

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

**NORMOKSİK VE PULMONER HİPERTANSİF SIÇANLARDA
İNTERMEDİN'İN (IMD/AM₂) PULMONER VASKÜLER
YATAĞA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz. Gökçen TELLİ

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2017**

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

**NORMOKSİK VE PULMONER HİPERTANSİF SIÇANLARDA
İNTERMEDİN'İN (IMD/AM₂) PULMONER VASKÜLER
YATAĞA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz. Gökçen TELLİ

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Bülent Gümüşel**

**İKİNCİ DANIŞMANLAR
Doç. Dr. Burak Kandilci
Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel**

**ANKARA
2017**

**Normoksik ve Pulmoner Hipertansif Sıçanlarda İntermedin'in (IMD/AM₂)
Pulmoner Vasküler Yatağa Etkilerinin İncelenmesi**
Ecz. Gökçen Telli

Bu çalışma 21.06.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Farmakoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

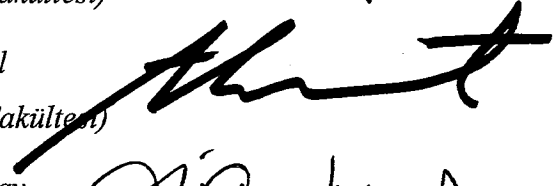
Jüri Başkanı:

Prof. Dr. İnci Erdemli
(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)



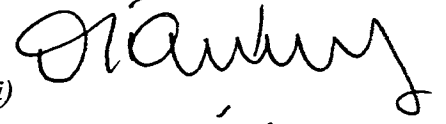
Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Bülent Gümüşel
(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)



Üye:

Prof. Dr. Tanju Özçelikay
(Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)



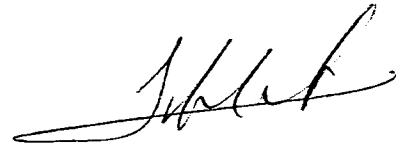
Üye:

Doç. Dr. Yasemin Eraç
(Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)



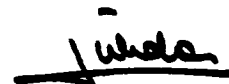
Üye:

Doç. Dr. Emrah Bozkurt
(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Tarih 10 Temmuz 2017



(imza)

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenkle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

• Tezimin/Raporumun 21.06.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

26/05/2017


Ecz. Gökçen TELLİ

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Bülent GÜMÜŞEL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.



Ecz. Gökçen TELLİ

TEŞEKKÜR

Doktora sürecinde verdiği değerli bilimsel katkının yanı sıra; sorun çözmenin, çok yönlü düşünebilmenin önemini gösteren, desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve bu güvenle yoluma daha emin adımlarla devam etmemi sağlayan sevgili danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Bülent Gümüşel'e çok teşekkür ederim.

Bilimsel ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, ikinci danışmanım sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel'e; tezimin gelişimine yaptığı katkılarını ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili hocam Sayın Prof. Dr. İnci Erdemli'ye ve sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Serdar Uma'ya;

Tez deneylerimin bir kısmını gerçekleştirdiğim İzmir'de, desteklerini benden esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Zeliha Kerry olmak üzere Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın sayın hocalarına; yeni bir sistemi bana ilgi ve güler yüzle öğreten sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Yasemin Eraç ve katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Metiner Tosun'a;

Tezimin gelişimine verdiği bilimsel katkı için ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. H. Burak Kandilci'ye, katkıları için Sayın Prof. Dr. Tanju Özçelikay'a, tezimin histopatolojik çalışmalarını gerçekleştiren Sayın Prof. Dr. Petek Korkusuz'a ve Arş.Gör. Nilgün Yersal'a,

Farmakoloji eğitimimi yürüten ve beni teze hazırlayan tüm değerli hocalarıma, çok teşekkür ederim.

Bu zorlu süreci eğlenceli hale getiren, aynı dili konuşmayı başardığım, dostlukları ile her zaman yanımda olan, sorunlarımı benimle birlikte çözen, sevgili çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Son olarak her zaman her koşulda yanımda olan, elimi tutan ve kendimi her zaman şanslı hissettiren çok sevgili aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (THD-2016-9281) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Telli,G., Normoksik ve Pulmoner Hipertansif Sıçanlarda İntermedin/Adrenomedullin₂'nin (IMD/AM₂) Pulmoner Vasküler Yatağa Etkisinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Çalışmamızda IMD/AM₂'nin sıçan ana pulmoner arterinde (PA) meydana getirdiği gevşemenin etki mekanizması araştırıldı ve kronik hipoksi maruziyeti ile sekonder pulmoner hipertansiyon (PH) geliştirilen sıçanların akciğer damar yataklarında IMD/AM₂'nin vazodilatör etkisi değerlendirildi. Sıçan ana PA'sında yaptığımız çalışmalarda CGRP₈₋₃₇ (10⁻⁶M), L-NAME (10⁻⁴M), ODQ (10⁻⁵M), SQ22536 (10⁻⁴M), H89 (10⁻⁶M), TEA (10⁻²M), iberiotoksin (3x10⁻⁷M) ve verapamil (10⁻⁵M) IMD/AM₂ gevşeme yanıtlarını inhibe etti. Endoteli tahrip edilmiş PA'da, 60 mM K⁺ ile ön kasılma oluşturulan PA'da ve Ca⁺²'siz ortamda IMD/AM₂ gevşeme yanıtları inhibe oldu. AM₂₂₋₅₂ (10⁻⁶M), 4-aminopiridin (3x10⁻³M), glibenklamid (10⁻⁵M), apamin (3x10⁻⁷M) ve TRAM-34 (10⁻⁵M), La⁺³ (10⁻⁴M) ise IMD/AM₂ yanıtında değişiklik meydana getirmediler. Hücre içi [Ca⁺²] düzeyinin çalışıldığı deneylerde IMD/AM₂ uygulamasıyla endotel tabakasında hücre içi [Ca⁺²]da artış meydana geldi ve bu artışlar iberiotoksin (3x10⁻⁷M) ve verapamil (10⁻⁵M) varlığında inhibe olurken, La⁺³ (10⁻⁴M) varlığında değişmedi. PH oluşturulan sıçanların ana PA'larında ve rezistans arterlerinde IMD/AM₂ sırasıyla gevşeme ve vazodilatasyon meydana getirdi. Yanıtlar L-NAME (10⁻⁴M) ile inhibe oldu. Bu bilgiler, IMD/AM₂'nin sıçan ana PA'sında CGRP reseptörleri üzerinden, sAMP ve PKA yolağını kullanarak, endotel bağımlı ve NO aracılı olarak etki gösterdiğini, NO'nun kalsiyumla indüklenen büyük kondüktanslı K⁺ kanalları ile L-tipi Ca⁺² kanallarının aktivasyonu sonrasında hücre içinde meydana gelen Ca⁺² artışıyla salıverildiğini ve IMD/AM₂'nin PH'de akciğer damar yatağında güçlü bir vazodilatör etki oluşturması IMD/AM₂'nin PH'de tedavi hedefi olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: İntermedin/Adrenomedullin₂, Pulmoner hipertansiyon, pulmoner arter, CGRP ailesi

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (THD-2016-9281) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Telli, G., Investigation The Role Of Intermedin/Adrenomedullin₂ (IMD/AM₂) On Pulmonary Vascular Bed In Normoxic and Pulmonary Hypertensive Rats, Hacettepe University Faculty of Pharmacy Department of Pharmacology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017. In our study, we investigated the mechanism of the relaxation responses of IMD/AM₂ in the rat main pulmonary artery. Another aim of the study is to evaluate the vasodilator effect of IMD/AM₂ on pulmonary vascular bed in rats with secondary pulmonary hypertension (PH). CGRP₈₋₃₇ (10⁻⁶M), L-NAME (10⁻⁴M), ODQ (10⁻⁵M), SQ22536 (10⁻⁴M), H89 (10⁻⁶M), TEA (10⁻²M), iberiotoxin (3x10⁻⁷M) and verapamil (10⁻⁵M) inhibited IMD/AM₂ relaxation responses in rat main PA. The IMD/AM₂ responses were also inhibited in the endothelium damaged PA, in the absence of Ca⁺² and in the PA's precontracted with 60 mM K⁺. There were no changes in the responses with the incubation of PA's AM₂₂₋₅₂, 4-aminopiridin (3x10⁻³M), glibenklamid (10⁻⁵M), apamin (3x10⁻⁷M) and TRAM-34 (10⁻⁵M), La⁺³ (10⁻⁴M). In experiments for changes in intracellular [Ca⁺²] levels were investigated, [Ca⁺²] levels were increased with IMD/AM₂ administration. These increases were inhibited with iberiotoxin (3x10⁻⁷M) and verapamil (10⁻⁵M) but there were no changes with La⁺³ (10⁻⁴M) incubation. IMD/AM₂ induced relaxation in the main PAs and caused vasodilatation in resistance pulmonary arteries in pulmonary hypertensive rats. These responses were inhibited by L-NAME (10⁻⁴M). According to these results, it is thought that IMD/AM₂ effects via CGRP receptors and sAMP-PKA pathways; the relaxation is endothelium-dependent and NO mediated. NO is released after increase of intracellular [Ca⁺²] with the activation of large-conductance calcium-activated K⁺ channels and L-type Ca⁺² channels. IMD/AM₂ produced important vasodilatation in the pulmonary vascular bed in PH suggests that IMD/AM₂ may be evaluated as a therapeutic target in PH.

Key words: Intermedin/Adrenomedullin₂, Pulmonary hypertension, Pulmonary artery, CGRP family,

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: THD-2016-9281).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. CGRP Ailesi	2
2.2. CGRP Ailesinin Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri ve Etki Mekanizmaları	5
2.3. IMD/AM ₂	8
2.4. IMD/AM ₂ 'nin Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri ve Mekanizmaları	10
2.5. Pulmoner Hipertansiyon	11
2.6. CGRP Ailesi ve Pulmoner Hipertansiyon	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1. İzole Organ Banyosu	15
3.2. Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonundaki Değişimlerin İzlenmesi	16
3.3. Kronik Hipoksi ile İndüklenmiş Sekonder PH Modeli	18
3.4. İzole Sıçan Akciğer Perfüzyonu	19
3.5. Kullanılan Çözelti ve İlaçlar	19
3.6. İstatistiksel Analiz	20
4. BULGULAR	22

4.1. İzole Sıçan Ana Pulmoner Arterinde IMD/AM ₂ 'nin Etki Mekanizması	22
4.1.1. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM ₂ Gevşeme Yanıtında CGRP ve AM Reseptörlerinin Rolü	22
4.1.2. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM ₂ Gevşeme Yanıtında NOS İnhibitörü ve Endotel Tabakasının Rolü	24
4.1.3. Sıçan PA'sında IMD/AM ₂ Gevşeme Yanıtında sGMP'nin Rolü	24
4.1.4. Sıçan PA'sında IMD/AM ₂ Gevşeme Yanıtında sAMP ve PKA Yolağının Rolü	25
4.1.5. Sıçan Ana Pulmoner Arterinde IMD/AM ₂ Gevşeme Yanıtında Potasyum Kanallarının Rolü	26
4.1.6. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM ₂ Gevşeme Yanıtında Kalsiyumun Rolü	30
4.1.7. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM ₂ 'nin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyine Olan Etkileri	32
4.2. Kronik Hipoksi ile İndüklenen PH'de IMD/AM ₂ 'nin Pulmoner Vasküler Yatak Yanıtlarına Etkisi	35
4.2.1. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Geliştirilmesi	35
4.2.2. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Gelişen Sıçanların PA'sında IMD/AM ₂ 'nin Etkisi	38
4.2.3. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Gelişen Sıçanların PA'sında IMD/AM ₂ ve ACh Gevşeme Yanıtlarında NOS İnhibitörünün ve Endotel Tabakasının Rolü	39
4.2.4. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Geliştirilen Sıçanların İzole Akciğerlerinde IMD/AM ₂ 'nin ve ACh'nin Perfüzyon Basıncına Olan Etkisi	40
4.2.5. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Gelişen Sıçanların İzole Akciğerlerinde IMD/AM ₂ ve ACh'in Perfüzyon Basıncını Azaltıcı Etkisinde NOS İnhibitörü ve Endotel Tabakasının Rolü	40

5. TARTIŞMA	42
5.1. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM ₂ 'nin Vazodilatör Etki Mekanizması	42
5.2. PH Oluşturulmuş Sıçanların Pulmoner Vasküler Yatağında IMD/AM ₂ 'nin Etkisi	50
6. SONUÇ ve YORUM	52
7. KAYNAKLAR	53
8. EKLER	66
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AM	Adrenomedullin
AMY	Amilin
ATP	Adenozin trifosfat
BK_{Ca}	Kalsiyum ile aktive olan büyük kondüktanslı potasyum kanalları
CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptit
CLR	Kalsitonin resptörü benzeri reseptörler
CTR	Kalsitonin reseptörü
EGTA	Etilen glikol tetraasidik asit
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
Gs	Stimülatör G proteini
IK_{Ca}	Kalsiyum ile aktive olan orta kondüktanslı potasyum kanalları
IMD/AM₂	İntermedin/Adrenomedullin ₂
i.a.	İntraarteriyel
i.v.	İntravenöz
KHS	Krebs Heinseleit solüsyonu
K_{ATP}	ATP ile aktive olan potasyum kanalları
K_v	Voltajla aktive olan potasyum kanalları
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginin metil ester
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PA	Pulmoner arter
PH	Pulmoner hipertansiyon
PKA	Protein kinaz A
RAMP	Reseptör aktive eden modifiye protein
RCP	Reseptör komponent protein
sAMP	Siklik adenozin monofosfat
sGMP	Siklik guanozin monofosfat
SK_{Ca}	Kalsiyum ile aktive olan küçük kondüktanslı potasyum kanalları
SNP	Sodyum nitroprussid
TEA	Tetraetilamonyum

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kalsitonin benzeri reseptörlerin ve adaptör proteinler RAMP ile RCP'nin etkileşimleri.	5
2.2.	İnsan IMD/AM ₂ 'sinin 148 aminoasitlik prepropeptid IMD/AM ₂ 'den bölünme bölgeleri	9
3.1.	Ca ⁺² görüntüleme deneylerinde ana PA halkasının sisteme yerleştirilmesi	17
4.1.	İzole sıçan ana pulmoner arterinde, CGRP ₈₋₃₇ (10 ⁻⁶ M) varlığında (A); AM ₂₂₋₅₂ varlığında (B); hem CGRP ₈₋₃₇ (10 ⁻⁶ M) hem de AM ₂₂₋₅₂ (10 ⁻⁶ M) varlığında (C) IMD/AM ₂ konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları.	23
4.2.	İzole sıçan ana PA'sında, L-NAME (10 ⁻⁴ M) varlığında ve endoteli tahrip edilmiş PA'da konsantrasyon bağımlı IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları	24
4.3.	İzole sıçan ana pulmoner arterinde, ODQ (10 ⁻⁵ M) varlığında IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları	25
4.4.	İzole sıçan ana pulmoner arterinde, SQ22536 (10 ⁻⁴ M) (A) ve H89 (10 ⁻⁶ M) (B) varlığında IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları	26
4.5.	İzole sıçan PA halkalarında, TEA (10 ⁻⁴ M) varlığında (A) ve 60 mM K ⁺ ile ön kasılma oluşturulmuş PA'da (B) konsantrasyon bağımlı IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları	27
4.6.	İzole sıçan ana PA'sında, glibenklamid (10 ⁻⁵ M) ve 4-AP varlığında konsantrasyon bağımlı IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları.	28
4.7.	İzole sıçan ana PA'sında apamin (3x10 ⁻⁷ M) ve TRAM-34 (10 ⁻⁶ M) varlığında, kümülatif IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları	28
4.8.	İzole sıçan ana PA halkalarında, iberiotoksin (3x10 ⁻⁷ M) varlığında kümülatif IMD/AM ₂ (A) gevşeme yanıtı. İberiotoksin (3x10 ⁻⁷ M) varlığında spesifik BKca agonisti NS1619 gevşeme yanıtı (B)	29
4.9.	İzole sıçan PA halkalarında, iberiotoksin (3x10 ⁻⁷ M) varlığında konsantrasyon bağımlı ACh (A) ve SNP (B) gevşeme yanıtları	30
4.10.	İzole sıçan PA halkalarında, Ca ⁺² 'siz KHS çözeltisinde IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları	31
4.11.	İzole sıçan PA halkalarında La ⁺³ (10 ⁻⁴ M) (A) ve 10 ⁻⁵ M verapamil varlığında (B) IMD/AM ₂ gevşeme yanıtı	32
4.12.	İzole sıçan ana pulmoner arterinde, IMD/AM ₂ (10 ⁻⁹ - 3x10 ⁻⁷ M) uygulamasıyla birlikte hücre içi kalsiyum düzeyi ve IMD/AM ₂ (10 ⁻⁹ - 3x10 ⁻⁷ M) gevşeme yanıtı.	33

4.13.	İzole sıçan PA'sında, IMD/AM ₂ ve hücre içi kalsiyum düzeyi (A). IMD/AM ₂ ve inhibitörler varlığında IMD/AM ₂ gevşeme yanıtları (B)	34
4.14.	İzole sıçan PA'sında, IMD/AM ₂ ile ACh'nin ve iberiotoksin, verapamil ve lantanyum varlığında IMD/AM ₂ 'nin hücre içi kalsiyum düzeyine etkisi	35
4.15.	3 hafta süresince kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçanların kan hematokrit düzeyleri (A) ve bazal perfüzyon basınçlarında (B) meydana gelen değişim. Sıçanların sağ ventriküllerinde gözlenen hipertrofi (C)	36
4.16.	Normoksik sıçanların (A ve B) ve 3 hafta süresince kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçanların ana pulmoner arter duvarları (C ve D).	37
4.17.	3 hafta süresince kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçanların ana pulmoner arter medial duvar kalınlığında meydana gelen artış.	37
4.18.	İzole organ banyosunda, PH geliştirilen sıçanların PA'sında elde edilen IMD/AM ₂ (A) ve ACh (B) gevşeme yanıtları.	38
4.19.	İzole organ banyosunda, PH gelişen sıçanların PA'sında L-NAME varlığında ve endotel tabakasının tahrip edilmesinden sonra alınan IMD/AM ₂ (A) ve ACh (B) gevşeme yanıtları.	39
4.20.	İzole sıçan akciğer perfüzyonunda, IMD/AM ₂ ve ACh'nin pulmoner hipertansif ve normoksik hayvanlarda akciğer perfüzyon basıncını azaltıcı etkisi.	40
4.21.	İzole sıçan akciğer perfüzyonunda, IMD/AM ₂ (A) ve ACh'nin (B) pulmoner hipertansif ve normoksik hayvanlarda akciğer perfüzyon basıncını azaltıcı etkisinde endotel tabakasının rolü.	41
5.1.	Sıçan ana PA'sında IMD/AM ₂ 'nin gevşeme yanıtında rol oynayan muhtemel yollar.	49

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	CGRP ailesinin etkileştiği reseptörler ve reseptör komponentleri	4

1. GİRİŞ

Kalsitonin geni ile ilişkili peptit (CGRP) ailesi vücutta önemli fizyolojik etkileri olan peptit hormonlardır. Bu peptitlerden CGRP ve adrenomedullin (AM) ise kardiyovasküler sistemdeki etkin rolleri ile dikkat çekmektedir (1, 2). Ailenin son izole edilen üyesi olan intermedin (IMD/AM₂) özellikle AM ile yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik göstermektedir. IMD/AM₂'nin birçok damar yatağında gevşetici etkisi olduğu bilinmektedir. Pulmoner sistemde, IMD/AM₂'nin hem sıçan ana pulmoner arterinde (PA) gevşeme hem de akciğer rezistans arterlerinde güçlü bir vazodilatasyon sağladığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu gevşemenin endotel bağımlı ve nitrik oksit (NO) aracılı olduğu ve gevşemede kalsiyum ile aktive olan büyük kondüktanslı potasyum kanallarının (BK_{Ca}) da rolü olduğu gösterilmiştir (3). Ancak gevşeme mekanizmasını gösteren detaylı çalışmalar bulunmamaktadır. Farklı damar yataklarında vazodilatör etkide farklı mekanizmaların rol oynadığını bildiren, birbirleri ile çelişen çalışmalar mevcuttur.

Bu tez çalışmasında amacımız IMD/AM₂'nin sıçan ana PA'sında oluşturduğu gevşeme yanıtının mekanizmasını ayrıntılı olarak çalışmak, literatürdeki çelişkili sonuçlara yeni bir bakış açısı getirmektir. Bunun için IMD/AM₂'nin reseptörle etkileşiminden gevşemenin meydana geldiği son basamağa kadar etkide rol oynaması muhtemel çeşitli yollar değerlendirilmiştir. Bu amaçla izole organ banyosu kullanılarak sıçan ana PA'sında çeşitli antagonistler varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtlarındaki değişim değerlendirilmiştir. Ayrıca gevşemede rolü olduğu düşünülen Ca⁺² düzeyindeki değişim, izole sıçan ana PA'sında IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ile eş zamanlı olarak hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikler izlenmiştir. Böylelikle hem IMD/AM₂'nin gevşeme mekanizmasında rolü olduğu düşünülen yollar hem de bu gevşemede Ca⁺²'nin rolü değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın bir diğer amacı pulmoner vasküler dirençteki artışla karakterize olan pulmoner hipertansiyonda (PH) IMD/AM₂'nin olası rolünü değerlendirmektir. Bu amaçla sıçanlarda kronik hipobarik hipoksi maruziyeti ile sekonder PH geliştirilmiş ve ardından hem izole organ banyosunda sıçan ana PA'sında hem de izole akciğer preparatında IMD/AM₂ yanıtları elde edilmiştir. Bu çalışma ile PH gelişimi sonrasında IMD/AM₂ yanıtındaki olası değişiklik araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. CGRP Ailesi

CGRP ailesi; kalsitonin, amilin (AMY), CGRP, AM, kalsitonin reseptörü stimüle eden peptid 1, 2,3 ve bilinen son üyeleri olan intermedin (IMD/AM₂)'den meydana gelmektedir (1, 2). Bu peptid hormonlar yapısal benzerlikleri göz önüne alınarak aynı aileye dahil edilmişlerdir. Keşfedilmeleri sonrası yapılan çalışmalarda yapılarına bağlı olarak biyolojik etkilerinin de genel olarak birbirlerine benzer olduğu gösterilmiştir (4-6). Çeşitli organ ve dokularda önemli roller üstlenen CGRP ailesi peptitlerinin vücut homeostazında rol oynadıkları bilinmektedir (7).

Bu peptid ailesinin bilinen ilk üyesi kalsitonindir. 1961 yılında Harold Copp tarafından tiroid C-hücrelerinde kalsiyum bağımlı bir mekanizma ile sentezlenip aynı yerden salıverildiği bulunmuştur. Vücutta kalsiyum dengesinden sorumludur ve hipokalsemik etki gösterir (8, 9).

1982 yılında kalsitonin geninin CGRP adı verilen başka bir peptid daha sentezleyebileceği gösterilmiştir. CGRP, 37 aminoasitlik duyuşal sinir kaynaklı bir peptittir (10). Santral ve periferik sinir sistemi boyunca eksprese edilir ve gastrointestinal sistem, üreme sistemi, solunum sistemi ve endokrin sistemde önemli görevler alır (6). Kardiyovasküler sistem CGRP'nin en fazla etki gösterdiği yerdir. Bilinen en potent vazodilatörlerden biri olan CGRP'nin ayrıca kalbin atım gücünü ve hızını arttırdığı, trombosit agregasyonunu azalttığı da gösterilmiştir (2, 11, 12). Migren, artrit, ateroskleroz, iskemi gibi çeşitli patofizyolojik durumlarda, nörojenik inflamasyon ve ağrıda, sepsiste endojen CGRP düzeyindeğişiklik gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (13-15).

