

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**NİTRİK OKSİT SENTAZ
İNİBİSYONU HİPERTANSİYON
MODELİNDE 20-HETE'NİN ROLÜ**

Nur ÖZEN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

NİTRİK OKSİT SENTAZ İNHİBİSYONU HİPERTANSİYON MODELİNDE 20-HETE’NİN ROLÜ

Nur ÖZEN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Filiz BASRALI

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2014.02.0122.003)

‘Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir’

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.06 Temmuz 2015

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Filiz BASRALI**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Aysel AĞAR**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Sadi ÖZDEM**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Nimet UYSAL**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/2015 tarih ve/.... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özgül ALPER

Enstitü Müdürü

ÖZET

Hipertansiyon, günümüzde oldukça yaygın ve ciddi komplikasyonlara sebep olduğu için üzerinde sıkça çalışılan bir hastalıktır. Deneysel hayvan modelleriyle çalışılması ise hipertansiyon patogenezi, etiolojisini, komplikasyonlarını ve tedavi yollarını araştırmak için etkili bir yöntemdir. Güçlü bir damar gevşetici olan nitrik oksit (NO) üretiminin bloke edildiği nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon modeli esansiyel hipertansiyon etiolojisinde yer alan endotel disfonksiyonunu yansıtmaktadır.

Öte yandan 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) vasküler tonusun ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli rolü olduğu vurgulanan bir ajandır. 20-HETE'nin, vasküler dokuda vazokonstriktör ve vazodilatörlerin etkilerini değiştirerek, özellikle endotel disfonksiyonu ve oksidatif stres yaratarak periferik vasküler direnci arttırdığı ve kan basıncını etkilediği çeşitli hipertansiyon modellerinde gösterilmiştir. Ancak bu konuda NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon modelinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon modelinde 20-HETE'nin kan basıncı ve hem iletim hem de direnç damarlarının kasılma ve gevşeme yanıtları üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla in-vitro ve tedavi çalışması olarak iki ayrı çalışma planlandı. İn vitro çalışmada kontrol ve hipertansiyon grupları kullanıldı. Tedavi çalışmasında ise kontrol, tedavi, hipertansiyon ve hipertansiyon+tedavi olmak üzere 4 grup oluşturuldu.

Her iki çalışmada da hipertansiyon, hayvanların içme sularına 5 hafta boyunca 25 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) ilavesiyle gerçekleştirildi. Hayvanların kan basınçları non-invaziv bir yöntem olan kuyruktan ölçüm yöntemiyle yapıldı. 20-HETE inhibitörü olan N-Hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamidine (HET0016) in vitro çalışmada damar banyosuna eklenirken tedavi çalışmasında tedavi gruplarına 10 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ ip yolla son iki hafta boyunca uygulandı. Deney sonunda torasik aort ve mezenter arterin 3. dalı izole edilerek kasılma ve gevşeme yanıtları organ banyosu ve telli miyograf düzeneklerinde incelendi. Her iki çalışmanın sonuçları birbirine paralellik gösterdi.

Hipertansif grupta L-NAME uygulaması kan basıncında kontrol grubuna göre önemli artış yaratırken HET0016 tedavisi ile önemli olarak azalma gösterdi. Hipertansif gruplarda kontrol gruplarına kıyasla aortun fenilefrin (Phe) ile kasılma yanıtında artış, asetilkolin (ACh) ile gevşeme yanıtında azalma saptandı. HET0016 hem banyoya uygulandığında hem de ip yolla verildiğine bu yanıtlarda hipertansif hayvanlarda önemli düzelmeye neden oldu. Aortik halkaların potasyum klorür (KCl) aracılı kasılma ve sodyumnitroprussid (SNP) aracılı gevşeme yanıtları gruplar arasında fark göstermedi ve banyoya HET0016 eklenmesiyle ya da HET0016 tedavisi ile de değişmedi.

Mezenter arterin 3. dalı'nın KCl ve Phe aracılı kasılma yanıtları gruplar arasında benzer bulundu. Banyo sıvısında HET0016'nın bulunması veya hayvanlara ip yolla verilmesi bu yanıtlarda bir değişikliğe neden olmadı. Öte yandan bu damarların ACh aracılı gevşeme yanıtları hipertansif gruplarda kontrol gruplarına kıyasla azalmış olarak bulundu. Ancak hem HET0016 inkübasyonu hem de tedavisi hipertansif gruplarda ACh aracılı gevşeme yanıtında düzelmeye neden oldu. Hipertansif sıçanların SNP aracılı gevşeme yanıtları kontrol grubundaki hayvanlarla benzer bulunurken, hem HET0016 inkübasyonu hem de tedavisi, hipertansif gruplardan elde edilen damarların SNP'ye cevaben oluşturdukları gevşeme yanıtlarında artışa neden oldu.

Sonuç olarak 20-HETE inhibisyonu NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon modelinde artmış olan kan basıncını önemli düzeyde düşürdü. 20 HETE'nin inhibisyonu ile iletim tipi damarlarda agonist aracılı kasılma yanıtlarında azalma oluşurken, gevşeme yanıtları artış meydana geldi. Direnç tipi damarlarda ise endotel bağımlı ve bağımsız gevşeme yanıtlarında artış izlendi. 20-HETE inhibisyonunun kan basıncını düşürücü etkilerine, çalışmamızda damarlar üzerine olduğu gösterilen çeşitli etkilerin katkısının bulunduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler : Hipertansiyon, L-NAME, 20-HETE, İletim, Direnç

ABSTRACT

Hypertension is a disease, which has wide prevalence and serious complications nowadays, is worked on frequently. Studying with experimental animal models is beneficial for understanding the pathogenesis, ethiology and treatment of hypertension. Inhibition of nitric oxide synthase causes hypertension and endothelial dysfunction which indicates analog evidence with essential hypertension.

20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) is a very important mediator which regulates vascular tone and blood pressure. It has been demonstrated in various experimental hypertension models that 20-HETE causes enhancement of peripheral vascular resistance and effects blood pressure through changing the effects of various vasoconstrictor and vasodilator and causing endothelial dysfunction and oxidative stress. But these effects have not been studied on inhibition of nitric oxide synthase hypertension model yet. In the present study, we investigated the effects of 20-HETE on conductive and resistance arteries vasoconstriction and vasodilation responses and blood pressure in nitric oxide synthase inhibition hypertension model. We planned two distinct studies which named as *in vitro* and *in vivo* (treatment) studies. In *in vitro* study, control and hypertension groups were used. In treatment study; control, treatment, hypertension and hypertension+treatment groups were examined.

In both studies, animals drank water which contained $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ N_ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) during 5 weeks. Blood pressure of animals measured from tails with non-invasive method. In *in vitro* study, 20-HETE inhibitor N-Hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamide (HET0016) added to tissue baths. In *in vivo* study, HET0016 injected intraperitoneally at a dose of $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ to animals during last two weeks. At the end of experiment, aortic artery and third branch of mesenteric artery were isolated. They studied on tissue wire myographs. Results of studies showed parallelism.

Blood pressure of hypertension group was significantly higher than control group. After administration of HET0016 blood pressure of hypertension group attenuated significantly. Hypertension group of aortas showed increase with Phe mediated vasoconstriction and decrease with ACh mediated vasodilation. Both adding HET0016 to baths and injections of HET0016 to animals ameliorated the responses. Neither KCl mediated vasoconstriction nor SNP mediated vasodilation responses of aorta changed before or after HET0016 administration.

KCl and Phe mediated vasoconstrictions of third branch of mesenteric arteries were similar in groups. Besides, they didn't change after HET0016 administration. Hypertension group of mesenteric arteries showed decrease with ACh mediated vasodilation. Both adding HET0016 to baths and injections to animals, corrected the responses. SNP responses were similar in groups. However, SNP mediated vasodilation responses in hypertension group were enhanced after adding HET0016 to baths or injections to animals.

In conclusion in nitric oxide synthase inhibition hypertension model, inhibition of 20-HETE significantly decreased high blood pressure. In conductive arteries inhibition of 20-HETE augmented the vasodilation and reduced the vasoconstriction responses. In resistance arteries, inhibition of 20-HETE caused increment in the endothelial dependent and independent responses. We could say that 20-HETE inhibition related to vascular responses and blood pressure. Improving the vascular responses corrected the blood pressure.

Key words: hypertension, L-NAME, 20-HETE, conductive, resistance

TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarım sűresince űstűn bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen danıŐman hocam sayın Prof. Dr. Filiz BASRALI'ya, yűksek lisans eđitimim esnasında tűm katkılarından dolayı baŐta Prof. Dr. Ŭmit Kemal ŐENTŬRK olmak űzere anabilim dalımızın deđerli hocalarına, her konuda yardımını esirgemeyen ArŐ. Gűr. Seher ŬLKER'e ve beraber çalıŐtıđım araŐtırma gűrevlisi arkadaşlarıma, sađlık bilimleri enstitűsű personeline, manevi desteklerini hep yanımda hissettiđim aileme ve Uzm. Dr. Pınar ŬLKER'e sonsuz saygı ve Őűkranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hipertansiyon	3
2.1.1. Hipertansiyon Tanımı ve Sınıflandırması	3
2.1.2. Hipertansiyon Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Hipertansiyon Patogenezi	4
2.1.4. Deneysel Hipertansiyon Modelleri	5
2.1.4.1. Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonu Hipertansiyon Modeli	8
2.2. Vasküler Tonusun Düzenlenmesi	9
2.2.1. Nitrik Oksit	10
2.2.2. Prostaglandin I ₂	10
2.2.3. Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör	11
2.2.4. Endotelin	11
2.2.5. 20-HETE	11
2.2.5.1. Tarihçe	12
2.2.5.2. Metabolizması	12
2.2.5.3. Etkileri	14
2.2.5.4. 20-HETE Sentez ve Etki İnhibitörleri	19
2.3. Çeşitli Hipertansiyon Modellerinde 20-HETE	20
2.4. Amaç ve Hipotez	22
GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1. İn Vitro Çalışma	23
3.1.1. Hipertansiyon Oluşturulması	23
3.1.2. Kan Basıncı Ölçülmesi	23

3.1.3.	Deneyin Sonlandırılması ve Damar İzolasyonu	24
3.1.4.	İzole Damarların Asılması ve Vitalizasyon Aşamaları	24
3.1.4.1.	Deney Protokolü	25
3.2.	Tedavi Çalışması	26
3.2.1.	Hipertansiyon Oluşturulması	27
3.2.2.	Tedavi Uygulanması	27
3.2.3.	Vehicle Uygulanması	27
3.2.4.	Kan Basıncı Ölçülmesi	27
3.2.5.	Deneyin Sonlandırılması ve Damar İzolasyonu	27
3.2.6.	İzole Damarların Asılması ve Vitalizasyon Aşamaları	27
3.2.6.1.	Deney Protokolü	28
3.3.	Verilerin Değerlendirilmesi	28
BULGULAR		29
4.1.	Çalışma I: İn Vitro Çalışma	29
4.1.1.	Aort Yanıtları	29
4.1.2.	Mezenter Direnç Arteri Yanıtları	32
4.2.	Çalışma II: Tedavi Çalışması	34
4.2.1.	Aort Yanıtları	38
4.2.2.	Mezenter Direnç Arteri Yanıtları	40
TARTIŞMA		44
SONUÇLAR		49
KAYNAKLAR		50
ÖZGEÇMİŞ		72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Phe	:	Fenilefrin
KCl	:	Potasyum Klorür
SNP	:	Sodyum Nitroprussid
ACh	:	Asetilkolin
L-NAME	:	N _ω -Nitro-L-arginine Methyl Ester Hydrochloride
AA	:	Araşidonik Asit
COX	:	Siklooksijenaz
LOX	:	Lipoksijenaz
PLA₂	:	Fosfolipaz A ₂
20-HETE	:	20-hydroxyeicosatetraenoic acid
HET0016	:	N-Hydroxy-N'-(4-butly-2-methylphenyl)-formamide
CYP450	:	Sitokrom P 450
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	:	Nöral Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
Ang II	:	Anjiyotensin II
ET-1	:	Endotelin-1
PGI₂	:	Prostaglandin I ₂
EDHF	:	Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör
SHR	:	Spontan Hipertansif Sıçan
Dahl SS	:	Dahl Tuz Duyarlı
PMR	:	Postmenapozal Hipertansif Sıçan
mmHg	:	Milimetre Civa
DOCA	:	Deoksikortikosteronasetat
cAMP	:	Siklik Adenilat Monofosfat
TAHL	:	Çıkan Kalın Henle Kulbu
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
VSMC	:	Vasküler Düz Kas Hücresi
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
Na⁺-K⁺-ATPaz	:	Sodyum Potasyum ATPaz
PKC	:	Protein Kinaz C
TGF	:	Tubuloglomerular Feedback

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. 20-HETE yapısı	12
2.2. Araşidonik asit yolağı	13
2.3. 20-HETE – NO ilişkisi	16
4.1. Aort KCl aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	29
4.2. Aort Phe aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	30
4.3. Aort ACh aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	31
4.4. Aort SNP aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	31
4.5. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	32
4.6. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	33
4.7. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	33
4.8. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	34
4.9. Aortik halkaların a)KCl ve b)Phe aracılı kasılma, c)ACh ve d)SNP aracılı gevşeme doz-yanıt eğrileri	35
4.10. Mezenter arter 3. dal a)KCl ve b)Phe aracılı kasılma, c)ACh ve d)SNP aracılı gevşeme doz-yanıt eğrileri	36
4.11. Tedavi çalışması ortalama arteriyel kan basıncı-hafta grafiğı	37
4.12. Aort KCl aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	38
4.13. Aort Phe aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	39
4.14. Aort ACh aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	39
4.15. Aort SNP aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	40
4.16. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	41
4.17. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı kasılma doz-yanıt eğrisi	41
4.18. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	42
4.19. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı gevşeme doz-yanıt eğrisi	43

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Kan basıncı sınıflandırması	3
2.2. Vasküler tonusun düzenlenmesi	9
4.1. İn vitro çalışma K ve H grupları vücut ağırlığı, su tüketimi ve ortalama arteryel kan basıncı değerleri	29
4.2. Aort KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	30
4.3. Aort Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	30
4.4. Aort ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	31
4.5. Aort SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	32
4.6. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	32
4.7. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	33
4.8. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	34
4.9. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	34
4.10. Aortik halkaların maksimum (Emax) yanıtları	35
4.11. Mezenter arter 3. dal maksimum (Emax) yanıtları	36
4.12. Tedavi çalışması K, HET, H ve H+HET grupları vücut ağırlığı ve su tüketim değerleri	37
4.13. Aort KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	38
4.14. Aort Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	39
4.15. Aort ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	40
4.16. Aort SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	40
4.17. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	41
4.18. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları	42
4.19. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	42
4.20. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları	43

GİRİŞ

Sistemik arteriyel kan basıncının kalıcı olarak yükselmesi şeklinde tanımlanan hipertansiyon, görülme sıklığı ve yaygın komplikasyonları göz önüne alındığında, günümüzde hala önemini koruyan ve üzerinde sıkça çalışılan bir hastalıktır. Endotel kaynaklı vazodilatör ve vazokonstriktör ajanlar arasındaki dengesizlik, periferik damar direnci ve dolayısıyla kan basıncını etkiler. Nitekim kronik endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi bir çok hastalığın gelişimine katkıda bulunmaktadır [1, 2].

Vasküler tonusun ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli rolü olduğu vurgulanan ve özellikle damar düz kasında kasılmaya neden olarak son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan endojen maddelerden birisi 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE)'dir [3-6]. Bir araşidonik asit metaboliti olan 20-HETE, sitokrom P (CYP) 450 enzimlerinden çeşitli dokularda üretilir. İskemik serebrovasküler hastalıklar, polikistik böbrek hastalığı, diyabet, gebelik toksemisi ve çeşitli hipertansiyon modellerinde 20-HETE üretiminde değişiklikler olduğu bilinmektedir [5-8].

Vasküler dokuda düz kas hücrelerinde üretilen 20-HETE'nin daha çok küçük damarlarda sentezlendiği ve sentezinin anjiyotensin II (Ang II), endotelin (ET-1), serotonin ve ayrıca nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri ile uyarıldığı bildirilmektedir [5, 6, 9, 10]. NO, karbonmonoksit (CO) ve süperoksit radikali ise 20-HETE üretimini baskılayan ajanlar arasında yer almaktadır [11-13]. İskelet kası, renal, serebral, ve mezenterik arterlerde güçlü vazokonstriktör etkisi olan 20-HETE, özellikle renal ve serebral arteriyollerde miyojenik tonusun gelişimine katkıda bulunmakta ve bu dokuların kan akımının otoregülasyonunda yer almaktadır [14-17]. 20-HETE aynı zamanda damar düz kasının Ang II, fenilefrin (Phe) ve ET-1 gibi çeşitli kasıcı ajanlara olan duyarlılığını arttırmakta ve bu yolla da vasküler tonus gelişimine katkıda bulunmaktadır [5, 6, 18, 19].

20-HETE'nin vasküler tonusun düzenlenmesindeki rolü ile ilgili çalışmaların yanı sıra çeşitli hipertansiyon modellerindeki rolünü inceleyen çalışmalar da yine son yıllarda hız kazanmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar tuz-duyarlı hipertansiyon modeli (Dahl SS sıçanlar), spontan hipertansif sıçanlar (SHR), Ang II veya androjenler ile indüklenen hipertansiyon modellerinde yoğunlaşmaktadır [5, 6]. Belirtilen hipertansiyon modellerinde artan 20-HETE'nin, oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu oluşturarak, ayrıca vasküler dokunun kasıcı ajanlara duyarlılığını arttırarak periferik vasküler direnci arttırdığı ve bu modellerde oluşan hipertansiyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir [5, 6, 20-26].

Nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonuyla oluşturulan hipertansiyon modeli, NO'nun dolaşımı düzenlemedeki rolünün anlaşılması ve esansiyel hipertansiyonda rol oynayabileceği görüşü ile L-arjinin analogları kullanılarak oluşturulan ve ilk defa

1992 yılında iki ayrı araştırma grubu tarafından önerilen modeldir [27, 28]. Ancak hipertansif hastalarda bazal NO üretiminin bozulduğu, bunun yanısıra biyoyararlanımının azaldığı, yıkımının ise arttığı gösterilmiştir. Ayrıca hipertansif hastaların NO uyarıcılarına verdikleri vazodilatör yanıtları da genelde bozuk bulunmuştur [29, 30]. NO azlığının hipertansiyon gelişimine katkısı olduğu fikrini destekleyen bulgular çeşitli hayvan çalışmalarıyla da ortaya konmuştur [28, 31].

Hipertansiyonun etkilediği populasyon yüzdesi ve uzun vadede mortalite ve morbiditeye etkisi göz önüne alındığında, tedavisinin de büyük önem taşıdığı açıktır. Hipertansiyon tedavisinde kullanılmakta olan çeşitli farmakolojik ajanlar bulunmakla birlikte [32] hipertansiyon patogenezinin aydınlatılmasıyla ilgili çalışmalar, tedavide yeni yaklaşımların geliştirilebilmesi açısından günümüzde önemini korumaktadır. 20-HETE'nin vasküler tonus üzerindeki belirleyici etkisinin ortaya konmasının ardından yukarıda belirtilen çeşitli hipertansiyon modellerindeki rolü araştırılmıştır. Ancak NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20-HETE'nin katkısının bulunup bulunmadığı bilinmemektedir.

Bu çalışma ile N_ω-Nitro-L-arginine Methyl Ester Hydrochloride (L-NAME) kullanılarak NOS inhibisyonu yoluyla hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda 20-HETE inhibisyonunun kan basıncı, ayrıca büyük ve küçük boy arterlerin kasılma ve gevşeme yanıtları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon

2.1.1. Hipertansiyon Tanımı ve Sınıflandırması

Kan basıncı, kanın damar duvarlarına yaptığı basınca denmektedir. Başka bir şekilde ifade edilecek olunursa kan basıncı, sistemik arteriyel kan basıncını temsil etmektedir. Çünkü diğer damarlardaki basınç arteriyel basınçtan daha düşüktür. Kan basıncı birimi evrensel olarak milimetre civa (mmHg) olarak değerlendirilmektedir. Sistolik basınç, kalp döngüsü sırasında arterlere uygulanan maksimum basıncı gösterirken; diyastolik basınç ise en düşük basıncı göstermektedir. Bireysel farklılık olabilmekle birlikte normal bir insanda sistolik basınç değeri yaklaşık 120 mmHg iken diyastolik basınç değeri ise yaklaşık 80 mmHg'dir [33, 34].

Kan basıncı değerleri için dağılım popülasyon genelinde çan eğrisi şeklinde olmaktadır. 12 yıllık bir kohort çalışmasında 350.000 erkeğin gözlenmesi neticesinde, kan basıncında yükselme sonucu kardiyovasküler ölüm oranının arttığı ortaya koyulmuştur [35]. Hipertansiyon, belli bir eşik değerin üzerinde sistemik arteriyel basınçtaki kronik yükselmenin varlığı şeklinde tanımlanmaktadır [36]. Sistolik kan basıncının 139 mmHg'den, diyastolik kan basıncının ise 89 mmHg'den yüksek olduğu değerler 'hipertansiyon' sınıfında yer almaktadır. Sistolik kan basıncının 120-139 mmHg, diyastolik kan basıncının 80-89 mmHg olan değerler ise 'prehipertansiyon' sınıfına koyulmaktadır. Yetişkinler için kan basıncı sınıflandırması 4 gruba ayrılarak yapılmıştır (Tablo 2.1). Eğer sistolik ve diyastolik kan basıncı değerleri farklı kategorilerde olursa; basınç değeri, yüksek olan değer kategorisine göre değerlendirilmektedir [37].

Tablo 2.1. Kan Basıncının Sınıflandırılması

Kan basıncı Sınıfları	Sistolik kan basıncı (mmHg)	Diyastolik kan basıncı(mmHg)
Normal	< 120	ve < 80
Prehipertansiyon	120 – 129	veya 80 – 89
Hipertansiyonun 1. Evresi	140 – 159	veya 90 – 99
Hipertansiyonun 2. Evresi	≥ 160	≥ 100

2.1.2. Hipertansiyon Epidemiyolojisi

Hipertansiyon, geniş prevalansı ve bu prevalansın sonucu olarak komplikasyon olasılığının yüksek oluşuyla dünya çapında önemli bir sağlık problemidir [38, 39]. Kardiyovasküler, serebrovasküler ve renal hastalıklar için en önemli ancak düzeltilebilir risk faktörüdür. 2000 yılında yaklaşık olarak 1 milyar insanın hipertansif olduğu belirtilip, 2025 yılında bu sayının 1.56 milyara çıkacağı tahmin edilmektedir [40].

Hipertansiyon sıklığı ülkeden ülkeye değişiklik gösterse bile, kardiyovasküler risk faktörleri arasında en sık görülenlerden biridir. Tüm dünyada hipertansiyon konusunda farkındalık, tedavi alma ve kontrol altına alınma oranları düşük seyretmekle birlikte, ülkeler arasında da önemli farklılıklar vardır [41]. Bunları belirlemek için de pek çok çalışma yapılmıştır. Ülkemizde bu çalışmaların öncüsü sayılabilecek 1991 yılında yapılan çalışmanın verilerine göre hipertansiyon prevalansı %33.7' dir [42]. 2003 yılında yapılan başka bir çalışmaya göre ise ülkemizdeki hipertansiyon prevalansı %31.8' dir [43]. Bunlardan da anlaşılacağı üzere ülkemizdeki hipertansiyon kontrol altına alma oranının arttığıdır. Ancak yine de hipertansiyon prevalansımız oldukça yüksektir.

2.1.3. Hipertansiyon Patogenezi

Hipertansiyon patofizyolojisi hakkında hala pek çok bilinmeyen vardır. Normal kan basıncı, kardiyak debi ve periferel vasküler direnç arasındaki dengeye bağlıdır ve bu dengenin bozulması kan basıncı artışına neden olmaktadır [44]. Hipertansiyon, primer ve sekonder hipertansiyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Primer hipertansiyon diğer bir deyişle esansiyel hipertansiyon, nedeni belli olmayan hipertansiyona denilmektedir ve hipertansiyonun yaklaşık olarak %95' ini oluşturmaktadır. Primer hipertansiyona yol açtığı düşünülen nedenler şunlardır [45-47]:

- Genetik faktörler ve genetik bozukluklar
- Fazla tuz alımı
- Periferel vasküler direnç artışı
- Obezite
- İnsülin direnci ve hiperinsülinemi
- Renin-anjiyotensin sistemi rolü
- Sempatik sinir sistemi rolü
- Endotel disfonksiyonu
- Düşük doğum ağırlığı
- İntrauterin beslenme bozuklukları
- Nörovasküler anormallikler
- Kardiyak debi artışı
- Hiperkoagülasyon
- Vazoaktif maddelerdeki değişimler
- Yüksek alkol tüketimi
- Yaş ve sedanter yaşam tarzı
- Stres
- Düşük potasyum ve kalsiyum alımı

Oluşum nedeni bilinen diğer tip hipertansiyona ise sekonder hipertansiyon denilmektedir. Sıklığı primer hipertansiyona göre çok daha azdır (%5 oranında).

Bunun da nedeni; hipertansiyon hastalığına sekonder olarak gelişen bir olgu olup, hastalığın tedavisiyle birlikte hipertansiyon ortadan kalkmaktadır. Genel başlıklar altında toplayacak olursak ise şu şekildedir [48]:

- Renal parankimal nedenler
 - Kronik Glomerulonefrit
 - Kronik Piyelonefrit
 - Polikistik Böbrek Hastalığı
- Renovasküler nedenler
- Endokrin nedenler
 - Primer aldosteronizm
 - Hipermineralokortikoidle ilişkili diğer faktörler
 - Cushing hastalığı
 - Feokromasitoma
 - Diğer endokrin sebepler (Akromegali, hipotiroidizm vb.)
- Vasküler nedenler
 - Arterit hastalığı
 - Damar iltihabının başka formları
 - Aort koarktasyonu
 - Kardiyak output artışıyla gelişen hipertansiyon
- Merkezi sinir sistemi veya Beyin hastalıkları
- İlaça bağlı nedenler
 - Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar
 - Glisirizin
 - Glukokortikoidler
 - Diğer ilaçlar (immün-baskılayıcılar, östrojen vb.)

