

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZOLE PULMONER ARTER VE VEN PREPARATLARINDA HİPOKSİ İLE
OLUŞAN VAZOKONSTRİKSİYONUN ETKİ MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

UZM. ECZ. ÖZGE UZUN

70270

TEZ YÖNETİCİSİ

PROF. DR. İLKER KANZİK

YARDIMCI TEZ YÖNETİCİSİ

DOÇ. DR. A. TUNCAY DEMİRYÜREK

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKTORA TEZİ

ANKARA-1998



Tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan tez yöneticim Prof. Dr. İlker Kanzık'a

Çalışmalarımın her aşamasında karşılaştığım sorunların çözümünde yardımcı olan ve yönlendiren Doç.Dr.A.Tuncay Demiryürek'e teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

I.GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
II.1.PULMONER DOLASIM.....	2
II. 1. 1. PULMONER DAMAR DİRENCİNİN DÜZENLENMESİ.....	3
II. 1. 1. A. Nöronal Mekanizmalar.....	3
II. 1.1.B. Refleks Mekanizmalar.....	4
II.1.1 C. Hümorale Mekanizmalar.....	5
II.2. HİPOKSİK PULMONER VAZOKONSTRİKSİYON.....	6
II.2.1 İZOLE PULMONER ARTER VE VEN PREPARATLARINDA HİPOKSİNİN ETKİSİ.....	7
II.2.2. HİPOKSİK VAZOKONSTRİKSİYONUN MEKANİZMASI.....	8
II.2.2.1. HİPOKSİK VAZOKONSTRİKSİYONDA ROLÜ OLABİLECEK MEDİYATÖRLER	9
II.2.2.1.A. Anjiyotensin.....	9
II.2.2.1.B. Kininler.....	9
II.2.2.1.C.Vazopressin.....	9
II.2.2.1.D. Atrial natriüretik Peptit (ANP).....	9
II.2.2.1.E. Kalsitonin geniyle ilişkili peptit (CGRP).....	10
II.2.2.1.F.Vazoaktifintestinal peptit(VIP).....	10
II.2.2.1.G. P maddesi.....	10

II.2.2.1.H. Nöropeptit Y(NPY).....	10
II.2.2.1.I.Endotelinler.....	11
II.2.2.1.J. Prostaglandinler.....	11
II.2.2.1.K. Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF).....	12
II.2.2.1.L. Histamin.....	14
II.2.2.1.M. Serotonin.....	14
II.2.2.1.N. Sitokinler.....	14
II.2.2.2. ENDOTEL HÜCRELERİNDE OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLER.....	15
II.2.2.3. HIPOKSİNİN DÜZ KAS HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	17
II.2.2.3.A. Kalsiyum.....	18
II.2.2.3.B. Potasyum.....	19
II.2.2.3.B.1.Hipoksiye aracılık eden membran depolarizasyonu.....	23
II.2.2.3.B.2. Oksijene bağımlı etkilerde K ⁺ kanallarının rolü.....	24
II.2.2.3.B.4. Pulmoner Arter Düz Kas Hücrelerinde K ⁺ Akımının Hücrel Redoks Değişikliği ile Kontrolü.....	24
II.2.2.3.B.5.Hipoksinin Hücrel Redoksu Değiştirmesi.....	25
II.2.2.3.C. Sodyum pompası.....	26
II.3. G PROTEİNLERİ.....	27
II.3.1. G PROTEİNLERİNİN YAPISI.....	27
II.3.2. RESEPTÖR AKTİVASYONU - G PROTEİNİ İLİŞKİSİ.....	28
II.3.3.G PROTEİNLERİNİN İŞLEVLERİ	29

II.3.4. G PROTEİNLERİ VE VASKÜLER YANITLAR.....	30
I.4. İKİNCİ HABERCİLER.....	34
II.4.1. SIKLIK NÜKLEOTİDLER.....	34
II.4.2. FOSFOİNOZİD HİDROLİZİ.....	35
II.4.3. PROTEİN KİNAZLAR.....	36
II.5. TİROZİN KİNAZ ARACILIKLI SİNYAL İLETİMİ VE DÜZ KAS KASILMASI.....	36
II.5.1. DAMAR DÜZ KASININ KASILMASI.....	36
II.5.2. PROTEİN TİROZİN FOSFORİLASYONU VE DÜZ KAS KASILMASI.....	40
II.5.3. DAMAR DÜZ KAS HÜCRESİNDE Ca^{+2} GİRİŞİ VE DEPOLANMASINDA TİROZİN KİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ.....	41
II.5.4. DÜZ KAS GERİMİNİN TİROZİN KİNAZ/TİROZİN FOSFATAZ YOLAĞI ARACILIĞI İLE DÜZENLENMESİ.....	43
II.5.5. G PROTEİNLERİNE BAĞLI AGONİSTLERİN TİROZİN KİNAZ YOLAĞINI AKTİVE ETMELERİ.....	45
III.MATERYAL VE YÖNTEM.....	47
III.1 DENEYSEL PREPARAT.....	47
III.2.DENEYLERDE KULLANILAN MALZEMELER.....	47
III.3.DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	47
III.4.YÖNTEM.....	48
III.4.1.PULMONER ARTER İZOLASYONU VE OPTİMUM DİNLENME GERİMİNİN SAPTANMASI.....	48
III.4.2. KONTRAKTİL AGONİSTİN BELİRLENMESİ	51

III.4.4. GEVŞEME YANITLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	53
II.4.5. ÇALIŞMALARDA İZLENEN DENEY PROTOKOLÜ.....	55
IV.BULGULAR.....	59
IV.I.PULMONER ARTERLERDE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	59
IV.I.1. DAR ÇAPLI PULMONER ARTERLERDE HİPOKSİ UYGULAMASI.....	59
IV.I.2. GENİŞ ÇAPLI PULMONER ARTERLERDE AKUT HİPOKSİ UYGULAMASI.....	59
IV.I.1.A. Dinlenme gerimindeki arterler.....	59
IV.I.1.B. Prekontrakte arterler.....	63
IV.I.1.C. Endotel bağımlı gevşeme yanıtları.....	68
IV.I.3. GENİŞ ÇAPLI, ENDOTEL TABAKASI KORUNMUŞ İZOLE PULMONER ARTERLERDE TIROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN VE ORTOVANADATIN HİPOKSİ UYGULAMASI ÜZERİNE ETKİSİ.....	68
IV.I.3.A. Dinlenme gerimindeki arterler.....	68
IV.I.3.B. Prekontrakte arterler.....	73
IV.I.3.B.1. Genisteinin HPV üzerine etkisi	73
IV.I.3. B.2 Trifostinin HPV üzerine etkisi.....	73
IV.I.3.B.2.Ortovanadatın HPV üzerine etkisi.....	73
IV.1.4. KOLERA TOKSİNİNİN HPV ÜZERİNE ETKİSİ.....	78
IV.1.4. KOLERA TOKSİNİNİ VE ORTOVANADATIN HPV ÜZERİNE ETKİSİ.....	78

IV.I.5. TETRAETİL AMONYUMUN (TEA) HİPOKSİK PULMONER VAZOKONSTRİKSİYON ÜZERİNE ETKİSİ.....	78
IV.II. İZOLE KOYUN PULMONER VENLERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	82
IV.II. A. Dinlenme gerimindeki venler.....	82
IV.II. A. Prekontrakte venler gerimindeki venler.....	87
V. TARTIŞMA.....	90
V.1. İZOLE KOYUN PULMONER ARTERLERİNDE HPV	90
V.2.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin HPV Üzerine Etkisi.....	93
V.3.2. Kolera Toksininin (CT) HPV Üzerine etkisi.....	96
V.4. 3. Tetraetilamonyumun (TEA) HPV Üzerine etkisi.....	97
V.2. İZOLE KOYUN PULMONER VENLERİNDE HİPOKSİ UYGULAMASI.....	98
VI. SONUÇ.....	102
VII. ÖZET.....	103
VIII. SUMMARY.....	105
IX. KAYNAKLAR.....	107
X. ÖZGEÇMİŞ.....	124

GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonun 1946'da ilk defa deneysel olarak anesteziye kedide yapılan çalışmayla gösterilmesinden sonra mekanizmasının anlaşılmasına yönelik bir çok çalışma yapılmış ama kesin olarak aydınlatılamamıştır. Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon, akciğerlerde kan akımını az oksijenlenen bölgeden daha iyi oksijenlenen bölgeye yönelten bir uyum mekanizmasıdır²⁷. Ayrıca patofizyolojik olarak da gelişebilir. İzole pulmoner arterlerde ve venlerde yapılan çalışmalarda hipoksik vazokonstriksiyonun gözlenmesi, bu olayın inervasyondan, parenkimal ve bağ dokusundan bağımsız olduğunu ortaya koymuştur. Prekapiller arteriollerin hipoksiye bağlı olarak oluşan vazokonstriksiyonda başlıca etki bölgesi olduğu bilinmektedir. Arterioller yanında venlerde de hipoksinin vazokonstriksiyon oluşturduğu ve bunun önemli olabileceği ileri sürülmüştür¹⁸⁴. Ancak venlerde hipoksinin etkisini belirleyebilecek bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu nedenle, çalışmanın ilk amacı, hipoksinin etkisini koyun pulmoner arterleri ve venleri kullanarak araştırmaktır. Çalışmanın diğer bir amacı, kolera toksini kullanarak hipoksik vazokonstriksiyonda G proteinlerinin rol oynayıp oynamadığının saptanması ve genistein, trifostin gibi son zamanlarda geliştirilen selektif tirozin kinaz inhibitörleri ile hipoksik vazokonstriksiyonda etkisi incelenmemiş olan tirozin kinaz yolağının rolünün aydınlatılmasıdır. Deneylerimizde son olarak koyun izole pulmoner arterlerinde hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonda K⁺ kanallarının bir rolü olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. PULMONER DOLAŞIM

Normal yetişkin pulmoner dolaşımı düşük basınçlı ve düşük dirençli bir dolaşımdır. Vazodilatörler normal koşullarda pulmoner dolaşım üzerinde ya etkisizdirler ya da etkileri çok azdır¹⁸¹. Pulmoner dolaşım hem aktif hem de pasif aktörlerin kontrolü altındadır. Aktif faktörler otonomik sinirler, hümorale etkenler ve gazlardır. Pasif faktörler ise kalp debisi, sol atrial basınç, interstisyel basınç ve damar tıkanıklığıdır. Pasif faktörler bazı önemli olaylarda rol oynamakla birlikte pulmoner dolaşım temel olarak aktif faktörlerin kontrolü altındadır¹³.

Pulmoner arterlerin düz kas tabakası sistemik arterlerin tersine daha incedir. Pulmoner venler de yapısal olarak pulmoner arterlere benzer ancak düz kas tabakası daha azdır¹³. Pulmoner arterlerin kasılması pulmoner basıncın yükselmesine ve buna bağlı olarak sağ kalpte basıncın artmasına, pulmoner venlerin kasılması ise kapiler basıncın artmasına ve pulmoner ödem gelişmesine neden olmaktadır¹³.

Hastalıklara bağlı olarak pulmoner damarların yapısında önemli değişiklikler oluşabilmektedir. Pulmoner basıncın kronik olarak yükselmesi fibrozisle birlikte yeniden yapılanmayı başlatır. Bu özellikle intimal tabakada olmaktadır. Sonuçta düz kas tabakası kalınlaşmakta ve kontrol mekanizmalarında değişiklikler meydana gelmektedir¹³.

II. 1. 1. PULMONER DAMAR DİRENCİNİN DÜZENLENMESİ

II. 1. 1. A. Nöronal Mekanizmalar:

Otonom sinir sistemi hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullarda pulmoner kan akımını modifiye edebilir. Pulmoner damar direncinin düzenlenmesinde otonom sinir sisteminin rolüne ilişkin bilgiler nöropeptitler, purinler, nitrik oksit (NO) gibi yeni nörotransmitterlerin bulunması, farklı otonomik reseptörlerin belirlenmesi ve otonomik sinir uçlarında kavşak öncesi kontrol mekanizmalarının gösterilmesi ile artmıştır¹³(Tablo1).

Tablo 1: Pulmoner damarlarda otonomik reseptörler¹³

Reseptör	Alt tip	Yanıt	Endotele bağımlılık
Adrenerjik	α_1 α_2	Kasılma Gevşeme	Yok Var
Muskarinik	M_3	Gevşeme	Var
Purinerjik	P_{2x} P_{2y}	Kasılma Gevşeme	Var Var
Taşikinin	NK_1 NK_2	Gevşeme Kasılma	Var Yok
VIP	?	Gevşeme	Var / Yok
CGRP	?	Gevşeme	Yok

Histokimyasal çalışmalarda ekstrapulmoner arter ve venlerin katekolamin içeren sinirlerle inerve edildiği gösterilmiştir. Ancak özellikle intrapulmoner arterlerde türler arası farklılıklar dikkat çekicidir¹³. Köpeklerde intakt ve perfüze pulmoner damar yatağında sempatik sinirlerin uyarımı, akciğerde perfüzyon basıncında artmaya neden olmaktadır⁷⁵.

Pulmoner dolaşımında, adrenerjik inervasyonla karşılaştırıldığında kolinerjik inervasyonun etkinliğinin daha az olduğu gösterilmiştir¹³. Kolinerjik sinir liflerinin dağılımında da türe bağlı değişiklikler dikkat çekmektedir. Asetilkolin damarın önceki gerimine bağlı olarak hem vazodilatör hem de vazokonstriktör olabilir^{143, 23}. Pek çok türde pulmoner dolaşımın kolinerjik inervasyona sahip olduğu gösterilmiş olmakla birlikte bunun fonksiyonel önemi henüz aydınlatılamamıştır¹¹³.

Pulmoner dolaşım adrenerjik ve kolinerjik inervasyon dışında nonadrenerjik nonkolinerjik (NANK) sinirlerle de innerve edilmiştir. Adenozin trifosfat (ATP) eksitator; kalsitonin geni ile ilişkili peptit (CGRP), NO ve P maddesi ise inhibitör NANK transmitterleridir¹³.

II. 1.1.B. Refleks Mekanizmalar:

Pulmoner dolaşım merkezi ve yerel refleks mekanizmaların kontrolü altında çalışmaktadır. Hipotalamik intergratif alanın stimülasyonu pulmoner dirençte hafif bir artışa³ ya da pulmoner komplansta bir azalmaya neden olmaktadır¹⁶¹. Medullanın yakınındaki vasküler düzenleyici C-1 alanının uyarımının pek çok deneyde sempatik kanallarla pulmoner vazokonstriksiyona neden olduğu ve bunu vazodilatasyonun izlediği saptanmıştır⁶⁴. İntrakraniyal basıncın yükselmesi de Cushing refleksi yoluyla pulmoner vazokonstriksiyon oluşturur¹⁰³

Pulmoner tonüs periferik kemoreseptörler ve baroreseptörler tarafından da modüle edilir. Deneysel koşullara bağlı olarak bir uyarı, karotit ya da

aortik kemoreseptörler aracılığı ile pulmoner damar direncinde artmaya ya da azalmaya neden olabilmektedir. Ancak pulmoner direnci etkilemediği de bulgular arasındadır. Karotit ya da aortik baroreseptörlerin uyarımı ise refleks olarak pulmoner vazodilatasyona neden olabilmektedir¹³.

II.1.1 C. Hümorale Mekanizmalar:

Pek çok mediyatörün ve hormonun pulmoner damar tonüsünün düzenlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Tablo 2). Etkileri tür, yaş, ön gerim gibi pek çok faktöre bağılı olarak değişmektedir¹³. Hümorale kontrol mekanizmaları fizyolojik koşullara uyumlu yanıtların oluşumunda önemlidir.

Anjiyotensin (AII), lösin-enkefalin, trombin, trombin reseptör aktivasyon peptidi, prostaglandin D₂ (PGD₂), PGE₂, ve PGF_{2α} pulmoner vazokonstriktör, atrial natriüretik peptit (ANP), vazoaktif intestinal peptit (VIP), CGRP (kalsitonin geniyle ilişkili peptit), adenozin monofosfat (AMP), PGE₁ ve PGI₂ pulmoner vazodilatör olarak değerlendirilirler¹³. Bununla birlikte bazı istisnalar da sözkonusudur. Örneğin, PGD₂ ve PGE₂ fetal kuzu pulmoner damarlarında vazodilatörken, tavşanda pulmoner vasküler direnci arttırmaktadır. Bradikinin (BK), endotelinler (ET), P maddesi, histamin, serotonin, trombosit aktive edici faktör (PAF), arakidonik asit, adenozin trifosfat (ATP) ve adenozin difosfatın (ADP) pulmoner damar tonüsü üzerine ikili etkileri gösterilmiştir. Bu maddelerin damar tonüsü artmışsa gevşeme, tonüs düşüğe kasılmaya neden oldukları belirlenmiştir¹³.

Tablo 2: Pulmoner damarlardaki hümorale reseptörler

Reseptör	Alt tip	Yanıt	Endotele bağımlılık
Adenozin	A ₁ A ₂	Kasılma Gevşeme	Yok Yok
Angiotensin	AT	Kasılma	Yok
Atrial natriüretik peptit	ANP _A ANP _B	Gevşeme Gevşeme	Yok Yok
Bradikinin	B ₁ ? B ₂	Gevşeme Gevşeme	Var Var
Endotelin	ET _A ET _B	Kasılma Gevşeme	Yok Var
Histamin (HA)	H ₁ H ₂	Gevşeme Gevşeme	Var Yok
Serotonin (5-HT)	5-HT ₁ 5-HT _{1c}	Kasılma Gevşeme	Yok Var
Tromboksan	TP	Kasılma	Yok
Vazopressin	V ₁	Gevşeme	Var

II.2. HIPOKSİK PULMONER VAZOKONSTRİKSİYON

Pulmoner dolaşımın akut hipoksiye yanıtı pulmoner arter basıncı ve direncinin artmasıdır. Bu, hipoksiye yanıtın vazodilatasyon olduğu sistemik dolaşım ile pulmoner dolaşımın bir farkıdır²⁷. Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon (HPV) ilk kez 1946'da anesteziye edilmiş kedi pulmoner dolaşımında gösterilmiştir¹⁶⁸. Daha sonra HPV'nin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik çalışmalar ilgi çekici bir araştırma alanını oluşturmuştur.

HPV akciğerlerde kan akımını az oksijenlenen bölgeden daha iyi oksijenlenen bölgeye yönelten intrapulmoner bir uyum mekanizmasıdır. Bu mekanizma akciğerlerde ventilasyon-perfüzyon oranının en iyi şekilde sürdürülmesi

ve düzenlenmesi için gerekli fizyolojik bir mekanizmadır¹⁷⁵. HPV patofizyolojik olarak da gelişebilir. Astma, atelektazi, akut solunum yetmezliği sendromu, (ARDS) pnömoni gibi pulmoner hipertansiyonun eşlik ettiği çeşitli hastalıklarda görülmektedir²⁷.

HPV'yi pek çok faktör etkileyebilmektedir. Bunlar tür, cinsiyet, genetik, yaş ve gebelik şeklinde özetlenebilir²⁷. Ayrıca hipoksinin süresi, damar parçasının ölçütleri pulmoner yataktaki yeri ve hipoksinin derecesi de hipoksiye bağlı kontraktıl yanıtı etkileyen faktörler olarak değerlendirilmektedir⁸⁷.

II.2.1 İZOLE PULMONER ARTER VE VEN PREPARATLARINDA HIPOKSİNİN ETKİSİ

Kato ve Staub adlı araştırmacılar⁷⁸ HPV'nin başlıca etki bölgesinin terminal bronşiyoller çevresindeki dar çaplı pulmoner arterler olduğunu göstermişlerdir. Bu arterler, alveolar oksijen konsantasyonundaki değişiklikten en kolay etkilenebilecek bölgededir. Daha sonra yapılan araştırmalarda da HPV'nin predominant bölgesinin dar çaplı pulmoner arterler olduğu doğrulanmıştır¹¹⁵. Pulmoner venler de hipoksiye kasılma ile yanıt vermektedir¹⁸⁴. Oysa kedilerde yapılan bir çalışmada hipoksiye bağlı direnç artışının pulmoner arterlerde venlere göre üç kat fazla olduğu gösterilmiştir¹¹⁵. Bununla birlikte kuzularda yapılmış bir çalışmada pulmoner arter ve vende hipoksiye bağlı direnç artışının eşit olduğunu gösterilmiştir¹³³.

II.2.2. HİPOKSİK VAZOKONSTRİKSİYONUN MEKANİZMASI

Pek çok mediyatör ve vazoaktif maddenin (katekolaminler, HA, AII, PG'ler, PAF, 5-HT....) HPV'deki rolü araştırılmıştır ve bunlardan hiçbiri HPV'nin başlıca mediyatörü olarak kabul edilmemektedir. Olaya modülatör olarak katılabilecekleri öne sürülmektedir. HPV mekanizması üzerinde yapılan araştırmalar iki varsayım üzerine yoğunlaşmıştır:

1. HPV endotel bağımlı bir olaydır³⁰.
2. HPV doğrudan düz kas üzerine etkiyle oluşmaktadır²⁶.

Her iki mekanizmayı da sıçan pulmoner arterlerinde izlemek olasıdır. Sıçan pulmoner arterlerinin hipoksiye yanıtı bifaziktir¹⁵. Sıçan pulmoner arterlerinde hipoksi önce hızlı bir kasılma ve bunu izleyen bir gevşeme oluşturmaktadır. Bu birinci fazdır. İkinci faz ise yavaş gelişen ve uzun süren bir kasılmadır. Birinci fazın endotel bağımlı bir mekanizma olduğu ikinci fazın ise endotelden bağımsız şekilde geliştiği gösterilmiştir. Oysa Leach ve arkadaşları⁹⁰ yaptıkları araştırmada endotel tahribinin birinci fazı etkilemediğini ancak dar çaplı pulmoner arterlerde vazokonstriksiyonu % 40 oranında azalttığını saptamıştır. İkinci fazın ise hem dar çaplı hem de geniş çaplı arterlerde tamamen endotele bağlı bir mekanizma olduğu görülmüştür. Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada ise endotel tabakasının kaldırılması HPV'yi %40-80 oranında azaltmıştır¹³⁸.

II.2.2.1. HİPOKSİK VAZOKONSTRİKSİYONDA ROLÜ OLABİLECEK MEDİYATÖRLER

II.2.2.1.A. Anjiyotensin: Endojen AII'nin pulmoner dolaşımın düzenlenmesinde önemli bir mediyatör olduğu belirtilmiştir⁴⁴. HPV için de bir mediyatör olarak değerlendirilmiştir¹⁷. Endojen AII oluşumunun anjiyotensin dönüştürücü enzimin inhibisyonu nedeniyle hipoksik koşullarda azaldığı gösterilmiştir⁶⁹.

II.2.2.1.B. Kininler: Bradikinin sistemik ve pulmoner damar yatağında güçlü bir NO salıcısı olarak bilinmektedir¹²⁹. Ancak bradikinin pulmoner yatakta PGI₂ salınımına da neden olmaktadır⁶⁷. Bazal koşullarda köpek, tavşan ve sıçanda pulmoner damar yatağında bir etkisi gösterilememiştir^{52, 93,130}. Bradikininin normal insan pulmoner yatağında bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Ama hipoksik pulmoner hipertansiyonlularda pulmoner arter direncini bir miktar düşürmektedir¹⁹.

II.2.2.1.C. Vazopressin: Prekontrakte ya da hipoksik koşullarda, vazopressin pulmoner damar yatağında vazodilatasyona neden olmaktadır¹⁷⁴. Vazodilatör etkiye V₁ reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak NO salınımının artması neden olmaktadır. Çünkü V₁ reseptör antagonistleri ile bu yanıt tamamen bloke edilebilmekte, NO sentez inhibitörleriyle anlamlı şekilde azaltılabilmektedir.

II.2.2.1.D. Atrial natriüretik Peptit (ANP): ANP hipoksik pulmoner hipertansiyonda modüle edici faktörlerden biridir. Akut alveolar hipoksi ANP salınımına neden olmaktadır⁹. Dolaşımdaki ANP miktarı kronik pulmoner hipoksi

uygulanmış hayvan modellerinde ve pulmoner hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur.

II.2.2.1.E. Kalsitonin geniyle ilişkili peptit (CGRP): Otoradyografik çalışmalarda CGRP reseptörleri vasküler düz kasta saptanmıştır. CGRP'nin akut HPV üzerine etkisi zayıf bulunmuştur¹³ Ancak hipoksik pulmoner hipertansiyon gelişiminde önemi olabileceği düşünülmektedir. Çünkü sıçanlar kronik hipoksiye maruz bırakıldıklarında akciğer nöroendokrin hücrelerinde CGRP benzeri immünreaktivitenin arttığı saptanmıştır¹³⁹.

II.2.2.1.F. Vazoaktif intestinal peptit (VIP): VIP izole pulmoner damarları gevşetmektedir. İntakt izole pulmoner damar yatağında hem endotel hem de endotelden bağımsız etkisinin olduğu bildirilmiştir^{66, 12}.

II.2.2.1.G. P maddesi: Kobay, tavşan ve koyunda P maddesinin hipoksi ya da başka bir nedenle pulmoner tonüs yüksek olduğunda vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir¹³.

II.2.2.1.H. Nöropeptit Y(NPY): NPY adrenerjik sinir uçlarında bir kotransmitter olarak bulunur ve in vitro olarak vazokonstriktör olduğu gösterilmiştir^{100, 79}. NPY'nin endotel hücre kültürlerinde PGI₂ salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir⁸⁰. Bununla birlikte pulmoner damar yatağında etkisi çok zayıftır.

II.2.2.1.I. Endotelinler: Endotelden salınan kasıtırıcı faktörün (EDCF) de HPV'nin mediyatörlerinden olabileceği görüşü vardır¹⁴². Oksijen konsantrasyonundaki değişikliklere yanıtta kan akımının kontrolünde ET önemli bir madde olarak değerlendirilmektedir. Çünkü hipoksinin endotel hücre kültürlerinde ET gen ekspresyonunu ve sekresyonunu arttırdığı saptanmıştır⁸⁶. Domuz izole pulmoner arterlerinde de ET aktivitesinin arttığı gösterilmiştir⁸⁷. Ancak bu çalışmalarda kronik hipoksi uygulaması söz konusudur. ET'nin akut HPV' de rolü önemli görülmemektedir. ET-1'e pulmoner damarların verdiği yanıt ilginçtir. Çünkü pulmoner arterlerde vazokonstriksiyona aracılık eden ET reseptörleri farklı tiptedir¹³⁰. Geniş çaplı pulmoner arterlerde yapılan çalışmalarda ET etkisine sıçan köpek ve domuzda ET_A reseptörlerinin, tavşanda ise ET_B reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ekstrapulmoner arterlerde ET etkisine ET_A reseptörlerinin aracılık ettiği, dar çaplı damarlarda ise ET_B reseptörlerinin aracılık ettiği bulunmuştur¹⁰⁸. Geniş çaplı pulmoner arterlerde ET_A aracılıklı yanıtların bazal NO salınımı tarafından baskılanmadığı da gösterilmiştir. Ayrıca hipoksinin sıçan pulmoner arterlerinde ET-1'e duyarlılığı artırmadığı belirtilmiştir.

II.2.2.1.J. Prostaglandinler: Pulmoner damarlarda PG'lerin oluşumunun HPV'yi modüle edici rolü olduğu ve aşırı vazokonstriksiyona karşı pulmoner dolaşımda koruyucu bir göreve sahip olduğu bilinmektedir^{167, 179}. Hipoksi bölgesel kan akımını yeniden düzenleyerek damar tonüsünü değiştirebilmektedir. Bu olaya eikozanoit

üretimindeki değişiklikler de katılabilir. Bu varsayım domuz endotel hücrelerinde araştırılmıştır¹⁰⁴. Hipoksi boyunca endotel hücrelerinde $\text{PGF}_{2\alpha}$ üretiminin arttığı ama total lökotrien ve tromboksan üretiminde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Siklooksijenaz enzim inhibitörlerinin insan, domuz ve koyunda HPV'yi azalttığı gösterilmiştir^{29, 113}.

Akciğerlerde PGI_2 üretiminin, özellikle vasküler endotelde olduğu bulgular arasındadır. Bu durum, parsiyel oksijen basıncındaki değişikliklerin PGI_2 sentezini doğrudan etkileyebileceğini düşündürmektedir. Akut hipoksi ile endotel hücrelerinin PGI_2 üretimi arasındaki ilişki yeni doğmuş kuzuların pulmoner arterlerinde incelenmiştir¹¹⁹. Araştırmanın bulguları parsiyel oksijen basıncında düşmenin vazodilatör prostaglandin sentezini arttırdığını göstermektedir. PGI_2 sentezi üzerindeki bu etki siklooksijenaz (COX) enzim düzeyi, PGI_2 sentetaz ve PGE_2 - PGH_2 izomeraz aktivitesindeki değişiklikler yoluyla olabilmektedir. Majör etkinin COX üzerinden olduğuna dikkat çekilmektedir. Sonuç olarak akut hipoksi COX-1'in endotel hücrelerindeki sentezini arttırmaktadır. Bu artış COX aktivitesinin artmasına yol açarak PGI_2 ve PGE sentez hızını yükseltmektedir. COX-1 pulmoner arterlerde O_2 'e bağlı yanıt değişikliklerinde önemli bir modüle edici faktör olarak değerlendirilmektedir¹¹⁹.

II.2.2.1.K. Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF): Endotel hücrelerinin pulmoner damarların oksijene duyarlılığını ayarlama da görevleri vardır. Bu

hücrelerden salınan EDRF/NO ve EDCF'nin hipoksik vazokonstriksiyondaki rollerini araştırmaya yönelik bir çalışmada pulmoner arterlerde hipoksinin EDCF aktivitesini arttırdığı, EDRF/NO etkinliğini ise azalttığı saptanmıştır⁸⁷. Sıçanlarda bifazik olan HPV yanıtının ilk gevşeme fazında EDRF/NO etkinliğinin arttığı, ama sonraki kasılma fazında EDRF/NO etkinliğinin inhibe olduğu gösterilmiştir⁴⁶. Bu çalışmayı yapan araştırmacılar, EDRF/NO'nun nedensel değil, ama hipoksiye yanıtı etkileyen bir faktör olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır. Domuz pulmoner arterlerinde metilen mavisi, oksihemoglobin, L-NNMA ön uygulaması ve endotel harabiyeti hipoksiye bağlı kasılmaları arttırmıştır. EDRF/NO'nun bazal salınımının baskılanması ise hipoksidede kontraktıl bir etkiye neden olmamış, ancak endotel tabakasının tahrip edilmesi HPV'yi arttırmıştır¹²⁴. Hipoksinin EDRF salınımını arttırdığını gösteren çalışmalar da vardır. Bütün bu bulgular EDRF salınımının HPV'yi etkilediğini göstermektedir. Nitekim hipoksinin EDRF/NO sentaz aktivitesini azalttığı da bulgular arasındadır¹³⁷. EDRF'nin düz kasta sGMP düzeyini arttırarak etki gösterdiği bilinmektedir¹⁶⁶. Kedi pulmoner arterlerinde sGMP düzeylerinin hipoksiye bağlı olarak düştüğü gösterilmiştir⁶⁵. Bu durum HPV'de sGMP aracılığının sözkonusu olabileceğini düşündürmektedir. Hipoksiye alınan yanıtta EDRF/NO'nun modülatör rolü gösterilmiş olmakla birlikte düz kastaki sGMP azalmasının EDRF/NO'dan bağımsız bir mekanizma ile olabileceği de bilinmektedir¹⁰⁵.

Pulmoner arterlerde NOS ve COX enzimleri arasında karşılıklı bir etkileşim olabileceği, birinin inhibisyonunun diğerinin aktivitesini değiştirebileceği

varsayımı da değerlendirilmiştir⁹⁹. Bu çalışmada normoksik koşullarda izole perfüze gelincik akciğerinde NOS aktivitesinin COX blokajından sonra arttığı gösterilmiştir. İzole perfüze sıçan akciğerinde ise COX aktivitesi NOS blokajından sonra artmaktadır. Hipoksik koşullarda bu enzimlerin karşılıklı etkileşiminin nasıl olduğu ise henüz değerlendirilmemiştir.

II.2.2.1.L. Histamin: Histamin akciğerlerde mast hücrelerinden salgınır. Bu hücreler pulmoner damarların adventisya tabakasında bulunur. Histamin, pulmoner damar yatağında önceden varolan tonüse göre etki gösterir^{126, 150}.

II.2.2.1.M. Serotonin (5-HT): 5-HT'nin çeşitli türlerde potent bir vazokonstriktör olduğu gösterilmiştir^{63, 110}. Ancak kedide pulmoner tonüs yüksekse vazodilatasyon oluşturduğu da bildirilmiştir¹¹⁷. İnsan pulmoner damarlarının ise in vitro olarak 5-HT ile kasıldığı gösterilmiştir. Ancak 5-HT in vivo olarak pulmoner basıncı değiştirmemektedir¹³.

II.2.2.1.N.Sitokinler: Sitokinlerin pulmoner damarlardaki etkinliği, eNOS ve iNOS üzerine olan etkinliklerinin dengesine bağlıdır. Sıçanlarda TNF α 20 dakika içinde HPV'yi arttırmaktadır. Bir haftalık kronik uygulamada pulmoner direnci arttırırken iki haftalık uygulama pulmoner vasküler reaktiviteyi azaltmaktadır. Bu durum TNF α 'nın iNOS ve eNOS üzerindeki etkisinin doz ve zaman bağımlı olabileceğini belirtmektedir^{155,156}. İzole perfüze sıçan akciğer lobunda 30 dakikalık hipoksi

uygulaması sonucu oluşan HPV, TNF_{α} tarafından ortadan kaldırılmaktadır. TNF_{α} 'nın etkileri için tür bağımlı değişiklikler de sözkonusudur.

II.2.2.2. ENDOTEL HÜCRELERİNDE OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLER

Akciğer harabiyeti ve çeşitli hastalık durumları pulmoner damar endotel hücrelerini düşük parsiyel oksijen basıncı ile karşıkarşıya getirmektedir. Bu durum endotel hücrelerinde pek çok metabolik özelliğin değişmesine neden olmaktadır. Böylece hipoksiye maruz kalmış hücreler yapılarını ve yaşamsal işlevlerini sürdürebilmektedirler⁷. Pulmoner damarlarda endotel hücrelerinin hipoksik koşullara uyumunu sağlayan mekanizmalar kesin olarak bilinmemekle birlikte, bazı spesifik proteinlerin sentezinde artışın yeni duruma uyumu sağlamada görev aldığı düşünülmektedir¹⁵⁹. Hipoksiye bağlı olarak endotel hücre kültürlerinde stres proteinlerinin sentezlendiğini gösterilmiştir¹²³. Sığır pulmoner arteri endotel hücrelerinde hipoksik koşullarda sentezlenen spesifik proteinler tanımlanmıştır⁴⁵. Bu proteinlerin hipoksinin tolere edilebilmesinde endotel hücrelerine yardımcı olmakla görevli oldukları düşünülmektedir. Hipoksik koşullara uyumda rol alan stres proteinlerinin etki mekanizmaları bilinmemektedir. Bununla birlikte bu proteinlerin, olgunlaşmamış ve konfigürasyonu bozuk proteinler olduğu ve özel protein konformasyonlarının sürdürülmesine katkıda buldukları düşünülmektedir¹³². Stres proteinleri bu etkilerini hipoksiye maruz kalan hücrede protein degradasyonunu ve fosfolipaz aktivasyonunu engellemek ve aşırı kalsiyumun hücre içine girmesini önlemek yoluyla gösterebilmektedir.