Ailenin bir diğer üyesi olan AMY, pankreas Langerhans adacıklarında bulunan β -hücrelerinde amiloid plaklarından izole edilmiştir (16) ve ardından özellikle CGRP ile yapısal benzerlikler taşıdığı belirlenerek CGRP ailesine dahil edilmiştir. AMY daha çok gastrointestinal sistem ve enerji metabolizmasındaki etkileri ile bilinmektedir. Özellikle besin alımı ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde etkin rol oynamaktadır (17, 18). İnsülin sekresyonunun inhibe ettiği ve insülin direncine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Özellikle obezite tedavisinde ve yeme bozukluklarında tedavi hedefi olabileceği düşünülmektedir (19). Son yıllarda

AMY'nin anti-psikotik etkinliğine dair çalışmalar bulunmaktadır (20). Alzheimer hastalığında da AMY'nin olası etkinliğine dair araştırmalar yürütölmektedir. Transgenik Alzheimer'lı farelerde yapılan çalışmada AMY uygulamasının öğrenme ve hafızayı arttırdığı gösterilmiştir (19, 21)

İlk kez insan feokromasitoma hücrelerinden izole edilen AM, vücutta oldukça fazla dokuda eksprese edilmektedir (22). Adrenal medulla, böbrek, akciğerler, ventrikül ve özellikle endotel hücrelerinde yüksek miktarlarda bulunmaktadır (23, 24). Ekspresyon düzeyindeki fazlalığa bağlı olarak vücutta da çok çeşitli önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Antiproliferatif etkili olduğu, hücre migrasyonunu ve hipertrofiyi azalttığı endokrin sistemde; adrenokortikotropik hormon ve adrenal korteks hormonlarının salgılanmasını inhibe ettiği, insülin sekresyonu üzerinde de inhibitör rolü olduğu gösterilmiştir (25-29). Sıçanlarda intrarenal AM infüzyonu böbreklerde renal kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını arttırmış, intravenöz (i.v.) uygulanması gastrik boşalmayı inhibe etmiştir (30, 31). İmmün sistem ve kemik metabolizması üzerinde etkilerinin olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (32). Bütün bu etkilerinin yanında AM'nin özellikle kardiyovaskülersistem üzerindeki etkileri dikkat çekmektedir. Birçok damar yatağında vazodilatasyona neden olurken, ayrıca pozitif inotropik etkisiyle kalbe direkt olarak etki ettiği de bilinmektedir (33, 34).

CGRP ailesine bağlı peptitler birbirine yapıca çok benzeyen kalsitonin reseptörleri (CTR) veya kalsitonin reseptörü benzeri reseptörlerle (CLR) etkileşirler. CTR'ler ilk kez 1991 yılında domuzlarda gösterilmiştir (35). Hemen ardından bu reseptörlerin insanlarda bulunduğu gösterilmiş ve 2 ayrı varyantı hCT_aR ve hCT_bR olarak adlandırılmıştır. Bu reseptörler genellikle hücre yüzeyinde bulunurlar. Her iki varyant da vücutta çok çeşitli yerlerde bulunurlar, ancak hCT_aR yaygın dağılım gösterirken hCT_bR'ye özellikle plasenta, ovaryum, akciğer ve kemik iliğinde rastlanmıştır (36). CLR'ler ise 1993 yılında önce sıçanlarda gösterilmiş; ardından 2 yıl sonra insan CLR'ler izole edilmiştir (37, 38). CLR'ler özellikle santral sinir sisteminde, böbrek ve dalakta; ayrıca damarlardaki endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri ve kalpte bulunmaktadır. CTR ve CLR'ler G protein bağımlı reseptörlerdir ve 7 transmembran bölge içerirler (39, 40). Reseptörler aktivite gösterebilmek için, ligandın özelliğine bağlı olarak tek transmembran bölge içeren ilgili reseptör-aktive

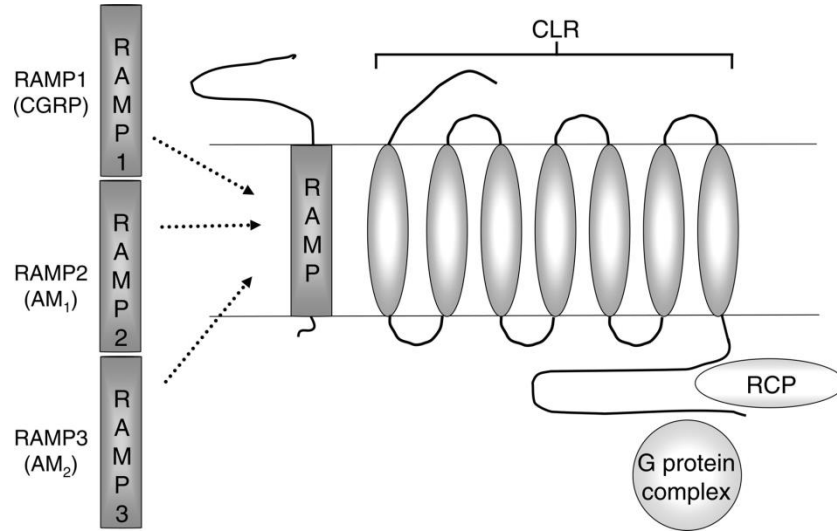
eden modifiye protein (RAMP) ile etkileşmelidir. Bu proteinler reseptörlerin plazma membranından geçişlerini ve hücre içine translokasyonlarını kolaylaştırmaktadırlar (41, 42). RAMP'lar 148 ila 189 aminoasitten oluşmaktadırlar; %30'dan daha az bir homoloji göstermekle birlikte birbirlerine yapısal olarak benzerler ve RAMP-1, RAMP-2 ve RAMP-3 olarak adlandırılmışlardır. Yapılarında büyük ekstraselüler N-terminali, plazma membranında bulunan bir bölge ve intraselüler kısa bir C-terminali taşırlar (13). AMY, CTR'ler RAMP'larla aktive olduklarında yüksek afinite göstermektedir (42, 43). CTR'ye bağlanan RAMP'lar reseptörün kalsitonin yerine AMY'ye afinite göstermesini sağlamaktadır. CTR'ler RAMP1 ile bağlandığında AMY1, RAMP2 ile bağlandığında AMY2 ve RAMP3 ile bağlandığında AMY3 adını alırlar. CGRP ve AM ise CLR'lere bağlanarak etki göstermektedirler. CLR'lerin CGRP reseptörü olarak fonksiyon gösterebilmesi için RAMP1'e; AM reseptörü olmak içinse RAMP2 ve -3'e (sırasıyla AM1 ve AM2) bağlanmaları gerekmektedir (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. CGRP ailesinin etkileştiği reseptörler ve reseptör komponentleri

Reseptör	Reseptör Komponenti	Agonist
CGRP	CLR/RAMP1	CGRP, IMD/AM ₂
AM1	CLR/RAMP2	AM, IMD/AM ₂
AM2	CLR/RAMP3	AM, CGRP, IMD/AM ₂
Kalsitonin	CTR	CT, CRSP
AMY1	CTR/RAMP1	AMY, CGRP
AMY3	CTR/RAMP3	AMY

RAMP1 uterus, mesane, beyin, pankreas ve gastrointestinal sistemde yaygın bir şekilde bulunur (44-46). Damarlarda, perivasküler sinirlerde, arter ve arteriyollerin endotel hücrelerinde ve düz kaslarında, ayrıca kardiyomiyositlerde ve kalpte kardiyomiyosit dışındaki dokularda bulunduğu gösterilmiştir (47, 48) RAMP2 akciğer, dalak, immün sistem ve böbrekte; kardiyovasküler sistemde ise damar endotel ve düz kas hücrelerinde bulunmaktadır (49). RAMP3'ün dağılımı RAMP2 ile benzerlik göstermektedir. Yüksek oranda böbrekte, daha az olmak üzere akciğer, dalak ve timusda bulunmaktadır (44, 45).

CLR'ler, optimum aktivite gösterebilmek için RAMP'lara ek olarak bir diğer adaptör proteine daha ihtiyaç duymaktadır. Reseptör komponent protein (RCP) adı verilen bu protein stimülatör G proteini (Gs) ile daha etkili bir bağlanma sağlamakta ve böylece aktiviteyi arttırmaktadır (41, 50) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kalsitonin benzeri reseptörlerin ve adaptör proteinler RAMP ile RCP'nin etkileşimleri. Şekil Brain, S.D. ve ark.'dan alınmıştır (6).

2.2. CGRP Ailesinin Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri ve Etki Mekanizmaları

CGRP ailesi peptitleri kardiyovasküler sistemde vazodilatör etkileriyle öne çıkmaktadırlar. Özellikle CGRP ve AM makro ve mikrovasküler damarlarda güçlü gevşetici etkileriyle bilinen peptitlerdir.

AMY kardiyovasküler sistemde CGRP reseptörleri üzerinden etki göstermektedir (51). Ancak AMY'nin etki göstermesi için yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşması gerekmektedir. Sıçanlarda i.v. AMY uygulaması ile potent vazodilatasyon ve arteriel kan basıncında azalma görülmüştür (52). Ancak insanda AMY uygulamasıyla yapılan çalışmalarda önemli bir etkiye rastlanmamıştır (53). Sıçan kardiyomiyositlerinde ve izole kalpte yapılan çalışmalarda AMY'nin direkt inotropik etkilerinin CGRP reseptörleri aracılı olduğu gösterilmiştir. Ancak kalpteki etkilerin de yüksek dozlarda ortaya çıkması nedeniyle AMY uygulamasının kliniğe uygulanamayacağına dikkat çekilmiştir (54, 55).

CGRP bilinen en güçlü vazodilatörlerdendir. Ayrıca diğer vazodilatörlerle karşılaştırıldığında etkisinin daha uzun süreli olduğu da gösterilmiştir (56, 57). Koroner, serebral, pulmoner ve renal arterlerdeki gevşetici etkisi hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (6). Hem normal hem de hipertansif hayvanlarda vasküler direnç ve organların kanlanması üzerinde düzenleyici etkileri bulunmaktadır (58, 59). Sistemik uygulandığında, hipertansiyonda kan basıncını düşürücü, pozitif inotropik ve kronotropik etkileri dikkat çekmektedir (60, 61). Sıçanlarda iskemik hasar sonrası CGRP salıverildiği ve ayrıca CGRP infüzyonunun sıçanlarda kalpte iskemi-reperfüzyona bağlı aritmileri azalttığı gösterilmiştir (62). Ayrıca yapılan birçok çalışmada CGRP'nin iskemik hasara karşı koruyucu etkinliği olduğu belirtilmiştir (63-65). CGRP'nin bu etkilerinin genel olarak vazodilatör etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (60, 61). Pulmoner vasküler sistemde gevşeme sağlayan CGRP'nin PH'de plazma düzeyinin azaldığı ve CGRP infüzyonunun PH'nin tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (13, 66-68).

CGRP kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerini CGRP reseptörleri üzerinden gerçekleştirmektedir. Selektif CGRP antagonisti CGRP₈₋₃₇ varlığında CGRP'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri inhibe olmaktadır (69-72). CGRP aracılı vazodilatasyonda endotel bağımlı ve endotelden bağımsız birçok mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir (6, 73, 74). Kedi serebral arteri, sıçan mezenter arteri ve domuz koroner arterleri gibi birçok dokuda CGRP uygulaması sonrası dokuda siklik adenozin monofosfat (sAMP) artışı ölçülmüş ve endoteli tahrip edilmiş damarlarda gevşeme yanıtı gözlenmiştir. Bu durum CGRP'nin düz kas hücrelerinde direkt olarak adenilat siklaz enzimini aktive ederek sAMP düzeyini arttırdığını düşündürmektedir (34, 75, 76). CGRP'nin endotel tabakasında sAMP üretimini arttırdığı ancak yüksek dozlarda bile siklik guanizin monofosfatı (sGMP) direkt uyaramadığı gösterilmiştir (74, 77). sAMP artışı sonrası protein kinaz A (PKA) aktivasyonunun adenozin trifosfat (ATP) ile aktive olan K⁺ (K_{ATP}) kanallarını uyarak gevşeme meydana getirebileceği K_{ATP} kanal inhibitörü glibenklamid ile CGRP yanıtının inhibe olduğu arteriyel düz kaslarda (78) domuz koroner arterinde (79) ve kobay üreterinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (34, 75, 80, 81).

CGRP'nin endotel kaynaklı gevşeme yanıtı oluşturduğuna dair çalışmalar da bulunmaktadır. Sıçan aortasında CGRP uygulamasının, endotel tabakasında bulunan

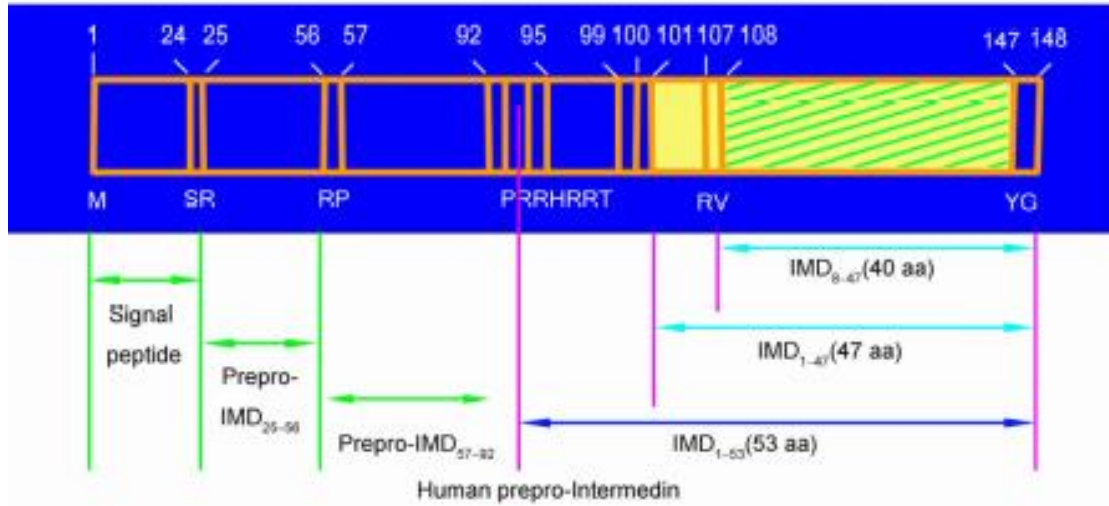
CGRP reseptörlerinin aktivasyonunun sAMP'yi ve böylece NO üretimini arttırdığı, düz kasa difüze olan NO'nun sGMP artışına yol açarak gevşeme sağladığı gösterilmiştir (82). Sıçan mezenter arterinde, CGRP'nin ayrıca vasküler sistemlerde güçlü bir vazokonstrüktör peptit olan endotelin-1 ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Perivasküler duyuşal motor sinirlerde CGRP reseptörleri ile endotelin-1 reseptörlerinin koekspresyon oldukları ve CGRP'nin endotelin-1'in neden olduğu kasılmalara daha duyarlı olduğu ve bu etkinin NO'dan, siklik nükleotitlerden ve K⁺ kanallarından bağımsız olduğu gösterilmiştir (83).

AM vücutta geniş bir biyolojik etkinliğe sahip olmakla birlikte kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileriyle öne çıkmaktadır. Gerek deney hayvanlarında gerekse insanlarda yapılan çalışmalarda AM infüzyonu sonrası belirgin, güçlü hipotansiyon gözlenmiştir ve bu etkinin NO aracılı olduğu gösterilmiştir (31, 84, 85). Sıçanlarda AM'nin akut ve kronik uygulanması sonrasında kan basıncıyla birlikte total periferik damar direncinde belirgin bir azalma ve eş zamanlı olarak kalp atım hızı, kalp debisi ve atım hacminde artış meydana gelmiştir. Benzer etkiler hipertansif sıçanlarda da gözlenmiştir (86, 87). AM'nin mezenter, renal, pulmoner, serebral arterler ve aorta başta olmak üzere birçok damarda gevşetici etkisi bulunmakta, ancak bu etkinin mekanizması türlere ve damar yatağına göre farklılık göstermektedir (32, 88, 89). AM, CGRP ve/veya AM reseptörleri üzerinden etki göstermektedir. Sıçan mezenter arterinde, köpek renal arterlerinde, kedi sistemik vasküler basıncında AM'nin gevşetici etkisi CGRP reseptör antagonisti varlığında inhibe olurken, kedi ve sıçan arka bacak arter yatağında, köpek serebral arterlerinde yapılan bazı çalışmalarda CGRP reseptörlerinin inhibisyonu gevşeme yanıtını değiştirmemiştir. AM reseptör antagonisti AM₂₂₋₅₂ varlığında insan koroner arterlerinde AM gevşeme yanıtı inhibe olurken, sıçan serebral arteriyollerinde yanıt değişmemektedir (89-91). Benzer şekilde AM'nin gevşetici etkisinde endotel tabakasının ve NO'nun rolü de farklılıklar göstermektedir. Sıçan renal, pulmoner, arka bacak arterleri, mezenter arteri gibi farklı damar yataklarında yapılan birçok çalışmada gevşemenin endotel aracılı olduğu ve nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri ile yanıtın azaldığı gösterilmiştir (84, 92, 93). Ancak bu çalışmaların aksine izole sıçan akciğerinde, kedi arka bacak arterlerinde, kedi penil arterinde yapılan çalışmalarda NOS inhibitörü

varlığında yanıtta herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir (94-97). İnsan ve köpek koroner arterlerinde ve sıçan serebral arterlerinde yapılan çalışmalarda yüksek K^+ varlığında AM yanıtı inhibe olmuştur (89, 98, 99). Literatürde çelişkili sonuçlar yer almakla birlikte genel olarak AM'nin vasküler sistemlerde sAMP, NO veya K^+ kanalları aracılığıyla gevşeme sağladığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (100).

2.3. IMD/AM₂

İntermedin/Adrenomedullin₂ (IMD/AM₂)CGRP ailesinin izole edilmiş, bilinen son üyesidir (101, 102). Roh ve ark. 2004 yılında, 146-150 aminoasitlik bir prepro peptidi kodlayan geni tanımlamışlardır (101). 2004 yılında iki ayrı grup tarafından keşfedilen IMD/AM₂, CGRP ailesinden özellikle AM ile yapısal olarak benzerlik göstermektedir (103). CGRP ailesi peptitleri gibi, N terminalinde disülfid bağı ile çevrelenmiş altı amino asitlik intramoleküler halkave C terminalinde amid yapısı taşımaktadır. Her ne kadar genel aminoasit ardışımı ailenin bilinen diğer peptitleri ile oldukça az benzerlik gösterse de peptidin C-terminali AM ile yaklaşık %28 ve CGRP ile %20 oranlarında benzerlik taşımaktadır ve bu ailenin karakteristik yapısal özelliklerine sahiptir. Bu durum göz önüne alınarak yeni keşfedilen bu peptit CGRP ailesine dahil edilmiş ve ön hipofiz pars intermediasında (*intermediated lobe*) ekspresyon düzeyinin oldukça fazla olması nedeniyle intermedin olarak adlandırılmıştır (101). Aynı yıl içerisinde Takei ve ark. balon balığından aynı peptidi izole etmişler ve AM₂ olarak adlandırmışlardır (104). İnsanlarda IMD/AM₂ geni kromozom 22'nin distal kolunda yer almaktadır. IMD/AM₂, 148 aminoasitlik prekürsör; pre-pro hormonun 93 ve 94. pozisyonundaki arjinin rezidüleri arasından ayrılarak 53 aminoasitlik bir peptit haline gelmesiyle oluşur. Bu peptit daha sonra ayrıca 101. aminoasitten ayrılarak 47 aminoasitlik uzun IMD/AM₂ (1-47) (pre-pro IMD₁₀₁₋₁₄₇) ve 40 aminoasitlik kısa IMD/AM₂ (8-47) (pre-pro IMD₁₀₈₋₁₄₇) versiyonlarına dönüşebilir (101) (Şekil 2.2).



Şekil. 2.2. İnsan IMD/AM₂'sinin 148 aminoasitlik prepropeptid IMD/AM₂'den bölünme bölgeleri. Şekil Ni, XQ ve ark.'dan alınmıştır (105).

IMD/AM₂'nin farklı versiyonları farklı etki gücü gösterebilmektedir. IMD/AM₂(1-47)'nin IMD/AM₂(8-47) ile karşılaştırıldığında kalp atım hızını daha güçlü bir şekilde arttırdığı, IMD/AM₂(1-53)'ün kan basıncı düşürücü etkisinin IMD/AM₂(1-47)'den daha fazla olduğu, fakat IMD/AM₂(1-47)'nin IMD/AM₂(1-53)'e göre daha uzun süreli hipotansiyon sağladığı gösterilmiştir (7). Ancak bu farklı versiyonların birbirlerine önemli farmakolojik üstünlükler sağlamadığı ve araştırmalarda her üç formun da kullanılabilceği belirtilmiştir (103).

IMD/AM₂'nin vücuttaki dağılımı da AM ile benzerlik göstermektedir (106). Plazmadaki IMD/AM₂'nin ana kaynağı bilinmemektedir ancak öncelikli olarak hipofizde salgılandığı düşünülmektedir (101). Sıçanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda en çok böbrek, gastrointestinal sistem, beyin, deri ve submaksillar bezde yüksek düzeylerde bulunmuştur. Ayrıca; pankreas, akciğer, dalak, timüs ve ovaryumlarda da önemli miktarda bulunmaktadır (101, 104, 106-109). Kalpte ise normal koşullarda IMD/AM₂düzeyi düşük düzeyde seyrederken, stres şartlarında IMD/AM₂düzeyinin önemli miktarda arttığı gösterilmiştir (110). Kalpte hastalık koşullarında artış göstermesi kalp hastalıklarının patogenezinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir.

IMD/AM₂'nin etkileştiği; IMD/AM₂ spesifik bir reseptöre rastlanmaması üzerine, IMD/AM₂'nin AM ve CGRP ile yapısal benzerlikleri dikkate alınarak IMD/AM₂'nin biyolojik etkinliğini RAMP/CLR'ler üzerinden gerçekleştirebileceği

düşünülmüştür. Bunun üzerine yapılan araştırmalarda, IMD/AM₂'nin başta RAMP3/CLR (AM2) olmak üzere, RAMP2/CLR (AM1) ve RAMP1/CLR (CGRP) ile etkileşerek aktivite sağladığı gösterilmiştir (101, 111).

IMD/AM₂, biyolojik aktivite olarak da AM ile benzerlik göstermektedir. Ancak gerek periferde gerekse beyinde yapılan birçok çalışmada AM'den daha potent olduğu belirtilmiştir. Her ne kadar benzer etkileri olsa da bu iki peptidin farklı fizyolojik şartlarda farklı sonuçlar meydana getirdiği durumlar da bulunmaktadır. IMD/AM₂'nin büyüme faktörü üzerinde inhibitör etkileri bulunurken AM'nin herhangi bir etkisi gösterilmemiştir. Benzer şekilde kronik renal hasar sonrasında IMD/AM₂ ekspresyon düzeyi azalırken, AM düzeyi artış göstermiş ve bu durum iki peptidin farklı patofizyolojik rolleri olduğunu düşündürmüştür (112).

IMD/AM₂ kardiyovasküler sistem üzerinde etkili bir peptit olarak bilinmektedir. Ancak ayrıca kan prolaktin ve oksitosin düzeylerini arttırdığı, anti-diürezisi ve anti-natriürezisi indüklediği, su ve besin alımını azalttığı ve gastrik boşalmayı inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalara bağlı olarak IMD/AM₂'nin büyüme ve metabolizma homeostazının kontrolünde de etkili olduğu düşünülmektedir (101, 102, 106, 113).

2.4. IMD/AM₂'nin Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri ve Mekanizmaları

CGRP ailesinin diğer üyelerinin vücut homeostazındaki önemli etkileri bilinmektedir. IMD/AM₂'nin yapıcı daha çok benzediği CGRP ve AM özellikle kardiyovasküler sistemin regülasyonunda ve kardiyovasküler sistem hastalıklarındaki etkileriyle dikkat çekmektedir (114). Bu durum dikkate alındığında IMD/AM₂'nin de özellikle vasküler sistemde etkili olması beklenen bir durumdur. Yapılan birçok çalışma bu durumu kanıtlar niteliktedir. IMD/AM₂ uygulanması ile kan basıncının düştüğü, vasküler basıncın azaldığı, kalp atım hızının arttığına dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (39, 101, 102, 115). IMD/AM₂ kalpte iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası koroner perfüzyonu, sol ventrikülün kasılma gücünü arttırmış, miyokardiyal infarkt büyüklüğünü, hipertrofiyi ve kardiyak fibrozisi azaltmıştır (116-118). IMD/AM₂'nin i.v. infüzyonu hem normotansif hem hipertansif sıçanlarda total periferik damar direncini azaltarak kardiyak debiyi arttırmıştır (119). IMD/AM₂'nin

birçok damar yatağında vazodilatör etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle pulmoner, renal ve abdominal arterlerde potent bir şekilde gevşeme sağladığı gösterilmiştir (120-122).

