

**HİPERTANSİYON İLE ACE2 GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

SAMET TÜREL

**Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman: Yrd.Doç.Dr. F. Sırrı ÇAM

Şubat 2008

TUTANAK

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek lisans Öğrencisi Samet TÜREL'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "HİPERTANSİYON İLE ACE2 GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ" başlıklı çalışma, jürimize lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

11/02/2008

Tez danışmanı

Yrd.Doç.Dr. F. Sırrı ÇAM

Üye

Yrd. Doç.Dr. Nuray ALTINTAŞ

Üye

Doç.Dr. Cumhur GÜNDÜZ (EÜ. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD)

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetim kurulunun/...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Beril ÖZBAKKALOĞLU

Enstitü müdürü

ÖZET

Bio. Samet TÜREL

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Manisa
TÜRKİYE

Hipertansiyon kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayan en önemli risk faktörlerinden birisidir. Renin angiotensin sistemi (RAS), kardiyovasküler ve renal fonksiyonların merkezi bir düzenleyicisi olup, birçok kalp böbrek hastalığında anahtar rol oynar. RAS'ın, kardiyovasküler ve renal fonksiyonlarda ve hastalık durumlarında önemli bir rol oynadığı ve düşünüldüğünden çok daha karmaşık bir sistem olduğu ortaya çıkmıştır. X kromozomu üzerinde lokalize olan ve Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) ile homolog olan yeni bulunan ACE2'nin RAS'ı negatif şekilde düzenlediği görülmektedir. ACE2, Ang I ve Ang II yi inaktif Ang1-9 ve Ang1-7 ye bölmektedir. Yapılan genetik araştırmalar sonucunda ACE2 geninde hipertansiyonla ilişkilendirilmiş 4 farklı ten nükleoit polimorfizm bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar; intron 1 deki 1075 bölgesinde A→G, intron 3 deki 8790 bölgesinde G→A, intron 11 deki 28330 C→G ve intron 16 daki 36787 bölgesinde G→C polimorfimleridir. Bu çalışmada, ACE2 gen polimorfizmi ile hipertansiyon arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 158 primer hipertansiyon hastası birey ile 163 normal kan basıncına sahip bireyde ACE2 genindeki intron 1 A→G (nt 1075) ve int 3 G→A (nt 8790) polimorfizmleri analiz edilmiştir.

SUMMARY

Hypertension is one of the most important risk factors in cardiovascular diseases. Renin angiotensin system (RAS) is a central organizer of the cardiovascular and renal functions and it plays a key role in many cardio renal diseases. It's arised that RAS plays an important role in cardiovascular and renal functions and in illness conditions and it's a more complicated system than it's thouht. It's seen that new found ACE2 which is homologous with ACE, localized on X chromosome, orders RAS in a negative way. ACE 2 separates AngI and Ang II to inactive Ang1-9 and Ang1-7. As a result of the genetical researches ACE2 is associated with hypertension and 4 different nucleotide polymorphism regions are defined. These are, A→G in the 1075 region of intron 1, G→A in the 8790 region of intron 3, C→G in the 28330 region of intron 11, G→C in the 36787 region of intron 16.

In this study it will be aimed to determine whether ACE2 gene polymorphism and hypertension have a relationship or not. Also, the aim is to show A→G (nt 1075) and int 3 G→A (nt 8790) polymorphisms existance on the ACE2 gene in 158 individuals with primer hypertension and 163 individuals with normal blood pressure.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim sırasında değerli bilgileri ile yol gösteren ve her türlü desteği sağlayan değerli hocam, danışmanım Sayın Yrd.Doç.Dr. F.Sırrı ÇAM'a şükranlarımı arz ederim.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd.Doç.Dr. Nuray ALTINTAŞ'a, eğitimime katkısı ve her zaman eksik etmediği değerli desteği için teşekkür ederim.

Tez çalışması sırasında gösterdikleri dostluk ve yardımseverlikleri ile her zaman beni destekleyen bütün çalışma arkadaşlarıma minnettarım.

Çalışmanın her safhasında, maddi ve manevi desteğiyle her an yanımda olan eşim Yeliz TÜREL'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Samet TÜREL

Şubat 2008

KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMA	AÇIK İSMİ
Ang 0	Angiotensinojen
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang III	Angiotensin III
Ang(1-7)	Angiotensin(1-7)
Ang(1-9)	Angiotensin(1-9)
ACE	Angiotensin Dönüştürücü Enzim
ACE2	Angiotensin Dönüştürücü Enzim2
QTL	Quantitative trait lokus
YKB	Yüksek Kan Basıncı
GFH	Glomeruler filtrasyon hızı
NO	Nitrik oksit
RAAS	Renin Anjiotensin Aldosteron sistemi
AT1R	Anjiotensin tip-1 reseptörü
AT2R	Anjiotensin tip-2 reseptörü
BK	Bradikinin
PG	Prostoglandin
RSNA	Renal sempatik sinirlerin aktivasyonu
ACEi	Angiotensin Dönüştürücü Enzim inhibitörü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)
DNA	Deoksiribonükleik asit

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Tablo Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1	Hipertansiyondaki genetik mekanizmalar	4
Tablo 2	Çeşitli Hedef Dokularda Anjiotensin II'nin Etkileri	23
Tablo 3	Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri	30
Tablo 4	Kullanılan Primerler.	34
Tablo 5	50 µl hacim içerisinde gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.	34
Tablo 6	<i>Kullanılan PCR Sıcaklık Profili</i>	35
Tablo 7	Kadınlarda intron 1 için genotip ve alel frekansı dağılımı	38
Tablo 8	Erkeklerde intron 1 için genotip dağılımı	38
Tablo 9	Kadınlarda intron 3 için genotip ve alel frekansı dağılımı	38
Tablo 10	Erkeklerde intron 3 için genotip dağılımı	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Şekil Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1	<i>Renin-anjiotensin-aldosteron aksı</i>	15
Şekil 2	Klasik görüşte RAS'ın bileşenlerinin spesifik dokulardan salınımı	16
Şekil 3	Jukstaglomerüler aparat ve renin salgılanmasında önemli faktörler	17
Şekil 4	somatik ACE, germinal ACE, ACE2 ve Collectrin'nin domain bölgelerinin yapıları	20
Şekil 5	ACE ve ACE2 genlerinin ekson bölgeleri	24
Şekil 6	Günümüzde kabul edilen renin angiotensin sistemi	28

İÇNDEKİLER

	Sayfa No:
1.GİRİŞ	1
2. HİPERTANSİYON	2
2.1 HİPERTANSİYONUN ETYOLOJİSİ	3
2.1.1 Genetik	4
2.1.2 Kalp debisi	5
2.1.3 Aşırı sodyum alımı	5
2.1.4 Potasyum	6
2.1.5 Nefron sayısında azalma	6
2.1.6 Stress ve aşırı sempatik etkinlik	6
2.1.7 Çevresel direnç	6
2.1.8 Hücre zarındaki değişiklikler	7
2.1.9 Atriyal natriüretik hormon	7
2.1.10 Vazopressin	8
2.1.11 Endotel işlev bozukluğu	8
2.1.12 Şişmanlık	8
2.1.13 İnsülin direnci ve hiperinsülinemi	9
2.1.14 Sigara	9
2.1.15 Alkol	9
2.1.16 Kalsiyum ve paratiroid hormonu	10
2.1.17 Fiziksel hareketsizlik	10
2.1.18 Öteki olası mekanizmalar	10
3.Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (Raas)	11
3.1 RAS'ın fizyolojik rolü	13
3.2 Dokulardaki RAS'a karşı Dolaşımdaki RAS	14
3.3 Renin	16
3.3.Renin Salınımını Etkileyen Faktörler	17
3.4 Angiotensinojen (Renin Substrat)	19
3.5 Angiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE)	19
3.6 Anjiotensin Peptidleri	20
3.6.1 Angiotensin İi	21
4. Angiotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2)	23
4.1 ACE2'nin Yapısı	24
4.2 ACE 2 'nin dağılımı	25
4.3 Vasoaktif peptitlerin kontrolünde ACE2 nin merkezi görevi	26
4.4 ACE 2 ve hipertansiyon	27
4.5 ACE2 ve Kardiyovasküler Fonksiyonu	28
5. Gereç ve Yöntem	29
5.1. Örneklerin Seçimi ve Kan Alımı	29
5.2 ARAÇ VE GEREÇLER	30

5.2.1 Kullanılan Kimyasallar	30
5.2.1.1. Kimyasallar	29
5.3. ACE2 Genindeki Intron 1 A→G (nt 1075) ve Intron 3 G→A (nt 8790) Polimorfizmlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması	31
5.3.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	31
5.3.1.1. Uygulanan Protokol	31
5.3.1.2. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması	32
5.3.2 PCR Amplifikasyonu	33
5.3.2.1 Amplifikasyonda Kullanılacak Primerlerin Seçimi	33
5.3.2.2 Uygulanan PCR Protokolü	33
5.4 PCR Ürünlerinin Elektroforezde Değerlendirilmesi	35
5.5 RE Kesimi ile Polimorfizmlerin Saptanması	36
5.6 İstatistiksel Yöntem	37
6 BULGULAR	37
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
8. KAYNAKLAR	41

1.GİRİŞ

Hipertansiyon kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayan en önemli risk faktörlerinden birisidir. Renin angiotensin sistemi (RAS), kardiyovasküler ve renal fonksiyonların merkezi bir düzenleyicisi olup, birçok kalp böbrek hastalığında anahtar rol oynar. RAS, kan basıncı düzenlenmesinin başlıca aktörü olması dolayısıyla hipertansiyon patofizyolojisinde kritik öneme sahiptir. Bunun yanında RAS, çeşitli kalp ve böbrek dokularında ve plazmada bulunan angiotensin II grubunun bir dizi enzimatik reaksiyonunu içerir. Renal afferent arteriollerdeki juxtaglomerüler hücrelerden salındıktan sonra renin, angiotensinogen üzerinden rol oynar ve dekapeptid inaktivasyonunu gerçekleştirir. AngII, böbreklerdeki sodyum geri emilimini aldesteron salgısının uyarısıyla çoğaltır, bu protein aynı zamanda renal tübülo-gromerular geri besleme mekanizmasındaki kritik düzenleyicidir (1).

RAS'ın, kardiyovasküler ve renal fonksiyonlarda ve hastalık durumlarında önemli bir rol oynadığı ve düşünüldüğünden çok daha karmaşık bir sistem olduğu ortaya çıkmıştır. Yeni bulunan homolog olan ACE olan ACE2 nin RAS'ı negatif şekilde düzenlediği görülmektedir. ACE2, Ang I ve Ang II yi inaktif Ang1-9 ve Ang1-7 ye bölmektedir. ACE2 böbrek ve kalpte yüksek oranda eksprese edilmekte ve özellikle endotelde bulunmaktadır. Quantitative trait lokus (QTL) haritalamasıyla ACE2 fare hipertansiyon modellerinde X kromozomunda bir QTL olarak tanımlanmıştır. Bu hayvan modellerinde böbrek ACE2 mRNA ve protein ifadelerinde belirgin azalma olmuştur buda ACE2 yi bu QTL için aday bir gen yapmıştır. Farelerde ACE2 hedeflenmiş bozulması hipertansiyona neden olmamıştır ancak miyokardiyal kasılabilirlik ağır bozulmaya ve yüksek angiotensin II seviyelerine yol açmıştır. ACE2'siz farelerden ACE nin genetik olarak alınması kardiyak fenotipi kurtarmıştır. Bu genetik bilgiler ACE2 nin kalp fonksiyonlarının vazgeçilmez bir in vivo düzenleyicisi olduğunu göstermiştir. ACE2 nin inaktivasyonu bazal renal morfoloji ve fonksiyonda değişme olmamıştır. ACE2'nin bir çok başka peptidin hidrolizinde(Apelin peptitleri, opioidler ve kinin metabolitleri gibi) oynadığı önemli rol angiotensin ve bileşiklerinden başka peptit sistemlerinde kardiyovasküler ve renal fonksiyonları düzenlemede önemli rol oynayabileceği ihtimalini artırmaktadır (2).

Yapılan genetik araştırmalar sonucunda ACE2 geninde hipertansiyonla ilişkilendirilmiş 4 farklı nükleoit polimorfizm bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar; intron 1 deki 1075 bölgesinde A→G, intron 3 deki 8790 bölgesinde G→A, intron 11 deki 28330 C→G ve intron 16 daki 36787 bölgesinde G→C polimorfizmleridir (3).

Labuda ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada Kanada ve Fransız ailelerinde, ACE2 deki varyasyonları ile insan hipertansiyonları arasında pozitif bir ilişki gösterilmiştir (4). Yapılan başka bir araştırmada, ACE2'nin ekspresyonunun düşük olduğu durumlarda ACE aktivasyonunun arttığı bu artışın da vasküler tonus artışına yol aadığı ve bununda hipertansiyonla sonuğlandığını göstererek ACE2 nin hipertansiyon için yeni bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (5).

ACE2'nin çeşitli peptitleri parçalamasındaki etkisi biyolojik önemini aadığça ortaya koymaktadır. Bu enzimin diğer peptit sistemlerindeki karmaşık fonksiyonlarının anlaşılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada ülkemizdeki hipertansif hastalarda ACE2 genindeki intron 1 A→G (nt 1075) ve int 3 G→A(nt 8790) polimorfizmlerinin rolünü incelemek amaçlandı.

2. HİPERTANSİYON

Hipertansiyon (yüksek kan basıncı = YKB), sürekli yüksek arteriyel kan basıncı ile kendini gösteren sistemik bir hastalık olup, ciddi komplikasyonlara yol aadıması ve toplumda sık görülmesi nedeniyle önemli bir sağlık problemidir. Dünyada bir milyar kişiyi etkilediği düşünölmektedir.

Hipertansiyon sıklığı, ırk ve coğrafyaya göre değişmektedir. ABD, Avrupa ve diğer bir çok ölkede erişkin popölasyonun yaklaşık %25'inde hipertansiyon vardır. 65 yaş üstü Amerikan siyah ırkında %70'i geçen oranlarda görülür. 50 yaşına kadar görülme sıklığı, erkeklerde daha fazladır. 1993 yılında Hipertansiyon ve Ateroskleroz Derneği'nin yayınladığı Türkiye Hipertansiyon Haritası isimli kitapta (6), ülkemizde sistolik kan basıncı yüksekliği sıklığı, kadınlarda %20, erkeklerde %17 saptanırken, diyastolik kan basıncı yüksekliği, sırasıyla %32 ve %33 bulunmuştur. Aynı makalede

56-65 yaş grubunda kadın ve erkeklerde hipertansiyon sıklığı sırasıyla %61 ve %53'dür. Bir diğer çalışmaya göre ülkemiz hipertansiyon sıklığı %37'dir.