Domuz endotel hücrelerinde de hipoksinin total protein sentezini inhibe etmekle beraber seçici olarak bazı proteinlerin sentezini arttırdığı saptanmıştır¹³². Bu proteinlerden biri tropomiyozindir. Tropomiyozin özellikle aktin mikrofilamentlerinin ve stres liflerinin organizasyonunda düzenleyici bir rol oynamaktadır. Tropomiyozin sentezindeki artış pulmoner arter endotel hücrelerinin biçimlerinin sürdürülmesi, diğer hücrelere adezyonu ve hipoksinin destabilize edici etkisi altında hücrenin motilitesini devam ettirebilmesini sağlamaktadır. Ayrıca pulmoner arter endotel hücrelerinde çeşitli tropomiyozin izoformlarının varlığı, bunların hipoksi durumunda farklı işlevsel görevleri olabileceğini düşündürmektedir¹³².

İntraselüler serbest kalsiyum, endotel hücrelerinin fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli bir göreve sahiptir²¹. Endotel hücrelerinde kalsiyum homeostazı dinamik bir olaylar dizisidir³² ve büyük ölçüde plasmalemmadan kalsiyum girişi ile yürütülür. Endotel hücrelerinde düşük voltajla çalışan kalsiyum kanalları olduğuna inanılır. Temel olarak kalsiyumun endotel hücresi içine girişinin pasif bir olay olduğu düşünülmektedir²¹.

Parsiyel oksijen basıncındaki akut bir düşüş pulmoner arter düz kas hücrelerini depolarize eder. Bu hücrelerin depolarizasyonu, L tipi kalsiyum kanallarını aktive ederek hücre içi kalsiyum düzeyini arttırmaktadır¹⁵⁷. Endotel hücrelerinde de parsiyel oksijen basıncındaki akut düşme membran depolarizasyonuna neden olmaktadır. Bu hücrelerde depolarizasyonun hücre içi

kalsiyum düzeylerinin düşmesine neden olduğu belirlenmiştir. Oysa endotel hücrelerinde vazodilatör madde üretimleri kalsiyum bağımlı mekanizmalarla yürümektedir. Bu bulguya dayanarak, hipoksi boyunca hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin düşmesinin NO üretiminde azalmanın bir nedeni olabileceği öne sürülmektedir¹⁵⁷.

II.2.2.3. HIPOKSİNİN DÜZ KAS HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Hücrelerin birbirinden farklı olduğu görüşü bir arterin yapısının farklı hücre popülasyonlarından oluşmuş bir mozayik olduğunu ve bu popülasyonların hücreden hücreye fenotip ve fonksiyon açısından değişebileceğini göstermektedir. Hücre fonksiyonlarının farklılığı fizyoloji ve patofizyoloji açısından, vasküler segmentin proliferatif uyarılara vazodilatör ve vazokonstriktör maddelere verdiği yanıt açısından önemlidir. Bu durum hipoksi gibi bir uyarana karşı farklı damar yataklarında neden farklı yanıtlar alındığını da açıklamaktadır⁶.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, damar düz kas hücrelerinde fonksiyon ve morfoloji açısından segmentten segmente, hücreden hücreye birtakım farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Bu hem pulmoner hem de sistemik damarlar için sözkonusudur⁶. Fötal, yeni doğan ve yetişkin sığır pulmoner arter düz kas hücrelerinde sitoskeletal proteinlerin ekspresyonunun birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Bu pulmoner arter düz kas hücrelerinde 4 ayrı hücre popülasyonu saptanmıştır. Değerlendirme yapılırken hücre lokalizasyonu, morfolojik ve immunolojik kriterler göz önüne alınmıştır⁴¹. Pulmoner damar direncinin kontrolünde dar çaplı distal arterler geniş elastik pulmoner arterlere göre daha

önemli bir fonksiyona sahiptirler. Dar çaplı arterlerde hipoksinin hücrelerde Ca^{+2} düzeyini yükselttiği gösterilmiştir. Oysa geniş çaplı arterlerde bu gösterilememiştir¹⁶⁵. Son yıllarda yapılan çalışmalarda direnç arterlerde O_2 'ye duyarlı K^+ kanallarının olduğu ortaya konmuştur. Hipoksi bağımlı K^+ kanal inhibisyonunun ve/veya membran depolarizasyonunun sistemik arterlerde olmayışı sistemik dolaşımda neden HPV gelişmediğini açıklamaktadır¹³³.

II.2.2.3.A. Kalsiyum:

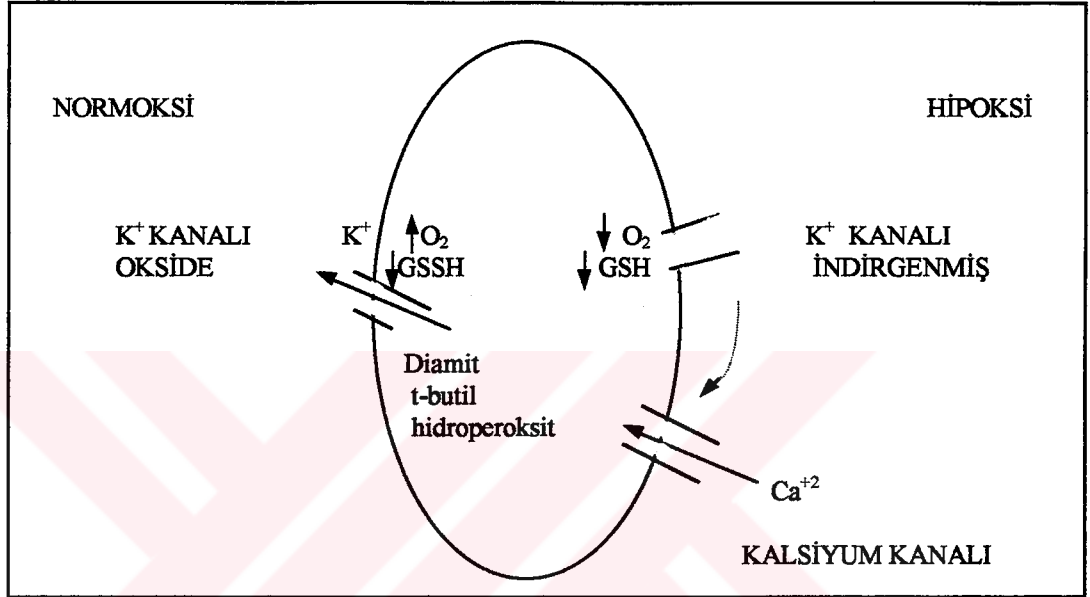
Sıçan pulmoner arterlerinde akut hipoksi, düz kas hücrelerine Ca^{+2} girişini arttırmaktadır¹⁴⁵. Bu artışın sıçan pulmoner arterinde voltaj bağımlı kalsiyum kanalları (VBKK) aracılığı ile olduğu belirlenmiştir. Cornfield ve arkadaşlarının fötal pulmoner arterlerde yaptıkları araştırma bunu doğrular niteliktedir²⁵. Bu bulgulara dayanarak araştırmacılar hipoksinin membran depolarizasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar verapamilin, pulmoner arter düz kas hücrelerinde hipoksiye bağlı Ca^{+2} artışını önlediğini belirlemişlerdir²⁵. Üstelik hipoksiye bağlı olarak hücrede oluşan Ca^{+2} düzeyinin artışı BAY K 8644 (VBKK'dan Ca^{+2} girişini kolaylaştıran bir madde) ile potansiyalize olmaktadır. Ancak VBKK blokörleri ile hücreye Ca^{+2} girişinin azaltılması vazokonstriksiyonu tamamen ortadan kaldırmamaktadır. Araştırmacılara göre bunun bir nedeni, bu deneylerde kullanılan verapamil konsantrasyonunun yüksek olması olasılığıdır. Çünkü yüksek doz VBKK blokörlerinin nonspesifik etkileri olduğu gösterilmiştir^{14,54}. Bir başka neden olarak da pulmoner damarlarda

$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{+2}$ değiş-tokuş mekanizmasının hipoksi boyunca etkinliğinin azalması ve bunun hücre içinde Ca^{+2} 'un yükselmesine katkıda bulunması önerilmiştir¹⁴⁵. Ca^{+2} 'un, Ca^{+2} sızdıran kanallardan giriyor olması da bir başka olasılık olarak değerlendirilmektedir¹²¹. Hipoksik vazokonstriksiyonun verapamil tarafından etkilenmediğini gösteren çalışmalar da vardır. İnsan ve koyun pulmoner arterlerinde Ca^{+2} girişinin engellenmesinin etkisi anlamlı bulunmamıştır^{31,32}. Köpek pulmoner arterlerinde ise pO_2 ' düşmesi sonucu oluşan vazokonstriksiyonda kafein ve ryanodine duyarlı sarkoplazmik kalsiyum kanallarından salınan Ca^{+2} 'nın önemli olduğu belirtilmektedir⁶⁸. Hoshio ve grubu⁵⁹ ise insan pulmoner arterlerinde hipoksik vazokonstriksiyonun VBKK blokajı ile ancak %30 oranında inhibe edilebildiğini göstermiştir⁵⁹. Bu sonuçlar vazokonstriksiyonun tamamen Ca^{+2} bağımlı bir mekanizma olmadığını vurgulamaktadır. Sıçan pulmoner arterlerinde ise hipoksik kasılmanın birinci fazı verapamilden ve kalsiyumsuz ortamdan etkilenmemekte ama bu durum ikinci fazı ortadan kaldırmaktadır. İkinci faz protein kinaz C inhibitörü olan H-7 ile de inhibe edilebilmektedir. Bu, ikinci fazın protein kinaz C bağımlı Ca^{+2} aracılıklı bir mekanizma ile gerçekteştiğini düşündürmektedir⁷⁰.

II.2.2.3.B. Potasyum:

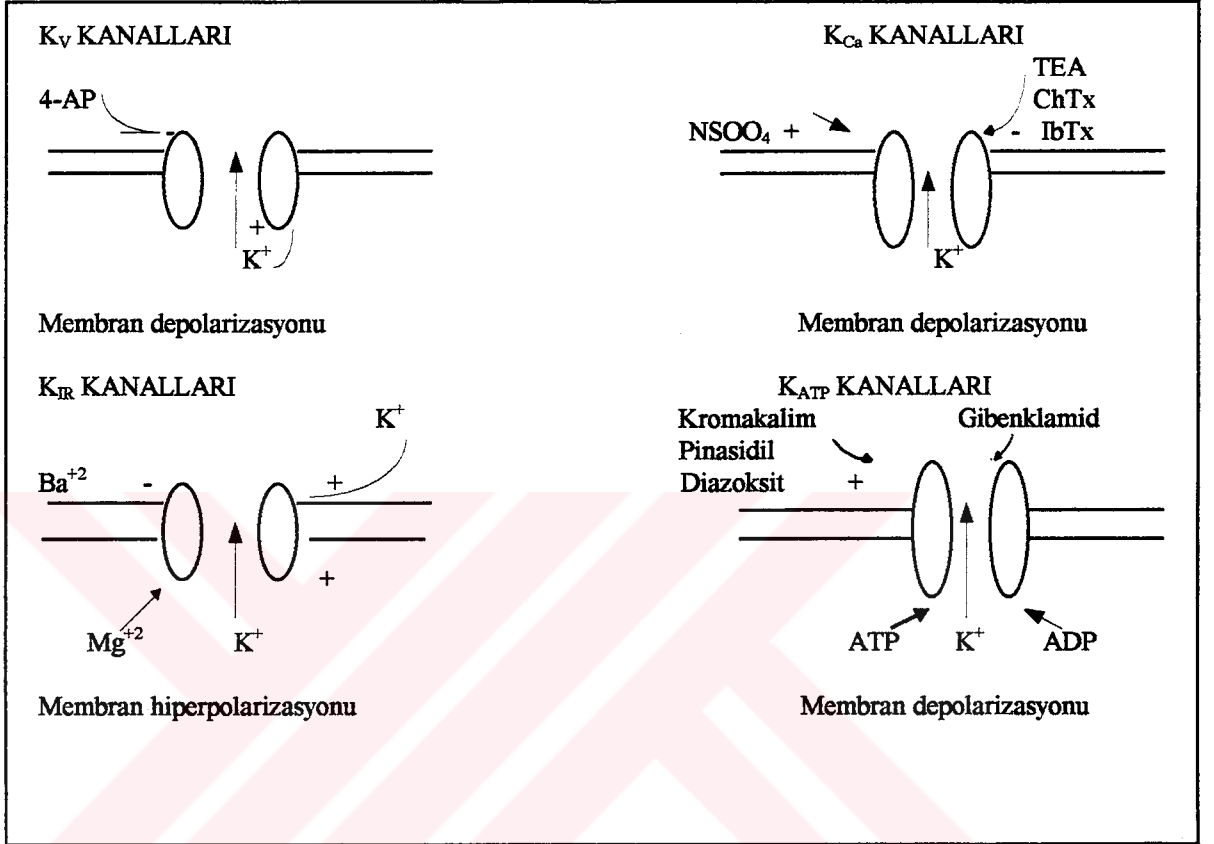
Arter düz kas hücresi membranında K^+ kanallarının açılması K^+ 'un hücre dışına akımını arttırmakta ve bu membranda hiperpolarizasyona neden

olmaktadır. Sonuçta voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları kapanmakta, Ca^{+2} girişi azalmakta ve vazodilatasyon gerçekleşmektedir¹⁸⁰ (Şekil 1).



Şekil 1: Pulmoner düz kas hücresinin hipoksiye yanıtında K^+ ve Ca^{++} kanallarının rolleri K^+ kanalının kapanması membran depolarizasyonuna ve voltaj bağımlı kapılardan Ca^{++} girişine neden olmaktadır. K^+ kanalları redoksa bağlı etkinlik göstermektedir. (indirgenmiş durumda kapalı, okside durumda açık). GSH: Glutatyon, GSSH: Okside glutatyon (Şekil 180 numaraları kaynaktan alınmıştır)

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada hipoksiye bağlı depolarizasyonda K^+ kanallarının rolüne dikkat çekilmektedir. Dinlenme membran potansiyelinin sürdürülmesi pek çok hücrede K^+ iyonu geçirgenliği ve dağılımı tarafından sağlanmaktadır. Hipoksinin pulmoner arter düz kas hücrelerinde depolarizasyona neden olduğu gösterilmiştir. Düz kas hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada hipoksinin elektriksel aktiviteyi artırdığı ve bu artışın Ca^{+2} 'dan bağımsız olduğu gösterilmiştir¹⁸³. Pulmoner arter düz kasında dört tip potasyum kanalı tanımlanmıştır: (Şekil 2)



Şekil 2 : K⁺ kanalları. 4-AP: 4-aminopiridin, TEA: tetraetilamonyum, ChTx: Karibbdotoksin, IbTx: İberitoksin. (Şekil 118 numaraları kaynaktan alınmıştır)

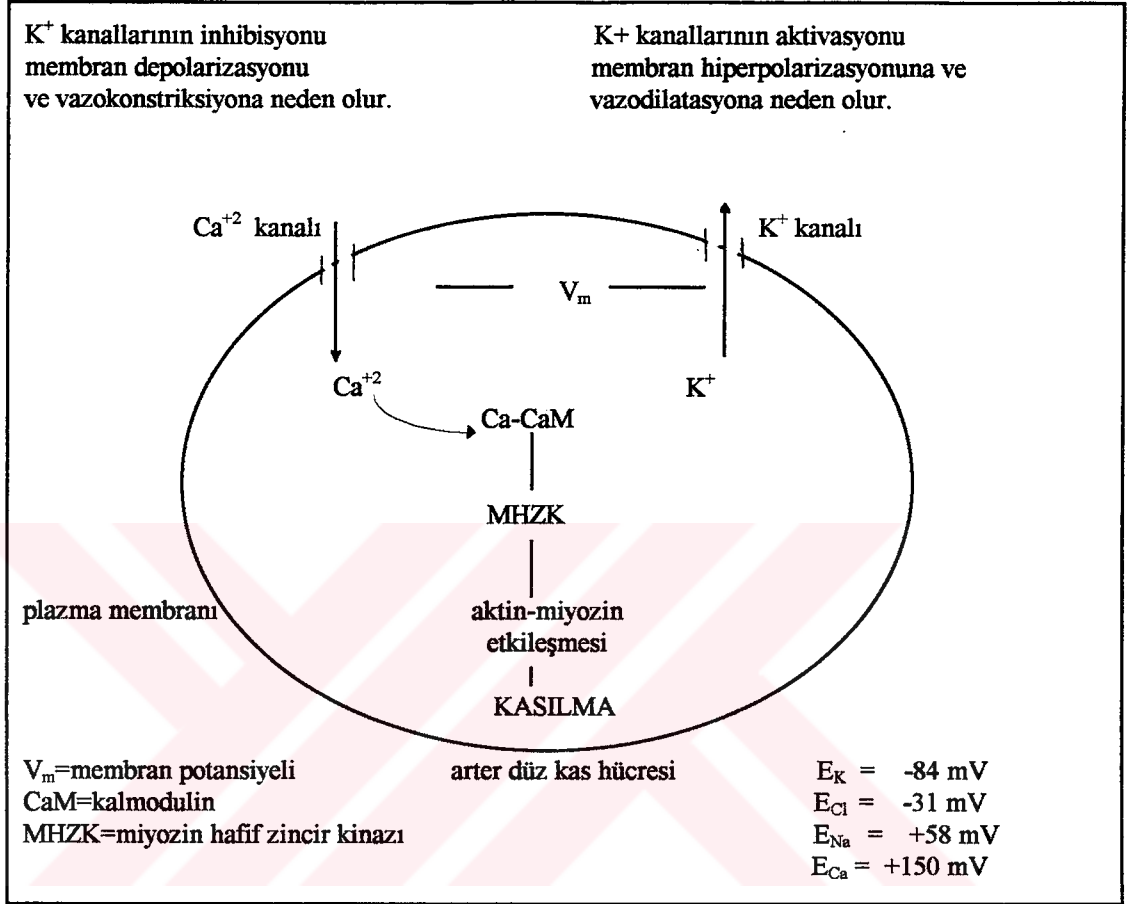
1. Voltaj bağımlı potasyum kanalları (K_v): Membran depolarize olduğu zaman açılırlar. Bu kanaldan K⁺ çıkışı voltaj bağımlı olarak artmaktadır. Çünkü depolarizasyon hücreden K⁺ çıkışı için gerekli elektrokimyasal sürücü gücü belirlemektedir.

2. Kalsiyum bağımlı potasyum kanalları(K_{Ca}): Hücre içi Ca⁺²'un yükselmesi ve membran depolarizasyonu ile aktive olurlar.

3. Inwardly rectified potasyum kanalları (K_{IR}): Bu kanallar K_v ve K_{ca} 'nın tersine hiperpolarizasyonla uyarılır. K_{IR} kanallarının aktivitesi ekstraselüler K^+ konsantrasyonu ve membran potansiyelinin fonksiyonudur.

4. ATP bağımlı potasyum kanalları (K_{ATP}): Hücre içi ATP'ye duyarlıdır. ATP düzeyi düştüğü zaman açılır. İlk kez kardiyak kasta tanımlanmıştır. K_{ATP} çok sayıda endojen vazodilatöre bağılı olarak oluşan metabolik değişikliklere yanıtta önemlidir.

Bu kanallar 4-aminopiridin (4-AP), tetraetil amonyum (TEA), akrep venomu, gliburit ile bloke edilebilir^{133,183}. İlk üçü izole akciğerde vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Hipoksiye bağılı olarak azalan K^+ akımı pulmoner arter düz kas hücrelerinde gösterilmiştir¹⁸³. Hipoksinin sistemik arterlerde K^+ akımını azaltmıyor olması^{133,183}, hipoksiye bağılı K^+ akım inhibisyonunun pulmoner arterlere özel olduğunu düşündürmektedir. Pulmoner damarların hipoksiye verdiği farklı yanıt (Şekil 3) HPV'yi açıklayabilecek ana mekanizmalardan biri olarak değerlendirilebilir.



Şekil 3 : Membran potansiyelinin düzenlenmesinde K⁺ kanallarının rolü. (Şekil 180 numaraları kaynaktan alınmıştır)

II.2.2.3.B.1.Hipoksiye aracılık eden membran depolarizasyonu: K⁺ akımının inhibisyonu membran depolarizasyonu ile sonuçlanmaktadır. Kedi dar çaplı pulmoner arterlerinde (<300 µM) mikroeletrotlar kullanılarak yapılan deneylerde hipoksi 51 ± 1.4 mV'dan -37 ± 2mV'a kadar depolarizasyona neden olmaktadır. Geniş çaplı pulmoner arterlerde (<500 µM) ise depolarizasyon gösterilememiştir. Hipoksinin oluşturduğu depolarizasyon Ca²⁺ bağımlı aksiyon potansiyelinin oluşmasına neden olmaktadır¹⁸⁰.

II.2.2.3.B.2. Oksijene bağımlı etkilerde K⁺ kanallarının rolü: Koroner damarlar gibi sistemik damar yataklarında hipoksiye bağımlı vazodilatasyona ATP bağımlı K⁺ kanalları aracılık etmektedir. Bu kanallar hücrenin ATP içeriği düştüğü zaman açılmakta ve böylece hiperpolarizasyon sağlanarak vazodilatasyon gerçekleşmektedir. Normoksik koşullarda K_{ATP} blokörleri (glibenklamit) pulmoner tonüsü arttırmamaktadır. Bu durum K⁺ akımının düşük tonüsün sürdürülmesine katılmadığını ve K_{ATP} inhibisyonunun HPV için bir sinyal oluşturmadığını göstermektedir. Ancak hipoksi uzadığı zaman ATP düzeyleri düşmekte ve pulmoner vazokonstriksiyon azalmaya başlamaktadır. Bu azalmanın glibenklamit ile önlenebildiği saptanmıştır¹⁸⁰. Bu ATP duyarlı K⁺ kanallarının hipoksinin geç döneminde açıldığını ve HPV'yi azalttığı sonucunu ortaya koymaktadır.

K_{ATP} kanallarından başka, diğer K⁺ kanalları da akıma izin verecek bazal düzeyde fosforilasyona uğrayabilir. Teorik olarak membran bağımlı ATP havuzunun tükenmesi K⁺ kanal fosforilasyonunu azaltmakta ve K⁺ kanal akımını düşürmektedir. Bununla birlikte HPV'nin hızlı başlangıcında (7s) ve hücre K⁺ akımının hipoksiye bağlı inhibisyonunda ATP tüketiminin kanal aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir mekanizma olmadığı da bulgular arasındadır¹⁸⁰

II.2.2.3.B.3. Pulmoner Arter Düz Kas Hücresinde K⁺ Akımının Hücresel Redoks Değişikliği ile Kontrolü: Redoks mekanizması pulmoner damar düz kas hücrelerinde K⁺ akımını etkileyebilmektedir. Diamit (glutasyonu okside eder) hücre K⁺ akımını arttırmaktadır. Oysa antioksidan bir madde olan N-asetil sistein aynı

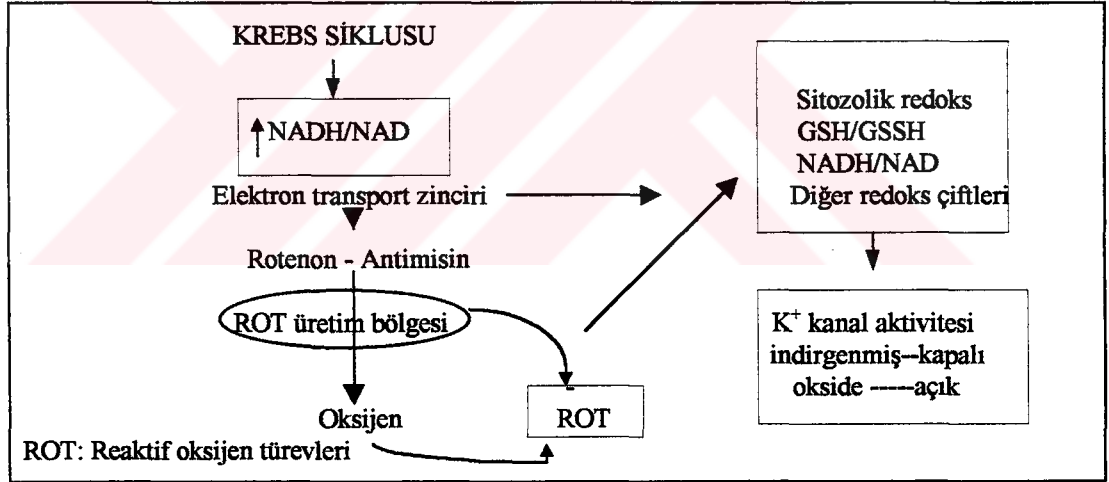
akımı düşürmektedir¹⁸⁰. Eksternal glutatyonun K^+ akımını inhibe ettiği GSH ile perfüze edilen düz kas hücrelerinde gösterilmiştir. Bu, redoks aktif maddelerin pulmoner arter düz kas hücresinde K^+ kanallarını etkileyerek pulmoner damar tonüsünü değiştirebileceğini göstermektedir. Örneğin, okside edici bir madde olan diamit, K^+ akımını arttırmasına bağlı olarak hiperpolarizasyon ve vazodilatasyona neden olmaktadır. Ancak ditionit tersine bir etki de göstermektedir. Güçlü bir indirgeyici olan ditionit, K^+ akımını azaltarak depolarizasyona neden olmaktadır.

Bu hem K_{Ca} hem de K_{IR} kanallarının hücrel redoks değişiminden etkilendiğini ortaya koymaktadır¹⁸⁰.

II.2.2.3.B.4.Hipoksinin Hücrel Redoksu Değişirmesi: Glikolitik yolak inhibitörleri 2DG (2 deoksiglikoz) ve iyodo asetat (oksidatif fosforilasyon inhibitörü) pulmoner vazokonstriktör olarak bilinirler^{141,154}. Bu inhibitörlerle hipoksinin ATP tüketimi arasında bir bağ olduğu düşünülmektedir. ATP azalması K_{ATP} kanallarını açarak vazodilatasyon gelişmesine neden olacaktır. Ancak hipoksiye bağlı olarak gelişen ATP tüketimi çabuk değildir. Bu nedenle kanal proteinlerinin fosforilasyonu yeterli hızda olmayabilir. Bununla birlikte, intraselüler ATP'nin hipoksida K^+ akımını arttırdığı da gösterilmiştir¹³³.

Metabolik inhibitörlerle, hipoksinin hücrel redoksu değişirmesi arasında bir bağ olması olasıdır. Karotit tip 1 hücrelerinde O_2 konsantrasyonunda azalmaya NAD(P)H/NAD(P) oranının artması eşlik etmektedir. Metabolik inhibitörler akciğerde de benzer etkinlik göstermektedirler¹⁸⁰. Akciğerde O_2

radikalleri normoksik koşullarda üretilmektedir. Aktive O_2 türevleri (O_2 radikalleri ve peroksit) artışı metabolik inhibitörlerle azaltılabilir⁵ Bunun sonucu olarak elektron akışının inhibisyonu elektron transportunu azaltmaktadır. Hipoksi gibi metabolik inhibitörler de (2-DG, rotenon, antimisin A) pulmoner arter düz kasında K^+ akımını inhibe etmektedir. Pulmoner arter düz kas hücrelerinde glutatyonun ve NADH'nın indirgenmesinin K^+ akımı üzerine etkilerine bakıldığında hipoksi ve metabolik inhibitörlerin bir ya da birkaç tip K^+ kanalının etkinliğini hücrel redoks değişikliği yoluyla etkileyebileceği olası görülmektedir¹⁸⁰(Şekil 4).



Şekil 4:Elektron transportunun hipoksi ve metabolik inhibitörler tarafından inhibisyonu NAD(P)H/NAD(P) ve GSH/GSSG oranlarını değiştiriyor ve bu, kanalın açılmasına neden olabiliyor. (Şekil 180 numaraları kaynaktan alınmıştır)

II.2.2.3.C. Sodyum pompası:

Parsiyel oksijen basıncında düşmenin düz kas hücrelerini depolarize ettiği ve bunun da Ca^{+2} homeostazını değiştirerek vazokonstriksiyona neden olduğu bilinmektedir²⁶. Hipoksinin neden olduğu depolarizasyon sodyum pompasının

işlevini de etkilemektedir. Oubain gibi sodyum pompasını inhibe eden ilaçların HPV'yi şiddetlendirdiği gösterilmiştir⁴⁸. Buna karşılık, sodyum pompasının (NaK ATPaz) artan aktivitesinin düz kasta aşırı duyarlılık gelişmesine neden olduğu bulgular arasındadır³⁸. Bu konudaki çalışmaların sonuçları birbiriyle çelişmektedir. Köpek pulmoner arterlerinde hipoksinin sodyum pompasını aktive ettiği gösterilmekle birlikte⁴⁸ tam tersi görüşte olan araştırmacılar da vardır⁶⁰.

II.3. G PROTEİNLERİ

Vasküler direncin düzenlenmesi, dolaşım homeostazının sürdürülebilmesi için önemlidir. Bu vasküler düz kasın kasılması ve gevşemesini sağlayan etkenler tarafından belirlenir. Kasılma fizyolojik koşullar altında hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin yükselmesi ve ATP'nin enerji kaynağı olarak kullanılmasıyla sağlanır³⁵. Pek çok fizyolojik ve farmakolojik mekanizma, damar direncinin düzenlenmesi olayına katılır. Bu noktada hücreye reseptör aracılıklı sinyalin iletimi önemlidir. G proteinleri reseptör aracılıklı sinyalin iletiminde rol oynayan ve bu yolla hücresel etkinliği düzenleyen proteinlerdir. Çeşitli hücre tiplerinde G proteinlerinin membrana bağlı pek çok reseptörle ve subselüler efektör sistemlerle kenetli olduğu bilinmektedir³⁷.

II. 3.1. G PROTEİNLERİNİN YAPISI

G proteinleri 3 alt birimden oluşmuştur: α , β ve γ . α alt birimi guanin nükleotidi ile bağlantılı olan bölgedir ve aktive olmamış durumda iken GDP ile bağlanmış durumdadır. 340-395 aminoasitten oluşmuştur. Amino terminalinde

$\beta\gamma$ alt birimlerinin bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Karboksi terminali ise reseptörle etkileşim açısından önemli olan bölgedir¹⁵². Yapılan araştırmalar α alt biriminde efektör etkileşiminin karboksi terminalinde olduğu şeklindedir. α alt biriminde ayrıca intrinsik GTPaz etkinliğini düzenleyen bir bölge vardır. GDP bağlı durumda iken α alt birimi inaktiftir. Uyarı bu birimde yapısal bir değişikliğe yol açmakta ve bu durumda GDP'nin yerini GTP almaktadır¹⁵². β alt birimi 340 amino asitten, γ alt birimi ise 70 amino asitten oluşmuştur. α ile birlikte $\beta\gamma$ heterodimer yapısı reseptör-G proteini bağlanmasında önemli rol oynar¹⁵².

G proteinlerinin α alt birimleri bakteriyel toksinler tarafından kovalan modifikasyona uğrayabilecek bölgeler içermektedir. Bu toksinler NAD bağımlı ADP ribozil transferaz reaksiyonlarını kataliz etmektedirler. Bu durum G proteinlerinde fonksiyonel değişime neden olmaktadır¹¹². Kolera toksini (CTX), ADP ribozilasyonu ile G_s proteinin α alt biriminde arjinin residüsünü etkileyerek GTPaz aktivitesini inhibe etmekte ve G proteinin kalıcı aktivasyonuna neden olmaktadır. Pertusis toksini (PTX), ADP ribozilasyonu ile G_i ve G_o 'ın α alt birimindeki sistein rezidüsünü etkileyerek bu G proteinlerinin inaktivasyonuna neden olmaktadır³⁷.

II.3. 2. RESEPTÖR AKTİVASYONU - G PROTEİNİ İLİŞKİSİ

İnaktif G proteinleri heterotrimer ($\alpha\beta\gamma$) bir yapı içerir ve α alt ünitesine GDP bağlıdır. Reseptörün aktivasyonu kısa bir süre içinde G proteini ile

reseptörün kenetlenmesini sağlar. Bu GDP nin , GTP ile değişimini katalize eder. GTP'nin bağlanması ise α altbirimini aktive eder. Bu durumda $\beta\gamma$ heterodimeri ayrılır. Aktive olmuş α alt biriminin deaktivasyonuna yol açar. α alt birimi $\beta\gamma$ alt birimi ile yeniden bağlanır. Siklus yeni bir uyarımla bu şekilde devam eder¹⁵². Siklus sırasında sinyal iletimi yapılırken, aynı zamanda sinyal amplifiye de edebilir. Agonist molekülün aktive ettiği bir tek reseptör bir çok G proteini molekülünü amplifiye eder. Aktive olan bu G proteinleri de pek çok fizyolojik makromolekülü etkileyebilmektedir. G proteinlerine bağlı reseptörler agoniste yüksek afinite göstermektedirler. Guanin nükleotidi ile bağlanma, G proteinlerinin reseptörden ayrılmasına ve reseptörün agoniste afinitesinin azalmasına neden olmaktadır¹⁵².

Pek çok G proteini tanımlanmıştır. Örneğin G_s adenilat siklaz ve Ca^{+2} kanallarını stimüle eder. G_i ($G_{i-1}, G_{i-2}, G_{i-3}$) adenilat siklaz ve K^+ kanallarının, G_o ise Ca^{+2} kanallarının inhibisyonuna neden olmaktadır. G_z ise fosfolipaz aktivasyonunu sağlamaktadır³⁷.

II.3.3. G PROTEİNLERİNİN İŞLEVLERİ

Vazodilatasyon olayı kan basıncı ve kan akımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle vasküler düz kas hücrelerinde Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişiklikler önemlidir³⁵. Siklik nükleotitler hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin kontrolünde görevi olan ikinci habercilerdir. İkinci haberciler hücresel işlevlerin düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptirler ve etkinliklerini protein kinazlar aracılığı ile göstermektedirler¹⁶⁰. Protein kinazlar bir başka proteine

ATP'den fosfat grubu transfer eden enzimlerdir. Bu şekilde hücre sel yanıt oluşumuna katılmaktadır.

Yoğun olarak üzerinde çalışılan siklik nükleotidlerden birisi sAMP'dir ve özellikle β adrenoseptörlere bağlı tonüs düzenlenmesine katılmaktadır¹⁰². sAMP gibi sGMP de bazı protein kinazları aktive etmektedir⁹⁸. Hücrede sGMP düzeylerinin yükselmesi hücre içi Ca^{+2} düzeyini düşürür. Ancak bütün bu olayların gerçekleşmesi için uyarının hücre içine iletilmesi gerekmektedir. G proteinlerinin görevi bu noktada başlamaktadır.

G proteini ile kenetlenen reseptörler üzerinde oluşan sinyalin hücre içine iletimini sağlayan makromoleküller şu şekilde sıralanabilir:

- a. Adenilat siklaz: ATP'yi yıkarak ikinci ulak olarak sAMP'yi oluşturur.
- b. Fosfolipaz C (PLC): Fosfoinozid hidrolizi yaparak ikinci ulak olarak inositol trifosfat ve diaçil gliserol (DAG) oluşturur. Böylece hücre içi Ca^{+2} düzeyleri yükseltilir.
- c. K^{+} kanalları: K^{+} iletiminin artması efektör hücrelerde inhibisyon yapar.
- d. Ca^{+2} kanalları: α reseptörlerle bağlantılıdır.