IMD/AM₂'nin hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullarda kardiyovasküler sistem homeostazındaki önemli etkilerinin, CLR/RAMP aracılığı ile gerçekleştiği hem CGRP reseptör antagonisti CGRP₈₋₃₇; hem de AM reseptör antagonisti AM₂₂₋₅₂ varlığında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (101, 107, 120). Her ne kadar IMD/AM₂'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinde sıklıkla CGRP reseptörlerinin etkisine rastlansa da CGRP ve AM reseptörlerinin yoğunluğunun vasküler yataklar arasında farklılıklar göstermesine bağlı olarak damar yatağına göre IMD/AM₂'nin etkileştiği reseptör de farklılık gösterebilmektedir (6, 70). Sıçan koroner, karotid ve supramezenterik arterlerinde, pulmoner arterinde ve sıçan sistemik basıncında meydana gelen hipotansiyonda IMD/AM₂ gevşeme yanıtı CGRP reseptörü aracılı bulunurken domuz koroner arterlerinde, IMD/AM₂'nin pulmoner endotel hücrelerindeki stabilizan etkisinde, sıçan renal arterinde AM₁ ve AM₂ reseptörlerinin de etkisi bulunmaktadır (101, 107, 120, 122-124).

IMD/AM₂'nin kardiyovasküler etkilerinin endotel aracılı ve NO bağımlı olduğu yapılan birçok araştırmada gösterilmiştir. Pulmoner vasküler sistemde, aortada gevşeme yanıtı NOS inhibitörü N^o-Nitro-L-arginin metil ester hidroklorür (L-NAME) varlığında ve endotel tabakasının tahrip edilmesi ile inhibe olmuştur (120, 125). Serebral endotel hücrelerinde ve pulmoner düz kas hücrelerinde. IMD/AM₂ uygulamasıyla NO üretimi doz bağımlı olarak artış göstermiştir (126, 127).

IMD/AM₂'nin kalp kası üzerindeki pozitif inotrop etkisinde, hücre proliferasyonu, hücre apoptozu ve hücre migrasyonu gibi kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinde intraselüler sAMP'yi artırdığı da gösterilmiştir (128-130).

2.5. Pulmoner Hipertansiyon

PH, pulmoner vasküler dirençteki artışla birlikte pulmoner arteriyel basıncın yükselmesi ve buna bağlı olarak pulmoner sisteme kan akımının azalmasıyla karakterize, hızlı ilerleyen bir hastalıktır (131). Pulmoner arteriyel basıncının

istirahat halinde 25 mmHg, egzersiz sırasında ise 30 mmHg'yı geçtiği durumlarda PH tanısı konulur (132). PH'nin oldukça karmaşık, birçok faktörden etkilenen bir patofizyoloji ile geliştiği bilinmektedir. PH idiyopatik olabileceği gibi genetik mutasyonlar, çevresel faktörler, ilaç kullanımı gibi ekzojen maruziyetler, pulmoner damar yatağında uzun süreli vazokonstriksiyon, hücrel proliferasyon, tromboz; vazodilatasyonu ve vazokonstriksiyonu regüle eden vasküler efektörlerin dengesinde bozulmalar, uzun süreli kronik akciğer ve kalp hastalıkları sonucunda da PH gelişebilir (133). Endotelial disfonksiyon PH gelişiminden sorumlu olan önemli patogenezlere biridir. Endotel hasarı sonrasında damar tonusunu dengeleyen endotel aracılı bir takım mediyatörlerin düzeyleri değişmektedir. PH sırasında NO, prostasiklin gibi vazodilatör moleküller azalırken, endotelin gibi vazokonstriktör ajanların ekspresyonlarının artış gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (134). PH sırasında sıklıkla rastlanan bir diğer durum vasküler *remodelling*dir. Vasküler *remodelling* artan pulmoner vasküler rezistansın en önemli nedeni olarak görülmektedir (135). *Remodelling* meydana gelmiş damarlardaki vasküler hücreler hiperproliferatif ve antiapoptotik bir fenotip gösterirler; aşırı büyüme faktörü uyarımı, transkripsiyon faktörlerinde anomaliler, mitokandriyal disfonksiyon gibi etkenler hücre proliferasyonunu ve hiperplaziyi indükleyebilirler (136). İyon kanallarının fonksiyonlarında meydana gelen anomaliler ve bozulmuş kalsiyum homeostazı da pulmoner vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu tetikleyerek *remodellinge* yol açabilirler (21).

Henüz PH için kesinleşmiş kesin bir tedavi bulunmamaktadır. Tedavi semptomatik olarak yürütülür. Hemodinamik parametreleri düzeltmek adına, prostasiklin analogları (iloprost, epoprostenol), endotelin reseptör-1 antagonisti bosentan, periferik vazodilatörler, kalsiyum kanal blokörleri tedavide tercih edilmektedir (137). Ancak özellikle son yıllarda akciğer damar yatağındaki regülatör ve yapısal değişiklikleri hedefleyen birçok hedefe yönelik ilaç çalışması bulunmaktadır. Her ne kadar mevcut tedavi seçenekleri ile hastalığın ilerleme hızı azaltılarak semptomları hafifletilse de, PH günümüzde halen tedavisi olmayan ve sıklıkla ölümlü sonuçlanan tehlikeli bir hastalıktır (137).

2.6. CGRP Ailesi ve Pulmoner Hipertansiyon

CGRP ailesi peptitlerinin kardiyovasküler sistemdeki önemli etkileri ve pulmoner damar yatağında sağladıkları belirgin vazodilatasyon göz önüne alınarak PH'deki olası rolleri birçok çalışmada değerlendirilmiştir. Öncelikle CGRP ve ardından AM ile yapılan çalışmalarda önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Akciğer dokusunda CGRP düzeyi oldukça yüksektir (138). Sıçanlarda PH sırasında CGRP'nin dolaşımdaki miktarlarının azaldığı ve PH'li sıçanlara CGRP infüzyonu uygulandığında pulmoner vasküler direncin azaldığı gösterilmiştir (66, 67). Kronik hipoksi maruziyeti öncesinde farelerin akciğerlerine yapılan adenovirüs- aracılı olarak CGRP transferi, sAMP aracılı olarak pulmoner vasküler direnç artışına karşı koruma sağlamış ve vasküler *remodellingi* azaltmıştır. CGRP ile ayrıca güçlü vazokonstriktörler olan endotelin ve anjiyotensinin saliverilmesi de suprese edilmektedir (139). Sıçan hipoksik akciğerlerinde yapılan çalışmalarda CGRP reseptörü adaptör proteini olan RAMP1'in ekspresyonu artmıştır(140). İnsan dokusunda yapılan çalışmalarda CGRP'nin hipoksi ile indüklenen remodellinge karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (68).

Periferik mikrosirkülasyondaki güçlü ve uzun süreli vazodilatör etkinliğine bağlı olarak PH'de etkili olabileceği düşünülen bir diğer CGRP ailesi peptidi AM'dir (141). CGRP gibi AM'de sıçanlarda hipoksi ile indüklenen PH'de pulmoner arter basıncını azaltmıştır (142). Nagaya ve ark.sıçanlarda i.v. AM uygulamasının sistemik kan basıncını fazla etkilemezken pulmoner vasküler direnci düşürdüğünü ve arteriyel oksijen düzeyini arttırdığını göstermiş ve bu durumun PH tedavisinde avantaj sağlayabileceğini belirtmişlerdir (143). PH hastalarında yapılan çalışmalarda; AM'nin plazma düzeyinin hastalığın şiddeti ile bağlantılı olarak artış göstermekte, ancak endojen üretimdeki bu artışın aksine i.v. AM uygulaması, pulmoner arter basıncını ve pulmoner vasküler direnci azaltmaktadır (144, 145). Az sayıda PH hastasıyla yapılan bir başka klinik çalışmada akut olarak inhale edilen AM'nin pulmoner sisteme selektif olarak hemodinamik parametreleri iyileştirdiği ve egzersiz kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir (146). AM'nin bu etkileri düşünüldüğünde PH'de gelecek tedavi hedefi olarak değerlendirilebilmesi için uzun dönem güvenliliği ve etkililiğini değerlendirecek çok merkezli, randomize, kontrollü klinik araştırmaların yapılması gerekmektedir (133).

Ailenin son izole edilen üyesi olan IMD/AM₂'nin pulmoner damar yatağında etkin bir vazodilatör olduğu bilinmektedir (3, 120). Hipoksi ile indüklenmiş PH geliştirilen sıçanların sağ ventriküllerinde, akciğer dokularında ve plazmalarında IMD/AM₂ mesajcı ribonükleik asit ve protein ekspresyonu artış göstermiştir (147-149). Mao ve ark.'nın sıçanlarda yaptığı çalışmada, IMD/AM₂ tedavisi ile PH semptomları hafiflerken, sağ ventrikül hipertrofisi de önlenmiş ve hipoksik pulmoner vasküler *remodelling* inhibe olmuştur (127). IMD/AM₂ tedavisi akciğerlerde NO üretimini arttırarak L-arjinin'in pulmoner vasküler dokuya geçişinde de artış sağlamıştır. Pulmoner hipertansif sıçanlarda yapılan bu çalışmalarda IMD/AM₂'nin hem pulmoner arter düz kas hücrelerinde proliferasyonu azaltıp, apoptozu arttırarak, hem de önemli gevşetici ajan olan NO yolağını aktive ederek PH'de farklı mekanizmalarla etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda henüz çok az sayıda çalışma mevcut olup, IMD/AM₂'nin PH'de *in vitro* ve *in vivo* olarak pulmoner ve sistemik damar basıncına olan etkileri hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır (105).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyleerde *Sprague Dawley* yetişkin, erkek albino sıçanlar (300-350 g) kullanıldı (Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu karar no: 2015/02-03). Deneyleer Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. İzole Organ Banyosu

Sıçanlar, karbondioksit gazı ile uyutulduktan sonra karotid arterleri kanatılarak ötenazi edildi. Göğüs kafesleri açılarak, akciğerler kalp ile birlikte izole edildi ve soğuk Krebs-Heinseleit solüsyonu (KHS) içine konuldu. Ana PA görülecek şekilde kalp ve akciğerler sabitlendi. PA çevresindeki fazla yağ ve bağ dokusu temizlenip, PA ana dalından yaklaşık 2,5-3 mm.'lik halka preparatı hazırlandıktan sonra 5 ml'lik 37°C de % 95 O₂ - %5 CO₂ ile gazlandırılan KHS içeren organ banyosuna yerleştirildi. İki tane paslanmaz çelikten kanca PA lümenine yerleştirildi. Preparata deney başlangıcında 1,5 g bazal gerim uygulandı ve hemen ardından 10⁻⁴ M fenilefrinle alfa adrenerjik reseptörlerin uyarılması sağlandı. KHS ile yıkanarak bazal gerime geri döndürülen preparatlar 1 saat dinlendirildi ve bu süreçte her 15 dk'da bir KHS ile yıkandı. Gerimde görülen değişiklikler izometrik olarak kuvvet transdüseri ile ölçülerek bilgisayara aktarıldı.

Dinlenme süresinin ardından kümülatif fenilefrin (10⁻⁸-3x10⁻⁵M) kasılma yanıtı alınarak konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edildi. Maksimum kasılmanın % 60-80'ini sağlayan konsantrasyon aralığı belirlendi (10⁻⁷-3x10⁻⁶ M) ve bu konsantrasyon deneyleerde ön kasılma sağlamak için kullanıldı.

IMD/AM₂'nin etki mekanizmasının araştırıldığı izole organ banyosu deneyleerinde fenilefrin ön kasılmasının (10⁻⁷-3x10⁻⁶ M) ardından kümülatif IMD/AM₂ (10⁻⁹-3x10⁻⁷M) yanıtları alındı. Bu yanıt, PA halkalarının çeşitli antagonist ve inhibitörler (CGRP₈₋₃₇ (10⁻⁶ M), AM₂₂₋₅₂ (10⁻⁶M), L-NAME (10⁻⁴ M), ODQ (10⁻⁵ M), SQ22536 (10⁻⁴ M), H89 (10⁻⁶ M), TEA (10⁻²M), 4-aminopiridin (3x10⁻³ M), glibenklamid (10⁻⁵ M), apamin (3x10⁻⁷ M), TRAM-34 (10⁻⁶ M), iberitoksin (10⁻⁷ M), verapamil (10⁻⁵ M), La⁺³ (10⁻⁴ M) ile 30 dk süresince inkübe edilmeleri sonrasında

tekrarlandı. PA'daki kasılma ve gevşemeler izometrik olarak kuvvet transdüseri yardımıyla ölçülüp bilgisayara aktarıldı (MP36-Biopac data acquisition system). Endotel tabakasının tahrip edildiği deney gruplarında, PA halkaları damar lümenlerinden ince bir tel geçirilerek ıslak filtre kağıdı üzerinde yuvarlandı ve endotel tabakaları hasarlandı. Bu hasar fenilefrin (10^{-7} - 3×10^{-6} M) ile alınan ön kasılmanın ardından asetilkolin (ACh) (10^{-8} - 10^{-5} M) ile anlamlı bir gevşeme elde edilmemesi (<10%) ile kontrol edildi. Daha sonra yine fenilefrinle ön kasılma alınarak (10^{-7} - 3×10^{-6} M) IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları alındı. Hiperpolarize sıçan ana PA'sında IMD/AM₂'nin etkisi 60 mM yüksek K⁺lu KHS ile ön kasılma oluşturularak araştırıldı. Yüksek K⁺lu KHS ile ön kasılma oluşturulduktan sonra IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları alındı.

Sekonder pulmoner hipertansif (bkz. 3.3. kronik hipoksi ile indüklenmiş sekonder pulmoner hipertansiyon modeli) ve normoksik hayvanlardan izole edilen PA halkalarında; daha potent kasılma sağlamak amacıyla kasıcı ajan olarak tromboksan A₂ analogu U46619 kullanıldı. U46619 (3×10^{-8} - 3×10^{-7} M) ile sağlanan ön kasılmadan sonra IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtı alındı. Bu yanıt L-NAME (10^{-4} M) ile 30 dk'lık inkübasyon sonrasında tekrarlandı.

3.2. Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonundaki Değişimlerin İzlenmesi

Sıçanlar yüksek doz ketamin/ksilazin ile anesteziye edildikten sonra servikal dislokasyonla ötenazi edildi. Göğüs kafesleri açılarak, akciğerler izole edildi ve PA ana dalı temizlenerek yaklaşık 2.5-3 mm'lik halka preparatı hazırlandı. PA halkası, lümeni dış yüzeyde olacak şekilde endotel tabakası korunarak ters çevrildi. Ters çevrilen damar paslanmaz çelikten iki kancaya takılarak dokuya 0,36 V (~1,5 g) ön gerilim uygulandı (Şekil.3.1.).



Şekil 3.1. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişikliklerin izlendiği deneylerde ana PA halkasının sisteme yerleştirilmesi

Doku karanlıkta tutularak KHS içindeki Fura-2 AM inkübasyon çözeltisi ile 90 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası doku sıcaklığı $37^{\circ}C$ olan % 95 O_2 - %5 CO_2 ile gazlandırılan KHS içeren küvete yerleştirildi. Hücre içerisine girmeyen Fura-2 AM'nin uzaklaştırılması için perfüzyon pompası yardımıyla doku 60 dk boyunca 1mM probenesid çözeltisi içeren KHS ile yıkandı. 90 dk'lık dinlenme sürecinden sonra fenilefrinle kasılma yanıtı alındı ve IMD/AM₂ kümülatif olarak uygulandı. İberiotoksin, verapamil ve La^{+3} varlığında IMD/AM₂ yanıtı tekrarlandı. Kasılma-gevşeme yanıtlarıyla eş zamanlı olarak kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler izlendi. Spesifik olarak Ca^{+2} iyonuna afinite gösteren Fura-2 AM, hücre membranından geçtikten sonra asetoksi metil (AM) ester grubu hücre içindeki esterazlar aracılığı ile uzaklaştırılır. Fura-2 serbest halde iken ekzitasyon dalga boyu 380 nm iken, Ca^{+2} bağlandıktan sonra ekzitasyon dalga boyu 340 nm'ye kayar ve 510 nm'de alınan emisyon şiddeti Ca^{+2} konsantrasyonu ile orantılı olarak artış gösterir (Quantamaster-8 2005 PTI, Photon Technology International, Inc., NJ, U.S.A). Hücre içi Ca^{+2} değerlerindeki değişim orantısız olarak verilmiştir ($F_{340/380}$). Deney sonunda 10 μM iyonominin verilerek hücre içi ve hücre dışı Ca^{+2} miktarlarının eşitlenmesi sağlandı. Ardından doku 2 mM etilen glikol tetraasidik asit (EGTA) içeren Ca^{+2} 'siz KHS ile yıkanarak, ortamdaki Ca^{+2} 'nin Fura-2 AM'den ayrılması sağlandı. Son olarak 5 mM mangan klorür uygulanarak arka plandaki floresans belirlendi. Deney süresince meydana gelen hücre içi Ca^{+2} değişiklikleri bu floresansa göre normalize edildi.

3.3. Kronik Hipoksi ile İndüklenmiş Sekonder PH Modeli

Sıçanlarda sekonder PH, kronik hipobarik hipoksi uygulanarak oluşturuldu. Bu amaçla iki adet 50x50x50 cm'lik pleksiglas kutu (Önder Kimya, Siteler, Ankara) kullanıldı. Kutulardaki atmosfer basıncı vakum pompası (Zihni Vakum Pompaları, Pendik, İstanbul) kullanılarak düşürüldü. Sıçanlar öncelikle bir gün boyunca atmosfer basıncı ¼ oranında düşürülen pleksiglas kutu içerisinde tutularak aklimatize edildi. Ardından 3 hafta süresince atmosfer basıncı ½ oranında düşürülen diğer pleksiglas kutuda tutuldu (150). Bu süre içinde kutuda bulunan kafeslere her gün yem ve su ilavesi yapıldı, 2 günde bir sıçanların kafesleri temizlendi. 3 haftanın sonunda kafeslerden alınan sıçanlar ötenazi edildi ve sekonder PH gelişimini doğrulayabilmek için akciğer damar yatağında bazal perfüzyon basıncında meydana gelen artış ve hematokrit düzeyi ölçüldü. Ayrıca sağ ventrikülde meydana gelen hipertrofi değerlendirildi. Hematokrit değeri sıçanlardan 4 ml kan alınarak kırmızı kan hücrelerinin oluşturduğu hacimin, toplam kan hacmine oranlanmasıyla hesaplandı. Sağ ventrikül hipertrofisini değerlendirmek için sağ ventrikül serbest duvarı ayrıldıktan sonra sol ventrikül ve septum bir bütün olarak izole edildi. Ardından sağ ventrikül serbest duvarının ağırlığı ile sol ventrikül+septumun ağırlığı ölçüldü. “Sağ ventrikül (yaş ağırlığı)(g)/sol ventrikül+septum (yaş ağırlığı) (g)” oranı hesaplandı. Sağ ventrikül hipertrofisi, kronik hipoksiye maruz bırakılan hayvanların “Sağ ventrikül/sol ventrikül+septum” oranının normal hayvanların oranı ile karşılaştırılmasıyla belirlendi (186). Pulmoner damar yatağında bazal perfüzyon basıncındaki artış izole sıçan akciğer perfüzyonu sistemi kullanılarak ölçüldü.

PH gelişimi histopatolojik olarak da değerlendirildi (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı). Sıçan ana PA'ları %10'luk formaldehitte fikse edildi. Damarlardan 5µm kalınlığında kesitler alınarak hemotoksilen ve eozin ile boyandı. Damar medial duvarın kalınlığı ışık mikroskobu (Leica DMR 6000B, Westlar Germany) ve dijital kamera (Model DFC 490, Leica) kullanılarak on ayrı noktadan ölçülerek medial duvar kalınlığı belirlendi (LAS, Leica Inc. Westlar Germany).

Sekonder PH geliştirildiği doğrulanan sıçanların akciğerlerinde izole akciğer perfüzyonu ve ana PA'larında izole organ banyosu deneyleri yapıldı.

3.4. İzole Sıçan Akciğer Perfüzyonu

Sekonder pulmoner hipertansif ve normoksik sıçanlar, intraperitoneal olarak uygulanan ketamin/ksilazin ile anestezi edildi. Trakeal kanülasyonun ardından göğüs kafesleri açıldı. Sağ ventriküle heparin (200 IU) uygulandı. Bir süre beklenildikten sonra sıçanın abdominal aortu kanatılarak ötenazi edildi. Sağ ventriküle kesi atılarak ana PA'sı kanüle edildi ve sabitlendi. Atriyum ve ventriküller kesilerek uzaklaştırıldı ve perfüzyonun serbest biçimde akabilmesi sağlandı. Ardından trakea ve akciğerler izole edilerek modifiye Langendorff perfüzyon sistemine asıldı. Akciğerler, ana rezervuarda bulunan %95 O₂ - %5 CO₂ ile gazlandırılan 37°C'deki KHS ile 6 ml/dk hızında perfüze edildi. 20 dk süresince basıncın stabilize olması beklenildi. 20 dk sonunda bazal perfüzyon basıncı U-46619 (3×10^{-8} - 3×10^{-7} M) ile basınç yaklaşık 10 mmHg olacak şekilde yükseltildi. IMD/AM₂ (2 µg/100 µl) ve ACh (2 µg/ 100 µl) 100 bolus enjeksiyonla intraarteriyel (i.a.) uygulandı. Bu yanıtlar L-NAME (10⁻⁴ M) varlığında tekrarlandı. Deneyler papaverin (180 µg/100 µl, i.a) yanıtı alınarak sonlandırıldı. Perfüzyon basıncında meydana gelen değişiklikler transdüser data kayıt sistemi (MP36 Biopac data acquisition system) aracılığı ile bilgisayara kaydedildi.

3.5. Kullanılan Çözelti ve İlaçlar

Deneylerde fizyolojik solüsyon olarak KHS kullanıldı (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, ve glukoz 11.1.

60 mM KCl içeren yüksek K⁺lu KHS çözeltisi KCl'nin eş molar konsantrasyonda NaCl ile değiştirilmesi ile hazırlandı.

Fura-2 AM inkübasyon çözeltisi, 0,2 mM neostigmin %0,02 pluronik, 1mM probenesid ve 5 µM Fura-2 AM boyasının KHS içinde 10 dk süresince sonike edilmesiyle hazırlandı.

Ca²⁺ içermeyen EGTA çözeltisi, KHS'ye CaCl₂ yerine 10 mM EGTA eklenmesi ile hazırlandı.

Kalsiyum içermeyen KHS hazırlamak için CaCl₂ eş molar konsantrasyonda MgSO₄ ile yer değiştirildi. 100 µM EGTA 5M KOH içerisinde çözeltilmeye ilave edildi, çözelti pH'sı derişik HCl ile 7.4'e getirildi.

Heparin; Nevparin[®], Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.'den (İstanbul, Türkiye), ketamin; Alfamine[®] ve ksilazin; Alfazyne[®] Egevet Hayvancılık San. ve

Ticaret Limited Şirketi'nden (İzmir, Türkiye) temin edilmiştir. İberiotoksin ve IMD/AM2 (sıçandan elde edilen IMD/AM2₁₋₄₇) Bachem laboratuvarlarından (Torrance, CA, Amerika), AM₂₂₋₅₂ ve CGRP₈₋₃₇ Phoenix laboratuvarlarından (Mountainview, CA, Amerika) sağlanmıştır. Apamin, N⁰-Nitro-L-arginin metil ester hidroklorür (L-NAME), N- [2- (p-Bromocinnamylamino) ethyl] - 5 - isoquinolinesulfonamide dihydrochloride (H89), asetilkolin (ACh), glibenklamid, tetraetilamonyum klorür (TEA), 11-dideoksi-9 α ,11 α -methanoepoksi prostaglandin F_{2 α} (U-46619) 1,3-Dihidro-1-[2-hidroksi-5-(triflurometil)fenil]-5-(triflurometil)-2H-benzimidazol-2-on (NS1619), 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole (TRAM-34), ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), 4-aminopiridin, La⁺³, verapamil, papaverin hidroklorür, probenesid, neostigmin, iyonomisin, mangan klorür, EGTA Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Amerika)'dan, 9-(tetrahidro-2'-fural) adenin (SQ22536) Calbiochem (Darmstadt, Almanya)'den pluronik ve Fura-2 AM Molecular Probes (Oregon, ABD)'dan temin edilmiştir.

Fura-2 AM, pluronik, iyonomisin, glibenklamid ve NS1619 DMSO'da; U46619 ise metanol'de çözüldü. Probenesid 0,5 N NaOH'da çözüldükten sonra pH'sı derişik HCl kullanılarak 7,4'e ayarlandı. Bu çözücüler gevşeme ve kasılma yanıtlarını tek başlarına denediklerinde değiştirmediler. Diğer tüm maddeler distile suda çözüldü. Kimyasallar istenilen dilüsyonlara distile su ile seyreltildi. Bütün maddeler (1-75 μ l hacminde) banyo ortamında en son molar konsantrasyon olacak şekilde ilave edildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

İzole organ banyosunda ve hücre içi Ca⁺² konsantrasyonundaki değişikliklerin izlendiği deneylerde etki mekanizmasının değerlendirildiği gruplarda gevşemeler fenilefrin kasılmasının %'si olarak verilirken, PH ve normoksi gruplarında U46619 kasılmasının %'si olarak verildi.