2.1.4. Deneysel Hipertansiyon Modelleri

Hipertansiyon üzerinde çok uzun yıllardır çalışılmasına rağmen günümüzde hala önemini fazlasıyla koruyan bir hastalıktır. Hipertansiyon için deneysel hayvan modellerinin kullanımı bize hipertansiyonun patogenezi, etiyolojisini komplikasyonlarını ve tedavi yollarını araştırmayı olanaklı kılmaktadır. Bu yüzden de insanlardaki hipertansiyonu pek çok yönüyle taklit eden deneysel hayvan modelleri geliştirilmiştir [49]. Bu tezin konusu olan NOS inhibisyonu hipertansiyon modeli ise 2.1.4.1.alt başlığında ayrıca incelenmiştir.

Deneysel hayvan modelleri kısaca;

- Renal hipertansiyon
- Diyete dayalı hipertansiyon
- Endokrin hipertansiyon
- Nörojenik hipertansiyon
- Psikojenik hipertansiyon
- Genetik hipertansiyon

- Diğer hipertansiyon modelleri başlıkları altında toplanmaktadır.

▪ **Renal hipertansiyon modelleri**

I- Renovasküler hipertansiyon modeli

Goldblatt'ın öncülük ettiği ilk hayvan hipertansiyon modelidir. Köpeklerde renal arteri unilateral klemleme yaparak hipertansiyon gelişimini sağlamıştır [50]. Bu hipertansiyon modeli 3 çeşide ayrılmaktadır:

- a) **2-Böbrek, 1-Klip (2-K, 1-C) modeli:** Bu modelde iki böbrek de olduğu gibi bırakılıp, bir renal arter klemlenmiştir. İnsanlardaki renal arter stenozuyla benzerlik göstermektedir [51-53].
- b) **1-Böbrek, 1-Klip (1-K, 1-C) modeli:** Bu modelde unilateral nefrektomiye takiben, kalan böbreğin renal arterine klemp takılmıştır. Tek böbrekli ve bu böbreklerinde renal arter stenozu olan insanla benzerlik göstermektedir [54, 55].
- c) **2-Böbrek, 2-Klip (2-K, 2-C) modeli:** Bu model çok fazla kullanılmamaktadır. 1K-1C'den biraz farklıdır.

II- Renal parankimal hipertansiyon modeli

- a) **Page hipertansiyon modeli:** Selofan kağıdı böbreğin etrafına sarılıp, renal hilus ipek sütür ile bağlanmaktadır. Ya iki böbrek de sarılmaktadır, ya da bir böbrek sarılıp diğer böbrek çıkarılmaktadır [56].
- b) **Grollman hipertansiyon:** Böbrek dokusu, böbreği sekiz şeklinde bağlayarak komprese edilmektedir. 2 böbrek 1 bağ (2K1L) ve 1 böbrek 1 bağ (1K1L) çeşitleri vardır.

III- Aort koartraksiyon modeli: Renal kan akımı, aort kompresyonu yapılarak azaltılmaktadır [57].

IV- Renal kütlenin azaltılması modeli: Renal kütlenin 5/6'sı çıkartılarak yapılmaktadır.

V- Mikrosfer embolisine sekonder olarak gelişen glomerular sklerozis de renal hipertansiyon oluşturmada kullanılmaktadır [58].

▪ **Diyete bağlı hipertansiyon modeli**

- **Tuz alımının arttırılması ile oluşturulan model:** Sıçanlarda, 10-12 ay boyunca içme suyuna %1-2'lik sodyum klorid eklenerek oluşturulmaktadır [59, 60].

▪ **Endokrin hipertansiyon modelleri**

I- Mineralokortikoid ile oluşturulan hipertansiyon modeli: Mineralokortikoidler vücutta sodyum ve su tutulumuna neden oldukları için, arteriyel basıncın yükselmesine dolayısıyla da hipertansiyon gelişimi gözlenmesine sebebiyet vermektedirler [61]. Genel olarak bu modelde deoksikortikosteronasetat (DOCA) tuz modeli kullanılır.

II- Adrenal rejenerasyon hipertansiyon modeli: Sıçanlarda unilateral nefrektomiye takiben sağ adrenal bezin çıkartılıp, sol adrenal bezin dışarıya alınmasıyla oluşturulmaktadır.

▪ **Nörojenik hipertansiyon modeli**

Sinoaortik baroreseptörlerin denervasyonu ve beynin farklı bölgelerinin kimyasal veya elektriksel şekilde uyarılması şeklinde olmaktadır [62].

▪ **Psikojenik hipertansiyon modeli**

Tekrarlı stres koşullarının sonucunda oluşan bir hipertansiyondur [63].

▪ **Genetik hipertansiyon modeli**

I- Spontan hipertansif ve felce yatkın spontan hipertansif sıçan modelleri: Bu model, spontan hipertansif sıçan (SHR) olarak adlandırılmaktadır [64]. Fizyolojik, farmakolojik veya cerrahi girişim gerekmeden hipertansif olan bir modeldir. SHR'lerin haricinde felce yatkın spontan hipertansif sıçanlar (SHR-SP) da mevcuttur, ancak bu sıçanlar yetişkinliğin ortalarında ölmektedirler [65].

II- Dahl Sıçan modelleri: Dahl tuz duyarlı ve Dahl tuz dirençli sıçanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. %8'lik NaCl ile oluşturulan tuz yüklemeli modellerin çiftleştirilmesi sonucu oluşmuş olup; tuz duyarlılar tuz yüklemesiyle birlikte hipertansiflik gösterip, tuz dirençliler ise kan basınçlarında anlamlı bir yükselme göstermemektedirler [66].

▪ **Diğer hipertansiyon modelleri**

I- Androjen ile oluşturulan hipertansiyon modeli: İnsanların 60'lı yaşlarında görülen yüksek kan basıncını taklit etmek amacıyla, testosteron uygulanması ile kan basıncını yükseltme prensibine dayanır [67].

II- Dişi sıçanlarda hipertansiyon modelleri

a) **Postmenopozal hipertansiyon modeli:** Dişi spontan hipertansif sıçanlar 18 aylık olduktan sonra postmenopozal hipertansif sıçan (PMR) modeli olarak alınmaktadır. PMR'lerin 12. ve 16. ay aralıklarında östrus siklus durmaktadır ve hipertansiyon gelişimi gözlenmektedir. Kadınlardaki postmenopoz döneminde görülen hipertansiyonla eş değer görülmektedir [68].

b) **Hamile sıçanlarda uterus perfüzyonunun azaltılması ile oluşturulan hipertansiyon modeli:** Kadınlarda preeklampsi ile benzerlik göstermektedir. Bu sıçanlarda hipertansiyon gelişiminin yanı sıra endotel disfonksiyonu, renal plazma akımı ve glomeruler filtrasyon hızında azalma, proteinüri ve intrauterin büyümenin durması gözlemlenmektedir [69-71].

III- Anjiyotensin II ile oluşturulan hipertansiyon modeli: Mini pompayla subkutan anjiyotensin II infüzyonu (0,7mg/kg/gün) yapılmasıyla 4-8 hafta içerisinde oluşmaktadır [72].

IV- Obezite ilişkili hipertansiyon modeli: Obez Zucker sıçanlarla Wistar Kyotoların çaprazlanması sonucu oluşmaktadır. 16 haftadan sonra hiperinsülinemi ve hipertansiyon gelişimi gözlenmektedir [73]

V- Genetik Knockout modeller: Genin çıkartılarak veya değiştirilerek etkisiz hale getirilmesiyle oluşturulmaktadır.

2.1.4.1.Nitrik oksit sentaz inhibisyonu hipertansiyon modeli

NO, genel bilgilerin ileri kısımlarında üzerinde durulacağı üzere vasküler tonusun düzenlenmesinde yer alan çok önemli vazodilatör bir maddedir. Endotelden salınan NO'nun eksikliğinin hipertansif süreçlere yol açması, deney hayvanlarında da NO eksikliğine bağlı hipertansiyon modelinin kullanılmasına yol açmıştır. Bu amaç için NO'yu üreten enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin inhibe edilmesi yaklaşımı yapılmaktadır.

L-arjinin analogu olan L-NMMA, L-NIO ve L-NAME; L-arjinin yerine geçip endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) inhibisyonu sağlamaktadır. Bu analoglar, L-arjininin eNOS bağlanma bölgesiyle yarışıp NO sentezini inhibe etmektedirler. NOS enziminin kronik olarak inhibisyonu ile periferik direncin arttığı ve dolayısıyla sistemik hipertansiyon gelişimi olduğu saptanmıştır. NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon gelişimine katkısı olduğu öne sürülen mekanizmalar arasında; total periferik vasküler direnç artışı, sempatik sistem aktivasyonu, çeşitli vazodilatör maddeler ve artmış renal sodyum tutulumu bulunmaktadır [27, 74]. Mevcut veriler ışığında düşük doz NOS inhibitörleri ile oluşturulan hipertansiyondan esasen sodyum tutulumunun, yüksek doz NOS inhibitörleri ile oluşturulan hipertansiyondan ise total periferik vasküler direnç artışının sorumlu olduğu kabul edilmiştir [75].

NOS inhibisyon modeli ilk olarak 1992 yılında ortaya konulmuştur. NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon modelinde ilk olarak L-NAME kullanıldığını görmekteyiz. İki ayrı araştırmacı grubu, birbirinden bağımsız olarak L-NAME uygulaması yapıp hipertansiyon oluşumunu gözlemlemişlerdir. Baylis ve arkadaşları 8 haftalık L-NAME uygulamasıyla stabil hipertansiyonu ve ek olarak glomeruloskleroz oluşumunu göstermişlerdir [76]. Ribeiro ve arkadaşları ise daha fazla miktarda L-NAME uygulayarak hipertansiyonun farklı seviyelerinin, glomerular iskemiye, glomeruloskleroz oluşumuna ve renal interstisyel genişlemeye neden olduğunu gözlemlemişlerdir [77].

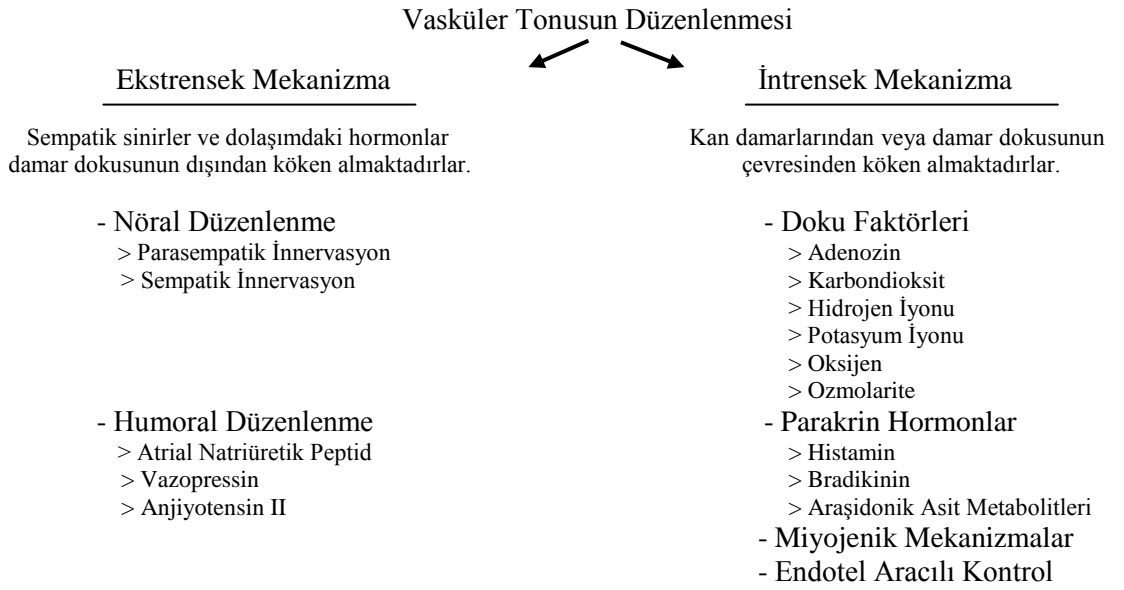
L-NAME uygulanması hipertansiyon için oldukça uygun bir modeldir, çünkü içme suyunda çözünebilmekte ve sindirim sisteminde rahatlıkla emilebilmektedir [78, 79]. Ayrıca sıçanlarda L-NAME'in intraperitoneal olarak enjeksiyonu da hipertansiyon oluşumunda kullanılmaktadır [80]. Farklı soylardaki sıçanlara aynı dozda L-NAME uygulanmasının kan basıncı artışının düzeyini değiştirdiği belirtilmektedir [28]. Yapılan çalışmalarda, bu inhibitörün değişen dozlardaki ve uygulama sürelerindeki etkisi incelendiğinde farklı kan basıncı artışları gözlemlenmiştir [77, 81, 82]. Böylece farklı dozlarda L-NAME uygulamasının

hipertansiyona sebebiyet verdiği gösterilip arteriyel hipertansiyon patofizyolojisinin araştırılması için önemli bir kaynak oluşturmuştur.

2.2. Vasküler Tonusun Düzenlenmesi

Direnç damarları, fizyolojik koşullarda kan basıncının düzenlenmesinden sorumlu en önemli faktörler arasında yer almaktadır. Bu damarların bazal koşullarda kısmen kasılı olması 'vasküler tonus'u sağlamaktadır. Vasküler tonusun düzenlenmesi iki ana mekanizma altında incelenmektedir. Detaylardan Tablo 2.2.'de bahsedilmektedir [83-86].

Tablo 2.2. Vasküler Tonusun Düzenlenmesi



Görüldüğü üzere vasküler tonusun düzenlenmesinde pek çok faktör rol oynamakla birlikte, vasküler dokudan salgılanan maddelerin önemi büyüktür. Vasküler dokunun bileşenlerinden olan endotel tabakası tek hücreli bir tabaka olup, arter ve venler boyunca ilerlemektedir [87]. Vasküler endotel tabakası, vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynayan en önemli faktördür. Biyomekanik ve kimyasal uyarılara cevaben, pek çok vazodilatör ve vazokonstriktör otokoid salınımı gerçekleştirmektedir. Bu medyatörlerle de vasküler tonusta dengeyi sağlamaktadır [88]. Vasküler endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler hastalık patogenezinde önemli rol oynamaktadır ve özellikle hipertansiyon gelişiminde etkilidir [89]. Vasküler direncin sağlanmasında endotelden salınan vazodilatör etkenler; nitrik oksit (NO), prostaglandin I₂ (PGI₂) ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) 'dür. Endotelden salınan vazokonstriktör etkenler arasında en önemlisi ise; endotelin-1 (ET-1)'dir.

2.2.1. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit, endotelden salınan en önemli fizyolojik vazodilatördür. Özellikle arterlerden salınımı olmaktadır. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-arjininin oksidasyonu ile üretilmektedir.

Hücre tiplerine göre 3 adet NOS izoformu bulunmaktadır. Bunlar; Endotelyal NOS (eNOS) , nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS)'tur [90, 91]. Endotel gevşetici olarak ilk defa 1980 yılında tavşan aort halkasındaki sağlam endotel tabakası sayesinde asetilkoline gevşeme yanıtının verilmesi ile bulunmuştur. Endotel tabakası olmayan aort halkalarında, vasküler düz kasın vazodilatasyonu ortadan kalkmıştır. 1987 yılında ise, prostasiklinlerden ziyade asıl vazodilatör maddenin NO olduğu bulunmuştur [87, 92].

Çeşitli uyarılar, endotel hücre membranında bulunan bir otokoid olan nitrik oksit (NO) sentezini ve salınımını başlatmaktadır. Hücre membranı küçük, gaz moleküllere geçirgen olduğu için NO komşu vasküler düz kas hücrelerine difüze olup vazodilatasyon gerçekleşmektedir. Vazodilatasyon, siklik guanozin monofosfat (cGMP) ikincil habercil mekanizmasıyla olmaktadır. NO, vasküler düz kas hücre sitozolüne ulaştıktan sonra guanil siklaz enziminin aktif bölgelerindeki demirle etkileşime girmektedir. Bu olay, intraselüler mediatör olan cGMP'nin üretimini uyarmaktadır. cGMP de sinyali amplifiye etmektedir [93]. Bu da plazma membranı ve sarkoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum pompalarını aktive etmektedir. Kalsiyum pompaları, intraselüler kalsiyum miktarını azaltarak vasküler düz kas gevşemesine ve kan damarlarının vazodilatasyonuna neden olmaktadır [94]. NO, endotel hücrelerinin yanı sıra aktive olmuş makrofaj ve nötrofillerden üretilmektedir. Kısa ömründen dolayı (5-10 saniye) lokal olarak etki edip, ardından nitrit ve nitrate indirgenmektedir [95]. Özellikle iletim tipi büyük arterlerde NO'nun katkısı ön plandayken, damar çapı küçüldükçe yerini EDHF'nin katkısına bırakmaktadır.

2.2.2. Prostaglandin I₂ (PGI₂)

Diğer adıyla prostasiklin, 1976 yılında endotelden salındığı bulunan ilk vazodilatör maddedir [96]. Diğer prostaglandinler gibi siklooksijenaz (COX) yoluyla araşidonik asitten sentezlenen protaglandin H₂ (PGH₂)'den özelleşerek oluşmaktadır [97]. Nitrik oksite benzer şekilde lipitte çözülen PGI₂ endotel hücrelerinden diffüze olmaktadır. Hem vasküler düz kas hücrelerinin kontraksiyonunu hem de platelet agregasyonunu inhibe etmektedir. Endotel hücrelerinden kayma gerilimi sonucunda veya nitrik oksit salınımını sağlayan agonistler aracılığı ile sekrete edilmektedir. Kendi membran reseptörüne bağlanıp hedef hücredeki adenilat siklazı aktive etmektedir. Böylece artan siklik adenilat monofosfat (cAMP) seviyeleri protein kinaz A'yı aktive edilip, sitozolik kalsiyum azalışı olmakta ve potasyum kanalları aracılığı ile hiperpolarizasyona sebep olmaktadır. Vasküler homeostazisin sürdürülmesinde ve kan akımının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [96]. PGI₂ sentezini uyaran en önemli agonist bradikinin olmakla birlikte; substant P, platelet kaynaklı büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü de sentezini uyarmaktadır [98].

2.2.3. Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör (EDHF)

Pek çok damarda, NO ve PGI₂ sentezlerinin inhibisyonu gerçekleştirildiğinde hala hiperpolarizasyonu ve vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeyi sağlayan endotel aracılı bir mekanizma görülmektedir. Bu üçüncü vazodilatöre 'Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör (EDHF)' denilmektedir. EDHF'ye dair 3 ayrı etki mekanizması fikri öne sürülmüştür. Bunlardan ilki, EDHF'nin CYP450 enzimleri aracılığı ile araşidonik asitten salınan epoxyeicosatrienoic acid (EET) ürünü olup kalsiyum aracılı potasyum kanalları ile vazodilatasyona sebep olabileceğidir [99]. İkincisi mekanizma, endotel hücrelerinden kalsiyum aracılı potasyum kanalları ile potasyum çıkışının gerçekleşmesinin içeri doğrultucu potasyum kanallarını (Kir) ve sodyum potasyum ATPazları aktive edebileceğidir [100]. Son olarak ise EDHF varlığı ile direkt olarak kalsiyum aracılı potasyum kanallarıyla gerçekleşen hiperpolarizasyonun gap junctionlarla vasküler düz kasa iletebileceği [101] şeklindedir. Potasyum iyonlarının, endokannabinoidlerin, C-tipi natriüretik peptidin veya EET'lerin EDHF olabileceği öne sürülmektedir [88, 102, 103].

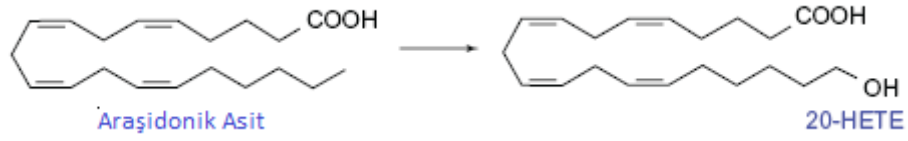
2.2.4. Endotelin-1 (ET-1)

Endotel hücreleri bazal laminalarından vazokonstriktör peptid olan Endotelin-1 salınımını gerçekleştirmektedirler. Endotelin-1 (ET-1), endotelinin 18 aminoasitten oluşan 3 izoformundan biridir ve preproendotelin olarak sentezlenip endotelin dönüştürücü enzim ile aktif hale gelmektedir. ET-1, pek çok uyarıyla salınabilmektedir (hipoksi, Ang II, inflamatuvar sitokinler vb.) [104]. ET-1, fizyolojik etkilerini iki tip reseptör ile göstermektedir. Bunlar, ET_A ve ET_B 'dir. Bu reseptörler, vasküler düz kas hücrelerinde yer almaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu intraselüler kalsiyum miktarını arttırıp, kontraksiyona neden olmaktadır. Endotel hücreleri tip B reseptörünü içermektedir. Bu reseptörün aktivasyonu eNOS aktivitesini arttırmaktadır. Böylece artan NO seviyeleri ET-1 üretimini azaltıp, vazokonstriksiyonu antagonize etmektedir. Bu durum kendi kendini sınırlayıcı bir mekanizma oluşturmaktadır [105]. ET-1'in etkisi IP₃ yolağı aracılığı ile olmaktadır [106]. Yapılan bir çalışmada; ET-1'e ait reseptörler sistemik olarak bloke edilince damarlarda vazodilatasyon ve kan basıncında %10-20 oranında azalma gözlenmiştir [98].

2.2.5. 20-HETE (20-hydroxyeicosatetraenoic acid)

20-HETE, vasküler düz kasta salgılanan oldukça önemli bir vazokonstriktör medyatördür. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda pulmoner endotel tabakasından da salgılandığı gösterilmiştir.

20-hydroxyeicosatetraenoic acid; 20 karbon zincirli, 4 cis-çift bağlı ve çift bağlardan ilki omega ucundan itibaren 6. karbon atomunda bulunan araşidonik asitin (AA) hidroksilasyonu sonucu terminal sp³ karbon grubunun yanına hidroksil (OH) grubu eklenmesiyle oluşan bir moleküldür (şekil 2.1) [4, 107, 108].



Şekil.2.1. 20-HETE yapısı

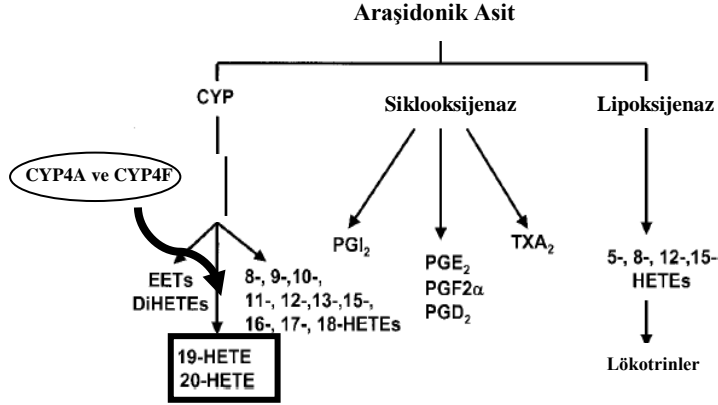
2.2.5.1. Tarihçesi

AA'nın, siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) enzimlerince metabolize olduğu çok uzun zamandır bilinmektedir. Elde edilen metabolitlerin renal ve pulmoner fonksiyonu, vasküler tonusu ve inflamatuvar cevabı düzenlediği de gösterilmiştir [109-112]. Bununla birlikte 1981 yılında üçüncü bir AA metabolizma yolu ortaya konulmuştur. Bu yolda AA'nın, sitokrom P-450 (CYP450) enzimlerince epoxyeicosatrienoic acid (EET) ve ilgili dihydroxyeicosatrienoic acid (DiHETE)'lere dönüştüğü gösterilmiştir [113-115]. Ardından bu enzimlerin, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE)'i de içeren çeşitli HETE'lerin oluşumunu katalize ettiği bulunmuştur. Ancak bu yolak; COX ve LOX yollarına odaklanıldığından, spesifik CYP enzim inhibitörleri eksikliğinden ve yolakta oluşan metabolitlere kısıtlı erişim sağlanabildiğinden dolayı uzunca süre göz ardı edilmiştir. Bununla birlikte üç anahtar çalışma CYP yolağının gündeme tekrar gelmesini sağlamıştır. Çalışmalar, CYP metabolitlerinin renal fonksiyon ve vasküler tonusu düzenlemedeki rolü üzerine yapılmıştır. İlk olarak 1988 yılında, CYP4A2'nin tuz alımıyla düzenlenen bir gen olduğu ve spontan hipertansif sıçanlarda (SHR) bu gen ekspresyonunun fazla olduğu gösterilmiştir [116]. Ardından 1992 yılında spontan hipertansif sıçanların böbreklerinde 20-HETE üretiminin arttığı bulunmuştur [117, 118]. Son olarak da, hem oksijenaza aracılık eden ve renal 20-HETE oluşumunu azaltan etmenlerin SHR'lerde hipertansiyon gelişimini önlediği gösterilmiştir [119-121]. Bu kanıtlardan sonra CYP yolağına dair çalışmalar hız kazanmıştır. Ayrıca bu çalışmalar, 20-HETE'nin hipertansiyon gelişiminde rol oynayabileceği hipotezinin ortaya çıkmasını sağlamışlardır [111].