Hipertansiyon, birincil (primer, idyopatik, esansiyel) ve ikincil (sekonder) olarak ikiye ayrılır. Birincil hipertansiyon, olguların yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Vakaların %5'lik bölümü ikincil hipertansiyondur ve bunun büyük çoğunluğu böbrek sebeplidir.

Hipertansiyon uzun yıllar belirtisiz veya komplikasyonsuz olarak seyredebilir. Bu sırada tek somut bulgu arteriyel kan basıncının (AKB) yüksek saptanmasıdır. Ciddi komplikasyonlar uzun yıllar sonra ortaya çıkabilir. Belirtisiz dönemde hastaya tedaviyi benimsetmek güç olur. Bu nedenle yüksek kan basıncı tedavisinde hasta uyumu büyük önem kazanmaktadır. YKB hastalarının yaklaşık 1/3'ü, durumlarından haberdar değildir. YKB'li hastaların ancak yarısı tedavi almaktadır ve bu hastaların önemli bir bölümü de verilen tedavileri düzenli uygulamamaktadır. Buna bağlı olarak da tedavi alan hastaların yarısından azının kan basınçları kontrol altındadır. Bu durumda, YKB hastalarının büyük bölümü yüksek kan basıncı değerlerinin getireceği olumsuzluklarla karşı karşıyadır. Etkin tedavi edilen YKB hastalarında inme, kalp yetersizliği, ve miyokard infarktüsü riskinde anlamlı azalmalar meydana gelmektedir.

Hipertansiyon konusunda karşılaşılan sorunların çoğunluğu, tıp personelinin bu konuda göstereceği ilgi ile çözümlenebilecektir. Kan basıncı ölçümünün, dikkatlice her fizik muayeneye ilave edilmesi, hastalara durumları ile ilgili her türlü bilginin anlatılması ve yeterli sıklıktaki kontroller, yüksek morbidite ve ölüm hızına sahip bu hastalığın verebileceği zararları azaltacaktır.

2.1 HİPERTANSİYONUN ETYOLOJİSİ

Birincil hipertansiyonun nedeni bilinmemektedir; ancak katkıda bulunan mekanizmalar ve etyoloji hakkında çeşitli görüşler mevcuttur. Arteriyel kan basıncını oluşturan faktörler, kalp debisi (kardiyak output) ve sistemik damar direncidir. YKB'den sorumlu mekanizma ne olursa olsun, bu iki faktörden biri ya da her ikisinde artış olmalıdır. Kalp debisini, atım hacmi (stroke volüm) ile kalp hızının çarpımı belirlerken, sistemik damar direncini, damar çapı, damar duvarının yapısı ve damar düz

kaslarının tonüsü gibi faktörler belirler. Atım hacmini ön yük, art yük ve kalbin kasılma gücü etkilerken, damar düz kaslarının tonüsünü nörojenik, humoral, miyojenik ve lokal damar faktörleri tayin eder. Yüksek kan basıncının nedenleri arasında suçlanan faktörler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

2.1.1 Genetik :

YKB'nin etyolojisinde en önemli faktörlerden biri de genetikdir. YKB, ailevi bir özellik gösterir. Epidemiyolojik araştırmalar, genetik faktörlerin YKB'nin oluşumunda %30-60 gibi önemli derecede rol oynadığı göstermiştir. Bu konuda birden fazla genin ilgisi olduğu araştırmacılarca ileri sürülmektedir(7). Bu konuda ileri sürülen mekanizmalardan bazıları tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1: Hipertansiyondaki genetik mekanizmalar

<i>Gen mutasyonu</i>	<i>Ara fenotip</i>
Glukokortikoid reseptörü	Glukokortikoidlerde artma
Anjiyotensinojen	Anjiyotensinojende artma
SA geni	Bilinmiyor
Lipoprotein lipaz	İnsülin direnci
Nadir tek gen mutasyonları	
❖ Glukokortikoidle düzelen hiperaldosteronizm	❖ 18 hidroksillenmiş steroidlerde artma
❖ Görünürde mineralokortikoid fazlalığı	❖ Kortizon, kortizolde azalma
❖ Doğumsal sürrenal hiperplazisi	❖ Kortizol öncüllerinde artma
❖ Polikistik böbrek hastalığı	❖ Böbrekte kistler
❖ Liddle sendromu	❖ Hipokalemi
	❖ Hipokalemi

2.1.2 Kalp debisi:

Genç, yüksek kan basıncı bulunan ve dolaşımı hiperkinetik olan bazı kişilerde kalp debisinin artmış olduğu bulunmuştur. Kalp debisindeki artış iki yoldan ortaya çıkabilir; ya sıvı hacmi (ön yük) artacak, ya da kalbin sinirsel uyarılmasıyla kasılabilirliği artacaktır. Ancak kalp debisindeki artış hipertansiyonun başlamasından sorumlu olsa bile, yerleşmiş yüksek kan basıncında kalp debisinde artış olmamaktadır (9).

2.1.3 Aşırı sodyum alımı:

Tuz tüketimi yüksek olan toplumlarda hipertansiyon sıklığının fazla olması, tuz kısıtlaması ile kan basıncı değerlerinde düşüş görülmesi ve tuzdan fakir diyetle beslenen ilkel toplumların diyetlerindeki tuz artırıldığında YKB sıklığının artması, YKB etyolojisindeki tuz faktörünü ortaya koyan bilgilerimizdir. Geleneksel bilgilerimize göre, aşırı sodyum alınması sıvı hacmini ve ön yükü artırıp bu yoldan kalp debisini yükseltir ve sonucunda yüksek kan basıncı ortaya çıkar (10). Fakat sodyumun yüksek kan basıncı etyolojisindeki rolü bu bilgi ile sınırlandırılmaz.

Normal kişilerde kan basıncı yükseldiğinde böbreklerden sodyum ve su atılması artar, sıvı hacmi azalır ve basınç normale döner (basınç natriürezisi). Bu mekanizmadaki bozukluğun yüksek kan basıncına yol açabileceği düşünülüyor. Sodyum fazlalığı kan basıncını, damarsal reaktiviteyi etkileyerek de yükseltebilir. Diyetle sodyum alınması primer hipertansiyon patogenezi ile yakından ilişkilidir, ancak tek başına yeterli olmayan bir faktördür (11).

Diyetteki klorür: İnsanda NaCl ile kan basıncı, sodyumun klorür olmayan tuzlarına oranla daha fazla yükselmektedir (12).

Sodyum duyarlılığı: Batı ülkelerinde hemen herkes sodyum içeriği yüksek bir diyetle beslendiğinden, bu kişilerin yalnızca yarısında hipertansiyon gelişmesi, kan basıncının sodyuma duyarlılığının değişken derecede olduğunu düşündürmektedir. Sodyum duyarlılığı için birçok mekanizma ileri sürülmüştür. Mekanizması ne olursa

olsun sodyum duyarlılığı olasılıkla kalıtsaldır ve sodyum kısıtlamasına kan basıncı yanıtı anne ve çocuklarda birbirine çok benzemektedir (13).

Böbrekte sodyum tutulumu: Beslenme yoluyla gerekenden daha fazla sodyum alınması ve sodyuma duyarlılığın yanı sıra “esansiyel hipertansiyonda, böbreğin sodyum atımında isteksizlik gösterdiği” görüşü de bulunmaktadır (14).

2.1.4 Potasyum

K oranı yüksek diyetle beslenen ilkel toplumlarda YKB daha az görülmekteydi. Modern çağın getirdiği yüksek tuzlu (sodyumlu) diyet YKB görülme sıklığını artırmıştır. Potasyum alımındaki yetersizlik, en az aşırı sodyum alımı kadar sorumlu olabilir, ancak kanıtların çoğu sodyum fazlalığının birinci rol oynadığı lehinedir. (15)

2.1.5 Nefron sayısında azalma:

Bu hipotezde hipertansiyonun, nefron sayısında ya da glomerül başına filtrasyon yüzey alanındaki doğumsal bir azalma sonucunda ortaya çıkabileceği öne sürülmektedir (16).

2.1.6 Stress ve aşırı sempatik etkinlik:

Sempatik sinir sistemi aktivitesinde artış, kan basıncını birden bire ve belirgin derecede yükseltir, ayrıca bir çok yüksek kan basınçlıda görülen artmış kalp hızından da sorumlu olabilir. Aralıklarla yaşanan stresler sonucu böbrek üstü bezinin medullasından salgılanan katekolaminler; hem kan basıncında yükselmeyi başlatan presör mekanizma olmaya, hem de kan basıncı yüksekliğini damar hipertrofisi yoluyla sürdüren trofik mekanizma olmaya en iyi adaydır(17)

2.1.7 Çevresel direnç:

Çevresel dirençteki (periferik rezistans) yükselme, çapı 1mm'nin altında olan

distal arteriyolleri ilgilendirir. Yüksek kan basınçlı kişilerin, deri altı yağ dokularındaki küçük direnç damarlarının, normal kan basınçlılarla karşılaştırılması ile yapılan çalışmalarda, media kalınlığı/iç çap oranında %26-62 arasında değişen artışlar saptanmıştır(18).

2.1.8 Hücre zarındaki değişiklikler:

Yüksek kan basınçlı hayvan ve insanlarda hücre zarlarında birincil değişiklikler olmaktadır. Bu durum, iyonların anormal hareketine olanak tanıyarak, hücre içi koşullarını kasılma ve büyüme lehinde değiştirmektedir:

1. Hücre içi sodyum ölçümlerinin çoğunda, yüksek kan basınçlıların hücrelerindeki yoğunluk normal kan basınçlılardan daha yüksek bulunmuştur. Na-K ATPaz pompası etkinliğinde azalmaya bağlı hücre sodyumunda artış, buna yol açar.
2. Na-H değiştiricisinin güçlenmesi hem damar tonüsünü ve hücre büyümesini uyararak hem de böbrek proksimal tubulus hücrelerinde sodyum geri emilmesini artırarak hipertansiyon patogenezinde önemli rol oynayabilir.
3. Na-Li kotransportu da yüksek kan basınçlılarda artmıştır.
4. Birincil yüksek kan basıncı bulunan hastaların yaklaşık yarısında, lenfositlerde hücre içi serbest sitozolik kalsiyum yoğunluğunda artma saptanmıştır (19).

2.1.9 Atriyal natriüretik hormon:

Çevrede (periferde) damar genişletici etkisi vardır, dolayısı ile kan basıncını düşürür. Atriyumlarda hacim genişlemesine cevap olarak sentezlenir. Sodyum atıran etkisi glomeruler filtrasyon hızı (GFH)'ndaki artış sonucudur. Aferent arteriyolü genişletir, eferent arteriyolü daraltır. Norepinefrin, AngII, AVP gibi ajanlar tarafından daha önce daraltılmış damarlarda gevşeme yapar. Renin ve aldosteron salınımlarını baskılar(20).

2.1.10 Vazopressin:

Plazma ozmolaritesinin yükselmesine yanıt olarak arka hipofizden salgılanır. Bunun sonucunda sodyum ve su tutulması uyarılır. Sodyum tutulmasının fizyolojik önemi açık değildir(20).

2.1.11 Endotel işlev bozukluğu:

Endotel, fonksiyonları hakkındaki bilgilerimiz arttıkça, önemi ve üzerindeki araştırma sayısı çok fazla artan bir “organ” dır. Endotel tarafından salgılanan bir çok madde içinde ikisi, kan basıncı için önemlidir.

Nitrik oksit: Argininden nitrik oksit (NO) üretimi, pek çok değişken uyarıma bağlı olarak, pek çok hücre tipinde meydana gelir. NO endotelyal hücreden, komşu damar düz kaslarına nüfuz eder ve burada cGMP oluşumunu uyararak kan damarlarını genişletir. Esansiyel hipertansiyon bulunan hastalarda tüm vücut NO üretimi azalmıştır. Azlığında glomerül kapiller basınç artışı, böbrek kan akımının azalması, glomerüler kapiller geçirgenlikte azalma görülür. Sodyum atılımında belirgin düşüş ve sistemik kan basıncında yükselme oluşur (21).

Endotelin: Ang II ve norepinefrinden daha güçlü bir damar daraltıcıdır. Bilinen üç izoformu vardır. Endotelin I esas olarak endotelde sentezlenir, bilinen depo yeri yoktur. Endotelin etkilerini özgün reseptörleri yoluyla parakrin veya otokrin yolla ortaya koyar. Yüksek kan basınçlılarda katkısı kesin olarak bilinmemekle birlikte, plazma düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (22).

2.1.12 Şişmanlık:

Kilo fazlalığında, sempatik sinir sistemi ve RAAS aktivasyonu, plazma hacminin artması, hiperinsülinemi gibi mekanizmalarla kan basıncı değerlerinde artma meydana gelir. Şişmanlığın, YKB oluşumunda önemli risk faktörlerinden birisi olduğu kabul edilmektedir. Framingham çalışmasında erkeklerde yüksek kan basıncının %70'i ve kadınlarda da %61'i doğrudan yağ dokusunun fazlalığına atfedilmiş ve vücut

ağırlığında her 5 kiloluk artışa karşılık ortalama sistolik kan basıncının 4-5 mmHg yükseldiği belirlenmiştir(23). Özellikle merkezi şişmanlık YKB ile beraber koroner kalp hastalığı oluşmasını hızlandırmaktadır. Ayrıca, yüksek kan basıncı gelişeceğini gösteren en güçlü tahmin etmenlerinin ağırlık, yaş ve alkol tüketimi olduğu belirlenmiştir (24).

2.1.13 İnsülin direnci ve hiperinsülinemi:

İnsülin normalde damar genişletici bir etkiye sahiptir, ancak yüksek kan basınçlılarda ve yaşlılarda bu etkisi kaybolmuştur. İnsülin aynı zamanda etkili bir trofik hormondur ve damar endotelinde hipertrofiye neden olur. İnsülinin bir diğer etkisi böbreğe yaptığı etki ile sodyum ve suyun geri emilmesini artırmaktır. Hücre içi kalsiyumunu artırmak da insülinin kan basıncını artırıcı etkilerindedir. Şişman ya da şişman olmayan yüksek kan basınçlılarda hiperinsülineminin en önemli nedeni, çevresel insülin direncidir. Bu direnç genetik bir yatkınlıktan olabilir (25).