İzole akciğer perfüzyonunda perfüzyon basıncında meydana gelen azalma U46619'la arttırılan basıncın %'si olarak ifade edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. İzole organ banyosu ve hücre içi Ca⁺² konsantrasyonundaki değişikliklerin izlendiği deneylerde, konsantrasyon bağımlı yanıtlarda iki yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı ve *post hoc* olarak da Bonferroni testi yapıldı.

İki grubun karşılaştırıldığı testlerde *Student's t* testi kullanıldı. Analizler *Graphpad Prism5.0* yazılımı kullanılarak yapıldı. Tüm parametrelerde $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

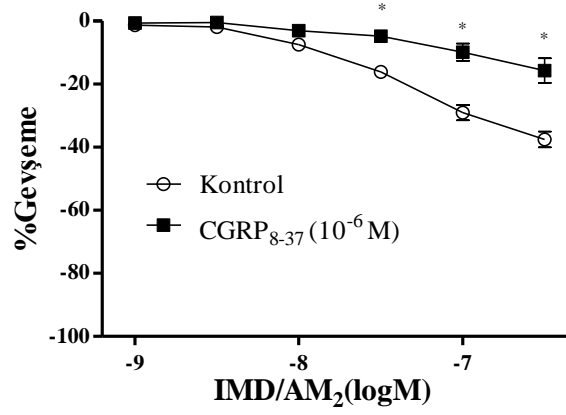
4. BULGULAR

4.1. İzole Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂'nin Etki Mekanizması

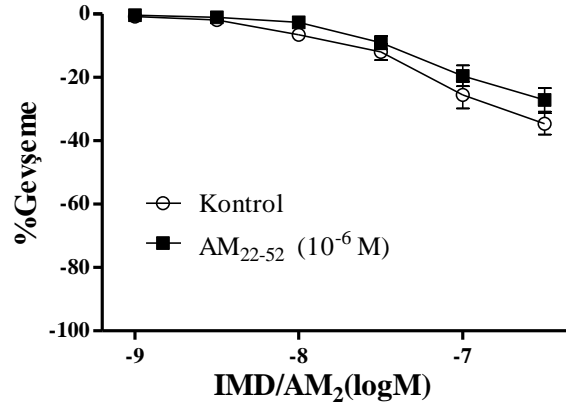
4.1.1. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında CGRP ve AM Reseptörlerinin Rolü

İzole sıçan ana PA halkalarında fenilefrinle ön kasılma (3×10^{-6} M) oluşturularak IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı elde edildi. CGRP reseptör antagonisti CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M) ile 30 dakika süresince inkübe edilen PA halkalarında IMD/AM₂ gevşeme yanıtları anlamlı olarak inhibe olurken (* $p < 0,05$; Şekil 4.1.A), selektif olmayan AM₁ ve AM₂ reseptörleri antagonisti AM₂₂₋₅₂ varlığında, IMD/AM₂ gevşeme yanıtlarında meydana gelen inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.1.B). CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M) ve AM₂₂₋₅₂ (10^{-6} M) antagonistlerinin birlikte uygulanması ile IMD/AM₂ yanıtı anlamlı olarak azalırken (* $p < 0,05$; Şekil 4.1.C); bu inhibisyon sadece CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M) varlığında meydana gelen inhibisyonla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark görülmedi.

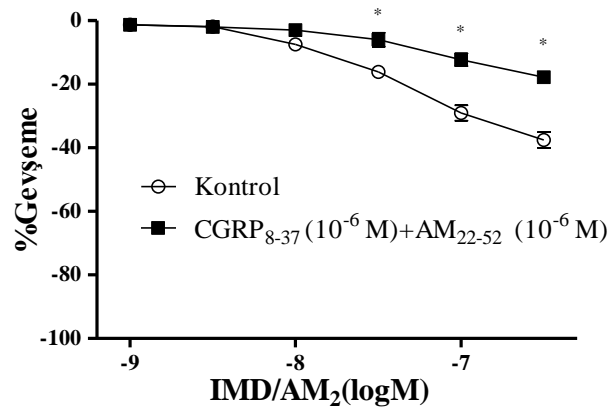
A



B



C

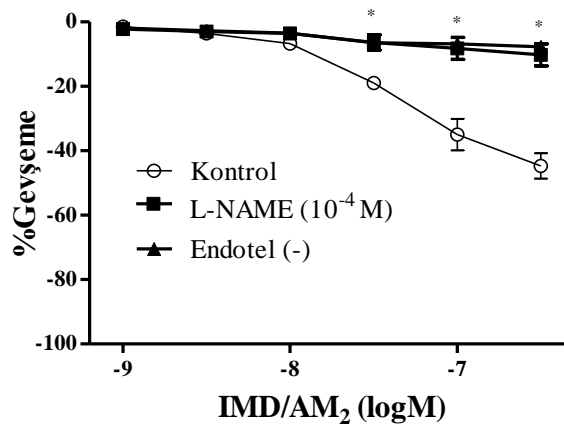


Şekil 4.1. İzole sıçan ana pulmoner arterinde, CGRP₈₋₃₇ (10⁻⁶ M) varlığında (A); AM₂₂₋₅₂ varlığında (B) ve hem CGRP₈₋₃₇ (10⁻⁶ M) hem de AM₂₂₋₅₂ (10⁻⁶ M) varlığında (C) IMD/AM₂'nin konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları. (*p<0,05, IMD/AM₂ yanıtı inhibitörler varlığında IMD/AM₂ yanıtı ile karşılaştırıldığında, n=6).

4.1.2. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında NOS İnhibitörü ve Endotel Tabakasının Rolü

İzole sıçan PA halkaları 30 dk süresince L-NAME (10⁻⁴ M) ile inkübe edildiğinde IMD/AM₂ (10⁻⁹ - 3x10⁻⁷ M) ile konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı inhibe oldu.

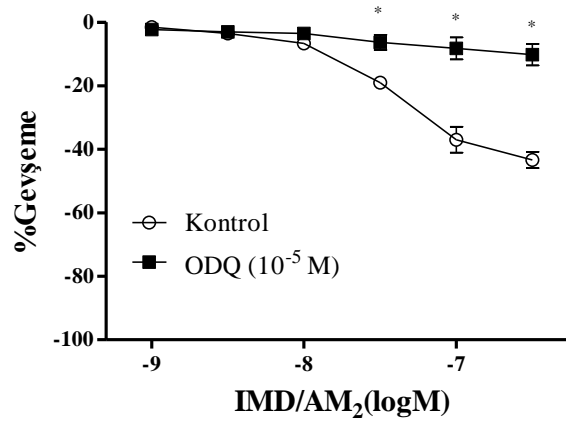
Endotel tabakası hasarlanmış sıçan PA halkalarında da aynı şekilde IMD/AM₂ gevşeme yanıtı inhibe oldu (*p<0,05; Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. İzole sıçan ana PA'sında, L-NAME (10⁻⁴ M) varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtları ve endoteli tahrip edilmiş PA'da IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (*p<0,05; IMD/AM₂ yanıtı, L-NAME varlığında IMD/AM₂ yanıtı ve endoteli tahrip edilmiş PA'da IMD/AM₂ yanıtı ile karşılaştırıldığında, n=6).

4.1.3. Sıçan PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında Siklik Guanozin Monofosfatın (sGMP) Rolü

İzole sıçan ana pulmoner arter halkalarında sGMP aracılı gevşeme yanıtını değerlendirmek için spesifik guanilat siklaz enzimi inhibitörü ODQ (10⁻⁵ M) kullanıldı. Fenilefrinle (3x10⁻⁶ M) ön kasılma oluşturulmuş olan PA halkalarında IMD/AM₂ (10⁻⁹ - 3x10⁻⁷ M) ile konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı elde edildi. ODQ (10⁻⁵ M) varlığında IMD/AM₂ (10⁻⁹ - 3x10⁻⁷ M) gevşeme yanıtı inhibe oldu (*p<0,05; Şekil 4.4.A).

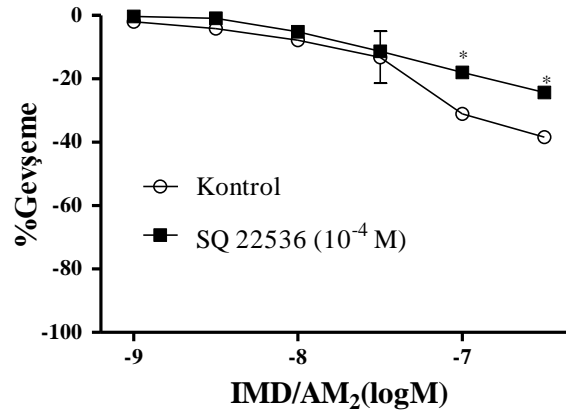


Şekil 4.3. İzole sıçan ana pulmoner arterinde, ODQ (10^{-5} M) varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (* $p < 0,05$; IMD/AM₂ yanıtı ODQ varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ile karşılaştırıldığında, $n=6$).

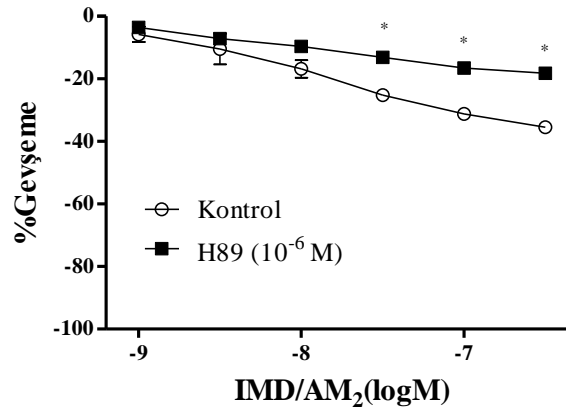
4.1.4. Sıçan PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında Siklik Adenozin Monofosfat (sAMP) ve Protein Kinaz A (PKA) Yolağının Rolü

İzole sıçan ana pulmoner arter halkalarında sAMP aracılı gevşeme yanıtını değerlendirmek için spesifik adenilat siklaz enzimi inhibitörü SQ22536 (10^{-4} M) kullanıldı. Fenilefrinle (3×10^{-6} M) ön kasılma oluşturulmuş olan PA halkalarında IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı elde edildi. SQ22536 (10^{-4} M) varlığında IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtı azaldı (* $p < 0,05$; Şekil 4.4.A). sAMP yolağının bir diğer elemanı olan PKA'nın etkisi ise enzimin spesifik inhibitörü H89 (10^{-6} M) varlığında değerlendirildi. H89 (10^{-6} M) varlığında IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtı inhibe oldu (Şekil 4.4.B).

A



B

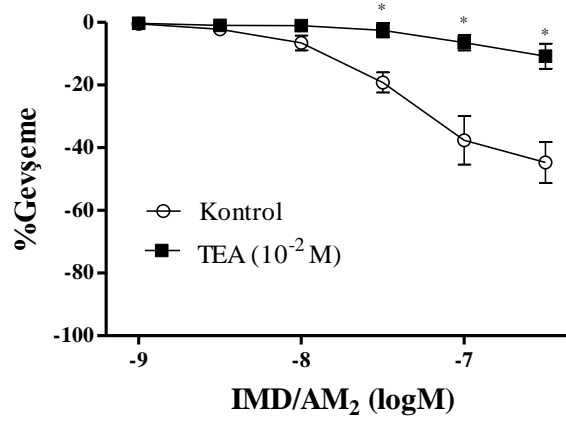


Şekil 4.4. İzole sıçan ana pulmoner arterinde, SQ22536 (10^{-4} M) (A) ve H89 (10^{-6} M) (B) varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (* $p < 0,05$; IMD/AM₂ gevşeme yanıtı SQ22536 varlığında ve H89 varlığında alınan IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ile karşılaştırıldığında, $n=6$).

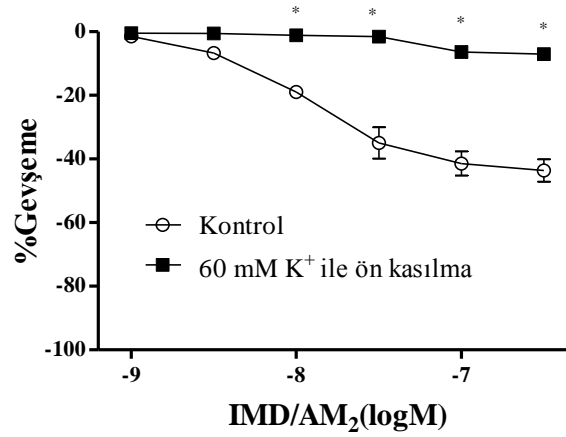
4.1.5. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında Potasyum Kanallarının Rolü

Fenilefrinle (3×10^{-6} M) ön kasılma oluşturulan PA halkalarında IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı elde edildi. Spesifik olmayan K⁺ kanal inhibitörü tetraetilamoniyum (TEA) (10^{-2} M) varlığında IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtı inhibe oldu (* $p < 0,05$; Şekil 4.5.A). Sıçan PA halkalarında 60 mM K⁺ ile ön kasılma oluşturulması sonrasında kümülatif olarak uygulanan IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile gevşeme yanıtı inhibe oldu (Şekil 4.5.B).

A



B

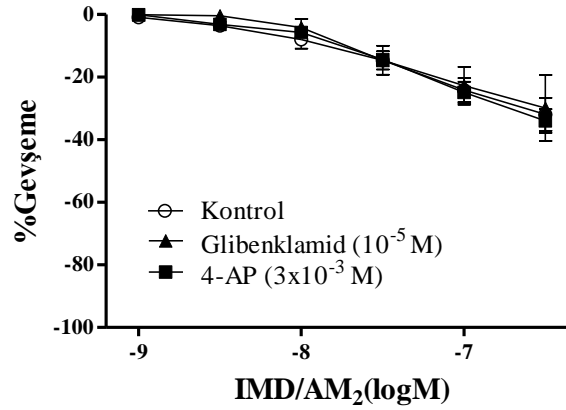


Şekil 4.5. İzole sıçan PA halkalarında, TEA (10^{-4} M) varlığında (A) ve 60 mM K^+ ile ön kasılma oluşturulması ile (B) alınan konsantrasyon bağımlı IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (* $p < 0,05$; IMD/AM₂ gevşeme yanıtı TEA varlığında alınan IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ile karşılaştırıldığında (A), fenilefrin ile alınan ön kasılma sonrası alınan IMD/AM₂ gevşeme yanıtı, 60 mM K^+ ile ön kasılma oluşturulması sonrası alınan IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ile karşılaştırıldığında (B), her grup için $n=6$).

Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında K_{ATP} ve Voltaj Bağımlı Potasyum Kanallarının (K_V) Rolü

İzole sıçan PA halkalarında fenilefrinle (10^{-6} M) ön kasılma oluşturularak IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) ile konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı alındı. K_{ATP} kanalı inhibitörü glibenklamid (10^{-5} M) ve K_V kanallarının spesifik inhibitörü 4-

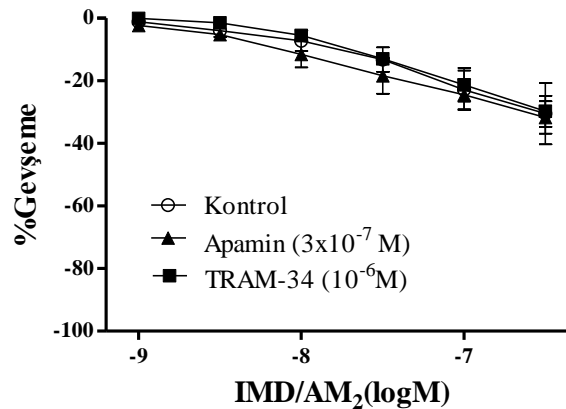
aminopiridin (4-AP) (3×10^{-3} M) IMD/AM₂'nin (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtlarını değiştirmede (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. İzole sıçan ana PA'sında, IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ile glibenklamid (10^{-5} M) ve 4-AP varlığında konsantrasyon bağımlı IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (n=6).

Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında Kalsiyum ile Aktive Olan Küçük (SK_{Ca}), Orta (IK_{Ca}) ve Büyük Kondüktanslı (BK_{Ca}) Potasyum Kanallarının Rolü

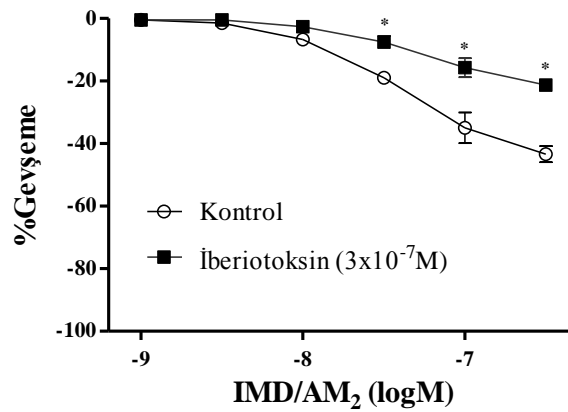
SK_{Ca} spesifik inhibitörü apamin (3×10^{-7} M) ve IK_{Ca}spesifik inhibitörü TRAM-34 (10^{-6} M) varlığında fenilefrinle (10^{-6} M) ön kasılma oluşturulmuş sıçan PA'sında elde edilen IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi (Şekil 4.7.).



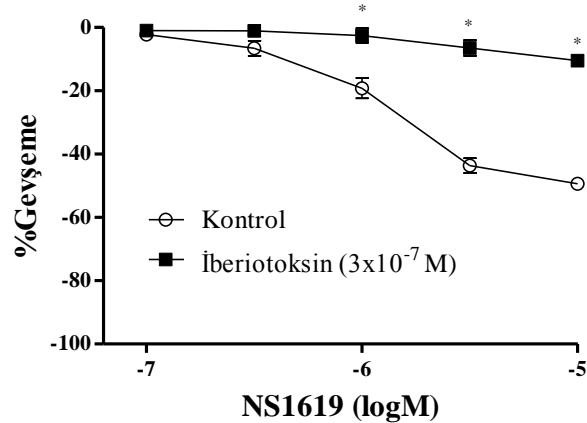
Şekil 4.7. İzole sıçan ana PA'sında IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ile apamin (3×10^{-7} M) ve TRAM-34 (10^{-6} M) varlığında, kümülatif IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (n=6).

BK_{Ca} spesifik inhibitörü iberiotoksin (3×10^{-7} M) varlığında sıçan PA halkalarında alınan IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtları konsantrasyon bağımlı olarak inhibe oldu (* $p < 0,05$; Şekil 4.8.A). İberiotoksin varlığında (3×10^{-7} M) BK_{Ca} kanalı spesifik agonisti NS1619 (10^{-7} - 10^{-5} M) gevşeme yanıtlarını inhibe etti (* $p < 0,05$; Şekil 4.8.B).

A



B

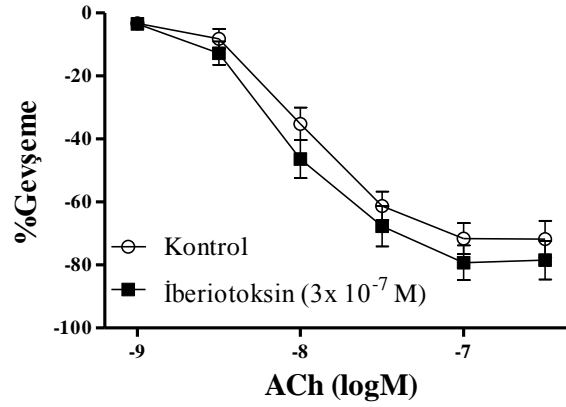


Şekil 4.8. İzole sıçan ana PA halkalarında, iberiotoksin (3×10^{-7} M) varlığında kümülatif IMD/AM₂ gevşeme yanıtı (**A**). İberiotoksin (3×10^{-7} M) varlığında spesifik BK_{Ca} agonisti NS1619 gevşeme yanıtı (**B**) (* $p < 0,05$; IMD/AM₂ ve iberiotoksin varlığında IMD/AM₂ yanıtı (**A**) ve NS1619 ve iberiotoksin varlığında NS1619 gevşeme yanıtı (**B**) karşılaştırıldığında. Her grup için n=6).

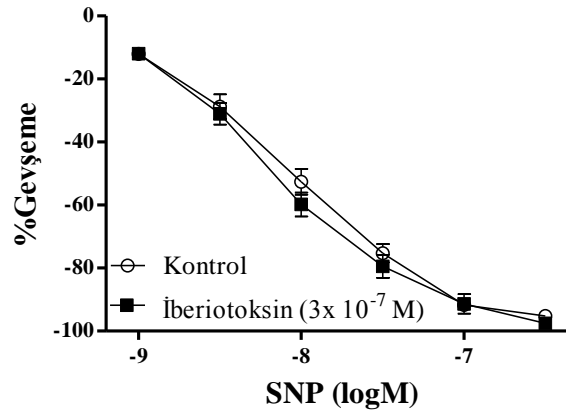
İberiotoksin (3×10^{-7} M) varlığında ACh (10^{-9} - 3×10^{-6} M) gevşeme yanıtları değişmedi (Şekil 4.9.A). Benzer olarak NO donörü sodyum nitroprussid (SNP) (10^{-9}

– 3×10^{-7} M) varlığında elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtlarında da bir değişiklik meydana gelmedi (Şekil 4.9.B).

A



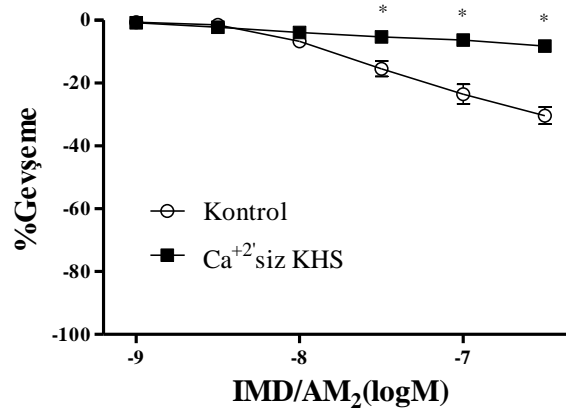
B



Şekil 4.9. İzole sıçan PA halkalarında, ACh (**A**) ve SNP (**B**) yanıtları ile iberiotoksin (3×10^{-7} M) varlığında konsantrasyon bağımlı ACh (**A**) ve SNP (**B**) gevşeme yanıtları (Her grup için n=6).

4.1.6. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂ Gevşeme Yanıtında Kalsiyumun Rolü

IMD/AM₂ yanıtında Ca⁺²'nin rolünü değerlendirebilmek için Ca⁺²'siz ortamda IMD/AM₂ gevşeme yanıtı elde edilmiştir. Bu amaçla Ca⁺² içermeyen KHS ile IMD/AM₂ yanıtı elde edilmiştir. Ca⁺² bulunmayan ortamda IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtları inhibe olmuştur (* p<0,05; Şekil 4.10).

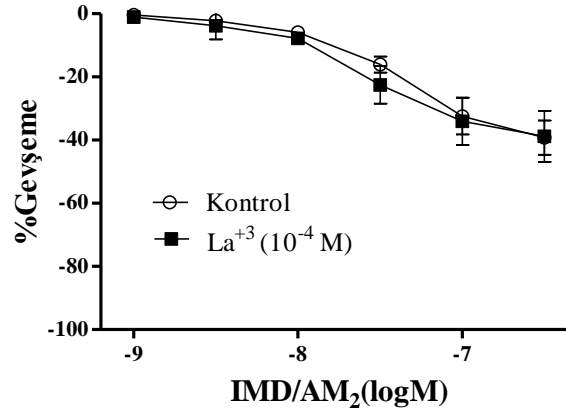


Şekil 4.10. İzole sıçan PA halkalarında, Ca²⁺siz KHS çözeltisinde IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (*p<0,05 IMD/AM₂ ve Ca²⁺siz KHS’de IMD/AM₂ yanıtı karşılaştırıldığında; n=6).

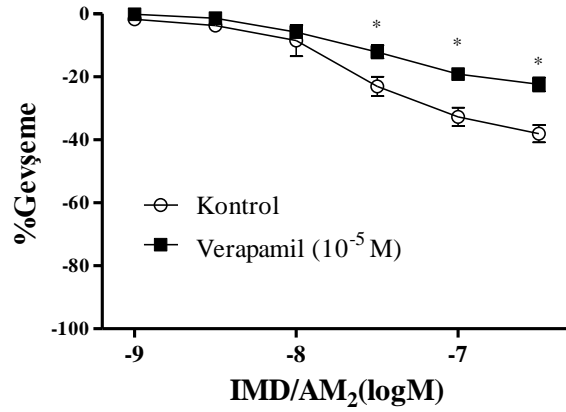
Hücre içine kalsiyum girişinde rol oynayan spesifik olmayan katyon kanallarının IMD/AM₂ yanıtındaki etkisini değerlendirmek için öncelikle izole sıçan PA halkalarında fenilefrinle (3×10^{-6} M) ön kasılma oluşturulmuş olan damarlarda spesifik olmayan katyon kanalları inhibitörü La³⁺ (10^{-4} M) varlığında IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) yanıtı alındı. IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi (Şekil 4.11.A).