2.2.5.2. Metabolizması

Araşidonik asit yolağından oluşumu

Fosfolipitlerden, fosfolipaz A₂ (PLA₂) aracılığı ile AA oluşuktan sonra, AA üç ana yolla eikosanoidlere metabolize olmaktadır. Bunlar COX, LOX ve CYP450 monofosfat yolları olup, lipid medyatörleri oluşturmak için AA'ya farklı pozisyonlarda oksijen eklemektedirler. AA, COX yolağı ile prostaglandinlere (PGs) ve tromboksanlara metabolize olmaktadır. LOX yolağından ise 15(S), 12(S), 12(R), 8(S), 5(S) HETE'ler, lökotrinler ve lipoksinler oluşmaktadır. Son olarak da CYP450 yolağından 16-, 17-, 18-, 19-, 20-HETE'lere ve 5-, 6-, 8-, 9-, 11-, 12-, 14-, 15-EET'lere metabolize olmaktadır. EET'lerin oluşumu için CYP2C ve CYP2J epoksijenazları gerekmektedir. AA'dan 20-HETE oluşturacak CYP450 w-hidroksilasyonunu ise CYP4A ve 4F enzimleri yapmaktadır. w-hidroksilasyonda 20-HETE'nin yanı sıra 19-HETE oluşumu da gözlenmektedir. 19-HETE, 20-HETE'nin antagonisti rolünde olmasına rağmen oluşan miktarı çok az olduğu için baskın metabolit 20-HETE olmaktadır (Şekil 2.2) [4, 107, 122].



Şekil 2.2. Araşidonik asit yolağı

CYP4A ve 4F enzimleri türlere ve buldukları yerlere göre farklılık göstermektedirler. İnsanlarda 20-HETE üreten CYP4A11, CYP4A22, CYP4F2 ve CYP4F3 olmak üzere 4 tane CYP450 izoformu bulunmaktadır [4, 122, 123]. Bahsedilen 4 adet 20-HETE üreten enzim göz önüne alındığında; CYP4F2, 20-HETE üretiminin %70'inden sorumlu başlıca enzim olarak kabul edilmektedir [123, 124]. CYP4A22'nin ekspresyonu çok az olduğu için, fonksiyonel öneminin limitli olduğu bildirilmektedir. CYP4A11, CYP4A22 ve CYP4F2 enzimleri insanlarda karaciğer ve böbreklerde [123-125], CYP4F3 enzimi ise polimorfonükleer lökositlerde [126] eksprese olmaktadır.

Sıçanlarda ise CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3 ve CYP4A8 olmak üzere 4 adet CYP4A enzimi bulunmaktadır. Sıçanlarda CYP4A1'in katalitik aktivitesi CYP4A2 ve CYP4A3 'e göre on kat daha fazladır [127]. CYP4A1, CYP4A'nın aort ve renal arterde eksprese olan tek izoformudur. Sıçanlarda 20-HETE üreten tüm CYP4A'lar; glomerulus, proksimal tübül, kortikal toplayıcı kanal, kortikal kalın çıkan henle, interlobar-arkuat ve interlobular arterlerde bulunmaktadır [10, 128]. Belirtmek gerekir ki, vasküler sistemde CYP4A izoformları en fazla küçük çaplı damarlarda bulunmaktadır. Tüm sayılan 4A izoformlarının karaciğer ve beyinde (serebral arter) protein düzeyinde ekspresyonları da gözlenirken [16, 129-136], ayrıca CYP4A2 ve CYP4A3 ekspresyonlarının iskelet kası damar yataklarında ve akciğerde de olduğu saptanmıştır [137, 138]. Sıçanlarda 20-HETE üreten CYP4F enzim ailesinin ise 4 izoformu bulunmaktadır. Bunlar; CYP4F1, CYP4F4, CYP4F5 ve CYP4F6'dır [139-141]. CYP4F izoformları da CYP4A izoformları gibi en fazla böbreklerde eksprese olmaktadır. Sıçanlarda bulunan CYP4F izoformlarının her birinin karaciğer, böbrek, akciğer ve beyinde protein düzeyinde ekspresyonları bulunmaktadır [142].

Farelerde ise CYP4A10, CYP4A12 ve CYP4A14 izoformlarının 20-HETE üretiminde görev aldığı bilinmektedir. Bu enzimlerden sadece CYP4A12 izoformunun anlamlı bir 20-HETE sentaz aktivitesi gösterdiği bilinmektedir [143]. Bu üç izoform fare karaciğer ve böbreklerinde bulunmakla birlikte, dişi ve erkeklerdeki ekspresyon düzeyleri farklıdır [144, 145]. CYP4A10 hem dişilerde hem de erkeklerde eksprese olurken, CYP4A12 erkeklere özgü olup, CYP4A14 ise yüksek oranda dişilerde eksprese olmaktadır [143, 144, 146].

Salınımına Etki Eden Faktörler

20-HETE sentezi ve salınımı bazal şartlarda olmakla birlikte; Ang II, ET-1, serotonin (5-HT) ve diğer büyüme faktörleri gibi pek çok otokoid tarafından da düzenlenmektedir [23, 147]. Bazal şartlarda 20-HETE'nin etkileri, diğer vazoaaktif ajanların ve hormonların etkinliği sebebiyle baskılanmaktadır. Klinikte renovasküler hastaların renin-anjiyotensin sistemi aktivasyonunda artış olduğu bilinmektedir. Bu artışla birlikte plazmadaki 20-HETE miktarının da pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur [148]. ET-1, sıçan böbreklerinde 20-HETE salınımını sağlamaktadır [149]. Spontan hipertansif sıçanların böbreklerinde hem paratiroid hormonun hem de epidermal büyüme faktörünün 20-HETE oluşumunu uyardığı gösterilmiştir [118, 150]. Androjen, sıçan renal interlobar arterlerinde 20-HETE oluşumunu arttırmıştır [25, 26, 151]. Ayrıca egzojen faktörler de 20-HETE sentez ve salınımını etkilemektedir. Lipit azaltıcı ajanlar olan fibratlar, karaciğer ve böbrekte CYP4A ekspresyonunu arttırmıştır [152]. Diğer bir hipolipidemik ilaç olan fenofibratlar da 20-HETE seviyelerini yükseltmiştir [153]. Yüksek yağ diyeti ise CYP4A aktivitesini azalttığı için, 20-HETE oluşumu da azalmaktadır [154]. Yaş ve cinsiyetin de 20-HETE salınımı üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir [151].

Yıkımı

20-HETE, AA'nın 3 yolağına da metabolize olabilmektedir. Ayrıca alkol dehidrogenazlar ve β -oksidasyon ile de metabolizasyonu gerçekleşmektedir [155]. 20-hidroksi-prostaglandin'ler, sıçan aortik halkalarında 20-HETE'nin COX kaynaklı vazokonstriktör metabolitlerindendir [156]. Ancak her vasküler yatakta bu görülmemektedir. Örneğin sıçan afferent arteriollerinde COX'tan bağımsızdır [128]. 20-HETE, alkol dehidrogenazlarla vazodilatör medyatör olan 20-karboksi-araşidonik-asit'e çevrilmektedir. Bu metabolitin işlevi domuz koroner arterlerinde yapılan bir çalışmayla gösterilmiş olup, bunun yanı sıra PPAR alt birimlerinin aktivasyonunu sağladığı da bulunmuştur. Ayrıca 20-HETE, β -oksidasyon ile 18-, 16-, 14 β oksidasyon ürünlerine dönüştürülebilmektedir [155, 157]. Platelet ve polimorfonükleer lökositlerde 20-HETE'nin lipoksijenazlar ve COX yolağı ile inaktif ürünlere metabolize olduğu da bilinmektedir [158, 159]. Sıçan böbreklerinde CYP epoksijenazlar aracılığı ile ise 20-HETE'nin PPAR-alfa aktivatörü olan 20-hydroxy-epoxyeico-satrienoic acid'e metabolize olabilmektedir [160]. Karaciğer ve böbrekte ise fosfolipidlere esterleşip, öyle depolanmaktadır [23]. Görüldüğü üzere 20-HETE, pek çok farklı yerde pek çok metabolite dönüştürülebilmektedir.

2.2.5.3. Etkileri

20-HETE kan basıncının kontrolünde oldukça önemli bir AA türevi olup, temel olarak vasküler doku ve böbrekler üzerine etki etmektedir. Etkilerini sınıflandıracak olursak ise şu başlıklar altında toplayabilmekteyiz:

- Vasküler tonusa etkisi
- Endotel disfonksiyonu oluşumuna etkisi
- Miyojenik tonus ve O₂ duyarlılığına katkısı
- Tubuloglomerular feedback (TGF) ve renal kan akımı kontrolüne etkisi
- Sodyum transportu ve basınç-natriürik cevaba katkısı
- Vasküler inflamasyon süreçlerine etkisi
- Anjiyogenetik etkisi

- **Vasküler tonus üzerine etkisi**

Vasküler tonus üzerine 3 şekilde etkisi bulunmaktadır:

A) Doğrudan etki:

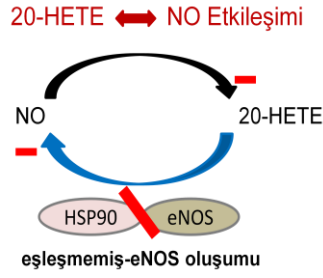
Renal, serebral, kardiyak, mezenterik ve iskelet kası arteriollerinde etkili bir vazokonstriktördür [9, 14, 161]. 20-HETE, tek başına direkt olarak kalsiyum aracılı potasyum kanalını bloke etmektedir. Ayrıca protein kinaz C (PKC), mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) ve src-tip tirozin kinazı aktive etmektedir. Bu kinazların hepsi kalsiyum aracılı potasyum kanallarını fosforile etme yolu ile inhibe edebilmektedir (İntraselüler kalsiyum artışı ve depolarizasyona sebep olmaktadır). Böylece L-tipi kalsiyum kanallarının açık kalma süresi de uzamaktadır [5]. Ayrıca 20-HETE, Rho kinaz yolağı ile miyozin hafif zincir fosforilasyonunu sağlayıp kalsiyuma karşı duyarlılığı arttırmaktadır [162].

B) Vazoaktif ajanlar aracılığı ile etkisi:

20-HETE vasküler tonusu, vasküler düz kas hücrelerinin konstriktör cevaba karşı duyarlılığını arttırarak düzenlemektedir. 20-HETE sentezi ve salınımı Ang II, ET-1 ve serotonin ile uyarılabilmektedir. Bu konunun detayları bölüm 2.1.5.2.2. de daha ayrıntılı olarak ifade edilmiştir [18, 19, 147, 163, 164].

C) NO ile ilişkisinin etkisi:

Vasküler homeostaziste NO oldukça önemli olduğundan yukarıda bahsedilmiştir. Kısaca hatırlayacak olursak, NO sentezinin düzenlenmesi oldukça karışıktır ve etkisini temel olarak cGMP aracılığı ile göstermektedir. Bazı vasküler yataklarda NO'nun etkisinin sGC'den bağımsız olabileceğine dair bulguların eldesi sonucunda, bunun ardında yatan mediyatörün 20-HETE olduğu anlaşılmıştır [165]. 20-HETE oluşumu üzerinde cGMP inhibitörünün herhangi bir etkisi olmadığı gösterilirken, 20-HETE oluşumunun SNP'ye karşı doza bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir [166]. Ayrıca NOS substratının da 20-HETE oluşumunu azalttığı gözlemlenmiştir. Renal arterlerde NOS inhibisyonu, CYP450 monooksijenaz metabolitleri aracılığı ile vazokonstriksiyona neden olmuştur [11]. Hemen ardından w-hidroksilaz seçici inhibitörü ile vazodilatasyonun sağlanması sonucu, 20-HETE'nin vazokonstriksiyona asıl neden olan metabolit olduğu bulunmuştur. Öte yandan CYP4A ekspresyonunun artması (20-HETE oluşumunun artmasına neden olmaktadır), asetilkolin aracılı vazodilatasyon yanıtını da bozmaktadır [167]. Vazodilatasyon yanıtının bozulması, 20-HETE'nin NO biyoyararlanımını eşleşmemiş eNOS aracılığı ile azaltmasından kaynaklıdır ve eNOS ile heat shock protein 90 (HSP90) arasındaki ilişkinin engellenmesi bu duruma sebep olmaktadır [168]. Sıçan serebral arterleri ve renal interlobular arteriollerinde 20-HETE inhibisyonu gerçekleştirilmesinin ardından, damarların NO donörü olan sodyum nitroprusid (SNP)'e verdiği vazodilatasyon yanıtının değiştiği gösterilmiştir [169-171]. Elde edilen bulgular 20-HETE'nin NO aktivitesinin düzenleniminde rol aldığını göstermenin yanı sıra, pek çok mikrodolaşım yatağında NO'nun 20-HETE sentezinin düzenlenmesinde rol aldığını göstermiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 20-HETE – NO ilişkisi

- **Endotel disfonksiyonu oluşumuna etkisi**

Dolaşımın pek çok kısmında vasküler endotelin 20-HETE üretip üretmediği hala kesin değildir, ancak 20-HETE'ye karşı verdiği cevap üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Vasküler tonusun, damar çapının ve kan akımının düzenlenmesinde önemli yeri olan endotel tabakası, ayrıca zararlı uyarılara karşı savunma gösteren ilk tabakadır [172]. Endotelin bütünlüğü, NO'ı de içeren pek çok faktöre bağlılık göstermektedir [173]. Endotel disfonksiyonu; NO biyoyararlanımının azalması (NO üretiminin azalması veya yıkımının artması sebebiyle) ve/veya endotel kaynaklı gevşeme ve kasılma faktörleri arasındaki dengesizlik sebebiyle görülmektedir. Endotel disfonksiyonunun hipertansiyonun bir özelliği ve kardiyovasküler hastalıklar için erken risk faktörü olduğu bilinmektedir [2, 174]. İlk defa 2000 yılında 20-HETE'nin kremasterik arteriolde asetilkolin aracılı gevşemeyi azaltması, 20-HETE'nin NO homeostazisinde rol oynayabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır [175]. Renal interlobar arterlerde CYP4A2 ekspresyonu arttırıldığında ise; 20-HETE üretiminin arttığı, asetilkolin aracılı gevşeme yanıtının azaldığı, NO ve siklik guanozin monofosfat seviyelerinin azaldığı ve süperoksit anyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [167]. Bu sonuçların da hipertansiyon gelişimi ve endotel disfonksiyonuna yol açtığı bilinmektedir [176-178].

Oksidatif stres, hücresel süreçte reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile hücrelerin bunları suya çevirebilmeleri arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. NO kadar oksidatif stresin de endotel disfonksiyonunda büyük bir rolü olduğu bilinmektedir. Fizyolojik koşullarda ROS'lar süperoksit dismutazlar (SOD) aracılığı ile azaltılırlar, ancak bu sistem bozulabilmektedir. Sığır aort endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 20-HETE'nin NO üretimini azaltması ile süperoksit üretiminin artışının ilişkili olduğu gösterilmiştir. 20-HETE inhibitörü verilmesiyle süperoksit oluşumunun azaldığı da kanıtlanmıştır [168]. Son yıllarda ise kardiyomiyositlerde 20-HETE aracılı L-tipi kalsiyum kanal akımının artışının protein kinaz C'deki (PKC) artışla ilişkili olduğu, bunun da NADPH oksidazı fosforile ettiği ve süperoksit üretimini arttırdığı gösterilmiştir.

- **Miyojenik tonusa katkısı**

Renal, serebral, mezenterik, iskelet kası arteriollerinde artan transmural basınç karşısında ve kan akımının otoregülasyonunda 20-HETE önemli rol oynamaktadır [16, 179-184]. Transmural basıncın artması ile damar çaplarında kasılma görüldükten sonra, 20-HETE sentezi inhibe edildiğinde basınç aracılı kasılma yanıtının azaldığı gösterilmiştir. Sıçan orta serebral arterlerinde transmural

basıncın arttırılması ile, arterlerden üretilen 20-HETE konsantrasyonunda artış gözlenmiştir [16]. Miyojenik yanıt gerimle aktive olmuş kanallardan içeri kalsiyum girişi ile tetiklenmektedir [185]. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması AA salınımına neden olup, 20-HETE oluşumunu sağlamaktadır. Normalde hücre içi kalsiyum artışıyla aktive olan hiperpolarize edici potasyum kanalı açılmaktadır. Ancak bu durumda 20-HETE, kalsiyum aracılı potasyum kanalını bloklamakta ve vasküler düz kas hücrelerinin hiperpolarizasyonunu önlemektedir.

- **O₂ duyarlılığı üzerine etkisi**

Arteriollerde w-hidroksilaz, oksijen sensörü olarak da görev yapmaktadır [186]. İskelet kası vasküler yatağında, oksijen konsantrasyonunun azalması ile 20-HETE sentezi de azalmaktadır. İskelet kası damarlarındaki hipoksi-kaynaklı NO-aracılı vazodilatasyon, azalmış 20-HETE sentezi ile ilişkilidir. 20-HETE sentezinin azalması ile NO-aracılı vazodilatasyon artışı sağlanmaktadır. Böylece endotelial kalsiyum aracılı potasyum kanalları açılmakta ve potasyum çıkışıyla birlikte membran hiperpolarizasyonu sağlanmaktadır [187]. Ayrıca artan oksijen seviyesiyle birlikte iskelet kası damarlarının kasıcı ajanlara duyarlılığının arttığı gösterilmiştir [188].

- **Vasküler inflamasyon süreçlerine etkisi**

Vasküler inflamasyon; ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde yer almaktadır. İnflamasyon kaynaklı vasküler yeniden düzenlenme, vasküler direncin artmasını sağlamaktadır. Direnç arterlerinde duvar kalınlığının ve duvar/lümen oranının artışıyla kan basıncı artışı ilişkilendirilmiştir. Bu da hipertansiyon patogenezinde rol almaktadır [189-191]. Endotel aktivasyonu (endotelde meydana gelen proinflamatuvar değişimler), hücre adhezyon moleküllerinin, endotel-lökosit etkileşiminin ve geçirgenliğin artmasına sebep olmaktadır [192-194]. Aktive olmuş endotel hücrelerinden monosit kemoatraktant protein-1'i (MCP-1) de içeren sitokinlerin ve kemokinlerin salınımı, kemokin reseptör tip 2 ile monositlerin adhezyonuna/göçüne aracılık etmektedir [195, 196]. 20-HETE endotel hücrelerindeki bu proinflamatuvar değişiklikleri arttırmaktadır [197]. Özellikle hipertansiyon patogenezi endotel aktivasyonunda ve buna bağlı olarak inflamasyon oluşumunda, aktive olmuş B hücrelerinde nükleer faktör kappa-hafif-zincir-arttırıcı (NF-κB) aktivasyonu ve ROS anahtar rol oynamaktadır [198-201]. Örneğin Ang II-aracılı hipertansiyon modelinde ; NF-κB inhibisyonunun endotel aktivasyonunu azalttığı, aterosklerozu iyileştirdiği, hipertansiyonu önlediği ve buna bağlı olarak da organ hasarından koruduğu gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda, endotel hücrelerinin 20-HETE ile muamelesinin NF-κB aktivitesini arttırdığı kanıtlanmıştır [191, 202, 203]. Son yıllarda yapılan bir çalışma ile inhibitör kappa-B kinazın (IKK), 20-HETE aracılı endotel disfonksiyonunda anahtar bir role sahip olduğu bulunmuştur [204].

- **Anjiyogenetik etkisi**

20-HETE'nin vasküler hücrelerin fonksiyonları üzerine etkisi, anjiyogeneizde de rolü olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Endotel hücre proliferasyonu, anjiyogenezin erken evresinde görülmektedir. İn vitro çalışmalarda insan endotel hücrelerinin 20-HETE ile inkübasyonunun, süperoksit oluşumunu, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve hipoksiyle uyarılır faktör 1 alfa (HIF-1α) üretimini

uyardığı gösterilmiştir. Bu faktörler, anjiyogenik cevapta önemli düzenleyicilerdir. Anjiyogenik kaskatta önemli olan diğer bir basamak ise hücre göçüdür ve 20-HETE endotel hücre göçünü arttırmaktadır [197, 205-207]. İn vivo olarak da 20-HETE'nin hem vaskülerizasyona hem de anjiyogeneze aracılık ettiği gösterilmiştir [208].

Sığır pulmoner arter endotel ve düz kas hücrelerinde 20-HETE'nin hücre sağ kalımına koruyucu etkisi olduğu ve intrinsek apoptotik yolağı etkileyerek apoptozu önlediği gösterilmiştir [207, 209].

Yeni kan damarlarının gelişiminin sağlanması, endotel hücrelerinin kapiller benzeri tüp oluşturmaya ve ardından vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) buraya göçüne bağlı olmaktadır [210]. 20-HETE'nin bunları uyardığı gösterilmiştir [206, 211]. Ayrıca büyüme, 20-HETE aracılığı ile epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve proto-onkogen tirozin-protein kinaz Src (c-Src) bağlı farklı yollara bağlılık göstermektedir [167]. Tüm bu sebeplerden 20-HETE proliferasyonu, göçü, tüp oluşumunu ve hem endotel hücre hem de VSMC sağ kalımlarını düzenlediği için anjiyogenetik cevapta önemli rol oynamaktadır.

- **Tubuloglomerular feedback üzerine etkisi**

20-HETE, böbreklerdeki tubuloglomerular feedback (TGF) cevabına düzenleyici olarak katılmaktadır. Henle kulbunun AA ile inkübasyonu, TGF yanıtını arttırmıştır ve inhibitörler ile yanıtta da azalma gözlenmiştir [212]. 20-HETE sentez inhibitörleri, TGF'nin mediyatörlerinden ATP ile oluşan vazokonstriksiyon yanıtında da azalma göstermiştir [213]. Geniş yelpazede bakacak olursak; NO 20-HETE üretimini inhibe etmekte ve TGF'yi azaltmaktadır. Ang II ise 20-HETE üretimini uyarmakta ve TGF'yi arttırmaktadır.

- **Sodyum (Na⁺) transportu ve basınç-natriüretik cevap üzerine etkisi**

20-HETE proksimal tübülde, Na⁺ transportunu ve Na⁺-K⁺-ATPaz aktivitesini PKC aktivasyonu ile inhibe etmektedir. Paratiroid hormon, dopamin, ET ve AngII'nin proksimal tübülde Na⁺-K⁺-ATPaz aktivitesine ve Na⁺ transportu üzerine olan inhibitör etkileri 20-HETE oluşumuna bağlı olmaktadır [23, 214-219]. Ayrıca üretilen 20-HETE, kalın çıkan henle kulbundaki (TAHL) Na⁺-K⁺-2Cl⁻ transportunu inhibe etmektedir. Nefronun bu kısmında Na⁺-K⁺-ATPaz aktivitesini inhibe etmesi, 20-HETE'nin ouabain-benzeri etkisinden kaynaklanmaktadır [220-224]. Ayrıca 20-HETE, TAHL hücrelerinin apikal membranında bulunan 70-pS K⁺ kanalını da bloke etmektedir [225]. Bu da TAHL'da Na⁺ reabsorpsiyonu için pasif bir sürücü kuvvete sebep olmaktadır.

Basınç-natriürez mekanizmasında hipertansiyon ancak basıncın natriüretik etkisi bozulursa gelişmektedir [226]. Elde edilen bulgular doğrultusunda basınç-natriürez; renal medullar kan akımının ve renal interstitial basıncın artışıyla, proksimal tübülde Na⁺ emiliminin inhibisyonuyla ilişkilendirilmiştir. 20-HETE'nin oluşmasının da Na⁺ transportuna inhibitör etkisi bilindiği için basınç-natriürezle 20-HETE'nin ilişkisi olabileceği düşünülmüştür. Ardından 20-HETE inhibisyonuyla taşıyıcı inhibisyonun önlediği ve ratların basınç-natriüretik cevaplarında ciddi oranda düşme görüldüğü bulunmuştur [227-231].

2.2.5.4. 20-HETE sentez ve etki inhibitörleri

20-HETE'nin fizyolojik rolünü anlamak için inhibitörler ve uyarıcılar geliştirilip çalışılmaktadır. 20-HETE'yi üreten araşidonik asit metabolizması yolağının en üst kısmından başlarsak eğer; membran fosfolipidlerinden araşidonik asit salınımı fosfolipaz inhibitörleri olan kinakrin ve heparinle veya daha spesifik inhibitör olan sitoplazma fosfolipaz A₂ araşidonil-triflorometil keton (AACOF₃) ile bloke edilebilmektedir. Yolağı (CYP enzimlerini) yarışmalı olarak inhibe eden başka bir inhibitör ise 5,8,11,14-eikosatetraynoik asit (ETYA) tir.

Mekanizma temelli inhibitörler; ABT, 10-UDYA, 11-DDYA, 17-ODYA, DMDYA, 10-SUYS, SKF-525, NO ve CO'dur. Mekanizmaya dayalı inhibitörler, kataliz bağımlı şekilde enzimleri inaktive etmektedirler [232]. Bu inhibitörlerin inhibisyonu kalıcı olmaktadır. İçlerinden 10-SUYS, en etkili biçimde 20-HETE oluşumunu seçici olarak inhibe etmektedir.

Mekanizma temelli inhibitörler haricinde, araşidonik asit w-hidroksilasyonunu inhibe eden yarışmalı inhibitörler de bulunmaktadır. Bunlar N-metilsülfonil-12,12-dibromododek-11-enamid (DDMS) ve 12,12-dibromododek-11-enoik asit (DBDD) olmak üzere ayrılmıştır. Bunlar w-hidroksilasyonda yüksek derecede seçicilik sergilemektedir ve epoksijenaz aktivitesini çok az etkilemektedirler. En önemli özellikleri ise oluşan 20-HETE inhibisyonu geri dönebilmektedir [171].

20-HETE oluşumunda daha kuvvetli ve seçici inhibitör olarak ise N-hidroksi-N²-(4-n-bütil-2-metilfenil) formamidin (HET0016) kullanılmaktadır. Rat renal mikrozomlarında HET0016'nın 20-HETE oluşumunu inhibe etmek için küçük miktarlarının yeterli olduğu gösterilmiştir. HET0016'nın siklooksijenaz, epoksijenaz ve diğer CYP enzimleri aktivitesi üzerine de çok az bir etkisi olduğu saptanmıştır [233]. HET0016, in vivo ve ex vivo çalışmalarda da 20-HETE'nin fizyolojik aktivitesini göstermek üzere sıklıkla kullanılmaktadır. Kronik HET0016 uygulamasının (10mg/kg/gün iv) Sprague-Dawley ratların renal homojenatlarında 20-HETE oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği, ayrıca 20-HETE'nin üriner atılımını %90 oranında azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak epoksijenaz aktivitesine anlamlı bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra düşük tuz diyetiyle beslenen Sprague-Dawley ratlara HET0016 uygulaması kan basıncına etki etmez iken, yüksek tuz diyetiyle beslenen ratlara uygulandığında kan basıncını 18 mmHg kadar düşürdüğü gösterilmiştir [234]. Ek olarak 20-HETE oluşumunun inhibisyonu için; belirli CYP genlerinin ekspresyonunu bloklayıp, diğer genlerin fonksiyonlarına etki etmeyen antisens cDNA oligonükleotidleri de kullanılmaktadır [235].