2.1.14 Sigara:

Nikotin, nikotinic reseptörlere etki ederek, adrenerjik sinir uçlarında noradrenalin salınmasına neden olmaktadır. Düşük nikotinli, düşük katranlı ya da filtreli sigara içimi kalp damar sistemi hastalık riskini değiştirmez. Sigara dumanındaki nikotin, aşırı sigara tiryakilerinin bile kan basıncını akut olarak yükseltmektedir (26). Tolerans gelişmez ve bu yüzden hasta sigara içmeyi sürdürdükçe kan basıncı yüksek kalmaktadır (27). Ancak her sigaranın etkisi geçicidir ve 30 dk içinde etkisi kaybolmaktadır. Bu nedenle sigaranın etkisini görmek için, içicilerde kan basıncı değerlerine, bu yarım saat içinde bakılmalıdır. Sigaranın etkisinden bağımsız kan basıncı değerleri için ise içimden yarım saat sonra kan basıncı ölçülmelidir. Sigara, insülin direnci, endotele bağımlı gevşemede zayıflama ve endotelin düzeylerinde bir yükselmeye YKB'ye yol açar (28).

2.1.15 Alkol:

Makul ölçülerde alınan alkolün kan basıncı üzerine olumlu etkilerinin olduğunu

savunan görüşlerin aksine, bir çok yazar, makul ölçülerde bile olsa süreğen (kronik) alkol tüketiminin kan basıncını yükselttiğini savunmaktadır. Daha fazla miktarlardaki alkol ise yüksek kan basıncının önemli bir bölümünden sorumlu tutulabilir. Alkol sempatik sinir sistemini ve RAAS'yi aktive ederek, plazma kortizon düzeyini artırarak kan basıncı değerlerini yükseltir (29).

2.1.16 Kalsiyum ve paratiroid hormonu:

Diyetle alınan kalsiyum ile kan basıncı arasında zıt bir ilişki vardır fakat bu ilişki kan basıncı yüksek hastalara kalsiyum verilmesini gerektirecek kadar kuvvetli değildir. Yeterli günlük kalsiyum alımı dışında ek kalsiyum alımı önerilmemektedir. Serum kalsiyumunun azalması ile gelişen hiperparatiroidinin YKB etyolojisinde rol oynadığı sanılmaktadır. Yüksek kan basıncı kişilerde damar düz kas hücrelerinde kalsiyum düzeyi yüksektir. Hücre içi kalsiyumun, dışarı çıkmasında sorun olduğu varsayılmaktadır (30).

2.1.17 Fiziksel hareketsizlik:

Fiziksel açıdan aktif ve antrenmanlı kişilerde daha az yüksek kan basıncı gelişmektedir. Hipertansiflerde de düzenli izotonik egzersize başladıktan sonra kan basıncında düşme görülmektedir(31). Egzersize yeni başlayan hastalardaki görülebilecek kan basıncı artışları zamanla azalacaktır. Bu sorun egzersizin bırakılmasına yol açmamalıdır. Fakat egzersiz öncesi çok yüksek kan basıncı değerleri kontrol altına alınmalıdır(32).

2.1.18 Öteki olası mekanizmalar:

Anormal steroid metabolizması: YKB'de kortikosteron düzeylerinde hafif bir yükselme ve glukokortikoidlere vazokonstriktör duyarlılıkta artma bildirilmiştir(33).

Vazoaktif peptidler: YKB'de natriüretik peptid, adrenomedullin, kallikrein, kinin, dopamin, serotonin, vazopressin, opioid peptidler, nöropeptid Y ve medullipinin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Prostaglandinler: Çeşitli prostaglandinler kan basıncı değerlerine, yükseltici veya indirici etki ederler. Damar kasılmasını sağlayan prostaglandinlerin artması veya damar gevşeticilerin düzeyinin azalması kan basıncı değerlerinde yükselme yapacaktır(34).

Katkıda bulunan etmenler:

1. *Fötal koşullar:* YKB gelişimi inutero başlıyor olabilir. İnutero büyüme yavaşlamasına bağlı düşük doğum tartısı, yapılan tarama çalışmalarının çoğunda daha sonraki yıllarda yüksek kan basıncı gelişmesiyle ilişkili bulunmuştur(35).
2. *Öteki mineraller* (kurşun, Mg, vb)
3. *Kafein:* Koyu bir bardak kahvede bulunan kafein diyastolik kan basıncını, kan basıncı çok az yüksek erkeklerde 8 mmHg yükseltirken, normallerde yalnızca 3 mmHg yükseltiyor(36).
4. *Çevre sıcaklığı ve yükseklik:* Soğuk iklimlerde kan basıncı yüksek olma eğilimindedir. Ayrıca yüksek bölgelerde yaşayanlarda hipertansiyon daha sık görülebilmektedir(37).
5. *Baroreseptörler:* Kan basıncı yükseldiğinde devreye giren bu reseptörler, sempatik baskılama ile kalp hızını ve kan basıncını düşürürler. Bu mekanizmanın bozukluğu da YKB etyolojisinde rol oynayabilir(38).
6. *Edinsel natriüretik hormon:* Bu natriüretik hormon, kısa bir süre önce belirlenen, beyin ve atriyumdaki natriüretik peptitlerden hem işlevsel hem de kimyasal açıdan tümüyle farklıdır(39).

3. RENİN-ANJİYOTENSİN-ALDOSTERON SİSTEMİ (RAAS):

Renin angiotensin sistemi vücutta homeostatik bir çok olayda önemli rol oynayan hem dolaşımda hem de hücrel hiyerarşik organizasyon yapısında –COOH ucunu [Ang (1-8) (ANG II), Ang (2-8),) ANG III), Ang (3-8)) ANG IV)] veya NH₂ ucunu

[Ang (1-7)] aktif hormonları oluşturan enzimlerle karakterize biyokimyasal bir networktür [şekil1]. Özellikle su-elektrolit dengesinin, kan volumünün ve arter kan basıncının düzenlenmesinde ve fizyolojik düzeylerde devamının sağlanmasında temel görev yüklenir. Son çalışmalar RAS'ın kardiyovasküler hastalıkların ve konjestif kalp yetmezliğinin patofizyolojisinden sorumlu olduğunda göstermiştir (40).

RAS'ın etkileri en iyi bilinen aktif peptid hormonu Angiotensin II (ANG II) dir. Ang II bir dizi koordine çalışan enzimatik reaksiyon sonucunda sentezlenir. (41). Bu kaskat böbreklerde sentezlenen bir proteaz olan reninle başlar. Renin karaciğerde sentezlenen anjiotensinojene etki ederek fizyolojik olarak inaktif olan Angiotensin I (Ang I)'i oluşturur. Ang I' Angiotensin dönüştürücü enzim(ACE) etki ederek fizyolojik olarak aktif oktapeptit olan Angiotensin II (Ang II) oluşur. ACE bir çinko metaloprotezdir ve ilk olarak akciğerlerde bulunmuştur ve 1956 yılında hipertansiyon dönüştürücü enzim olarak tanımlanmıştır (42). ACE aynı zamanda vasodilatör olan bradykininin katabolizma ve inaktivasyonu dan da sorumludur. Ek olarak ACE klasik yolunun haricinde başka alternatif yollarla da fizyolojik olarak aktif Ang II sentezini gerçekleştirilebilmektedir bunlardan biriside kimaz yoludur (43).

Ang II sentezinin ardından Ang II sistemik dolaşım ile periferik dokuya aktarılır ve hedef hücre üzerine olan etkisini G-protein bağlı angiotensin tip-1 reseptörü (AT₁R) ve tip-2 reseptörü (AT₂R) aracılığıyla gerçekleştirir. Vasokonstriksiyon, mitojenik ve hipertrofik etki, inflamatuvar cevap ve tuz-su dengesi gibi Ang II'nin etkisine bağlanan birçok kardiyovasküler etki AT₁R'nün aktivasyonu ile gerçekleşir. (43). Fosfolipitleri (PLC,PLD,PLA2), NAD(P)H'nin stimülasyonu ve reaktif oksijen radikallerini (O₂, H₂O₂), gen transkripsiyonunun indüklenmesi(protoonkogenler: c-fos, c-jun, c-myc) ve tirozinkinazların aktivasyonunu (Src, JAK/STAT, FAK, Pyk2, p130Cas, PI3-kinase) içeren kompleks etkileşim gösteren sinyal yolları ile bu etkiler görülür. Bu etkilerin bazıları PDGFR, EGFR ve IGFR içeren tirozin kinaz reseptörlerinin transaktivasyonu ile direk veya indirek olarak görülebilir (44). AT₁R aracılığıyla olan etkinin aksine AT₂R apoptozis, natriüresis ve büyük ölçüde BK ve nitrik oksit (NO)'in neden olduğu vasodilatasyon gibi karşıt dengeleyici etkiye sebep olduğu düşünülmektedir (45).

Bu oluşumun ardından Ang II hızlı bir şekilde dolaşımda veya dokularda anjiyotensinazlar olarak isimlendirilen peptidazlar tarafından des-aspartyl1-AngII

[AngIII], angiotensin (1-7) [Ang(1-7)], AngIV ve Ang(3-8)'e dönüştürülür. Bu Ang II parçaları güçlü bir vazopressör olan Ang III ve BK, NO ve prostoglandin (PG) yapımını stimule eden Ang (1-7) dışında büyük ölçüde inaktiftir (46).

3.1 RAS'ın fizyolojik rolü

RAS'ın öncelikli görevi özellikle kan basıncının azalması durumunda veya hipotensif uyarı durumunda kan basıncının düzenlenmesinde görev yapar (47). Bu dengeleme başlıca Ang II'nin böbreklerde su ve tuz tutulumunu sağlayan aldosteron salınımını, vasokonstriksiyonu ve sempatik tonusu stimule etmesiyle arterial basıncı dengelemesiyle oluşur. Bununla birlikte RAS'ın hipertansiyon gibi homeostatik dengeyi kaybetmesi kalp kusurları, hipertrofik değişimler, kalp krizleri, atherosklerazis gibi kardiyovasküler ve renal hastalıklara bağlıdır. Bunlar dışında hipertansiyonla RAS arasındaki ilişkinin büyük bölümü genetik özelliklere bağlıdır. Bizim bu konudaki bilgilerimiz geniş çapta böbreğin fonksiyonuyla ve morfolojisiyle ilişkili olmayan hipertansiyonda RAS'ın renin, ACE, AGT, AT₁R gibi anahtar bileşenleri olmayan farelerde ve bu bileşenlerin mutant formlarına sahip farelerde kan basıncı üzerine yapılan araştırmalardan gelmektedir (48). Hipertansiyonda en çok kullanılan fare modellerinden birisi spontaneously hypertensive rat (SHR) modelidir. Primer hipertansiyonun başlaması, gelişmesi ve sürmesi konusundaki önemli bir hipotez anormal renal ekskresyon fonksiyonudur (49). Renal vücut sıvısı feedback mekanizması arterial basıncın uzun dönem düzenlenmesiyle böbreklerin üriner sodyum ve su ekskresyonunun değişimi ile arterial basınç değişimine cevabı olan natriüresis ile bağdaştırılır. Renal sempatik sinirlerin aktivasyonu (RSNA) gibi faktörler renal ekskresyon fonksiyonunun azalmasına ve arteriyal basıncın artmasına neden olmaktadır (50). RSNA'nın renal etkileri; tubular sodyum reabsorpsiyonunda artış, renal kan akışında azalma ve glomerular filtrasyon hızında artışla renal vasküler direncin artması ve renin salınımının yükselmesinin neden olduğu Ang II üretimini artırmasını içerir (şekil 1). RSNA arteriyal baroreflaks sisteminin negatif düzenlenmesi kontrolü altındadır. RAS hem kan basıncının düzenlenmesinde hem de kardiyovasküler yapının homeostazında önemli görevleri vardır, bu yüzden RAS'ın anahtar bileşenleri

farmakolojik olarak önemlidir. ACE inhibitörleri ve AT1R blokörleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Angiotensinler hem karaciğer, böbrek ve akciğerlerin katkılarıyla dolaşım (sistemik Ras); hem de vücudun hemen tüm organ ve dokularında lokal olarak doku RAS'ı üretirler ve görev yaparlar. Sistemik RAS ve lokal doku RAS'ı, fonksiyonlarını karşılıklı desteklerler, fakat bağımsız olarak gerçekleştirirler. RAS'ın tanımlanması reninin keşfi ile başlar (51).

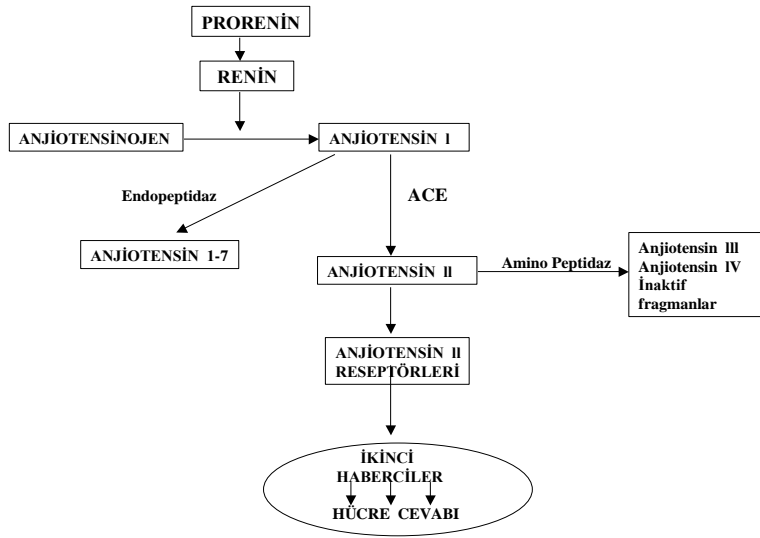
3.2 Dokulardaki RAS'a karşı dolaşımdaki RAS:

Geleneksel görüşte endokrin RAS'ın birleşenleri spesifik dokulardan salgılanır ve bunlar şöyledir; Anjiotensinojen karaciğerden, renin böbreklerden ve ACE akciğerden salınır (şekil 2). Fakat son on yılda yapılan çalışmalar hem klasik görüşü genişletmiş hem de doku RAS'ını tamamen tanımlamıştır. Bu para-oto-ve intrakrin sistem hipertansiyonla alakalı hipertrofi ve diğer doku patolojisinde kritik öneme sahiptir. Bu sistemin anlaşılması akışkanlığın ve elektrolit dengesinin, arteriyel basıncın ve doku homeostazının mekanizmasının anlaşılmasına ve kontrolünün sağlanmasına böylece kardiyovasküler ve renal hastalıklarda yeni tedavi şekillerinin bulunmasını sağlayacaktır.

RAS'ın inhibitörleri plazma renin aktivitesini arttıran supresyonun varlığında kan basıncını düşürme kapasitesine sahiptir. Bu, inhibitörlerin RAS dokularının büyük kısmının blokajına bağlı olan yararlı etkilerine ilişkin konsepti desteklemektedir. Bu Ang II konsantrasyonlarının plazma seviyelerini aşabileceğini ve vasküler direncin kardiyak ve adrenal fonksiyonların ve intra-renal olayların kontrolünde önemli rol oynayabileceğini gösterir (52).