II.3.4. G PROTEİNLERİ VE VASKÜLER YANITLAR

Vasküler tonüsün düzenlenmesinde endotel hücrelerinin rolü büyüktür. Endotel hücrelerinde fizyolojik ve farmakolojik uyarılara yanıtta G proteinlerinin aracılığı değerlendirilmiştir. ³²[-P]NAD, ³²[-P]ADP kullanılarak

endotel hücre membranında PTX'e duyarlı G proteinlerinin olduğu gösterilmiştir⁹¹. Endotel hücrelerinde CTX'in β adrenoseptörlere bağlı olarak adenilat siklazı aktive etmesi, G_s 'nin de endotel hücrelerinde bulunabileceğini düşündürmektedir¹⁷¹.

Kan basıncının yükselmesi perifik direncin artmasına bağlıdır. Bunun sonucu damarlarda yapısal ve işlevsel değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu durum, endotel hücrelerinin işlevlerinde bozukluklara, Ca^{+2} hareketinde anormalliklere, miyozin hafif zincir kinazının Ca^{+2} 'a duyarlılığının değişmesine ve PLC aktivitesinde değişiklikler gelişmesine neden olmaktadır. Bütün bu değişimler yanında G proteinlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar, 5-HT, AII, arginin-vazopressin (AVP) ve α reseptörlerin yoğunluğunda ve duyarlılığında artma meydana gelmektedir³⁹. Genellikle G proteinleri ile kenetli bu reseptörlerinin uyarımını fosfolipaz aracılıklı ikinci ulaklar olan IP_3 ve DAG oluşumu yoluyla gerçekleşmektedir. IP_3 ve DAG'ın intraselüler Ca^{+2} düzeylerini yükselterek kontraktıl etki oluşturduğu kabul edilmektedir¹⁷³. Pek çok durumda buna arakidonik asit salınımı da eşlik etmektedir¹⁶. Ancak G proteini aracılıklı kontraktıl etki gösteren agonistlerin bu etkilerini kısmen de olsa reseptöre bağlı olmayan bir tirozin kinaz stimulasyonu ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir⁹⁰.

Vasküler düz kasta G proteinlerine bağlı reseptör uyarımının mekanizması ve sinyal iletimi pek çok araştırmanın konusu olmuştur. G proteinleri pek çok reseptörle bağlantılıdır¹⁶³. Bu reseptörlerden α_2 reseptörler PTX'e duyarlı G proteinleri aracılığı ile voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının işlevlerinin

düzenlenmesine katılmaktadır¹⁶³. Bir in vivo çalışmada CTX'e duyarlı G proteinlerinin α_1 aracılıklı kontraksiyona katıldıkları ve α_1 reseptörlerinin Ca^{+2} kanalları ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir¹⁶³. Bu konudaki çalışmanın bulguları birbiriyle uyumlu değildir. Vasküler düz kasta Ca^{+2} kanallarının α_1 reseptörler ile kenetli olduğu ve burada kanal aktivitesinin düzenlenmesinde PTX'e duyarlı G proteinlerinin aracılığını vurgulayan araştırmalar da vardır¹³⁶. Sıçan kuyruk arteri düz kasında ise hem α_1 hem de α_2 reseptörlerinin rolleri olduğu sanılmaktadır.

TXA₂, PAF ve lökotrienlerin reseptörlerinin G proteinleri ile kenetli olduğu gösterilmiştir¹⁸. Burada PAF'a bağlı değişikliklerde, etkiye G proteinlerinin aracılığı söz konusudur¹⁶³. Anesteziye domuzlarda pulmoner hemodinamik değişikliklerde PAF'ın neden olduğu bu etkiye aracılık eden G proteinlerinin PTX'e duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak kalıcı hemodinamik etkilerin PTX'e duyarsız bir mekanizma ile gerçekleştiği önerilmektedir. Bu mekanizmanın G proteinlerinden tamamen bağımsız bir mekanizma olabileceği de düşünülmektedir¹²⁵.

Adenozin, hücre yüzeyinde A₁ ve A₂ reseptörleri aracılığı ile pek çok fizyolojik olaya katılan modülatör bir maddedir. Adenozin reseptörlerinden A₁ in uyarılması adenilat siklazı G_i aracılığı ile inhibe ederken, A₂, G_s aracılığı ile aktive etmektedir¹⁵⁸. İnsan koroner arterlerinde adenozin reseptörlerinin CTX ve PTX'e duyarlı G proteinleri aracılığı ile gevşeme sağladığı bilinmektedir¹⁴². Domuz koroner arterlerinde de adenozin reseptör agonistleri hem PTX hem de CTX'e duyarlı G proteini aracılığı ile etki göstermektedir. Bununla birlikte CTX'e duyarlı

G proteinlerinin adenzin reseptör uyarımına bağlı gevşeme yanıtına daha spesifik olarak katıldığı görülmüştür⁶².

G proteinleri adenilat siklaz aktivitesini regüle etme görevinden başka PLC ve PLA₂ regülasyonunda ve iyon kanallarının işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadırlar.

Pek çok dokuda G proteinleri muskarinik reseptör uyarımına bağlı yanıtla aracılık eder. İzole damarlarda muskarinik agonistler doğrudan düz kası etkileyerek kontraksiyona neden olurlar. Endotel hücrelerinde ise EDRF salınımına neden olurlar⁴⁰. Her iki olay da Ca⁺² bağımlıdır. Tavşan pulmoner arter düz kas hücrelerinde muskarinik, α adrenoseptör ve 5-HT reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak Ca⁺² influksında artışın PTX'e duyarlı G proteinleri aracılığı ile olduğu gösterilmiştir⁵⁶. Pulmoner arter endotel hücrelerinde ise muskarinik, purinerjik ve P maddesi reseptörlerinin uyarımı ile endotelden gevşetici faktörlerin salınımı PTX'e duyarlı bir başka mekanizma aracılığı ile gerçekleşmektedir¹¹⁶.

G proteinleri K⁺ kanallarına bağlı sinyal iletimine de aracılık etmektedir¹⁴⁹. Ach muskarinik reseptörlerle kenetli spesifik G proteinleri aracılığı ile K⁺ kanal aktivitesinde artışa neden olmaktadır¹¹⁷. Ancak Ach, A23187, histamin gibi endotel bağımlı etki gösteren agonistlerin PTX'e duyarlı G proteinleri ile ilişkisi olmadığını gösteren bulgular da vardır¹. Vasküler fizyoloji ile ilgili araştırmalarda koroner mikrovasküler sirkülasyonunun düzenlenmesinde ATP'ye

duyarlı K^+ kanallarının önemi bilinmektedir ve bu kanalların aktivitesi intraselüler ATP düzeyleri tarafından düzenlenmektedir⁸. ATP bağımlı K^+ kanal işlevlerinin düzenlenmesine G proteinleri de katılmaktadır. Kardiyak miyositlerde G_i , ATP duyarlı K^+ kanallarının açılmasına aracılık etmektedir⁸². Köpeklerde yapılan bir çalışmada koroner mikrovasküler otonöregülasyonda ve iskemi sırasında PTX'e duyarlı G proteinlerinin rolünün önemli olduğu vurgulanmıştır⁸³

II.4. İKİNCİ HABERCİLER

II.4.1. SIKLIK NÜKLEOTİTLER

Pulmoner tonüsün düzenlenmesinde siklik nükleotitlerin önemli bir rolü vardır. sGMP, NO aracılıklı pulmoner vazodilatasyonda anahtar rolü olan bir ikinci habercidir. sAMP de pek çok doğrudan etkili vazodilatörün (β -reseptör agonistleri, PGI_2 , CGRP, VIP) etkinliğinde önemli bir göreve sahiptir. Eksojen sAMP ve sGMP'nin çok potent oldukları saptanmıştır^{53, 109}. sGMP bağımlı vazodilatasyonun mekanizması henüz tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte sGMP bağımlı kinazların aktivasyonu, IP_3 inhibisyonu, miyozin hafif zincir kinazının (MHZK) fosforilasyonu, Ca-ATPaz stimülasyonu, K^+ kanallarının açılması ve Ca^{+2} 'un hücre içine girmesinin inhibisyonuna bağlı görülmektedir⁹⁶. sAMP bağımlı PK aktivasyonu MHZK aktivitesinin azalmasıyla sonuçlanmakta miyozin fosforilasyonu buna bağlı olarak azaltılmakta, Ca^{+2} un hücre içine girmesi inhibe olmaktadır. Ca^{+2} 'un hücre dışına çıkmasının stimülasyonu K^+_{Ca} kanallarının açılmasını sağlamaktadır. sGMP degradasyonunun sGMP'ye özel (tip V) fosfodiesteraz (PDE) inhibitörleriyle inhibe edilmesi perfüze pulmoner damar

yatağında perfüzyon basıncını da düşürmektedir. Endoteli kazınmış izole pulmoner damarlarda bazal düzeyde sGMP bulunmaktadır⁶⁷. Hem sAMP hem de sGMP HPV'yi modüle etmektedir. sAMP ve sGMP oluşumunun stimülasyonu, albumine karşı pulmoner damarlarda endotel hücrelerinin permeabilitesini azaltmakta ve pulmoner ödem gelişimini inhibe etmektedir⁵¹. Bu durum, sAMP ve sGMP'nin akciğer dokusu harabiyetinde koruyucu bir faktör olarak değerlendirilebileceğini vurgulamaktadır.

II.4.2. FOSFOİNOZİD HİDROLİZİ

G proteinlerine bağlı reseptör stimülasyonu sonucu fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu ile fosfoinositol bifosfat hidrolize olmakta, bu da ikinci habercilerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu haberciler inositoltrifosfat (IP₃) ve diasilgliseroldür (1,2 DAG). IP₃ intraselüler depolardan Ca⁺² salınımına neden olmakta ve bu olayı Ca⁺²/kalmodulin bağımlı miyozin hafif zincir kinazı (MHZK) aktivasyonu izlemektedir. Sonuçta düz kas kasılmaktadır¹⁶. Oysa DAG, PKC'yi aktive ederek hücre içi Ca⁺² düzeylerinin yükselmesine neden olur. Pek çok hümmoral madde ve mediyatör pulmoner tonüsü G proteinlerine bağlı reseptörleri etkileyerek değiştirmektedir¹⁸. İzole pulmoner arterlerde IP₃ oluşumunun hipoksiye bağılı olarak değil de noradrenaline bağılı olarak arttığının gösterilmiş olması, IP₃'ün HPV'ye katılmadığını düşündürmektedir⁷¹.

II.4.3. PROTEİN KİNAZLAR

Protein kinazlar pek çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. sAMP ve sGMP bağımlı protein kinazlar pulmoner damarların gevşemesine katılmaktadırlar. PKC ise, DAG tarafından aktive edilmekte ve düz kasta yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır⁷⁷. PKC sinyal iletimine ve pulmoner damar düz kasının uyarım-kasılma olayına katılmakta ve düz kas kasılmasına katılan substratların fosforilasyonunu sağlamaktadır. PKC aktivasyonunun insan ve sıçan izole pulmoner arterlerinde kasılma¹²⁷ oluşturduğu, perfüze pulmoner damar yatağında ise pulmoner perfüzyon basıncını arttırdığı saptanmıştır¹¹¹. PKC aktivasyonu sıçır pulmoner arter endotel hücrelerinde albumin permeabilitesini de arttırmakta ve izoproterenole bağı sAMP oluşumunu inhibe etmektedir¹¹⁹. Bütün bu faktörler pulmoner ödem gelişimine yardımcı olmaktadır⁷³.

II.5. TIROZİN KİNAZ ARACILIKLI SİNYAL İLETİMİ VE DÜZ KAS KASILMASI

II.5.1. DAMAR DÜZ KASININ KASILMASI

Hem düz kas hem de çizgili kas hücrelerinde hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyleri kasılma ya da gevşemeyi başlatan temel olaydır. Düz kas hücresinde Ca^{+2} kalmoduline bağlanır ve bu kompleks, miyozin hafif zincir kinazını (MHZK) aktive ederek miyozin hafif zincirinin (MHZ) fosforilasyonuna neden olur. Bu fosforilasyon aktinin miyozin ATPazı aktive etmesine ve düz kasın kasılmasına neden olur. MHZK'na ek olarak kalmodulin kinaz II de MHZ₂₀'nin 19. serinini

fosforile eder. Ancak bu çok yavaştır ($1/20 V_{\max \text{ MHZK}}$). Bu olayın kasılmanın başlamasına katılmadığı düşünülmektedir¹⁵³. Ca^{+2} düzeyinin düşmesi MHZK'nı inaktive eder ve MHZ₂₀'nin miyozin hafif zincir fosfataz tarafından defosforile olmasına neden olur. Böylece aktomyozin ATPaz deaktivasyonu ile gevşeme oluşur. Bu olayda önemli olan bir nokta son yıllarda Ca^{+2} 'dan bağımsız fosforilasyon/defosforilasyon yapıcı enzimlerin düzenleyici mekanizmaya katıldıklarının belirlenmesidir¹⁵³.

Kaldesmon, kalponin gibi ince filament-eşlikli proteinler tarafından kasılmanın düzenlenmesinin, mitojenle aktive olan kinaz (MAP) ya da diğer kinazların fosforilasyonu sağlaması ile gerçekleştiği düşünülmektedir. İnce filament eşlikli proteinler miyozin fosforilasyonunun etkisini modüle etmektedir. Bunun da tek başına kasılmayı başlatmak ve sürdürmek için yeterli olabileceği öne sürülmektedir¹⁵³.

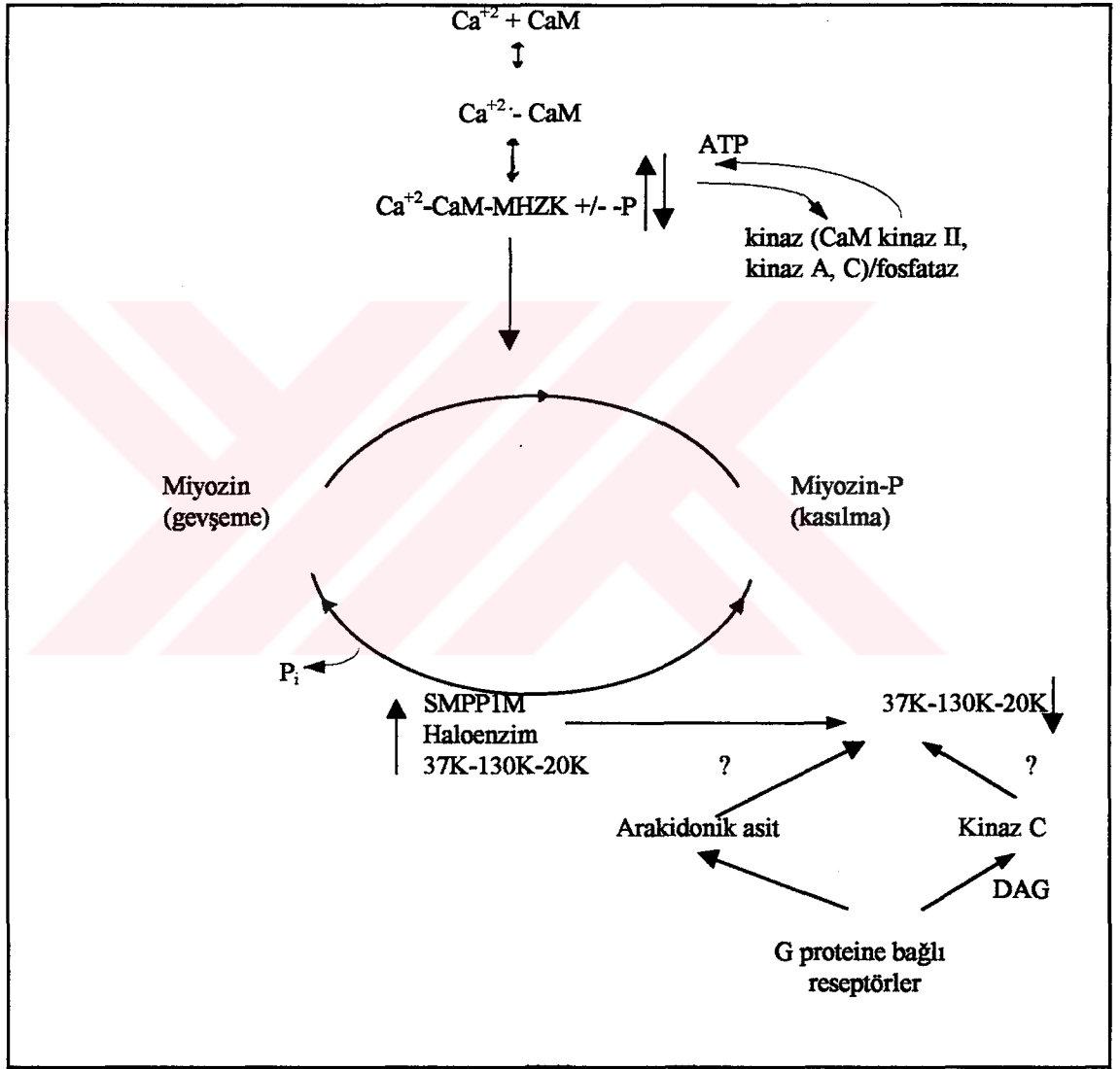
Elektromekanik, olaylar membran potansiyeli değişiklikleri ve bu değişikliklerin sitoplazmik Ca^{+2} üzerine etkisini yönetmektedir. Düz kas hücrelerinin dinlenme membran potansiyeli diğer hücrelerde olduğu gibi negatiftir. Hücrenin depolarize olması voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının açılmasına neden olmaktadır. Ca^{+2} 'un hücre içinde yükselmesi kasılma için bir tetiktir¹⁵³. Depolarizasyon bağımlı Ca^{+2} artışı kısmen voltaj bağımlı kapılardan giren Ca^{+2} , kısmen de sarkoplazmik retikulumdan (SR) salınan Ca^{+2} 'a bağlıdır. Membranın

potansiyelinin negatifleşmesi aksiyon potansiyelinin inhibisyonuna ve voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının kapanmasına neden olmaktadır.

Düz kasın plazma membranı çok sayıda iyon kanalı içerir. Bu iyon kanallarından bazılarının işlevleri yalnızca membran potansiyeli, hormonların doğrudan etkileri ve nörotransmitterler tarafından değil, çeşitli agonistlere bağlı olarak oluşan ikinci habercilere bağlı olarak da düzenlenir. Böylece Ca^{+2} 'un SR'den salınımı K_{Ca} kanallarını ve Cl^- kanallarını aktive eder¹⁰⁷. Bu iyonların dinlenme potansiyelleri birbirinden çok farklıdır. Bu da agonistlerin değişken elektrofizyolojik etkilerine bağlanabilir. K_{Ca} kanallarının açılması hiperpolarizasyona, kalsiyum kanallarının açılması depolarizasyona neden olabilir. Benzer bir şekilde eksitatuvar agonistler tarafından salınan arakidonik asit de K^+ kanal aktivitesini modüle edebilir ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından kalsiyum girişini inhibe edebilir. Ligant bağlı kanallar agonistler tarafından doğrudan modüle edilebilirler ama bu nonselektiftir. Bu kanallardan Ca^{+2} girişi uyarı-kasılma olayına anlamlı bir katılımda bulunmayabilir. Bununla birlikte depolarizasyona bağlı olarak açılan ligant aracılıklı kanallar voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarından anlamlı bir Ca^{+2} girişine neden olmaktadır¹⁵³(Şekil 5).

Farmakomekanik olaylar fizyolojik olarak çok önemlidir. Uyarı kasılma-olayının mekanizması çok sayıda hücrel sinyal ileti mekanizması tarafından yönetilir. Bu membran potansiyelinde gerekli değişiklikler olmadan da gerçekleşebilir (Şekil 5). Farmakomekanik olayların majör mekanizması IP_3

tarafından yapılan Ca^{+2} salınımıdır. IP_3 oluşumu fosfoinositol hidrolizi tarafından ve MHZ_{20} fosforilasyonunun Ca^{+2} duyarlılığını modüle etmesi ile oluşturulur¹⁵³(Şekil 5)



Şekil 5 :Uyarı-kasılma olayının elektromekanik ve farmakomekanik yolağı. Şeklin sol tarafı kasılmamanın sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlı olarak yürüten kısmıdır. Sağ tarafta ise yine Ca^{+2} 'a bağlı olarak ve MHZK'nin fosforilasyonunun aktivasyonu ya da inhibisyonuyla sonuçlanan olaylar gösterilmiştir. (Şekil 57 numaraları kaynaktan alınmıştır)

II.5.2. PROTEİN TİROZİN FOSFORİLYASYONU VE DÜZ KAS KASILMASI

Tirozin kinazların hücre sel sinyal iletim yolağının anahtar elemanı olabileceği görüŖüne dayanan çalışmalar 1980 yılında bařlamıřtır⁵⁷. Tirozin kinaz yolağı dokunun kontraksiyonunun kontrolü, gen transkripsiyonu, hücre bölünmesi gibi olayların düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Tirozin kinazlar üç grup olarak sınıflandırılmaktadır⁵⁷:

1. Membran tirozin kinazları (insülin reseptörü ve epitelial büyüme faktörü (EGF) için olan reseptörler)
2. Sitolitik (non-reseptör) tirozin kinazlar (protoonkojen ürünleri egt, Fes)
3. Membran bağımlı (non-reseptör) tirozin kinazlar (en az 8 izoenzim)

Tirozin kinazlar için çok sayıda substrat belirlenmiştir. PLC α ve MAP β 'ın tirozin kinazın sinyal iletimine doğrudan katıldıklarına inanılmaktadır⁵⁷. Bununla birlikte intakt memeli hücre sisteminde spesifik sinyal iletimine hangi tirozin kinazların katıldığı henüz tam olarak belirlenememiştir.

Düz kasın kasılmasında protein tirozin fosforilasyonunun rolü, büyüme faktörleri ve PTK bağımlı olarak gösterilmiştir. Büyüme faktörleri reseptörlerinin intrinsik PTK aktivitesine sahip olduklarına ve bunun hücre büyümesi ve proliferasyonuna katıldığına inanılmaktadır. Bundan başka AII, AVP, ET gibi vazokonstriktör maddelerin vasküler düz kasta büyüme faktörleri gibi etki gösterdiği ve çeşitli endojen proteinlerin tirozin fosforilasyonunu stimüle ettiği bilinmektedir⁵⁷.

G proteinlerine bağlanarak etki gösteren agonistler (AII,VP...) heterotrimetrik α_x , β_y , γ_z G proteini kompleksinin aktivasyonu aracılığı ile etkilerini oluştururlar. Aktive olan α , β ve γ alt birimlerinin hedefi sAMP bağımlı PKA ve PLC'nin inozite spesifik β izoformudur. DAG ve IP_3 gibi hücre içi ulaklar PLC aktivitesi sonucu oluşurlar. Burada serin/treonin fosforilasyon kaskadının stimülasyonu ve PKC/ Ca^{+2} uyarımı ile eşgüdümlüdür. Sonuçta IP_3 aracılığı ile hücre içi Ca^{+2} düzeyi yükselir. Yükselen hücre içi Ca^{+2} 'un Ca^{+2} kanallarını modüle etmesi Ca^{+2} -kalmazdulin kinaz yolağını stimüle edecektir⁵⁷.

G proteini aracılığı ile etki gösteren agonistlerin hücrede serin/treonin fosforilasyonunu arttırmaları yanında AII, VP, BK, ET gibi G proteini aracılığı ile etki gösteren agonistlerin pek çok substratın tirozin fosforilasyonunu arttırması hücre kültürü çalışmalarıyla gösterilmiştir⁵⁸.

II.5.3. DAMAR DÜZ KAS HÜCRESİNDE Ca^{+2} GİRİŞİ VE DEPOLANMASINDA TİROZİN KİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ

Bir uyarıya bağlı olarak ekstraselüler ortamdan Ca^{+2} girişinin intraselüler Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} serbestlenmesine neden olduğu kabul edilmektedir. SR'deki düzeyler ryanodin, tapsigargin, siklopazonik asit gibi maddelerle modüle edilebilmektedir. Ca^{+2} salınımının aktivasyonu için plazma

membranı ve SR arasındaki “cross-talk”ın tam mekanizması henüz bilinmemektedir. Ancak plazma membranı ile SR arasındaki iletişimi sağlayan ulağın “Ca influx factor” (CIF) olarak tanımlaması yapılmıştır¹³⁵.

Sitokrom P-450 sistemi, Ca^{+2} depoları ve plazma membranı arasındaki bağı kurmak için incelenmiştir. Sitokrom P-450’yi inhibe eden ekonazol ve ketokanazol gibi maddeler Ca^{+2} depolarının boşalması ile oluşan Ca^{+2} influksını bloke etmektedir². Ancak daha sonra ekonazolün P-450’yi inhibe etmekten çok plazma membran Ca^{+2} kanalları ile etkileşime girerek depolardan Ca^{+2} influksını etkilediği belirlenmiştir¹⁷⁰.

Ca^{+2} girişinin ve intraselüler depolardan Ca^{+2} boşalmasının düzenleyicisi olarak tirozin kinazın rolüne ilişkin ikna edici kanıtlar bulunmaktadır¹⁶⁹. Vostal ve arkadaşlarının çalışmalarına göre, trombinin neden olduğu sitozolik Ca^{+2} düzeylerinin yükselmesine trombositlerde tirozin fosforilasyonu neden olmaktadır. Sitozolik Ca^{+2} ’un şelasyonu, trombine bağlı tirozin fosforilasyonunu azaltmaktadır. Bu gözleme dayanarak sitozolik ve depolanmış Ca^{+2} ’un tirozin kinaz aktivitesini kontrol edip, hücreye Ca^{+2} girişi için tirozin fosforilasyonunu arttırdıkları sonucuna varılabilir. Bu sonucu destekleyen bir başka çalışmada araştırmacılar, fosfoinozitol fosfataz aktivitesinin inhibitörü olan pervanadatla ekstraselüler Ca^{+2} ’a bağlı olarak düz kas kasılmasının gerçekleştiğini göstermişlerdir⁸⁸. Tirozin kinaz fosfatazın inhibisyonu tirozin kinaz aktivitesini arttırmakta ve düz kas kasılması için gerekli Ca^{+2} girişini kolaylaştırmaktadır.

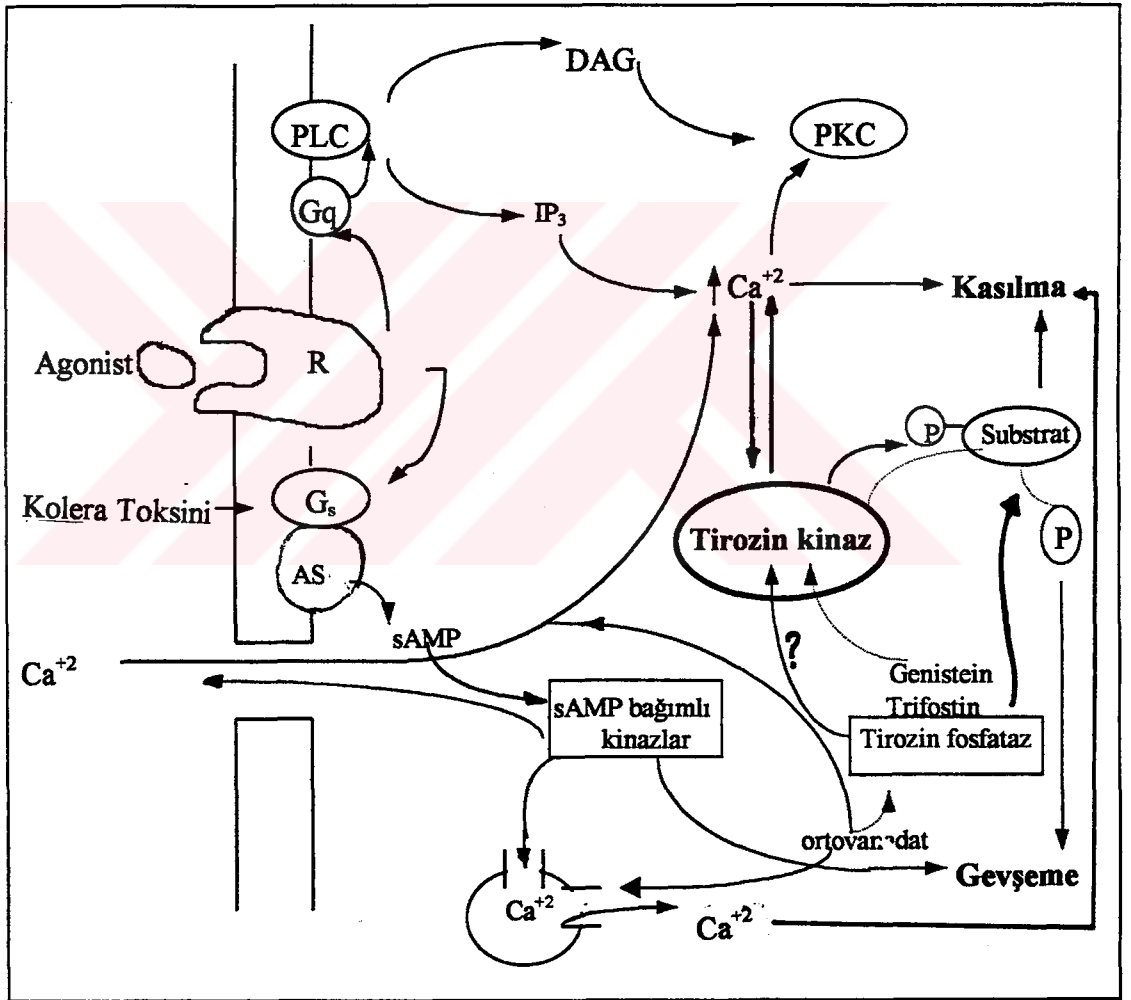
Tirozin kinaz inhibitörleri genistein ve trifostin ile agonist ve tapsigarginle uyarılmış Ca^{+2} girişinin inhibisyonu, trombosit ve fibroblastlarda gösterilmiştir^{92, 148}. AII ile karaciğer epitel hücrelerinin stimülasyonu, bazı proteinlerin fosfotirozin içeriğinde artışa neden olmuştur. SR'da Ca^{+2} pompasının inhibitörü olan Ca^{+2} ionofor ve tapsigarginle sitozolik Ca^{+2} 'un yükselmesi de tirozin fosforilasyonunda artmaya neden olmaktadır⁶¹.

Düz kas hücresinde karbakol ve NA'nın neden olduğu kasılma tirozin kinaz inhibitörleri ile antagonize edilebilmektedir. Trifostin ve genisteinin etkisi endotelden bağımsız bulunmuştur. Bazı çalışmalarda, genistein ve trifostinin VBKK inhibisyonu yaptığı da gösterilmiştir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin Ca^{+2} girişini bloke etmesi ve bunu izleyen agonist aracılıklı Ca^{+2} deposu boşalması, damar kontraktilesinin modülasyonunda tirozin kinazın önemine dikkat çekmektedir¹⁰¹.

II.5.4. DÜZ KAS GERİMİNİN TİROZİN KİNAZ/TİROZİN FOSFAT YOLAĞI ARACILIĞI İLE DÜZENLENMESİ

Damar düz kasında G proteinine bağlı etki gösteren agonistlerin etkilerini bloke eden tirozin kinaz inhibitörleriyle yapılan çalışmalar¹⁸¹ tirozin kinaz aktivatörleri (vanadat ve pervanadat) ile yapılan araştırmalarla geliştirilmiştir⁸⁸. Pervanadat tirozin fosfataz aktivitesini yükseltmekte ve AII gibi maddelerin kontraktil etkinliğini arttırmaktadır. Bu tirozin kinaz inhibitörleriyle geri çevrilebilmektedir. AII'ye bağlı yanıt ekstraselüler Ca^{+2} yokluğunda ve

indometazinle bloke edilebilmektedir⁸⁹. Bu düz kasta tirozin kinaz/tirozin fosfataz dengesinin düz kas geriminin kontrolünde dinamik bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca G proteini aracılığı ile etki gösteren agonistlerin, kontraktilitenin modülasyonunda tirozin kinaz enzimi üzerine etkilerinin önemine dikkat çekmektedir(Şekil 6)



Şekil 6: G proteini aracılıklı etki gösteren agonistlerle tirozin kinaz yolağı arasındaki ilişki. (Kesikli çizgiler tirozin kinaz yolağı için varsayılan yolağı belirtmektedir.) fosfolipaz C, PLD: fosfolipaz D, P: Fosforilasyon, DAG: Diaçilgliiserol, IP₃: İnositoltrifosfat, AS: Adenilat siklaz, PKC: Protein kinaz C (Kesikli çizgiler inhibisyonu belirtmektedir). (Şekil 58 numaraları kaynaktan yeniden düzenlenerek alınmıştır)

II.5.5. G PROTEİNLERİNE BAĞLI AGONİSTLERİN TİROZİN KİNAZ YOLAĞINI AKTİVE ETMELERİ

G proteinerine bağılı etki gösteren agonistler PLC'yi aktive ederler. Bu, DAG ve IP₃ aracılığı ile hücre içi Ca⁺²'u yükseltir. Tirozin fosforilasyonu PKC'nin DAG/Ca⁺² aracılığı ile aktivasyonundan oluşabilir. Bu yönelmede hücresele kinaz, doğrudan enzimin serin/treonin fosforilasyonu ile, dolaylı olarak da hücresele tirozin kinazın modülasyonu ile düzenlenmektedir. Bir başka seçenek de Ca⁺²'un yükselişinin doğrudan Ca⁺²'a duyarlı kinazları aktive etmesidir³⁶. Reseptör aracılığı G proteini aktivasyonu, aktin sitoskeletal yapısının sürdürülmesinde tirozin kinaz düzenlenmesinin hedefi olarak bir rol oynayabilir. Bir başka seçenek, aktive olan α alt birimlerinin (α_i ya da α_q) doğrudan tanımlanmamış nonreseptör tirozin kinaz ya da tirozin fosfatları stimüle ederek hücresele tirozin fosforilasyonunu tetiklemesidir. Bu da düz kas kasılmasında G proteini aracılığı bir etkidir⁸⁹. Bir başka varsayım olarak da G proteini aracılığı agonistlerin doğrudan membrandaki efektör molekülleri regüle etmesidir. Nonreseptör kinazların düz kas kasılması ile sonuçlanan etkilerinde esas hedefin hangisi olduğuna dair çalışmalar yapılmaktadır⁸⁹. Bu konuda bir ipucu pervanadla yapılan deneylerden sağlanmıştır. Pervanadata bağılı olarak hücresele tirozin fosforilasyonun yükselmesi ekstraselüler Ca⁺² olsada olmasa da gerçekleşmektedir. Ancak intraselüler Ca⁺² artmadığı halde tirozin fosforilasyonun yükselmesi ve kontraktile aparatı aktive etmesi pek uygun görülmemektedir. Dikkat edilmesi gereken nokta tirozin kinaz aktivitesinin potansiyel rolü incelenirken Ca⁺² girişinin düzenidir. Bu, bombesinle stimüle fibroblastlarda Ca⁺² girişinin genistein tarafından inhibe edilebilmesi⁹¹, düz

kas hücresinde Ca^{+2} kanal akımının bloke olması ve insan trombositlerinde agonist bağımlı Ca^{+2} girişini azaltması ile ilgili¹⁴⁸ gözlemlerle değerlendirilmiştir. Büyük bir olasılıkla, selüler tirozin kinaz aktivitesinin artmasıyla Ca^{+2} girişinin kolaylaştırılması intraselüler Ca^{+2} 'un yükselmesinde önemli bir etkindir. Bu yalnızca kasılmanın artması anlamında değil aynı zamanda hücrede Ca^{+2} /kalmazdın düzenleyici sistemlerle modüle edilen çok çeşitli hücresel olay için de geçerlidir⁴³. Tirozin kinaz aracılığı ile artan intraselüler Ca^{+2} , polipeptit büyüme faktörleri ve düz kasta G proteinine bağlı etki gösteren agonistler için yeni bir birleştirici mekanizmadır.

