. The nonpeptide AVE0991 attenuates myocardial hypertrophy as induced by angiotensin II through downregulation of transforming growth factor- β 1/Smad2 expression. *Heart Vessels* 2010, 25(5): 438-43.
170. Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 2001, 106(5): 619-32.
171. Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 2002, 520(1-3): 97-101.
172. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 1989, 246(4937): 1620-2.
173. 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 A ng (1-7). *Int J Exp Pathol* 2014, 95(4): 290-5.
174. Oliveira AC, Melo MB, Motta-Santos D, Peluso AA, Souza-Neto F, da Silva RF, Almeida JFQ, Canta G, Reis AM, Goncalves G, Cerri G, Coutinho D, Guedes de Jesus IC, Guatimosim S, Linhares ND, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Genetic deletion of the alamandine receptor MRGD leads to dilated cardiomyopathy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019, 316(1): H123-33.
175. Liu C, Yang CX, Chen XR, Liu BX, Li Y, Wang XZ, Sun W, Li P, Kong XQ. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids* 2018, 50(8): 1071-81.
176. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, Jankowski J, Jankowski V, Sousa F, Alzamora A, Soares E, Barbosa C, Kjeldsen F, Oliveira A, Braga J, Savergnini S, Maia G, Peluso AB, Passos-Silva D, Ferreira A, Alves F, Martins A, Raizada M, Paula R, Motta-Santos D, Klempin F, Pimenta A, Alenina N, Sinisterra R, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos

- RA. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 2013, 112(8): 1104-11.
177. 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. *Circ J* 2017, 81(3): 405-12.
178. Blankley CJ, Hodges JC, Klutchko SR, Himmelsbach RJ, Chucholowski A, Connolly CJ, Neergaard SJ, Van Nieuwenhze MS, Sebastian A, Quin J, Essenburg AD, Cohen DM. Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT2 subtype. *J Med Chem* 1991, 34(11): 3248-60.
179. Jesus ICG, Scalzo S, Alves F, Marques K, Rocha-Resende C, Bader M, Santos RAS, Guatimosim S. Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2018, 314(6): C702-11.
180. Park BM, Phuong HTA, Yu L, Kim SH. Alamandine protects the heart against reperfusion injury via the MrgD receptor. *Circ J* 2018, 82(10): 2584-93.
181. Huang Y, Li Y, Lou A, Wang GZ, Hu Y, Zhang Y, Huang W, Wang J, Li Y, Zhu X, Chen T, Lin J, Meng Y, Li X. Alamandine attenuates hepatic fibrosis by regulating autophagy induced by NOX4-dependent ROS. *Clin Sci (Lond)* 2020, 134(7): 853-69.
182. de Souza-Neto FP, Silva MME, Santuchi MC, de Alcantara-Leonidio TC, Motta-Santos D, Oliveira AC, Melo MB, Canta GN, de Souza LE, Irigoyen MCC, Campagnole-Santos MJ, Guatimosim S, Santos RAS, da Silva RF. Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice. *Clin Sci (Lond)* 2019, 133(5): 629-43.
183. Silva MM, de Souza-Neto FP, Jesus ICG, Goncalves GK, Santuchi MC, Sanches BL, de Alcântara-Leonídio TC, Melo MB, Vieira MAR, Guatimosim S, Santos RAS, da Silva RF. Alamandine improves cardiac remodeling induced by transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2021, 320(1): H352-63.
184. Li P, Chen XR, Xu F, Liu C, Li C, Liu H, Wang H, Sun W, Sheng YH, Kong XQ. Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways. *Life Sci* 2018, 206: 106-16.