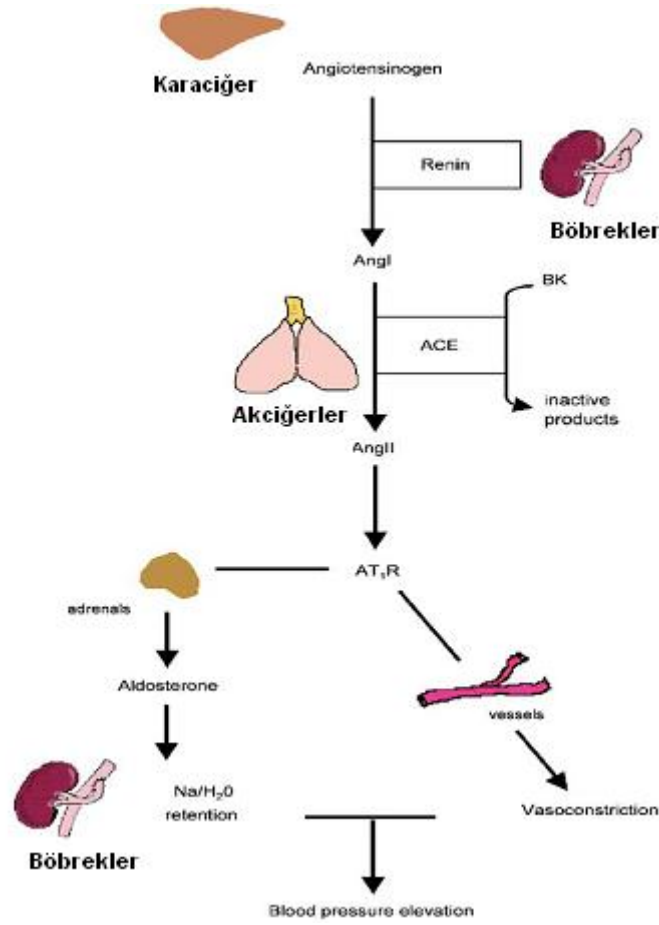
Yapılan çalışmalar sonucunda oluşan ortak görüş, dolaşım RAS'ı akut hemodinamik dengenin kurulmasında önemli olduğunu, bununla birlikte doku RAS'ı doku homeostazı ve remodeling ile uzun dönemde hemodinamik dengenin sağlanmasında kritik öneme sahip olduğudur (53). Bunun için temel destek kanıtlarının 2 tanesinden köken almaktadır. Birincisi, doku ACE seviyesi MI(54) ve kalp yetmezliği gibi patolojilerde artmaktadır. Bundan dolayı, artmış kardiyak ACE miktarı

miyokardiyal duvar stresi (54) ve yaşlanma süreciyle koreledir. İlave olarak, hasarlı miyokarda hücum eden makrofajlar Ang II'nin akümüle olduğu interstisyel bölgede yüksek seviyede ACE taşır (55). İkincisi, başarılı bir ACE inhibisyonu hedef dokuda faydalı sonuçların gelişmesini hedefler. Aslında ACE temel olarak plazmada bulunan %10'dan az aktiviteye sahip doku temelli bir enzimdir (56).



Şekil 1: Renin-angiotensin-aldosteron aksı

Bunun fonksiyonel önemi genetik olarak değiştirilen ACE dokusundan yoksun farelerde gösterilmiştir. Bu hayvanlar önemli bir plazma ACE seviyesi gösterir fakat hipertansiyon gelişimi gösterirler (57). Hipertansif kalp hastalığında lokal kardiyak RAS'ın desteklenmesi, antihipertansif etkisinden bağımsız RAS blokajının kardiyoprotektif ve antiproliferatif etkisine bağlı olabilir. Gerçekten farklı ACEi ve ARB'nin hemodinamik ve yapısal etkileri arasındaki ayırım için arterial basınç değişikliklerinden bağımsız olarak ortaya çıkan azalmış sol ventriküler hacimde olduğu gibi, bildirilmiştir (58). Kanıtlar doku ACE'nin ACEi'nin eyleminin temel alanı olduğunu ileri sürdüğünden beri, ACEi'nin inhibisyonunun daha fazla bağımlıdır(59). Bu yüzden ACEi'nin doku dağılımı ve kinetiği ilaç etkisinden çok fazla önemli olduğunun bir belirleyicisidir (60).

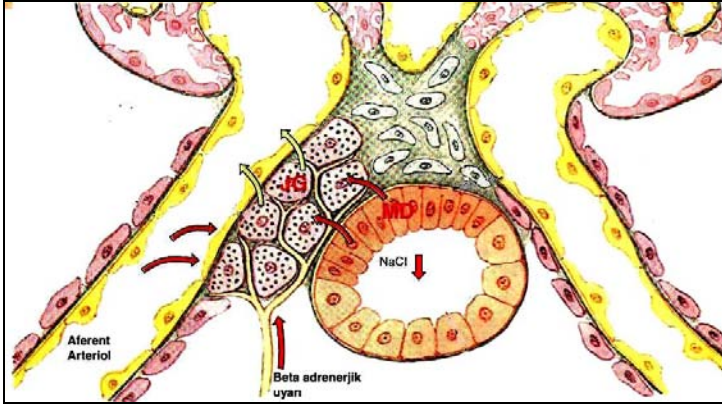


Şekil 2: Klasik görüşte RAS'ın bileşenlerinin spesifik dokulardan salınımı(61)

3.3 RENİN:

Renin, aferent arterioldeki juxtaglomerüler (JG) hücrelerden prorenin olarak salgılanır. Bu hücreler Henle'nin çıkan bacağına macula densa hücrelerine ve glomerülün göbeğindeki mezangiyal hücelere yakındırlar ve burada hep birlikte JG aparatı oluştururlar (şekil 3). Renin (J-G) hücreler başta olmak üzere, bazı hücelerde yapılan 40. 000 mol. ağırlıklı bir glikoprotein enzimdir. Enzimlerin aspartil proteaz ailesindedir ve pre-proprotein şeklinde (preprorenin) sentez edilir. Dörtüyzaltı amino asidli bu ilk proteinden 20 amino asidin ayrılması ile prorenin oluşur ve bunun ilk 43 aminoasidi aktif enzimi oluşturmak üzere ayrılır. Plazma anjiotensin II (Ang II) düzeyleri büyük ölçüde böbrek orijinli renine bağlı olmakla beraber, böbrek dışı rennin

ve/veya prorenin'in de bir miktar katkısı vardır. Pitüiter, beyin, damar endoteli ve düz kas dokusu, adrenal gland, desidua, koriyon, testisler, overler gibi diğer dokularda prorenin ve renin yapımı gösterilmiştir. Renin, sentezlendiği dokularda granüller içinde depolanır ve spesifik sekretagolara cevap olarak (renal perfüzyon basıncı değişiklikleri, hipopotasemi, Ang II düzeyi düşmesi veya adrenerjik sinir sistemi aktivasyonu) salınır. J-G hücrelerden renin salınımını artıran mekanizmalar nöral ve nöral olmayan uyarılar olarak ayrılabilir. Dikey postür ve egzersiz büyük ölçüde nöraldır ; sempatik system aracılığı ile ve β -blokerler ile baskılanır. Sodyum kısıtlaması ve diüretikler ise nöral olmayan uyarılardır (61).



Şekil 3: Jukstaglomerüler aparat ve renin salgılanmasında önemli faktörler.

JG: Jukstaglomerüler hücreler, MD: Makula densa

YKB'de, yüksek veya normal kan hacmi ve yüksek kan basıncının etkilerine uygun olarak renin salıverilmesinde baskılanma ve dolayısıyla düşük plazma renin düzeyleri beklenir. Fakat hastaların çoğunda renin düzeyleri normal ya da yüksek bulunur. Bu düzeylerin uygunsuz olması, akla hastalık patogenezinde reninin direkt bir rol oynayıp oynamadığını getirmiştir. Birincil YKB bulunan bir çok hastada bu mekanizma anormal şekilde etkilenmiş olabilir(62).

3.3.1 Renin Salınımını etkileyen faktörler:

1. Afferent arteriyollerdeki basınç (baroreseptör mekanizma): Afferent arteriyollerdeki

basıncın azalması rennin salınımını uyarır. Dolaşımın normal olduğu durumlarda, kan basıncındaki değişiklikler sistemi az etkiler

2. Makula densa: Özelleşmiş bir gurup distal tüp hücresidir ki, distal tüplerde bulunan sodyum ve klorun değişiminde kemoreseptör fonksiyonu görür. Makula densadaki sodyum ve klor düzeyinin azalması rennin salınımını artırır. Plazma hacminin azalması durumunda, proksimal tüplerden sodyum geri emiliminin artması distal tüplere daha az miktarda ve sodyum konsantrasyonu düşük sıvının ulaşmasına neden olur.

3. J-G hücreleri innerve eden renal sempatik sinirlerin stimülasyonu, adrenerjik β_1 -reseptörler aracılığı ile, rennin salınımını uyarır; α -adrenerjik uyarı ise rennin salınımını azaltır.

4. Böbrekteki Ang II'nin rennin salınımını baskılaması: Renin J-G hücrelerden renal arterlere salınıyorken bir miktar anjiyotensin I (AI) oluşur ve bu da böbrek içinde aktif Ang II'ye dönüşür. Böbrek içindeki bu Ang II rennin salınımını doğrudan baskılar.

5. Katekolaminler, parathormon, glukagon rennin salınımını uyarır.

6. Plazma elektrolit düzeyleri: Hiperkalemi rennin salınımını azaltır, hipokalemi artırır. Sodyumun, fizyolojik şartlarda, rennin salınımına etkisi azdır. Diyetteki sodyum miktarı rennin salınımını doğrudan etkiler; gerçi, sodyum miktarı günde 50 mEq'ın altına ininceye kadar plazma rennin aktivitesinde (PRA) anlamlı bir artış olmaz. Plazma magnezyum düzeyinin artması rennin salınımını uyarır, azalması rennin salınımını azaltır.

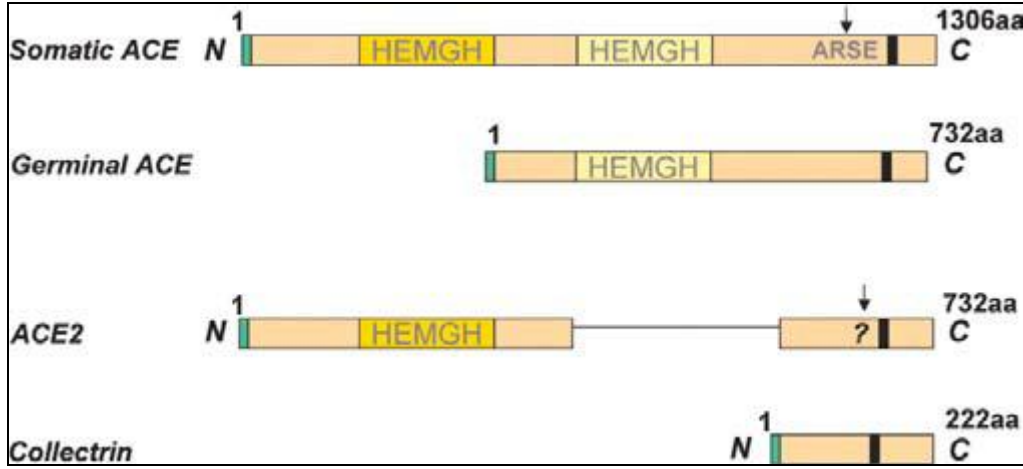
PRA hem normotansif hem hipertansiflerde, yaşın ilerlemesiyle azalır. Bu durum fonksiyon gören J-G hücre kitlesinde yaşla artan azalmayı yansıtabilir. Siyah ırkta PRA daha düşüktür. Uykunun REM periyodunda rennin düzeyi süratle azalır. Menstrüyel siklusun luteal fazında PRA artar. Bunların dışında çok sayıda patolojik ve farmakolojik değişiklikler rennin salınımını ve PRA'ni etkiler. İnsanlarda rennin kodlayan gen kromozom 1' in kısa kolunda yerleşmiştir (1q32-1q42). Rennin karaciğer, böbrek ve plazmada proteolitik enzimler tarafından inaktive edilir veya böbrekler tarafından ve safrayla atılır. Plazmadaki yarı ömrü 10-20 dk. dır(62).

3.4 ANGIOTENSİNOJEN (RENİN SUBSTRAT):

Karaciğerde yapılan bir α_2 globulindir. Karaciğer dışı dokularda da (böbrek, beyin, adrenal, aort, kalb, testisler) daha az miktarlarda yapılır. Ang II, östrojen, glukokortikoidler, tiroid hormonu ve inflamatuvar mediyatörler anjiotensinojen yapımını artırır, glukagon ve bazı prostaglandinler ise azaltır. Reninin bilinen yegane substratıdır ve anjiotensin peptidlerine katabolize edilir. İnsan anjiotensinojeni proteinlerin serpin ailesindedir ve 1. Kromozomda renin geninin yanındaki bir gen (11q24.3) tarafından kodlanır. Önce 485 a.a. li bir protein yapılırdı; bunun sekresyonundan sonra 33 a.a. li presegment ayrılır, bu presegmentten sonraki ilk 10 a.a. Ang I' i oluşturur. Bir dekapeptid olan Ang I, Ang II'nin ön maddesidir (43).

3.5 ANGIOTENSİN-DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ACE):

İlk olarak 1956 yılında hipertensiyon dönüştürücü enzim adıyla izole edilmiştir (42). Bir dipeptidil karboksil çinko metallopeptidaz' dır ve Ang II yapımında rolü olan ikinci enzimdir. Genellikle hücre membranlarına bağlı bulunursa da, Ang II yapan bazı dokularda hücre içindeki granüllerde de vardır. Mol. Ağırlığı reninden oldukça fazladır. İnsanlarda ACE geni kromozom 17q23 dedir ve ACE'nin bu tek genden yapılan 2 moleküler formu vardır, bunlar somatik ve germinal formdur (43). ACE'nin somatik formu akciğerlerdeki endotelial yüzeyde ve böbreklerin membranlarında, bağırsaklarda, plasentada ve choroid pleksusta bulunur (63). Germinal formu ise özellikle testislerde bulunur ve fertilitede önemli role sahiptir (64). ACE bir peptidyl dipeptidaz olarak substratın C-terminal bölgesini uzaklaştırır. Somatik ACE iki homolog bölge içerir bunlar C-terminal ve N-terminal bölgeleridir (65)(şekil 4). Her iki bölgede çinko-bağlı motif (His-Glu-X-X-His) içerir ve bu motif birçok çinko peptidazda vardır. Germinal ACE ise tek katalitik bölge içerir ve bu bölge somatik ACE'nin C-terminal bölgesiyle örtüşür (66) (şekil 5).