III. MATERYAL VE YÖNTEM

III.1. DENEYSEL PREPARAT

DeneYler Et ve Balık kurumu ile Sincan Belediye mezbahasında günlük olarak kesilen koyunların akciğerlerden izole edilen izole pulmoner arter ve venlerde geręekleřtirilmiřtir.

III.2.DENEYLERDE KULLANILAN MALZEMELER

İzole organ banyosu

Su banyosu (Nüve BM, 101, Ankara)

Transdsır (MAY, Force displacement transducer, Ankara)

Bridge Amplifier (TÜMEL, İZmir)

Bilgisayar ve LABSYS bilgisayar programı

Oksijenmetre (JENWAY 9071, İngiltere).

III.3.DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

KCl, histamin dihidroklorür, serotonin kreatin fosfat, noradrenalin, bradikinin, endotelin-1, sodyum florür, genistein, trifostin I, sodyum ortovanadat, kolera toksini, tetraetilamonyum.

Deneylerde kullanılan Krebs-Heinseleit çözeltisinin bileşimi (g/L):

NaCl	6.95
NaHCO ₃	2.10
KCl	0.34
MgCl ₂	0.24
KH ₂ PO ₄	0.16
CaCl ₂	0.27
Glukoz	2.17

Çalışmalarda kullanılan bütün kimyasal maddeler Sigma Chemical Co (St. Louis, USA)'dan sağlanmıştır. Kullanılan kimyasal maddelerden genistein dimetil sülfoksitte, 5-HT 0.01N HCl'de diğerleri ise distile suda çözülmüştür.

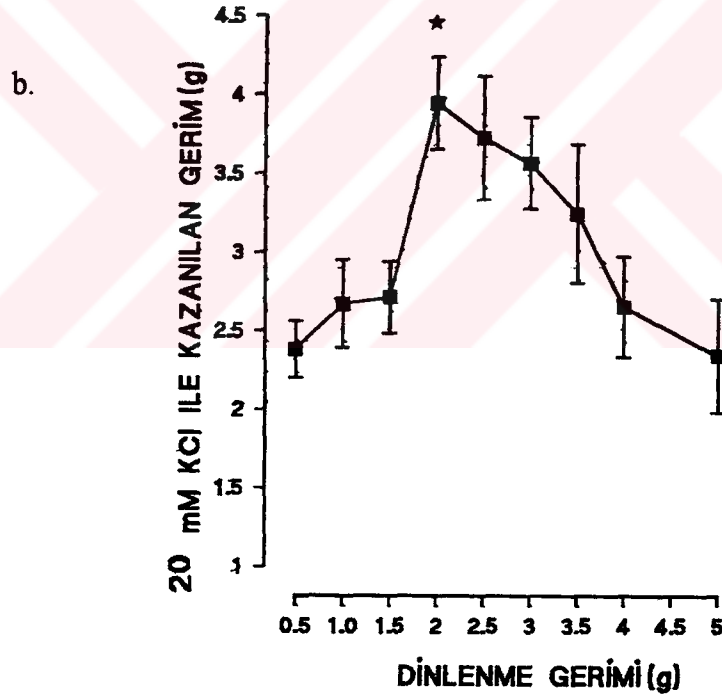
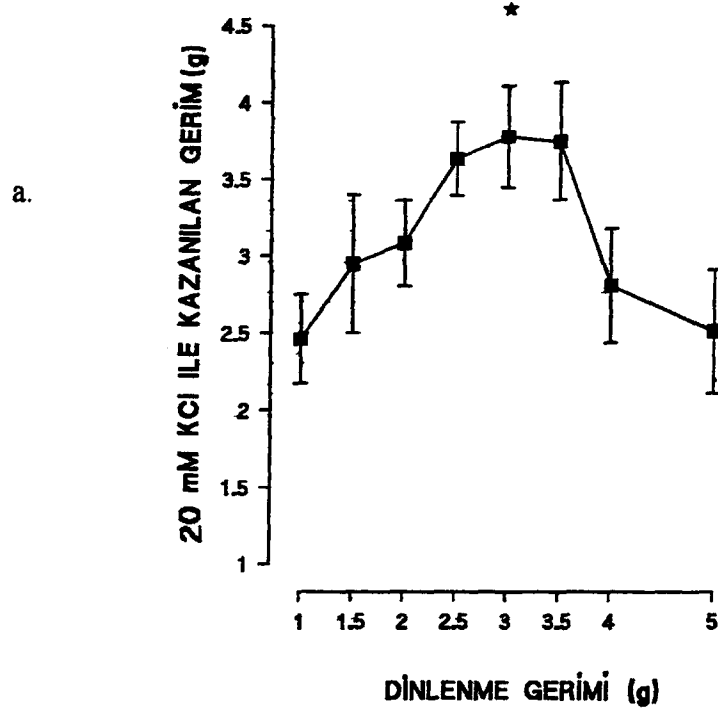
III.4. YÖNTEM

III.4.1.PULMONER ARTER İZOLASYONU VE OPTİMUM DİNLENME GERİMİNİN SAPTANMASI

Deneylerde günlük olarak kesilen koyunların akciğerleri kullanılmıştır. Pulmoner arter ve venler sol akciğerden izole edilmiştir. İzole edilen arter ve venler sol akciğerin alt lobuna giden ilk daldandır ve dış çapları yaklaşık 2-4 mm'dir. Dar çaplı pulmoner arterler ise dördüncü dallanmadandır ve dış çapları yaklaşık 0.5 mm dir. İzolasyondan sonra damarlar Krebs-Henseleit çözeltisi içeren bir petri içinde 3-5 mm uzunluğunda halka şeklinde kesilmiş, yağ ve bağ dokudan temizlenmiştir. Daha sonra izole edilen arter ve venler izole organ banyosuna

çengeller yardımıyla asılmıştır. İzole organ banyoları 10 ml Krebs-Henseleit çözeltisi içermektedir ve havalandırılma için oda havası kullanılmıştır. İzometrik kasılmalar sürekli olarak Labsys bilgisayar programı ile izlenmiş ve kaydedilmiştir. İzole edilen dokular bir saat dengelenmeye bırakılmış bu süre içinde 15 dakikada bir yıkanmıştır. Optimum dinlenme geriminin saptanabilmesi için dengelenme süresi sonunda dokulara 1-6 g arasında gerim uygulanmış ve 20 mM KCl' le alınan yanıtlar değerlendirilmiştir. Bu işlem sonucunda dokuların en iyi kasılma yanıtı verdikleri gerim optimum dinlenme gerimi olarak saptanmıştır. Sonuçta optimum dinlenme gerimi, arterler için 3g, venler için 2g olarak belirlenmiştir (Şekil 7).

Bazı deneylerde kullanılan damarların endotel tabakası ucuna bir parça pamuk sarılmış pens kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Endotel tabakasının uzaklaştırıldığından emin olmak için 5-HT ile prekontrakte edilen damarlarda bradikinin gevşeme yanıtının olup olmadığına bakılmıştır.



Şekil 7: İzole pulmoner arter ve venlerde optimum dinlenme gerimi.
a. pulmoner arter b. pulmoner ven
* seçilen dinlenme gerimi

İzometrik kasılmalar mN/mm^2 olarak değerlendirilmiştir. Bunun için aşağıdaki formüle göre hesaplanan A değeri kullanılmıştır:

$$A = \frac{W}{h \times \beta}$$

A= Arterin enine kesit alanı

β = Arter halkasının yoğunluğu (koyun karotit arterinde 1.05 mg/mm^3 olduğu bildirilmiştir⁸⁰)

W= Filtre kağıdında kurutulmuş arterin ağırlığı (mg)

h= Optimum dinlenme geriminde damarın iki çengel arasındaki uzunluğu (mm)

Buna göre; izometrik kasılma (mN/mm^2) = $\frac{\text{kasılma (mN)}}{A}$ formülüne uygun şekilde hesaplanmıştır^{30,174}.

III.4.2. KONTRAKTİL AGONİSTİN BELİRLENMESİ

Dokular optimum dinlenme geriminde bir saat dengelenmeye bırakılmıştır. Daha sonra 20 mM KCl uygulaması yapılmış, arka arkaya benzer bir yanıt alındıktan sonra, kontraktıl maddelerle doz-yanıt eğrisi oluşturmak üzere çalışmalara başlanmıştır. Bu amaçla kullanılan maddeler ve uygulanan doz aralıkları şöyledir:

KCl	$10^{-2}\text{M} - 10^{-1}\text{M}$
5-HT	$10^{-8}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$
Histamin	$10^{-8}\text{M} - 10^{-3}\text{M}$
Noradrenalin	$10^{-8}\text{M} - 10^{-3}\text{M}$

U46619	$10^{-10}\text{M}-10^{-7}\text{M}$
ET	$10^{-11}\text{M}-10^{-7}\text{M}$
NaF	1mM- 50 mM

Tablo 3: Koyun pulmoner arterinde NA, 5-HT, ET, NaF ve KCl uygulamaları sonucu hesaplanan EC_{50} ve E_{max} değerleri.

	EC_{50}	$E_{max}(\text{mN}/\text{mm}^2)$
NA (n=5)	$0.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$	16.8 ± 4.4
5-HT (n=6)	$6 \pm 0.7 \mu\text{M}$	10.3 ± 3.1
ET (n=5)	$17 \pm 4.8 \text{ nM}$	12.3 ± 3.4
KCl (n=8)	$20.1 \pm 5.2 \text{ mM}$	21.4 ± 2.58
NaF (n=6)	$22.4 \pm 7.4 \text{ mM}$	21.4 ± 2.58

Tablo 4: Koyun pulmoner venlerinde NA, HA, U46619, NaF ve KCl uygulamaları sonucu hesaplanan EC_{50} ve E_{max} değerleri.

	EC_{50}	E_{max} (mN/mm^2)
U46619 (n=4)	$11 \pm 4 \mu\text{M}$	12.6 ± 3.81
NA (n=6)	$0.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$	1.8 ± 0.75
HA (n=6)	$9.3 \pm 5.2 \mu\text{M}$	14.7 ± 2.92
KCl (n=5)	$30.0 \pm 6.4 \text{ mM}$	16.8 ± 3.88
NaF (n=14)	$26.3 \pm 3.8 \text{ mM}$	7.3 ± 1.5

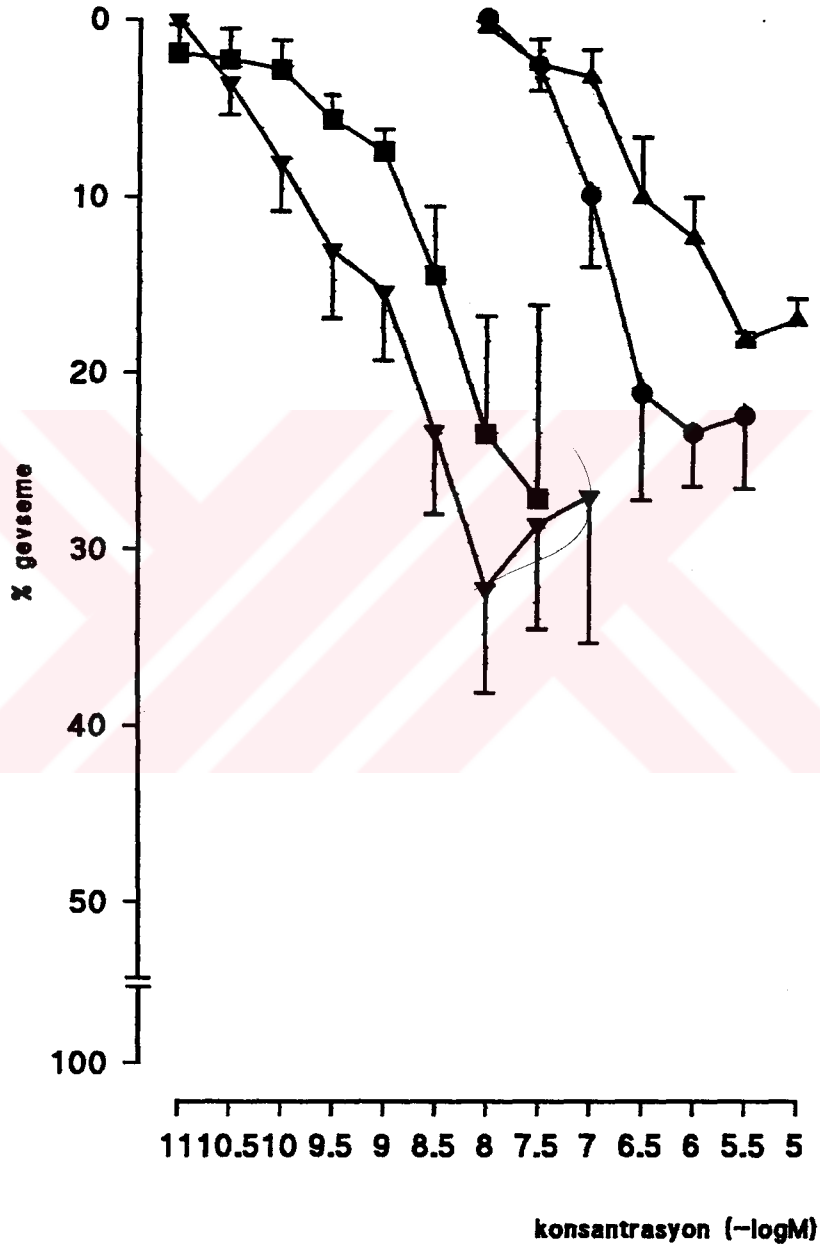
Pulmoner arterlerde 5-HT, kasılma süresi, boyu ve profilinin uygunluğu nedeniyle prekontraktıl agonist olarak seçilmiştir. Pulmoner arterlerde G

proteinleri üzerine etkinliği bilinen NaF de reseptörden bağımsız kasılma oluşturan bir madde olarak deneylerde kullanılmıştır.

Pulmoner venlerde NA çok zayıf bir kasılma oluşturmuştur. HA ile alınan kasılma yanıtının profili ise hipoksik pulmoner kontraksiyonu izlemek için uygun bulunmamıştır. Pulmoner venlerde U46619 uygun bir kontraktil madde olarak belirlenmiş, ancak deneyler suresince sağlanmasındaki güçlük nedeniyle kullanılamamıştır. Bu nedenle pulmoner venlerdeki deneylerimizde prekontraksiyon amacıyla sadece NaF kullanılmıştır.

III.4.3. GEVŞEME YANITLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bazı deneylerde kullanılan deendotelize edilmiş damarların, endotel tabakasının kazınmış olduğunun test edilmesi amacıyla, endotel bağımlı gevşeme oluşturduğu bilinen agonistlere verdiği yanıtlar izlenmiştir. Bu amaçla A23187, BK, Ach, HA ile oluşan gevşeme yanıtları incelenmiştir. Gevşeme yanıtları KCl prekontraksiyonunun yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Buna göre maksimum gevşeme A23187 ile % 27.2 ± 10.9 , BK ile % 32.3 ± 5.9 , HA ile % 23.5 ± 3.3 , Ach ile % 18.3 ± 0.4 olarak gerçekleşmiştir. En iyi gevşeme yanıtı BK ile alındığından deneylerde endoteli varlığının test edilmesi amacıyla BK'le kullanılması uygun bulunmuştur (Şekil 8).



Şekil 8: 5-HT ile prekontrakte izole pumoner arterlerde endotel aracılıklı gevşetici agonistlerin etkileri ● Histamin (n=8), ■ A23187 (n=3), ▲ Asetilkolin (n=2-12) ▼ Bradikinin (n=6)

III.4.4. ÇALIŞMALARDA İZLENEN DENEY PROTOKOLÜ

İzole edilen damarlar optimum dinlenme geriminde 1 saat dengelenmeye bırakıldıktan sonra KCl uygulaması yapılmış ve ardarda benzer kasılma yanıtı alındıktan sonra deneylere geçilmiştir. Deneylerde izole organ banyolarında Krebs-Heinseleit çözeltisinin havalandırması, oda havası ile yapılmıştır. Hipoksik koşullar ise % 5 CO₂- % 95 N₂ karışımı ile sağlanmış ve 30 dakikalık bir uygulama yapılmıştır. Deneyler süresince izole organ banyolarında oksijen konsantrasyonu ölçülmüştür. Hipoksi uygulaması sonucu ortamın pO₂ değerinin zamana karşı değişimi Şekil 9' de verilmiştir.

Hipoksinin endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını nasıl etkilediği incelenirken 5-HT ile prekontrakte damarlarda BK gevşeme yanıtları saptanmış, daha sonra 30 dakikalık bir hipoksi uygulaması yapılmıştır. Dokular hipoksik koşullarda yeniden 5-HT ile prekontrakte edilmiş ve BK gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir.

Pulmoner arter ve venlerde hipoksinin etkisi, hem dinlenme geriminde hem de prekontrakte dokularda araştırılmıştır. Dinlenme gerimindeki pulmoner arterlerde ve venlerde ardarda iki hipoksi uygulaması yapılmıştır. Arterlerde bu iki uygulama arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (1.4 ± 0.4 mN/mm², -1.7 ± 0.4 mN/mm²). Venlerde de iki hipoksi uygulaması arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanamamıştır (-1 ± 0.4 mN/mm², -0.8 ± 0.5 mN/mm²).

Denelerimizde normoksik koşullarda, arterlerde, ardarda yapılan 5-HT kasılmaları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (5.6 ± 0.6 mN/mm², 5.8 ± 0.7). Daha sonra prekontrakte arterlerde, hipoksi uygulamasına geçilmiştir. Bu işlem iki kere yapılmış ve aralarında anlamlı bir fark saptanamamıştır (1.2 ± 0.5 mN/mm², 1 ± 0.2 mN/mm²). Pulmoner venlerde prekontraksiyon amacıyla kullanılan NaF ile de benzer sonuçlar alınmıştır. Normoksik koşullarda NaF ile elde edilen prekontraksiyonun maksimumu ilk uygulamada 4.7 ± 0.8 mN/mm² iken, ikinci uygulamada bu 4.5 ± 0.5 mN/mm² olarak gerçekleşmiştir.

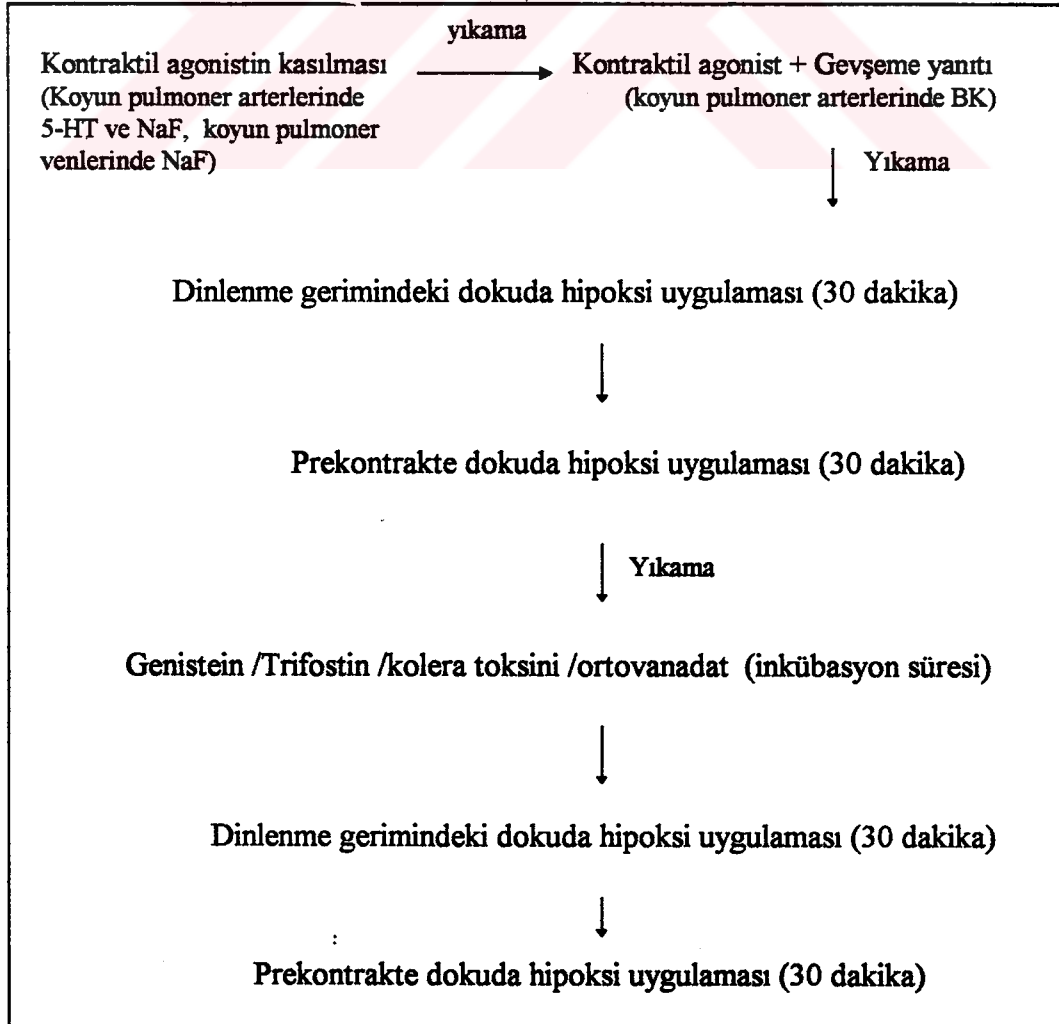
Deneilerde doku dengelendikten sonra izlenen deney protokolü tablo 5'de verilmiştir. Bu protokole göre prekontraktıl agonist olarak seçtiğimiz 5-HT ile ardarda benzer kasılma yanıtı alınmış ve BK ile endotel bağımlı gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Daha sonra dinlenme gerimindeki arterlerde hipoksi uygulamasına geçilmiştir. Hipoksi uygulama süresi 30 dakikadır. Bu sürenin sonunda normoksik koşullara geri dönmüştür. Kısa bir dengelenme süresi sonrası dokular prekontrakte (5-HT ve NaF) edilmiştir. Prekontrakte dokularda hipoksinin etkisini incelemek amacıyla 30 dakikalık hipoksi uygulaması yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra normoksik koşullara geri dönmüş ve yıkama işlemi yapılmıştır

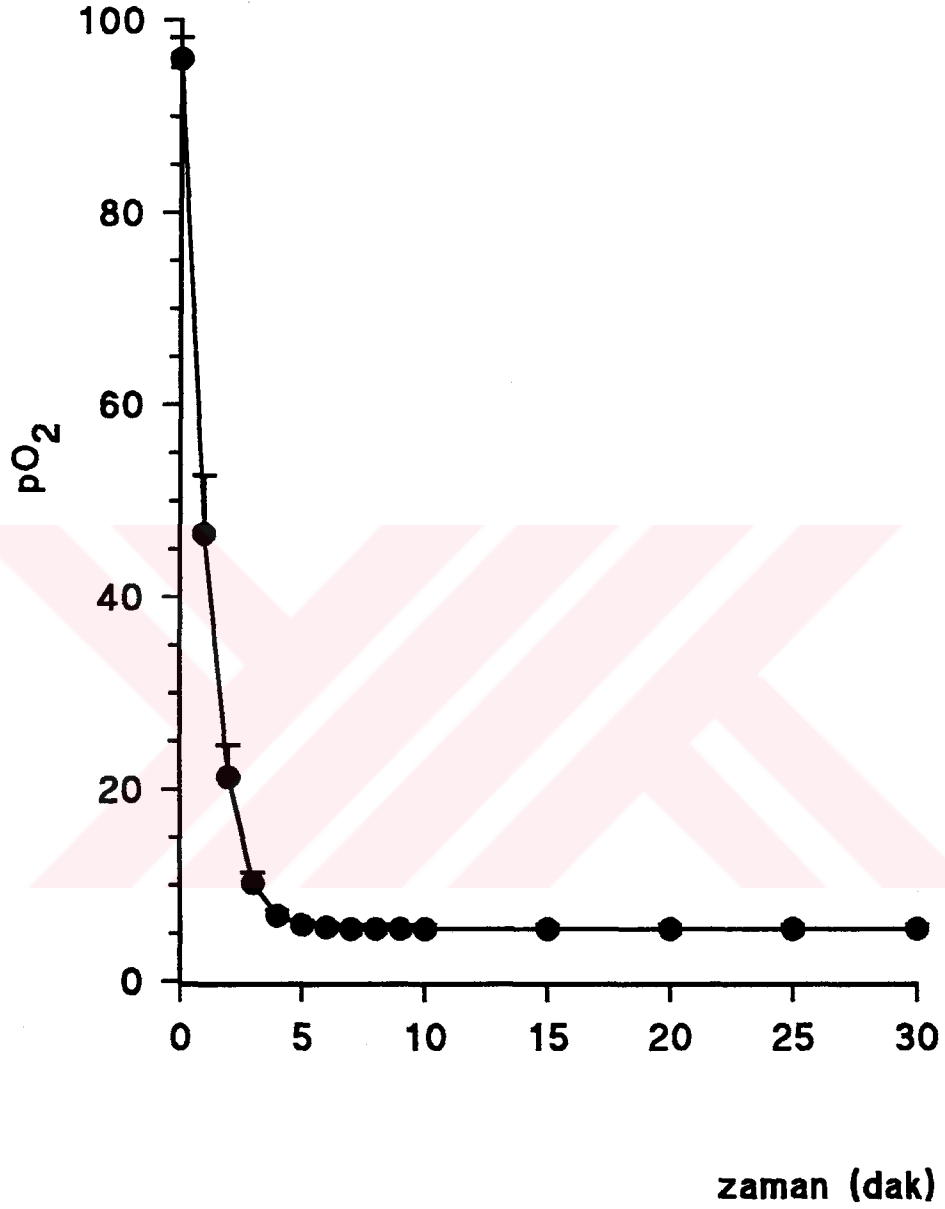
Deneilerimizde hem dinlenme geriminde hem de prekontrakte dokularda hipoksiye bağılı gerim değışiklikleri üzerinde üzerinde genistein, trifostin, sodyum ortovanadat, TEA ve kolera toksininin etkisi incelenmiştir. Çalışmalarımızda genistein, sodyum ortovanadat, TEA için 30 dakika, kolera

toksini için 3 saat, trifostin için 20 dakikalık inkübasyon süreleri uygulanmıştır. Genistein $30 \mu\text{M}^{89}$, trifostin $50 \mu\text{M}^{34}$, ortovanadat $100 \mu\text{M}^{72}$, kolera toksini $2 \mu\text{M}^{143}$, TEA ise 20Mm^{176} konsantrasyonlarda kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda dinlenme gerimindeki dokularda 30 dakikalık hipoksi yeniden yapılmıştır. Sonra kısa bir süre için normoksik koşullara geri dönmüştür. Ardından dokular prekontrakte edilmiş ve sonrasında 30 dakika hipoksi uygulaması yapılmıştır.

Sonuçlar, ortalama \pm standart hata olarak hesaplanmış iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığın saptanması için student's t testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 5: Deney protokolü





Şekil 9: 30 dakikalık hipoksi uygulaması boyunca değişen pO₂ değerleri

IV. BULGULAR

IV.I. PULMONER ARTERLERDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

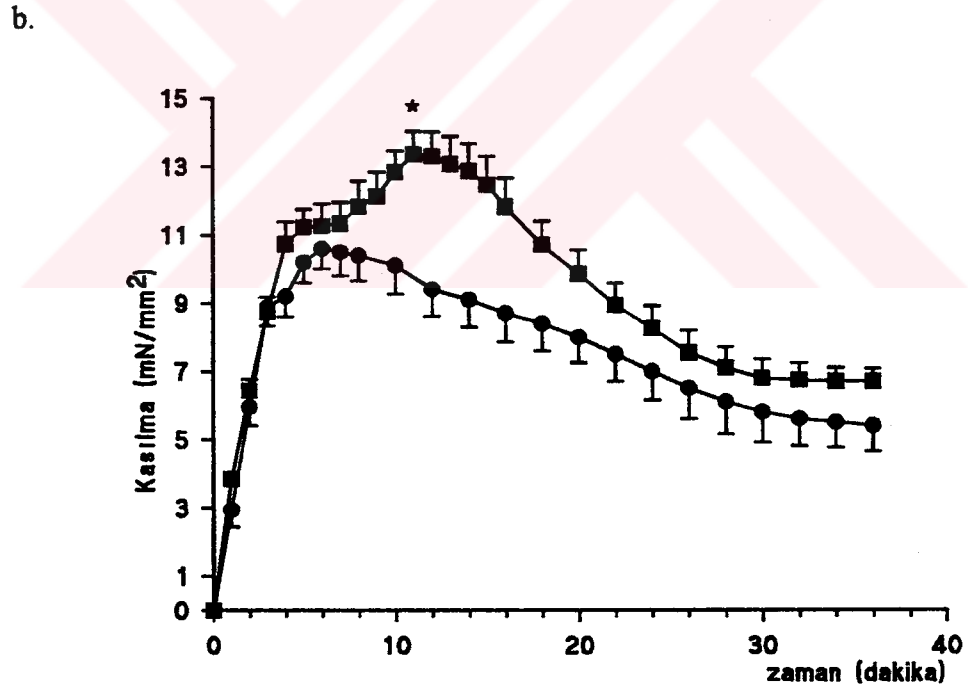
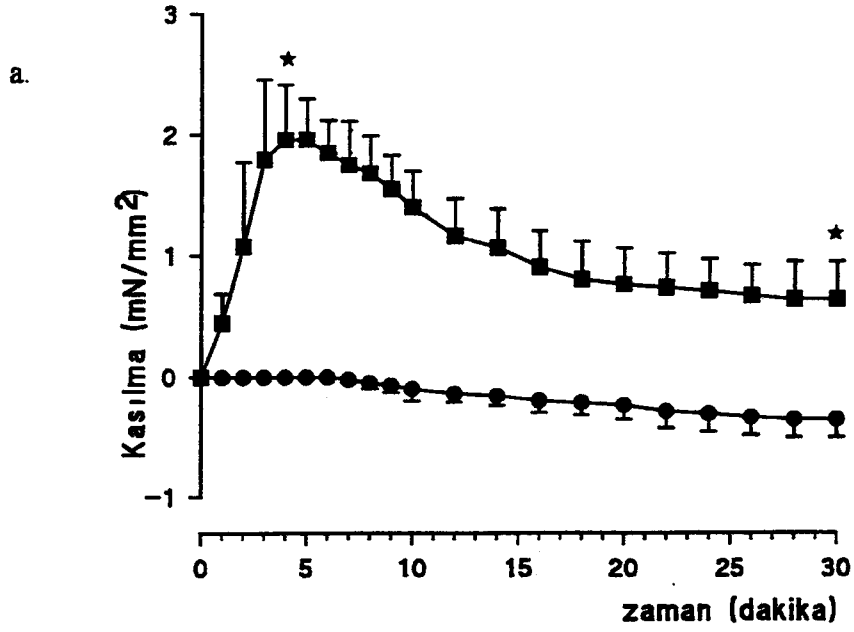
IV.I.1. DAR ÇAPLI ARTERLERDE HIPOKSİ UYGULAMASI

Dinlenme gerimindeki dar çaplı izole pulmoner arterlerde 30 dakikalık hipoksi uygulaması gerim artışına neden olmuştur (1.96 ± 0.46 mN/mm²) (n=4) (Şekil 10 a). 5-HT ile prekontrakte edilmiş arterlerde de hipoksi uygulaması sonucu kasılma olmuştur (1.1 ± 0.3 mN/mm²) (n=4) (Şekil 10 b).