185. Song XD, Feng JP, Yang RX. Alamandine protects rat from myocardial ischemia-reperfusion injury by activating JNK and inhibiting NF-kappaB. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019, 23(15): 6718-26.
186. Kalkan F, Parlakpınar H, Disli OM, Tanrıverdi LH, Özhan O, Polat A, Çetin A, Vardı N, Otlu YO, Acet A. Protective and therapeutic effects of dexpanthenol on isoproterenol-induced cardiac damage in rats. *J Cell Biochem* 2018, 119(9): 7479-89.
187. Tanrıverdi LH, Parlakpınar H, Özhan O, Ermis N, Polat A, Vardı N, Tanbek K, Yıldız A, Acet A. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin promotes myocardial antioxidant response and prevents isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rats. *Free Radic Res* 2017, 51(9-10): 772-86.
188. Blenck CL, Harvey PA, Reckelhoff JF, Leinwand LA. The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease. *Circ Res* 2016, 118(8): 1294-312.
189. Yang C, Wu X, Shen Y, Liu C, Kong X, Li P. Alamandine attenuates angiotensin II-induced vascular fibrosis via inhibiting p38 MAPK pathway. *Eur J Pharmacol* 2020, 883: 173384.
190. İkizler M, Dernek S, Erkasap N, Kaygısız Z, Sevin B, Kural T. İzole Rat Kalplerine Uygulanan Reperfüzyon Hasarında Resveratrol'ün Hemodinamik Etkileri. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2003, 11: 91-5.
191. Parlakpınar H, Özhan O, Ermis N, Vardı N, Cigremis Y, Tanrıverdi LH, Çolak C, Acet A. Acute and subacute effects of low versus high doses of standardized panax ginseng extract on the heart: an experimental study. *Cardiovasc Toxicol* 2019, 19(4): 306-20.
192. Elbe H, Vardı N, Orman D, Taslidere E, Yıldız A. Ameliorative effects of aminoguanidine on rat aorta in Streptozotocin-induced diabetes and evaluation of alpha-SMA expression. *Anadolu Kardiyol Derg* 2014, 14(8): 679-84.
193. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Yoloğlu S. WSSPAS: An interactive web application for sample size and power analysis with R using Shiny. *Turkiye Klinikleri J Biostat* 2018, 10(3): 224-46.
194. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, Chen J, He J. Global disparities of hypertension prevalence and control: a systematic analysis of population-based studies from 90 countries. *Circulation* 2016, 134(6): 441-50.

195. Bissell BD, Browder K, McKenzie M, Flannery AH. A blast from the past: revival of angiotensin II for vasodilatory shock. *Ann Pharmacother* 2018, 52(9): 920-7.
196. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017, 43(3): 304-77.
197. Busse LW, Nicholson G, Nordyke RJ, Lee CH, Zeng F, Albertson TE. Angiotensin II for the treatment of distributive shock in the intensive care unit: A US cost-effectiveness analysis. *Int J Technol Assess Health Care* 2020, 36(2): 145-51.
198. Khanna A, English SW, Wang XS, Ham K, Tumlin J, Szerlip H, Busse LW, Altaweel L, Albertson TE, Mackey C, McCurdy MT, Boldt DW, Chock S, Young PJ, Krell K, Wunderink RG, Ostermann M, Murugan R, Gong MN, Panwar R, Hästbacka J, Favory R, Venkatesh B, Thompson BT, Bellomo R, Jensen J, Kroll S, Chawla LS, Tidmarsh GF, Deane AM; ATHOS-3 Investigators. Angiotensin II for the treatment of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2017, 377(5): 419-30.
199. Zhuo JL, Imig JD, Hammond TG, Orengo S, Benes E, Navar LG. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT1 receptor. *Hypertension* 2002, 39(1): 116-21.
200. Castoldi G, Carletti R, Ippolito S, Colzani M, Barzaghi F, Stella A, Zerbini G, Perseghin G, di Gioia CRT. Renal anti-fibrotic effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibition in angiotensin II-dependent hypertension. *Am J Nephrol* 2020, 51(2): 119-29.

201. Phillips EH, Chang MS, Gorman S, Qureshi HJ, Ejendal KFK, Kinzer-Ursem TL, Blaize AN, Goergen CJ. Angiotensin II infusion does not cause abdominal aortic aneurysms in apolipoprotein E-deficient rats. *J Vasc Res* 2018, 55(1): 1-12.
202. Krasney J, Paudler F, Hogan P, Lowe R, Youmans W. Peripheral adrenergic basis for cardioaccelerator action of angiotensin. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1966, 211(6): 1447-50.
203. Carroll RG, Opdyke DF. Evolution of angiotensin II-induced catecholamine release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1982, 243(1): R65-9.
204. Brasch H, Sieroslowski L, Dominiak P. Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. *Hypertension* 1993, 22(5): 699-704.
205. Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res* 2001, 11(3): 165-80.
206. Anke J, Van Eekelen M, Phillips M. Plasma angiotensin II levels at moment of drinking during angiotensin II intravenous infusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1988, 255(3): R500-6.
207. Raffai G, Lombard JH. Angiotensin-(1-7) selectively induces relaxation and modulates endothelium-dependent dilation in mesenteric arteries of salt-fed rats. *J Vasc Res* 2016, 53(1-2): 105-18.
208. Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, 295(6): H2373-9.
209. Turner AJ. ACE2 cell biology, regulation, and physiological functions. In: Unger T, Steckelings UM, dos Santos RS (eds). *The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS) Functional Aspects and Therapeutic Implications*, 1th ed. Boston, Academic Press, 2015: 185-89.
210. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Koziaradzki I, Scanga SE, Oliveirados-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002, 417(6891): 822-8.
211. Tang X, Geng L, Feng X, Sun L. Decreased serum ACE2 levels in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2021, 60(9): 4401-6.