Şekil 4: somatik ACE, germinal ACE, ACE2 ve Collectrin'nin domain bölgelerinin yapıları (67).

3.6 ANJİOTENSİN PEPTİDLERİ:

Bu güne dek Ang II'nin RAS'ın başlıca etkin hormonu olduğu düşünülmekteydi. Fakat yapılan son araştırmalar RAS'da başka aktif angiotensinlerinde görev aldığı bulunmuştur. Deneysel çalışmalar AngI'in, heptapeptid A(1-7)'nin üretimi için gerekli bir madde olduğunu göstermiştir.(68). A1-7'nin Ang II'den çok farklı ilginç etkileri vardır. Hayvan deneyleri ve hücre kültürleri Ang(1-7)'nin büyümeyi inhibe eden hücresel olaylarda aracı olan vazodiyalör prostoglandinlerin salgılanmasını uyardığını belirlemişlerdir.(69)

Ayrıca ang(1-7) su tuz atılımını, böbrek kan akımından bağımsız bir mekanizma ile artırılmaktadır(70). Ang(1-7)'nin, AngII etkisi ile gelişen çoğalmaya karşı antiproliferatif bir faktör olarak etki yaptığını destekleyen deneysel bulgular vardır. Ang(1-7)'nin düz kas hücrelerinde büyümeyi, endotelden prostoglandin ve NO salgılanmasını uyarak inhibe ettiği bulunmuştur.

Ang I'in Ang II'ye veya Ang(1-7)'e dönüşüm hızları henüz yeterince bilinmemektedir. Ancak, AngII üretiminin baskı altına alınması durumunda Ang(1-7) üretimi belirgin miktarda artmaktadır. Hipertansif insan ve deney hayvanlarının ACE inhibitörleriyle uzun süreli tedavisinde, Ang(1-7) düzeyinin arttığı belirlenmiştir(71). Ang(3-8)(AngIV) yeni belirlenmiş, biyolojik olarak aktif olan bir angiotensin peptididir(72).

Kardiyovasküler dokularda ve beyin bazı önemli bölgelerinde bu peptidin özel bağlanma yerleri belirlenmiştir. AngIV, AT1 ve AT2 reseptör antagonistleri ile inhibe

edilememektedir. AngII veya Ang(1-7) gibi serbest peptidlerin afinite gösterdiği N ucuna da afinite göstermezler. İlginç bir diğer bulguda Ang IV reseptörlerinin Ang (3-8) ve Ang(3-7)'yi birbirinden ayıramaması her iki peptide de aynı afiniteyi göstermesidir. Bu reseptörler beyin arterlerinde vazodilatasyona neden olurlar. Ang IV periferik olarak uygulandığında AT1 reseptörlerini uyararak vazokonstriksiyona neden olur(73).

3.6.1 ANGIOTENSİN II:

Anjiotensin (AII), RAS'ın asıl, aktif mediatörüdür. Kan volümü ve vasküler rezistansı düzenlemedeki önemli rolünden dolayı, kardiyovasküler homeostazın düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Her ne kadar AII asıl mediatör ise de Anjiotensinojen (Ang 0)'den orjin alan Ang III (A 2-8), Ang IV (A 3-8) ve Ang (1-7)'nin de rolü olduğu bilinmektedir.1-3 Ang II'den aminopeptidazların etkisi ile AIII ve Ang IV oluşurken, Ang 1-7; doku endopeptidazları deneni nötral endopeptidaz (NEP) 24.11, NEP 24.15 ve NEP 24.26' ların Ang I'e etkisi ile oluşmaktadır.4 Ang II'nin geniş spektrumlu bir doku hedefi vardır; adrenaller, böbrekler, beyin, hipofiz bezi, damar düz kasları, ve sempatik sinir sistemi gibi. Anjiotensin sadece dolaşımda bulunan hormon olmayıp, aynı zamanda beyin, kalp, böbrek ve kan damarları gibi pek çok dokuda da üretilir. Böylelikle, Ang II hem parakrin hem de otokrin hormon görevi yapar. Hücre büyümesinde proliferasyon ve ekstrasellüler matriks oluşumunu da kontrol eden önemli övler üstlenmiştir. Diğer peptid hormonlar gibi Ang II de hedef hücrelerin plazma membranlarında yerleşik bulunan reseptörler aracılığı ile etki eder.

AII'nin etkisi hormona sensitif dokuların (damar düz kas hücreleri, adrenal korteks glomeruloza tabakası, renal glomerüller, santral sinir sistemi ve uterus) plazma membranlarındaki reseptörler aracılığı ile edilir. Ang II, normal ekstrasellüler volüm ve kan basıncını devam ettirme fonksiyonunu AT1 reseptörleri aracılığı ile, 5 yolla yapar: 1) Vasküler düz kasların konstriksiyonu ile kan basıncını artırır ve renal kan akımını azaltır. 2) Adrenal medulladan norepinefrin ve epinefrin salınımını artırır. 3) Sempatik sinir uçlarından norepinefrin salınımını artırarak, sempatik sinir sistemi aktivitesini artırır .4) Vasopresin salınımını artırır. 5) Aldosteron sekresyonunu artırır. Bu

fonksiyonları dışında, AT1 reseptörleri üzerinden olan diğer fonksiyonları: 1) Hipofizden ACTH salınımını azaltması 2) Plasenta ve over fonksiyonları üzerine muhtemel etkileri 3) Kalp, böbrekler ve vasküler düz kasların hipertrofi ve hiperplazisine neden olması; yani doku gelişme faktörü “growth” factor, gibi etki göstermesi. Bu etkisi ile atherosklerozda rol oynar. 4) Plazminojen aktivator inhibitör tip 1 (PAI-1)’i aktive ederek koagülasyonu etkilemesi (ki vazokonstriktör etkisi ile de trombotik olaylara uygun zemin hazırlar) ile de protrombotik etki gösterir. Ayrıca platelet adhezyonunu ve tromboksan yapımını artırır; nitrik oksid aktivitesini azaltır. Tablo 2 de çeşitli dokularda AII’nin etkileri özetlenmiştir(62).

Ang II’ nin AT2 reseptörleri aracılığı ile olan etkileri, AT1 reseptörleri üzerinden olan etkilerini birçok yönden antagonize eder: Vazodilatasyon, renal sodium kaybı, apoptozis (bu etki, AT1 aktivasyonu ile olan büyümeyi artırıcı etkisini antagonize eder).

ACE inhibitörlerinin primer HT’deki etkinliği, RA sisteminin etiopatogenezdeki rolünü destekler. Ayrıca, RA sisteminin blokajı vasküler proliferasyonu da önler. Normal veya yüksek reninli HT’da beta-blokerlere de iyi cevap alınır.

Renin angiotensin sistemi memeli organizmalardaki kan basıncının düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Renin ilk defa 1890 yılında tanımlanmış fakat detaylı araştırmalar 1970 yılında başlamıştır. ACE nin keşfi ile RAS’ın önemini birkez daha anlaşılmasından 50 yıl sonra yani 2000 yılında RAS üzerindeki genomik temelli stratejiler, ACEnin homoloğu olan ACE2 nin keşfiyle büyük ölçüde değişmiştir.

Tablo 2: Çeşitli Hedef Dokularda Anjiotensin II'nin Etkileri

Etki	Hedef Doku
Vazokonstrüksiyon	Damar düz kası
Hipertrofi / hiperplazi	Damar düz kası
Aldosteron sekresyonu	Adrenal zona glomeruloza
Kontraktilite, hipertrofi	Miyokard
Embriyogenezis	
Sodyum reabsorpsiyonu	Böbreğin proksimal tüpleri
Kontraksiyon	Böbreğin mezanşimi
Renin salınımının inhibisyonu	Jukstaglomerüler hücreler
Prostaglandinler, nitrik oksid ve endotelinin artması	Damar endoteli
Ekstrasellüler matriks sentezi	Damar bağ dokusu
Platelet agregasyonu	Plateletler
Monosit adhezyonu	Damar duvarı
Prolaktin inhibisyonu	Anteriyör pitüiter
ADH inhibisyonu, susama	Posteriyör pitüiter
Norepinefrin salınımı	Sempatik nöronlar
Katekolamin salınımı	Adrenal medulla
Pressör kontrol	Beyin
Baroreseptör kontrol	Beyin
ADH kontrolü	Beyin
Tuz/su absorpsiyonu	Barsak (AT2)
Anjiotensinojen sentezi	Karaciğer
Glikojenolizis	Karaciğer
Apoptozisde azalma	Dokular

Norman M. Kplan. Klinik Hipertansiyon.Turgu Yayıncılık ve Ticaret A.Ş.,1998. S:59(62)

4. ANGIOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM 2 (ACE2) :

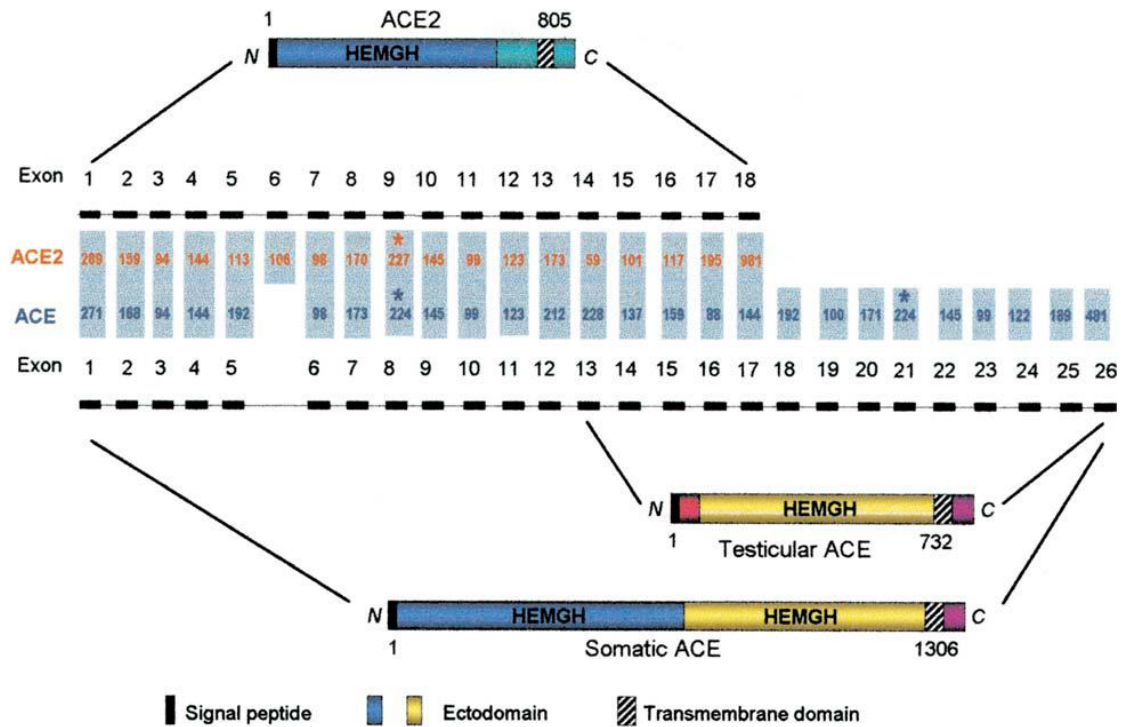
2000 yılında yani ACE nin keşfinden 50 yıl sonra genomik temelli stratejiler ACE nin homoloğu olan ACE2 nin keşfiyle değişmiştir(74).

4.1 ACE2'nin Yapısı:

Yapılan çalışmalarda insan ve fare ACE2 gen yapılarının %82-86 oranında benzer olduğu görülmüştür. İnsan ACE2 geni 18 ekson bölgesi içerir ve ilk 12 ekson bölgesi ACE'nin ilk 11 ekson bölgesinin homologudur (67). ACE2 çinko bağlı bölgesi olan (HEXXH) bölgesini 9. Ekson bölgesinde bulundurur ACE'de bu bölgeye karşılık gelen bölge 5. Ekson bölgesidir.

ACE2 805 amino asitten oluşur ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 120 Da dur. ACE2 bir metalopeptidazdır ve ACE ile %42 sekans benzerliği gösterir (67). ACE2 protein sekansı N-terminal ve C-terminalin yanındaki hidrofobik bölgenin potansiyel sinyal peptidi olduğunu göstermiştir, bu ACE2 nin ACE gibi tip-I integral membran proteini olduğunu göstermiştir. ACE, ACE2 den farklı olarak 2 izoform içerir (şekil 5). ACE2 ise sadece tek özel protein formundadır. ACE ve ACE2 nin genomik dizilimleri çok sayıda benzerlik gösterir. Bununla birlikte ACE bir dipeptidyl- karboksi peptidaz ACE2 ise bir karboksi peptidazdır.

Analizler ACE2 nin Ang I den Ang (1-9) ve Ang II den Ang (1-7)yi hidrolize ettiğini göstermiştir ayrıca ACE2 substrat olarak Ang II ye Ang I e oranla yaklaşık 400 kat fazla katalitik etki gösterir (75).



Şekil 5: ACE ve ACE2 genlerinin ekson bölgeleri(76)

ACE2 ilk olarak kalp yetmezliğindeki cDNA (77) ve insan lenfoma cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır (78). ACE2nin genomik sekans araştırmaları sonucunda genin 18 exon bölgesi içerdiği ve insanlarda Xp22 (79), kemirgenlerde Xq22 (80) ve farelerde XF5 (81) kromozomal yerleşimli olduğu bulunmuştur. Tam boydaki ACE2 805 amino asitten oluşur ve ACEnin N-terminal katalitik bölgesiyle ve C-terminusun yanındaki hidrofobik bölgeyle %42 homoloji gösterir (82) (şekil 5). ACE gibi ACE2 de ekstrasellüler yüzeydeki katalitik bölgesiyle tip-1 membran protein yapısındadır.

ACE den farklı olarak ACE2 sadece 1 aktif enzimatik bölgeye sahiptir ve dipeptidylkarboksi peptidazdan çok karboksipeptidaz olarak fonksiyon gösterir (75). ACE2 Ang I den Ang 1-9 yapar bu peptidin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Bununla beraber ACE2 biyolojik olarak aktif Ang II den Ang (1-7)'yi meydana getirmektedir. Yapılan alışmalarda ACE2 nin Ang II üzerine olan katalitik etkisinin Ang I üzerine olan etkisine orana yaklaşık 400 kat fazla olduğu görülmüştür (83) bu da bize ACE2 nin ana görevinin Ang II yi Ang (1-7) ye dönüştürmek olduğunu gösterir.