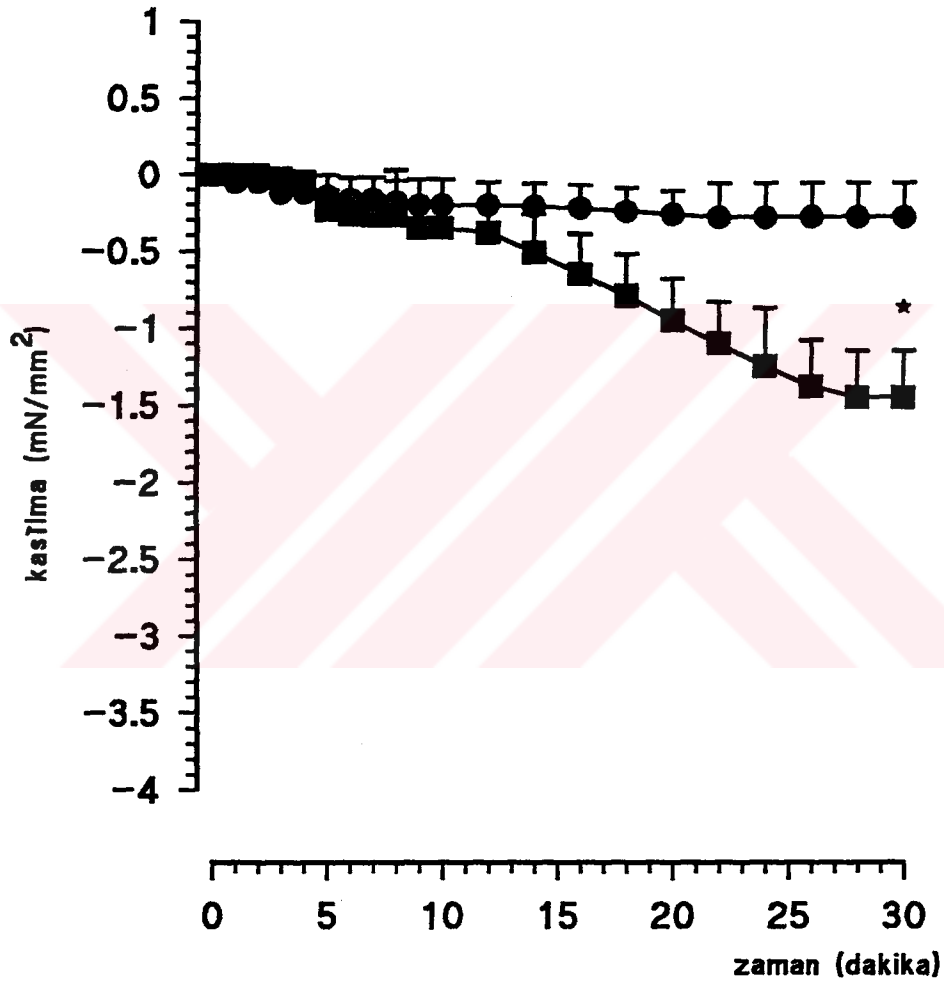
IV.I.2. GENİŞ ÇAPLI ARTERLERDE HIPOKSİ UYGULAMASI

IV.I.2.A. Dinlenme gerimindeki arterler:

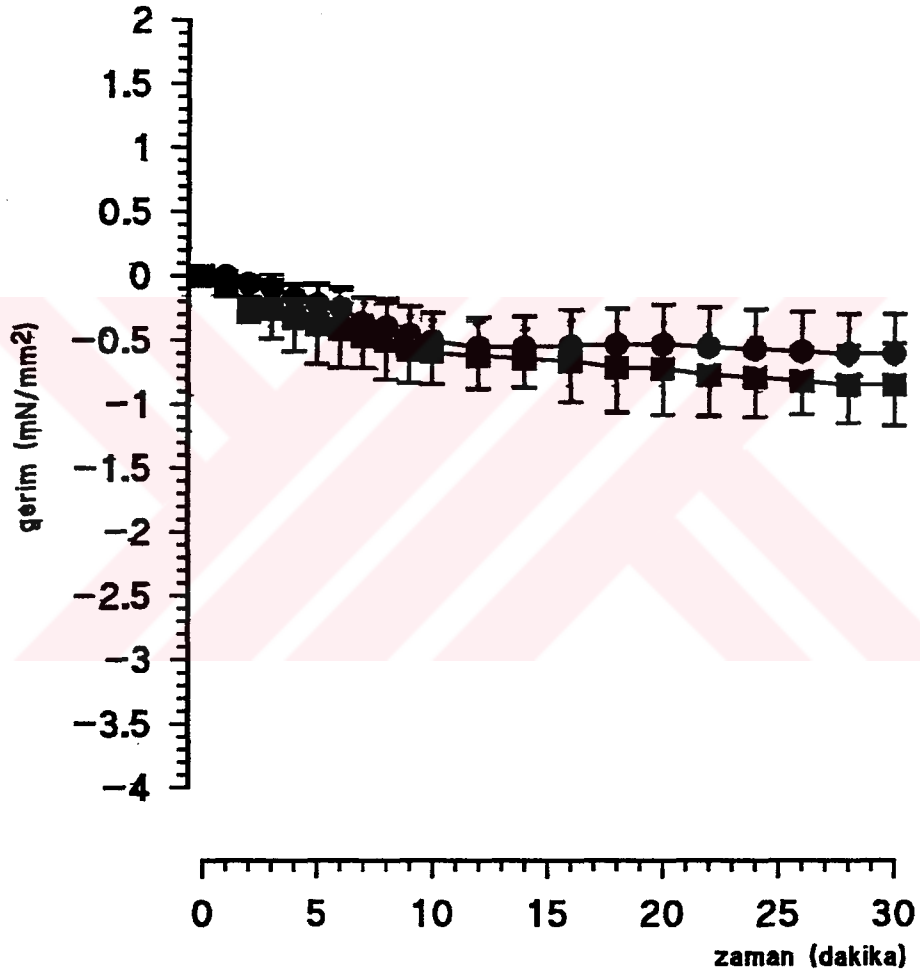
30 dakikalık hipoksi uygulaması (%95 N₂-%5 CO₂) geniş çaplı izole pulmoner arterlerde anlamlı bir gerim kaybına neden olmuştur. Bu arterlerde normoksi boyunca 0.28 ± 0.17 mN/mm² (n=6) gerim kaybı olurken, 30 dakikalık hipoksi uygulaması sonunda 1.5 ± 0.36 mN/mm² (n=6) gerim kaybı gerçekleşmiştir (Şekil 11). Endotel tabakası kazınmış izole pulmoner arterlerde hipoksiye bağlı gerim kaybı anlamlı bulunmamıştır (Şekil 12).



Şekil 10: a. Dinlenme gerimindeki dar çaplı pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması ● Normoksi boyunca oluşan gerim değişikliği (n=3), ■ Hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=3) b. 5-HT ile prekontrakte dar çaplı pulmoner arterlerde hipoksik vazokonstriksiyon ● Normoksi boyunca 5-HT kasılması (n=4), ■ 5-HT ile prekontraksiyon sonrası hipoksi uygulaması (n=4). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * $p < 0.05$)



Şekil 11: Endotel tabakası korunmuş, dinlenme gerimindeki geniş çaplı pulmoner arterlerde hipoksi uygulamasının oluşturduğu gerim değişikliği. ● Normoksi boyunca pulmoner arterlerde oluşan gerim değişikliği (n=6), ■ Hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=6). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * $p < 0.05$)



Şekil 12: Endotel tabakası kazınmış dinlenme gerimindeki geniş çaplı pulmoner arterlerde hipoksi uygulamasının oluşturduğu gerim değişikliği. ● Normoksi boyunca pulmoner arterlerde oluşan gerim değişikliği (n=6), ■ Hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=6). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * $p < 0.05$)

IV.I.2.B. Prekontrakte arterler:

Endotel bütünlüğü korunmuş izole koyun pulmoner arterlerinde prekontraktıl agonist olarak NaF ve 5-HT kullanılmıştır. Prekontraksiyon için bu agonistlerin EC₅₀ değerleri seçilmiştir. NaF ile kasılmış dokularda hipoksiye (%95 N₂, %5 CO₂) bağlı hafif bir vazokonstriksiyon oluşmuş ancak bu anlamlı bulunmamıştır. (Şekil 13). 5-HT ile prekontraksiyon sonrası hipoksi uygulaması ise endoteli korunmuş pulmoner arterlerde başlangıçta kasılmaya (1.2 ± 0.5 mN/mm²) (n=7) sonra gevşemeye neden olmuş ve bu anlamlı bulunmuştur. (Şekil 14,15, tablo 6). Endotel tabakası kazınmış prekontrakte pulmoner arterlerde ise 30 dakikalık hipoksi uygulaması boyunca kasılma yanıtı izlenemediği gibi hipoksiye bağlı vazodilatasyon görülmüştür (Şekil 16 Tablo 7).

Tablo 6: 5-HT ile prekontrakte edilmiş *endotel tabakası korunmuş* arterlerde hipoksi uygulaması sonucu oluşan gerim değişikliği.

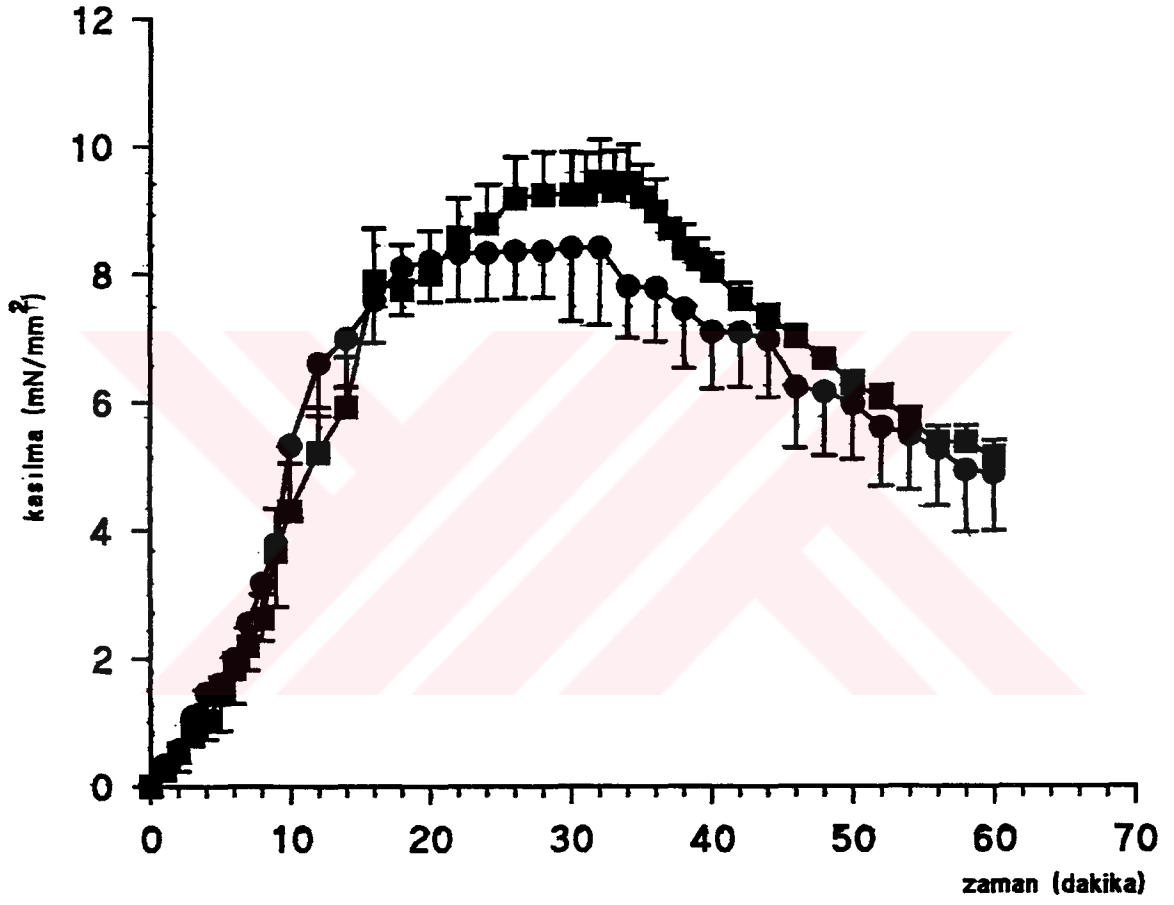
	n	8-12 (dak) kasılma (mN/mm ²)	8-38 (dak) kasılma (mN/mm ²)
Normoksik koşullar	7	0.02 ± 0.01	-1.8 ± 0.3
Hipoksi uygulaması	7	1.2 ± 0.5 *	-3.2 ± 0.4*

(*p< 0.05, Normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen sonuçlar Student's t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.)

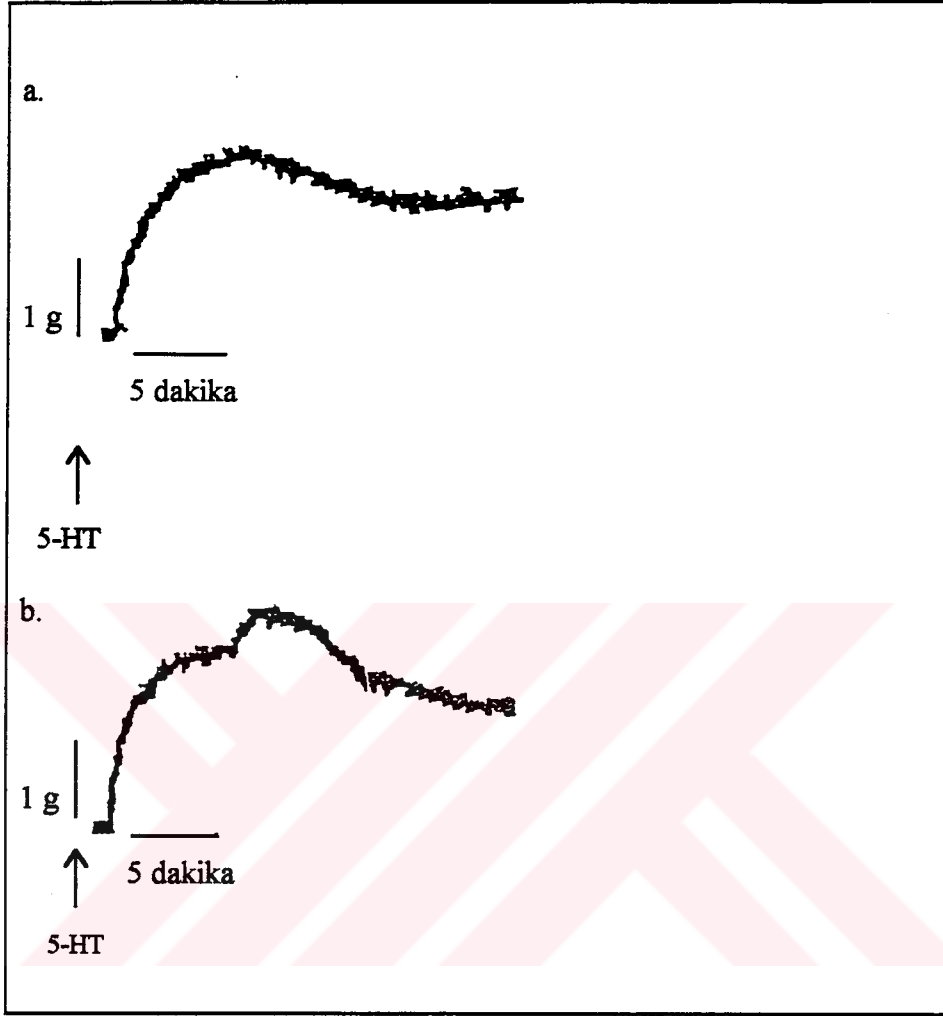
Tablo 7: 5-HT ile prekontrakte edilmiş *endotel tabakası kazınmış* arterlerde hipoksi uygulaması sonucu oluşan gerim değişikliği.

	n	8-12 (dak) kasılma (mN/mm ²)	8-38 (dak) kasılma (mN/mm ²)
Normoksik koşullar	7	-0.03 ± 0.5	-3.9 ± 0.4
Hipoksi uygulaması	7	0.2 ± 0.5	-2.3 ± 0.2*

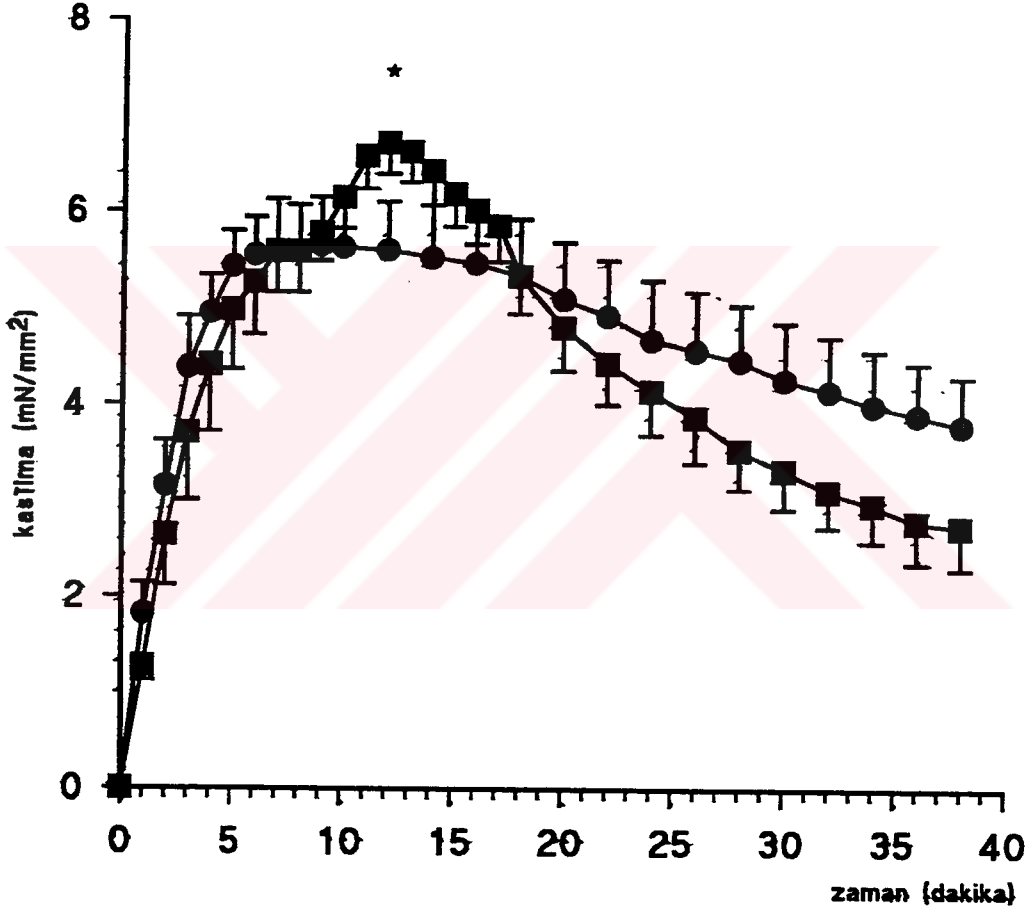
(* p< 0.05, Normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen sonuçlar Student's t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.)



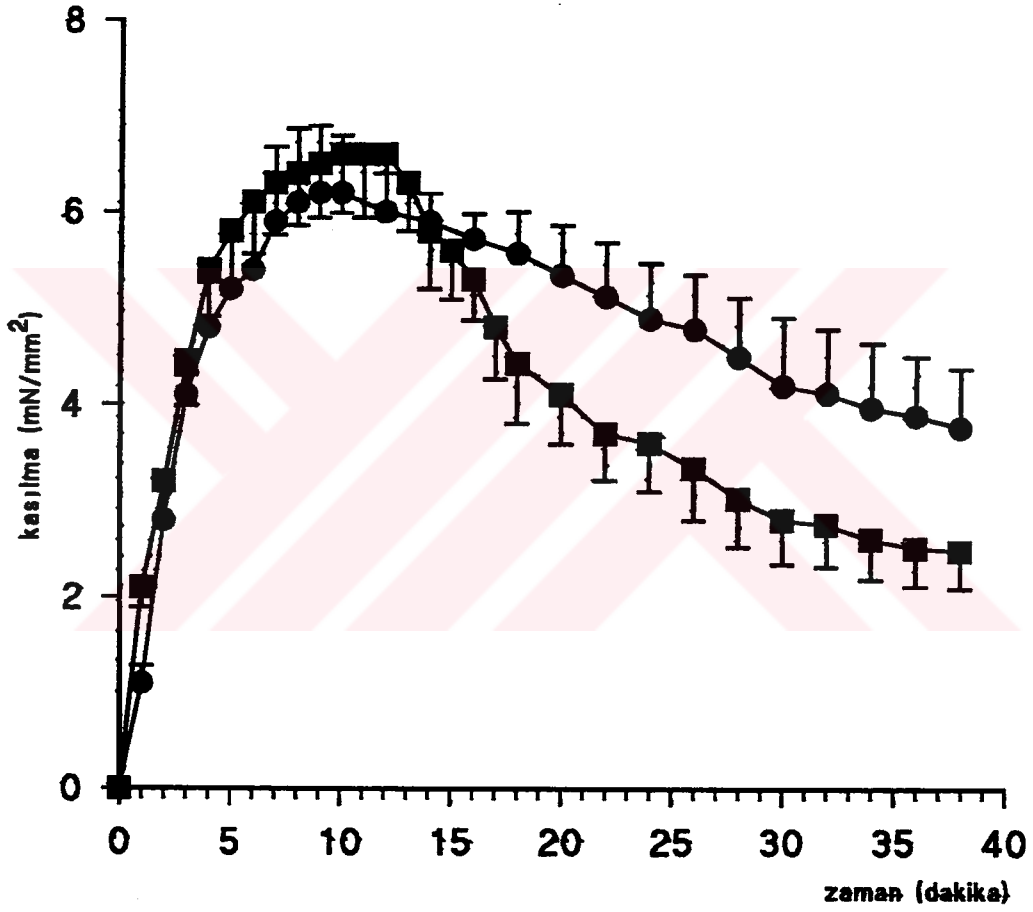
Şekil 13: NaF ile prekontrakte edilmiş pulmoner arterlerde hipoksinin etkisi.
● Normoksi boyunca pulmoner arterlerde NaF'ün oluşturduğu kasılma (n=6) ■ NaF prekontraksiyonu sonrası 30 dakikalık hipoksi uygulaması (n=6)



Şekil 14: 5-HT kasılması (a) ve 5-HT ile prekontraksiyon sonrasında hipoksi uygulaması boyunca (b) alınan kayıtlar.



Şekil 15: Endotel tabakası korunmuş, 6 μ M 5-HT ile prekontrakte edilmiş pulmoner arterlerde hipoksinin etkisi ● Normoksi boyunca 5-HT'nin oluşturduğu kasılma (n=7), ■ 5-HT prekontraksiyonu sonrası 30 dakikalık hipoksi uygulaması (n=7). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)



Şekil 16: Endotel tabakası kazınmış, 6 μ M 5-HT ile prekontrakte edilmiş pulmoner arterlerde hipoksinin etkisi ● Normoksi boyunca 5-HT'nin oluşturduğu kasılma (n=6), ■ 5-HT prekontraksiyonu sonrası 30 dakikalık hipoksi uygulaması (n=6). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)

IV.I.2.C. Endotel bağımlı gevşeme yanıtları

5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde normoksik koşullarda BK ile % 32.3 ± 5.9 (n=6) oranında bir gevşeme yanıtı oluştuğu saptanmıştır. Daha sonra hipoksi uygulamasına geçilmiş ve hipoksi boyunca 5-HT ile prekontrakte dokularda BK yanıtı izlenmiştir. Bu koşullarda endotele bağımlı gevşeme yanıtlarının anlamlı olarak (% 5.5 ± 3.5 n=6) azaldığı saptanmıştır (Tablo 8)

Tablo 8: 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksinin BK ile oluşan gevşeme yanıtı üzerine etkisi.

	n	Bradikinin konsantrasyonu			
		$10^{-11}M$	$10^{-10}M$	$10^{-9}M$	$10^{-8}M$
Normoksik koşullarda oluşan % gevşeme	6	0 ± 0	8.1 ± 2.8	15.5 ± 3.9	32.3 ± 5.9
Hipoksik koşullarda oluşan % gevşeme	6	0 ± 0	0 ± 0	$4.6 \pm 0.8^*$	$5.5 \pm 1.8^*$

(*p< 0.05, Normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen sonuçlar Student's t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.)

IV.I.3. GENİŞ ÇAPLI, ENDOTEL TABAKASI KORUNMUŞ İZOLE PULMONER ARTERLERDE TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN VE ORTOVANADATIN HIPOKSİ UYGULAMASI ÜZERİNE ETKİSİ

IV.I.3.A. Dinlenme gerimindeki arterler:

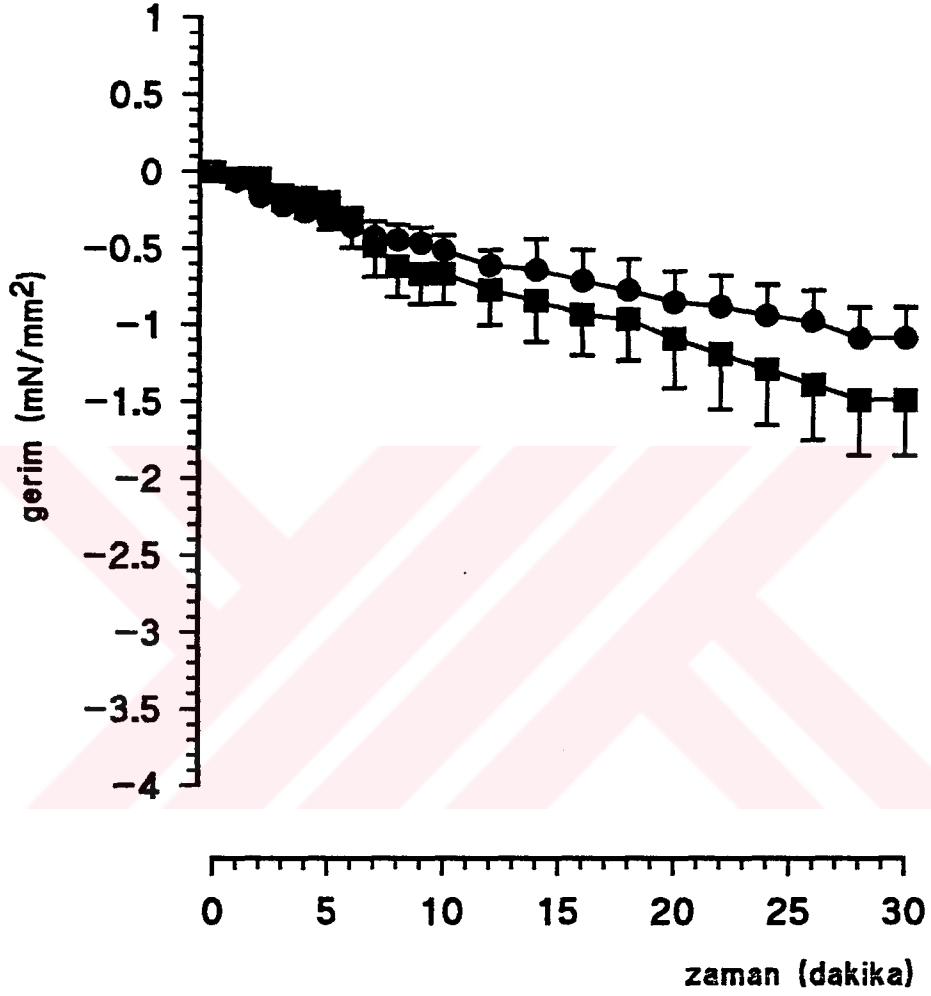
Dinlenme gerimindeki izole pulmoner arterlerde 30 dakikalık hipoksi uygulaması gerim kaybına neden olmaktadır (1.7 ± 0.2 mN/mm²) (Şekil 11). Tirozin kinaz inhibitörleri genistein ve trifostin varlığında yapılan deneylerde de 30 dakikalık hipoksi uygulaması sonucu değiştirmemektedir (Şekil 17, 18 Tablo 9). Buna karşın ortovanadatla inkübasyon, arterlerde hipoksik gevşemeyi

azaltmaktadır ($0.6 \text{ mN/mm}^2 \pm 0.20$) (Tablo 9). Ortovanadat uygulaması yapılan deneylerde hipoksi uygulamasının ilk dakikalarında çok zayıf bir kasılma izlenmiş ($0.06 \text{ mN mm}^2 \pm 0.2$) ancak bu anlamlı bulunmamıştır (Şekil 19).

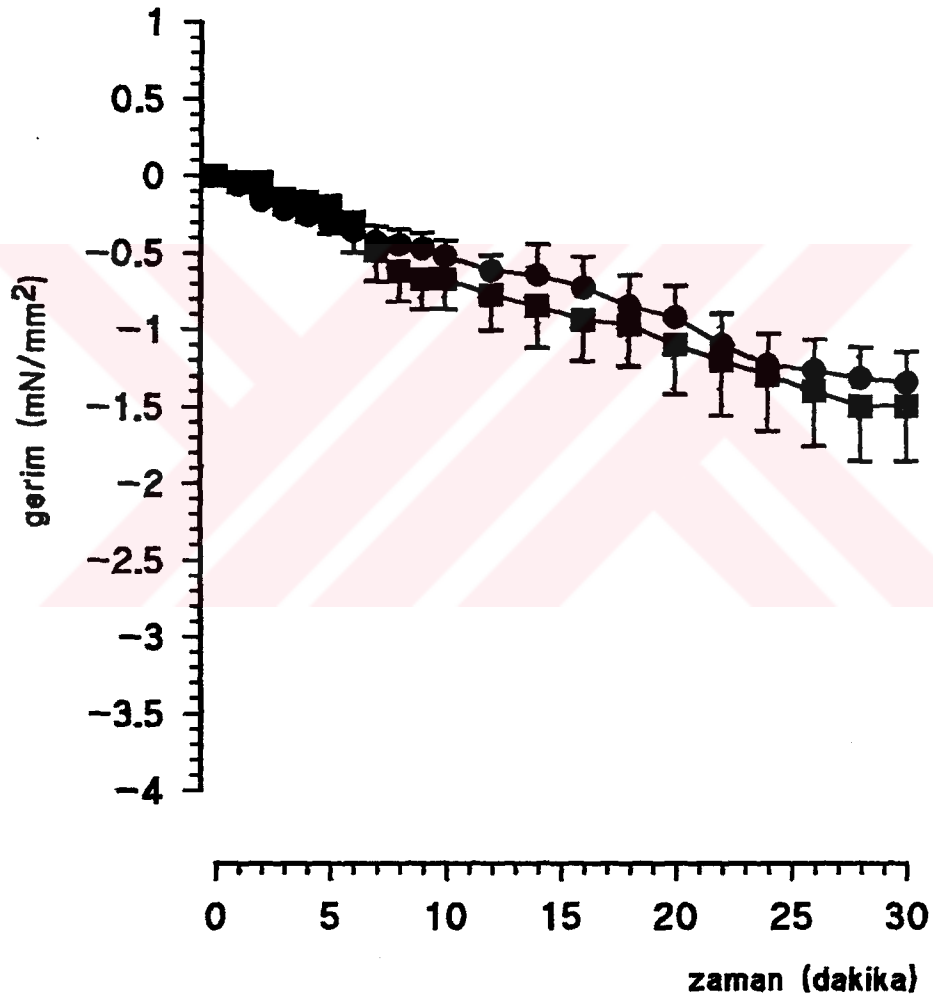
Tablo 9: Dinlenme gerimindeki pulmoner arterlerde tirozin kinaz inhibitörlerinin (genistein ve trifostin) ve ortovanadatın hipoksiye bağlı gerim kaybı üzerine etkisi.

	n	inkübasyon öncesi gerim (mN/mm^2) (30.dak)	inkübasyon sonrası gerim (mN/mm^2) (30.dak)
Kontrol	7	-1.4 ± 0.4	-1.7 ± 0.4
Genistein	7	-1.1 ± 0.4	-1.5 ± 0.4
Trifostin	6	-1.4 ± 0.4	-1.5 ± 0.4
Ortovanadat	7	-1.7 ± 0.4	$-0.6 \pm 0.2^*$

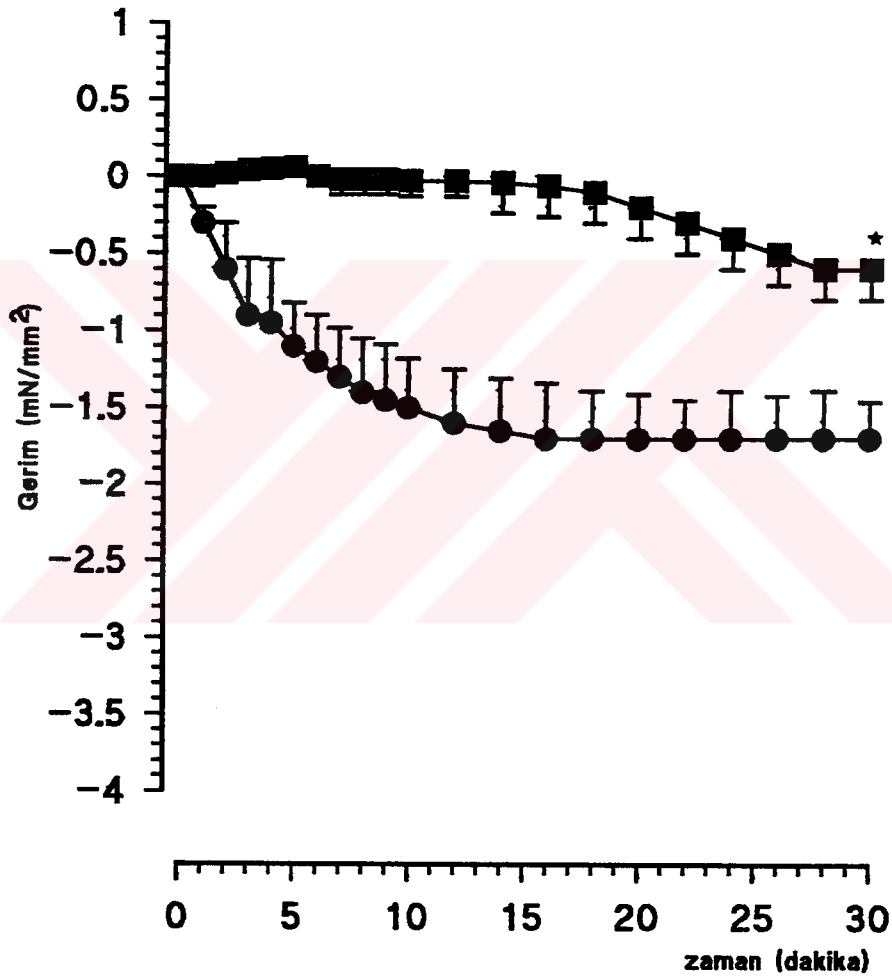
(* $p < 0.05$, karşılaştırmalar inkübasyon öncesi değerlerle Student's t testi kullanılarak yapılmıştır.)



Şekil 17: Dinlenme gerimindeki geniş çaplı, endotel tabakası korunmuş pulmoner arterlerde genisteinin hipoksiye bağlı gerim değişikliği üzerindeki etkisi. ● Dinlenme gerimindeki pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=7) ■ Genistein valığında hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=7). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)



Şekil 18: Dinlenme gerimindeki geniş çaplı, endotel tabakası korunmuş pulmoner arterlerde trifostinin hipoksiye bağlı gerim değişikliği üzerindeki etkisi. ● Dinlenme gerimindeki pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=7) ■ Trifostin valığında hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=7). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)



Şekil 19: Dinlenme gerimindeki geniş çaplı, endotel tabakası korunmuş pulmoner arterlerde sodyum ortovanadatın hipoksiye bağlı gerim değişikliği üzerindeki etkisi. ● Dinlenme gerimindeki pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=7) ■ ortovanadat valığında hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=7). (Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)

IV.I.3.B. Prekontrakte arterler

IV.I.3. B.1. Genisteinin HPV üzerine etkisi :

5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulamasının neden olduğu vazokonstriksiyon, ($1.1 \pm 0.3 \text{ mN/mm}^2$) (n=7) genistein ile inkübasyon sonrasında ortadan kalkmıştır (Tablo 10). Genistein inkübasyonu, 5-HT prekontraksiyonunun ($5.7 \pm 0.4 \text{ mN/mm}^2$) (n=7) anlamlı bir değişiklik ($5.2 \pm 0.3 \text{ mN/mm}^2$) (n=7) oluşturmamıştır. Buna karşın hipoksi uygulaması boyunca bu grupta gerim kaybı daha fazla olmuştur (Şekil 20).

IV.I.3.B.2. Trifostinin HPV üzerine etkisi :

5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulamasına bağlı vazokonstriksiyon ($1.2 \pm 0.3 \text{ mN/mm}^2$) (n=6) trifostin ile ortadan kalkmıştır (Tablo 10). Trifostin inkübasyonu 5-HT prekontraksiyonunu ($6.4 \pm 0.4 \text{ mN/mm}^2$) (n=6) azaltmış ($5.5 \pm 0.5 \text{ mN/mm}^2$) (n=6) ama bu anlamlı bulunmamıştır (Şekil 21).