20-HETE'nin herhangi bir reseptörü henüz bulunamamıştır. Ancak etkilerini bloklamak için agonistler üretilmiştir. 20-hidroksieikosa-6(Z),15(Z)-dienoik asit (WIT002) stabil bir nonsiklooksijenaz metaboliti 20-HETE'nin vazokonstriktör etkisini antagonize etmektedir [236, 237]. N-[20-hidroksieikoza-6(Z),15(Z)-dienoilglisin (6,15-20-HEDGE) ise WIT002'nin bir analogu olup beta oksidasyondan daha iyi korunacağı için, WIT002'den daha etkin olabileceği düşünülmektedir. Sentetik stabil analoglara ek olarak, N-[20-hidroksieikoza-5(Z),14(Z)-dienoil]glisin (5,14-HEDGE) ve 20-hidroksieikoza-5(Z),14(Z)-dienoik asit (5,14-20-HEDE diğer bir deyişle WIT003)'nin kardiyorenal fonksiyonlarda bozulmayı önlediği ve bunun

da 20-HETE analogları için potansiyel bir terapötik olabileceğini düşündürmüştür [238, 239].

2.3. Çeşitli Hipertansiyon Tiplerinde 20-HETE

20-HETE ile ilişkili olan hipertansiyon modelleri

Spontan Hipertansif Sıçan Modelinde 20-HETE

SHR'lerde ilk olarak 20-HETE'nin böbreklerde üretiminin arttığı pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir [22, 117, 240]. Bunun yanı sıra 20-HETE sentez inhibisyonunun da kan basıncını düşürdüğü bulunmuştur [121, 241]. 20-HETE'nin sodyum transportu üzerine etkileri göz önüne alındığında, 20-HETE sentezinin inhibisyonunun kan basıncını nasıl düşürdüğü uzunca bir süre anlaşılamamıştır. 20-HETE'nin SHR mezenter arterlerinde Phe'ye karşı duyarlılığı arttırdığı saptanmıştır [242]. Ardından 20-HETE'nin hem renal hem de splanik vasküler sistemde arttığı ve bu artışın periferik vasküler tonusu arttırdığı bulunarak konu aydınlığa kavuşturulmuştur. SHR'lerde 20-HETE sentezinin inhibisyonunun, 20-HETE'nin üriner atılımını azalttığı ve renal interlobar arterlerde Ang II'ye karşı vazokonstriktör cevapta düşüşe neden olduğu gösterilmiştir [243]. Bunun yanında CYP4A1 ve CYP4A2'ye yönelik antisens komplementer DNA uygulanması da renal mikrodamarlarda 20-HETE oluşumunu azaltıp kan basıncını düşürmüştür [244]. 12-16 haftalık SHR'lerde 20-HETE sentezinin inhibisyonuyla kremaster arteriollerinin O₂ aracılı vazokonstriksiyon yanıtında da azalma bulunmuştur [245]. L-NAME ile muamele edilmiş SHR'lerde yine 20-HETE sentezinin inhibisyonuyla kan basıncının azaldığı, bunun yanı sıra organ hasarında azalma olduğu gösterilmiştir [246].

Serebral arterlerde 20-HETE'nin arttığı, bu artışın iskemik felce ve oksidatif stres artışına sebep olduğu bulunmuştur [20]. Buna ek olarak başka bir çalışmada 20-HETE sentezinin inhibisyonu ile serebral inflamasyonda, oksidatif streste, orta serebral arterlerde ACh aracılı gevşeme yanıtında düzelme olduğu gösterilmiştir [247].

Androjen İle Oluşturulan Hipertansiyon Modelinde 20-HETE

Androjen uygulaması ile; arteriyel kan basıncının, CYP4A proteininin ve bununla ilişkili olarak 20-HETE oluşumunun arttığı gösterilmiştir. 20-HETE antagonistinin kullanımı ise kan basıncında düşüşe sebep olmuştur [248]. Ayrıca oluşan 20-HETE'nin artışı, oksidatif stres ve endotel disfonksiyonuyla pozitif korelasyon göstermiştir [26]. Başka bir çalışmada yine androjen uygulaması, renal interlobar arterlerde 20-HETE miktarında, Phe'ye karşı oluşan cevabın duyarlılığında ve NF-KB aktivitesinde artışa, ACh aracılı vazodilatasyonun bozulmasına sebep olmuştur [204].

Dişi Sıçanlarda Oluşturulan Hipertansiyon Modellerinde 20-HETE

-Hamile Sıçanlarda Uterus Perfüzyonunun Azaltılması İle Oluşturulan Hipertansiyon Modelinde 20-HETE: Bu modelde 20-HETE sentezinin inhibisyonu ile kan basıncında ve renal kortekste 20-HETE oluşumunda azalma gözlenmiştir. Ayrıca glomerular filtrasyon hızında artış bulunmuştur [249].

-Postmenapozal Hipertansiyon Modelinde 20-HETE: Postmenapozal hipertansiyon (PMR) modeline 20-HETE spesifik inhibitörü olan HET0016

uygulandığı zaman kan basıncında düşme meydana geldiği ancak bunun genç dişilerde gözlenmediği gösterilmiştir. Ayrıca PMR'lerde genç dişilere göre endojen serebrovasküler 20-HETE oluşumunun fazla olduğu ancak renal 20-HETE oluşumunun az olduğu gösterilmiştir [250].

Ang II ile Oluşturulan Hipertansiyon Modelinde 20-HETE

Ang II, sıçan böbreklerinde 20-HETE sentezini ve salınımını arttırmaktadır. İn vivo ve in vitro çalışmalar 20-HETE sentez inhibisyonunun, Ang II'ye bağlı vazokonstriksiyonu önlediğini göstermiştir. Yine 20-HETE oluşumunun inhibe edilmesi bu sıçan modelinde kan basıncında düşüşe neden olmuştur [24, 218].

Mineralokortikoid ile Oluşturulan Hipertansiyon Modelinde 20-HETE

Sıçanlarda mineralokortikoid olan deoksikortikosteroneasetat (DOCA) tuz ile oluşturulan hipertansiyon modelinde, 20-HETE oluşumu bloke edilince kan basıncının düştüğü gösterilmiştir [251]. Bu çalışmanın aksine, yine aynı model kullanılan farelerin böbreklerinde 20-HETE oluşumunun azaldığı ve 20-HETE oluşumunun arttırılması sonucu hipertansiyon gelişiminin önlediği bulunmuştur [252].

Goldblatt Hipertansiyon Modelinde 20-HETE

Bu modelde, hipertansiyon oluşumunun erken evrelerinde herhangi bir etki gözlenmezken, kronik süreçte 20-HETE'nin oluşumunun inhibe edilmesi kremasterik arteriollerde O₂ aracılı vazokonstriksiyonu azaltmıştır [253].

Dahl Tuz Duyarlı (Dahl SS) Sıçan Modelinde 20-HETE

Dahl SS sıçanlar, yüksek tuz diyeti ile beslendiklerinde sürekli bir hipertansiyon gelişimi ve renal hasar göstermektedirler. Bu model hipertansiyonda 20-HETE diğer modellere göre farklı olarak koruyucu etki göstermektedir. Nefronda Na⁺-K⁺-2Cl⁻ transportunun düzenlenmesinde 20-HETE'nin önemi göz önüne alındığında yapılan pek çok çalışma, Dahl SS sıçanlardaki 20-HETE oluşum eksikliğinin nefronda klor transportunda yükselmeye sebep olduğu ve hipertansiyon gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Dahl SS sıçanların böbreklerinde CYP4A protein ekspresyonu ile 20-HETE oluşumu azalmaktadır [222, 254, 255] ve 20-HETE oluşumunun arttırılmasıyla birlikte kan basıncında düşüş meydana gelmektedir [256]. Dahl SS sıçanların kontrolü olarak kullanılan Dahl tuz dirençli (Dahl SR) sıçanlar yüksek tuz diyetiyle beslendiğinde ise hipertansiyon gelişimi gözlenmemekte ve kronik 20-HETE blokajı kan basıncını düşürmektedir. Ancak bu blokajın Dahl SS sıçanlara ek bir etkisi gözlenmemektedir [228, 234]. Başka bir çalışmada ise, Brown Norway sıçanların kromozom 5'inin (20-HETE oluşumunu sağlayan CYP4A geni bu kromozom üzerinde bulunmaktadır) Dahl SS sıçanlara aktarılması ile oluşturulan konsomik sıçan modelinde yüksek tuz diyetiyle beslenmeye rağmen hipertansiyon gelişiminin ve proteinüri oluşumunun azaldığı gösterilmiştir [257].

Genetik Hipertansiyon Modellerinde 20-HETE

Vasküler endotele özgü CYP4A2'nin ekspresyonunun arttırılması 20-HETE oluşumunun artışına sebep olmakta, bunun sonucunda hipertansiyon gelişimi ve

endotel disfonksiyonu gözlenmektedir. 20-HETE sentezinin inhibisyonuyla ise kan basıncında düşüşün sağlanmasının yanı sıra ACh aracılı vazodilatasyon yanıtında düzelme gözlenmiştir [167, 177].

2.4. Amaç ve Hipotez

Hipertansiyon günümüzde oldukça yaygın ve önemli bir hastalık olup, tedaviye yönelik pek çok uygulama yapılmasına rağmen hala çözülememiş bir problemdir. Özellikle vasküler tonusun düzenlenmesinde 20-HETE'nin etkin bir rolü olduğu bulunduktan sonra, hipertansiyon patogenezinin araştırılmasına dair çalışmalar bu yönde ağırlık kazanmıştır. Pek çok hipertansiyon modelinde 20-HETE'nin rolü araştırılmasına rağmen, NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20-HETE'nin rolü olup olmadığı bilinmemektedir.

Bu çalışmada, Wistar albino sıçanlarda L-NAME ile NOS inhibisyonu hipertansiyon modeli oluşturarak 20-HETE'nin arteryal kan basıncına, iletim (aort) ve direnç tipi (mezenterik arter 3.dal) damarlarda kasılma ve gevşeme yanıtlarına etkisini incelemeyi amaçladık.

Hipotezimiz ise; NO'nun 20-HETE üretiminde baskılayıcı bir ajan olduğu gösterildiği için NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde de 20-HETE'nin katkısının bulunabileceğini, vasküler kasılma yanıtlarında artış ve/veya gevşeme yanıtlarında azalma görülebileceği yönündedir. Ayrıca 20-HETE üretiminin inhibisyonu ile NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde arteriyel kan basıncında düşüş ve vasküler yanıtlarda düzelme beklemekteyiz.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 8 haftalık toplam 60 erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul onayı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Ünitesinden temin edildi. Temin edilen sıçanlar, $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ olan ve 12 saat gün ışığı - 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutulup, kısıtlama olmaksızın (ad libitum) ticari sıçan yemi tüketimine bırakıldılar. Deney prosedürüne alınmadan önce bir haftalık alışma periyoduna bırakılan hayvanların bu süre zarfında kan basınçları da ölçülerek normotansif olduklarından emin olundu. Tüm sıçanlar feda edilene kadar iki günde bir su tüketimleri ve haftada bir ağırlık ölçümleri yapıldı. Çalışma aşağıda anlatıldığı gibi iki ayrı deney şeklinde planlandı.

3.1. İn vitro çalışma

Gruplandırma: Bu çalışmanın amacı, deneysel NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20-HETE'nin damar kasılma ve gevşeme yanıtına katkısını in vitro koşullarda incelemektir. Alınan hayvanlar rastgele olarak Kontrol (K, n=10) ve Hipertansiyon (H, n=10) olmak üzere iki gruba ayrıldı.

3.1.1. Hipertansiyon Oluşturulması

Deneysel nitrik oksit sentaz inhibisyonu hipertansiyon modelini oluşturmak için hipertansiyon gruplarındaki hayvanların içme sularına spesifik olmayan bir NOS inhibitörü olan N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), 25 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ dozunda ve beş hafta boyunca ilave edildi. Hayvanların amaçlanan dozu alabilmesi için günlük su tüketimi belirlendi ve haftalık kilo takibi yapıldı. L-NAME'in aktivitesini yitirmemesi için ise kafeslerin suları iki günde bir tazelandı. Ayrıca L-NAME'li sular değiştirilirken suluklarda artan sular tekrar kullanılmadı.

3.1.2. Kan Basıncı Ölçülmesi

Hayvanların bazal ve deney sonundaki ortalama arteriyel kan basınçları, invaziv olmayan tail-cuff yöntemiyle kuyruk arterlerinden ölçüldü. Kuyruğa takılan halka şeklindeki basınç probuyla alınan sinyaller MP 150 veri toplama sistemi (BİOPAC Systems, CA-USA) ve MAY-BPHR 9610-PC (Commat Ltd, Ankara) ünitesi aracılığıyla bilgisayara aktarıldı. Kan basıncı ölçümleri, Acknowledge programıyla çizdirilen traseler üzerinden yapıldı. Her bir ölçüm sırasında en az 5 trase kaydı yapıldı ve peş peşe gelen traselerin ortalama değeri kullanıldı.

İnvaziv olmayan tail-cuff yöntemi, insanda kol arterinden kan basıncı ölçme yöntemiyle aynı prensibe dayanmaktadır. Kısaca bahsedecek olursak; kuyruk arterinden geçen kan akımının kesilmesi amacıyla havayla şişirilen halka şeklinde bir manşet (cuff) kullanıldı. Belli bir basınç sağlayan manşet şişirilip kan akımı kesildikten sonra, otomatik olarak yavaşça söndürülmesiyle kan akımı tekrar başladı.

Kan tekrar başladığı kısımdaki değer sistolik, manşet basıncının kan akımıyla eşitlendiği kısımdaki değer ise diyastolik kan basıncı değerini verdi. Ortalama kan basıncı değeri de, sistolik ve diyastolik basınçların ortalamasıydı.

Kuyruk arterlerinden pulsasyonların daha kolay algılanması için hayvanlar her kan basıncı ölçümünde 30 cm yüksekte bulunan 150 watt'lık kızılötesi ışınli lamba ile ısıtıldı ve arterlerin genişlemesi sağlandı. Kan basıncı ölçümleri oda sıcaklığında yapıldı.

3.1.3. Deneyin Sonlandırılması ve Damar İzolasyonu

Tüm deney gruplarındaki sıçanlar, 5 haftalık deney süresinin sonunda intra-peritoneal tiyopental sodyum (80 mg.kg^{-1}) anestezisi ile uyutulup, abdomenleri hızlı açıldıktan sonra abdominal aortaları kesilerek kansızlaştırma yoluyla feda edildi. Hızlı bir şekilde göğüs kafesi açılarak torasik aorta diğer dokulardan ayrılıp çıkarıldı. Ardından yine hızlı bir şekilde mezenter yatak, içeriğinin dışarı çıkmaması için düğümlenip çıkarıldı. Bu iki doku çıkarılır çıkarılmaz, buz üzerinde bekletilen içerisinde Krebs solüsyonu (110mM NaCl , 5mM KCl , 24mM NaHCO_3 , $1\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, $1\text{mM MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2,5\text{mM CaCl}_2$, 10mM glukoz, $0,02\text{mM EDTA}$; $\text{pH}=7.4$) bulunan beherlere alındı. Dokular soğuk Krebs ile yıkandıktan sonra diseksiyon aşamasına geçildi.

Mikrodiseksiyon aşaması için dokular, soğuk Krebs içeren petrilere alındıktan sonra ortama sabitlendi. Diseksiyon mikroskobu kullanılarak (OLYMPUS – SZ61) uygun büyütme derecesinde (arter ve ven ayrımı yapıldıktan sonra), arterlerden yağ ve bağ dokudan uzaklaştırıldı ve torasik aort ile mezenter damar yatağının 3. dalı izole edildi. Torasik aort, uygun uzunlukta halkalara ayrılıp çalışılmak üzere organ banyosuna alınırken; mezenter arter 3.dal ise uygun uzunluklarda telli miyografa alındı.

3.1.4. İzole Damarların Asılması ve Vitalizasyon Aşamaları

İzole edilen torasik aort 2 – 2,5 mm uzunluğunda halkalara ayrıldıktan sonra; %95 O_2 - %5 CO_2 içeren gaz karışımı ile gazlandırılmış, sıcaklığı 37°C ve $\text{pH}=7.4$ olan 10 ml krebs solüsyonu bulunan organ banyosuna alındı. Damar halkaları, çelik tellere asılarak gergin bir ip aracılığı ile izometrik transdusere (FDT 1 A – 10 MAY) bağlandıktan sonra, 1 gram istirahat gerimi altında her 15 dakikada bir yıkanarak toplam 60 dakika boyunca dinlendirildi. Her yıkamadan sonra eğer gerim değişmişse, tekrar 1 gram gerime getirilmesine dikkat edildi.

İzole edilen direnç damarı olan mezenter arter 3. dalı 2 mm uzunluğunda parçalara ayrıldıktan sonra; sıcaklığı 37°C $\text{pH}=7.4$ olan ve 5 ml Krebs solüsyonu içeren miyograf düzeneğine (Model 620M, Danish Myo Technology, Aarhus N, Danimarka) alındı. 25 mikrometre çapındaki tungsten telin bir ucu düzeneğe vidalandıktan sonra, telin diğer ucundan iki ince uçlu forseps yardımıyla mezenter arterler geçirildi. Telin damar lümeninden geçirildiği esnada, damarın endotel tabakası zarar görmemesine dikkat edildi. Ardından telin serbest kalan ucu da diğer kısma vidalandıktan sonra, ikinci tel birinci tele paralel olacak şekilde yine damarın kas ve endotel tabakasına hasar vermemeye dikkat ederek damarın içinden geçirildi ve ikinci tel düzeneğin transduser tarafına vidalandı. Düzeneğin hazırlanması tamamlandıktan sonra her bir banyodaki 5 ml krebs solüsyonu, %95 O_2 - %5 CO_2

içeren gaz karışımı ile gazlandırılıp sıcaklığı 37°C ve pH=7.4'te tutulmaya devam edildi.

Telli miyograf düzeneğindeki damarların istirahat gerimi olan bazal duvar gerimini bulmadan önce, damarlar 15 dakikalık dinlenme periyoduna bırakıldı. 15 dakikanın ardından, mikroskop yardımıyla mikrometrik ölçüm skalası kullanılarak her bir damarın boyu ölçüldü ve iki tel arasında belirli dış damar çapı değerleri de hesaba katılarak damar duvarının oluşturduğu gerim saptanıp bilgisayar yazılımı yardımı ile (LabChart Pro V7, Adinstruments, Bella Vista, Avustralya) çap – gerim grafiği çizdirildi. Bazal damar gerimini belirlemek için, in vivo şartlarda 90 mmHg kan basıncı değerinde oluşan gerim otomatik olarak hesaplandı. Bulunan gerime ayarlanan direnç damarları, bazal gerimleri altında her 15 dakikada bir yıkanarak toplam 60 dakika boyunca dinlendirildi.

Bir saatlik istirahat geriminin (dinlenme periyodunun) ardından damarlara ön-uyarılma safhası olan vitalizasyon aşaması uygulandı. Bu işlem için 20 mM Potasyum Klorür (KCl) içeren Krebs solüsyonunu uyguladıktan sonra 10^{-7} M konsantrasyonunda Phe [(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Sigma P6126, St. Louis, USA] ilavesi yapıldı. Aort halkalarını içeren organ banyosuna 10 ml 20 mM KCl içeren Krebs konulduktan sonra, banyoda 10^{-7} M olacak şekilde Phe ilavesi yapılırken; telli miyograf sistemine 5 ml 20 mM KCl içeren Krebs eklenip, aynı şekilde 10^{-7} konsantrasyonda olacak şekilde Phe ilavesi yapıldı. Bu işlem 3 kere art arda tekrarlandı. Vitalizasyon işleminden sonra damarlar Krebs solüsyonu ile yıkanıp, 15 dakikada bir solüsyonun yenilenmesi şartıyla 30 dakikalık ek dinlenme periyoduna geçildi.

Dinlenme periyodunun ardından damar lümeninin iç yüzünü döşeyen endotel tabakasının sağlıklı olup olmadığını araştırmak için ise; banyolara 10^{-6} M konsantrasyonunda Phe ilave edildikten sonra yine 10^{-6} M konsantrasyonunda ACh (Acetylcholine chloride, Sigma A6625, St. Louis, USA) ilavesi yapılarak, gevşeme cevabının yüzde olarak değeri hesaplandı. %60 ve üzeri gevşeme cevabı veren damarlar endotelli olarak kabul edilip, %60'ın altındakiler deney protokolünden çıkarıldı.

Deney protokolüne alınacak olan damarlar belirlendikten sonra damarların kasılma ve gevşeme yanıtları aşağıdaki protokollerle incelendi.

3.1.4.1. Deney Protokolü

KCl aracılı kasılma yanıtı protokolü: Her iki sistemin de haznelerine 20, 40 ve 80 mM KCl eklenip damarların verdiği kasılma yanıtları bazal koşullarda elde edildi.

HET0016 varlığında KCl aracılı kasılma yanıtı protokolü: KCl aracılı kasılma yanıtları, damarların 30 dakika boyunca banyolarda 1 μ M HET0016 varlığında inkübe edilmesinden sonra tekrarlandı. Ayrıca KCl'li krebsler eklendiği sırada banyo sıvılarında 1 μ M HET0016 bulunmaktaydı.

Fenilefrin (Phe) aracılı kasılma yanıtı protokolü: Her iki sistemin banyo sıvılarına artan dozlarda Phe kümülatif olarak ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M) eklenip bazal koşullarda kasılma yanıtı elde edildi.

HET0016 varlığında Phe aracılı kasılma yanıtı protokolü: Phe aracılı kasılma yanıtları damarların 30 dakika boyunca 1 μ M HET0016 varlığında inkübe edilmesinden sonra tekrarlandı. Kümülatif olarak artan dozlarda Phe eklenmesi aşamasında da banyo sıvılarında 1 μ M HET0016 bulunmaktaydı.

Asetilkolin (ACh) aracılı gevşeme yanıtı (endotel bağımlı gevşeme) protokolü: Her iki sistemde damarların submaksimal dozda Phe ile kasılmayı takiben kümülatif olarak ACh dozlarına ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M) verilen gevşeme cevapları kaydedilerek bazal koşullarda gevşeme yanıtları elde edildi.

HET0016 varlığında Asetilkolin (ACh) aracılı gevşeme yanıtı (endotel bağımlı gevşeme) protokolü: ACh aracılı gevşeme yanıtları damarların 30 dakika boyunca 1 μ M HET0016 varlığında inkübe edilmesinden sonra tekrarlandı. Protokol aşamasında yine banyo sıvılarında 1 μ M HET0016 bulunmaktaydı.

Sodyumnitroprussid (SNP) aracılı gevşeme yanıtı (endotel bağımsız gevşeme) protokolü: Her iki sistemde damarların submaksimal dozda Phe ile kasılmayı takiben kümülatif olarak SNP (Sodium nitroprusside dihydrate, Merck 106541, Darmstadt, Germany) dozlarına ($10^{-10} - 3 \times 10^{-5}$ M) verilen gevşeme cevapları kaydedilerek bazal koşullarda gevşeme yanıtları elde edildi.

HET0016 varlığında Sodyumnitroprussid (SNP) aracılı gevşeme yanıtı (endotel bağımsız gevşeme) protokolü: SNP aracılı gevşeme yanıtları damarların 30 dakika boyunca 1 μ M HET0016 varlığında inkübe edilmesinden sonra tekrarlandı. Protokol aşamasında banyo sıvılarında 1 μ M HET0016 bulunmaktaydı.

20-HETE doz yanıt eğrisi: 20-HETE'ye kasılma yanıtlarının etkilenip etkilenmediğinin incelenmesi amacıyla ekzojen 20-HETE kullanıldı. Bu amaç için banyo sıvısına 20-HETE ($10^{-9} - 10^{-6}$ M) eklenmesiyle 20-HETE doz yanıt eğrisinin alınması amaçlandı. Ancak her iki grupta damarların 20-HETE'ye kasılma yanıtlarının oluşmaması nedeniyle "Bulgular" bölümünde 20-HETE yanıtlarına yer verilmedi.

Her bir protokolden sonra damarlar 3 kere normal Krebs ile yıkandı. Tüm ardışık protokoller arasında ise en az 30 dakikalık dinlenme süresi uygulandı.

3.2. Tedavi çalışması

Gruplandırma: Bu çalışmanın amacı, deneysel NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20-HETE'nin in vivo inhibisyonunun damar kasılma ve gevşeme yanıtlarına katkısını incelemektir. Alınan hayvanlar rastgele olarak 4 gruba ayrıldılar:

- 1.Kontrol grubu (K; n=10)
- 2.Hipertansiyon grubu (H; n=10)

- 3.Kontrol + Tedavi grubu (HET; n=10)
- 4.Hipertansiyon + Tedavi grubu (H + HET; n=10)

3.2.1. Hipertansiyon Oluşturulması

Deneyssel nitrik oksit sentaz inhibisyonu hipertansiyon modeli hipertansiyon gruplarındaki hayvanların içme sularına yukarıda tarif edildiği gibi 25 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ dozunda L-NAME'in beş hafta boyunca ilave edilmesiyle oluşturuldu.