Hücre içine kalsiyum girişini sağlayan bir başka kalsiyum kanalı olan voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının etkisini değerlendirmek amacıyla L-tipi kalsiyum kanallarının inhibitörü olan verapamil (10^{-5} M) varlığında IMD/AM₂ yanıtı değerlendirildi. Verapamil IMD/AM₂ gevşeme yanıtını anlamlı olarak inhibe etti (*p<0,05; Şekil 4.11.B).

A



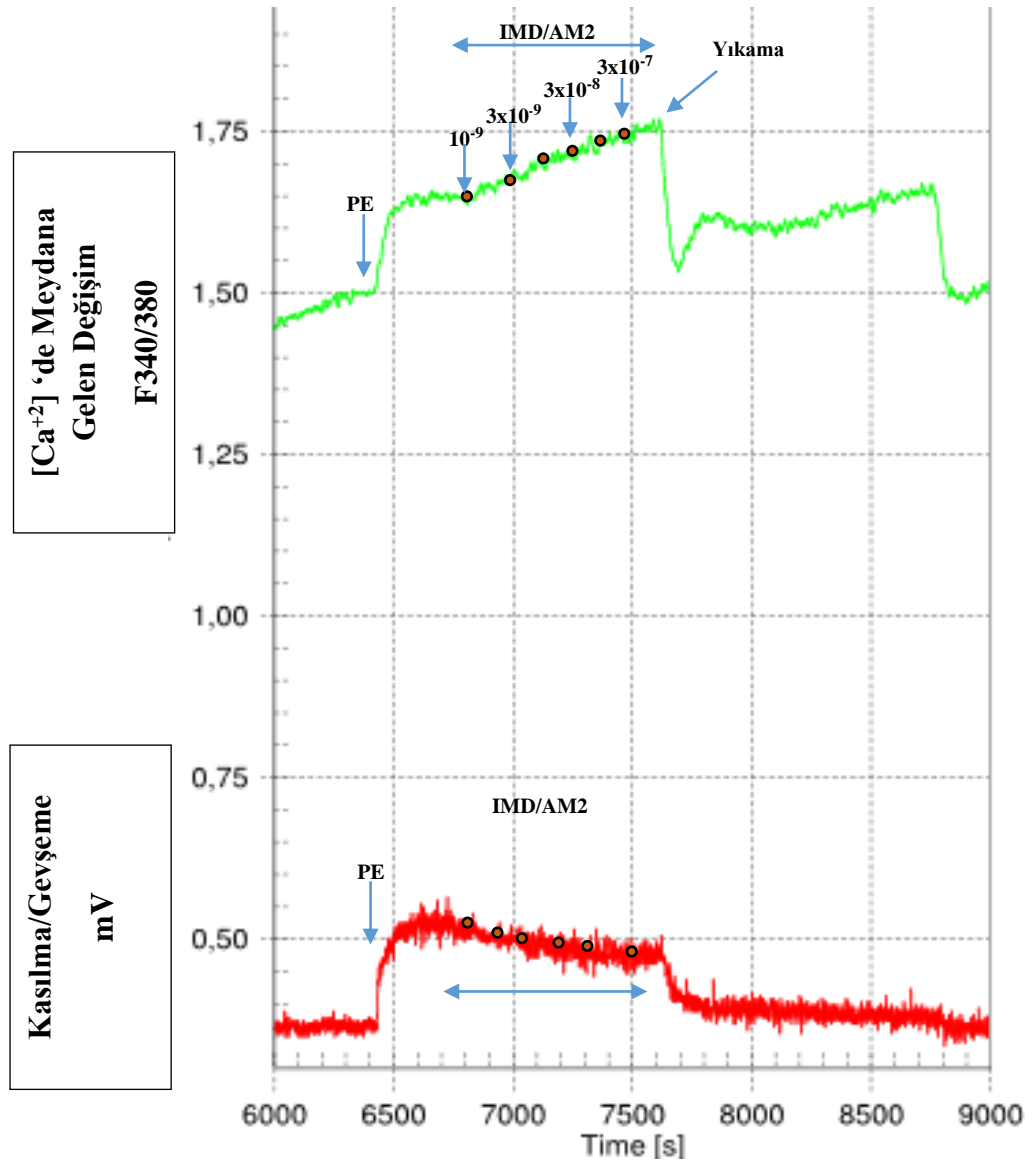
B



Şekil 4.11. İzole sıçan PA halkalarında La³⁺ (10⁻⁴ M) (A) ve 10⁻⁵ M verapamil varlığında (B) IMD/AM₂ gevşeme yanıtı (*p<0,05 IMD/AM₂ yanıtı verapamil varlığında IMD/AM₂ yanıtı ile karşılaştırıldığında; her grup için n=6).

4.1.7. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂'nin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyine Olan Etkileri

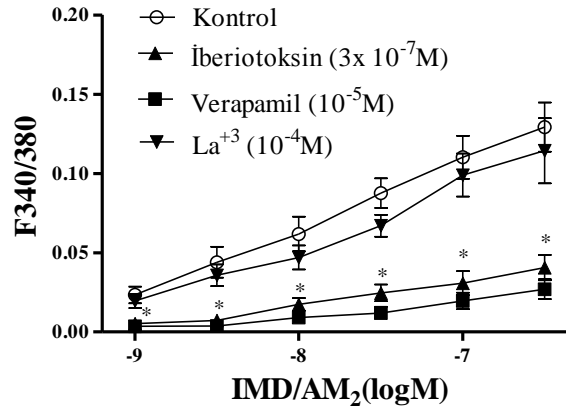
IMD/AM₂ gevşeme yanıtında hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonundaki değişimleri kontraktıl yanıt oluşumu ile eşzamanlı olarak izlenmesini mümkün kılan sisteme takılmış olan sıçan PA halkasında fenilefrin (10⁻⁶ M) ile ön kasılma oluşturuldu ve daha sonra kümülatif IMD/AM₂ (10⁻⁹ - 3x10⁻⁷ M) uygulandı. PA'da konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı elde edilirken, eş zamanlı olarak hücre içi kalsiyum düzeyinde konsantrasyon bağımlı artış görüldü (Şekil 4.12).



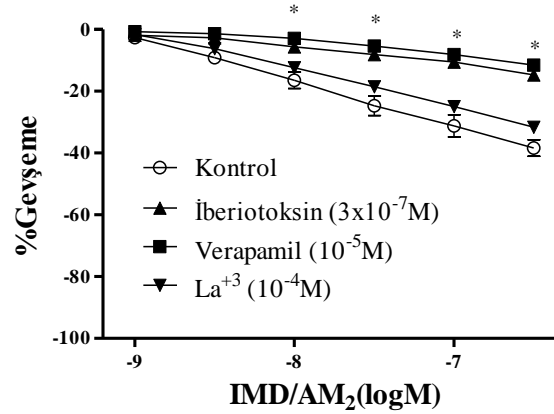
Şekil 4.12. İzole sıçan ana pulmoner arterinde, IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) uygulamasıyla birlikte hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki değişim ve IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtı. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyindeki değişim F340/F380 oranı ile belirlenmiştir.

BK_{Ca} kanal inhibitörü iberiotoksin (3×10^{-7} M) varlığında IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtında inhibisyon görülürken hücre içi kalsiyum düzeyi de anlamlı olarak azaldı. L-tipi kalsiyum kanalı inhibitörü verapamil (10^{-5} M) varlığında da gevşeme yanıtı inhibe olurken hücre içi kalsiyum düzeyi azaldı. Spesifik olmayan katyon kanalları inhibitörü La⁺³ varlığında ise IMD/AM₂ gevşeme yanıtı ve hücre içi kalsiyum düzeyinde meydana gelen artış değişmedi (* $p < 0,05$; Şekil 4.13.A ve B).

A

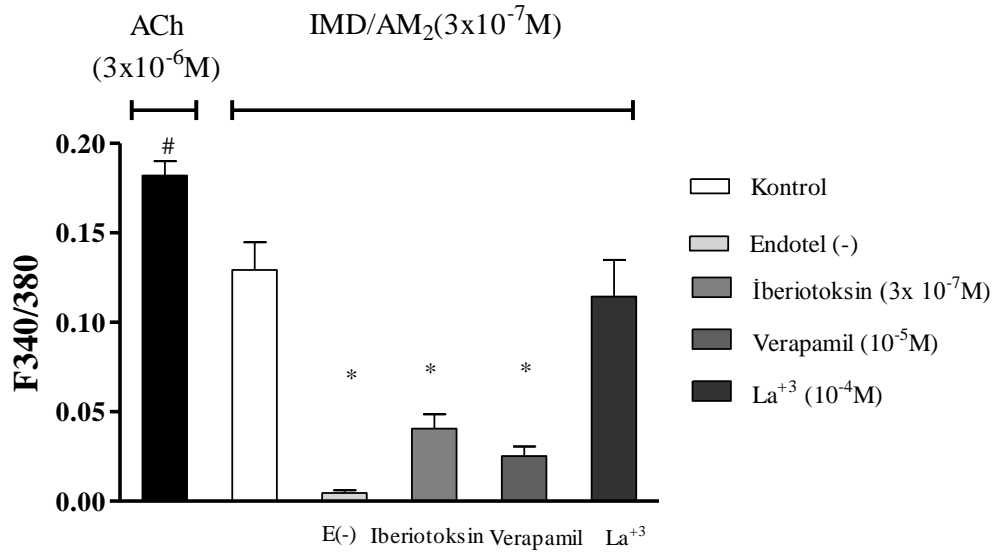


B



Şekil 4.13. İzole sıçan PA'sında, IMD/AM₂ ve hücre içi kalsiyum düzeyi (A). IMD/AM₂ ve iberiotoksin, verapamil ve La⁺³ varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtları (B) (*p<0,05 IMD/AM₂ ve iberiotoksin varlığında IMD/AM₂ yanıtı, IMD/AM₂ ve verapamil varlığında IMD/AM₂ yanıtı, n=6). [Ca⁺²] düzeyindeki değişim F340/F380 oranı ile belirlenmiştir.

Endotel tabakası tahrip edilen PA'da IMD/AM₂ yanıtı inhibe olurken, hücre içi kalsiyum düzeyi değişmemiştir. Endotel aracılı gevşeme yanıtı oluşturan bir diğer ajan olan ACh (3x10⁻⁶ M), hücre içi kalsiyum düzeyinde artış meydana getirmiştir ve bu artış IMD/AM₂'nin meydana getirdiği artışa göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha fazladır (* p<0,05, # p<0,05; Şekil 4.14.).



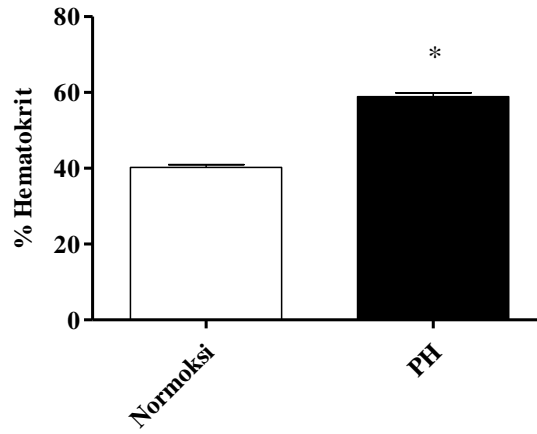
Şekil 4.14. İzole sıçan PA'sında, IMD/AM₂ ile ACh'nin ve iberiotoksin, verapamil ve La⁺³ varlığında IMD/AM₂'nin hücre içi kalsiyum düzeyine etkisi (*p<0,05; IMD/AM₂ ve iberiotoksin varlığında IMD/AM₂ yanıtı, IMD/AM₂ ve iberiotoksin varlığında IMD/AM₂, IMD/AM₂ ve endotel tabakası hasarlanmış PA'da IMD/AM₂ yanıtı karşılaştırıldığında. #p<0,05; IMD/AM₂ ve ACh yanıtları karşılaştırıldığında, her grup için n=6). [Ca⁺²] düzeyindeki değişim F340/F380 oranı ile belirlenmiştir.

4.2. Kronik Hipoksi ile İndüklenen PH'de IMD/AM₂'nin Pulmoner Vasküler Yatak Yanıtlarına Etkisi

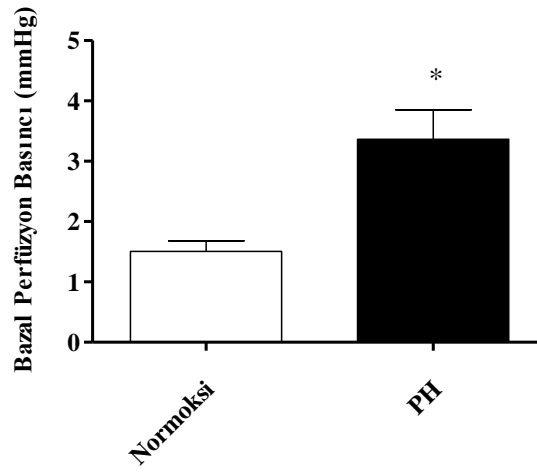
4.2.1. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Geliştirilmesi

3 hafta süresince hipobarik hipoksiye (atmosfer basıncı'nın 1/2'si) maruz bırakılan sıçanların hemotokrit değerleri ve bazal perfüzyon basınçlarında anlamlı olarak artış görüldü. Sağ ventriküllerinde hipertrofi gözlemlendi. Hipoksi maruziyeti sonrası sıçanların ana PA medial duvar kalınlıklarında artış meydana geldi (*p<0,05; Şekil 4.15.)

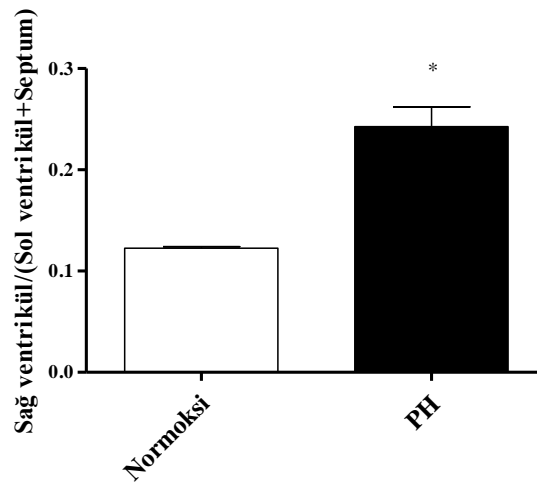
A



B

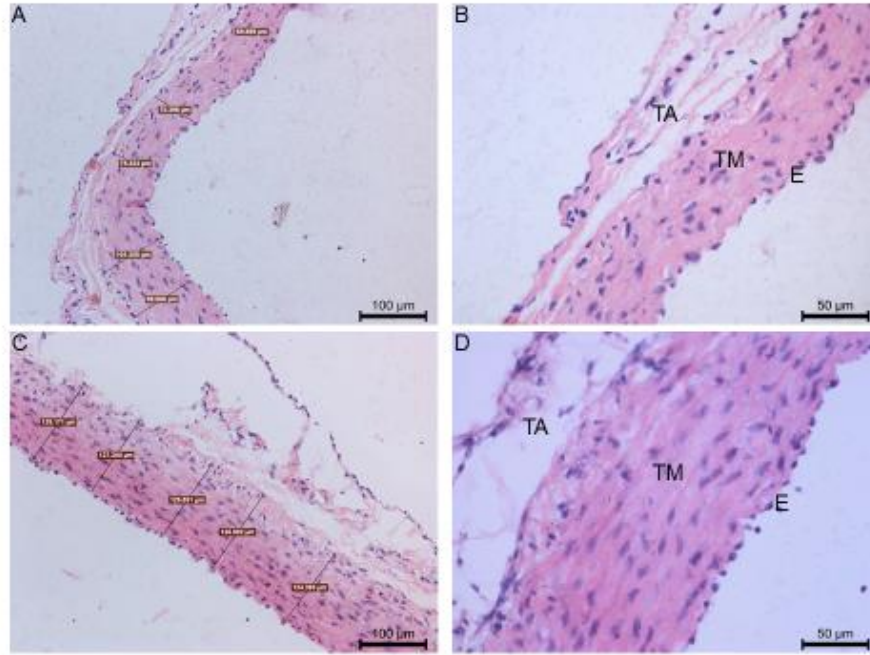


C

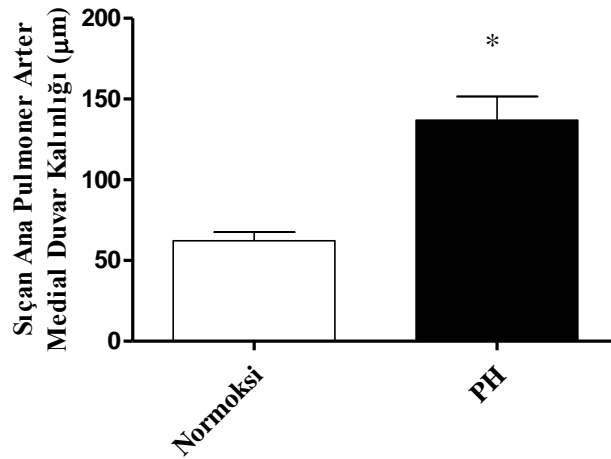


Şekil 4.15. 3 hafta süresince kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçanların kan hematokrit düzeyleri (A) ve bazal perfüzyon basınçlarında (B) meydana gelen değişim. Sıçanların sağ ventriküllerinde gözlenen hipertrofi (C) (* $p < 0,05$; normoksi ve PH grupları karşılaştırıldığında, her bir grup için $n=6$).

Yapılan histopatolojik değerlendirmede, PH grubunda normoksi grubuna göre anlamlı olarak ana PA'da medial kalınlıkta artış görülmüştür (Şekil 4.16. ve 4.17).



Şekil 4.16. Normoksik sıçanların (A ve B) ve pulmoner hipertansif sıçanların ana pulmoner arter duvarları (C ve D). A ve C görüntüleri 100 µm; B ve D görüntüleri 50 µm ölçütlerindedir.

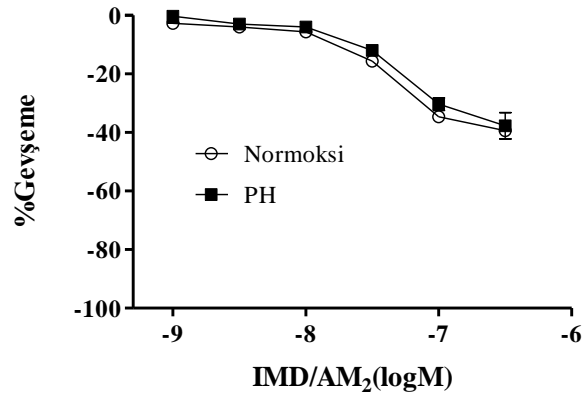


Şekil 4.17. PH grubundaki sıçanların ana pulmoner arter medial duvar kalınlığında meydana gelen artış (* $p < 0,05$ normoksi grubu PH grubu ile karşılaştırıldığında).

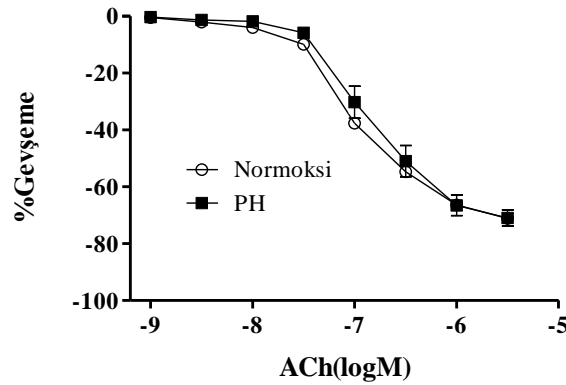
4.2.2. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Gelişen Sıçanların PA'sında IMD/AM₂'nin Etkisi

PH geliştirilen sıçanların PA'sında yapılan izole organ banyosu deneylerinde U46619 (3×10^{-7} M) ile ön kasılma oluşturularak elde edilen IMD/AM₂ (10^{-9} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıtları kontrol grubuna göre değişmedi. IMD/AM₂ hem PH gelişmiş hem de sağlıklı hayvanların izole PA'sında gevşeme sağladı (Şekil 4.18.A). U46619 (3×10^{-7} M) ile ön kasılma oluşturularak elde edilen konsantrasyon bağımlı ACh (10^{-9} - 3×10^{-6} M) yanıtı da PH gelişen sıçan PA'sında değişmedi (Şekil 4.18.B).

A



B

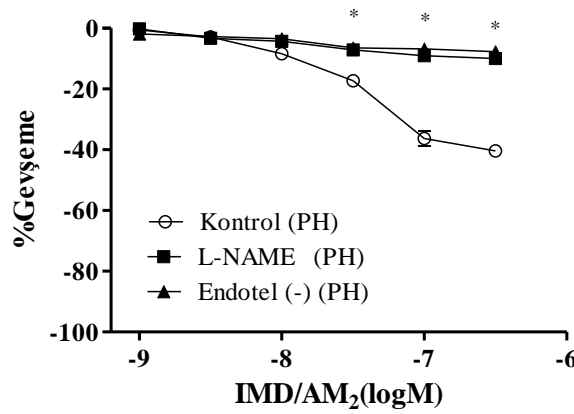


Şekil 4.18. İzole organ banyosunda, PH geliştirilen ve normoksik sıçanların PA'larında elde edilen IMD/AM₂ (A) ve ACh (B) gevşeme yanıtları (n=6).

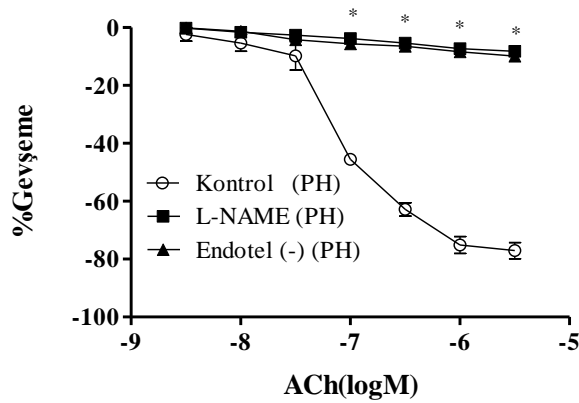
4.2.3. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Gelişen Sıçanların PA'sında IMD/AM₂ ve ACh Gevşeme Yanıtlarında NOS İnhibitörünün ve Endotel Tabakasının Rolü

PH geliştirilen sıçanların PA'sında L-NAME (10⁻⁴ M) ile 30 dk'lık inkübasyon IMD/AM₂ (10⁻⁹-3x10⁻⁷ M) ve ACh (10⁻⁹-3x10⁻⁶ M) kümülatif gevşeme yanıtları inhibe oldu. Endotel tabakasının mekanik olarak tahrip edilmesi ise IMD/AM₂ (10⁻⁹-3x10⁻⁷ M) ve ACh (10⁻⁹-3x10⁻⁶ M) gevşeme yanıtlarını inhibe etti (*p<0,05; Şekil 4.19. A ve B).

A



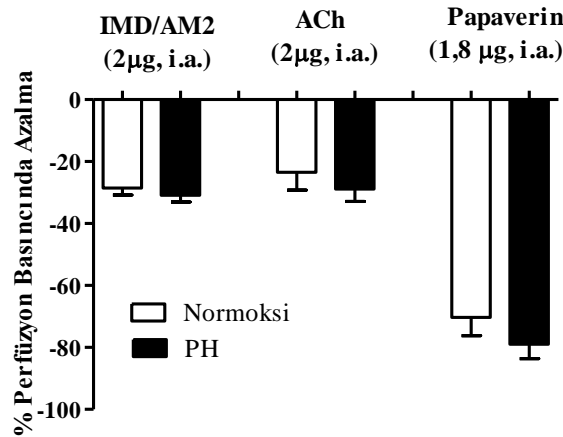
B



Şekil 4.19. İzole organ banyosunda, PH gelişen sıçanların PA'sında L-NAME varlığında ve endotel tabakasının tahrip edilmesinden sonra alınan IMD/AM₂ (A) ve ACh (B) gevşeme yanıtları (*p<0,05; IMD/AM₂ ve L-NAME varlığında IMD/AM₂ ve IMD/AM₂ ve endotel tabakası tahrip edilmiş sıçanlarda IMD/AM₂ yanıtları; her grup için n=6).