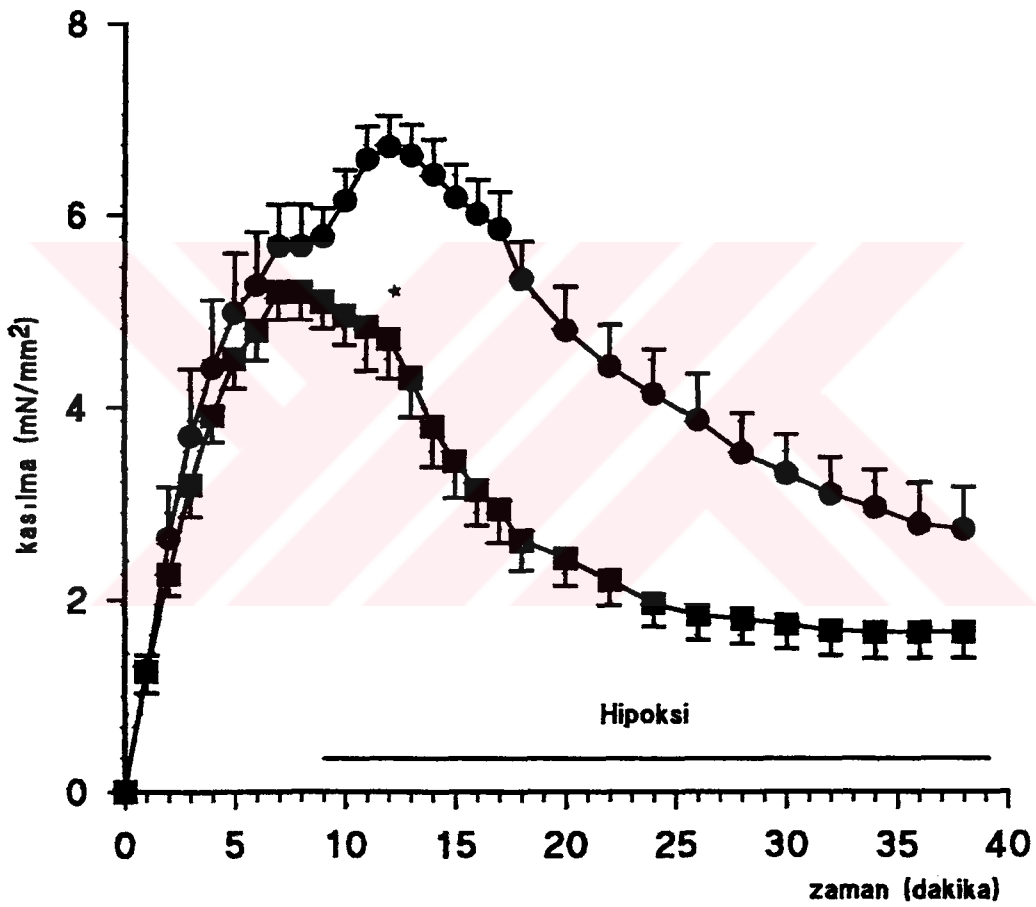
IV.I.3.B.3. Ortovanadatın HPV üzerine etkisi:

5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksiye bağlı kasılma izlendikten sonra ($2.1 \pm 0.3 \text{ mN/mm}^2$) (n=7), dokular 30 dakika süreyle $100 \mu\text{M}$ vanadatla inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hipoksiye bağlı kasılmanın ($3.48 \pm 0.6 \text{ mN/mm}^2$) (n=7) anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (Tablo10). Ortoanadatla inkübasyon 5-HT prekontraksiyonunu ($7.3 \pm 0.5 \text{ mNmm}^2$, $8.5 \pm 0.5 \text{ mN/mm}^2$) (n=7) arttırmış ama bu artış anlamlı bulunmamıştır (Şekil 22).

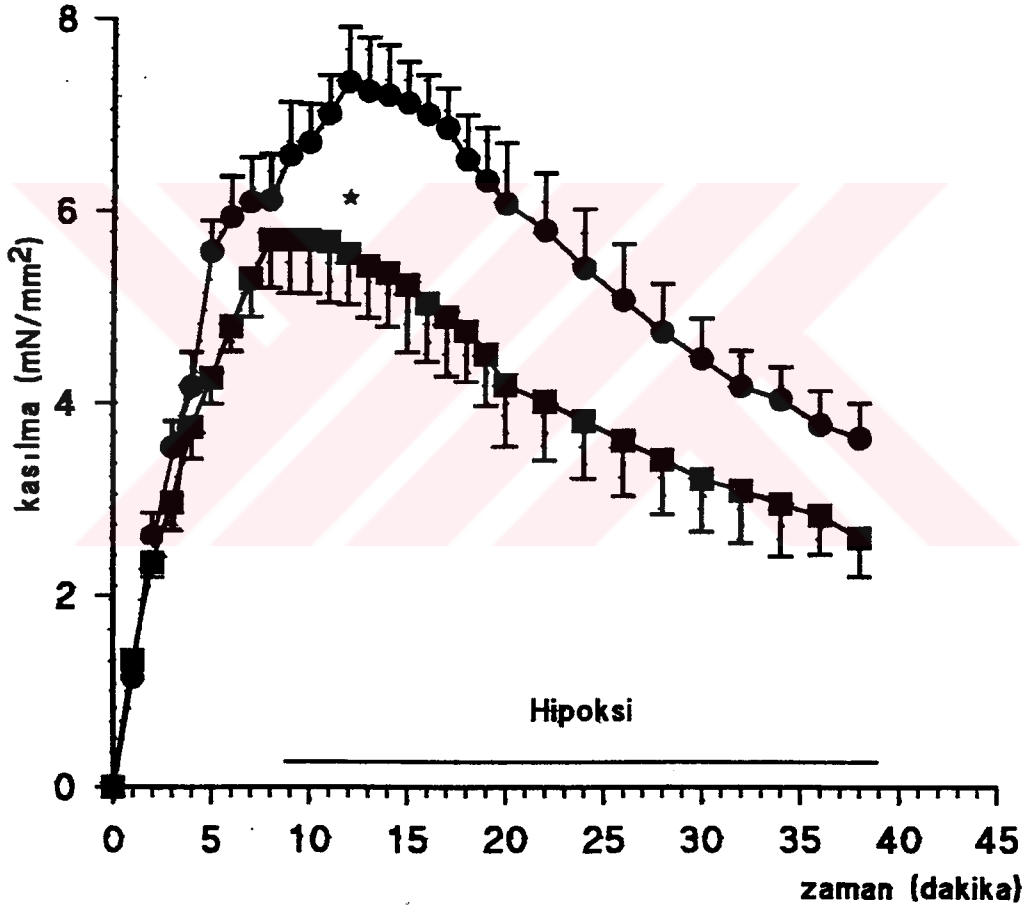
Tablo 10: 5-HT ile prekontrakte geniş çaplı pulmoner arterlerde tirozin kinaz inhibitörleri, ortovanadat, kolera toksini, kolera toksini+ortovanadat ve TEA'nın HPV üzerine etkisi

	n	İnkübasyon öncesi gerim (mN/mm ²)		İnkübasyon sonrası gerim (mN/mm ²)	
		8-12 (dak)	8-38 (dak)	8-12 (dak)	8-38 (dak)
Kontrol	6	1.2 ± 0.5	-3.2 ± 0.5	1.0 ± 0.2	-3.2 ± 0.4
Genistein	7	1.1 ± 0.3	-2.9 ± 0.7	-0.5 ± 0.3*	-3.6 ± 0.3
Trifostin	6	1.2 ± 0.3	-2.8 ± 0.4	-0.2 ± 0.1*	-2.9 ± 0.5
Ortovanadat	7	2.1 ± 0.3	-3.9 ± 0.5	3.5 ± 0.6*	-2.5 ± 0.7
Kolera toksini	6	1.0 ± 0.2	-3.1 ± 0.5	-0.2 ± 0.1*	-2.5 ± 0.3
Kolera toksini + ortovanadat	6	1.1 ± 0.6	-1.8 ± 0.5	0.7 ± 0.6	-2.0 ± 0.6
TEA	6	1.0 ± 0.6	-3.2 ± 0.5	0.9 ± 0.3	-3.2 ± 0.6

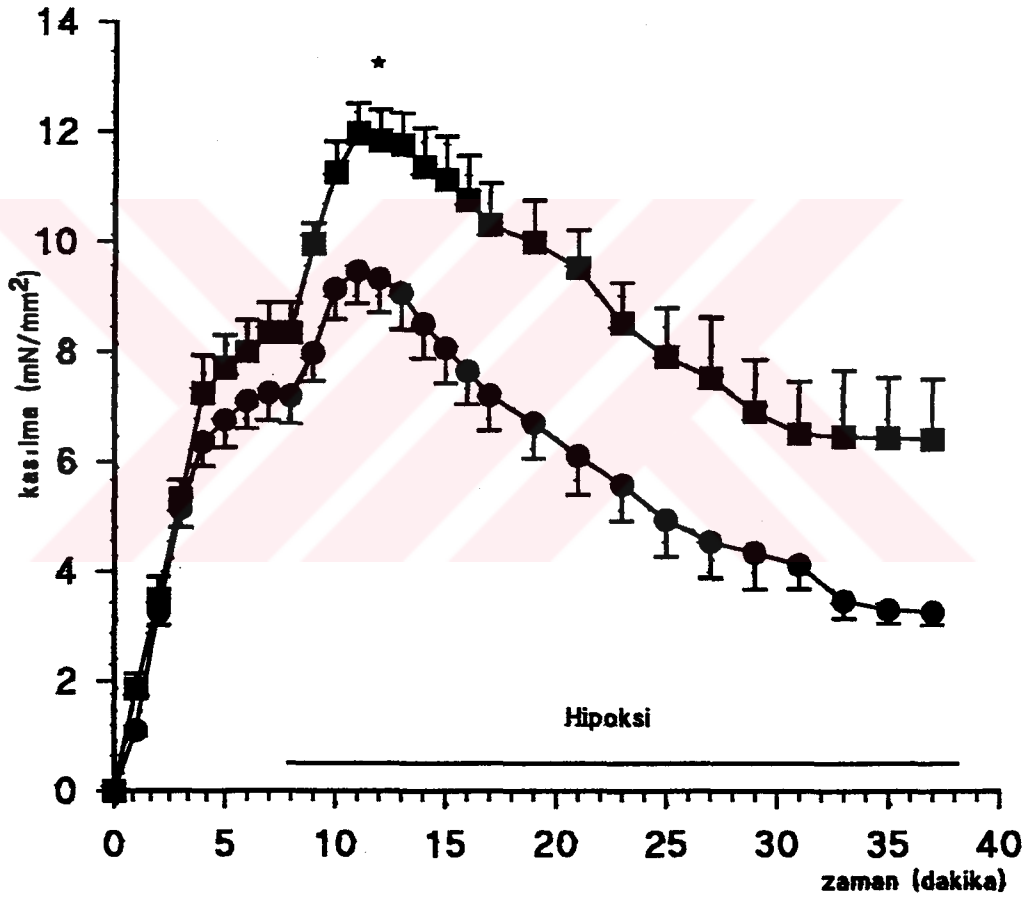
(* p< 0.05, karşılaştırmalar inkübasyon öncesi değerlerle Student's t testi kullanılarak yapılmıştır.)



Şekil 20:6 μM 5-HT ile prekontrakte geniş çaplı pulmoner arterlerde HPV üzerine genisteinin etkisi.● 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=7), ■ Genistein varlığında 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterde hipoksi uygulaması (n=7). Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)



Şekil 21: 6 μ M 5-HT ile prekontrakte geniş çaplı pulmoner arterlerde HPV üzerine trifostinin etkisi.● 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6), ■ Trifostin varlığında 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterde hipoksi uygulaması (n=6). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)



Şekil 22 6 μ M 5-HT ile prekontrakte geniş çaplı pulmoner arterlerde HPV üzerine sodyum orto vanadatın etkisi. ● 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=7), ■ 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde vanadat varlığında hipoksi uygulaması (n=7). Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)

IV.I.4. KOLERA TOKSİNİNİN HPV ÜZERİNE ETKİSİ

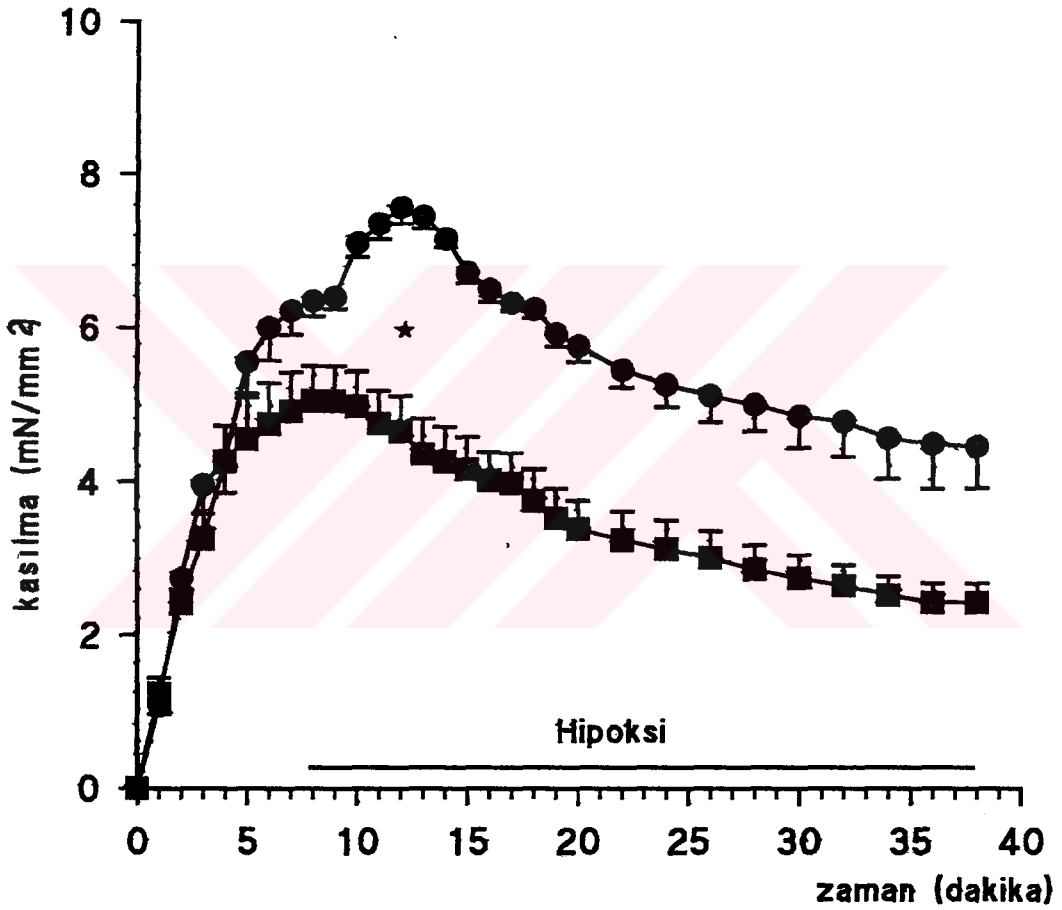
5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulamasına bağlı kasılma yanıtı (1.0 ± 0.2 mN/mm²), 2 µM kolera toksini ile 3 saat süreyle inkübasyon sonrası ortadan kalkmıştır (Tablo 10) (n=6). Kolera toksini ile inkübasyon 5-HT prekontraksiyonunu (6.4 ± 0.1 mN/mm²) (n=6) azaltmakla birlikte (5.1 ± 0.5 mN/mm²) (n=6) bu anlamlı bulunmamıştır(Şekil 23).

IV.I.5. KOLERA TOKSİNİ VE ORTOVANADATIN HPV ÜZERİNE ETKİSİ

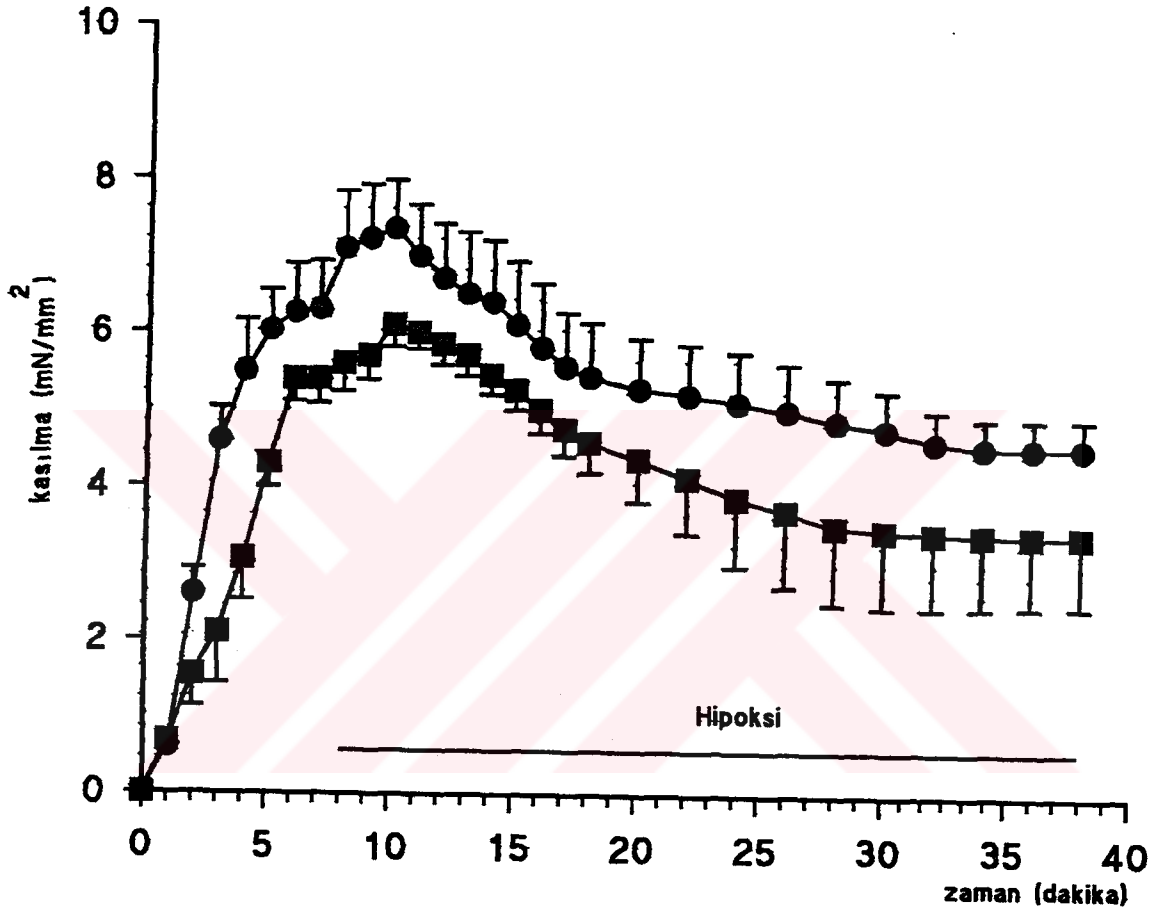
Kolera toksini ve ortovanadatın birlikte inkübasyonu 5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonu (1.1 ± 0.6 mN/mm²) bir miktar azaltmakla birlikte anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır (0.7 ± 0.2 mN/mm²) (n=4) (Tablo 10, Şekil 24).

IV.I.6. TETRAETİL AMONYUMUN (TEA) HPV ÜZERİNE ETKİSİ

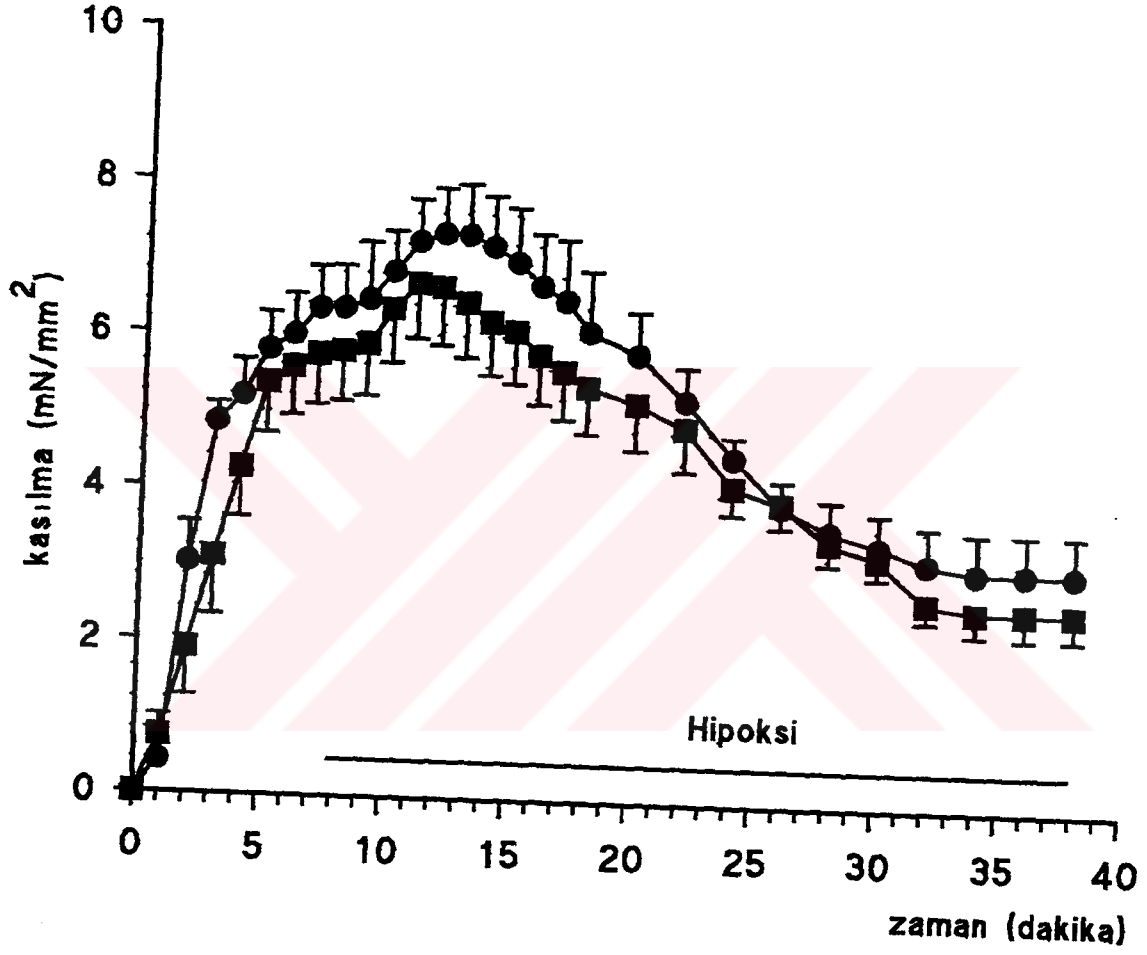
Nonspesifik bir potasyum kanal blokörü olan TEA deneylerde 20 mM konsantrasyonda kullanılmıştır. 5-HT ile prekontrakte arterlerde hipoksiye bağlı olarak oluşan kontraksiyon (1.0 ± 0.25 mN/mm²) (n=4) TEA ile 30 dakikalık inkübasyon sonrasında da farklılık göstermemiştir (0.9 ± 0.3 mN/mm²) (n=4) (Tablo 10). TEA inkübasyonu 5-HT prekontraksiyonunu da anlamlı olarak etkilememiştir (Şekil 25).



Şekil 23: 6 μ M 5-HT ile prekontrakte geniş çaplı pulmoner arterlerde HPV üzerine kolera toksininin etkisi. ● 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6), ■ Kolera toksini varlığında 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)



Şekil 24: 6 μ M 5-HT ile prekontrakte geniş çaplı pulmoner arterlerde HPV üzerine kolera toksini ve vanadatın birlikte inkübasyonunun etkisi. ● 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6) ■ Koler toksini ve vanadat varlığında varlığında 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * p < 0.05)



Şekil 25: 6 μ M 5-HT ile prekontrakte geniş çaplı pulmoner arterlerde HPV üzerine TEA'nın etkisi. ● 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=4), ■ TEA varlığında 5-HT ile prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=4).

IV.II. İZOLE KOYUN PULMONER VENLERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

IV.II.1.A. Dinlenme gerimindeki venler :

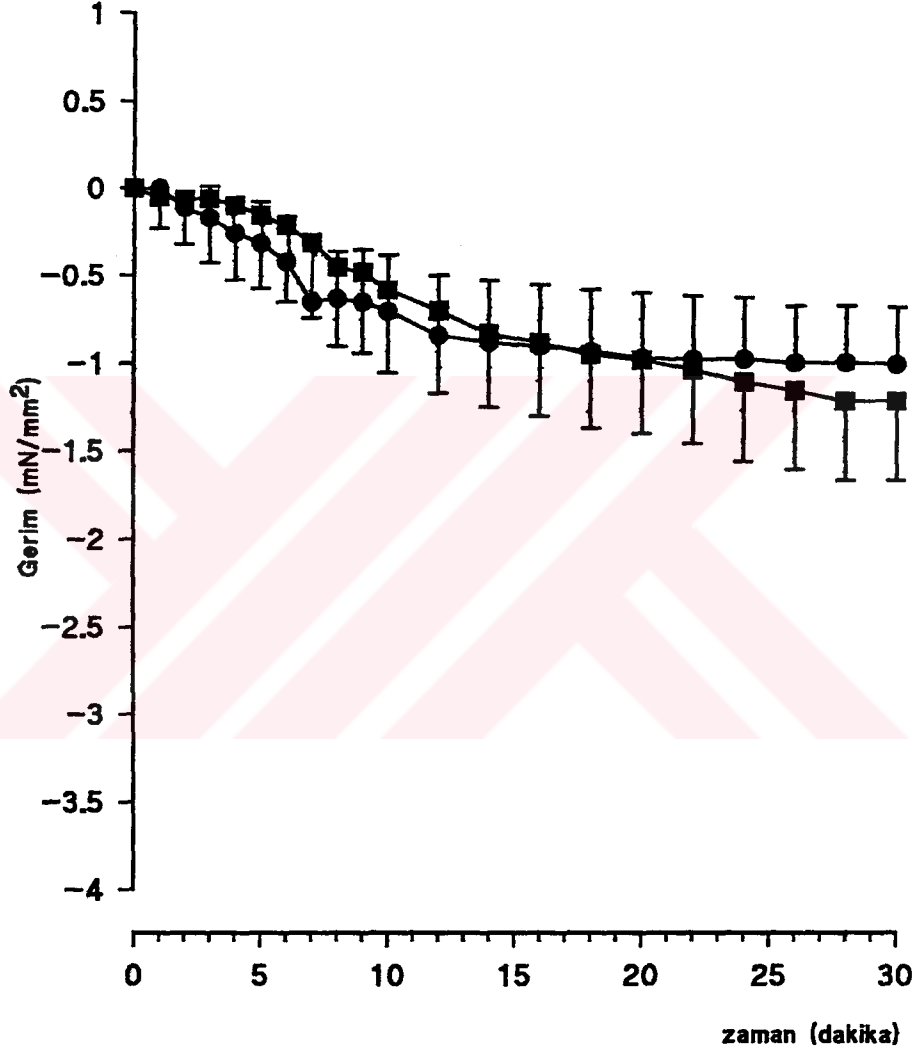
Dinlenme gerimindeki izole pulmoner venlerde yapılan deneylerde hipoksi uygulaması gerim kaybına neden olmuştur (-1.0 ± 0.4 mN/mm²) (n=6). Ama bu, normoksi boyunca venlerde oluşan gerim değişikliği ile karşılaştırıldığında anlamlı (0.6 ± 0.2 mN/mm²) (n=6) bulunmamıştır (Şekil 26) (Tablo 11).

Dinlenme gerimindeki izole pulmoner venlerde, tirozin kinaz inhibitörleri, genistein ve trifostin varlığında yapılan deneylerde 30 dakikalık hipoksi uygulaması sonunda, inkübasyon öncesine göre anlamlı bir gerim değişikliği saptanamamıştır. (Şekil 27, 28, Tablo 11). Buna karşın ortovanadatla inkübasyon, venlerde hipoksi uygulaması ile birlikte ilk dakikalarda anlamlı bir gerimin artışına neden olmuştur (1.66 ± 0.2 mN/mm²). Hipoksi uygulamasının sonunda da gerim, inkübasyon öncesi gerimden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 29 Tablo 11) (n=6).

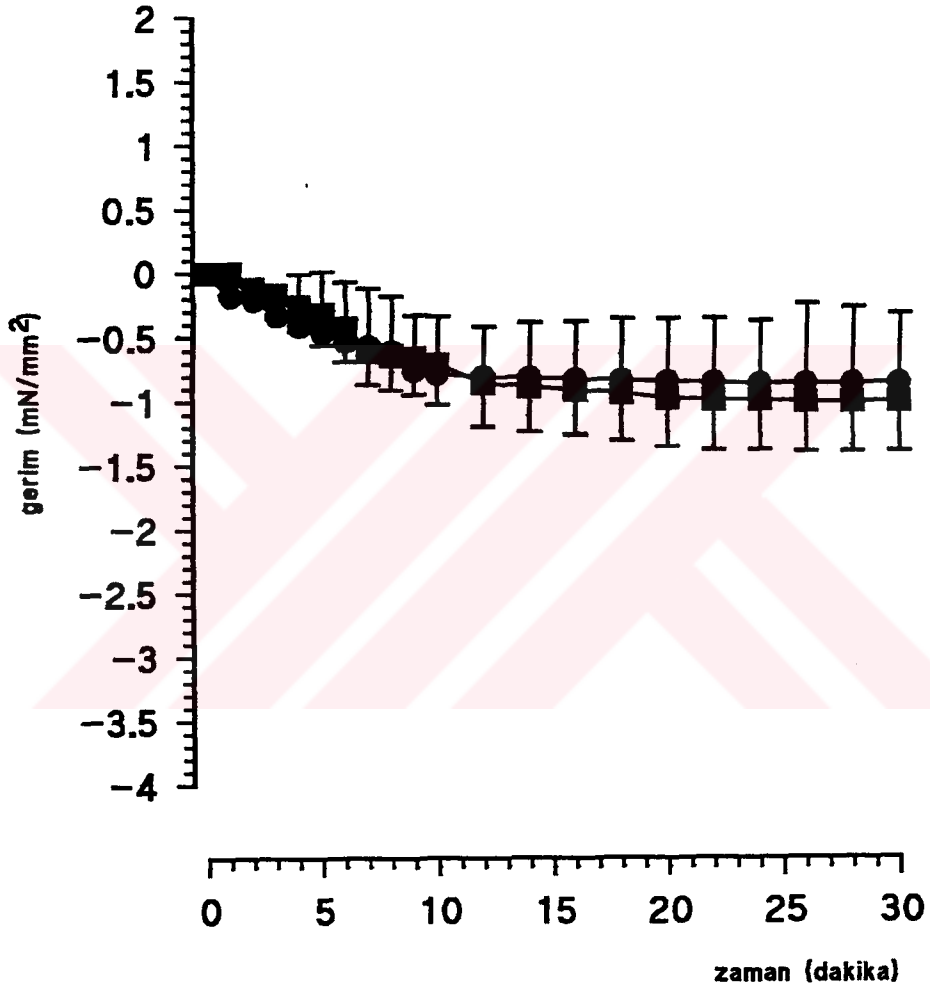
Tablo 11: Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde tirozin kinaz inhibitörlerinin ve ortovanadatın hipoksiye bağlı gerim kaybı üzerine etkisi.

	n	inkübasyon öncesi gerim (mN/mm ²) (30.dak)	inkübasyon sonrası gerim (mN/mm ²) (30.dak)
Kontrol	6	-1.0±0.4	-1.2±0.5
Genistein	6	-0.9±0.5	-1.1±0.3
Trifostin	6	-0.6±0.2	-1.0±0.3
Ortovanadat	6	-0.8±0.5	0.4±0.2*

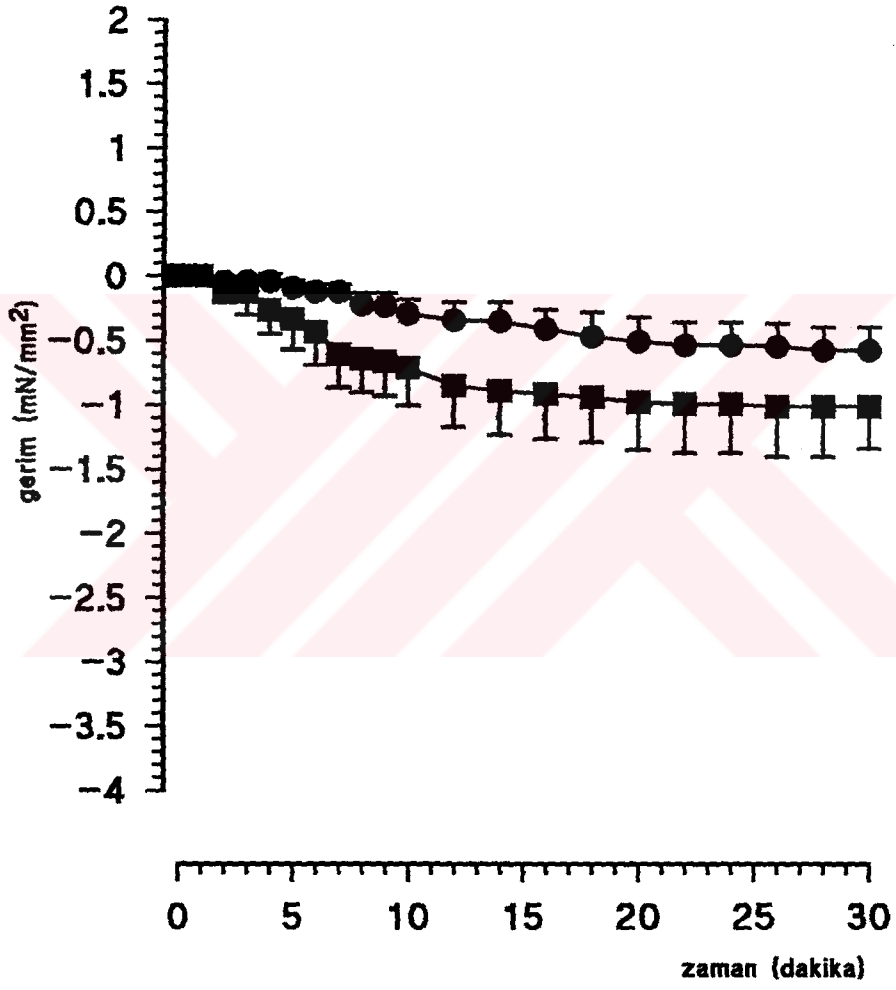
(* p< 0.05, karşılaştırmalar inkübasyon öncesi değerlerle Student's t testi kullanılarak yapılmıştır.)



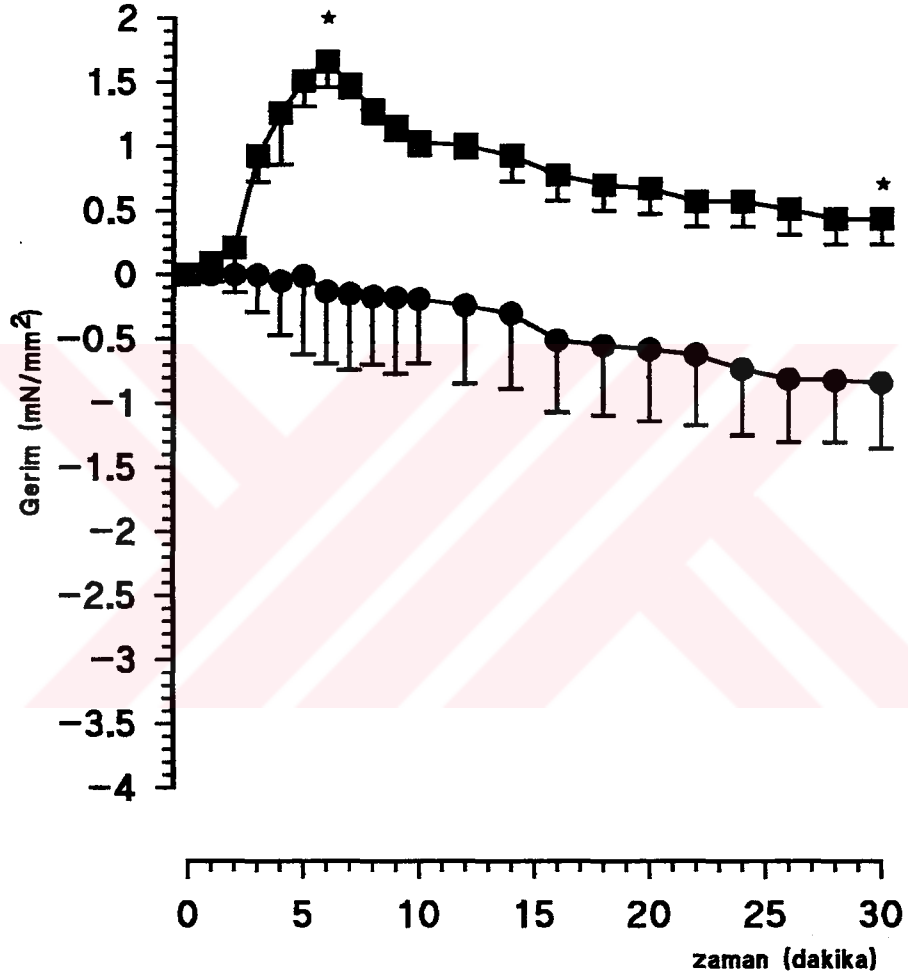
Şekil 26. Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulamasına bağlı gerim değişikliği ● Normoksi boyunca pulmoner venlerde oluşan gerim değişikliği (n=6), ■ Hipoksi uygulaması boyunca oluşan gerim değişikliği (n=6).