3.2.2. Tedavi Uygulaması

NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20 HETE'nin katkısını göstermek için tedavi gruplarındaki hayvanlara 20-HETE üretiminin inhibisyonu amacıyla CYP4A ve 4F enzimleri için spesifik bir inhibitör olan N-Hydroxy-N'-(4-butly-2-methylphenyl)-formamidine (HET0016) uygulandı. Tedavi gruplarındaki hayvanlara ilk 3 hafta boyunca tek başına L-NAME, ardından 2 hafta süresince 10 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ dozunda HET0016 tedavisi L-NAME ile birlikte uygulandı. HET0016, her bir hayvana 2 ml.kg⁻¹.gün⁻¹ dozunda lesitin içerisinde çözülerek intra-peritoneal olarak verildi. Lesitin (L-alpha-phosphatidylcholine) ise, %10'luk olarak salin (%0,9 NaCl/distile su) içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.2.3. Vehicle Uygulaması

Vecihle uygulamasının ölçülecek olan parametrelere olası etkisi olup olmadığı bir ön çalışma ile değerlendirildi. Bu amaçla 5 adet kontrol, 5 adet vehicle alan kontrol olmak üzere toplam 10 adet sıçan kullanıldı. Vehicle gruplarına HET0016 çözücüsü olarak kullanılan lesitin yukarıda tanımlandığı şekilde hazırlanarak, 2 ml.kg⁻¹.gün⁻¹ dozunda intra-peritoneal olarak ve HET0016 tedavisi ile uygun olacak şekilde 2 hafta boyunca uygulandı.

Vehicle tedavisinin başlangıcında ve sonunda hayvanların kan basıncı kuyruktan ölçme yöntemi ile değerlendirildi. Daha sonra feda edilen hayvanların aort ve mezenter arter 3 dallarının KCl, Phe, ACh, SNP aracılı kasılma/gevşeme yanıtları değerlendirildi. Protokollerin detayları aşağıda verilmiştir.

3.2.4. Kan Basıncı Ölçülmesi

Hayvanların ortalama arteriyel kan basınçları, invaziv olmayan tail-cuff yöntemiyle yukarıda tarif edildiği gibi kuyruk arterlerinden haftalık olarak ölçüldü.

3.2.5. Deneyin Sonlandırılması ve Damar İzolasyonu

Deney sürecinin bitiminde yukarıda tarif edildiği şekilde deney hayvanları anestezi altında kansızlaştırma yoluyla feda edilerek torasik aorta ve mezenter arterin 3. dalı izole edildi.

3.2.6. İzole Damarların Asılması ve Vitalizasyon Aşamaları

Aortik halkalar organ banyosuna, mezenter arterin 3. dalı ise telli miyograf sistemine yukarıda tarif edildiği üzere uygun şekilde asılarak, dinlenim ve vitalizasyon aşamalarına geçildi. Endotel sağlamlığı test edildikten sonra deney protokolüne alınacak olan damarlar belirlenerek damarların kasılma ve gevşeme yanıtları aşağıdaki protokollerle incelendi.

3.2.6.1. Deney Protokolü

KCl aracılı kasılma yanıtı protokolü: Her iki sistemin de haznelere 20, 40 ve 80 mM KCl eklenip damarların verdiği kasılma yanıtları bazal koşullarda elde edildi.

Fenilefrin (Phe) aracılı kasılma yanıtı protokolü: Her iki sistemin banyo sıvılarına artan dozlarda Phe kümülatif olarak ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M) eklenip bazal koşullarda kasılma yanıtı elde edildi.

Asetilkolin (ACh) aracılı gevşeme yanıtı (endotel bağımlı gevşeme) protokolü: Damarların submaksimal dozda Phe ile kasılmayı takiben kümülatif olarak ACh dozlarına ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M) verilen gevşeme cevapları kaydedilerek bazal koşullarda gevşeme yanıtları elde edildi.

Sodyumnitroprussid (SNP) aracılı gevşeme yanıtı (endotel bağımsız gevşeme) protokolü: Damarların submaksimal dozda Phe ile kasılmayı takiben kümülatif olarak SNP dozlarına ($10^{-10} - 3 \times 10^{-5}$ M) verilen gevşeme cevapları kaydedilerek bazal koşullarda gevşeme yanıtları elde edildi.

Her bir protokolden sonra damarlar 3 kere normal Krebs ile yıkandı. Tüm ardışık protokoller arasında ise en az 30 dakikalık dinlenme süresi uygulandı.

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. Ardışık ölçümlerle elde edilen farklı ajan dozlarındaki kasılma/gevşeme cevaplarının ve haftalık kan basıncı ölçümlerinin değerlendirilmesinde tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi (repeated measures ANOVA) ve post hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. Dört grubun Emax (ajana karşı verilen maksimum yanıt) değerleri, vücut ağırlığı ve su tüketimlerinin kıyaslanmasında tek yönlü varyans analizi ve ardından gruplar arası farkın değerlendirilmesinde post hoc test olarak Tukey testi uygulandı. İkili grupların kıyaslanması ise Student-t testi ile gerçekleştirildi. P'nin 0.05 ve altı değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Çalışma I: İn vitro çalışma

Deneye alınma sırasında 240-270 g vücut ağırlığına sahip olan hayvanlar gruplara homojen olarak dağıtıldı. K ve H gruplarının bazal ortalama kan basıncı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (89.62 ± 2.93 vs. 97.34 ± 3.56).

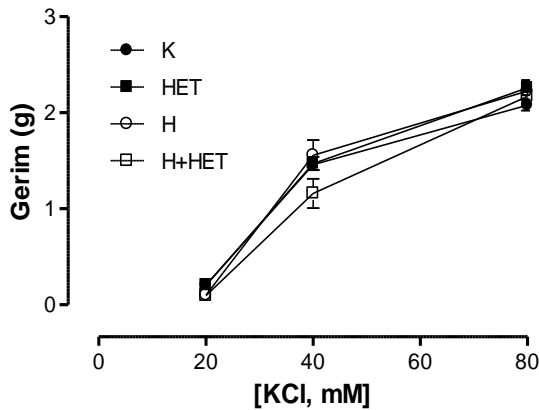
Grupların deneyin sonunda feda edilmeden hemen önce ölçülen vücut ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ayrıca H grubunun 5 hafta boyunca L-NAME'i uygun dozda almasını sağlamak amacıyla, hayvanların günlük içme suyu miktarları takip edildi. Su tüketimleri yönünden gruplar arasında fark saptanmadı. Hayvanlar feda edilmeden hemen önce ölçülen K ve H gruplarının ortalama kan basıncı değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark gösterildi. ($p < 0,001$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. İn vitro çalışma K ve H grupları vücut ağırlığı, su tüketimi ve ortalama arteriyel kan basıncı değerleri

Protokol	K	H
Vücut Ağırlığı (g)	287.30 ± 6.84	283.64 ± 7.83
Su Tüketimi (ml/gün)	36.51 ± 2.05	38.26 ± 2.81
Ortalama Arteriyel Kan Basıncı (mmHg)	92.10 ± 5.04	$157.55 \pm 3.13^{***}$

4.1.1. Aort yanıtları

KCl protokolü: 20, 40 ve 80 mM konsantrasyonlardaki KCl doz yanıt eğrileri ve maksimum kasılma yanıtları (E_{max}) tüm gruplarda birbirine benzer bulundu. (Şekil 4.1, Tablo 4.2).

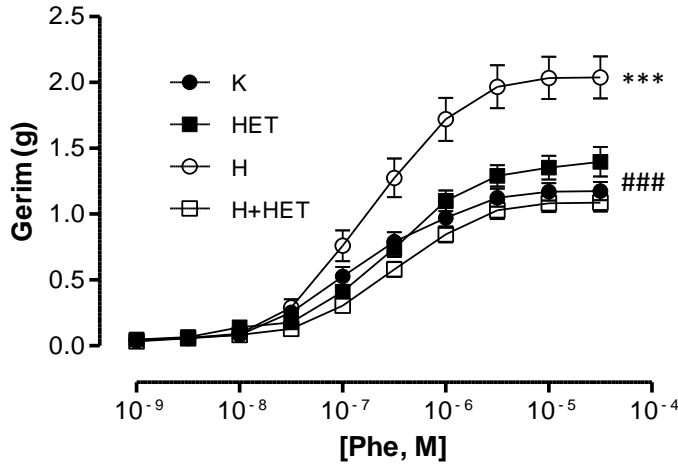


Şekil 4.1. Aort KCl aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.2.Aort KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
KCl (g)	2.08±0.06	2.26±0.08	2.23±0.09	2.17±0.15

Phe protokolü: Artan dozda Phe (10^{-9} – 3×10^{-5}) ile elde edilen doz-yanıt eğrileri ve Emax değerleri Şekil 4.2 ve Tablo 4.3'te gösterilmiştir. H grubunun kasılma yanıtlarının K grubuna kıyasla önemli olarak arttığı görüldü ($p < 0.001$). HET0016 inkübasyonu ile 20-HETE oluşumunun inhibe edilmesi K grupları arasında bir fark yaratmazken, H+HET grubunda saptanan kasılma doz-yanıtları H grubununkine kıyasla önemli düzeyde baskılandı ($p < 0.001$). Ayrıca Phe'ye verilen Emax yanıtları açısından da doz yanıt eğrilerine benzer şekilde H grubunda K grubuna kıyasla önemli artış, H+HET grubunda ise H grubuna kıyasla önemli azalma izlendi ($p < 0.001$).



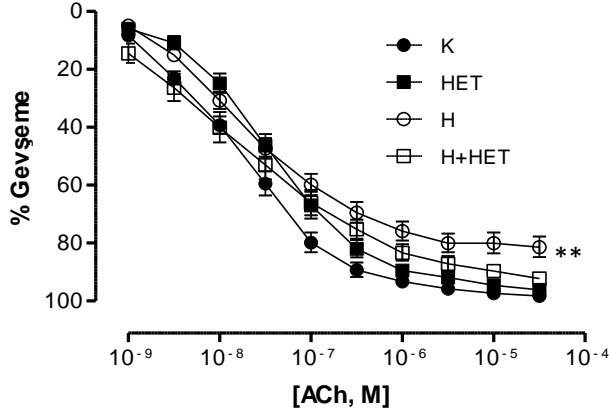
Şekil 4.2. Aort Phe aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.3. Aort Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
Phe (g)	1.18 ±0.07	1.40±0.11	2.04±0.16***	1.09±0.07###

ACh protokolü: ACh (10^{-9} – 3×10^{-5}) ile elde edilen doz-yanıt eğrileri ve Emax değerleri Şekil 4.3 ve Tablo 4.4'te izlenmektedir. H grubunda K grubuna göre ACh doz-yanıt eğrisinde vazodilatasyonda istatistiksel olarak önemli azalma saptandı ($p < 0.01$), ancak organ banyosuna HET0016 eklenmesi ile H+HET grubunda H grubuna kıyasla gevşeme artışı saptanmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bir

değişiklik yaratmadı. Bununla birlikte grupların Emax değerleri incelendiğinde H grubunda K grubuna göre izlenen azalma yanıtı ($p<0.001$), H+HET grubunda H grubuna kıyasla önemli derecede düzelme gösterdi ($p<0.01$).

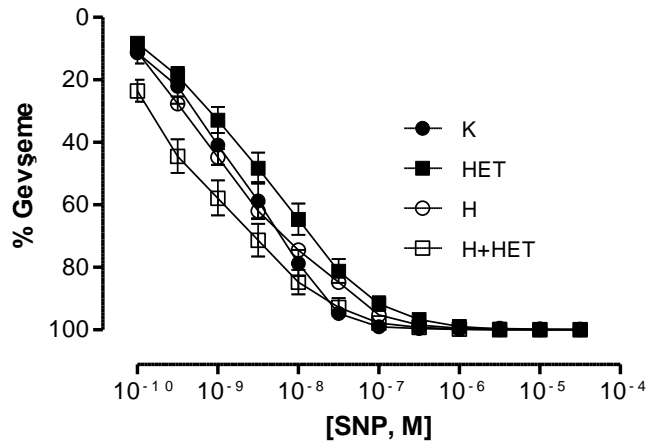


Şekil 4.3. Aort ACh aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.4. Aort ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
ACh (%)	98.26±0.64	96.18±0.94	81.40±3.56***	92.28±1.98##

SNP protokolü: Aortik halkaların SNP'ye (10^{-10} – 3×10^{-5} M) verdikleri gevşeme yanıtları hem doz-yanıt eğrileri hem de Emax değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark göstermedi (Şekil 4.4, Tablo 4.5).



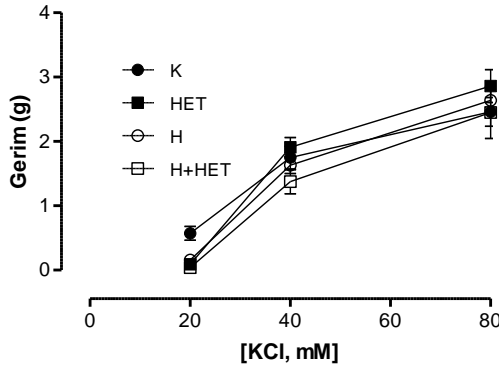
Şekil 4.4. Aort SNP aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.5. Aort SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
SNP (%)	100.0±0.0	100.0±0.0	99.9±0,09	100.0± 0.0

4.1.2. Mezenter direnç arteri yanıtları

KCl protokolü: Mezenter arterin üçüncü dalının KCl'nin artan dozlarına verdikleri doz yanıt eğrileri ve Emax değerleri açısından gruplar arasında fark bulunmadı (Şekil 4.5, Tablo 4.6).

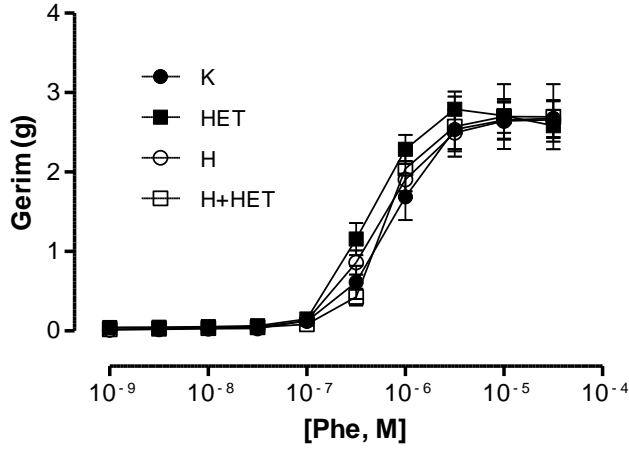


Şekil 4.5. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.6. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
KCl (g)	2.46± 0.22	2.86±0.26	2.64±0.21	2.45±0.40

Phe protokolü: Benzer şekilde grupların Phe'ne verdikleri kasılma yanıtları da gruplar arasında farklılık göstermedi (Şekil 4.6, Tablo 4.7).

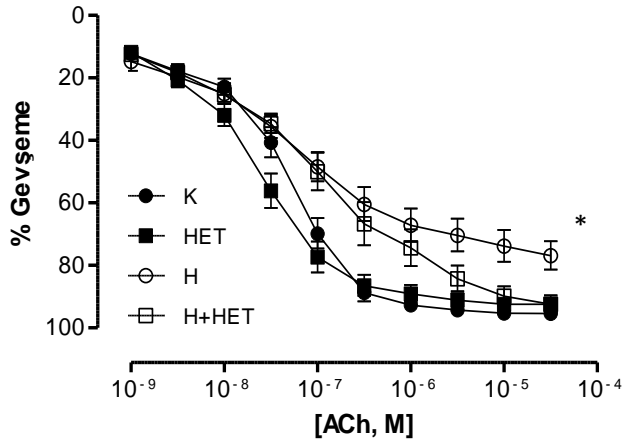


Şekil 4.6. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.7. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
Phe (g)	2.68 ±0.23	2.58±0.20	2.66±0.23	2.69±0.41

ACh protokolü: ACh'ne verilen gevşeme yanıtları incelendiğinde H grubunda K grubuna kıyasla hem doz-yanıt eğrilerinde hem de Emax değerlerinde istatistiksel olarak önemli derecede azalma saptandı (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). Ancak HET0016 inkübasyonu sonucu K grubu yanıtlarında bir değişiklik yokken H grubunun gevşeme doz-yanıt eğrilerinde istatistiksel olarak önemli olmayan, Emax yanıtında ise istatistiksel olarak önemli artış ($p<0.05$) saptandı (Şekil 4.7, Tablo 4.8).

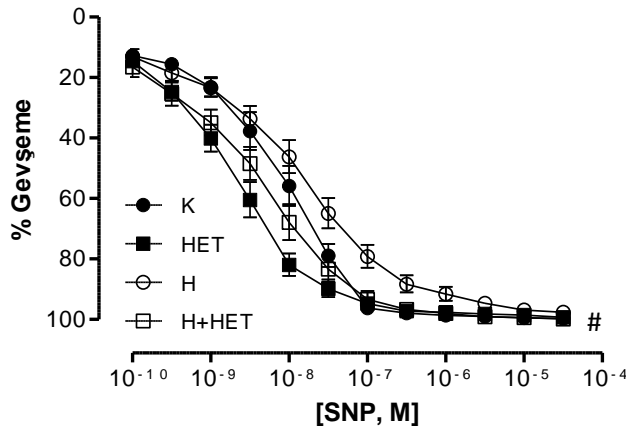


Şekil 4.7. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.8. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
ACh (%)	95.45±1.58	92.5±1.98	76.91±4.56**	92.43±2.71#

SNP protokolü: Grupların SNP aracılı gevşeme yanıtları Şekil 4.8 ve Tablo 4.9’da izlenmektedir. H grubunun SNP aracılı doz-yanıt eğrisi ve Emax değeri K grubununkine benzer bulundu. Bununla birlikte H+HET grubunun SNP’ye cevaben oluşturduğu gevşeme yanıtları hem doz-yanıt eğrilerinde hem de Emax cevaplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa neden oldu ($p<0.05$).



Şekil 4.8. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.9. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

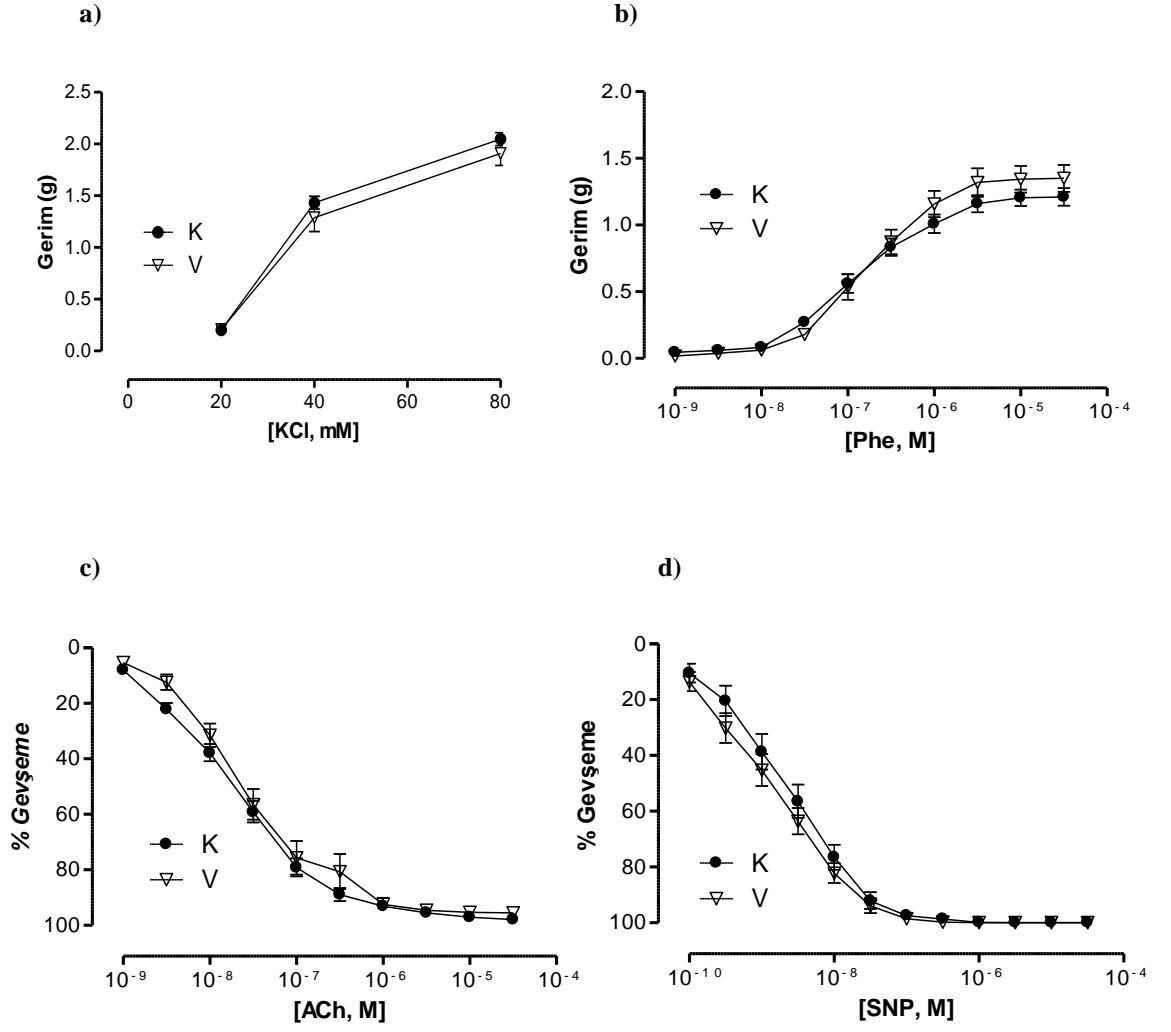
Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
SNP (%)	99.67±0.24	99.32±0.33	98.02±0.68	99.83± 0.15#

4.2. Çalışma II: Tedavi çalışması

❖ Vehicle çalışması

Kontrol grubuna uygulanan vehicle çalışmasında 2 hafta boyunca %10’luk lesitin uygulamasının ortalama kan basıncını etkilemediği gösterildi (K, 89.83 ± 5.04 vs. K-vehicle, 92.46 ± 3.06). K ve K-vehicle gruplarının kasılma ve gevşeme doz yanıt eğrileri ile Emax değerleri, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 ile Tablo 4.10 ve Tablo 4.11 ‘de incelenmektedir. Vehicle uygulamasının K grubu ortalama kan basıncı değerinin yanı sıra kasılma ve gevşeme yanıtları ile Emax değerlerini de etkilememesi nedeniyle vehicle çalışma grupları deney protokolünden çıkarıldı.

Aort yanıtları

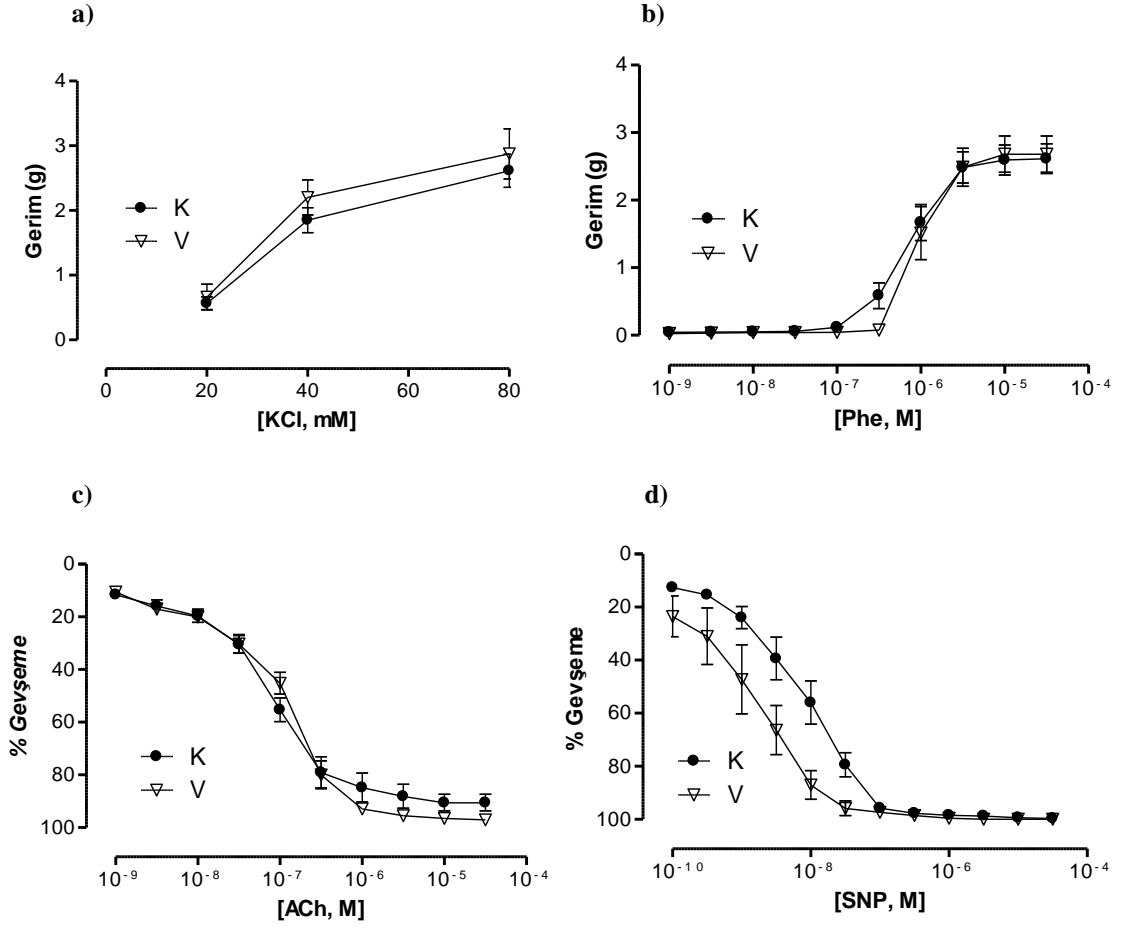


Şekil 4.9. Aortik halkaların a) KCl ve b) Phe aracılı kasılma, c) ACh ve d) SNP aracılı gevşeme doz yanıt eğrileri

Tablo 4.10. Aortik halkaların maksimum (Emax) yanıtları

Protokol	Emax	
	K	V
KCl (g)	2.05±0.06	1.91±0.12
Phe (g)	1.21±0.07	1.35±0.10
ACh (%)	97.91±0.91	95.48±1.70
SNP (%)	99.99±0.01	100.00±0.00

Mezenter yanıtları



Şekil 4.10. Mezenter arter 3. dal a) KCl ve b) Phe aracılı kasılma, c) ACh ve d) SNP aracılı gevşeme doz yanıt eğrileri

Tablo 4.11. Mezenter arter 3. dal maksimum (Emax) yanıtları

Protokol	Emax	
	K	V
KCl (g)	2.61±0.26	2.87±0.39
Phe (g)	2.61±0.22	2.68±0.27
ACh (%)	90.60±3.12	97.11±0.81
SNP (%)	99.66±0.31	100.00±0.00

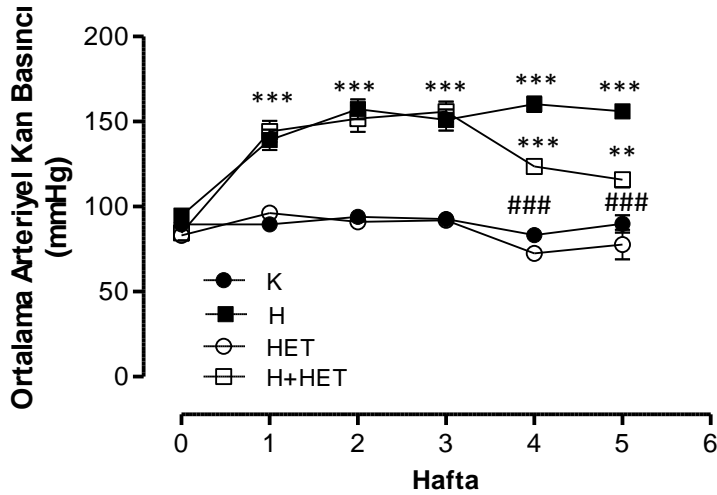
Deneye alınma sırasında 210-260 g vücut ağırlığına sahip olan hayvanlar homojen olarak gruplara ayrıldıktan sonra, vücut ağırlıkları arası fark bulunmamıştır. Grupların deneyin sonunda feda edilmeden hemen önce ölçülen vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir (Tablo 4.12).