4.2.4. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Geliştirilen Sıçanların İzole Akciğerlerinde IMD/AM₂'nin ve ACh'nin Perfüzyon Basıncına Olan Etkisi

İzole sıçan akciğerlerinde bolus olarak i.a. verilen IMD/AM₂ (2 µg/100 µl) ve ACh (2 µg/100 µl) U46619 ile arttırılmış olan perfüzyon basıncını sırasıyla %28,56 ve %23,44 oranlarında azalttı. PH geliştirilen sıçanların izole akciğerlerinde bolus IMD/AM₂ (2 µg/100 µl, i.a.) ve ACh (2 µg/100 µl, i.a.) uygulaması sonrası perfüzyon basıncındaki azalma kontrole göre farklı bulunmadı. Deney sonunda uygulanan papaverin (1,8 µg/100 µl, i.a.) yanıtları her iki grupta da perfüzyon basıncını sırasıyla %70,27 ve %78,93 oranlarında azalttı (Şekil 4.20.).



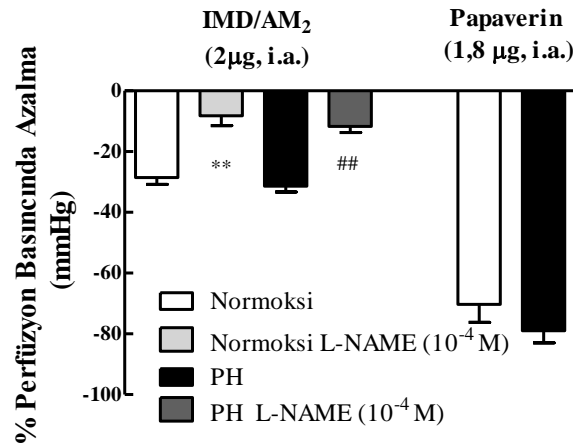
Şekil 4.20. İzole sıçan akciğer perfüzyonunda, IMD/AM₂ ve ACh'nin pulmoner hipertansif ve normoksik hayvanlarda akciğer perfüzyon basıncını azaltıcı etkisi (Her grup için n=6).

4.2.5. Kronik Hipoksi ile İndüklenen Sekonder PH Gelişen Sıçanların İzole Akciğerlerinde IMD/AM₂ ve ACh'nin Perfüzyon Basıncını Azaltıcı Etkisinde NOS İnhibitörü ve Endotel Tabakasının Rolü

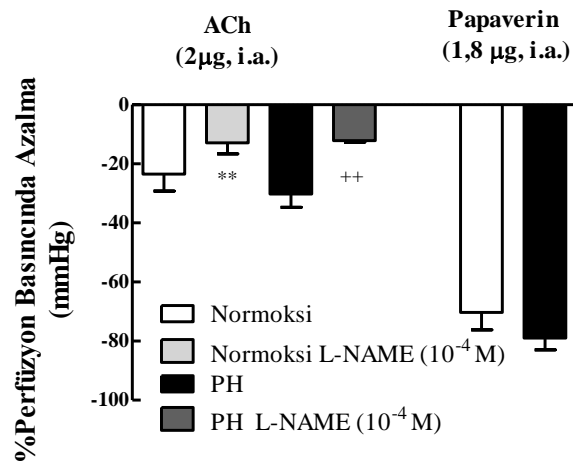
İzole sıçan akciğer perfüzyonunda, kontrol grubunda IMD/AM₂ (2 µg/100 µl, i.a) yanıtı L-NAME (10⁻⁴ M) varlığında inhibe oldu (*p<0,05; Şekil 4.21.A.). PH grubunda da L-NAME (10⁻⁴ M) varlığında alınan IMD/AM₂ (2 µg/100 µl, i.a.) yanıtında azalma meydana geldi. L-NAME ile PH grubunda meydana gelen inhibisyon ile kontrol grubunda meydana gelen inhibisyon arasında istatistiksel olarak

anlamli fark gorulmedi. Pulmoner vaskuler yatagin endotel yanitini degerlendirmek icin alinan ACh yanitlarinda, ACh hem kontrol hem de PH grubunda perfuzyon basincini azaltirken, bu azalma her iki grupta da L-NAME varliginda anlamlı olarak azaldi (#p<0,05; Şekil 4.21.B.). Deney sonunda uygulanan papaverin (1,8 µg/100 µl, i.a.) her iki grupta da perfuzyon basincini azaltti (Şekil 4.21.A ve B.).

A



B



Şekil 4.21. İzole sıçan akciğer perfüzyonunda, IMD/AM₂ (A) ve ACh'nin (B) pulmoner hipertansif ve normoksik hayvanlarda akciğer perfüzyon basıncını azaltıcı etkisinde endotel tabakasının rolü (*p<0,05, normoksik hayvanlarda IMD/AM₂ yanıtı L-NAME varlığında IMD/AM₂ yanıtı ile karşılaştırıldığında, # p<0,05 pulmoner hipertansif hayvanlarda kontrol IMD/AM₂ yanıtı ile L-NAME varlığında IMD/AM₂ yanıtı karşılaştırıldığında; her bir grup için n=6).

5. TARTIŞMA

5.1. Sıçan Ana PA'sında IMD/AM₂'nin Gevşetici Etki Mekanizması

CGRP ailesi, vücutta yaygın olarak üretilen ve fizyolojik etkileri ile vücut homeostazında önemli rol oynayan peptitlerdir. Kalsitonin, kemik metabolizması ve Ca⁺²regülasyonunda; AMY besin alımı ve enerji metabolizması üzerinde kilit etkiye sahip peptit hormonlardır(19, 43). CGRP ve ardından keşfedilen AM ise kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileriyle dikkat çekmektedir. CGRP keşfedildiği süreçte bilinen en güçlü vazodilatör olarak tanımlanmıştır(56, 57). Bunun üzerine çeşitli damar yataklarında ve hipertansiyon, ateroskleroz gibi vasküler patolojik durumlarda CGRP'nin etkileri ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda CGRP'nin gevşetici etkisinin farklı tür ve damar yataklarında farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Literatürde bu konu ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. CGRP, sıçan aortunda ve pulmoner arterinde endotel bağımlı ve NO aracılı yanıtlar meydana getirirken; sıçan mezenter arter perfüzyonunda, kedi serebral arterinde, insan intrakraniyal arterlerinde NO'dan bağımsız sAMP oluşumu ile gevşeme meydana getirdiği bildirilmiştir (75, 78, 81, 82, 151, 152). Sıçan mezenter arterinde, domuz koroner arterinde, fare aortunda yapılan çalışmalarda bu gevşeme yanıtlarında ayrıca K_{ATP} kanallarının etkisi olduğu gösterilmiştir(78, 80, 153). Ancak mekanizma ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılmamıştır. Etkinin PKA - sAMP yoluyla üzerinden olduğu ve NO sentezindeki artışla gevşeme sağlandığı genel görüş olarak kabul görmüştür(6, 13).

AM'nin keşfi ve izolasyonu sonrasında yapılan çalışmalarda AM'nin kardiyovasküler sistemde CGRP kadar potent olduğu gösterilmiş ve bunun üzerine çalışmalar AM üzerine yoğunlaşmıştır(22, 32, 154). AM etkilerini çoğunlukla endotel aracılı gerçekleştirmiş ve NO yoluyla ana etki mekanizmasını oluşturmuştur. AM'nin gevşetici etkisinde daha güçlü şekilde etkileştiği AM₁ ve AM₂ reseptörlerinin yanısıra etkide CGRP reseptörleri ile olan etkileşimi de önemli rol oynamaktadır (6, 32). AM'nin vazodilatör etkilerinin CGRP reseptör inhibitörü CGRP₈₋₃₇ varlığında inhibe olması özellikle vazodilatör mekanizmalarda CGRP reseptörlerinin önemine dikkat çekmektedir(33, 34, 155, 156). AM'nin damarlarda gevşeme oluştururken K⁺ kanallarını da etkilediği, yüksek K⁺ içeren KHS ile hiperpolarize edilen mezenter arterde yanıtın inhibe olmasıyla gösterilmiştir(157).

Literatürde AM'nin endotel aracılı ve NO bağımlı gevşeme meydana getirdiği ve başta K_{ATP} kanalları olmak üzere K^+ kanallarının da gevşeme yanıtlarında rol oynadığı görüşü kabul görmektedir(6, 32, 158).

Bu iki önemli peptitin gerek *in vitro* gerekse *in vivo* çalışmalarda damar yataklarında etkili bulunmalarına rağmen, gevşetici mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır.

CGRP ailesinin son izole edilen üyesi olan IMD/AM₂, AM'ye yapısal ve fonksiyonel olarak benzerliğiyle dikkat çekmiştir. Ancak yapılan çalışmalar sonrasında AM'nin etkili olduğu dokulardan farklı dokularda ve AM'den farklı güçteettiği gösterebildikleri belirlenmiştir (103, 112). Kardiyovasküler sistemde IMD/AM₂'nin AM'den daha etkili olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (107, 110, 159). IMD/AM₂'ningevşeme yanıtınınuzun süreli olduğu mezenterik ve renal arterlerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (121, 160). Günümüzde IMD/AM₂'nin makro ve mikrovasküler sistemlerde potent vazodilatör etkili önemli bir peptit olduğu kabul edilmiştir (103, 161).

Pulmoner vasküler sistemde yapılan çalışmalarda hem ana PA'da gevşeme hem de akciğerde rezistans arterlerinde vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir (120). Pulmoner sistemde oluşturduğu bu etki IMD/AM₂'yi pulmoner vasküler hastalıklarda bir tedavi hedefi haline getirmektedir. Ancak IMD/AM₂'nin öncelikle etki mekanizması ve yollarının değerlendirilmesi, pulmoner sistem patolojilerindeki olası etkilerini değerlendirebilmek adına önem taşımaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında IMD/AM₂ aracılı vazodilatasyonda NO'nun ve endotel tabakasının etkisi olduğu yapılan birçok çalışmada bildirilmektedir (120, 127, 162). Ancak CGRP ailesine bağlı diğer peptitlerde de olduğu gibi farklılık taşıyan sonuçlar da mevcuttur. Bazı çalışmalar IMD/AM₂'nin endotel bağımlı-NO aracılı yanıt meydana getirdiğini savunurken, endotel tabakasından bağımsız ve sAMP aracılı gevşeme yanıtı oluşturduğunu bildiren çalışmalar da literatürde mevcuttur (111, 128, 149, 163).

IMD/AM₂'nin reseptör aracılı yanıt oluşturan bir peptit olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda IMD/AM₂'nin biyolojik aktivitelerini CLR'ler aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir (103). Bu amaçla çalışmamızda öncelikle IMD/AM₂'nin gevşetici etki meydana getirirken etkileşebileceği reseptörler olan

CGRP ve AM reseptörleri ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Sıçan ana PA'sında daha önce yapılan çalışmalarda IMD/AM₂'nin gevşetici etkisini, AM reseptörü antagonisti AM₂₂₋₅₂ ve CGRP reseptör antagonisti CGRP₈₋₃₇ benzer düzeyde inhibe ederken, iki antagonistin birarada kullanılması ise inhibisyon derecesini arttırmamıştır (120). Sıçan ana PA'sında yaptığımız deneylerde, önceki çalışmadan farklı olarak AM reseptör antagonisti varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtı değişmemiştir. CGRP reseptör antagonisti varlığında ise gevşeme yanıtı inhibe olmuştur. IMD/AM₂ üzerinde kardiyovasküler sistemde yapılan diğer çalışmalara bakıldığında, koroner arterlerde, karotid arterde ve sistemik arteriyel basınçta çalışmamıza benzer şekilde sadece CGRP antagonisti varlığında inhibisyon meydana gelmiştir (161). CGRP ailesi peptitlerinin etkilerine bakıldığında da yapılan birçok çalışmada vazodilatör etkilerin daha çok CGRP reseptörleri üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir (57, 70, 164-167). Bu durum düşünüldüğünde IMD/AM₂ gevşeme yanıtının sadece CGRP reseptörlerinin inhibisyonu ile azalması beklenen bir durumdur.

IMD/AM₂'nin endotel aracılı ve NO bağımlı yanıt oluşturduğu NOS inhibitörü L-NAME varlığında ve endoteli tahrip edilmiş sıçan PA'sında yaptığımız çalışmalarla gösterilmiştir. L-NAME varlığında IMD/AM₂'nin vazodilatör etkisi tamamen ortadan kalkmıştır. Aynı şekilde endotel tabakası tahrip olmuş sıçan ana PA'sında da IMD/AM₂ ile gevşeme yanıtı alınamamıştır. NO, guanilat siklazı uyararak sGMP aracılığı ile gevşeme sağlamaktadır. Guanilat siklaz inhibitörü ODQ varlığında da IMD/AM₂ gevşeme yanıtının tamamen inhibe olması, NO aracılı yanıtı bir kez daha doğrulamaktadır.

Endotel tahrip edildiğinde yanıt tamamen inhibe olurken reseptör inhibitörü CGRP₈₋₃₇ varlığında ise yanıt tamamen yok olmamıştır. Bu durum IMD/AM₂'nin reseptör aracılı yanıt oluşturmak dışında direkt bir etkiyle endotel tabakasından NO salıverilmesini sağladığını düşündürmektedir.

Bu bağlamda, IMD/AM₂ uygulanmasıyla, endotel tabakasından NO salıverilme mekanizmasını araştırmak için çalışmamızda öncelikle ana mekanizma yolları değerlendirilmiştir. Literatürde IMD/AM₂ yanıtında sAMP üretiminin rol oynadığına dair çalışmalar vardır (128-130). Yaptığımız deneylerde adenilat siklaz inhibitörü SQ22536 varlığında IMD/AM₂yanıtı inhibe olmuştur. Bu durum IMD/AM₂'nin CGRP reseptörleri ile etkileştikten sonra sAMP üretimi

sağladığını düşündürmektedir. sAMP yolağının kenetli olduğu kinaz PKA'dır. PKA antagonisti H89 varlığında sıçan ana PA'sında yapılan deneylerde IMD/AM₂ yanıtı inhibe olmuştur. Böylelikle sAMP-PKA yolağının IMD/AM₂ gevşeme yanıtında rol oynayan mekanizmalardan biri olduğu gösterilmiştir. Ancak her iki antagonist varlığında yine gevşeme yanıtının tamamen inhibe olmaması IMD/AM₂'nin aynı zamanda farklı birçok ikincil mesajcıyı kullanarak gevşeme yanıtı meydana getirebileceğini düşündürmektedir.

CGRP ailesinin damarlarda meydana getirdiği gevşeme yanıtlarında en çok araştırılan ve rolü olduğu gösterilen faktörlerden bir diğeri K⁺ kanallarıdır (2, 6, 13). Damarlarda kasılma ve gevşemenin K⁺ ve Ca⁺² iyonları arasındaki denge ile sağlandığı dikkate alındığında bu beklenen bir durumdur. Bu iyonlar arasındaki dengenin nasıl sağlandığı, hangi kanalların gevşetici etkiye rol oynadığı ve nasıl aktive oldukları çalışmamızda değerlendirilmiştir. Bu amaçla K⁺ kanallarının rolünü değerlendirmek için öncelikle selektif olmayan K⁺ kanalları inhibitörü TEA varlığında IMD/AM₂ ile gevşeme yanıtı alınmıştır. TEA varlığında IMD/AM₂ gevşeme yanıtı tamamen inhibe olmuştur. 60 mM K⁺ ile hiperpolarize edilerek ön kasılma oluşturulan sıçan ana PA'sında da IMD/AM₂ ile gevşeme yanıtı tamamen ortadan kalkmıştır. Bu durum PA'da IMD/AM₂'nin K⁺ kanalları ile gevşeme yanıtı oluşturduğunu doğrulamaktadır. Daha önce IMD/AM₂'nin BK_{Ca} kanalı spesifik inhibitörü iberiotoksin varlığında sıçan ana PA'sında gevşeme yanıtını inhibe ettiği gösterilmiştir (3). TEA varlığında yanıtın tamamen inhibe olması bizi diğer K⁺ kanallarının olası etkisine değerlendirmeye yönlendirmiştir. Bu çalışmamızda K_{ATP} kanal inhibitörü glibenklamid, K_V kanal inhibitörü 4-AP, IK_{Ca} kanalı inhibitörü TRAM-34 ve SK_{Ca} kanalı inhibitörü apamin varlığında yanıtlarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu kanalların IMD/AM₂ gevşeme yanıtında tek başlarına etkin bir rolü bulunmamaktadır. BK_{Ca} kanal inhibitörü iberiotoksin varlığında ise literatürle uyumlu şekilde gevşeme anlamlı olarak azalmıştır. K⁺ kanalları ile yapılan çalışmalarda TEA varlığında gevşeme yanıtı tamamen inhibe olurken, BK_{Ca} kanalı hariç K⁺ kanallarının tek başlarına inhibisyonlarının anlamlı bir azalma meydana getiremedikleri görülmüştür. Bu durum K⁺ kanallarının tek başlarına gevşeme yanıtında önemli bir etki oluşturmamalarına karşın; IMD/AM₂ ile etkileşim gösterebilmektedir ve bu

etkileşimlerin ancak tüm kanalların spesifik olmayan bir şekilde inhibisyonu ile anlamlı bir sonuç oluşturabildiğini akla getirmektedir.

Çalışmamızda diğer K^+ kanallarının aksine BK_{Ca} kanallarının, IMD/ AM_2 'nin sıçan ana PA'sında meydana getirdiği gevşemede etkin rol oynadığı görülmüştür. Bu durum üzerine bir başka endotel aracılı ve NO bağımlı gevşeme yanıtı meydana getiren ajan olan ACh'nın, BK_{Ca} kanal inhibitörü iberiotoksin varlığında sıçan ana PA'sındaki etkisine bakıldığında gevşeme yanıtında bir değişiklik meydana gelmemiştir. BK_{Ca} kanalları genellikle düz kasta yerleşim gösterdikleri bilinen kanallardır (168). BK_{Ca} inhibitörü varlığında ACh yanıtında değişiklik olmaması BK_{Ca} kanallarının ACh'nın NO oluşturmasında bir rolü olmadığını ve salıverilen NO'nun düz kasta gevşeme sağlarken, düz kasta bulunan BK_{Ca} kanalları ile etkileşmediğini düşündürmektedir. Düz kastaki BK_{Ca} kanalları ile NO'nun etkileşimi; NO donörü SNP uygulanarak da değerlendirilmiştir. Dışarıdan verilen NO'nun oluşturduğu gevşeme yanıtı da BK_{Ca} kanalı inhibitörü varlığında değişmemiştir. Yaptığımız bu deneyler sıçan ana PA'sında düz kasta bulunan BK_{Ca} kanallarının NO aracılı gevşemede rolü olmadığını düşündürmüştür. ACh ile IMD/ AM_2 'nin gevşeme yanıtı mekanizmaları arasındaki farklılık NO'nun sentezlenmesi aşamasındadır. ACh, muskarinik reseptörlere bağlanarak PLC: IP_3 yolağı üzerinden NO oluşumuna neden olurken; tarafımızca yapılan çalışmalarda, literatürde rastlanan bazı çalışmalarda olduğu gibi IMD/ AM_2 'nin CGRP reseptörü aktivasyonu sonrasında sAMP-PKA yolağı üzerinden NO oluşumunu sağladığı düşünülmektedir. Bu durumda BK_{Ca} kanallarının IMD/ AM_2 'nin endotel tabakasından NO salıverme mekanizmasını etkileyerek gevşeme yanıtını inhibe ettiği akla gelmektedir. Bu noktada daha çok düz kasta yerleşim gösterdiği bilinen BK_{Ca} kanallarının endotel tabakasından da eksprese olabilecekleri düşünülmüştür. Literatürde 2010 yılında Vang. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda pulmoner vasküler sistemde endotel tabakasından BK_{Ca} kanallarının varlığı hem moleküler hem de fonksiyonel olarak gösterilmiştir (169). Yapılan bu çalışmalar bizim fonksiyonel çalışmamızla da uyumludur.

Yapılan tüm bu çalışmalar, IMD/ AM_2 'ninreseptörle etkileştikten sonra sAMP/PKA yolağını aktifleştirdiğini, endotel tabakasından yer alan BK_{Ca} kanallarını

aktive ederek NO oluşumu ile damar düz kasında gevşeme sağladığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular sonrasında sıçan PA'sında endotel tabakasında bulunan BK_{Ca} kanalları; IMD/ AM_2 'nin NO oluşumunda bir ara basamak olarak değerlendirilmiştir. BK_{Ca} kanalları aktive olduklarında hücre dışına K^+ çıkışı meydana gelir ve hücre hiperpolarize olur. Hiperpolarizasyonun çeşitli Ca^{+2} kanallarını ve/veya spesifik olmayan katyon kanallarını uyararak hücre içine Ca^{+2} girişini sağladığı daha önce gösterilmiştir (170). Hücre içinde artan Ca^{+2} düzeyi ise endotelial NOS'u (eNOS) indükleyerek NO üretimi sağlamaktadır. Bu bilgiler ışığında hücre dışı Ca^{+2} 'nin IMD/ AM_2 gevşeme yanıtındaki rolünü değerlendirmek amacıyla Ca^{+2} 'siz KHS varlığında IMD/ AM_2 uygulandığında, IMD/ AM_2 gevşeme yanıtı tamamen inhibe olmuştur. Bu deney ile hücre dışı Ca^{+2} 'nin IMD/ AM_2 yanıtındaki önemli etkisi gösterilmiştir. BK_{Ca} 'nın meydana getirdiği hiperpolarizasyon sonrası hücre içine Ca^{+2} kaçışlarına neden olduğu bilinen en önemli kanallar spesifik olmayan katyon kanallarıdır (170). Bu amaçla spesifik olmayan katyon kanalları inhibitörü La^{+3} varlığında sıçan ana PA'sında yaptığımız deneylerde, IMD/ AM_2 gevşeme yanıtında herhangi bir inhibisyon meydana gelmemiştir. Bunun üzerine düşük konsantrasyonda Ca^{+2} 'nin hücre içine girişine neden olabileceği düşünülen bir diğer Ca^{+2} kanalı olan voltaj duyarlı L-tipi Ca^{+2} kanallarının olası etkisi bu kanalın selektif inhibitörü verapamil varlığında denenmiştir. Yapılan deneylerde verapamil, sıçan ana PA'sında IMD/ AM_2 gevşeme yanıtını kısmen inhibe etmiştir. BK_{Ca} kanalları Ca^{+2} ile aktive olan kanallardır. Voltaj duyarlı L-tipi Ca^{+2} kanallarının inhibisyonu ile birlikte hücre içine giren Ca^{+2} 'nin azalması sonucu BK_{Ca} kanallarının aktive olamaması gevşeme yanıtında azalma görülmesinin nedenlerinden biri olarak görülebilir. Ancak L-tipi Ca^{+2} kanalları aynı zamanda BK_{Ca} 'nın meydana getirdiği hiperpolarizasyon sonrasında hücre içine Ca^{+2} kaçışlarına aracılık ediyor olabilir. İzole organ banyosu deneyleri IMD/ AM_2 yanıtında Ca^{+2} 'nin kritik önemini göstermiştir. Gevşeme mekanizmasında Ca^{+2} 'nin rolünü daha iyi anlamak amacıyla izole sıçan PA'sında Fura-2AM kullanılarak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişikliklerin izlenmiştir.

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişikliklerin izlendiği deneylerde sıçan ana PA'sına IMD/ AM_2 uygulanması ile gevşeme meydana gelirken hücre içi Ca^{+2}

düzeyinin arttığı eş zamanlı olarak gösterilmiştir. Endoteli haraplanan dokularda ise IMD/AM₂ yanıtı alınmamış ve beklenildiği şekilde Ca⁺² konsantrasyonu da değişmemiştir. Bunun sonucunda IMD/AM₂'nin gevşeme yanıtının tamamen Ca⁺² bağımlı bir yanıt olduğu görüşüne varılmıştır.

BK_{Ca} kanal inhibitörü iberiotoksin varlığında gevşeme yanıtı inhibe olurken hücre içi Ca⁺² artışı da inhibe olmuştur. BK_{Ca} kanallarının inhibisyonu sonrasında IMD/AM₂ uygulaması ile Ca⁺² seviyesinde artış meydana gelmemektedir. Bu durum BK_{Ca} kanallarının hücre dışından giren Ca⁺² ile aktive olmadığını düşündürmektedir. BK_{Ca} kanalları esas olarak Ca⁺² ile aktive olan kanallar olsa da literatürde PKA, protein kinaz G gibi enzimlerle ve bazı endojen/ekzojen ajanların direkt olarak uyarımı ile aktive olabilecekleri gösterilmiştir (171, 172). IMD/AM₂ uygulaması sonrası artan PKA, BK_{Ca} kanallarını fosforile ederek aktive etmesi beklenebilecek bir durumdur. Bir diğer olası durumda IMD/AM₂ uygulaması ile endoplazmik retikulumdan salıverilebilecek olan hücre içi Ca⁺²'nin BK_{Ca} aktivasyonu sağlayabilecek olmasıdır.