Şekil 27: Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulamasına bağlı gerim değişikliği üzerinde genisteinin etkisi ● Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6), ■ genistein varlığında dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6).



Şekil 28: Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulamasına bağlı gerim değışikliği üzerinde trifostinin etkisi ● Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6), ■ Trifostin varlığında dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6).



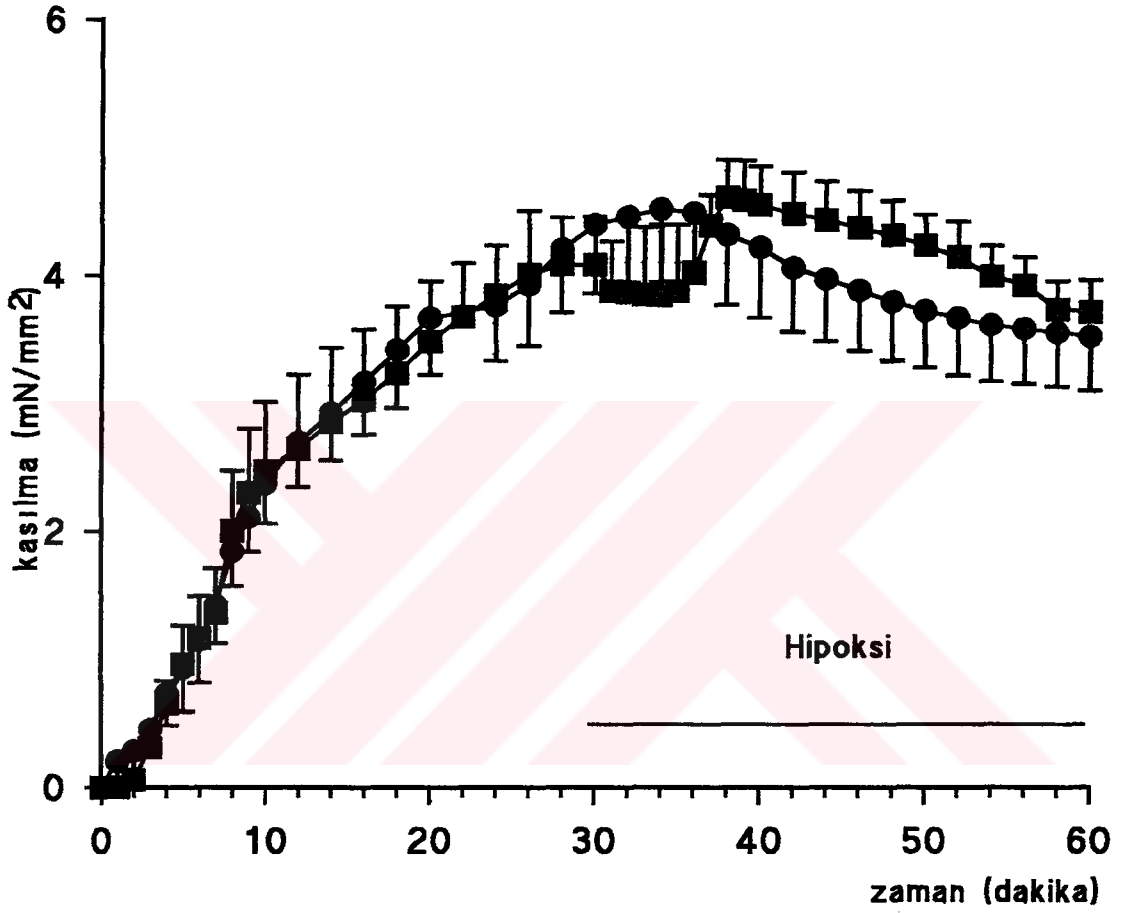
Şekil 29: Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulamasına bağlı gerim değişikliği üzerinde ortovanadatın etkisi ● Dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6), ■ Ortovanadat varlığında dinlenme gerimindeki pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6). (Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiş ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için Student's t testi kullanılmıştır. * $p < 0.05$)

IV.II.2.Prekontrakte venler:

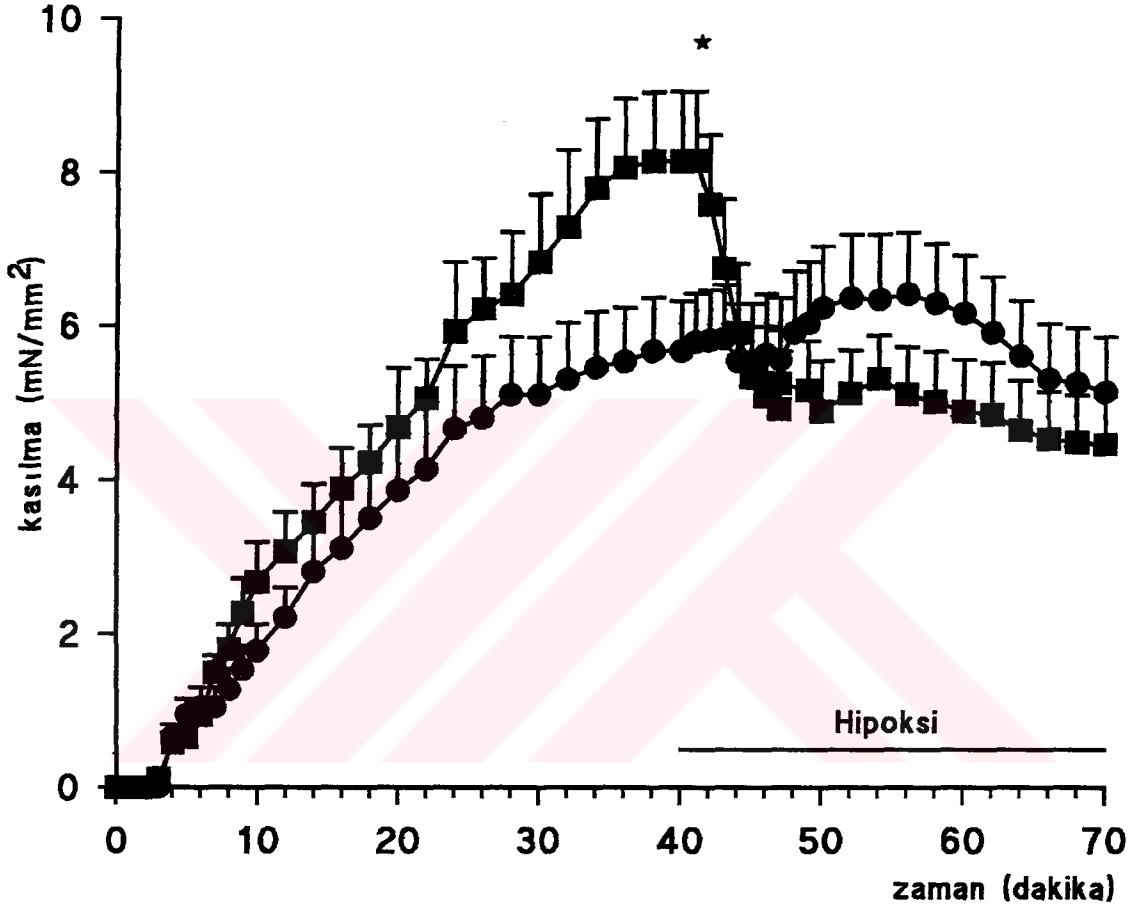
İzole koyun pulmoner venlerinde prekontraktıl agonist olarak G proteinleri üzerinde etkinliği bilinen NaF kullanılmış ve hipoksinin etkisi incelenmiştir. NaF ile prekontrakte edilen venlerde hipoksi uygulamasının ilk dakikalarında bir gerim kaybı izlenmiş, ama daha sonra bunu kasılma yanıtı izlemiştir (şekil 30). NaF prekontraksiyonu ile karşılaştırıldığında hipoksi uygulaması ile birlikte izlenen bu iki faz arasında istatistiksel bir anlamlılık yoktur.

Tirozin kinaz inhibitörleri ile yapılan deneylerde NaF prekontraksiyonu (4.1 ± 0.4 mN/mm²) (n=6) genisteinle azalmış (3.46 ± 0.6 mN/mm²) (n=6) ama bu anlamlı bulunmamıştır. NaF'ün oluşturduğu kasılma (5.2 ± 0.5 mN/mm²) (n=6) trifostin tarafından da azaltılmış (3.9 ± 0.6 mN/mm²) (n=6), olmakla birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ortovanadat ise NaF prekontraksiyonunda (4.38 ± 0.8 mN/mm²) (n=6) anlamlı bir artmaya neden olmuştur (8.12 ± 0.9 mN/mm²) (n=6) (şekil 31).

NaF ile prekontrakte dokularda genistein ve trifostin, hipoksi uygulamasının ilk dakikalarında oluşan gevşeme ve sonraki kasılma fazları üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşurmamıştır. Ortovanadat ile yapılan deneylerde ise hipoksi uygulamasının ilk dakikalarında oluşan gerim kaybı anlamlı olarak artmış (3.2 ± 0.5 mN/mm²) (n=6), daha sonraki kasılma fazı zayıf olarak izlenmiştir (şekil 31).



Şekil 30: NaF ile prekontrakte pulmoner venlerde hipoksi uygulamasına bağlı gerim değişikliği. ● Normoksi boyunca NaF ile oluşan kasılma (n=6), ■ NaF kasılmasını hipoksi uygulamasına bağlı olarak değişmesi (n=6).



Şekil 31: NaF ile prekontrakte pulmoner venlerde HPV üzerinde sodyum orto vanadatın etkisi ● NaF ile prekontrakte pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6), ■ Vanadat varlığında NaF ile prekontrakte pulmoner venlerde hipoksi uygulaması (n=6).

V.TARTIŞMA

Bu çalışmada farklı çaplardaki, koyun pulmoner arterlerinde hipoksinin etkisi incelenmiştir. Daha sonra dinlenme geriminde ve prekontrakte arterlerde genistein, trifostin gibi son zamanlarda geliştirilen selektif tirozin kinaz inhibitörleri ve orto vanadat kullanılarak tirozin kinaz/tirozin fosfataz dengesinin rolü değerlendirilmiştir. Hipoksik vazokonstriksiyonda G proteinlerinin önemi ise kolera toksini kullanarak araştırılmıştır. Son olarak, koyun izole pulmoner arterlerinde hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonda K⁺ kanallarının bir rolü olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ayrıca deneylerde izole koyun pulmoner venlerinde de hipoksinin etkisi incelenmiştir. Çalışmaların bu bölümünde dinlenme gerimindeki ve NaF ile prekontrakte venlerde hipoksiye bağlı gerim değişikliğinde tirozin kinaz/tirozin fosfataz dengesinin rolü değerlendirilmiştir.

V.1 İZOLE KOYUN PULMONER ARTERLERİNDE HPV

Koyun pulmoner arter ve venlerinde vazodilatör ve vazokonstriktör maddelere yanıt verirlilik açısından pulmoner damar yatağının bölgesel farklılıklar taşıdığı da önce gösterilmiştir⁸¹. İzole koyun pulmoner arterlerinde yaptığımız deneylerde, dar çaplı arterlerde hipoksi uygulamasının vazokonstriksiyona neden olduğunu saptanmıştır. (Şekil 10 a) Buna karşılık, dinlenme gerimindeki geniş çaplı pulmoner arterlerde ise hipoksiye bağlı gevşeme oluşmuştur (Şekil 11). Bu

bulgular hipoksinin asıl etki bölgesinin terminal bronşiooller çevresindeki dar çaplı pulmoner arterler olduğu şeklindeki çalışmaları¹¹⁵ destekler niteliktedir. Dar çaplı pulmoner arterlerin, geniş çaplılara göre pulmoner damar direncinin kontrolünde daha önemli bir işleve sahip oldukları da bildirilmiştir¹⁶⁵. Araştırmacılar, bir arterin yapısının farklı hücre popülasyonlarının bir mozayığı olduğunu göstermişlerdir⁶. Bu, hipoksi gibi bir uyarana karşı pulmoner damar yatağının farklı bölümlerinin için farklı yanıt verdiğini açıklamaktadır. Pulmoner damar yatağının fizyolojik ve farmakolojik uyaranlara verdiği farklı yanıtların, damar yatağının bölgesel özellikleri ile olan ilişkisinin aydınlatılması pulmoner hastalıkların tedavisinde o bölgelere özel ilaçların geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.

Pulmoner arterlerde hipoksinin etkisi parsiyel oksijen basıncına ve damarın ön gerimine bağlı olarak değişmektedir¹³⁹. Bu nedenle, hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonu izlemek için prekontraktıl bir madde kullanmak yararlı olmaktadır³⁰. Dolayısıyla bizim çalışmamızda izole koyun pulmoner arterlerinde HPV'yi izleyebilmek amacıyla NaF ve 5-HT prekontraksiyon amacıyla kullanılmıştır. NaF nonselektif bir G proteini aktivatörüdür ve etkisini hücre yüzeyinde herhangi bir reseptöre bağlanarak göstermemektedir¹⁷⁸. NaF'e bağlı olarak oluşan kasılma nifedipin varlığında inhibe olmaktadır¹⁷⁸. İntraselüller Ca^{+2} 'un NaF kasılmasında önemli olduğu ryanodinle yapılan deneylerde gösterilmiştir¹⁷⁸. Bizim çalışmamızda ise NaF ile prekontrakte edilen izole pulmoner arterlerde hipoksiye bağlı olarak bir gerim artışı saptanamamıştır (Şekil 13). Diğer taraftan kolera toksini ile yaptığımız deneylerde, G proteini aktivasyonun hipoksiye bağlı

vazokonstriksiyonu engellediği belirlenmiştir (şekil 23). Benzer olarak NaF'le prekontrakte edilen dokularda da G proteini aktivasyonu, HPV'nin ortaya çıkmamasını engelliyor olabilir. Bu arterlerde HPV'yi izleyemememizin bir nedeni de, daha önce KCl ile yapılan deneylerde gösterildiği gibi depolarizasyon ortamının, salınan kastırıcı mediyatrlere karşı düz kasın duyarlılığında azalma oluřturmasıdır³⁰.

5-HT'nin koyun pulmoner arterleri için güçlü bir kastırıcı olduğu bilinmektedir³⁰. 5-HT ile prekontrakte edilen koyun izole pulmoner arterlerinde, hipoksi hem dar hem de geniş çaplı pulmoner arterlerde kasılma oluşturmuştur. (şekil 10 b). İzole pulmoner arterlerde yapılan daha önceki çalışmalarda -tre bağlı olarak- hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonun ancak prekontraksiyon sonrasında izlenebildiğine ilişkin bulgular vardır¹³⁹.

Bulgularımıza göre hipoksik kasılma yanıtı, endotel bağımlı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Çünkü endoteli kazanmış pulmoner arterlerde hipoksi böyle bir yanıt oluşturamamaktadır. Bu sonuçlar izole koyun pulmoner arterlerinde daha önce yapılan çalışmalarla da uyumludur³⁰.

Deneilerimizde BK'ne bağlı endotel bağımlı gevşeme yanıtları hipoksik koşullarda anlamlı şekilde azalmıştır (Tablo 8). Tavşan pulmoner arterlerinde de hipoksinin endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını anlamlı şekilde azalttığı saptanmıřtır⁷³. Bunun nedeni, büyük bir olasılıkla hipoksinin endotel

kaynaklı EDRF/NO ya da diğer vazodilatörlerin bazal salınımını inhibe etmesidir.

V.1.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin HPV Üzerine Etkisi :

Damar düz kası hücrelerinde tirozin kinaz ile ilgili iki ayrı sinyal ileti yolağından söz edilmektedir. Birisi, hücre büyümesi proliferasyonu ve farklılaşmasından sorumlu, diğeri ise düz kasın kasılması ile ilişkilidir⁷². İntraselüler Ca^{+2} düzeylerinin yükselmesi, MHZK'nın aktivasyonuna neden olur. MHZ fosforilasyonu aktin-miyozin köprülerinin oluşumunda önemli bir basamaktır ve böylece düz kas kasılması gerçekleşmektedir⁷⁶. Diğer taraftan Tirozin kinaz enzimi pek çok vazoaaktif maddenin etkinliğinde önemli bir enzimdir. 5-HT, AII, ET ve karbakol gibi agonistlerin protein tirozin fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir^{84,164}. Hücreye Ca^{+2} girişi ve intraselüler depolardan Ca^{+2} boşalmasının düzenleyicisi olarak da tirozin kinazın rolüne ilişkin bulgular vardır¹⁶⁹.

Deneylelerimizde tirozin kinaz enziminin HPV'deki rolü araştırılmıştır. 5-HT ile prekontrakte dokularda, tirozin kinazı farklı mekanizmalarla inhibe ettiği bilinen iki enzim inhibitörü kullanılmıştır. Bu inhibitörlerden genistein, kompetitif bir inhibitördür ve diğer inhibitörlerden en az 15 kez daha potent olduğu gösterilmiştir¹⁰. Ancak, genisteinin kanal proteinleri üzerinde de etkili olduğuna ilişkin bulgular vardır¹²⁸. Trifostin ise bir psödosubstrattır ve tirozin kinaz enzimine daha spesifiktir⁴². Deneylelerimizde kullandığımız konsantrasyonlarda ($\leq 50\mu M$) genistein ve trifostinin kontraktıl yanıtları etkilediği, ancak protein kinaz C, sAMP bağımlı protein kinaz, Ca-

kalmodulin bağımlı kinaz, fosforilaz kinaz ve MHZ kinazı gibi kinazları etkilemediği bildirilmektedir^{4,42}.

Dinlenme gerimindeki arterlerde tirozin kinaz inhibitörleri hipoksi uygulamasına bağlı gerim kaybı üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturamamışlardır (Şekil 17,18). Oysa ortovanadat ile hipoksiye bağlı gerim kaybı önlenmiştir (Şekil 19). Bu sonuç dinlenme geriminde, tirozin kinaz enzimi ile ilişkili bir mekanizmadan çok ortovanadatın intraselüler Ca^{+2} düzeylerini arttırması ile ilişkili olabilir. Nitekim vanadat ve benzeri yapıdaki maddelerin Ca-ATPzı inhibe ederek hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin artmasına katkıda bulunabileceği bilinmektedir¹⁴⁷

Prekontrakte pulmoner arterlerdeki deneylerimizde tirozin kinaz inhibitörlerinin 5-HT'ye bağlı kasılmanın maksimumunu azalttığı izlenmiş ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 20,21). Bu bulgu sıçan pulmoner arterlerinde yapılmış bir başka çalışmanın bulguları ile uyumlu değildir¹⁰. Ancak bu araştırmacılar, çalışmalarında kullandıkları genistein ve trifostinin konsantrasyonlarının protein kinaz C inhibisyonuna da neden olabileceğini öne sürmektedirler. Tirozin kinaz inhibitörlerinin $PGF_{2\alpha}$ bağımlı kasılma üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, domuz koroner arterleri ve sıçan aortasında, genisteinin IC_{50} değerleri anlamlı olarak farklı bulunmuştur⁸⁹. Tüm bu bulgular, tirozin kinaz inhibisyonunun etkisinin türe ve damar parçasının özelliklerine göre değişebileceğini düşündürmektedir.

5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Oysa tirozin kinaz inhibitörleri ile inkübasyon sonrası hipoksiye bağlı vazokonstriksiyon tamamen ortadan kalkmaktadır (Şekil 20, 21). Bu bulgu HPV'de tirozin kinaz enziminin rolü olduğunu göstermektedir. Hipoksiye bağımlı kasılmanın MHZ fosforilasyonu ile orantılı olduğu gösterilmiştir¹⁸⁵. Sıçan pulmoner arterlerinde HPV'nin endotel bağımlı olan fazı için araştırmacılar, endotelden salınan kastırıcı faktörlerin arteriyel düz kas hücrelerinin Ca^{+2} duyarlılığını arttırdığını saptamışlardır. Buna bağılı olarak MHZ fosforilasyonu da artmaktadır. Araştırmacılar sıçan pulmoner arterlerinde hipoksiye bağılı kasılmanın endotel bağımlı fazının, PKC etkinliğinin inhibisyonundan etkilenmediğini ve MHZ fosforilasyonunun hipoksiye bağılı yanıtın ortaya çıkmasında son basamak olduğunu bildirmektedirler. Tirozin kinaz yolağının aktivasyonu ile MHZK yolağı arasında karşılıklı bir iletişim olduğu bilinmektedir⁷². Deneylemizimizin sonuçları tirozin kinaz inhibisyonu ile hipoksiye bağılı vazokonstriksiyonun ortadan kalktığını göstermektedir. Bu bulgu daha önceki çalışmaların sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, hipoksinin pulmoner arterlerde tirozin kinaz aktivitesini arttırdığı anlaşılmaktadır.

Orto vanadatla yapılan deneylerin bulguları da (Şekil 22) tirozin kinaz inhibitörleri ile elde edilen sonuçları desteklemektedir. Orto vanadat protein tirozin fosfataz aktivitesinin inhibisyonuna neden olmakta ve tirozin kinaz etkinliğini artırmaktadır⁷². Vanadatın EGF, AII gibi maddelerin kontraktil

etkinliğini arttırdığı da bilinmektedir⁸⁹ araştırmacılar tirozin kinaz/tirozin fosfataz dengesinin düz kas geriminin kontrolünde önemli bir rol oynadığına dikkat çekmektedir. Vanadatın hücrel tirozin fosforilasyonunu arttırması hücre içi Ca^{+2} düzeylerinde yükselmeye neden olmaktadır⁴³. Deneylerimizde orto vanadatın 5-HT kontraksiyonu üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır, ancak inkübasyon sonrası prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonu anlamlı biçimde arttırdığı saptanmıştır (Şekil 22). Tirozin kinaz inhibitörleri ile elde edilen bulguları destekleyen bu sonuç, hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonun tirozin kinaz aracılıklı mekanizma ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

V.1.2.Kolera Toksininin (CT) HPV üzerine etkisi:

Sistemik damarlarda olduğu gibi pulmoner arterlerde de fizyolojik, patofizyolojik ya da bir agoniste bağlı olarak direnç artışında, damarlardaki yapısal değişikliklerin, endoteldeki işlevsel ve yapısal farklılaşmaların, Ca^{+2} hareketinde anormalliklerin, MHZ'nin Ca^{+2} 'a duyarlılığının değişmesi gibi etkenlerin yanısıra G proteinlerinin işlev ve duyarlıklarında değişmelerin de rolü vardır³⁷. Pulmoner arterlerde hipoksiye yanıtta G proteinlerinin önemi daha önce araştırılmamıştır. HPV'de G proteinlerinin rolünü araştırmak amacıyla çalışmamızda CT kullanılmıştır. CT, G_s proteininin ADP ribozilasyonunu katalize ederek adenilat siklazı aktive etmektedir. Böylece sAMP oluşumunu arttırmaktadır. G_s uyarımının hücrede protein fosforilasyonunda rolü olduğu, iyon kanallarının aktivitesini etkilediği bilinmektedir¹²².

Elde ettiğimiz bulgular CT ile 3 saatlik inkübasyon sonucu prekontrakte izole pulmoner arterlerde HPV oluşmadığını göstermiştir (Şekil 23). Pulmoner arterlerde hipoksi-G proteini etkileşimini açıklayıcı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak CT' ye duyarlı G proteinleri-aracılıklı etki gösterdiği bilinen agonistlerle oluşan kontraksiyonun mekanizmasına yönelik bir araştırmada¹⁸⁶ AII ile stimüle olan IP₃ oluşumunun CT tarafından inhibe edildiği gösterilmiş ve araştırmacılar bunu sAMP düzeylerindeki artışa bağlamışlardır.

Prekontrakte pulmoner arterlerde CT ve ortovanadatın birlikte inkübasyonu sonrasında da HPV yanıtı bir miktar azalmış ama bu anlamlı bulunmamıştır (Şekil 24). Hipoksinin G_s proteini aracılığı ile hangi mekanizmaları tetiklediği ve bunun tirozin kinaz enzim aktivitesi ile olan ilişkisinin anlaşılması için adenilat siklaz-tirozin kinaz yolları arasındaki karşılıklı etkileşimin mekanizmasını çözümlenmeye yönelik daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

V.1.3. Tetraetilamoyumun (TEA) HPV üzerine etkisi:

pO₂' nin normoksik değerlerden hipoksik değerlere düşmesinin -sistemik arterlerin tersine- pulmoner arter düz kas hücrelerinde depolarizasyona neden olduğu bilinmektedir¹⁸³. Bu depolarizasyon sonrası hücreye dihidropiridine duyarlı Ca⁺² kanallarından Ca⁺² girişi artmakta ve bu da vazokonstriksiyona neden olmaktadır. HPV Ca⁺² kanal blokörleriyle engellenebilmektedir¹⁵. Ancak HPV'nin mekanizmasında endotel hücrelerinin ve endotelden salınan mediyatörlerin önemli

rolleri olduğu da ortaya çıkmıştır^{15,24}.

Hipoksinin membran kanalları ve proteinleri üzerindeki etkisine ilişkin önceki bulguları göz önüne alarak, bu çalışmada, K^+ kanal inhibisyonunun koyun izole pulmoner arterlerinde hipoksiye yanıtta bir rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla deneylerimizde nonselektif^{20,22} bir K^+ kanal blokörü olan TEA kullanılmış ve TEA ile inkübe edilen prekontrakte koyun izole pulmoner arterlerinde hipoksiye yanıtta anlamlı bir değişiklik oluşmadığı saptanmıştır (Şekil 25). Bu bulgu sıçan pulmoner arterlerinde yapılan bir başka çalışmayla benzerlik taşımaktadır¹⁷⁵. Ancak bu konuda yapılan çalışmalar birbiriyle uyumlu değildir. Normoksik koşullarda TEA, 4-AP gibi K^+ kanal blokörleriyle yapılan çalışmalarda K^+ akımı iletiminin akciğerlerde düşük direncin sürdürülmesinde önemli olduğu gösterilmiştir¹⁸³.

V. 2. İZOLE KOYUN PULMONER VENLERİNDE HİPOKSİ UYGULAMASI

Kan damarlarının farklı anatomik kaynakları, aynı farmakolojik uyarıya farklı yanıt alınmasına neden olmaktadır. Dolaşımdaki ya da lokal olarak salınan mediyatörler pulmoner damar direncini etkilemektedirler. Bu maddelere karşı oluşan yanıtta bölgesel farklılıkların önemi hem izole perfüze akciğerlerde hem de izole pulmoner arter ve venlerde gösterilmiştir⁸⁰.

Kuzu akciğerlerinde hipoksik koşullarda pulmoner venlerin total damar direncinin oluşumuna yarıdan fazla bir oranda katıldığı belirlenmiştir⁵⁰. Geniş

çaplı izole pulmoner venlerde yaptığımız deneylerde, dinlenme geriminde hipoksi uygulamasının damar geriminde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı saptanmıştır (Şekil 26). Hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonun asıl bölgesinin dar çaplı pulmoner damarlar olduğu gösterilmiştir⁵⁵. Bu, çalıştığımız geniş çaplı pulmoner venlerde neden vazokonstriksiyon izleyemediğimizi açıklamaktadır.

Dinlenme gerimindeki izole pulmoner venlerde tirozin kinaz enzim inhibisyonu hipoksiye bağlı yanıtı değiştirmemiştir (Şekil 27, 28). Oysa ortovanadat inkübasyonu, hipoksi uygulamasıyla birlikte venlerde gerim artışına neden olmuştur (Şekil 29). Pulmoner arterlerde yaptığımız deneylerde de benzer bir sonuç alınmıştır (Şekil 19). Bu, dinlenme gerimindeki izole pulmoner arter ve venlerde hipoksik koşullarda ortovanadatın tirozin kinaz aktivasyonundan bağımsız bir mekanizma ile etki gösterdiğini düşündürmektedir.

İzole pulmoner venlerde, HPV yanıtını izlemek amacıyla kullandığımız prekontraktıl agonistler stabil bir kasılma oluşturamamıştır. Pulmoner arterlerde vazokonstriksiyona neden olan 5-HT, venlerde kasılma oluşturamamış NA ise çok zayıf bir kontraksiyona neden olmuştur. HA ile ise stabil bir kontraksiyon sağlanamamıştır. Ancak bir tromboksan analogu olan U 46619'un pulmoner venler için iyi bir prekontraktıl agonist olabileceğini saptanmıştır. Benzer şekilde koyun pulmoner arter ve venlerinde bazı agonistlere bağlı yanıtlardaki farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada U 46619'un pulmoner venler için güçlü bir vazokonstriktör olduğu gösterilmiştir⁵⁵.

NaF ile prekontrakte edilen venlerde pO_2 ' bağımlı olarak hipoksi uygulamasının ilk dakikalarında vazodilatasyon, daha sonra ise vazokonstriksiyon izlenmiştir (Şekil 30). Ancak prekontraksiyonun plato değeri ile karşılaştırıldığında ilk fazda oluşan gevşeme ile daha sonraki kasılma yanıtı arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanamamıştır. NaF ile prekontrakte arterlerde ise hipoksiye bağlı böyle bir etki izlenmemiştir.

İzole pulmoner venlerde genistein ve trifostinle NaF'e bağlı kasılma yanıtı azalmış ama bu anlamlı bulunmamıştır Buna karşın ortovanadat varlığında NaF kasılması artmaktadır (Şekil 31). NaF' e bağlı kasılma üzerinde vanadatın bu etkisi daha önce gösterilmiştir¹⁷⁷. Bu, izole pulmoner venlerde G proteini aktivasyonu ile fosfatidil fosfataz etkinliğinin kontraktilitenin regülasyonundaki önemine dikkat çekmektedir. NaF ile prekontrakte pulmoner venlerde vanadat varlığında hipoksi uygulaması ile birlikte, oluşan gevşeme yanıtı artmıştır. Bu gevşeme yanıtından sonra oluşan kontraksiyon, vanadat uygulaması öncesi kasılma ile karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark saptanamamıştır. Nonspesifik bir G proteini aktivatörü olan NaF ile prekontrakte ettiğimiz venlerde elde ettiğimiz bu sonuçlar:

1. Pulmoner arter ve venlerde NaF kasılmasına farklı G proteinlerinin aracılık ediyor olabileceğini,
2. Hipoksi uygulamasına alınan yanıt açısından pulmoner arter ve venlerde farklı ikincil habercil mekanizmaların aktive olabileceğini düşündürmektedir.

Prekontrakte izole pulmoner venlerde reseptör bağımlı kasılma oluşturduğu bilinen bir prekontraktıl agonistle yapılacak çalışmalar HPV'nin mekanizmasının anlaşılmasında daha yararlı olacaktır.



Yab.
DOĞANCIYIÇI GENELİ

VİSONUÇ

Sonuç olarak deneylerimizin bulguları koyun izole pulmoner arterlerinde;

1. Hipoksi uygulamasına yanıtta pulmoner damar yatağının bölgesel farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur.
2. Genistein, trifostin ve sodyum orto vanadat ile yaptığımız deneyler HPV'nin tirozin kinaz aracılıklı bir mekanizma ile gerçekleştiğini göstermektedir.
3. İzole koyun pulmoner arterlerinde HPV mekanizmasında kolera toksinine duyarlı G proteinlerinin rolü olduğu belirlenmiştir.
4. Hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonda K^+ kanallarının rolü olmadığı saptanmıştır.
5. NaF ile prekontrakte edilmiş koyun izole pulmoner venlerinde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, pulmoner arter ve venlerde NaF kasılmasına farklı G proteinlerinin aracılık ediyor olabileceği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca pulmoner venlerde yaptığımız deneylerin bulguları hipoksi uygulamasına alınan yanıt açısından pulmoner arter ve venlerde farklı ikincil habercil mekanizmaların aktive olabileceğini düşündürmektedir.

VİLÖZET

Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon, akciğerlerde kan akımını az oksijenlenen bölgeden daha iyi oksijenlenen bölgeye yönelten intrapulmoner bir uyum mekanizmasıdır. Prekapiller arteriollerin hipoksiye bağlı olarak oluşan vazokonstriksiyonda başlıca etki bölgesi olduğu gösterilmiştir. Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon ayrıca geniş çaplı pulmoner arterlerle venlerde ve dar çaplı venlerde de gerçekleşmektedir ve bunun fizyolojik olarak önemli olabileceği ileri sürülmüştür.

Çalışmalarımızın ilk amacı dinlenme geriminde, 5-HT ve sodyum florür ile prekontrakte edilmiş pulmoner arterler ve venlerde hipoksinin etkisini belirlemektir. İkinci amaç hipoksik vazokonstriksiyonda G proteinlerinin rolünün saptanması ve genistein, trifostin gibi selektif tirozin kinaz inhibitörleri ile fosfatidil fosfataz aktivatörü orto vanadat kullanılarak hipoksik vazokonstriksiyonda tirozin kinaz yolağının öneminin aydınlatılmasıdır. Deneylelerimizde son olarak koyun pulmoner arterlerinde hipoksiye bağlı vazokonstriksiyonda K^+ kanallarının bir rolü olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Dinlenme gerimindeki dar çaplı pulmoner arterlerde hipoksi uygulamasına bağlı kasılma izlenirken geniş çaplı arterlerde hipoksi ile vazokonstriksiyon saptanamamıştır. Bu durum, hipoksi uygulamasına yanıtta pulmoner damar yatağının bölgesel farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Genistein ve trifostin hipoksik vazokonstriksiyonu önlerken, sodyum orto

vanadatın arttırdığı saptanmıştır. Bu sonuç hipoksik vazokonstriksiyonun tirozin kinaz aracılıklı bir mekanizma ile gerçekleştiğini göstermektedir. pO_2 'nin 96 mmHg'den 5 mmHg'ye düşmesi sonucu oluşan vazokonstriksiyonun kolera toksini ile inkübe edilen arterlerde oluşmaması, G_s proteinlerinin hipoksik yanıtta katılmadığını göstermektedir. K^+ kanallarının HPV'daki rolünün araştırılması için yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda nonselektif etki gösterdiği bilinen bir K^+ kanal blokörü olan TEA kullanılmıştır. Deneylerimizde TEA varlığında bir inhibisyon saptanamamıştır. Bu hipoksik vazokonstriksiyonun K^+ kanallarına bağlı olmadığını ortaya koymaktadır.