L-NAME alan grupların 5 hafta boyunca ilacı dozunda almalarını sağlamak amacıyla, hayvanların günlük içme suyu miktarları takip edildi. Su tüketimleri yönünden gruplar arasında fark saptanmadı (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Tedavi çalışması K, HET, H ve H+HET grupları vücut ağırlığı ve su tüketim değerleri

	K	HET	H	H+HET
Vücut Ağırlığı(g)	280.75±6.56	253.40±16.64	279.42±8.30	245.00±13.01
Su Tüketimi (ml/gün)	33.76±2.44	37.33±2.56	41.29±3.89	36.17±3.74

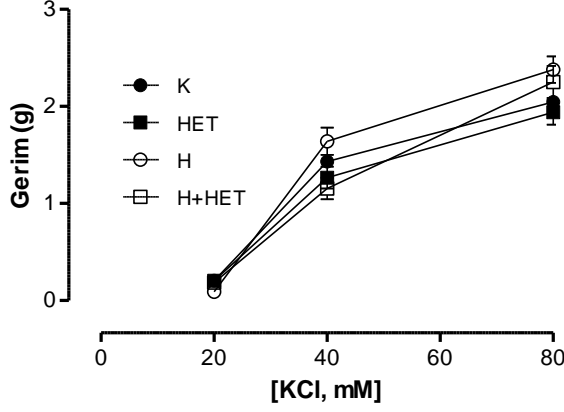
5 haftalık deney süresi boyunca ölçülen haftalık ortalama arteriyel kan basıncı değerleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Grupların bazal kan basıncı düzeyleri arasında fark bulunmazken, H grubunda L-NAME tedavisinin ardından 1. haftadan itibaren kan basıncı düzeyleri deney sonuna kadar K ve HET grubuna kıyasla önemli düzeyde artış gösterdi ($p<0.001$). H+HET grubunun kan basıncı değerleri ise K ve HET grubuna kıyasla deney süresince yüksek seyretti ($p<0,001$, $p<0.01$) ancak 3. haftanın sonunda başlanan tedavinin ardından 4 ve 5. haftalarda H grubuna kıyasla önemli olarak azaldı ($p<0,001$).



Şekil 4.11. Tedavi çalışması ortalama arteriyel kan basıncı-hafta grafiği

4.2.1. Aort yanıtları

KCl protokolü: Artan konsantrasyonlarda KCl'ye cevaben oluşan aort kasılma yanıtları gruplar arasında farklılık göstermedi (Şekil 4.12, Tablo 4.13).

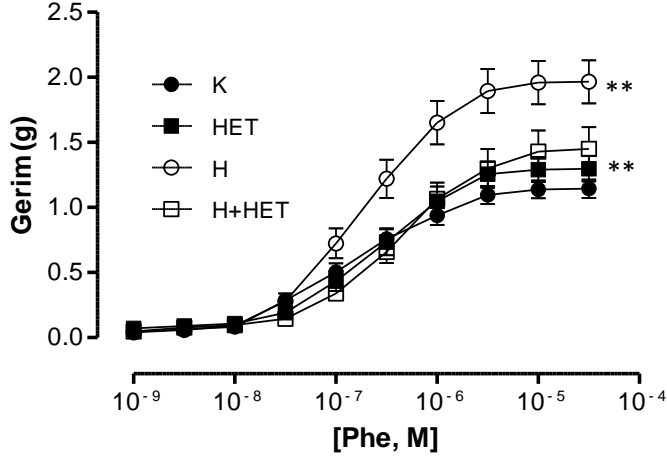


Şekil 4.12. Aort KCl aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.13. Aort KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
KCl (g)	2.05±0.06	1.94±0.13	2.38±0.14	2.25±0.17

Phe protokolü: Artan dozda Phe (10^{-9} – 3×10^{-5}) ile elde edilen kasılma doz-yanıt eğrileri ve Emax değerleri Şekil 4.13 ve Tablo 4.14'te izlenmektedir. Tedavi uygulanmayan hipertansif sıçanların Phe'ne cevaben oluşturdukları doz yanıt eğrileri K grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksekti ($p < 0.01$). HET tedavisi hipertansif hayvanlarda artmış Phe doz-yanıt eğrisinde düzelmeye neden olurken ($p < 0.01$) normotansif sıçanlarda herhangi bir etki yaratmadı. Aortik halkaların Emax değerleri kıyaslandığında da doz-yanıt eğrilerine benzer şekilde H grubunda K grubuna kıyasla kasılma yanıtında artış ($p < 0.001$), H+HET grubunda ise H grubuna kıyasla azalma saptandı ($p < 0.05$).

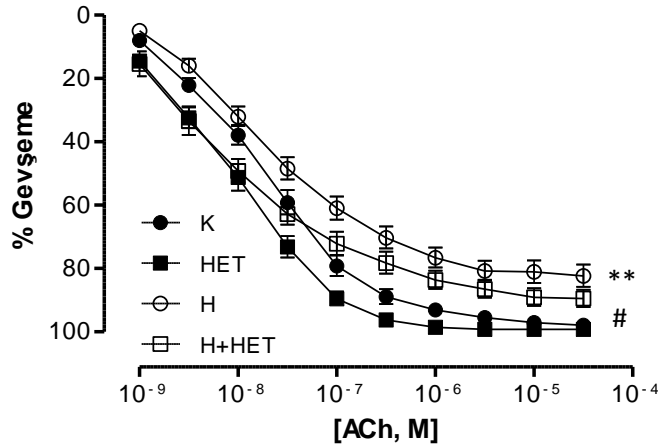


Şekil 4.13. Aort Phe aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.14. Aort Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
Phe (g)	1.14 ±0.07	1.30±0.01	1.97±0.17***	1.45±0.17#

ACh protokolü: ACh (10^{-9} – 3×10^{-5}) ile elde edilen gevşeme doz-yanıt eğrileri ve Emax değerleri Şekil 4.14 ve Tablo 4.15'te gösterilmiştir. ACh ile elde edilen doz yanıt eğrileri incelendiğinde H grubunda K grubuna kıyasla önemli olarak azalma olduğu görülürken ($p < 0,01$), HET0016 tedavisi alan hipertansif sıçanlarda almayanlara kıyasla ACh ile gevşeme yanıtında artış olduğu saptandı ($p < 0,05$). Emax değerlerinde ise yalnızca H grubunda K grubuna kıyasla önemli azalma saptandı ($p < 0,001$).

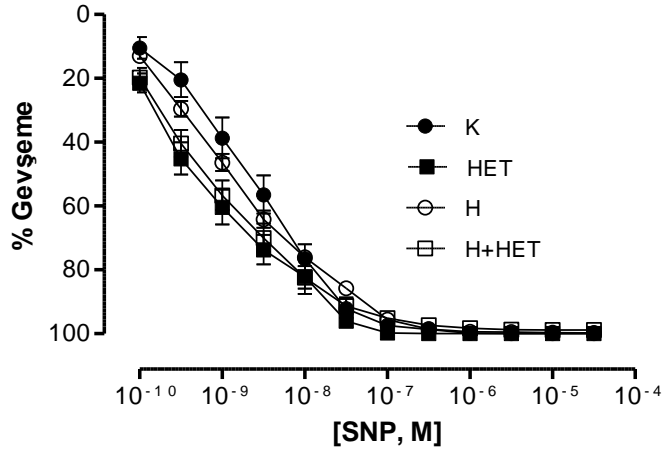


Şekil 4.14. Aort ACh aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.15. Aort ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
ACh (%)	97.91±0.91	99.26±0.63	82.38±3.51***	89.52±2.74

SNP protokolü: Aortik halkaların SNP'ye (10^{-10} – 3×10^{-5} M) verdikleri gevşeme yanıtları gruplar arasında farklılık göstermedi (Şekil 4.15, Tablo 4.16).



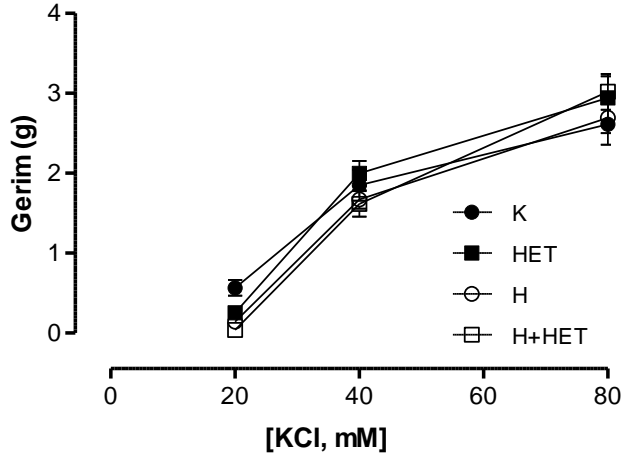
Şekil 4.15. Aort SNP aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.16. Aort SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
SNP (%)	99.99±0.01	100.00±0.00	99.74±0.16	98.83± 0.48

4.2.2. Mezenter direnç arteri yanıtları

KCl protokolü: Mezenter arter 3. dalının artan konsantrasyonlardaki KCl doz yanıt eğrileri ve maksimum kasılma yanıtları (Emax) tüm gruplarda birbirine benzer bulundu (Şekil 4.16 ve Tablo 4.17).

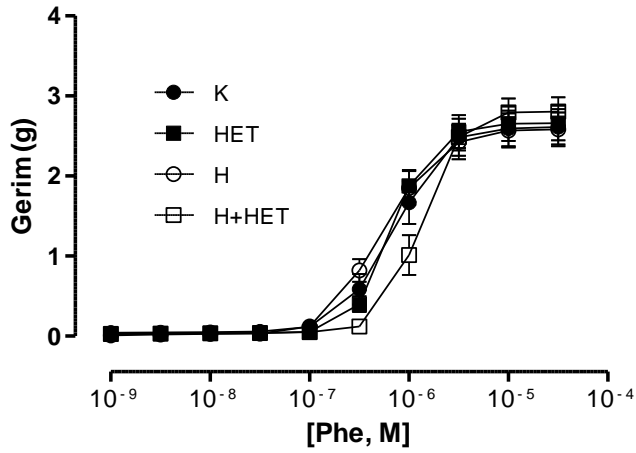


Şekil 4.16. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.17. Mezenter arter 3. dal KCl aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
KCl (g)	2.61± 0.26	2.94±0.27	2.70±0.20	3.02±0.22

Phe protokolü: Benzer şekilde grupların Phe'ne verdikleri kasılma yanıtları da gruplar arasında farklılık göstermedi (Şekil 4.17 ve Tablo 4.18).

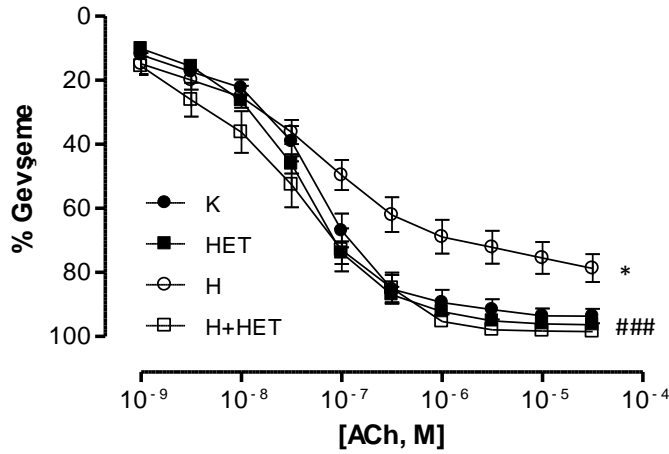


Şekil 4.17. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı kasılma doz yanıt eğrisi

Tablo 4.18. Mezenter arter 3. dal Phe aracılı maksimum (Emax) kasılma yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
Phe (g)	2.61 ±0.22	2.66±0.22	2.58±0.21	2.8145±0.18

ACh protokolü: ACh'nin kümülatif dozları (10^{-9} – 3×10^{-5}) ile elde edilen gevşeme yanıtları Şekil 4.18 ve Tablo 4.19'da sunulmuştur. Hipertansif sıçanlarda ACh'ne cevaben oluşan gevşeme yanıtları hem doz yanıt eğrileri hem de Emax açısından önemli olarak düşme gösterdi (sırasıyla, $p < 0.05$ $p < 0.01$). Tedavi uygulanan hipertansif sıçanlarda ise hipertansif sıçanlara kıyasla gevşeme yanıtları hem doz-yanıt eğrileri hem de Emax değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış sergiledi ($p < 0.001$).

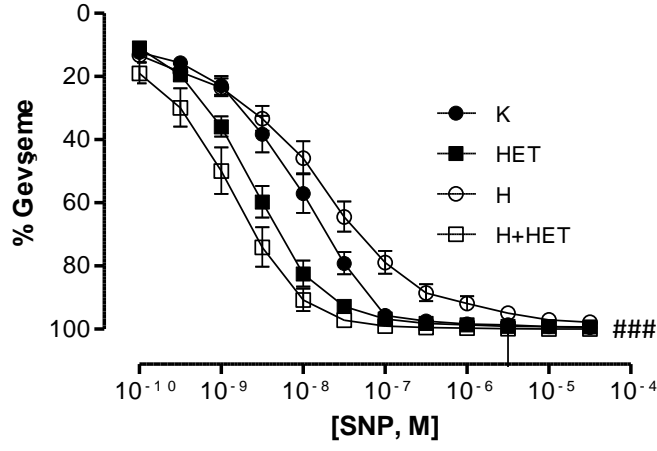


Şekil 4.18. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.19. Mezenter arter 3. dal ACh aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
ACh (%)	93.70±2.28	96.36±1.11	78.74±4.38**	98.44±20.71####

SNP protokolü: Tüm grupların SNP aracılı gevşeme yanıtları Şekil 4.19 ve Tablo 4.20'de izlenmektedir. H grubunun SNP aracılı doz-yanıt eğrisi ve Emax değeri K grubunununkine benzer bulundu. Bununla birlikte H+HET grubunun SNP'ye cevaben oluşturduğu gevşeme yanıtları hem doz-yanıt eğrilerinde hem de Emax yanıtlarında istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa neden oldu (sırasıyla, $p < 0.001$ $p < 0.05$).



Şekil 4.19. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı gevşeme doz yanıt eğrisi

Tablo 4.20. Mezenter arter 3. dal SNP aracılı maksimum (Emax) gevşeme yanıtları

Protokol	Emax			
	K	HET	H	H+HET
SNP (%)	99.53±0.26	99.35±0.28	97.78±0.71	100.00± 0.00#

TARTIŞMA

Hipertansiyon olarak adlandırılan kan basıncının kalıcı olarak yükselmesi, oldukça yaygın ve sık karşılaşılan bir sağlık sorunudur. Hipertansiyon koroner kalp hastalığı, kalp yetmezliği, serebrovasküler hastalıklar, böbrek yetmezliği gibi hastalıklara da yol açmaktadır. Hipertansiyonun yaygın oluşu ve morbiditesi yüksek olan bu hastalıklarla birlikte seyretmesi, bilim dünyasında üzerinde çok fazla araştırma yapılmasına neden olmaktadır [36-38]. Hipertansiyonun altında yatan nedenler, komplikasyonları ve tedavisini içeren çalışmalar insanlar üzerinde ancak belli bir yere kadar yapılabilmektedir. Bu konularda daha fazla bilgiye ulaşmak ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için çeşitli hipertansiyon modelleri kullanılmaktadır. Tezin giriş bölümünde de verildiği gibi deneysel olarak oluşturulan çok sayıda hipertansiyon modeli bulunmaktadır. Bu tezde deneysel hipertansiyon modeli olarak NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon modeli kullanılmıştır. Bu model, hipertansif insanlarda olduğu gösterilen endotel disfonksiyonuna dayanması açısından önem taşımaktadır [47, 258-260].

Hipertansiyon hastalığının % 95'lik kısmını oluşturan esansiyel yani nedeni bilinmeyen hipertansiyonu açıklayan en önemli hipotezlerden birisi endotel disfonksiyonudur [30]. Endotel disfonksiyonu temel olarak asetil koline cevaben endotelden salgılanan vazodilatör ajanların eksikliği şeklinde ifade edilebilir. Endotel disfonksiyonu hipertansiyona sebep olabileceği gibi hipertansiyonun sonucu olarak da ortaya çıkabilir [261]. İster primer ister sekonder olarak ortaya çıksın endotel disfonksiyonu sonucu oluşan NO eksikliği önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde NO eksikliği ile oluşturulan hipertansif süreç sistemik bir hastalık haline gelmektedir. Deney hayvanlarında endotel disfonksiyonu oluşmakta, sonucunda vazodilatasyon eksikliği görülmekte, sodyum geri emilimi inhibe edilmekte, sodyum atılımı bozulabilmekte [262], kalp debisi azalmakta [27], glomerüloskleroz, glomerüler kollaps ve interstisyel fibroz gelişebilmektedir [76, 263]. Görüldüğü üzere NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon modelinde NO eksikliği dışındaki mekanizmalar da önem taşımaktadır. Bu nedenle bu çalışmada önemli bir vazokonstriktör ajan olan 20-HETE'nin rolü araştırılmıştır. İnsanlarda 20-HETE üreten CYP4A11 ve CYP4F2 genlerinin, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur [176, 264]. Ayrıca insanlarda 20-HETE oluşumunda veya etkilerinde meydana gelen bozulmaların tuz-duyarlı hipertansiyon gelişimine neden olabileceğine dair bulgular gösterilmiştir [265, 266]. Çeşitli deneysel hipertansiyon modellerinde de hipertansiyon gelişiminin 20-HETE artışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [20, 177, 204].

Damarlardan salgılanarak vasküler tonusun düzenlenmesinde kasıcı bir ajan olarak görev alan 20-HETE'nin NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon

modelinin patogenezinde yer alıp almadığını araştırdığımız bu tez, iki çalışmadan oluşmaktadır. Birinci çalışmada NOS inhibisyonu yoluyla hipertansif hale getirilen deney hayvanlarında 20-HETE'nin vasküler tonuse katkısı 20-HETE inhibitörünün organ banyosuna ilavesiyle değerlendirilmiş ve elde edilen pozitif bulgular doğrultusunda araştırmanın ikinci aşamasına geçilmiştir. İkinci çalışmada ise NOS inhibisyonu yoluyla hipertansif hale getirilen hayvanlar 20-HETE inhibitörü ile tedavi edilerek hayvanların kan basınçları ve vasküler kasılma ve gevşeme yanıtları incelenmiştir.

I- İn vitro çalışma

Araştırmamızın ilk kısmında iki gruba ayrılan hayvanlardan hipertansif grupta olanların 5 haftalık L-NAME uygulaması sonrasında kan basınçlarının yüksek olduğu saptanmıştır.

Aort yanıtları. İletim tipi damar örneği olarak seçilen torasik aort halkalarının damar düz kası kasılma ve gevşeme yanıtları KCl ve SNP kullanılarak incelenmiştir. Kontrol grubu hayvanlardan elde edilen damarların KCl ve SNP'nin kümülatif dozlarına verdikleri yanıtlar alındıktan sonra aynı yanıtlar 20-HETE sentezini inhibe eden CYP450 enzim inhibitörü HET0016 inkübasyonu sonrasında değerlendirilmiştir ve hem doz-yanıt eğrilerinde hem de Emax değerlerinde farklılık olmadığı saptanmıştır. Benzer sonuçlar hipertansif hayvanların aortalarında da gösterilmiştir.

Ancak agonist aracılı yanıtlar iki grup arasında önemli farklılık göstermiştir. Phe'ne verilen kasılma, ACh'ne verilen gevşeme yanıtları 20-HETE inhibisyonundan etkilenmemiştir. Bu durum sağlıklı hayvanlarda bazal şartlarda 20-HETE'nin vasküler tonuse katkısının ölçülebilir düzeyde olmadığını göstermektedir [26, 167, 247, 267]. Hipertansif hayvanların Phe ile kasılma yanıtının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığını gözledik. Ancak Phe ile kasılma yanıtındaki bu artış HET0016 inkübasyonu sonucu 20-HETE oluşumunun engellenmesiyle düzelmiştir. Bu sonuç, hipertansif hayvanlarda saptanan ve olumsuz bir bulgu olan kasılma yanıtındaki artışa 20-HETE'nin katkıda bulunduğunu göstermesi bakımından önem taşımaktadır. ACh ile gevşeme yanıtı incelendiğinde de hipertansif hayvanlarda saptanan gevşeme yanıtlarındaki azalma literatür ile uyum göstermiştir [268-273]. Ancak araştırmamızın orijinal bulgularından biri 20-HETE oluşumu engellendiğinde hipertansif hayvanlarda azalmış olan gevşeme yanıtının, doz-yanıt eğrisinde anlamlı düzeyde olmasa da Emax değerlerinde önemli olarak düzelme göstermesi olmuştur. Şimdiye kadar verilen bilgilerin ışığında hipertansif hayvanların iletim tipi arterlerinde bozulan agonist bağımlı kasılma ve gevşeme yanıtlarında 20-HETE'nin rolü olduğu rahatlıkla söylenebilir.

Perfüzyon basıncı (arteriyel ve venöz basınçlar arasındaki fark) ile damar direnci, doku kan akımı belirleyicileridir. Genellikle perfüzyon basıncı belirli sınırlar arasında tutulurken kan akımı büyük ölçüde damar direnci tarafından belirlenmektedir. Organizmadaki vasküler direnç büyük ölçüde çapı 10 ile 500 µm arasında değişen direnç damarlarının fonksiyonu olarak karşımıza çıkmaktadır. Doku gereksinimine göre direnç damarları tonusunu değiştirerek kan akımını düzenlemektedir ve bu olay metabolik teori olarak ifade edilmektedir. Diğer yandan arteriyel kan basıncının doku düzeyine inmeden düşürüldüğü en önemli basamak da

direnç damarlarıdır. Direnç damarları, hem doku kan akımına etkisi hem de sistemik kan basıncının düzenlenmesindeki etkisi nedeniyle kritik bir öneme sahiptir [84, 274, 275].

Sistemik kan basıncını düzenleme ve doku kanlanmasına etkisi nedeniyle direnç damarlarının fonksiyon değişikliklerini araştırmak, fizyolojik ve fizyopatolojik mekanizmalara ışık tutmaktadır. Organ banyosu çalışmalarında genellikle büyük iletim veya besleyici tip arterler incelenebilmektedir. Ancak bu damarlardan alınan yanıt değişikliklerinin, doku kanlanması ve kan basıncını düzenleme üzerine etkilerinin ne düzeyde olduğu ciddi bir eleştiri konusudur. Bu yüzden direnç damarı sayılabilecek düzeyde küçük arter (100-500 µm) yanıtlarının incelenebilmesi için telli miyograf ve basınç miyografı olmak üzere iki teknik kullanılmaktadır. Telli miyografıta, damarların çeşitli maddelere karşı verdiği yanıtlar izometrik kuvvet transdüseriyle kaydedilmektedir. Basınç miyografında ise, damarlar iki kanül arasına takılıp içinden geçen sıvının akım ve basıncı istenildiği gibi düzenlenebilmektedir. Bu teknikte akım ve basınç ayrı ayrı kontrol edilebildiği için, damarlarda akım aracılığı ile değişen kayma geriliminin vasküler tonusa etkisi incelenebilmektedir [276, 277]. Basınç miyografı damarın silindirik yapısının korunması, akım ve basıncın ayrı ayarlanabilmesi özelliklerinden dolayı daha fizyolojik bir teknik olsa da; protokol sürelerinin uzunluğu ve manipülasyonun daha zor olmasından dolayı telli miyograf da tercih edilen bir tekniktir.

Araştırmamızda direnç damarlarındaki değişimlere ışık tutabilmek için mezenter damar yatağının 3. dalı kullanılmıştır. Bu damarların çapı 200-220 µm arasında değişmekteydi. İletim tipi damar örneği olarak ise çapları 2-2,5 mm arasında değişen torasik aorta halkaları kullanılmıştır. Aort yanıtları klasik organ banyosunda incelenirken mezenter direnç damarları telli miyograf düzeneğinde incelenmiştir.