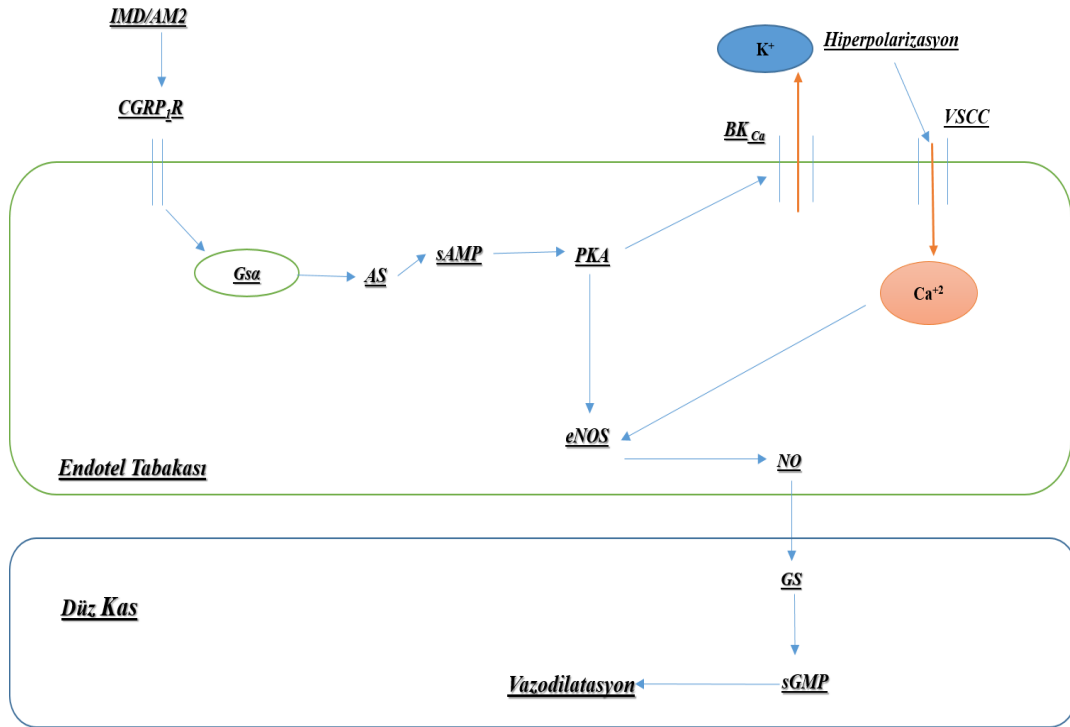
Verapamil varlığında da IMD/AM₂ uygulaması sonrası hücre içi Ca⁺²düzeyindeki artış anlamlı olarak azalmıştır. Bu sonuç IMD/AM₂'nin gevşeme yanıtında L-tipi Ca⁺² kanallarının rolünü doğrulamaktadır. İzole organ banyosunda IMD/AM₂ yanıtına etki etmeyen La⁺³, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonundaki artışa da bir etkide bulunmamıştır.

İberiotoksin varlığında hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunda meydana gelen inhibisyon BK_{Ca} kanallarının uyarıldıktan sonra meydana getirdiği hiperpolarizasyonun hücre içine Ca⁺² girişi sağladığı hipotezini doğrular niteliktedir. Ancak yapılan deneyler ışığında bu Ca⁺² girişinin beklendiği gibi spesifik olmayan katyon kanalları aracılığıyla değil voltaj duyarlı L- tipi Ca⁺² kanalları aracılığı ile olduğu düşünülmektedir.

IMD/AM₂'nin sıçan PA'sında meydana getirdiği vazodilatasyonun mekanizmasını aydınlatmak amacıyla yaptığımız çalışmalar sonrasında, IMD/AM₂'nin etkisini CGRP reseptörü aktivasyonu ile meydana getirdiği düşündürmüştür. Ancak reseptörle etkileşim olmaksızın çeşitli mekanizmaları direkt olarak uyararak NO oluşumu sağlayabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. CGRP reseptörünün G-protein bağımlı olduğu bilinmektedir. IMD/AM₂ gevşeme

yanıtının adenilat siklaz inhibitörü varlığında azalması CGRP reseptörünün Gs'yi stimüle ederek sAMP yolağını aktifleştirdiğini akla getirmiş ve bu durum PKA inhibisyonuyla birlikte yanıtın azalmasıyla da doğrulanmıştır. PKA direkt olarak eNOS'u fosforile ederek aktive edebileceği gibi, gevşeme yanıtında rolü olduğu gösterilen endotel tabakasındaki BK_{Ca} kanallarını fosforile ederek aktive ettiği düşünülmektedir. BK_{Ca} kanallarının açılmasıyla dışarıya çıkan K⁺'un hücreyi hiperpolarize etmesi sonucu hücre içine düşük konsantrasyonda Ca⁺² kaçışları meydana gelebileceği gösterilmiştir (170). Hücre içinde artış gösteren Ca⁺²'nin eNOS'u uyararak NO oluşmasını sağladığı ve böylece sGMP aracılığıyla damar düz kasında gevşeme meydana geldiği düşünülmektedir.

IMD/AM₂, CGRP ailesinin diğer peptitleri gibi hücre içinde çok çeşitli yolları, iyon kanallarını ve enzimleri etkilemektedir. Bu etkileşim arasındaki dengenin türlere, farklı damar yataklarına ve vücut dengesine göre değişmesi beklenebilecek olası bir durumdur. Çalışmamızla birlikte yaptığımız deneyler sonrasında sıçan ana PA'sında IMD/AM₂'nin gevşeme mekanizması rol oynayan ana yollar gösterilmiştir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Sıçan ana PA'sında IMD/AM₂'nin gevşeme yanıtında rol oynayan muhtemel yollar.

5.2. PH Oluşturulmuş Sıçanların Pulmoner Vasküler Yatağında IMD/AM₂'nin Etkisi

CGRP ailesi peptitlerinden CGRP ve AM uygulamasının daha önce PH geliştirilmiş sıçanlarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneylerde etki sağladıkları gösterilmiştir (66, 67). IMD/AM₂'nin de PH'deki etkisini araştıran çalışmalar mevcut olmakla birlikte oldukça sınırlıdır. IMD/AM₂'nin hipoksi ile sentezinin indüklendiği, IMD/AM₂ uygulamasının pulmoner arterde vasküler remodelingi azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (127, 148, 149).

Bu çalışmamızın bir diğer amacı *in vitro* olarak PH oluşturulmuş sıçanlarda IMD/AM₂'nin pulmoner damar yatağına etkisini değerlendirmektir. Bu amaçla sıçanlar 3 haftalık kronik hipobarik hipoksiye maruz bırakılmışlardır. Kronik hipoksi ile indüklenen PH modeli, hem kolay uygulanabilirliği hem de insanlarda gözlenen PH'ye klinik tablo olarak benzerliğinden dolayı PH araştırmalarında tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. Tekrar edilebilirliğinin yüksek olması ve literatürde kabul gören oldukça eski bir model olması nedeniyle diğer PH modellerine avantaj sağlamaktadır (173). Çalışmamızda hem biyokimyasal hem de histopatolojik çalışmalar sonucunda PH gelişimi doğrulanmış, ayrıca bazal perfüzyon basıncındaki anlamlı artışla, pulmoner vasküler direncin artışı da gösterilmiştir.

PH oluşturulan sıçanlarda, ana PA'da IMD/AM₂ yanıtları sağlıklı hayvanlarla karşılaştırıldığında farklılık göstermemiştir. IMD/AM₂ PH sonrasında da ana PA'da benzer bir gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Endotel aracılı yanıt meydana getiren bir diğer ajan olan ACh'nin gevşeme yanıtı da PH geliştirilmiş sıçanlarla normoksik sıçanlarda farklı değildir. Bu durum dikkate alındığında PH'nin sıçan ana PA'sının endotel tabakasında bir hasar meydana getirmediğini düşündürmüştür.

Akciğer damar yatağında mikrovasküler sistemdeki farklılığı değerlendirmek için sıçan akciğerlerinde perfüzyon yapılarak PH sonrasında mikrovasküler sistemin IMD/AM₂'ye verdiği yanıt değerlendirilmiştir. Pulmoner mikrovasküler sistemde de PH sonrasında IMD/AM₂ gevşeme yanıtında bir değişiklik gözlenmemiştir. IMD/AM₂ uygulaması pulmoner perfüzyon basıncında azalma sağlamıştır. Aynı şekilde ACh'nin de kontrol ve pulmoner hipertansif hayvanlarda perfüzyon basıncında benzer azalma sağlaması; PH sonrasında akciğer damar yatağında endotel tabakasının mikrovasküler sistemde de korunduğunu düşündürmektedir.

Kronik hipoksi ile indüklenmiş PH sonrasında sıçanların vasküler yataklarında endotel tabakalarının sağlamlığını koruduğu çalışmalar kadar, endotel tabakasının hasar görerek ACh yanıtlarının azaldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (174-177). Çalışmamızda PH endotel tabakasında hasar meydana getirmemiş ancak vasküler *remodelinge* neden olarak vasküler direnci arttırmıştır. Bu durum hastalık patolojisinde de gözlenebilen bir durumdur.

PH gelişiminin damarlarda bir takım yapısal değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Bazı iyon kanallarının, reseptörlerin, endojen üretilen proteinlerin ekspresyon düzeylerinin değişim gösterebildiği ve bu nedenle ilaçların, hormonların etki mekanizmalarının değişebildiği bilinmektedir (178). Endotel bağımlı ve NO aracılı yanıt oluşturan IMD/AM₂'nin gevşeme mekanizmasında herhangi bir değişiklik olup olmadığını değerlendirmek adına hem ana PA'da hem de izole akciğer perfüzyonunda, L-NAME varlığında yanıtlar alınmıştır. Yapılan deneyler sonrasında ana PA'da ve akciğer mikrovasküler damar yatağında IMD/AM₂ gevşeme yanıtının PH gelişimi sonrasında da tamamen NO aracılı olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamız sonucunda hedeflendiği gibi sıçan ana pulmoner arterinde IMD/AM₂'nin gevşeme yanıtında rol oynaması muhtemel ana yollar ayrıntılı bir şekilde araştırılmış ve IMD/AM₂'nin sAMP ve PKA yolağını aktive ederek endotel bağımlı yanıt oluşturduğu gösterilmiştir.

PH geliştirilen sıçanlarda IMD/AM₂'nin etkili bir vazodilatasyon sağlaması, gelecek tedavi hedefi olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ ve YORUM

Bu tez çalışması kapsamında CGRP ailesinin son izole edilen üyesi olan IMD/AM₂'nin pulmoner vasküler sistemde meydana getirdiği vazodilatör etkinin mekanizması ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonrasında sıçan ana PA'sında, IMD/AM₂'nin gevşeme mekanizmasında rol oynayan reseptörler, iyon kanalları ve enzimler gösterilmiştir.

Sıçan ana PA'sında IMD/AM₂'nin meydana getirdiği gevşemenin CGRP reseptörleri üzerinden, endotel bağımlı ve NO aracılı olarak gerçekleştirdiği çalışmamızda gösterilmiştir. Gevşemenin ayrıca sAMP/PKA yolağı üzerinden gerçekleştiği yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda BK_{Ca} kanallarının aktivasyonu ile meydana gelen hiperpolarizasyonun L-tipi kalsiyum kanalları aracılığı ile içeri Ca⁺² kaçıışlarına neden olarak eNOS'u uyardığı ve eNOS aktivasyonu ile oluşan NO'nun pulmoner vasküler düz kasta sGMP aracılığıyla gevşeme meydana getirdiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca IMD/AM₂'nin PH'de pulmoner vasküler sistemdeki etkisi de değerlendirilmiştir. Hem ana PA'da hem de izole akciğer perfüzyonu ile rezistans arterlerinde yaptığımız deneyler sonucunda IMD/AM₂'nin PH'de vazodilatör etkisini koruduğu ve bu etkinin PH sonrası da endotel bağımlı-NO aracılı olduğu gösterilmiştir.

PH günümüzde kesin tedavisi olmayan, hızlı ilerleyen ve sıklıkla ölümlerle sonuçlanan tehlikeli bir hastalıktır. Halen yoğun bir şekilde yeni tedavi hedefleri araştırılmakta ve yeni moleküller denenmektedir. PH gelişimi sonrasında IMD/AM₂'nin pulmoner vasküler sistemde halen etkili bir vazodilatasyon sağlaması oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirmiş olduğumuz *in vitro* çalışmalarla vazodilatör etkisi; mekanizması gösterilen IMD/AM₂'nin, yeni bir tedavi hedefi olarak değerlendirilebilmesi için *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Born W, Fischer JA. The Calcitonin Peptide Family: What Can We Learn from Receptor Knock Out and Transgenic Mice. In: Hay DL, Dickerson IM, editors. The Calcitonin Gene-related Peptide Family Form, Function and Future Perspectives. Springer Dordrecht Heidelberg London New York: Springer; 2010. p. 75-86.
2. Ghatta S, Ramarao P. Increased contractile responses to 5-Hydroxytryptamine and Angiotensin II in high fat diet fed rat thoracic aorta. *Lipids Health Dis.* 2004;3:19.
3. Kandilci HB, Gumusel B, Lipton H. Intermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) relaxes rat main pulmonary arterial rings via cGMP-dependent pathway: role of nitric oxide and large conductance calcium-activated potassium channels (BK(Ca)). *Peptides.* 2008;29(8):1321-8.
4. Wimalawansa SJ. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol.* 1997;11(2-3):167-239.
5. Muff R, Born W, Fischer JA. Adrenomedullin and related peptides: receptors and accessory proteins. *Peptides.* 2001;22(11):1765-72.
6. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004;84(3):903-34.
7. Ren YS, Yang JH, Zhang J, Pan CS, Yang J, Zhao J, et al. Intermedin 1-53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats. *Peptides.* 2006;27(1):74-9.
8. Copp DH, Cameron EC. Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science.* 1961;134(3495):2038.
9. Copp DH. Calcitonin: discovery, development, and clinical application. *Clin Invest Med.* 1994;17(3):268-77.
10. Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science.* 1985;229(4718):1094-7.
11. Franco-Cereceda A, Gennari C, Nami R, Agnusdei D, Pernow J, Lundberg JM, et al. Cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptides I and II in man. *Circ Res.* 1987;60(3):393-7.
12. Booth BP, Fung HL. Regulation of in vivo whole blood aggregation in rats by calcitonin gene related peptide. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76(7-8):811-3.
13. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099-142.
14. Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. Evidence for neural regulation of inflammatory synovial cell functions by secreting calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(11):2418-29.

15. Edvinsson L, Juul R, Jansen I. Perivascular neuropeptides (NPY, VIP, CGRP and SP) in human brain vessels after subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurol Scand.* 1994;90(5):324-30.
16. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;140(3):827-31.
17. Roth JD, Hughes H, Coffey T, Maier H, Trevaskis JL, Anderson CM. Effects of prior or concurrent food restriction on amylin-induced changes in body weight and body composition in high-fat-fed female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):E1112-7.
18. Lutz TA. Effects of amylin on eating and adiposity. *Handb Exp Pharmacol.* 2012(209):231-50.
19. Hay DL, Chen S, Lutz TA, Parkes DG, Roth JD. Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. *Pharmacol Rev.* 2015;67(3):564-600.
20. Baisley SK, Bremer QZ, Bakshi VP, Baldo BA. Antipsychotic-like actions of the satiety peptide, amylin, in ventral striatal regions marked by overlapping calcitonin receptor and RAMP-1 gene expression. *J Neurosci.* 2014;34(12):4318-25.
21. Yang Y, Song W. Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience.* 2013;250:140-50.
22. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;194(2):720-5.
23. Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, et al. Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203(1):719-26.
24. Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Miyamoto K, Kitamura K, Sakata J, et al. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201(3):1160-6.
25. Yamaguchi T, Baba K, Doi Y, Yano K, Kitamura K, Eto T. Inhibition of aldosterone production by adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the rat. *Hypertension.* 1996;28(2):308-14.
26. Samson WK, Murphy T, Schell DA. A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology.* 1995;136(5):2349-52.
27. Martinez A, Weaver C, Lopez J, Bhatena SJ, Elsasser TH, Miller MJ, et al. Regulation of insulin secretion and blood glucose metabolism by adrenomedullin. *Endocrinology.* 1996;137(6):2626-32.
28. Kohno M, Yokokawa K, Kano H, Yasunari K, Minami M, Hanehira T, et al. Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension.* 1997;29(6):1309-13.

29. Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Kuwasako K, Imamura T, Koiwaya Y, et al. Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):505-10.
30. Martinez V, Cuttitta F, Tache Y. Central action of adrenomedullin to inhibit gastric emptying in rats. *Endocrinology*. 1997;138(9):3749-55.
31. Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y, Suzuki E, Ikenouchi H, Kohmoto O, et al. Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Hypertension*. 1995;25(4 Pt 2):790-5.
32. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000;21(2):138-67.
33. Entzeroth M, Doods HN, Wieland HA, Wiene W. Adrenomedullin mediates vasodilation via CGRP1 receptors. *Life Sci*. 1995;56(1):PL19-25.
34. Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Ozaki H, Karaki H. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Br J Pharmacol*. 1998;123(8):1645-54.
35. Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, et al. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*. 1991;254(5034):1022-4.
36. Kuestner RE, Elrod RD, Grant FJ, Hagen FS, Kuijper JL, Matthewes SL, et al. Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor. *Mol Pharmacol*. 1994;46(2):246-55.
37. Fluhmann B, Muff R, Hunziker W, Fischer JA, Born W. A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206(1):341-7.
38. Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, et al. A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin Sci (Lond)*. 1993;85(4):385-8.
39. Pan CS, Yang JH, Cai DY, Zhao J, Gerns H, Yang J, et al. Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin 2. *Peptides*. 2005;26(9):1640-6.
40. Park K-Y, Russo AF. Genetic Regulation of CGRP and Its Actions. In: Hay DL, Dickerson IM, editors. *The Calcitonin Gene-related Peptide Family Form, Function and Future Perspectives*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York: Springer; 2010. p. 97-114.
41. Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(11):432-8.
42. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998;393(6683):333-9.
43. Muff R, Buhlmann N, Fischer JA, Born W. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology*. 1999;140(6):2924-7.

44. Just R. S, J., Furness, S.G.B, Christopoulos,A., Sexton,P.M. Understanding Amylin Receptors. In: Hay DL, Dickerson IM, editors. *The Calcitonin Gene-related Peptide Family Form, Function and Future Perspectives*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York: Springer; 2010. p. 41-57.
45. Nagae T, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Yahata K, Kasahara M, et al. Rat receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) for adrenomedullin/CGRP receptor: cloning and upregulation in obstructive nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(1):89-93.
46. Cottrell GS, Roosterman D, Marvizon JC, Song B, Wick E, Pikios S, et al. Localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in enteric neurons, dorsal root ganglia, and the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*. 2005;490(3):239-55.
47. . !!! INVALID CITATION !!! (47,).
48. Autelitano DJ, Ridings R. Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression. *Peptides*. 2001;22(11):1851-7.
49. Kamitani S, Asakawa M, Shimekake Y, Kuwasako K, Nakahara K, Sakata T. The RAMP2/CRLR complex is a functional adrenomedullin receptor in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1999;448(1):111-4.
50. Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31438-43.
51. Young A. Cardiovascular effects. *Adv Pharmacol*. 2005;52:239-50.
52. Young AA, Crocker LB, Wolfe-Lopez D, Cooper GJ. Daily amylin replacement reverses hepatic glycogen depletion in insulin-treated streptozotocin diabetic rats. *FEBS Lett*. 1991;287(1-2):203-5.
53. Young A, Kolterman O, Hall J. Amylin innocent in essential hypertension? *Diabetologia*. 1999;42(8):1029.
54. Bell D, McDermott BJ. Activity of amylin at CGRP1-preferring receptors coupled to positive contractile response in rat ventricular cardiomyocytes. *Regul Pept*. 1995;60(2-3):125-33.
55. Kaygisiz Z, Ozden H, Erkasap N, Koken T, Gunduz T, Ikizler M, et al. Positive inotropic, positive chronotropic and coronary vasodilatory effects of rat amylin: mechanisms of amylin-induced positive inotropy. *Acta Physiol Hung*. 2010;97(4):362-74.
56. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;313(5997):54-6.
57. Brain SD, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I, Williams TJ. Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *J Invest Dermatol*. 1986;87(4):533-6.
58. Deng PY, Li YJ. Calcitonin gene-related peptide and hypertension. *Peptides*. 2005;26(9):1676-85.

59. Li Y, Zhang Y, Furuyama K, Yokoyama S, Takeda K, Shibahara S, et al. Identification of adipocyte differentiation-related regulatory element for adrenomedullin gene repression (ADRE-AR) in 3T3-L1 cells. *Peptides*. 2006;27(6):1405-14.
60. Ando K, Pegram BL, Frohlich ED. Hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1990;258(2 Pt 2):R425-9.
61. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T, Foulkes R, Hughes B. Regional haemodynamic effects of prolonged infusions of human alpha-calcitonin gene-related peptide in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol*. 1991;103(2):1509-14.
62. Zhang JF, Liu J, Liu XZ, Li MY, Sheng SL, Zhang WJ. The effect of calcitonin gene-related peptide on ischemic reperfusion-induced arrhythmias in rats. *Int J Cardiol*. 1994;46(1):33-6.
63. Kallner G, Gonon A, Franco-Cereceda A. Calcitonin gene-related peptide in myocardial ischaemia and reperfusion in the pig. *Cardiovasc Res*. 1998;38(2):493-9.
64. Atkins BZ, Silvestry SC, Samy RN, Shah AS, Sabiston DC, Jr., Glower DD. Calcitonin gene-related peptide enhances the recovery of contractile function in stunned myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119(6):1246-54.
65. Li YJ, Du YH. CGRP-mediated cardiovascular effect of nitroglycerin. *Med Hypotheses*. 2003;60(5):693-8.
66. Keith IM, Ekman R. Dynamic aspects of regulatory lung peptides in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Exp Lung Res*. 1992;18(2):205-24.
67. Keith IM, Tjen ALS, Kraiczi H, Ekman R. Three-week neonatal hypoxia reduces blood CGRP and causes persistent pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(4):H1571-8.
68. Tjen ALS, Ekman R, Lipton H, Cary J, Keith I. CGRP and somatostatin modulate chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1992;263(3 Pt 2):H681-90.
69. Tam CW, Husmann K, Clark NC, Clark JE, Lazar Z, Ittner LM, et al. Enhanced vascular responses to adrenomedullin in mice overexpressing receptor-activity-modifying protein 2. *Circ Res*. 2006;98(2):262-70.
70. Bell D, McDermott BJ. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol Rev*. 1996;48(2):253-88.
71. Brain SD, Cambridge H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol*. 1996;27(4):607-11.
72. Marshall I. Mechanism of vascular relaxation by the calcitonin gene-related peptide. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;657:204-15.

73. Hirata Y, Takagi Y, Takata S, Fukuda Y, Yoshimi H, Fujita T. Calcitonin gene-related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;151(3):1113-21.
74. Crossman DC, Dashwood MR, Brain SD, McEwan J, Pearson JD. Action of calcitonin gene-related peptide upon bovine vascular endothelial and smooth muscle cells grown in isolation and co-culture. *Br J Pharmacol.* 1990;99(1):71-6.
75. Han SP, Naes L, Westfall TC. Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255(2):423-8.
76. Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and the pathophysiology of headache: therapeutic implications. *CNS Drugs.* 2001;15(10):745-53.
77. Hirata Y, Mitaka C, Sato K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K, et al. Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(4):1449-53.
78. Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature.* 1990;344(6268):770-3.
79. Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol.* 1995;45(1):1-98.
80. Wellman GC, Quayle JM, Standen NB. ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol.* 1998;507 (Pt 1):117-29.
81. Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I, Verrecchia C. Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci Lett.* 1985;58(2):213-7.
82. Gray DW, Marshall I. Nitric oxide synthesis inhibitors attenuate calcitonin gene-related peptide endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 1992;212(1):37-42.
83. Meens MJ, Fazzi GE, van Zandvoort MA, De Mey JG. Calcitonin gene-related peptide selectively relaxes contractile responses to endothelin-1 in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(1):87-95.
84. Feng CJ, Kang B, Kaye AD, Kadowitz PJ, Nossaman BD. L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life Sci.* 1994;55(22):PL433-8.
85. Miura K, Ebara T, Okumura M, Matsuura T, Kim S, Yukimura T, et al. Attenuation of adrenomedullin-induced renal vasodilatation by NG-nitro L-arginine but not glibenclamide. *Br J Pharmacol.* 1995;115(6):917-24.
86. He H, Bessho H, Fujisawa Y, Horiuchi K, Tomohiro A, Kita T, et al. Effects of a synthetic rat adrenomedullin on regional hemodynamics in rats. *Eur J Pharmacol.* 1995;273(3):209-14.