Ang (1-7)nin potansiyel görevi vasodilatör kardiyoprotektif peptit olarak anti-growth ve anti prolativ etki göstermektedir bu özelliği yakın zamanda gösterilmiştir. Bu bilgiler göstermektedirki ACE2 Ang II nin vasoconstriktr etkisini Ang II inaktivasyonu yoluyla sınırladırır, ek olarak bu karşı etkiyi Ang II nin karşıt formu olan Ang (1-7) ile yapar (77).

4.2 ACE 2 'nin dağılımı

ACE2, insanda ACE ye göre çok çok daha fazla bir bölgede dağılım gösterir. ACE2 ekspresyonu başlıca böbrek kalp ve testislerde (77) olmakla beraber son zamanlarda yapılan araştırmalarda beyin ve akciğerlerde de expresse olduğu gösterilmiştir. ACE gibi ACE2 de endotelial hücrelerde gösterilmiştir, başlıca vasküler endotelium ve renal tubüler epitheliumda bulunur ayrıca daha düşük miktarda vasküler düz kas hücrelerinde bulnur (84).

4.3 Vazoaktif peptitlerin kontrolünde ACE2 nin merkezi görevi:

ACE2 sadece RAS'ın üyesi olan peptitlerle sınırlandırılmamıştır. Ang (1-7) formasyonundaki rolüne ek olarak ACE2 diğer sistemlerin örneğin apelin 36 -13 ve B kinin metabolizması kallidin ve BK (des-ars) (BK değil), neurotensin ve ilişkili peptit kinetensin opioid gibi peptitler dynotropin gibi sistemlere de yüksek katalitik etki gösterir (83). Apelinin fizyolojik rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (85). Bununla beraber apelinin ratlarda su alınımasını etkileyen bir sıvı hemostaz regülatörü olduğu düşünülmektedir (86). Ek olarak apelinin kardiyovasküler regülasyonundaki rolünü destekleyerek izole edilen rat kalbinde pozitif intropik etki yaptığı ve endotelden fakir arterlerde vazokonstriksiyonu teşvik ettiği görülmüştür (87). Kinin metabolitleri [des-Arg9] BK ve belirli [des-Arg10] kallidin inflamasyon ve doku hasarı süresince indüklenmiş kinin B₁ reseptörlerinin endojen agonisti gibi davranır ve buyüzden B₂ reseptörünün hemodinamik özelliklerinin bazılarını yerine getirir (88). Dynorphin A (1-13), kardiyomiyosit kontraktilesi üzerinde negatif etkiler yapabilen κ ve δ 'nın(89) kardiyak ve merkezi opioid reseptörlerinin aktivasyonu yolu ile hipotansiyonu indükler (90). Birlikte ele alındığında bu bulgular bize ACE2'nin inflamasyon, nörotransmisyon ve kardiyovasküler fonksiyonlarda çok fonksiyonlu düzenleyici rol oynayan bir enzim olduğu görüşünü desteklemektedir

ACE2'nin bu multifonksiyonel özelliğine rağmen Ang (1-7)'nin yapımında ACE2'nin rolü muhtemelen kardiyovasküler kontrol konusuyla en çok ilgilidir ve bu yüzden en çok çalışılan enzim fonksiyonudur (91). Bu vazokonstriksiyon, proliferasyon ve hipertrofiye neden olan Ang II'den farklı olarak Ang (1-7) vazodilatör PG'nin salınımını ve sentezini uyarır, ACE'nin aktif alanını bağlayarak B₂ reseptöründe BK'nın metabolik etkilerini artırır ve NO salınımını artırır. Bununla birlikte, Ang (1-7) Ang II den zıt etkilere sahiptir ve Ang II'nin trofik etkisi ve pressörüne zıt bir feedback hormonu gibi davranabilir. Ayrıca, Ang (1-7)'nin Ang II'nin antogonisti gibi davrandığı ileri sürülmüştür. Bu yüzden ACE2 RAS'ın vazoaktif ve büyümeyi teşvik edici aktivitelerinin kontrolünde dengeleyici bir rol oynar(92).

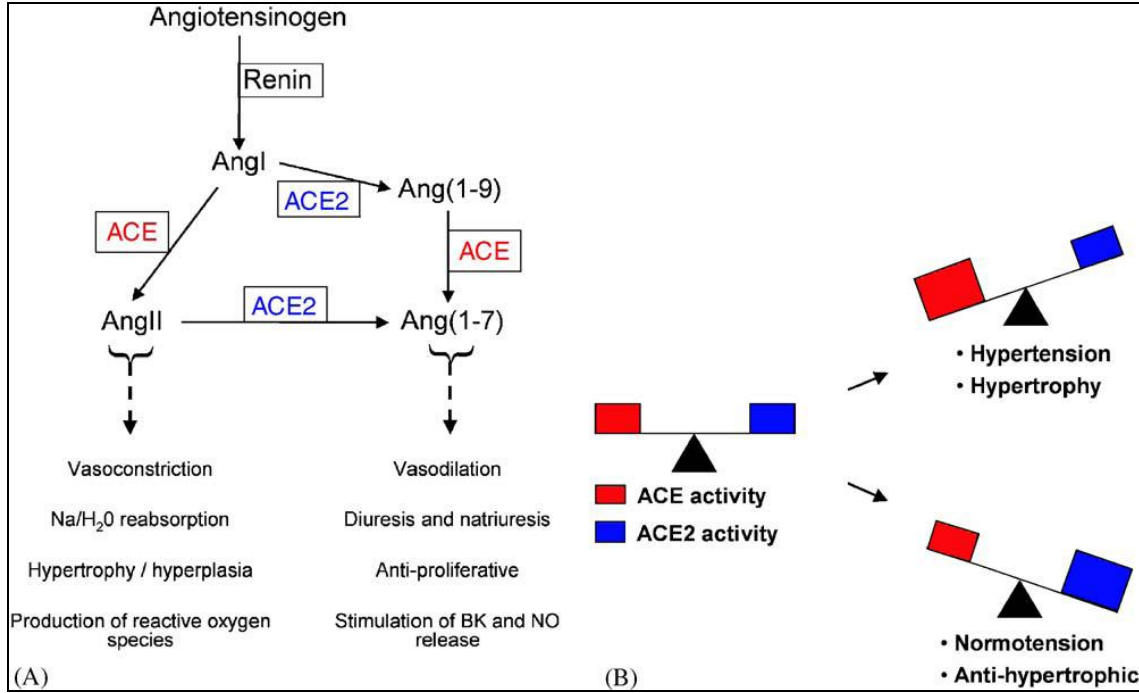
4.4 ACE 2 ve hipertansiyon:

ACE2 sistemik arterial basınç ile ilişkilendirilen hipotez;

- a) deneysel olarak hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda artmış kan basıncı ile azalmış ACE2 mRNA ve protein düzeyleri arasında ters orantı görülmesi,
- b) Hipertansif ratlarda normal kontrollere oranla kardiyovasküler ilişkili dokularda ACE2 gen ekspresyonunun azalma (80).
- c) Farklı QTL nin hipertansiyon üzerine etkisi ile ACE2 nin QTL üzerinde hipertansiyonu düzelmiş ratlarda gösterilmesiyle ilişkilidir. Bu bilgiler kan basıncında önemli rol oynayan 2 organ olan kalp ve böbrekte ACE2 üretimi ile birleştirilmiş ve hipertansiyonun patojenitesinde ACE2 nin rolü üzerinde önemli bir kanıt oluşturmuştur (93).

ACE2'nin yokluğunda Ang II predominant etki eder ve vazokonstriksiyon ve hipertansiyona öncülük edebilir. Özet olarak, ACE'nin ve ACE2'nin düzenleyici sistem çifti iç dengeli korumada iki zıt kuvveti dengelemek suretiyle tek bir hedef sisteminin ayarlanmasına izin verir (şekil 6).

Bu kanıtların yanı sıra son zamanlarda yapılan çalışmalardan Benjafield ve ark.larının Anglo-celtik Avustralya popülasyonunda hipertansiyon olgularında ACE2 nin 4 SNP'lerinin genotiplendirilmesiyle ACE2 polimorfizmlerinin hipertansiyonla ilişkisi hakkında bir kanıt elde edilememiştir (5). Fakat bu durumun tam anlamıyla açığa kavuşturulması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.



Şekil 6 : A) Günümüzde kabul edilen renin angiotensin sistemi ve Ang II ve Ang (1-7)'nin vazoaktif ve hücre fonksiyonları B)ACE ve ACE2 aktivitesinin hücre ve fizyolojik etkileri(61).

4.5 ACE2 ve Kardiyovasküler Fonksiyonu:

ACE2, normal kardiyak ve vasküler fizyoloji ve onun kardiyovasküler sistemin temel patofizyolojik değişiklikleri ile bağlantılı değişen ekspresyonunun kontrolünde kritik bir rol oynar. Genetik hedefli deneyleri ACE2'nin kardiyak fonksiyonunun önemli bir regülatörü olduğunu gösterir. Örneğin ACE2 yetersiz fareler kardiyak kontraktilitesinde şiddetli azalma ve aortik ventriküler basınçlarda belirgin azalma gösterir. Ne kadar ilginçtir ki ACE2 knock out farelerin kalpleri şiddetli disfonksiyona rağmen hipertrofi, genişleme, fibrozis ya da aşırı kolejen birikimi göstermez. Bu, özellikle bu hayvanlarda hem plazma hemde kardiyak Ang II'nin arttığı gerçeğini göstermede önemlidir (80). ACE2 mutant farelerde bulunan bu kalp fenotipi, insanlarda kronik arter hastalığında ve bypass ameliyatında uyum gösterici cevaplar veren kardiyak hibernasyonda benzerdir (94). kardiyak hibernasyonun insan ve hayvan modelleri kronik hipoksik durumlar miyosit metabolizması, hipoksi-indüklenmiş

genlerin upregülasyonu ve şiddetli kontraktıl disfonksiyonlardaki telafi edici değışikliklere öncülük edebilir. Ratlarda, insan kalp damarlarında ve düz kas hücrelerinde ACE2'nin endotel ve intramiyokardiyal yerleşimi ACE2'nin rolünü destekler (59). Kardiyovasküler patofizyolojide ACE2'nin gelişimi, fonksiyonel ACE2 aktivitesinin artmasına bağılı olarak artmış kardiyak Ang (1-7) formasyonu gösteren son basamak idiyomatik genişlemiş kardiyomyopati hastalardaki gözlemlerle daha da sağılamlaştırılmıştır (95).

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Örneklerin Seçimi ve Kan Alımı:

Çalışma, HT tanısı alan 158 hasta ile, HT öyküsü olmayan 162 sağılıklı birey (kontrol grubu) arasında yapıldı. Çalışmaya katılan bütün bireylerin yazılı onayları alındı. Arteriyal hipertansiyon kriteri olarak, birden çok ölçümde sistolik basınç ≥ 140 mmHg ve/veya diastolik basınç ≥ 90 mmHg bulunması alındı.

Bütün hastalar, diabetes mellitus (DM), hipertansiyon, hiperkolestrolemi ve sigara gibi koroner risk faktörleri açısından değerlendirildi. Trigliserit, total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol değerleri klasik biyokimyasal metodlarla elde edildi. Diabet öyküsü olanlar ya da bazal glukoz değeri ≥ 120 mg/dl olanlar diabetes mellitus olarak değerlendirildi. Sigara içimi ≥ 5 /gün olanlar, sigara içen grubuna dahil edildi. Vücut kitle indeksi ≥ 25 kg/m² olanlar, kilolu olarak değerlendirildi. Hasta ve kontrollerle yapılan görüşmeler sonucu HT aile öyküleri saptandı. Kontrol gurubu üyelerinin tümünde kan basınçları 130/90 mm Hg basıncın altındadır. Hastaların renal fonksiyonları normal olup sekonder hipertansiyona ait bir kanıt klinik standartlara göre gözlenmemiştir. Onayları alınan hastaların ve kontrollerin venöz kanları K2EDTA'lı tüplere toplandı ve DNA izolasyonları yapılmaya kadar -20°C'de saklandı. Tüm moleküler analizler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağılığı ve Hastalıkları A.D. Moleküler Tıp Araştırma laboratuvarında yapıldı. Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3 Hasta ve kontrol guplarının demografik özellikleri

	Hasta (n=158)	Kontrol (n=162)
Yaş (yıl)	51.3±5.7	49.4±2.1
Erkek/Kadın	63/95	87/75
HT aile öyküsü	64 (40.5%)	18 (11.1%)
Hipertansiyon	158 (100%)	12 (7%)
Sigara (≥5 adet/gün)	91 (57.6%)	58 (35.8%)
VKI (kg/m ²)	27.1±3.2	23.8±5.3
Diabet	31 (19.6%)	8 (4.9%)
Trigliserid (mg/dl)	186.5±43.6	144.2±51.7
Total kolesterol (mg/dl)	216.6±29.8	175.3±38.4
HDL kolesterol (mg/dl)	40.4±3.2	44.1±6.7
LDL kolesterol (mg/dl)	133.2±34.6	121.3±28.9

5.2 ARAÇ VE GEREÇLER

5.2.1 Kullanılan Kimyasallar

5.2.1.1. Kimyasallar

Çalışmanın her aşamasında moleküler grade kalitesinde kimyasallar ve tip-1 kalitesinde ddH₂O (çift distile su) (18 megaohm/cm) kullanıldı.

- Agaroz (Sigma, A 9539)
- Borik Asit (Sigma, B 6768)
- Bromfenol mavisi (Sigma, 5525)

- dNTP karışımı (Boehringer Mannheim, 1277049)
- *Ava*II Restriksiyon enzimi
- Etanol (Reidel de Haen, 24103)
- Etidium Bromid (Sigma, E 7637)
- MgCl₂ (Merck, 5832)
- Moeküler Ağırlık Marker'ı (Hae III, Fermentas)
- *Alu*I Restriksiyon Enzimi
- Nucleospin DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel, Cat No:740 951.250)
- PCR tampon seti (Boehringer Mannheim, 1699121)
- Taq DNA Polimeraz (Boehringer Mannheim, 1146165)

5.3. ACE2 Genindeki Intron 1 A→G (nt 1075) ve Intron 3 G→A (nt 8790) Polimorfizmlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

5.3.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Hastalardan EDTA'lı tüpe alınan 1ml periferik kandan 200µl alınarak genomik DNA elde edilmiştir. Bu amaçla tuzsuz DNA ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için Nucleospin DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri kit prospektüsüne göre yapılmıştır.