212. Fernández-Ruiz I. ACE2 level as a marker of CVD. *Nat Rev Cardiol* 2020, 17(12): 759.
213. 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. *Biol Pharm Bull* 2019, 42(6): 960-7.
214. Klein S, Herath CB, Schierwagen R, Grace J, Haltenhof T, Uschner FE, Strassburg CP, Sauerbruch T, Walther T, Angus PW, Trebicka J. Hemodynamic effects of the non-peptidic angiotensin-(1-7) agonist AVE0991 in liver cirrhosis. *PLoS One* 2015, 10(9): e0138732.
215. de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 2009, 5(12): 1512-26.
216. Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P. Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension* 1996, 28(2): 153-8.
217. Nabah YNA, Mateo T, Estellés R, Mata M, Zagorski J, Sarau H, Cortijo J, Morcillo EJ, Jose PJ, Sanz MJ. Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation* 2004, 110(23): 3581-6.
218. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 302(2): 148-58.
219. Soe NN, Sowden M, Baskaran P, Smolock EM, Kim Y, Nigro P, Berk BC. Cyclophilin A is required for angiotensin II-induced p47phox translocation to caveolae in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, 33(9): 2147-53.
220. Tian H, Yu D, Hu Y, Zhang P, Yang Y, Hu Q, Li M. Angiotensin II upregulates cyclophilin A by enhancing ROS production in rat cardiomyocytes. *Mol Med Rep* 2018, 18(5): 4349-55.
221. Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens* 2005, 18(1): 81-7.

222. Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal* 2013, 19(10): 1110-20.
223. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 2005, 65(1): 16-27.
224. Ma Y, Li H, Yue Z, Guo J, Xu S, Xu J, Jia Y, Yu N, Zhang B, Liu S, Liu M, Shao W, Chen S, Liu P. Cryptotanshinone attenuates cardiac fibrosis via downregulation of COX-2, NOX-2, and NOX-4. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014, 64(1): 28-37.
225. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J* 2006, 20(9): 1546-8.
226. Kurashiki T, Miyake T, Nakagami H, Nishimura M, Morishita R. Prevention of progression of aortic aneurysm by peptide vaccine against ang II (angiotensin II) in a rat model. *Hypertension* 2020, 76(6): 1879-88.
227. Howatt DA, Dajee M, Xie X, Moorleghe J, Rateri DL, Balakrishnan A, Da Cunha V, Johns DG, Gutstein DE, Daugherty A, Lu H. Relaxin and matrix metalloproteinase-9 in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms. *Circ J* 2017, 81(6): 888-90.
228. Kong J, Zhang Y, Liu S, Li H, Liu S, Wang J, Qin X, Jiang X, Yang J, Zhang C, Zhang W. Melatonin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm through the down-regulation of matrix metalloproteinases. *Oncotarget* 2017, 8(9): 14283-93.
229. Laczko R, Csiszar K. Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules* 2020, 10(8): 1093.
230. Ooshima A, Midorikawa O. Increased lysyl oxidase activity in blood vessels of hypertensive rats and effect of β -aminopropionitrile on arteriosclerosis. *Jpn Circ J* 1978, 41(12): 1337-40.
231. Martinez-Gonzalez J, Varona S, Canes L, Galan M, Briones AM, Cachofeiro V, Rodriguez C. Emerging roles of lysyl oxidases in the cardiovascular system: new concepts and therapeutic challenges. *Biomolecules* 2019, 9(10): 610.