87. Khan AI, Kato J, Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Hypotensive effect of chronically infused adrenomedullin in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(2):139-42.
88. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, et al. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270(9):4412-7.
89. Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H2620-6.
90. Parkes DG, May CN. Direct cardiac and vascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Br J Pharmacol*. 1997;120(6):1179-85.
91. Stangl D, Muff R, Schmolck C, Fischer JA. Photoaffinity labeling of rat calcitonin gene-related peptide receptors and adenylate cyclase activation: identification of receptor subtypes. *Endocrinology*. 1993;132(2):744-50.
92. Majid DS, Kadowitz PJ, Coy DH, Navar LG. Renal responses to intra-arterial administration of adrenomedullin in dogs. *Am J Physiol*. 1996;270(1 Pt 2):F200-5.
93. Nossaman BD, Feng CJ, Kaye AD, DeWitt B, Coy DH, Murphy WA, et al. Pulmonary vasodilator responses to adrenomedullin are reduced by NOS inhibitors in rats but not in cats. *Am J Physiol*. 1996;270(5 Pt 1):L782-9.
94. Champion HC, Wang R, Santiago JA, Murphy WA, Coy DH, Kadowitz PJ, et al. Comparison of responses to adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the feline erection model. *J Androl*. 1997;18(5):513-21.
95. Champion HC, Wang R, Shenassa BB, Murphy WA, Coy DH, Hellstrom WJ, et al. Adrenomedullin induces penile erection in the cat. *Eur J Pharmacol*. 1997;319(1):71-5.
96. Champion HC, Lambert DG, McWilliams SM, Shah MK, Murphy WA, Coy DH, et al. Comparison of responses to rat and human adrenomedullin in the hindlimb vascular bed of the cat. *Regul Pept*. 1997;70(2-3):161-5.
97. Heaton J, Lin B, Chang JK, Steinberg S, Hyman A, Lipton H. Pulmonary vasodilation to adrenomedullin: a novel peptide in humans. *Am J Physiol*. 1995;268(6 Pt 2):H2211-5.
98. Lang MG, Paterno R, Faraci FM, Heistad DD. Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke*. 1997;28(1):181-5.
99. Sabates BL, Pigott JD, Choe EU, Cruz MP, Lipton HL, Hyman AL, et al. Adrenomedullin mediates coronary vasodilation through adenosine receptors and KATP channels. *J Surg Res*. 1997;67(2):163-8.
100. Brain SD, Poyner DR, Hill RG. CGRP receptors: a headache to study, but will antagonists prove therapeutic in migraine? *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(2):51-3.

101. Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem.* 2004;279(8):7264-74.
102. Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett.* 2004;556(1-3):53-8.
103. Hong Y, Hay DL, Quirion R, Poyner DR. The pharmacology of adrenomedullin 2/intermedin. *Br J Pharmacol.* 2012;166(1):110-20.
104. Takei Y, Joss JM, Kloas W, Rankin JC. Identification of angiotensin I in several vertebrate species: its structural and functional evolution. *Gen Comp Endocrinol.* 2004;135(3):286-92.
105. Ni X, Zhang J, Tang C, Qi Y. Intermedin/adrenomedullin2: an autocrine/paracrine factor in vascular homeostasis and disease. *Sci China Life Sci.* 2014;57(8):781-9.
106. Taylor MM, Bagley SL, Samson WK. Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(4):R919-27.
107. Kobayashi Y, Liu YJ, Gonda T, Takei Y. Coronary vasodilatory response to a novel peptide, adrenomedullin 2. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31 Suppl 2:S49-50.
108. Takei Y, Hyodo S, Katafuchi T, Minamino N. Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function. *Peptides.* 2004;25(10):1643-56.
109. Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, et al. Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides.* 2006;27(6):1383-9.
110. Conner AC, Hay DL, Howitt SG, Kilk K, Langel U, Wheatley M, et al. Interaction of calcitonin-gene-related peptide with its receptors. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(4):451-5.
111. Chang CL, Roh J, Hsu SY. Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: a comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates. *Peptides.* 2004;25(10):1633-42.
112. Taylor MM, Bagley SL, Samson WK. Intermedin/Adrenomedullin-2 inhibits growth hormone release from cultured, primary anterior pituitary cells. *Endocrinology.* 2006;147(2):859-64.
113. Taylor MM, Samson WK. Stress hormone secretion is altered by central administration of intermedin/adrenomedullin-2. *Brain Res.* 2005;1045(1-2):199-205.
114. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, et al. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin

- gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):233-46.
115. Dong F, Taylor MM, Samson WK, Ren J. Intermedin (adrenomedullin-2) enhances cardiac contractile function via a protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathway in murine ventricular myocytes. *J Appl Physiol* (1985). 2006;101(3):778-84.
 116. Yang JH, Cai Y, Duan XH, Ma CG, Wang X, Tang CS, et al. Intermedin 1-53 inhibits rat cardiac fibroblast activation induced by angiotensin II. *Regul Pept.* 2009;158(1-3):19-25.
 117. Yang JH, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Ouyang M, Yang J, et al. Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327(3):713-9.
 118. Song JQ, Teng X, Cai Y, Tang CS, Qi YF. Activation of Akt/GSK-3 β signaling pathway is involved in intermedin(1-53) protection against myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion. *Apoptosis.* 2009;14(9):1061-9.
 119. Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Nishiyama A, Kimura S, et al. Effects of adrenomedullin 2 on regional hemodynamics in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;558(1-3):128-32.
 120. Burak Kandilci H, Gumusel B, Wasserman A, Witriol N, Lipton H. Intermedin/adrenomedullin-2 dilates the rat pulmonary vascular bed: dependence on CGRP receptors and nitric oxide release. *Peptides.* 2006;27(6):1390-6.
 121. Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Takei Y, Miura K, Shoukouji T, et al. Renal effects of a new member of adrenomedullin family, adrenomedullin2, in rats. *Eur J Pharmacol.* 2004;497(1):75-80.
 122. Jolly L, March JE, Kemp PA, Bennett T, Gardiner SM. Mechanisms involved in the regional haemodynamic effects of intermedin (adrenomedullin 2) compared with adrenomedullin in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 2009;157(8):1502-13.
 123. Grossini E, Molinari C, Mary DA, Uberti F, Caimmi PP, Vacca G. Intracoronary intermedin 1-47 augments cardiac perfusion and function in anesthetized pigs: role of calcitonin receptors and beta-adrenoreceptor-mediated nitric oxide release. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(4):1037-50.
 124. Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, Quanz K, Chang CL, Park JI, et al. Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(5):L837-45.
 125. Yang JH, Qi YF, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Yang J, et al. Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Peptides.* 2005;26(3):501-7.

126. Chen L, Kis B, Hashimoto H, Busija DW, Takei Y, Yamashita H, et al. Adrenomedullin 2 protects rat cerebral endothelial cells from oxidative damage in vitro. *Brain Res.* 2006;1086(1):42-9.
127. Mao SZ, Fan XF, Xue F, Chen R, Chen XY, Yuan GS, et al. Intermedin modulates hypoxic pulmonary vascular remodeling by inhibiting pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014;27(1):1-9.
128. Chen H, Wang X, Tong M, Wu D, Wu S, Chen J, et al. Intermedin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy through activation of autophagy. *PLoS One.* 2013;8(5):e64757.
129. Li P, Sun HJ, Han Y, Wang JJ, Zhang F, Tang CS, et al. Intermedin enhances sympathetic outflow via receptor-mediated cAMP/PKA signaling pathway in nucleus tractus solitarii of rats. *Peptides.* 2013;47:1-6.
130. Chang JR, Duan XH, Zhang BH, Teng X, Zhou YB, Liu Y, et al. Intermedin1-53 attenuates vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress via cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A pathway. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(10):1136-46.
131. Frumkin LR. The pharmacological treatment of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):583-620.
132. Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet.* 1998;352(9129):719-25.
133. Raja SG, Raja SM. Treating pulmonary arterial hypertension: current treatments and future prospects. *Ther Adv Chronic Dis.* 2011;2(6):359-70.
134. Humbert M, Lau EM, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G. Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2014;130(24):2189-208.
135. Dorfmuller P. Pulmonary hypertension: pathology. *Handb Exp Pharmacol.* 2013;218:59-75.
136. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmuller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2012;141(1):210-21.
137. Montani D, Bertoletti L, Chaumais MC, Perrin S, Fabre D, Chaouat A, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension complicating long-term cyproterone acetate therapy. *Eur Respir Rev.* 2014;23(132):260-3.
138. Mulderry PK, Ghatgei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, et al. Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience.* 1988;25(1):195-205.
139. Champion HC, Bivalacqua TJ, Lambert DG, McNamara DB, Kadowitz PJ. The influence of candesartan and PD123319 on responses to angiotensin II in the hindquarters vascular bed of the rat. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10 Suppl 11:S95-7.

140. Qing X, Svaren J, Keith IM. mRNA expression of novel CGRP1 receptors and their activity-modifying proteins in hypoxic rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(3):L547-54.
141. Dewachter L, Dewachter C, Naeije R. New therapies for pulmonary arterial hypertension: an update on current bench to bedside translation. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010;19(4):469-88.
142. Zhao L, Brown LA, Owji AA, Nunez DJ, Smith DM, Ghatei MA, et al. Adrenomedullin activity in chronically hypoxic rat lungs. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 2):H622-9.
143. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Oya H, Kyotani S, et al. Haemodynamic and hormonal effects of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Heart.* 2000;84(6):653-8.
144. Vizza CD, Letizia C, Sciomer S, Naeije R, Della Rocca G, Di Roma A, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin, a vasoactive peptide, in patients with end-stage pulmonary disease. *Regul Pept.* 2005;124(1-3):187-93.
145. Kakishita M, Nishikimi T, Okano Y, Satoh T, Kyotani S, Nagaya N, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond).* 1999;96(1):33-9.
146. Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Nakanishi N, et al. Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2004;109(3):351-6.
147. Gong YS, Fan XF, Wu XM, Hu LG, Tang CS, Pang YZ, et al. [Changes of intermedin/adrenomedullin 2 and its receptors in the right ventricle of rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension]. *Sheng Li Xue Bao.* 2007;59(2):210-4.
148. Fan XF, Huang P, Gong YS, Wu XM, Hu LG, Tian LX, et al. [Changes of adrenomedullin 2/intermedin in the lung of rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2007;23(4):467-71.
149. Gong YS, Zhang L, Guo YM, Hu LG, Mao SZ, Fan XF, et al. [Effect of hypoxia on the expressions of intermedin/ adrenomedullin2 in plasma and the tissues of heart and lung in rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2009;25(1):8-11.
150. Shaul PW, Wells LB, Horning KM. Acute and prolonged hypoxia attenuate endothelial nitric oxide production in rat pulmonary arteries by different mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22(6):819-27.
151. Wisskirchen FM, Burt RP, Marshall I. Pharmacological characterization of CGRP receptors mediating relaxation of the rat pulmonary artery and inhibition of twitch responses of the rat vas deferens. *Br J Pharmacol.* 1998;123(8):1673-83.

152. Itabashi A, Kashiwabara H, Shibuya M, Tanaka K, Masaoka H, Katayama S, et al. The interaction of calcitonin gene-related peptide with angiotensin II on blood pressure and renin release. *J Hypertens Suppl.* 1988;6(4):S418-20.
153. Reslerova M, Loutzenhiser R. Renal microvascular actions of calcitonin gene-related peptide. *Am J Physiol.* 1998;274(6 Pt 2):F1078-85.
154. Kitamura K. [Adrenomedullin and related peptides]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1998;112(3):137-46.
155. Kureishi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Nakano T, Kanaide H. Adrenomedullin decreases both cytosolic Ca²⁺ concentration and Ca(2+)-sensitivity in pig coronary arterial smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212(2):572-9.
156. Baskaya MK, Suzuki Y, Anzai M, Seki Y, Saito K, Takayasu M, et al. Effects of adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin on cerebral circulation in dogs. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15(5):827-34.
157. Ross GR, Yallampalli C. Endothelium-independent relaxation by adrenomedullin in pregnant rat mesenteric artery: role of cAMP-dependent protein kinase A and calcium-activated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(3):1269-75.
158. Yang BC, Lipton H, Gumusel B, Hyman A, Mehta JL. Adrenomedullin dilates rat pulmonary artery rings during hypoxia: role of nitric oxide and vasodilator prostaglandins. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;28(3):458-62.
159. Yang JH, Zheng DD, Dong NZ, Yang XJ, Song JP, Jiang TB, et al. Mutation of Arg723Gly in beta-myosin heavy chain gene in five Chinese families with hypertrophic cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl).* 2006;119(21):1785-9.
160. Jolly LA, Taylor V, Wood SA. USP9X enhances the polarity and self-renewal of embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Mol Biol Cell.* 2009;20(7):2015-29.
161. Bell D, McDermott BJ. Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1:S247-62.
162. Yang JH, Pan CS, Jia YX, Zhang J, Zhao J, Pang YZ, et al. Intermedin1-53 activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(2):567-72.
163. Li H, Bian Y, Zhang N, Guo J, Wang C, Lau WB, et al. Intermedin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:91.
164. Nuki C, Kawasaki H, Kitamura K, Takenaga M, Kangawa K, Eto T, et al. Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in rat mesenteric vascular beds. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;196(1):245-51.
165. Upton PD, Austin C, Taylor GM, Nandha KA, Clark AJ, Ghatei MA, et al. Expression of adrenomedullin (ADM) and its binding sites in the rat uterus: increased number of binding sites and ADM messenger ribonucleic acid in 20-

- day pregnant rats compared with nonpregnant rats. *Endocrinology*. 1997;138(6):2508-14.
166. Hall JM, Siney L, Lippton H, Hyman A, Kang-Chang J, Brain SD. Interaction of human adrenomedullin 13-52 with calcitonin gene-related peptide receptors in the microvasculature of the rat and hamster. *Br J Pharmacol*. 1995;114(3):592-7.
 167. Taylor GM, Meeran K, O'Shea D, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. Adrenomedullin inhibits feeding in the rat by a mechanism involving calcitonin gene-related peptide receptors. *Endocrinology*. 1996;137(8):3260-4.
 168. Jackson WF. Hypoxia does not activate ATP-sensitive K⁺ channels in arteriolar muscle cells. *Microcirculation*. 2000;7(2):137-45.
 169. Vang A, Mazer J, Casserly B, Choudhary G. Activation of endothelial BKCa channels causes pulmonary vasodilation. *Vascul Pharmacol*. 2010;53(3-4):122-9.
 170. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*. 2001;81(4):1415-59.
 171. Yan J, Olsen JV, Park KS, Li W, Bildl W, Schulte U, et al. Profiling the phospho-status of the BKCa channel alpha subunit in rat brain reveals unexpected patterns and complexity. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(11):2188-98.
 172. Hill MA, Yang Y, Ella SR, Davis MJ, Braun AP. Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett*. 2010;584(10):2033-42.
 173. Zhao L. Chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat: the best animal model for studying pulmonary vasoconstriction and vascular medial hypertrophy. *Drug Discovery Today: Disease Models | Pulmonary vascular disease* 2010;7(3-4):83-8.
 174. Crawley DE, Zhao L, Giembycz MA, Liu S, Barnes PJ, Winter RJ, et al. Chronic hypoxia impairs soluble guanylyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in the rat. *Am J Physiol*. 1992;263(3 Pt 1):L325-32.
 175. Maruyama J, Maruyama K. Impaired nitric oxide-dependent responses and their recovery in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Am J Physiol*. 1994;266(6 Pt 2):H2476-88.
 176. Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP, Archer SL. Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76(2):933-40.
 177. McCullough DJ, Vang A, Choudhary G. NS1619-induced vasodilation is enhanced and differentially mediated in chronically hypoxic lungs. *Lung*. 2014;192(5):811-7.
 178. Shirai M, Pearson JT, Shimouchi A, Nagaya N, Tsuchimochi H, Ninomiya I, et al. Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2003;139(5):899-910.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	D6000 Saklıve-Anakara Telefon: 0 (312) 305 1040-1002 - Faks: 0 (312) 310 0560 www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_sokl.php
	Sıra No: 52558575 - 04	03.02.2015
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI		
TOPLANTI TARİHİ TOPLANTI SAYISI DOSYA KAYIT NUMARASI KARAR NUMARASI ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 03.02.2015 (SALİ) : 2015/01 : 2015/02 : 2015/02-03 Prof.Dr.Bülent GÜMÜŞEL Ecz.Gökçen TELLİ ve Yrd.Doç.Dr.Banu Cahide TEL : Doç.Dr.H. Burak KANDILCI : 208 adet sprague dawley sıçan	
<p>Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Bülent GÜMÜŞEL'in araştırma yürütücüsü olduğu 2015/02 kayıt numaralı "Kronik Hipoksik Sıçanlarda İntermedin'in (IMD/AM2) Pulmoner Vasküler Yatağına Etkisinin Araştırılması" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Yrd.Doç.Dr.Banu Cahide TEL çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.</p>		
<p>Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür</p>		
 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ Etik Kurul Başkanı		

EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar**Bildiriler:**

Telli G., Kandilci HB, Tel BC, Gümüşel B. Intermedin/Adrenomedullin 2 (IMD/AM2) is a potent vasodilator in chronic hypoxia induced pulmonary hypertensive rats. *Experimental Biology, San Diego, 2-6 Nisan 2016.,A.B.D.*

Yayına Hazır Makaleler:

Effects of Intermedin/Adrenomedullin₂ on pulmonary vascular bed in hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Telli G.**, Kandilci HB, Tel BC, Korkusuz, P, Yersal, N., Gümüşel B.

The mechanism of vasodilatory effect of Intermedin/Adrenomedullin₂ on rat main pulmonary artery. **Telli G.**, Kandilci HB, Erac, Y, Tel BC, Gümüşel B.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Gökçen TELLİ
Doğum Yeri ve Tarihi Zonguldak, 9 Kasım 1989
Adres Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
 Farmakoloji Anabilim Dalı, 06100 Sıhhiye-Ankara
 Tel: (312) 305 2131,
 Mobil: (0505) 4920684
 E-posta: telli.gokcen@gmail.com

Öğrenim Durumu

2002-2006 Zonguldak Fen Lisesi
 2006-2011 Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (BSc)
 2011- Hacettepe Üniversitesi
 Farmakoloji Programı Doktora (PhD)

Üyesi olduğu bilimsel ve sosyal kuruluşlar

2013- Türk Farmakoloji Derneği
 2014- Hacettepe Üni.Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği

Bilimsel ilgi alanları

Pulmoner vasküler sistem
 Antidepresan ilaç aktivite tayini
 Parkinson hastalığı

Araştırma deneyimleri

İn vivo:
 -Antidepresan ilaçların aktivite tayinleri,
 -Sıçan akciğer ve karaciğer perfüzyon deneyleri,
 -Stereotaksik enjeksiyon

İn vitro:
 -İzole damar deneyleri
 -İzole akciğer perfüzyon deneyleri
 -Akciğer, karaciğer iskemi-reperfüzyon deneyleri

Ödüller:

22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Bildiri Ödülü

“Moleküler Modelleme Yöntemiyle Tasarlanan Yeni Monoamin Oksidaz-A Enzimi İnhibitörü Selektif 2-Pirazolin Türevlerinin Antidepresan Aktivitelerinin Tayini”

Telli, G., Salgın-Gökşen, U., Yalovaç, A., Çiftçi Yabanoğlu, S., Uçar, G., Gökhan-Kelekçi, N., Tel, B.C., (2013). 22. *Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7.11.2013 Antalya.*

Projeler:

2013- 2015

Proje adı: GPER-1 selektif agonisti G1’in sıçan izole akciğerinde iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkinliğinin araştırılması

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Araştırmacı

Yürütücü: Prof. Dr. Bülent Gümüşel

2014-2015

Proje adı: Depresyon tedavisinde yararlanılabilecek bazı yeni 2-pirazolin ve hidrazon türevlerinin etkin dozlarının belirlenmesi ve lokomotor aktivite üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Araştırmacı

Yürütücü: Prof. Dr. Nesrin Gökhan Kelekçi

2014-

Proje adı: Bazal ganglia ve hipokampüse unilaterale AAV-aracılı alfa-sinükleinin enjeksiyonu ile oluşturulan Parkinson Hastalığı modelinin davranışsal ve patolojik olarak değerlendirilmesi.

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi No: BAP 701, Araştırmacı

Yürütücü: Yard. Doç.Dr. Banu C. Tel

2015-

Proje adı: Bazal gangliyonlarda ve limbik kortekste viral vektör aracılı alfa sinüklein aşırı ifadesine dayalı

Parkinson hastalığı modelinde motor ve davranışsal değişikliklerin patoloji ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve bu modelde rapamisin uygulamasının etkisinin araştırılması, Araştırmacı

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

Yürütücü: Yard. Doç. Dr. Banu C. Tel

2016-

Proje adı: Sıçan ana pulmoner arterinde İntermedin'in (IMD/AM2) etki mekanizmasının araştırılması

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Araştırmacı

Yürütücü: Prof. Dr. Bülent Gümüşel

Bildiriler

- **Telli, G.**, Salgın-Gökşen, U., Erikci-Yalovac, A., Ciftci-Yabanoglu, S., Tel, B.C., Yelekci, K., Ucar, G., Kelekci-Gokhan, N. (2015). Antidepressant Activity of Novel Selective Monoamine Oxidase-A (MAO-A) Inhibitors: 2-Pyrazoline Derivatives Synthesized with Molecular Modelling. International Multidisciplinary Symposium (**Sözlü sunum**).
- **Telli G.**, Salgın-Gökşen U, Yalovaç A, Çiftçi-Yabanoğlu S, Uçar G, Gökhan-Kelekçi N, Tel BC. Moleküler modelleme yöntemiyle tasarlanan yeni monoamin oksidaz-A enzimi inhibitörü selektif 2-pirazolin türevlerinin antidepresan aktivitelerinin tayini.22.. *Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7.11.2013 Antalya*.
- Çınar E., Kazkayası İ., **Telli G.**, Mutluay SU., Yalçın-Çakmaklı G., Saka E., Ulusoy A., Elibol B., Tel BC. Adeno-ilişkili viral vektör aracılı parkinson hastalığı modeli: Alfa-sinüklein aşırı ifadesinin neden olduğu motor ve davranışsal değişiklikler. 22. *Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7.11.2013 Antalya*.
- Salgın-Gökşen U., **Telli G.**, Yalovaç A., Tel BC. , Yabanoğlu-Çiftçi S. , Uçar G., Yelekçi K., Gökhan-Kelekçi N. Selective human mao inhibitory activities of newly synthesized pyrazoline and hydrazone derivatives. *International*

Multidisciplinary. Symposium on Drug Research & Development, 28-30.11.2013 Antalya.

- **Telli G.**, Tel BC., Buyukafsar K., Gumusel B. Effect of the G protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER-1) on the control of pulmonary arterial pressure. *17th World Congress of Basic&Clinical Pharmacology, 13-18 Temmuz 2014 Cape Town, Güney Afrika.*
- Tel, B., Cakmakli, G.Y., Cinar, E., Mutluay, S.U., **Telli, G.**, Saka, E., Ulusoy, A., Elibol, B., (2015). Cognitive dysfunction due to over-expression of alpha-synuclein in hippocampus by using viral vector based approach: Modeling cognitive decline in PD. *Movement Disorders. 30 Suppl. 1 S49-S50.*
- Yalçın Çakmaklı, G., Çınar, E., Mutluay, S.U., **Telli, G.**, Kazkayası, I., Tel , B.C., Ulusoy, A., Saka Topçuoğlu, E., Elibol, B., (2015). Does higher alpha-synuclein aggregate density lead to more severe dopaminergic cell loss in the AAV-mediated over-expression model of PD. *Neurizons 2015 – Notes of an Orchestrated Brain 26-29 May 2015, Göttingen, Germany.*
- **Telli G.**, Kandilci HB, Tel BC, Gümüsel B. Intermedin/Adrenomedullin 2 (IMD/AM2) is a potent vasodilator in chronic hypoxia induced pulmonary hypertensive rats. *Experimental Biology, San Diego, 2-6 Nisan 2016.,A.B.D.*