Çalışmamızın ilk basamağında hipertansif sıçanların mezenter direnç damarlarının hem Phe hem de KCl protokolleri incelendiğinde kontrol grubundan fark göstermediği gibi HET0016 inkübasyonundan da etkilenmediği görülmüştür. Mezenter damarların ACh ile alınan endotel bağımlı gevşeme yanıtı beklenildiği gibi hem doz-yanıt eğrilerinde hem de Emax değerlerinde hipertansif grupta bozulma göstermiştir. 20-HETE oluşumu banyoya HET0016 eklenmesiyle engellendiğinde ise gevşeme yanıtındaki bu azalma düzelmiştir. Bu düzelme, doz-yanıt eğrisinde anlamlı olmasa da Emax değerleri göz önüne alındığında anlamlı idi. Doğrudan düz kasa etki ederek gevşeme oluşturan SNP yanıtları incelendiğinde kontrol grubunun inkübasyon öncesi ve sonrası yanıtları arasında farklılık gözlenmemiştir. Ancak kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik göstermemesine rağmen hipertansif grubun gevşeme yanıtları HET0016 inkübasyonu sonrasında artış göstermiştir.

Araştırmamızın birinci basamağının sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, hipertansif hayvanlardan elde edilen damarların kasılma ve gevşeme yanıtlarının, in vitro ortamda 20-HETE'nin akut inhibisyonu ile değişime uğraması önemli bulgulardır. Hipertansif sıçanlarda bozulmuş olan Phe aracılı kasılma ve ACh aracılı gevşeme yanıtlarının 20-HETE inhibisyonu ile düzelmesi, NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde bu maddenin önem kazandığını göstermektedir. Ancak kabul edilmelidir ki in vitro çalışmalar çeşitli kısıtlamalar içermektedir. Belli bir damar segmentindeki yanıt değişikliğinin, total periferik

direnci ne yönde etkileyebileceği, dolayısıyla kan basıncını ne yönde ve hangi ölçüde değiştirebileceği öngörülememektedir. Öte yandan in vitro çalışmada olduğu gibi tek seferde akut olarak uygulanan 20-HETE inhibisyonunun tüm organizma üzerine oluşturabileceği sistemik etkiler de kestirilememektedir. Ancak bütün bu kısıtlamalara rağmen sonuçlarımız 20-HETE üretiminin engellenmesinin bu hipertansiyon modeli için bir tedavi seçeneği oluşturabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla in vitro çalışmamızın sonuçları bu tezin ikinci basamağına geçiş için önemli bilgi sağlamıştır.

II- İn vivo tedavi çalışması

Tezin ikinci aşamasını oluşturan bu çalışmada ise L-NAME ile hipertansif hale getirilen sıçanların 20-HETE sentez inhibitörü ile tedaviye verecekleri yanıt ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 3 haftalık hipertansiyon periyodunun ardından hipertansiyon süreci devam ederken, deneyin son 2 haftasında hayvanlara CYP450 enzim inhibitörü olan HET0016 tedavisi uygulanmıştır. Toplam 5 haftalık süre boyunca hayvanların sistemik kan basıncı değişimleri takip edilmiş, deney sonunda da vasküler yanıt değişiklikleri incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulguların tartışmasına geçmeden önce HET0016'yı çözmek için kullanılan lesitin maddesiyle gerçekleştirilen vehicle çalışmasından söz etmek gerekmektedir. Hidrofobik bir bileşik olan HET0016 su veya serum fizyolojik gibi basit çözücülerde çözünmemektedir. Bundan dolayı araştırmamızda HET0016 çözücüsü olarak literatürde de sık kullanılan %10'luk lesitin solusyonu kullanılmıştır. Vehicle olarak lesitin kullanıldığı birçok araştırmada bu maddenin kan basıncı ve damar yanıtları üzerine etkili olmadığı gösterilse de [26, 247, 278] bu bulguyu bizim laboratuvar koşullarımızda da göstermeyi amaçladık. Bu amaçla yaptığımız vehicle çalışmasında kontrol grubu hayvanlara 2 hafta süreyle %10'luk lesitin çözeltisi ip yolla uygulandı. Bu sürenin sonunda lesitin alan ve almayan kontrol hayvanlarının kan basınçları kıyaslandığında aralarında hiçbir fark olmadığı saptanmıştır. Daha sonra her iki grubun torasik aort ve mezenter arter 3. dalı yanıtları KCl, SNP, Phe ve ACh protokolleriyle değerlendirilmiştir. Her iki grubun vasküler yanıtları hiçbir protokolde doz-yanıt eğrileri ve Emax değerleri açısından fark göstermemiştir. Bu bulguların elde edilmesiyle araştırmamızın ikinci kısmından elde edilecek sonuçların yalnızca HET0016 tedavisine bağlı olduğunu göstermiş olduk.

Tedavi çalışmamızda L-NAME uygulaması ile hipertansif hale getirilen sıçanların kan basınçlarının ilk haftadan itibaren artarak beklenildiği gibi 5 hafta boyunca yüksek kaldığı izlenmiştir. Ancak L-NAME uygulamasının son 2 haftasında HET0016 tedavisi verilen hayvanların kan basıncı değerlerinde hipertansif sıçanlara göre istatistiksel olarak önemli düşüş saptanmıştır. Araştırmamızın bu sonuçları NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20-HETE inhibisyonunun kan basıncını düşürücü etkisini ilk kez ortaya koyması açısından önem taşımaktadır. Bundan sonraki aşamada ise amacımız, eğer varsa hangi vasküler yanıtlardaki değişikliklerin kan basıncındaki bu düzelmeye katkıda bulunduğunu ortaya koymaktır.

Araştırmamızın ikinci basamağını oluşturan tedavi çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar in vitro deney sonuçları ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Torasik aort halkalarının endotel aracılı gevşeme yanıtı incelendiğinde hipertansif hayvanlarda bozulduğu saptanmıştır. Ancak 2 haftalık 20-HETE inhibisyonu ACh ile

gevşeme yanıtını arttırarak endotel disfonksiyonunda önemli düzelmeye neden olmuştur. Benzer olumlu süreç Phe kasılma yanıtlarında da elde edilmiştir. Hipertansif hayvanlarda artan Phe kasılma yanıtları HET0016 tedavisiyle önemli ölçüde düzelmiştir. Aortik halkaların damar düz kasına doğrudan etki eden ajanlar olan KCl ve SNP'ye verdikleri yanıtlarda ise ne hipertansif grupta ne de HET0016 tedavisi alan hayvanlarda herhangi bir bozulma veya düzelme izlenmemiştir.

Sistemik vasküler direnç oluşumuna önemli katkıda bulunan ve kan basıncının düzenlenmesinde çok önemli rolleri olan direnç damarlarını temsilen mezenter arter 3. dalının ACh ile gevşeme yanıtları incelendiğinde, çalışmamızda saptadığımız kan basıncındaki olumlu değişimi açıklayacak bulgular elde edilmiştir. Bu damarların ACh ile gevşeme yanıtı hipertansif hayvanlarda bozulmuş iken, 20-HETE inhibisyonu sonrasında hem doz-yanıt eğrileri hem de Emax değerleri açısından düzeldiği gözlenmiştir. L-NAME kullanımı ile oluşturulan hipertansiyonda vasküler dokuda 20-HETE miktarının artmış ve/veya 20-HETE'ye verilen yanıtın potansiyelize olmuş olabileceği ve bu şekilde 20-HETE'nin bu hipertansiyon modelinde vasküler tonus oluşumuna kasılma artışı yönünde etki ettiği düşünülebilmektedir. Araştırmamızda 20-HETE üretiminden sorumlu olan enzim yani CYP450'nin miktarı veya aktivitesindeki olası değişiklik gösterilmemekle birlikte, 20-HETE inhibisyonu ile ulaşılan bu sonuç, 20-HETE oluşumunun bu hipertansiyon modelinde artmış olabileceğine yönelik önemli kanıtlar vermektedir [6, 20, 26, 177, 204].

Mezenter direnç damarlarının agonist aracılı (Phe) veya direkt düz kasa etki ederek (KCl) elde edilen kasılma yanıtları gruplar arasında fark göstermemiştir. Ancak doğrudan damar düz kasına etki ederek gevşeme oluşturan SNP yanıtlarında in vitro çalışmadakine benzer bir durum saptanmıştır. Hipertansif hayvanların SNP'ye verdikleri gevşeme yanıtında kontrol grubuna göre bir bozulma olmadığı halde, 20-HETE inhibisyonu tedavi grubundaki gevşeme yanıtlarını hipertansif grubun üstüne çıkarmıştır. Her iki çalışmada da yalnızca mezenter damarlarda bu sonucun elde edilmiş olması ilgi çekici olmaktadır. Çalışmamızda saptadığımız bu sonucun hangi sebeple ortaya çıktığını söylemek pek mümkün görünmemektedir. Ancak 20-HETE ile NO molekülleri arasında çapraz etkileşim olduğunu gösteren çok sayıda araştırma bulunmaktadır. 20-HETE seviyelerinin artışı, NO aracılı gevşemeyi azaltmaktadır. Bunun sebebi ise heat shock protein 90 (HSP90) ile eNOS eşleşmesini engellemesinden kaynaklanmaktadır. NOS inhibisyonu ile NO sentezi engellendikten sonra, vazokonstriksiyona neden olan etkin metabolitin 20-HETE olduğu bulunmuştur. Diğer yandan NO artışının, 20-HETE seviyesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [11, 167, 168, 171].

Bu bilgilerin ışığı altında tedavi alan hipertansif grupta 20-HETE üretiminin baskılanması sonucu NO biyoyararlanımının arttığı akla gelmektedir. Ancak bu konuda daha ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

SONUÇLAR

Sonuç olarak araştırmamızda, endotel disfonksiyonunun ön planda olduğu bir model olan NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20-HETE'nin vasküler tonus üzerine olumsuz yönde katkıda bulunduğu ortaya konmuştur. 20-HETE oluşumunun enzimatik yolla inhibisyonu hem iletim tipi hem de direnç damarlarında gevşeme yanıtlarındaki bozulmayı düzeltmiştir. Ayrıca aortta ortaya çıkan kasılma yanıtı artışı da 20-HETE inhibisyonundan olumlu yönde etkilenmiştir. NOS inhibisyonu hipertansiyon modelinde 20-HETE inhibisyon tedavisi sonucunda kan basıncında saptanan düşüşün ilk defa gösterildiği araştırmamızda bu sonuca vasküler yanıtlardaki düzelmenin neden olduğu ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. Kunes, J., et al., Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiol Res*, 2004. 53 Suppl 1: p. S23-34.
2. Cai, H. and D.G. Harrison, Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 2000. 87(10): p. 840-4.
3. Wu, C.C., et al., 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications. *Cardiol Rev*, 2014. 22(1): p. 1-12.
4. Roman, R.J., P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*, 2002. 82(1): p. 131-85.
5. Williams, J.M., et al., 20-hydroxyeicosatetraenoic acid: a new target for the treatment of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010. 56(4): p. 336-44.
6. Wu, C.C. and M.L. Schwartzman, The role of 20-HETE in androgen-mediated hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011. 96(1-4): p. 45-53.
7. Capdevila, J.H., J.R. Falck, and R.W. Estabrook, Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J*, 1992. 6(2): p. 731-6.
8. Kroetz, D.L. and F. Xu, Regulation and inhibition of arachidonic acid omega-hydroxylases and 20-HETE formation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. 45: p. 413-38.
9. Zou, A.P., et al., 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel in renal arterioles. *Am J Physiol*, 1996. 270(1 Pt 2): p. R228-37.
10. Marji, J.S., M.H. Wang, and M. Laniado-Schwartzman, Cytochrome P-450 4A isoform expression and 20-HETE synthesis in renal preglomerular arteries. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 283(1): p. F60-7.
11. Oyekan, A.O. and J.C. McGiff, Functional response of the rat kidney to inhibition of nitric oxide synthesis: role of cytochrome p450-derived arachidonate metabolites. *Br J Pharmacol*, 1998. 125(5): p. 1065-73.

12. Hoagland, K.M., K.G. Maier, and R.J. Roman, Contributions of 20-HETE to the antihypertensive effects of Tempol in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, 2003. 41(3 Pt 2): p. 697-702.
13. Botros, F.T., M. Laniado-Schwartzman, and N.G. Abraham, Regulation of cyclooxygenase- and cytochrome p450-derived eicosanoids by heme oxygenase in the rat kidney. *Hypertension*, 2002. 39(2 Pt 2): p. 639-44.
14. Imig, J.D., et al., Formation and actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in rat renal arterioles. *Am J Physiol*, 1996. 270(1 Pt 2): p. R217-27.
15. Miyata, N. and R.J. Roman, Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res*, 2005. 41(4): p. 175-93.
16. Gebremedhin, D., et al., Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res*, 2000. 87(1): p. 60-5.
17. Zou, A.P., et al., Inhibition of renal vascular 20-HETE production impairs autoregulation of renal blood flow. *Am J Physiol*, 1994. 266(2 Pt 2): p. F275-82.
18. Oyekan, A., M. Balazy, and J.C. McGiff, Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol*, 1997. 273(1 Pt 2): p. R293-300.
19. Carroll, M.A., et al., Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. *Am J Physiol*, 1996. 271(4 Pt 2): p. R863-9.
20. Dunn, K.M., et al., Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature contributes to severity of ischemic stroke and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 295(6): p. H2455-65.
21. Yousif, M.H. and I.F. Benter, Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acids in the regulation of vascular function in a model of hypertension and endothelial dysfunction. *Pharmacology*, 2010. 86(3): p. 149-56.
22. Schwartzman, M.L., et al., Cytochrome P450 4A expression and arachidonic acid omega-hydroxylation in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Nephron*, 1996. 73(4): p. 652-63.
23. Carroll, M.A., et al., Cytochrome P450-derived renal HETEs: storage and release. *Kidney Int*, 1997. 51(6): p. 1696-702.

24. Alonso-Galicia, M., et al., Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in the renal and vasoconstrictor actions of angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. 283(1): p. R60-8.
25. Nakagawa, K., et al., Androgen-mediated induction of the kidney arachidonate hydroxylases is associated with the development of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 284(4): p. R1055-62.
26. Singh, H., et al., Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension. *Hypertension*, 2007. 50(1): p. 123-9.
27. Zatz, R. and C. Baylis, Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 1998. 32(6): p. 958-64.
28. Pollock, D.M., Chronic studies on the interaction between nitric oxide and endothelin in cardiovascular and renal function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1999. 26(3): p. 258-61.
29. Morton, J.J., et al., Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *J Hypertens*, 1993. 11(10): p. 1083-8.
30. De Artinano, A.A. and V.L. Gonzalez, Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res*, 1999. 40(2): p. 113-24.
31. Gibbons, G.H., Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *Am J Cardiol*, 1997. 79(5A): p. 3-8.
32. N.M., K., Treatment of Hypertension: Drug therapy, in *Clinical Hypertension*. 7th ed1998: William & Wilkins. p.181-265
33. A.C., G. and H. J.E., *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed2006: Elsevier Saunders. 166.
34. N.M., K., Primary Hypertension: Pathogenesis, in *Clinical Hypertension*. 7th ed1998: Williams & Wilkins. 41-99.
35. E, B., *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 6th ed2001: W. B. Saunders Company. 943.
36. Giles, T.D., et al., Definition and classification of hypertension: an update. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2009. 11(11): p. 611-4.
37. Chobanian, A.V., et al., Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 2003. 42(6): p. 1206-52.

38. He, J. and P.K. Whelton, Epidemiology and prevention of hypertension. *Med Clin North Am*, 1997. 81(5): p. 1077-97.
39. Whelton, P.K., Epidemiology of hypertension. *Lancet*, 1994. 344(8915): p. 101-6.
40. Kearney, P.M., et al., Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 2005. 365(9455): p. 217-23.
41. Hajjar, I. and T.A. Kotchen, Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA*, 2003. 290(2): p. 199-206.
42. A, O., Türkiye’de erişkinlerde kalp hastalığı ve risk faktörleri sıklığı taraması: 5. Hipertansiyon ve sigara içimi. *Türk Kardiyol Dern Arş*, 1991. 19: p. 169-77.
43. Altun, B., et al., Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Turkey (the PatenT study) in 2003. *J Hypertens*, 2005. 23(10): p. 1817-23.
44. Mayet, J. and A. Hughes, Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart*, 2003. 89(9): p. 1104-9.
45. Beevers, G., G.Y. Lip, and E. O'Brien, ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ*, 2001. 322(7291): p. 912-6.
46. Sodium, potassium, body mass, alcohol and blood pressure: the INTERSALT Study. The INTERSALT Co-operative Research Group. *J Hypertens Suppl*, 1988. 6(4): p. S584-6.
47. Sever, P.S. and N.R. Poulter, A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. *J Hypertens Suppl*, 1989. 7(1): p. S9-12.
48. Ogihara, T., et al., The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2009). *Hypertens Res*, 2009. 32(1): p. 3-107.
49. Sarikonda, K.V., et al., Experimental animal models of hypertension. *J Am Soc Hypertens*, 2009. 3(3): p. 158-65.
50. Goldblatt, H., et al., 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): p. 347-79.
51. Gavras, H., et al., Reciprocation of renin dependency with sodium volume dependency in renal hypertension. *Science*, 1975. 188(4195): p. 1316-7.

52. Liard, J.F., et al., Renin, aldosterone, body fluid volumes, and the baroreceptor reflex in the development and reversal of Goldblatt hypertension in conscious dogs. *Circ Res*, 1974. 34(4): p. 549-60.
53. Leenen, F.H., W. de Jong, and D. de Wied, Renal venous and peripheral plasma renin activity in renal hypertension in the rat. *Am J Physiol*, 1973. 225(6): p. 1513-8.
54. Freeman, R.H., et al., Effects of continuous converting enzyme blockade on renovascular hypertension in the rat. *Am J Physiol*, 1979. 236(1): p. F21-4.
55. Brunner, H.R., et al., Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms. *Science*, 1971. 174(4016): p. 1344-6.
56. Page, I.H., A Method for Producing Persistent Hypertension by Cellophane. *Science*, 1939. 89(2308): p. 273-4.
57. Thiedemann, K.U., et al., Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. *Basic Res Cardiol*, 1983. 78(2): p. 140-55.
58. Carroll, E.P., et al., Myocardial stiffness and reparative fibrosis following coronary embolisation in the rat. *Cardiovasc Res*, 1989. 23(8): p. 655-61.
59. ALA, B., Evaluation of drug activities pharmacometrics. Vol. 1. 1964: London: Academic Press. p. 431-53.
60. SP, R., Antihypertensive effect of dietary calcium and diltiazem, a calcium channel blocker on experimentally induced hypertensive rats. *Indian J Pharmacol*, 1997. 29: p. 99-104.
61. Bois, P. and H. Selye, The hormonal production of nephrosclerosis and periarteritis nodosa in the primate. *Br Med J*, 1957. 1(5012): p. 183-6.
62. Cowley, A.W., Jr., J.F. Liard, and A.C. Guyton, Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. *Circ Res*, 1973. 32(5): p. 564-76.
63. Hatton, D.C., et al., Stress-induced hypertension in the borderline hypertensive rat: stimulus duration. *Physiol Behav*, 1993. 53(4): p. 635-41.
64. Okamoto, K. and K. Aoki, Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 1963. 27: p. 282-93.
65. Nagura, J., et al., Effect of chronic treatment with ME3221 on blood pressure and mortality in aged stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 1995. 22(1): p. S363-5.

66. Somova, L.I., M.L. Channa, and M.S. Khan, An experimental rat model of salt-sensitive hypertension; biochemical and morphological parameters and sympathetic nervous system. *J S Afr Vet Assoc*, 1999. 70(1): p. 14-7.
67. Sonmez, A., et al., Metabolic syndrome and the effect of testosterone treatment in young men with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol*, 2011. 164(5): p. 759-64.
68. Fortepiani, L.A., et al., Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2003. 41(3 Pt 2): p. 640-5.
69. Alexander, B.T., et al., Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension*, 2001. 37(4): p. 1191-5.
70. Llinas, M.T., et al., Enhanced thromboxane synthesis during chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Am J Hypertens*, 2002. 15(9): p. 793-7.
71. Crews, J.K., et al., Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypertension*, 2000. 35(1 Pt 2): p. 367-72.
72. Krege, J.H., et al., A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*, 1995. 25(5): p. 1111-5.
73. Yamakawa, T., et al., Wistar fatty rat is obese and spontaneously hypertensive. *Hypertension*, 1995. 25(1): p. 146-50.
74. Yuasa, S., et al., Sodium sensitivity and sympathetic nervous system in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000. 27(1-2): p. 18-24.
75. Vapaatalo, H., E. Mervaala, and M.L. Nurminen, Role of endothelium and nitric oxide in experimental hypertension. *Physiol Res*, 2000. 49(1): p. 1-10.
76. Baylis, C., B. Mitruka, and A. Deng, Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, 1992. 90(1): p. 278-81.
77. Ribeiro, M.O., et al., Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*, 1992. 20(3): p. 298-303.
78. Rees, D.D., et al., Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 1990. 101(3): p. 746-52.

79. Buxton, I.L., et al., NG-nitro L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res*, 1993. 72(2): p. 387-95.
80. Sakuma, I., et al., A chronic model of hypertension with increased sympathetic drive in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. 1994: Portland Press. 245-247.
81. Gardiner, S.M., et al., Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *Eur J Pharmacol*, 1992. 213(3): p. 449-51.
82. Navarro, J., et al., Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol*, 1994. 267(6 Pt 2): p. R1516-21.
83. Klabunde, R.E., Organ Blood Flow, in *Cardiovascular Physiology Concepts* 2011, Philadelphia: Williams & Wilkins. 142-147.
84. Bagher, P. and S.S. Segal, Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011. 202(3): p. 271-84.
85. Klabunde, R.E., Neurohumoral Control of the Heart and Circulation, in *Cardiovascular Physiology Concepts* 2011, Philadelphia: Williams & Wilkins. 118-121.
86. Monos, E., V. Berczi, and G. Nadasy, Local control of veins: biomechanical, metabolic, and humoral aspects. *Physiol Rev*, 1995. 75(3): p. 611-66.
87. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980. 288(5789): p. 373-6.
88. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31(1): p. 61-74.
89. Lerman, A. and A.M. Zeiher, Endothelial function: cardiac events. *Circulation*, 2005. 111(3): p. 363-8.
90. Escrig, A., R. Marin, and M. Mas, Repeated PGE1 treatment enhances nitric oxide and erection responses to nerve stimulation in the rat penis by upregulating constitutive NOS isoforms. *J Urol*, 1999. 162(6): p. 2205-10.
91. Li, H., T. Wallerath, and U. Forstermann, Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*, 2002. 7(2): p. 132-47.

92. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987. 327(6122): p. 524-6.
93. Lamb, T.D. and E.N. Pugh, Jr., G-protein cascades: gain and kinetics. *Trends Neurosci*, 1992. 15(8): p. 291-8.
94. Shepherd, J.T. and Z.S. Katusic, Endothelium-derived vasoactive factors: I. Endothelium-dependent relaxation. *Hypertension*, 1991. 18(5 Suppl): p. III76-85.
95. Wink, D.A., et al., Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol*, 1993. 6(1): p. 23-7.
96. Parkington, H.C., H.A. Coleman, and M. Tare, Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res*, 2004. 49(6): p. 509-14.
97. Krotz, F., et al., Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *J Vasc Res*, 2005. 42(4): p. 312-24.
98. Griendling, K.K., Biology of the Vessel Wall, in *Hurst's the Heart2007: The McGraw-Hill Companies*. 137-139.
99. Coleman, H.A., M. Tare, and H.C. Parkington, Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. 31(9): p. 641-9.
100. Edwards, L.A., Symposium on diarrhea. 6. Infectious diarrhea. *Can Med Assoc J*, 1977. 116(7): p. 753-5.
101. Little, T.L., J. Xia, and B.R. Duling, Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res*, 1995. 76(3): p. 498-504.
102. Griffith, T.M., Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol*, 2004. 141(6): p. 881-903.
103. de Wit, C. and S.E. Wolfle, EDHF and gap junctions: important regulators of vascular tone within the microcirculation. *Curr Pharm Biotechnol*, 2007. 8(1): p. 11-25.
104. Attina, T., et al., Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*, 2005. 91(6): p. 825-31.

105. Lavallee, M., et al., Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. *Heart Fail Rev*, 2001. 6(4): p. 265-76.
106. Simonson, M.S. and M.J. Dunn, Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*, 1990. 4(12): p. 2989-3000.
107. O'Donnell, V.B., B. Maskrey, and G.W. Taylor, Eicosanoids: generation and detection in mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 2009. 462: p. 5-23.
108. Panigrahy, D., et al., Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. 29(4): p. 723-35.
109. Harder, D.R., et al., Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke*, 1998. 29(1): p. 229-34.
110. Makita, K., J.R. Falck, and J.H. Capdevila, Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *FASEB J*, 1996. 10(13): p. 1456-63.
111. McGiff, J.C. and J. Quilley, 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol*, 1999. 277(3 Pt 2): p. R607-23.
112. Roman, R.J. and M. Alonso-Galicia, P-450 Eicosanoids: A Novel Signaling Pathway Regulating Renal Function. *News Physiol Sci*, 1999. 14: p. 238-242.
113. Oliw, E.H., et al., Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. Formation of two novel dihydroxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*, 1981. 256(19): p. 9924-31.
114. Morrison, A.R. and N. Pascoe, Metabolism of arachidonate through NADPH-dependent oxygenase of renal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(12): p. 7375-8.
115. Capdevila, J., et al., Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(9): p. 5362-6.
116. Sacerdoti, D., et al., Renal cytochrome P-450-dependent metabolism of arachidonic acid in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol*, 1988. 37(3): p. 521-7.
117. Omata, K., et al., Age-related changes in renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, 1992. 262(1 Pt 2): p. F8-16.
118. Omata, K., N.G. Abraham, and M.L. Schwartzman, Renal cytochrome P-450-arachidonic acid metabolism: localization and hormonal regulation in SHR. *Am J Physiol*, 1992. 262(4 Pt 2): p. F591-9.