5.3.1.1. Uygulanan Protokol

DNA Ekstraksiyonu (NucleoSpin):

1. 1,5ml mikrosantrifüj tüplerine 200µl kan ve 25µl *proteinase K* eklenir.
2. 200µl *lysis buffer B3* herbir karışımın üzerine eklendikten sonra 10-20 saniye kadar vortekslenir.
3. 70°C'de 10 dakika beklenir.
4. Her bir örneğin üzerine %96-98'lik etanolden 210µl konulup vortekslenir.
5. Örneklerin her biri *NucleoSpin Blood Column*'lara aktarılır.

6. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 7. *NucleoSpin Blood column*'lar yeni tüplere aktarılır ve her birine $500\mu\text{l}$ BW eklenir.
 8. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 9. *NucleoSpin Blood column*'lar yeni tüplere aktarılır ve üzerlerine $600\mu\text{l}$ B5 eklenir.
 10. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 11. *NucleoSpin Blood column*'lar yeni tüplere aktarılır ve üzerlerine solüsyon koymadan boş, 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
 12. *NucleoSpin Blood column*'lar $1,5\text{ml}$ 'lik mikro santrifüj tüplerinin içine konur. Üzerine önceden 70°C 'de bekletilmiş olan *elution buffer (BE)* 'dan $100\mu\text{l}$ eklenir. Oda ısısında yaklaşık 3 dakika beklenir.
 13. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 14. *NucleoSpin Blood column*'lar atılır. Mikro santrifüj tüplerinin dibinde biriken miktarla PCR çalışılır.
- Tüplerin ağızları kapatıldı ve parafilmlelenerek -20°C 'ye kaldırıldı.

5.3.1.2. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması:

Örneklerin DNA konsantrasyonu tayini için, önce izole edilen DNA örneğinden $25\ \mu\text{l}$ alındı ve $425\ \mu\text{l}$ TE ile seyreltildi. İyiye karıştırılarak homojenize edilen DNA örneğinin optik dansitesi, spektrofotometrede 260 ve $280\ \text{nm}$ 'de TE'ye karşı okundu. $50\mu\text{g/ml}$ çift iplikli DNA içeren çözeltinin spektrofotometrede $260\ \text{nm}$ 'de 1.0 optik dansite (OD) değerinde bir okuma verdiği kabul edilmektedir. Spektrofotometrede okunan OD değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Örnekteki DNA miktarı ($\mu\text{g/ml}$): $(\text{OD}_{260}) \times 50\mu\text{g/ml}$ (1.0 OD'ye karşılık gelen çift iplikli standart DNA miktarı) $\times 17$ (seyreltme faktörü).

DNA miktarının yanında OD $260/280$ oranları değerlendirildi. Değerlendirilen hasta örneklerinin hepsinde bu oranın $1.75-2.0$ arasında değiştiği gözlemlendi. Bu oran, DNA kalitesinin moleküler çalışmalar için uygun olduğu anlamına gelmektedir.

Elde edilen DNA'nın bütünlüğü agaroz jel elektroforezi sisteminde örneklerin yürütülmesi ile test edildi. Elde edilen $2\mu\text{l}$ (100ng) DNA molekülü $\%1$ 'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Moleküler biyolojide kullanılan agarozdan $1\ \text{gr}$. Tartılarak

100µl 10xTBE tamponunda magnetik karıştırıcıda boncuklar kullanılarak karıştırıldı. Bu karışım mikrodalgada eritildi. Magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 60°C'ye kadar soğutuldu. Üzerine 10µg/ml konsantrasyonlu Etidyum Bromür solüsyonundan 10µl ilave edilip karıştırıldı. Bu agaroz solüsyonu önceden hazırlanmış elektroforez tankının taraklar yerleştirilmiş, kamerasına döküldü ve sertleşinceye kadar beklendi. Üzerine 1xTBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkartıldı. 2µl DNA ve 2µl Orange G karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez 100mV, 80mA koşullarında kullanılarak 30-40 dakika arasında uygulandı. Kontrol edilen bu DNA'dan tüm genotipleme reaksiyonları yapıldı.

5.3.2 PCR Amplifikasyonu :

5.3.2.1 Amplifikasyonda Kullanılacak Primerlerin Seçimi:

Kullanılacak primerler, yapılan literatür taraması sonucuna göre belirlendi (Tablo 4). Liyofilize halde gelen primerler 10 pmol / µl konsantrasyonda olacak şekilde ddH₂O ile çözüldü.

5.3.2.2 Uygulanan PCR Protokolü:

PCR reaksiyonunda yer alan bütün bileşenler (PCR tamponu, dNTP, Primerler, Taq DNA Polimeraz) ve PCR siklus sıcaklık profilleri tek tek kontrol edilerek standardizasyonları yapıldı. Sonuçta PCR reaksiyonunda kullanılan karışım aşağıdaki miktar ve konsantrasyonlarda hazırlandı (Tablo 5).

Tablo4 Kullanılan Primerler.

<p>Intron 1 A→G (nt 1075): (Fragman büyüklüğü : 471 bp)</p> <p>FORWARD: 5'-TAA CAA GTG CAA GGA TTT AGG-3'</p> <p>REVERSE : 5'-AAG CTG CAA TGA ATC ATG AT-3'</p> <p>Intron 3 G→A (nt 8790): (Fragman büyüklüğü : 466 bp)</p> <p>FORWARD: 5'-CAT GTG GTC AAA AGG ATA TCT-3'</p> <p>REVERSE: 5'-AAA GTA AGG TTG GCA GAC AT-3'</p>
--

Tablo 5 50 µl hacim içerisinde gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.

Kullanılan Madde	Intron 1	Intron 3
ddH ₂ O	Tamamlayacak kadar	Tamamlayacak kadar
10xPCR tamponu	5 µl	5 µl
dNTP karışımı	100µM	100µM
Primer	0.25 pmol	0.25 pmol
Taq DNA Pol.	1.0 ünite	1.0 ünite
Kalıp	2.0 µl	2.0 µl

Thermal Cycler'da tabloda gösterilen PCR sıcaklık profili (Tablo 6) kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 6 Kullanılan PCR Sıcaklık Profili

94°C	10 dakika	ilk denatürasyon
94°C	1 dakika	
65°C	1 dakika	10 siklus
72°C	1 dakika	
94°C	1 dakika	
60°C	1 dakika	15 siklus
72°C	1 dakika	
94°C	1 dakika	
58°C	1 dakika	20 siklus
72°C	1 dakika	
72°C	20 dakika	ekstansiyon

5.4 PCR Ürünlerinin Elektroforezde Değerlendirilmesi:

Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar:

- Etidyum Bromid Stok Solüsyonu : (Moleküler analiz için 20 mg / ml konsantrasyonda) 200 mg etidyum bromid çeker ocak içerisinde tartılarak 10 ml ddH₂O'da çözüldü.
- 10 x TBE (Agaroz Jel Elektroforezi için) :
108 gr Trizma baz (0.04 M)
55 gr Borik Asit
40 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0)
ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı.
- 0.5 M EDTA
186.1gr disodyum EDTA (2 sulu)
ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. PH'ı 10 M NaOH ile 8.0 ayarlandı.

(Not:EDTA pH :8.0'da çözülür.)

Elde edilen 2 µl (100ng) DNA molekülü %1'lik Agaroz jelde elektroforeze tabii tutuldu. Moleküler Biyolojide kullanılan Agarozdan 5gr. tartılarak 50 ml 1XTBE tamponunda magnetic karıştırıcıda boncuklar kullanılarak karıştırıldı. Bu karışım mikrodalga fırınında eritildi. Magnetic karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 60 °C kadar soğutuldu. Üzerine 10 µg/ml konsantrasyonlu Etidyum Bromür solüsyonundan 10 µl ilave edilip karıştırıldı. Önceden hazırlanmış elektroforez tankına taraklar yerleştirildi ve bu agaroz solüsyonu kamerasına döküldü, sertleşinceye kadar bekletildi. Üzerine 1XTBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkarıldı. 2µl DNA ve 2 µl Orange G karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez 100mV, 80 mA koşullarında kullanılarak 30-40 dakika arasında uygulandı.

5.5 RE Kesimi ile Polimorfizmlerin Saptanması:

İntron 1, 1075 A/G (rs1978124) için 1.9 U *Ava*II kısıtlayıcı enzimi (RE) kullanıldı. Bu kesim 10 µl. PCR örneğine uygulandı. 37°C'de 3 saat kesim yapıldı. %3'lük agaroz jelde ;

AA → 471 bp

AG → 471 bp + 305 bp + 166 bp

GG → 305 bp + 166 bp

olarak okuma yapıldı.

İntron 3, 8790 G/A (rs2285666) için 1.9 U *Alu*I kısıtlayıcı enzimi (RE) kullanıldı. Bu kesim 10 µl. PCR örneğine uygulandı. 37°C'de 3 saat kesim yapıldı. %3'lük agaroz jelde ;

GG → 466 bp

GA → 466 bp + 281 bp ve 185 bp

AA → 281 bp ve 185 bp

olarak okuma yapıldı.

RE kesim yöntemi uygulanan PCR ürünleri, jele yüklendi. UV'de belirlenen baz çiftleri değerlendirildi.

5.6 İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel incelemeler SPSS 10.0 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenler, ortalama \pm SD olarak ifade edildi. P değeri ≤ 0.05 olanlar anlamlı olarak değerlendirildi. Genotip dağılımı ve Univaryans analizler, χ^2 testi ile belirlendi.

6 BULGULAR :

Bu çalışmada 158 hipertansiyon hastasında ACE2 gen polimorfizmlerinin etkisi analiz edilmiştir. Hastaların % 60.1'ini kadınlar, %39.9'unu ise erkekler oluşturmaktadır. 162 kişiden oluşan kontrol grubunda % 46.3 oranında kadın, % 53.7 oranında ise erkek bulunmaktadır. İntron 1 için G alel frekansı hipertansif kadın hastalarda % 23.2, erkek hastalarda ise % 27.8 idi. Kontrol grubunda G aleli, kadınlarda % 30.6, erkeklerde % 16.1 olarak bulundu. İntron 3 için A alel frekansı hipertansif kadın hastalarda % 21.6, erkek hastalarda ise % 21.5 idi. Kontrol grubunda A aleli, kadınlarda % 19.3, erkeklerde % 9.2 olarak bulundu. Her iki polimorfizm için yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı (intron 1 için kadınlarda $X^2 = 4.4$ ve $p=0.35$, erkeklerde $X^2 = 3.9$ ve $p=0.41$; intron 3 için kadınlarda $X^2 = 4.0$ ve $p=0.40$, erkeklerde $X^2 = 9.3$ ve $p=0.53$).

Tablo 7 Kadınlarda intron 1 için genotip ve alel frekansı dağılımı

	Hastalar (n=95)	Kontroller (n=75)	
intron 1 A/G (1075)-Kadın			$X^2=4.4$ $p=0.35$
AA	57 (% 60.0)	39 (% 52.0)	
AG	32 (% 33.7)	26 (% 34.7)	
GG	6 (% 6.3)	10 (% 13.3)	
Allele frequencies A/G	0.768/0.232	0.694/0.306	

Tablo 8 Erkeklerde intron 1 için genotip dağılımı

	Patients (n=63)	Controls (n=87)	
intron 1 A/G (1075)-Erkek			$X^2=3.9$ $p=0.41$
Allele frequencies A/G	0.722/0.278	0.839/0.161	

Tablo 9 Kadınlarda intron 3 için genotip ve alel frekansı dağılımı

	Patients (n=95)	Controls (n=75)	
intron 3 G/A (8790)-Kadın			$X^2=4.0$ $p=0.40$
GG	59 (% 62.1)	53 (% 70.7)	
GA	31 (% 32.6)	15 (% 20.0)	
AA	5 (% 5.3)	7 (% 9.3)	
Allele frequencies A/G	0.784/0.216	0.807/0.193	

Tabo 10 Erkeklerde intron 3 için genotip dağılımı

	Patients (n=63)	Controls (n=87)
intron 3 G/A (8790)-Erkek		$X^2=9.3$ $p=0.53$
Allele frequencies G/A	0.785/0.215	0.908/0.092

7. TARTIŞMA VE SONUÇ :

Bu çalışmada ACE2 genindeki intron 1 A→G (nt 1075) ve int 3 G→A(nt 8790) polimorfizmleri ile hipertansiyon (HT) arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı.

Keşfedildiği 2000 yılından itibaren ACE2 enzimi, kardiyak fonksiyon, hipertansiyon, böbrek hastalıkları ve diyabet (DM) ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ACE2'nin insan biyolojisi, enfeksiyon mekanizmaları ve bağışıklık sisteminde kritik bazı rolleri olduğu gösterilmiştir. Literatürde var olan bu verilerin karşın insanlar üzerinde yapılmış sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Benjafield ve ark.larının Avustralya popülasyonu üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada, bizim çalışmamıza benzer bir şekilde, ACE2 gen polimorfizmleri ile HT arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı gösterilmiştir(5)

Chen ve ark. ları tarafından yapılan bir başka araştırmada, ACE2 lokusunda bulunan iki SNP'nin bazı kardiyovasküler durumlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (96). Alman toplumunda yapılan diğer bir çalışmada ise erkeklerde ACE2 genindeki 4 SNP ile sol ventrikül hipertrofisi, septum dunar kalınlığı ve sol ventrikül kitle indeksi

arasında yüksek oranda bir ilişki olduğu saptanmıştır (97). Yang ark.larınca yapılan çalışmada, ACE2'nin en sık gözlenen varyantlarının (1075A/G, 8790G/A ve 16854G/C) kadınlarda miyokard enfarktüsü ile erkeklerde ise alkol tüketimi ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (98).

Bunların dışında ACE2 gen polimorfizminin intrakranyal anevrizma (99) ve metabolik sendromlu hastalardaki HT ile (100) ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak Japon toplumunda yapılan bir başka çalışmada ise intrakranyal anevrizma ile ilişki saptanmamıştır (101).