232. Lopez B, Querejeta R, Gonzalez A, Beaumont J, Larman M, Diez J. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension* 2009, 53(2): 236-42.
233. Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J. The role of lysyl oxidase enzymes in cardiac function and remodeling. *Cells* 2019, 8(12): 1483.
234. Martinez-Revelles S, Garcia-Redondo AB, Avendano MS, Varona S, Palao T, Orriols M, Roque FR, Fortuño A, Touyz RM, Martínez-González J, Salaices M, Rodríguez C, Briones AM. Lysyl oxidase induces vascular oxidative stress and contributes to arterial stiffness and abnormal elastin structure in hypertension: role of p38MAPK. *Antioxid Redox Signal* 2017, 27(7): 379-97.
235. Schreckenber R, Horn A-M, da Costa Rebelo RM, Simseyilmaz S, Niemann B, Li L, Rohrbach S, Schlüter KD. Effects of 6-months' exercise on cardiac function, structure and metabolism in female hypertensive rats—the decisive role of lysyl oxidase and collagen III. *Front Physiol* 2017, 8: 556.
236. Ebersson LS, Sanchez PA, Majeed BA, Tawinwung S, Secomb TW, Larson DF. Effect of lysyl oxidase inhibition on angiotensin II-induced arterial hypertension, remodeling, and stiffness. *PLoS One* 2015, 10(4): e0124013.
237. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)* 2009, 117(3): 95-109.
238. Koyanagi M, Egashira K, Kitamoto S, Ni W, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Takeshita A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 in cardiovascular remodeling induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Circulation* 2000, 102(18): 2243-8.
239. Behr TM, Willette RN, Coatney RW, Berova M, Angermann CE, Anderson K, Sackner-Bernstein JD, Barone FC. Eprosartan improves cardiac performance, reduces cardiac hypertrophy and mortality and downregulates myocardial monocyte chemoattractant protein-1 and inflammation in hypertensive heart disease. *J Hypertens* 2004, 22(3): 583-92.
240. Zandbergen HR, Sharma UC, Gupta S, Verjans JW, van den Borne S, Pokharel S, van Brakel T, Duijvestijn A, van Rooijen N, Maessen JG, Reutelingsperger C, Pinto YM, Narula J, Hofstra L. Macrophage depletion in hypertensive rats accelerates development of cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2009, 14(1): 68-75.

241. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005, 96(8): 881-9.
242. Hong L, Wang Q, Chen M, Shi J, Guo Y, Liu S, Pan R, Yuan X, Jiang S. Mas receptor activation attenuates allergic airway inflammation via inhibiting JNK/CCL2-induced macrophage recruitment. *Biomed Pharmacother* 2021, 137: 111365.
243. Ma H, Wang YL, Hei NH, Li JL, Cao XR, Dong B, Yan WJ. AVE0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) mimic, inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E knockout mice. *J Mol Med (Berl)* 2020, 98(4): 541-51.
244. Jawien J, Toton-Zuranska J, Kus K, Pawlowska M, Olszanecki R, Korbut R. The effect of AVE 0991, nebivolol and doxycycline on inflammatory mediators in an apoE-knockout mouse model of atherosclerosis. *Med Sci Monit* 2012, 18(10): BR389-93.
245. de Carvalho Santuchi M, Dutra MF, Vago JP, Lima KM, Galvao I, de Souza-Neto FP, Morais E Silva M, Oliveira AC, de Oliveira FCB, Gonçalves R, Teixeira MM, Sousa LP, Dos Santos RAS, da Silva RF. Angiotensin-(1-7) and alamandine promote anti-inflammatory response in macrophages in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm* 2019, 2019: 2401081.
246. Zhang L, Deng M, Lu A, Chen Y, Chen Y, Wu C, Tan Z, Boini KM, Yang T, Zhu Q, Wang L. Sodium butyrate attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by inhibiting COX2/PGE2 pathway via a HDAC5/HDAC6-dependent mechanism. *J Cell Mol Med* 2019, 23(12): 8139-50.
247. Wang L, Tan A, An X, Xia Y, Xie Y. Quercetin Dihydrate inhibition of cardiac fibrosis induced by angiotensin II in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother* 2020, 127: 110205.
248. Pang JJ, Xu RK, Xu XB, Cao JM, Ni C, Zhu WL, Asotra K, Chen MC, Chen C. Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 286(3): H1063-9.
249. Prathapan A, Varghese MV, Abhilash S, Mathew AK, Nair A, Nair RH, Raghu KG. Polyphenol rich ethanolic extract from *Boerhavia diffusa* L. mitigates

- angiotensin II induced cardiac hypertrophy and fibrosis in rats. *Biomed Pharmacother* 2017, 87: 427-36.
250. 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. *Biol Pharm Bull* 2019, 42(6): 960-7.
251. Ma Y, Huang H, Jiang J, Wu L, Lin C, Tang A, Dai G, He J, Chen Y. AVE 0991 attenuates cardiac hypertrophy through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 474(4): 621-5.
252. Cunha TMB, Lima WG, Silva ME, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. The nonpeptide ANG-(1-7) mimic AVE 0991 attenuates cardiac remodeling and improves baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Life Sci* 2013, 92(4-5): 266-75.
253. Qi D, Wei M, Jiao S, Song Y, Wang X, Xie G, Taranto J, Liu Y, Duan Y, Yu B, Li H, Shah YM, Xu Q, Du J, Gonzalez FJ, Qu A. Hypoxia inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells promotes angiotensin II-induced vascular remodeling via activation of CCL7-mediated macrophage recruitment. *Cell Death Dis* 2019, 10(8): 544.
254. Gomolak JR, Didion SP. Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation. *Front Physiol* 2014, 5: 396.