119. Sacerdoti, D., et al., Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science*, 1989. 243(4889): p. 388-90.
120. Levere, R.D., et al., Effect of heme arginate administration on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest*, 1990. 86(1): p. 213-9.
121. Escalante, B., et al., Chronic treatment with tin normalizes blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1991. 17(6 Pt 1): p. 776-9.
122. Capdevila, J.H., J.R. Falck, and R.C. Harris, Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res*, 2000. 41(2): p. 163-81.
123. Powell, P.K., et al., Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. 285(3): p. 1327-36.
124. Lasker, J.M., et al., Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11. *J Biol Chem*, 2000. 275(6): p. 4118-26.
125. Kikuta, Y., et al., Cloning and expression of a novel form of leukotriene B4 omega-hydroxylase from human liver. *FEBS Lett*, 1994. 348(1): p. 70-4.
126. Bednar, M.M., et al., 16(R)-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid, a new arachidonate metabolite in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol*, 2000. 60(3): p. 447-55.
127. Nguyen, X., et al., Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors. *Am J Physiol*, 1999. 276(6 Pt 2): p. R1691-700.
128. Ito, O., et al., Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am J Physiol*, 1998. 274(2 Pt 2): p. F395-404.
129. Gibson, G.G., Comparative aspects of the mammalian cytochrome P450 IV gene family. *Xenobiotica*, 1989. 19(10): p. 1123-48.
130. Hardwick, J.P., et al., Isolation, complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic lauric acid omega-hydroxylase (cytochrome P-450LA omega). Identification of a new cytochrome P-450 gene family. *J Biol Chem*, 1987. 262(2): p. 801-10.
131. Helvig, C., E. Dishman, and J.H. Capdevila, Molecular, enzymatic, and regulatory characterization of rat kidney cytochromes P450 4A2 and 4A3. *Biochemistry*, 1998. 37(36): p. 12546-58.

132. Kimura, S., et al., The rat clofibrate-inducible CYP4A subfamily. II. cDNA sequence of IVA3, mapping of the Cyp4a locus to mouse chromosome 4, and coordinate and tissue-specific regulation of the CYP4A genes. *DNA*, 1989. 8(7): p. 517-25.
133. Kimura, S., et al., The rat clofibrate-inducible CYP4A gene subfamily. I. Complete intron and exon sequence of the CYP4A1 and CYP4A2 genes, unique exon organization, and identification of a conserved 19-bp upstream element. *DNA*, 1989. 8(7): p. 503-16.
134. Simpson, A.E., The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol*, 1997. 28(3): p. 351-9.
135. Stec, D.E., et al., Renal cytochrome P4504A activity and salt sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1996. 27(6): p. 1329-36.
136. Sundseth, S.S. and D.J. Waxman, Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases. Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *J Biol Chem*, 1992. 267(6): p. 3915-21.
137. Kroetz, D.L., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem*, 1998. 273(47): p. 31581-9.
138. Harder, D.R., et al., A common pathway for regulation of nutritive blood flow to the brain: arterial muscle membrane potential and cytochrome P450 metabolites. *Acta Physiol Scand*, 1998. 164(4): p. 527-32.
139. Kawashima, H., et al., Protein expression, characterization, and regulation of CYP4F4 and CYP4F5 cloned from rat brain. *Arch Biochem Biophys*, 1997. 347(1): p. 148-54.
140. Kawashima, H. and H.W. Strobel, cDNA cloning of three new forms of rat brain cytochrome P450 belonging to the CYP4F subfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 217(3): p. 1137-44.
141. Kikuta, Y., et al., Purification and characterization of recombinant rat hepatic CYP4F1. *Arch Biochem Biophys*, 1999. 369(2): p. 193-6.
142. Kalsotra, A., et al., Sexual dimorphism and tissue specificity in the expression of CYP4F forms in Sprague Dawley rats. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30(9): p. 1022-8.
143. Muller, D.N., et al., Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyecosatetraenoic acid formation. *Biochem J*, 2007. 403(1): p. 109-18.

144. Heng, Y.M., et al., A novel murine P-450 gene, Cyp4a14, is part of a cluster of Cyp4a and Cyp4b, but not of CYP4F, genes in mouse and humans. *Biochem J*, 1997. 325 (Pt 3): p. 741-9.
145. Bell, D.R., et al., Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs. *Biochem J*, 1993. 294 (Pt 1): p. 173-80.
146. Holla, V.R., et al., Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(9): p. 5211-6.
147. Croft, K.D., et al., Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. 279(3): p. F544-51.
148. Minuz, P., et al., Altered release of cytochrome p450 metabolites of arachidonic acid in renovascular disease. *Hypertension*, 2008. 51(5): p. 1379-85.
149. Hercule, H.C. and A.O. Oyekan, Cytochrome P450 omega/omega-1 hydroxylase-derived eicosanoids contribute to endothelin(A) and endothelin(B) receptor-mediated vasoconstriction to endothelin-1 in the rat preglomerular arteriole. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. 292(3): p. 1153-60.
150. Lin, F., et al., 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is formed in response to EGF and is a mitogen in rat proximal tubule. *Am J Physiol*, 1995. 269(6 Pt 2): p. F806-16.
151. Singh, H. and M.L. Schwartzman, Renal vascular cytochrome P450-derived eicosanoids in androgen-induced hypertension. *Pharmacol Rep*, 2008. 60(1): p. 29-37.
152. Roman, R.J., et al., Clofibrate prevents the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, 1993. 21(6 Pt 2): p. 985-8.
153. Wilson, T.W., M. Alonso-Galicia, and R.J. Roman, Effects of lipid-lowering agents in the Dahl salt-sensitive rat. *Hypertension*, 1998. 31(1 Pt 2): p. 225-31.
154. Zhou, Y., et al., Gender differences of renal CYP-derived eicosanoid synthesis in rats fed a high-fat diet. *Am J Hypertens*, 2005. 18(4 Pt 1): p. 530-7.
155. Kaduce, T.L., et al., 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) metabolism in coronary endothelial cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(4): p. 2648-56.

156. Schwartzman, M.L., et al., Metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid by cyclooxygenase. Formation and identification of novel endothelium-dependent vasoconstrictor metabolites. *J Biol Chem*, 1989. 264(20): p. 11658-62.
157. Fang, X., et al., 20-carboxy-arachidonic acid is a dual activator of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007. 82(1-4): p. 175-84.
158. Hill, E., F. Fitzpatrick, and R.C. Murphy, Biological activity and metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in the human platelet. *Br J Pharmacol*, 1992. 106(2): p. 267-74.
159. Rosolowsky, M., J.R. Falck, and W.B. Campbell, Metabolism of arachidonic acid by canine polymorphonuclear leukocytes synthesis of lipoxygenase and omega-oxidized metabolites. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1300(2): p. 143-50.
160. Cowart, L.A., et al., The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem*, 2002. 277(38): p. 35105-12.
161. Ma, Y.H., et al., 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ Res*, 1993. 72(1): p. 126-36.
162. Randriamboavonjy, V., R. Busse, and I. Fleming, 20-HETE-induced contraction of small coronary arteries depends on the activation of Rho-kinase. *Hypertension*, 2003. 41(3 Pt 2): p. 801-6.
163. Oyekan, A.O. and J.C. McGiff, Cytochrome P-450-derived eicosanoids participate in the renal functional effects of ET-1 in the anesthetized rat. *Am J Physiol*, 1998. 274(1 Pt 2): p. R52-61.
164. Cambj-Sapunar, L., et al., Contribution of 5-hydroxytryptamine1B receptors and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid to fall in cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 2003. 34(5): p. 1269-75.
165. Kompanowska-Jezierska, E. and M. Kuczeriszka, Cytochrome P-450 metabolites in renal circulation and excretion--interaction with the nitric oxide (NO) system. *J Physiol Pharmacol*, 2008. 59 Suppl 9: p. 137-49.
166. Oyekan, A.O., et al., Renal cytochrome P450 omega-hydroxylase and epoxigenase activity are differentially modified by nitric oxide and sodium chloride. *J Clin Invest*, 1999. 104(8): p. 1131-7.
167. Wang, J.S., et al., Endothelial dysfunction and hypertension in rats transduced with CYP4A2 adenovirus. *Circ Res*, 2006. 98(7): p. 962-9.

168. Cheng, J., et al., 20-hydroxyeicosatetraenoic acid causes endothelial dysfunction via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(2): p. H1018-26.
169. Alonso-Galicia, M., et al., Contribution of 20-HETE to vasodilator actions of nitric oxide in the cerebral microcirculation. *Stroke*, 1999. 30(12): p. 2727-34; discussion 2734.
170. Alonso-Galicia, M., et al., Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am J Physiol*, 1998. 275(3 Pt 2): p. F370-8.
171. Alonso-Galicia, M., et al., Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. *Hypertension*, 1997. 29(1 Pt 2): p. 320-5.
172. Schulz, E., et al., Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10(6): p. 1115-26.
173. Ignarro, L.J., Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990. 30: p. 535-60.
174. Harrison, D.G., Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, 1997. 100(9): p. 2153-7.
175. Frisbee, J.C., J.R. Falck, and J.H. Lombard, Contribution of cytochrome P-450 omega-hydroxylase to altered arteriolar reactivity with high-salt diet and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 278(5): p. H1517-26.
176. Ward, N.C., et al., A single nucleotide polymorphism in the CYP4F2 but not CYP4A11 gene is associated with increased 20-HETE excretion and blood pressure. *Hypertension*, 2008. 51(5): p. 1393-8.
177. Inoue, K., et al., Endothelial-specific CYP4A2 overexpression leads to renal injury and hypertension via increased production of 20-HETE. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. 297(4): p. F875-84.
178. Sodhi, K., et al., CYP4A2-induced hypertension is 20-hydroxyeicosatetraenoic acid- and angiotensin II-dependent. *Hypertension*, 2010. 56(5): p. 871-8.
179. Frisbee, J.C., et al., 20-HETE contributes to myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in Brown Norway and Sprague-Dawley rats. *Microcirculation*, 2001. 8(1): p. 45-55.

180. Harder, D.R., et al., Formation and action of a P-450 4A metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels. *Am J Physiol*, 1994. 266(5 Pt 2): p. H2098-107.
181. Imig, J.D., J.R. Falck, and E.W. Inscho, Contribution of cytochrome P450 epoxygenase and hydroxylase pathways to afferent arteriolar autoregulatory responsiveness. *Br J Pharmacol*, 1999. 127(6): p. 1399-405.
182. Imig, J.D., et al., Cytochrome P-450 inhibitors alter afferent arteriolar responses to elevations in pressure. *Am J Physiol*, 1994. 266(5 Pt 2): p. H1879-85.
183. Kauser, K., et al., Inhibitors of cytochrome P-450 attenuate the myogenic response of dog renal arcuate arteries. *Circ Res*, 1991. 68(4): p. 1154-63.
184. Oyekan, A.O., Cytochrome p450-dependent metabolites of arachidonic acid and renal function in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000. 27(8): p. 581-6.
185. Davis, M.J. and M.A. Hill, Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*, 1999. 79(2): p. 387-423.
186. Harder, D.R., et al., Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res*, 1996. 79(1): p. 54-61.
187. Kerkhof, C.J., E.N. Bakker, and P. Sipkema, Role of cytochrome P-450 4A in oxygen sensing and NO production in rat cremaster resistance arteries. *Am J Physiol*, 1999. 277(4 Pt 2): p. H1546-52.
188. Chu, Z.M., et al., Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid may be important mediators in angiotensin II-induced vasoconstriction in the rat mesentery in vivo. *Clin Sci (Lond)*, 2000. 98(3): p. 277-82.
189. Izzard, A.S., et al., Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage. *J Hypertens*, 2005. 23(2): p. 247-50.
190. Schiffrin, E.L., Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*, 2004. 17(12 Pt 1): p. 1192-200.
191. Marchesi, C., P. Paradis, and E.L. Schiffrin, Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. 29(7): p. 367-74.
192. Szmítko, P.E., et al., New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*, 2003. 108(16): p. 1917-23.

193. Szmitko, P.E., et al., Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*, 2003. 108(17): p. 2041-8.
194. Alom-Ruiz, S.P., N. Anilkumar, and A.M. Shah, Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10(6): p. 1089-100.
195. Schober, A. and A. Zerneck, Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost*, 2007. 97(5): p. 730-7.
196. Zhang, C., The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*, 2008. 103(5): p. 398-406.
197. Ishizuka, T., et al., 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 324(1): p. 103-10.
198. Csiszar, A., et al., Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol (1985)*, 2008. 105(4): p. 1333-41.
199. Ungvari, Z., et al., Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF-kappaB activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 293(1): p. H37-47.
200. Donato, A.J., et al., Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*, 2007. 100(11): p. 1659-66.
201. Savoia, C. and E.L. Schiffrin, Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond)*, 2007. 112(7): p. 375-84.
202. Theuer, J., et al., Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord*, 2002. 2: p. 3.
203. Henke, N., et al., Vascular endothelial cell-specific NF-kappaB suppression attenuates hypertension-induced renal damage. *Circ Res*, 2007. 101(3): p. 268-76.
204. Wu, C.C., et al., Androgen-dependent hypertension is mediated by 20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced vascular dysfunction: role of inhibitor of kappaB Kinase. *Hypertension*, 2011. 57(4): p. 788-94.
205. Guo, A.M., et al., The cytochrome P450 4A/F-20-hydroxyeicosatetraenoic acid system: a regulator of endothelial precursor cells derived from human umbilical cord blood. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. 338(2): p. 421-9.

206. Guo, A.M., et al., Activation of vascular endothelial growth factor through reactive oxygen species mediates 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced endothelial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 321(1): p. 18-27.
207. Dhanasekaran, A., et al., 20-HETE increases survival and decreases apoptosis in pulmonary arteries and pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. 296(3): p. H777-86.
208. Chen, P., et al., Inhibitors of cytochrome P450 4A suppress angiogenic responses. *Am J Pathol*, 2005. 166(2): p. 615-24.
209. Koike, K., et al., Purification and characterization of rabbit small intestinal cytochromes P450 belonging to CYP2J and CYP4A subfamilies. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 232(3): p. 643-7.
210. Voelkel, N.F., I.S. Douglas, and M. Nicolls, Angiogenesis in chronic lung disease. *Chest*, 2007. 131(3): p. 874-9.
211. Stec, D.E., et al., 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) stimulates migration of vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem*, 2007. 19(1-4): p. 121-8.
212. Zou, A.P., et al., Effect of P-450 omega-hydroxylase metabolites of arachidonic acid on tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol*, 1994. 266(6 Pt 2): p. F934-41.
213. Zhao, X., et al., The CYP450 hydroxylase pathway contributes to P2X receptor-mediated afferent arteriolar vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 281(5): p. H2089-96.
214. Ominato, M., T. Satoh, and A.I. Katz, Regulation of Na-K-ATPase activity in the proximal tubule: role of the protein kinase C pathway and of eicosanoids. *J Membr Biol*, 1996. 152(3): p. 235-43.
215. Schwartzman, M., et al., Renal cytochrome P450-related arachidonate metabolite inhibits (Na⁺ + K⁺)ATPase. *Nature*, 1985. 314(6012): p. 620-2.
216. Ribeiro, C.M., et al., Parathyroid hormone inhibits Na(+)-K(+)-ATPase through a cytochrome P-450 pathway. *Am J Physiol*, 1994. 266(3 Pt 2): p. F497-505.
217. Escalante, B.A., J.C. McGiff, and A.O. Oyekan, Role of cytochrome P-450 arachidonate metabolites in endothelin signaling in rat proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 282(1): p. F144-50.
218. Sanchez-Mendoza, A., et al., Angiotensin II modulates ion transport in rat proximal tubules through CYP metabolites. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 272(2): p. 423-30.

219. Nowicki, S., et al., 20-Hydroxyeicosa-tetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal Na⁺,K⁺-ATPase. *J Clin Invest*, 1997. 99(6): p. 1224-30.
220. Carroll, M.A., et al., Structural identification of cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites formed by rabbit medullary thick ascending limb cells. *J Biol Chem*, 1991. 266(19): p. 12306-12.
221. Escalante, B., et al., Effect of cytochrome P450 arachidonate metabolites on ion transport in rabbit kidney loop of Henle. *Science*, 1991. 251(4995): p. 799-802.
222. Ito, O. and R.J. Roman, Role of 20-HETE in elevating chloride transport in the thick ascending limb of Dahl SS/Jr rats. *Hypertension*, 1999. 33(1 Pt 2): p. 419-23.
223. Zou, A.P., H.A. Drummond, and R.J. Roman, Role of 20-HETE in elevating loop chloride reabsorption in Dahl SS/Jr rats. *Hypertension*, 1996. 27(3 Pt 2): p. 631-5.
224. Yu, M., et al., Effects of 20-HETE on Na⁺ transport and Na⁺ -K⁺ -ATPase activity in the thick ascending loop of Henle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. 292(6): p. R2400-5.
225. Wang, W. and M. Lu, Effect of arachidonic acid on activity of the apical K⁺ channel in the thick ascending limb of the rat kidney. *J Gen Physiol*, 1995. 106(4): p. 727-43.
226. Cowley, A.W., Jr. and R.J. Roman, The role of the kidney in hypertension. *JAMA*, 1996. 275(20): p. 1581-9.
227. Roman, R.J., et al., Pressure-diuresis in volume-expanded rats. Cortical and medullary hemodynamics. *Hypertension*, 1988. 12(2): p. 168-76.
228. Williams, J.M., et al., Elevations in renal interstitial hydrostatic pressure and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid contribute to pressure natriuresis. *Hypertension*, 2007. 49(3): p. 687-94.
229. Magyar, C.E., et al., Proximal tubule Na transporter responses are the same during acute and chronic hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. 279(2): p. F358-69.
230. Zhang, Y.B., et al., The cytochrome P-450 inhibitor cobalt chloride prevents inhibition of renal Na,K-ATPase and redistribution of apical NHE-3 during acute hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 1998. 9(4): p. 531-7.

- 231.** Dos Santos, E.A., et al., Inhibition of the formation of EETs and 20-HETE with 1-aminobenzotriazole attenuates pressure natriuresis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. 287(1): p. R58-68.
- 232.** Walsh, C.T., Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments. *Annu Rev Biochem*, 1984. 53: p. 493-535.
- 233.** Miyata, N., et al., HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. *Br J Pharmacol*, 2001. 133(3): p. 325-9.
- 234.** Hoagland, K.M., A.K. Flasch, and R.J. Roman, Inhibitors of 20-HETE formation promote salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension*, 2003. 42(4): p. 669-73.
- 235.** Wang, M.H., et al., Contribution of cytochrome P-450 4A1 and 4A2 to vascular 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis in rat kidneys. *Am J Physiol*, 1999. 276(2 Pt 2): p. F246-53.
- 236.** Yu, M., et al., Effects of a 20-HETE antagonist and agonists on cerebral vascular tone. *Eur J Pharmacol*, 2004. 486(3): p. 297-306.
- 237.** Qin, X., et al., Role of 20-HETE in the pial arteriolar constrictor response to decreased hematocrit after exchange transfusion of cell-free polymeric hemoglobin. *J Appl Physiol (1985)*, 2006. 100(1): p. 336-42.
- 238.** Tunctan, B., et al., A 20-hydroxyeicosatetraenoic acid agonist, N-[20-hydroxyeicosa-5(Z),14(Z)-dienoyl]glycine, opposes the fall in blood pressure and vascular reactivity in endotoxin-treated rats. *Shock*, 2008. 30(3): p. 329-35.
- 239.** Regner, K.R., et al., Protective effect of 20-HETE analogues in experimental renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int*, 2009. 75(5): p. 511-7.
- 240.** Kroetz, D.L., et al., Developmentally regulated expression of the CYP4A genes in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Mol Pharmacol*, 1997. 52(3): p. 362-72.
- 241.** Laniado-Schwartzman, M., et al., Effect of acute and chronic treatment of tin on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Tohoku J Exp Med*, 1992. 166(1): p. 85-91.
- 242.** Zhang, F., et al., Modulation by 20-HETE of phenylephrine-induced mesenteric artery contraction in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*, 2001. 38(6): p. 1311-5.
- 243.** Xu, F., et al., Antihypertensive effect of mechanism-based inhibition of renal arachidonic acid omega-hydroxylase activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. 283(3): p. R710-20.

244. Wang, M.H., et al., CYP4A1 antisense oligonucleotide reduces mesenteric vascular reactivity and blood pressure in SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. 280(1): p. R255-61.
245. Kunert, M.P., et al., Differential effect of cytochrome P-450 omega-hydroxylase inhibition on O₂-induced constriction of arterioles in SHR with early and established hypertension. *Microcirculation*, 2001. 8(6): p. 435-43.
246. Benter, I.F., et al., Contribution of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid to hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2005. 25(4): p. 143-54.
247. Toth, P., et al., Treatment with the cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibitor HET0016 attenuates cerebrovascular inflammation, oxidative stress and improves vasomotor function in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 2013. 168(8): p. 1878-88.
248. Wu, C.C., et al., Androgen-sensitive hypertension associates with upregulated vascular CYP4A12-20-HETE synthase. *J Am Soc Nephrol*, 2013. 24(8): p. 1288-96.
249. Llinas, M.T., et al., Cytochrome P-450 inhibition attenuates hypertension induced by reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Hypertension*, 2004. 43(3): p. 623-8.
250. Yanes, L.L., et al., Postmenopausal hypertension: role of 20-HETE. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. 300(6): p. R1543-8.
251. Oyekan, A.O., et al., Endothelin-1 and CYP450 arachidonate metabolites interact to promote tissue injury in DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol*, 1999. 276(3 Pt 2): p. R766-75.
252. Honeck, H., et al., Cytochrome P450-dependent renal arachidonic acid metabolism in desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive mice. *Hypertension*, 2000. 36(4): p. 610-6.
253. Kunert, M.P., et al., CYP450 4A inhibition attenuates O₂ induced arteriolar constriction in chronic but not acute Goldblatt hypertension. *Microvasc Res*, 2009. 78(3): p. 442-6.
254. Ma, Y.H., M.L. Schwartzman, and R.J. Roman, Altered renal P-450 metabolism of arachidonic acid in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol*, 1994. 267(2 Pt 2): p. R579-89.
255. Williams, J.M., et al., Transfer of the CYP4A region of chromosome 5 from Lewis to Dahl S rats attenuates renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. 295(6): p. F1764-77.

256. Alonso-Galicia, M., B. Frohlich, and R.J. Roman, Induction of P4504A activity improves pressure-natriuresis in Dahl S rats. *Hypertension*, 1998. 31(1 Pt 2): p. 232-6.
257. Williams, J.M., et al., Role of 20-HETE in the antihypertensive effect of transfer of chromosome 5 from Brown Norway to Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012. 302(10): p. R1209-18.
258. Taddei, S., et al., Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension*, 1997. 29(3): p. 736-43.
259. Bernatova, I., Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 598271.
260. Versari, D., et al., Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol*, 2009. 157(4): p. 527-36.
261. Marin, J. and M.A. Rodriguez-Martinez, Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*, 1997. 75(2): p. 111-34.
262. Kone, B.C. and C. Baylis, Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol*, 1997. 272(5 Pt 2): p. F561-78.
263. Gabbai, F.B., et al., Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology. *Adv Nephrol Necker Hosp*, 1995. 24: p. 3-18.
264. Eljovich, F. and C.L. Laffer, The relationship between CYP4A11 and human hypertension. *J Hypertens*, 2008. 26(8): p. 1712-4.
265. Laffer, C.L., et al., Differential regulation of natriuresis by 20-hydroxyeicosatetraenoic Acid in human salt-sensitive versus salt-resistant hypertension. *Circulation*, 2003. 107(4): p. 574-8.
266. Laffer, C.L., et al., 20-HETE and furosemide-induced natriuresis in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension*, 2003. 41(3 Pt 2): p. 703-8.
267. Berezan, D.J., et al., Aging increases cytochrome P450 4A modulation of alpha1-adrenergic vasoconstriction in mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008. 51(3): p. 327-30.
268. dos Santos, L., et al., Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na⁺, K⁺-ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sci*, 2003. 74(5): p. 613-27.
269. De Gennaro Colonna, V., et al., Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats by a kinin-dependent mechanism. *J Hypertens*, 2006. 24(1): p. 95-102.

270. Torok, J. and M. Gerova, Vascular responses after long-term inhibition of nitric oxide synthesis in newborn dogs. *Physiol Res*, 1996. 45(4): p. 323-8.
271. Torok, J., Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Physiol Res*, 2000. 49(1): p. 107-14.
272. Zhao, H., et al., Long-term vascular effects of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester are not solely mediated by inhibition of endothelial nitric oxide synthesis in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999. 33(4): p. 554-66.
273. Duarte, J., et al., Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens*, 2002. 20(9): p. 1843-54.
274. Thomas, G.D. and S.S. Segal, Neural control of muscle blood flow during exercise. *J Appl Physiol* (1985), 2004. 97(2): p. 731-8.
275. Green, D.J., et al., Control of skeletal muscle blood flow during dynamic exercise: contribution of endothelium-derived nitric oxide. *Sports Med*, 1996. 21(2): p. 119-46.
276. Falloon, B.J., et al., Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. *Am J Physiol*, 1995. 268(2 Pt 2): p. H670-8.
277. Schiffrin, E.L. and D. Hayoz, How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *J Hypertens*, 1997. 15(6): p. 571-84.
278. Kehl, F., et al., 20-HETE contributes to the acute fall in cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 282(4): p. H1556-65.

ÖZGEÇMİŞ

02.08.1989 tarihinde Antalya’da dünyaya gelen Nur ÖZEN, ilk ve orta öğrenimini Barbaros İlköğretim Okulu’nda (1995-2003), lise öğrenimini ise Antalya Koleji’nde (2003-2006) tamamladı. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde üniversite öğrenimine başladı ve 2012 yılında lisans diploması almaya hak kazandı. 2012-2013 Eğitim Öğretim Yılı Güz Dönemi’nde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı ve halen Fizyoloji Anabilim Dalı’nda öğrenimine devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.