Sonuç olarak bu çalışmada, bizim toplumumuzda ACE2 genindeki intron 1 A→G (nt 1075) ve int 3 G→A(nt 8790) polimorfizmleri ile hipertansiyon (HT) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. ACE2 nin fonksiyonlarının yeni yeni anlaşılması ile ACE2 nin kan basıncının kontrolünde oynadığı rol tam olarak anlaşılacaktır bu yüzden farklı popülasyonlarda daha büyük guruplar üzerine yapılacak olan böyle çalışmalar bizlere kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayan en önemli risk faktörü olan hipertansiyonu daha iyi anlamamızı sağlayacak, yeni tedavi yollarının bulunması konusunda yol gösterici olacak ve tek risk faktörü yerine, genetik ve diğer tüm risk faktörlerinin dikkate alınması tavsiyelerine uygun olarak, hastalığı önleme ve tedavi etmede risk faktörlü yaklaşıma yeni bir faktör olarak katkı sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR:

1. Alfred AJ, Diz DI, Ferrario CM, Chappell MC: Pathways for angiotensin 1-7 metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F841-F850.
2. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al.: A novel angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res in Dahl S(HSD) rats. Mol Med* 2000; 125-134.
3. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Cho H, Farzan M: Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;426:450-454.
4. Crackower MA, Sarao R, Penninger JM: Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417:822-828.
5. Adam V, Benjafeld, William Y.S. Wang, and Brian J. Morris. No Association of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Gene (ACE2) Polymorphisms With Essential Hypertension. *AJH* 2004; 17:624-628
6. Erdine S, Acar Türk E, Cordan J, Soydan İ, Lüleci C, Değer N, Yıldırım S, Şenocak H: Türkiye Hipertansiyon Haritası, İstanbul 1993
7. Alderman, MH, Budner, N, Cohen, H: Prevalence of drug resistant hypertension. *Hypertension* II: 1988; (Suppl II), 71-75
8. Norman M. Kaplan. Klinik Hipertansiyon. Turgu Yayıncılık ve Ticaret A.Ş., 1998. S:43
9. Bidani, AK, Griffin, KA, Plott, W, Schwartz, MM: Renal ablation acutely transforms “benign” hypertension to “malignant” nephrosclerosis in hypertensive rats. *Hypertension* 1994;24:301
10. Blake GH: Primary hypertension: The role of individualised therapy. *Am Fam Physician*, 1994; 50: 138-146
11. Braunwald: Heart Disease. 5th Ed., USA, 1997.
12. Bravo, EL: Resistant hypertension. *Sem. in Neph.* 1991; 5: 571-575
13. Burke AP, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*, 1997;336:1276-82
14. Carretero O, Oparil S. Essential hypertension part I: Definition and etiology. *Circulation*, 2000; 101: 329-335
15. Geleijnse JM, Witteman JCM, den Breeijen JH, et al. Dietary electrolyte intake and blood pressure in older subjects: the Rotterdam study. *J Hypertens* 1996; 14:737-741.
16. Crawford, ES: The diagnosis and management of aortic dissection. *JAMA* 1990; 264:2537
17. Norman M. Kaplan. Klinik Hipertansiyon. Turgu Yayıncılık ve Ticaret A.Ş., 1998. S:63-65
18. Malek AM, Izumo S. Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell. *J Hypertens* 1994;12:986-999.
19. Cunningham, FG, Lindheimer, MD: Hypertension in pregnancy. *N. Engl. Med.* 1992; 326:927
20. Prins BA, Biesiada E, Levin ER. Natriuretic peptides and hypertension. *Cur Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:170
21. Dahlof B, et al. Morbidity and mortality in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension (STOP-Hypertension) *Lancet*, 1991; 338:1281-5
22. Davidson K, et al. Do depression symptoms predict early hypertension incidence in young adults in the CARDIA study? *Archives of Internal Medicine*, 2000; 160: 1495-1500
23. Davis BR, et al. Rationale and design for the Antihypertensive and Lipid Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Hypertension* 1996; 9:342-60
24. De Leeuw PW. How do angiotensin II receptor antagonists affect blood pressure? *American Journal of Cardiology*, 1999;84(2A): 5K-6K

25. Farnett L, et al. The J-curve phenomenon and the treatment of hypertension: is there a point beyond which pressure reduction is dangerous? *JAMA*, 1991;265:489-95
26. Frohlich ED. The necessity for recognition and treatment of patients with "mild" hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 1999; 34:1369-77
27. Gueyffier F, Boutitie F, Boissel JP, et al: Effect of antihypertensive drug treatment on cardiovascular outcomes in women and men. A meta analysis of individual patient data from randomized controlled trials. The INDIANA investigators. *Ann Intern Med* 1997; 126: 761-767
28. Guidelines Subcommittee of the World Health Organization: World Health Organization-International Society of Hypertension, guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens.*; 1999; 17: 151-83
29. Hansson L, et al. Randomized trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension-2 study. *Lancet*, 1999; 354:1751-6
30. Hansson L. et al. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomized trial. *Lancet*, 1998; 351:1755-62
31. Kokkinos PF, Narayan P, Collieran JA, et al. Effects of regular exercise on blood pressure and left ventricular hypertrophy in African-American men with severe hypertension. *IJ Med* 1995;333:1462-1467.
32. Lowry DR, Mead LA, Dannenberg AL, Klag MJ. A longitudinal study of physical activity and incidence of hypertension [Abstract]. *Circulation* 1995;92:1619.
33. Soro A, Ingram MC, Tonolo G. et al. Evidence of coexisting changes in 11^β-hydroxysteroid dehydrogenase and 5^α-reductase activity in subjects with untreated essential hypertension. *Hypertension* 1995; 25:67-70.
34. Williams GH. Essential hypertension as an endocrine disease. *Endocr Metab Clin North Am* 1994;23:429-444.
35. Law CM, Egger PJ, Barker DJP. Size at birth and systolic pressure in children from 5 countries [Abstract]. *J Hypertens* 1996; 14:546
36. Pincomb GA, Lovallo WR, McKey BS, et al. Acute blood pressure elevations with caffeine in men with borderline systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1996;77:270-274.
37. Khalid MEM, Ali ME, Elbagir M, et al. Pattern of blood pressures among high and low altitude residents of southern Saudi Arabia. *J Hum Hypertens* 1994;8:765-769.
38. Chappleau MW, Cunningham JT, Sullivan MJ, et al]. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. *Hypertension* 1995;26:341-347
39. Bonow RO. New insights into the cardiac natriuretic peptides. *Circulation* 1996; 93:1946-1950.
40. Harrap SB: Hypertension: genes versus environment. *Lancet* 1994;344: 169-171
41. Campbell, D.J.: Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1987;10 (Suppl. 7), S1-S8
42. Skeggs LT :The preparation and function of the hypertensin converting enzyme *J Exp Med* 1956; 103:295-299
43. Reilly, C.F., Tewksbury, D.A., Schechter, N.M., Travis, J., et al. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J. Biol. Chem.* 1982;257, 8619-8622.
44. de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T.: International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev* 2000; 52, 415-472.
45. Touyz, R.M., Berry, C.: Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35, 1001-1015

46. Brosnihan, K.B., Li, P., Ferrario, C.M.: Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996; 27, 523–528
47. Sancho, J., Re, R., Burton, J., Barger, A.C., Haber, E.: The role of the renin–angiotensin–aldosterone system in cardiovascular homeostasis in normal human subjects. *Circulation* 1976;53, 400–405
48. Niimura, F., Labosky, P.A., Kakuchi, J., Okubo, S., Yoshida, H., Oikawa, T., Ichiki, T., Naftilan, A.J., Fogo, A., Inagami, T., et al.: Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *J. Clin. Invest.* 1995; 96, 2947–2954
49. Cowley Jr., A.W.: Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol. Rev.* 1992;72, 231–300
50. DiBona, G.F., Kopp, U.C.: Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* 1997; 77, 75–197
51. Harrap SB: Hypertension: genes versus environment. *Lancet* 1994; 344: 169–171
52. Dzau, V.J.: Evolving concepts of the renin-angiotensin system. Focus on renal and vascular mechanisms. *Am. J. Hypertens.* 1988; 1, 334S–337S
53. Stock, P., Liefeldt, L., Paul, M., Ganten, D.: Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology* 1995; 86 (Suppl. 1), 2–8.
54. Sun, Y., Zhang, J., Zhang, J.Q., Weber, K.T.: Renin expression at sites of repair in the infarcted rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2001; 33, 995–1003
55. Falkenhahn, M., Franke, F., Bohle, R.M., Zhu, Y.C., Stauss, H.M., Bachmann, S., Danilov, S., Unger, T.: Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension* 1995; 25, 219–226
56. Cushman, D.W., Cheung, H.S., 1971. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 250, 261–265.
57. Esther, C.R., Marino, E.M., Howard, T.E., Machaud, A., Corvol, P., Capecchi, M.R., Bernstein, K.E.: The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J. Clin. Invest.* 1997; 99, 2375–2385
58. Kaneko, K., Susic, D., Nunez, E., Frohlich, E.D.: ACE inhibition reduces left ventricular mass independent of pressure without affecting coronary flow and flow reserve in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Med. Sci.* 1997; 314, 21–27
59. S. Der Sarkissian et al. ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006; 91:165
60. Dzau, V.J., 1987. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* 59, 59A–65A
61. S. Der Sarkissian et al. ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006; 91 163–198
62. Norman M. Kaplan. *Klinik Hipertansiyon*. Turgu Yayıncılık ve Ticaret A.Ş., 1998. S:58-59
63. Turner AJ, Hooper NM (2002) The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 23:177–183
64. Corvol P, Williams TA: Peptidyl-dipeptidase A/angiotensin I-converting enzyme. In Barrett AJ, et al (eds) *Handbook of proteolytical enzymes*. Academic, pp 1998;1066–1076
65. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P : Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9386–9390
66. Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, Lenfant M, Corvol P: The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1995;270: 3656–3661
67. Ursula Danilczyk et al., Eriksson Michael A, Crackower, Josef M: A story of two ACEs. *Penninger J Mol Med* 2003; 81:229

68. Skaskidgel RA, Jackman HL:metabolism of substance P and bradykinin by human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 1991;41(9):138-145
69. Welches WR, Bronsnihan KB. Et al: a comparasion of the properties and enzymatic activity of threeangiotensin processing enzymes: ACE, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase. *Life Sci*. 1993;52(18):1461-1480
70. Benter If, Diz DI, Ferrario CM: Cardiovasküler actions of angiotensin(1-7). *Peptides* 1993;14(4):414
71. Von Lutterotti N et al:Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. *Circulation* 1994;89(1) 458-470
72. Yamamoto K et al: In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19(6, part 2)692-696
73. Freeman EJç et al:Anjjiotensin(1-7) linhibits vaskular smooth muscule cell growth. *Hypertension*.1993;22(3)s:414
74. U. Danilczyka,b, U. Eriksson et al. Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *Cell. Mol. Life Sci*.2004;61: 2714–2719
75. Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M.,Stagliano N. et al: A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res*. 2000;87: E1–E9
76. F. J.Warner, A. I. Smith. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cell. Mol. Life Sci*2004;61;20705
77. Donoghue, M. et al: A novel angiotensin-converting enzymereLATED carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ. Res*. 2000; 87, E1–E9
78. Tipnis, S.R. et al. :A human homolog of angiotensin-converting enzyme – cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem*. 2000; 275, 33238–33243
79. Tipnis S. R., Hooper N. M., Hyde R., Karran E., Christie G. And Turner A. JA :human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captoprilinsensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem*. 2000 ;275: 33238–33243
80. Crackower M. A., Sarao R., Oudit G. Y., Yagil C., Koziaradzki I., Scanga S. E. et al: Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002 ;417: 822–828
81. Komatsu T., Suzuki Y., Imai J., Sugano S., Hida M., Tanigami A. et al: Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme- related carboxypeptidase (mACE2). *DNA Sequence* 2002 ;13: 217–220
82. Turner, A.J., Hooper, N.M.: The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology.*Trends Pharmacol. Sci*. 2002; 23, 177–183.
83. Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F.,Acton, S., Patane, M., Nichols, A., Tummino, P.: Hydrolysis of biological peptides by human angiotensinconvertingenzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem*. 2002; 277, 14838–14843
84. Harmer, D. et al: Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett*. 2002;532, 107–110
85. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H.,Nishimura, O., Fujino, M.: Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim.Biophys. Acta* 2001; 1538, 162–171
86. Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillon, W., Dakin, C., Sajedi, A., Ghatei, M., Bloom, S.: The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002; 291, 1208–1212
87. Susic, D., Varagic, J., Frohlich, E.D.,. Pharmacologic agents on cardiovascular mass, coronary dynamics and collagen in aged spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens*. 1999; 17, 1209–1215

88. Duka, I., Kintsurashvili, E., Gavras, I., Johns, C., Bresnahan, M., Gavras, H.: Vasoactive potential of the b(1)bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ. Res.* 2001; 88, 275–281.
89. Jaiswal, N., Diz, D.I., Chappell, M.C., Khosla, M.C., Ferrario, C.M.: Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension* 1992; 19, II49–II55.
90. Ventura, C., Spurgeon, H., Lakatta, E.G., Guarnieri, C., Capogrossi, M.C.: Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ. Res.* 1992; 70, 66–81
91. Alessandri, G., Emanuelli, C., Madeddu, P.: Genetically engineered stem cell therapy for tissue regeneration. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1015, 271–284
92. S. Der Sarkissian et al. ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006;91:169
93. Stoll, M., Kwitek-Black, et al H.J.: New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res.* 200; 10, 473–482
94. Heusch, G.: Hibernating myocardium. *Physiol. Rev.* 1998; 78, 1055–1085.
95. Zisman, L.S., Keller, R.S., Weaver, B., Lin, Q., Speth, R., Bristow, M.R., Canver, C.C.: Increased angiotensin-(1–7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation* 2003; 108, 1707–1712.
96. Chen, A. A., Barnes, G., Foti, A. et al.: Two single nucleotide polymorphisms in the ACE2 locus are associated with cardiovascular disease. *Gen. Epidem.* 2002;23, 272
97. Lieb, W., Graf, J., Gotz, A. et al.: Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. *J. Mol. Med.* 2006 ; 84, 88–96
98. Yang W, Huang W, Su S, Li B, Zhao W, Chen S And Gu D.: Association study of ACE2 (angiotensin I-converting enzyme 2) gene polymorphisms with coronary heart disease and myocardial infarction in a Chinese Han population. *Clinical Science* 2006; 111, 333–340
99. Yamada S, Utsunomiya M, Inoue K, Nozaki K, Inoue S, Takenaka K, Hashimoto N, and Koizumi A.: Genome-wide scan for Japanese familial intracranial aneurysms: linkage to several chromosomal regions. *Circulation* 2004; 110: 3727–3733,
100. Jian Zhong, Zhengchen Yan, Daoyan Liu, Yinxing Ni, Zhigang Zhao, Shanjun Zhu, Martin Tepel, And Zhiming Zhu: Association of angiotensin-converting enzyme 2 gene A/G polymorphism and elevated blood pressure in Chinese patients with metabolic syndrome. *J Lab Clin Med* 2006;147:91–95
101. Youhei Mineharu, Kayoko Inoue, Sumiko Inoue, Shigeki Yamada, Kazuhiko Nozaki, Katsunobu Takenaka, Nobuo Hashimoto, Akio Koizumi: Association Analysis of Common Variants of ELN, NOS2A, APOE and ACE2 to Intracranial Aneurysm. *Stroke.* 2006;37:1189-1194