Hipoksinin başlamasıyla birlikte NaF ile prekontrakte edilmiş koyun izole pulmoner venlerinde bifazik bir yanıt oluşmuştur. Bu önce gevşeme ve bunu izleyen bir kasılma şeklindedir. Arter ve venlerde hipoksiye bağlı kasılmadaki bu farklılıklar, NaF kasılmasına farklı G proteinlerinin aracılık ediyor olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmalarımızın sonuçları hipoksik kasılmanın oluşumunda pulmoner arter ve venlerde farklı ikincil habercil mekanizmaların aktive olabileceğini göstermektedir.

VIII.SUMMARY

Hypoxic pulmonary vasoconstriction is an intrapulmonary adaptive mechanism in which circulating blood is diverted away from poorly ventilated to better ventilated region of the lung. It has been demonstrated that precapillary arterial are the important sites of hypoxic pulmonary vasoconstriction. Additionally this vasoconstriction occurs also in large pulmonary arteries, veins and small diameter veins, this may be physiologically important.

The first aim of our study is to demonstrate the effect of hypoxia in the sheep isolated pulmonary arteries and veins under resting force and when precontracted with serotonin or sodium flouride. The second aim is to determine role of G proteins in hypoxia induced vasoconstriction and clarify tyrosine kinase pathway using selective tyrosine kinase inhibitors genistein and tyrphostin and an activator phosphotidile phosphatase, sodium orto vanadat. The final aim of our experiments in sheep isolated arteries is to show the role of K^+ channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction.

Although we observed a contraction in a small diameter pulmonary arteries under resting force, there was no vasoconstriction in large diameter arteries. Therefore, our results indicate that pulmonary vascular bed show regional differences to hypoxia. Genistein and tyrphostin prevented and sodium orto vanadat increased hypoxia induced vasoconstriction. These results showed that tyrosine kinase pathway mediates hypoxic pulmonary vasoconstriction.

Vasoconstriction due to the lowering of pO_2 from 96 mmHg to 5 mmHg was prevented by preincubating of cholera toxin which indicates involvement of G_s proteins in the hypoxic responses. We used a K^+ channels antagonist, TEA nonselective at high concentrations to examine the relationship between K^+ channels and hypoxia. Our experiments demonstrated that there was no inhibition of hypoxic contractions in the presence of TEA. Therefore, these data showed hypoxia induced contraction was not dependent on K^+ channels.

Introduction of hypoxia induced a biphasic response with initial relaxation followed by contraction in NaF precontracted pulmonary veins. The differences in hypoxic contraction in arteries and veins suggests that different G proteins may mediate hypoxic contraction in pulmonary vascular bed. The results of our study indicate that different signal mechanisms may be activated for generation of hypoxic contraction in isolated pulmonary arteries and veins.

IX. KAYNAKLAR

1. ADEAGBO, A.S.O., MALIK, K.U.: Endothelium dependent and BRL 34915 induced vasodilatation in rat isolated perfused mesenteric arteries: role of G proteins, K⁺ and calcium channels, *Br. J. Pharmacol.*, 100, 427-437. (1991).
2. ALVAREZ, J., MONTENO, J., GARCIA-SANCHO, J.: Cytocrome p450 may link intracellular Ca⁺² store with plasma membrane influx, *Biochem. J.*, 274, 193-197. (1991).
3. ANDERSON, F.L., BROWN, A.M.: Pulmonary vasoconstriction elicited by stimulation of the hypothalamic integrative area for the defense reaction, *Circ. Res.*, 21, 747-756. (1967).
4. AKIYAMA, T., ISHIDA, J., NAKAGAWA, S., OGAWARA, H., WATANABLE, S., ITOH, N., SHIBUYA, M., FUKAMI, Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases, *J. Biol. Chem.*, 262, 5592-5595. (1987).
5. ARCHER, S.L., HUANG, J., HENRY, T., PETERSON, D., WEIR, E.K.: A redox based sensor in rat pulmonary vasculature, *Circ. Res.*, 73, 1100-1112. (1993).
6. ARCHER S.L: Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. *J.Clin. Med.* 127: 524-529. (1996).
7. ARNAULD, T., MICHELIS, C., ALEXANDRE, I., REMACLE, J.: Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells, *J. Cell. Physiol.*, 152:215-221. (1992).
8. ASCROFT, F. M: Adenosin 5'-triphosphate sensitive potassium channels, *Annu. Rev.Neurosci.*, 11, 97-118. (1988).
9. BAERTSCHI, A.J., TEAUGUE, W.G.: Alveolar hypoxia is a powerful stimulus for ANP release in conscious lambs, *Am.J.Physiol.*, 256, H990-H998. (1989).
10. BARMAN, S.A., PAULY, J.R., ISALES, C.M.: Canine pulmonary vasoreactivity to serotonin: role of protein kinase C and tyrosine kinase, *Am. J. Physiol.*, 41, H740-747. (1997).
11. BARNES P.J.: Neural control of human airways in health and disease, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134, 1289-2314. (1986).

12. BARNES P.J., CADIEUX A., CARSTAIRS J.R., GRENBORG B., POLAK J.M., RHODEN K.: Vasoactive intestinal peptide in bovine pulmonary artery: localization, function and receptor autoradiography. *Br. J. Pharmacol.* 89, 157-162. (1986).
13. BARNES P.J and LIU F.: Regulations of pulmonary vascular tone, *Pharm. Rev.* 47, 1,87-131. (1995).
14. BEAN P.B.: Two kind of calcium channels in canine arterial cells: Differences in kinetics, selectivity and pharmacology, *J. Gen. Physiol.*, 86, 1-30. (1985).
15. BENNIE, R.E., PACKER, C.S., POWEL, N.J., RHOADES, R.A.: Biophasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am. J. Physiol.* 261: L156-163. (1991).
16. BERRIDGE, M.J.: Inositoltrisphosphate and calcium signalling, *Nature.*, 361, 315-325. (1993).
17. BERKOV, S.: Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat. The necessary role of anjiotensin II, *Circ. Res.*, 35, 256-261. (1974).
18. BINBAUMER L., BROWN A.M.: G proteins and mechanisms of action of hormones, neurotransmitters and autocrine and paracrine regulatory factors. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141: S106-s114. (1990).
19. BISHOP J.M.: The circulatory effects of bradykinin in normal subjects and patients with chronic bronchitis, *Br. J. Pharmacol.*, 25, 456-459. (1965).
20. BRAYDEN, J.E., NELSON M.T.: Regulation of arterial tone by activation of calcium dependent potassium channels, *Science*, 256, 532-535. (1992).
21. BUCLEY, B.J., BARHOWSKY, A., DOLOR, J.R., WHORTON, A.R.: Regulation of arachidonic acid in vascular endothelium Ca^{+2} dependent and independent pathways, *Biochem. J.*, 280, 281-287. (1991).
22. CABELL, F., WEISS, D.S., PRICE, J.M.: Inhibition of adenosine induced coronary vasodilatation by block of large conductance Ca activated K^{+} channels, *Am. J. Physiol.*, 267, H1455-1460 (1994)
23. CATRAVAS, J.D., BUCCAFUSCO, J.J., KASHEF, H.: Effects of acetylcholine in the pulmonary circulation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231: 236-241, (1984).

24. CLAPP, L.H., GURNEY, F.M.: ATP sensitive K^+ channels regulates the potential pulmonary arterial smooth muscle cell, *Am. J. Physiol.*, 262, H916-H920. (1992).
25. CORNFIELD, D.N., STEVENS, T., McMURTY, I.F., ABMAN S.H.: Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary artery smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.*, 265, L53-L56. (1993).
26. CORNFIELD, D.N., STEVENS, T., McMURTY, I.F., ABMAN, S.H., RODMAN, D.M.: Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.*, 266, H1416-H1421. (1994).
27. CUTAIA, M.S., ROUNDS S.: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Physiological significance, mechanism and clinical relevance, *Chest*, 97(3), 707-717. (1990).
28. DEMİREL, E., LASKEY, E., PURKERSON, S., BREEMEN, VAN C.: The passive calcium leak in cultured porcine aortic endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 3, 1197-1203. (1993).
29. DEMİRYÜREK, A.T., WADSWORTH, R.M., KANE, K.A.: Pharmacological evidence for the role of mediators in hypoxia induced vasoconstriction in sheep intrapulmonary artery rings, *Eur. J. Pharmacol.*, 203, 1-8. (1991)
30. DEMİRYÜREK, A.T.: In vitro investigation of the mechanisms of hypoxia in pulmonary arteries, (Doktora tezi) University of Strathclyde Department of Physiology and Pharmacology. (1991).
31. DEMİRYÜREK, A.T., WADSWORTH, R.M., KANE, K.A.: Effects of hypoxia on isolated intrapulmonary arteries from sheep, *Pulm. Pharmacol.*, 4, 158-164. (1991)
32. DEMİRYÜREK, A.T., WADSWORTH, M., KANE, K.A., PEACOCK, A.J.: The role of endothelium in hypoxic constriction of human pulmonary artery rings, *Am. Respir. Dis.*, 147: 283-290. (1993)
33. DISALVO, J., STEUSLOFF, A., SEMENCHUK, L., SATOH, S., KOLQUIST, K., PFITZER, G.: Tyrosine kinase inhibitors suppress agonist-induced contraction in smooth muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190, 968-974. (1993)
34. DISALVO, J., PFITZER, G., SEMENCHUK, L.A.: Protein tyrosine phosphorylation, cellular Ca^{+2} and Ca^{+2} sensitivity for contraction of smooth muscle, *Can. J. Pharmacol.*, 75, 1434-1439. (1994).

35. DOMINICZAC, A.F., BOHR, D.F.: Mechanism of vasorelaxation, *Cardiovascular. Drug. Rev.*, 10, 243-258. (1992).
36. EARP, H.S., HUCKLE, W.R.: Intracellular calcium and regulations of agonists stimulated tyrosine kinase activity, *Can J. Pharmacol.*, 72 suppl.1, 39. (1994)
37. FLAVAHAN, N.A., VANHOUTTE, P.M.: G proteins and endothelial responses, *Blood Vessels*, 27, 218-258. (1990).
38. FLEMING, W.W.: The electrogenic Na-K pump smooth muscle: Physiologic and pharmacologic significance, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 202:129-149. (1980).
39. FLUCKIGER, J.P., NGYUGEN, P.V., LI, X.F., YANG, X.P., SCHIFFRIN, E.L.: Calcium phosphoinosid and 1,2 diacylglycerol responses of blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats to endothelin-1, *Hypertension*, 19, 743-748. (1992).
40. FURCHGOTT, R.F.: The role of endothelium in responses of vascular smooth muscle to drugs, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24,175-197. (1984).
41. FRID, M.G., MOISEEVA, E.P., STENMARK, K.R.: Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo, *Circ. Res.*, 75, 669-681. (1994).
42. GAZIT, A., YAISH, P., GILON, C., LEVITZKI, A.: Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors, *J. Med. Chem.*, 32, 2344-2352. (1989).
43. GNEGY, G. E.: Calmodulin in neurotransmitter and hormone action, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33, 45-70. (1993)
44. GOLL, H.M., NYHAN, D. P., GELLER, H.S., MURRAY, P.A.: Pulmonary vascular responses to anjiotensin in normocsic and hypoxic lamb lungs, *J. Appl. Physiol.*, 61, 1552-1559. (1986).
45. GRAVEN, K.K., ZIMMERMAN, E.W., DICKSON, G.L., WEINHOUSE, G.L., FARBER, H.W.: Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific. *J. Cell. Physiol* 157, 544-554. (1993).
46. GREENBERG B, KISHIYAMAMA S: Endothelium dependent and independent responses to severe hypoxia in rat pulmonary artery rings, *Am. J. Physiol.* 265, H1712-H1720. (1993).

47. GRYLEWSKI, R.J., KORBUT, R., OCETKIEWICZ, A.: Generation of protacycline by lungs in vivo and its release into the circulation, *Nature*, 273, 765-767. (1978).
48. HAAS, F., FOSTER, W.M., BERGOFISKY, E.H.: Direct effect of ouabain on the pulmonary vasculature and its enhancement of the vasoconstrictor response to hypoxia, *Prog. Respir.*, 9, 273-284. (1975).
49. HASUNUMA, K.D., RADMAN, D. M., McMURTY, I.F.: Effects of K⁺ channels blockers on vascular tone in perfused rat lung, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144, 884-887. (1987).
50. HAKIM, T.S., MICHEL, R.P., CHANG, H.K.: Partitioning of pulmonary vascular resistance by arterial and venous occlusion method, *J. Appl. Physiol.*, 52, 710-715. (1982).
51. HARADA, H., ISHIZAKA, A., YONEMARU, M., MALLICK, A.A., HATHERIL, R., ZHEHG, H., LILLY, M., O'HANLEY, P.T. and RAFFIN T.A.: The effects of aminophyline and pentoxyfyline on multiple organ damage after *E. Coli* sepsis, *Am.Rev.Res.Dis.*, 140, 947-980. (1989).
52. HAUGE, A.: Role of histamin in hypoxic pulmonary hypertension in rat. Blokade or potentiation of endogeneous amines or kinins and ATP, *Circ. Res.*, 22, 371-383. (1968).
53. HAYNES, J.J., ROBINSON, J., SAUDERS, L., TAYLOR, A.E., STRADA, S.J.: Role of cAMP dependent kinase in cAMP mediated vasodilatation, *Am. J. Physiol.*, 262, H511-H516.(1992).
54. HESS, P., LANSMAN, B., TSIEV, R.W.: Different modes of calcium channels gating behaviour favoured by dihydropiridine Ca antagonists and agonists, *Nature.*, 311, 538-544. (1984).
55. HILLER, C.S., GRAHAM, J., HANGER, C.C., GODBEY, P.S, GLENNY, W.R., WAGNER, W. JR.: Hyoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules, *J.Appl. Physiol.*, 82(4), 1084-1090. (1997)
56. HOHFELD, J., LIBEAU, F.U.: Pertussis toxin inhibits contraction but not endothelium dependent relaxation of rabbit pulmonary artery in response to acetylcholin and the other antagonists, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259, 260-264. (1989).
57. HOLLENBERG, M.D.: Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility, *TIPS.*, 15,108-114. (1994).

58. HOLLENBERG, M.D.: Tyrosine kinase-mediated signal transduction pathways and actions of polypeptide growth factors and G protein-coupled agonists in smooth muscle, *Mol. Cel. Biochem.*, 149, 77-85. (1995).
59. HOSHIO, Y., OBARA, H., KUSUNOKI, Y.F., IWAI, S.: Hypoxic contractile response in isolated human pulmonary artery: Role of calcium ion, *J. Appl. Physiol*, 65, 2468-2474. (1988).
60. HOSHIO, Y., MORRISON, K., VANHOUTTE, M.P.: Mechanisms of hypoxia vasoconstriction in the canine isolated pulmonary artery: role of endothelium and sodium pump, *Am. J. Physiol.*, 267, L120-L127. (1994).
61. HUCCKLE, W.R., PROCOP, C.A., DYR, C., HERMAN, B., EARP, H.S.: Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a Ca^{+2} dependent manner, *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6290-6298. (1990).
62. HUSSAIN, T., MUSTAFA, J.: Regulation of G proteins by adenosine recetor agonist in coronary artery, *Am. J. Pharmacol.*, 266, H1273-1279. (1994).
63. HYMAN, A.L., SPANHAKE, E.W., KADOWITZ, P.J.: Pharmacology of the pulmonary circulation, *Prog. Cardiol*, 11, 107-130. (1982).
64. HYMAN, A.L.: Neural regulation of pulmonary vascular bed, *Circulation*. 74 (suppl II), II D-II-E. (1986).
65. HYMAN, A.L., LIPPTON, L.H., KADOWITZ, P.J.: Methylene blue prevents hypoxic pulmonary vasoconstriction in cats, *J.Appl.Physiol.*, 66, 1513-1517. (1991).
66. IGNARRO, L.J., BYRNES, R.E., BURG, G.M., WOOD, K.S.: Mechanisms of endothelium dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP, *Am. J. Physiol.*, 253, H1074-1082. (1987)
67. IGNARRO, L.J., BYRNES, R.E., BURG, G.M., WOOD, K.S.: Endothelium dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein, *Circ. Res.*, 60, 82-92. (1987).
68. JABR, R., TOLAND, H., GELBAND, C.H., WANG, X.X.: Prominent role of intracellular Ca^{+2} stores release in hypoxic vasoconstriction of pulmonary artery, *Br. J. Pharmacol.*, 122, 21-30. (1997)
69. JIN, H., OPARIL, S., ANN, H.S., YANG, Y., JACKSON, R.M.: Hypoxia-induced inhibition of converting enzyme activity: role in vascular regulation, *J.Appl. Physiol.*, 63, 1012-1018 (1987).

70. JIN, N., RHOADES, A.R., PACKER, C.S.: Pulmonary arterial contraction: signal transduction, *Am. J. Physiol.*, 263, 73-78. (1992)
71. JIN, N., PACKER, C.S., ENGLISH, D., RHOADES, R.A.: Inositol triphosphate is involved in norepinephrine but not in hypoxia induced pulmonary arterial contraction, *Am.J. Physiol.*, 264, L160-L164. (1993).
72. JIN, N., RAFAT, A., SIDDIQUIR, A, ENGLISH, D., RHOADES, A.R.: Communication between tyrosine kinase pathway and myosin light chain kinase pathway in smooth muscle, *Am. J. Physiol*, 271, H1348-H1358. (1996)
73. JOHNSON, A.: PMA Induced pulmonary edema: mechanisms of the vasoactive response, *J.Appl. Physiol.*, 65, 2302-2312. (1988).
74. KADOWITZ, P.J., HYMAN, A.L.: Effects of sympathetic nerve stimulation on pulmonary vascular resistance in dogs, *Circ. Res.*, 32, 221-227. (1973).
75. KADOWITZ, P.J., KNIGHT, D.S., HIBSS, R.G., ELLISON, J.P., JOINER, P.D., BRODY, M.J., HYMAN, A.L.: Influence of 5- and 6-hydroxydopamine on adrenergic transmission and nerve terminal morphology in the canine pulmonary vascular bed, *Circ. Res.*, 39, 191-199. (1976).
76. KAMM, K.E and J.T, STULL.: The function of myosine light chain kinase phosphorylation in smooth muscle, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 25, 593-623. (1985)
77. KARIYA, K., TAKAI, Y.: Distinct function of down regulation sensitive and resistant type of protein kinase C in rabbit aortic smooth muscle cells, *FEBS Lett.*, 219, 119-124. (1987).
78. KATO, M., STAUB, N.J.: Response of small pulmonary artery to unilobar hypoxia and hypercapnia, *Circ. Res.*, 19, 426-439. (1966).
79. KAWAMURA, K., SMITH, T.L., ZHOU, Q., KUMMEROW, F.A.: Neuropeptide Y stimulates prostacycline production in porcine vascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 309-313. (1991).
80. KEATINGE, W.R.: Sodium flux and electrical activity of arterial smooth muscle, *J. Physiol.*, 194, 183-200. (1968).

81. KEMP, B.K., SMOLICH, J.J., COCS, T.M.: Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and vein, *Br. J. Pharmacol.*, 121,441-450. (1997).
82. KIRRS, G.E., CODINA, J. BYRNBAUMER, L., BROWN, A.M.: Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocyte, *Am. J. Physiol.*, 59, H820-H829 (1990).
83. KOMARU, T., WANG, Y., SATO, K., SEIGUCHI, N., SUGIMURA, A., KUMAGI, T., KANATSUKA, H., SHIRATO, K.: Pertussis toxin sensitive G proteins mediates coronary microvascular control during autoregulation and ischemia in canine heart, *Circ. Res.*, 75, 556-566. (1994).
84. KOIDE, M.Y., KAWAHARA, T., TSUDA, Y., ISHIDA, K.S., YAKOYAMA, M.: Endothelin-1 stimulates tyrosine phosphorylation and activates of two mitogen-activated protein kinases in cultured vascular smooth muscle cells, *J. Hypertens.*, 10, 1173-1182. (1992).
85. KOIKE, K., TAKAYANGI, I., OHASHI, M., NAKAZAWA, T., KUMAGAI, N., KISHII, K.I.: Ca-entry blockers, verapamil and diltiazem on α_1 -adrenoceptors in thoracic aorta, renal artery and portal vein from rabbit, *Gen. Pharmacol.*, 9, No 4 pp 541-545. (1988).
86. KOUREMBANAS, S., MASDEN, P.A., McQUILLAN, P.L., FALLER, D.V.: Hypoxia induced endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium, *J. Clin. Invest.*, 88, 1054-1057. (1991).
87. KOWITZ, L.K., ALESKOWITZ, T.D., SYLVESTER, J.T., FLAVAHAN, N.A.: Endothelium derived contracting factor and relaxing factors contribute to hypoxia response of pulmonary arteries, *Am. J. Physiol.*, 265, H1139-H1148. (1993).
88. LANIYONU, A.A., SAIFEDINE, M., AHMAD, S., HOLLENBERG, M.D.: Regulation of vascular and gastric smooth muscle contractility by pervanadate, *Br. J. Pharmacol.*, 113, 403-410. (1994).
89. LANIYONU, A.A., SAIFEDINE, M., YANG, S.G., HOLLENBERG, M.D.: Tyrosine kinase inhibitors and contractile action of G-protein-linked vascular agonists, *Can. J. Physiol., Pharmacol.*, 72,1075-1085. (1994).
90. LEACH, R., ROBERTSON, T.P., TWORT, C.H., WARD, J.P.T.: Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries, *Am. J. Physiol.*, 266, L223-L231. (1994).

91. LEE R.T, BROCK, T.A., TOLMAN, C., BLOCH, K.D., SIEDMAN, J.G., NEER, E.: Subtype specific increase in G protein alpha-subunit mRNA by interleukin-1 beta, FEBS Lett., 249,139-142 (1989).
92. LEE K.M, TOSKAS, K., VILLEREAL, M.L.: Inhibition of bradykinin and thapsigargin induced Ca^{+2} entry by tyrosine kinase inhibitors, J. Biol. Chem., 268, 9945-9948. (1993).
93. LEVINE, B.W., TALAMO, R.J., KAZEMI, H.: Action of metabolism of bradykinin in dog lung, J. Appl. Physiol., 34, 821-826 (1973).
94. LEVITZKI, A.: Tyrphostins. Tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissector of signal transduction, FASEB J., 6, 3275-3282 (1992).
95. LI, X.F., TRIGGLE, R.C.: Effect of pertussis and cholera toxin on adrenoceptor function in rat tail artery: differences in hypertension, Can. J. Physiol., 71, 791-799. (1996)
96. LINCOLN, T.M.: Cyclic GMP and mechanisms of vasodilatation, J. Pharmacol. Exp. Ther., 241, 479-502. (1989)
97. LINCOLN. T.M., CORNWEL. T.L., TAYLOR.A.E.: cAMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{+2} by cAMP in vascular smooth muscle cells, Am.J.Physiol., 258, C399-C400.(1990).
98. LINCOLN T.M, CORNWEL, T.L, RANDRIAMAMPITA C, TSIEN R.Y: Emptying of intracellular Ca^{+2} stores releases a novel second messenger that stimulates Ca^{+2} influx. Nature 364, 809-814. (1993).
99. LIU, X., BEE, D, EMERY, C.J., BARER, G.R: Possible interaction between NO synthase and cyclo-oxygenase in sustaining pulmonary vasodilation: isolated perfused rat and ferret lungs, J. Physiol., 4, 94-92. (1996).
100. LIPPTON, H.L, HAMARI, C., FENG, C.J., BAIQIANG, C., SUMMER, W.R.: Peptidergic regulation of the lung circulation, Crit. Care. Report., 1, 266-274. (1990).
101. LOW, A.M.: Role of tyrosine kinase on Ca^{+2} entry and refilling of agonist-sensitive Ca^{+2} stores in vascular smooth muscles, Can. J. Physiol. Pharmacol., 74, 298-304. (1996).
102. LUSHER, T.F., VANHOUTTE, P.M.: Endotelium-dependent responses to platelets and serotonin in spontaneously hyprtensive rat, Hypertension., 8 (supp III) II, 55-66. (1988).

103. MARRON, M.B., DAWSON, C.A.: Adrenal component to pulmonary hypertension induced by elevated cerebrospinal fluid pressure, *J. Appl. Physiol.*, 47, 153-160. (1979).
104. MARTIN, L.D., BARNES, S.D., WETZEL, R.C.: Acute hypoxia alters eicosanoid production of perfused pulmonary artery endothelial cell culture, *Prostaglandins.*, 43, 371-382 (1992).
105. MATHEW, R., OMAR, H.A., CHERY, P.D., GEWITZ, H.M., WOLIN, M.S.: Role of cGMP mechanisms in response of rat pulmonary arteries to hypoxia, *Am. J. Physiol.*, 263, H141-H146. (1992)
106. McCUMBER, M.W., ROSS, C.A., GLAXER, B.M., SAYDER, S.H.: Endothelin: Visualisation of mRNA by in situ hybridization provides evidence for local action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7285-7286. (1989).
107. McDONALD, T.F., PELZER, W., TRAUTHEN, N., PELZER, D.J.: Regulations of calcium channels in cardiac, skeletal and smooth muscle cells, *Physiol. Rev.*, 74, 365-507. (1994)
108. McLEAN, M.R., McCULLOCH, K.M., BAIRD, M.: Endothelin ET_A and ET_B receptor mediated vasoconstriction in the rat pulmonary arteries and arteriols, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 23, 838-845. (1994).
109. McMAHON, J.J., IGNARRO, L.J., KADOWITZ, P.J.: Influence of zaprinast on vascular tone and vasodilator responses in cat pulmonary vascular bed, *J. Appl. Physiol.*, 74, 1704-1711. (1993)
110. McMURTY, I.F., MORRIS, K.G.: Platelet-activating factor causes pulmonary vasodilation in the rat, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134, 757-762 (1986).
111. MICHAIL, J.R., YANG, J., FARRUKH, I.S., GURTHUR, G.H.: Protein kinase C mediated pulmonary vasoconstriction in rabbit: role of Ca⁺², AA metabolites and vasodilators, *J. Appl. Physiol.*, 74: 1310-1319. (1993).
112. MILLIGAN, G.: Techniques used in the identification and analysis of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins, *Biochem. J.*, 255:1-13. (1988).
113. MILLER, D.S., YAGHI, A., HAMILTON, J.T.: Role of arachidonic acid metabolites in hypoxic contractions of isolated porcine pulmonary artery and vein, *Exp. Lung. Res.*, 15, 213-222. (1989).

114. MURRAY, P.A., LADATO, R.F., MICHAEL, J.R.: Neural antagonists modulate pulmonary vascular pressure flow in conscious dogs, *J. Appl. Physiol*, 60 ,1900-1907. (1986)
115. NAGASAKA, Y., BHATTACHARYA, J., NANJO, S., GROPPER, M.A., STAUB, N.C.: Micropuncture measurements of lung microvascular pressure profile during hypoxia in cats, *Circ. Res*, 54, 90-95. (1984).
116. NAKAJIMA, Y., NAKAJIMA, S., INOUE, M.: Pertussis toxin-sensitive G proteins mediates substance P inhibition of potassium channels in brain neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3643-3647. (1988).
117. NEELY, C.F., HAILE, D., MATOT, I.: Tone-dependent responses to 5-hydroxytryptamin in the feline pulmonary vascular bed are mediated by two different 5-hydroxytryptamine receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264, 1315-1326. (1993).
118. NELSON, M.T., QUAYLE J.M: Physical roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle, *Am. J. Physiol.*, 268, C799-C822. (1995).
119. NEWMAN, K.B., MICHAEL, J.R., FELDMAN, A.M.: Phorbol ester-induced inhibition of beta adrenergic system in pulmonary endothelium role of a PTX sensitive protein, 1, 517-523. (1989).
120. NORTH, A.J., BRAAON, T.S., WELLS, L.B., CAMPBELL, W.B., SHAUL, W.P.: Hypoxia stimulates prostacyclin in newborn lamb pulmonary artery endothelium by increasing cyclooxygenase-1 protein, *Circ. Res.*, 75, 33-40 (1994).
121. NOON, J.P, RICE, P., BADESASARINI R.J.: Calcium leakage a cause of the resting tension in vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rat, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 75 (3), 1605-1607. (1978).
122. NOZAKI, SPERELAKIS, N.: Cholera toxin and G_s protein modulation of synaptic transmission in guinea pig mesenteric artery, *Eur. J. Pharmacol*, 197, 57-62. (1991)
123. OGAWA, S.M., KUWABARA, K., SHEREENIAVAS, C., BUTURA, S.K., STERN, D.: Hypoxia induced endothelial cells synthesis of membran-associated proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 88, 9897-9901. (1991).
124. OGATA, M., OHE, M., KATAYOSE, D., TAKISHIMA, T.: Modulatory role of EDRF in hypoxic vasoconstriction of isolated porcine pulmonary arteries, *Am. J. Physiol.*, 262, H691-H697. (1992).

125. OLSON, N., KRUSE-ELLIOTT, T., WHORTON, R., DODAM, J.R.: Pertussis toxin-sensitive G proteins mediates attenuates platelet activating factor-induced pulmonary hemodynamic alteration in pigs, *Am. J. Physiol.*, 264, L213-L221. (1993).
126. OPAKA, D.T.: A dual action of histamin on guinea pig lung vessels, *Br. J.Pharmacol.*, 45, 311-321. (1972).
127. ORTON, E.J., RAFFESTIN, B., McMURTY, I.F.: Proteine kinase influences rat pulmonary vascular reactivity, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141, 654-658. (1990)
128. PAILLART, C., CARLIER, E., GUEDIN, D., DARGENT, B., COURAUD, F.: Direct block of voltage-sensitive sodium channels by genistein, tyrosine kinase inhibitors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280, 521-526. (1997)
129. PALMER, R.M.J., FERRIDDGE, A.G., MONCADA, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature (London)*., 327, 524-526. (1987).
130. PANG, I.M., O'BRODOVICH, H.M., MELLINS, R.B., STALCUPS, A.: Bradykinin-induced increase in pulmonary vascular permeability in hypoxic sheep, *J. Appl. Physiol.*, 52, 370-375. (1982).
131. PANEK, R.L., MAJOR, T.C., HINGORANI, G.P., DOHERTY, M.A., TAYLOR, D.G.: Endothelin and sturcturally related analogues disstinguish between endothelin receptor subtypes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183, 1566-1571. (1992).
132. PRASADA, U.J.S., DENSLOW, N.D., BLOCK, R.E.: Hypoxia induces the synthesis of trophomyosin incultured porcine pulmonary artery endothelial cells, *Am. J. Physiol.*, 267, L271-L281. (1994).
133. POST, J., HUME, J., ARCHER, S., WEIR, E.: Direct role for potassium channel inhibition in pulmonary hypoxic vasoconstriction, *Am. J. Physiol.*, 262, C882-C890 (1992).
134. RAJ, U.J., CHEN, P.: Micropuncture measurements of microvascular pressures isolated lamb lung during hypoxia, *Circ. Res.*, 59,398-404. (1986).
135. RANDRIAMAMPTIA, R.Y., TSIEN, Y.: Emptying of intracellular Ca⁺² stores relase a novel small messenger that stimulates Ca⁺² influx, *Nature London.*, 364, 809-814. (1993)

136. RAKOTOARISOA, L., MIRONNEAU, C., SAYET, I., MIRONNEAU, J.: Guanin nucleotid binding protein modulates desmethoxyverapamil binding to calcium channels in vascular smooth muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259,164-168. (1991).
137. RENGASAMY, A., JOHNS, R.A.: Charectarization EDRF/NO synthase activity from bovine cerebellum and mechanisms of modulation by high and low oxygen tension, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259, 310-316. (1991).
138. RICHARDSON, J.B.: Nerve supply to the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 119, 785-802. (1979).
139. RODMAN, D.M., YAMAGUCHI, T., O'BRIEN, R., McMURTY, I.: Hypoxic vasoconstriction of isolated rat pulmonary artery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248 (3), 952-959. (1989).
140. RONCALLI, M, SPRINGALL, D.R., MAGGIONI, M., MORADOGHLI-HAFTVANI, A., WINTER, R.J.D., ZHAO, L., COGGI, G., POLAK, J.M.: Early changes in the calcitonin gene related peptide (CGRP) content of pulmonary endocrine cells concomitant with vascular remodeling in hypoxic rat, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 9, 467-474. (1993).
141. ROUNDS, S., McMURTY, I.F.: Inhibitors of oxidative ATP production cause transient vasoconstriction and block subsequent pressor responses in rat lungs, *Circ. Res.*, 48, 393- 400. (1981).
142. RUBANYI, G., VANHOUTE, P.: Hypoxia release a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium, *J. Physiol. Lond.*, 364, 45-46 (1985).
143. SABOUNI, M.H., HUSSAIN, T., CUSHING, D.J., MUSTAFA, J.: G proteins subserve relaxation mediated by adenosine receptors in human coronary artery, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 18, 696-702. (1991).
144. SADA, K., SHIRAI, M., NINOMIYA, I.: Vagally and acethylycolin-mediated constriction in small pulmonary vessels of rabbits. *J. Appl. Physiol.* 63, 1601-1609. (1987).
145. SALVETERA, G.C., RUBIN, J.L.: The influences of transmembrane sodium gradient on the responses pulmonary arteries to decreases in oxygen tension, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139, 933-939. (1989)
146. SALVETERA, G.C., GOLDMAN, F.W.: Acute hypoxia increases calcium in cultured pulmonary arterial myocytes, *Am. J. Physiol.*, 264, L323-L328. (1993).

147. SANCHEZ-FERRER, C.F., MARIN, J., LLUCH, M., VALVERDE, A., SALAICES, M.: Action of vanadate on vascular tension and sodium pump activity in cat isolated cerebral and femoral arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 93, 53-60 (1988)
148. SARGEANT, P., CLARKSON, W.D., SAGE, S.O., HEEMKERK, J.W.M.: Ca^{+2} influx evoked by Ca^{+2} store depletion in human platelets is more susceptible to cytochrome p450 inhibitors than receptor mediated Ca^{+2} entry, *Cell Calcium*, 13, 553-564 (1992).
149. SASAKI K, SATO M: A single G protein regulated K^+ channels coupled with dopamine, histamine and acetylcholine receptors, *Nature*, 325:259-262. (1987).
150. SCHWARTZ S.M, CAMPBELL G.R, CAMPBELL J.H: Replication of smooth cells in vascular disease. *Circ. Res.* 58: 427-444 (1986)
151. SHIMOKOWA, H., FAVAHAN, N.A., VANHOUTTE, P.M.: Loss of endothelial pertussis toxin sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries, *Circulation*, 83, 652-660 (1991).
152. SPIEGEL, A.M.: Heterotrimeric GTP-binding proteins: An expanding family of signal transducers, *Med. Res. Rev.*, 12(1), 55-71. (1994).
153. SOMYLO, A.P., SOMYLO, A.V.: Signal transduction and regulation in smooth muscle, *Nature.*, 372, 231-236. (1994).
154. STANBROOK, H.S., McMURTY, I.F.: Inhibition of glycolysis potentiates hypoxic vasoconstriction in rat lung, *J. Appl. Physiol.*, 55, 1467-1473 (1983)
155. STEVENS, T., MORRIS, K., McMURTY, I.F., ZAMORA, M., TUCKER, A.: Acute and long term TNF_{α} administration increases pulmonary vascular reactivity in isolated rat lungs, *J. Appl. Physiol.*, 73, 708-712. (1992).
156. STEVENS, T., MORRIS, K., McMURTRY, I.F., ZAMORA, M., TUCKER, A.: Pulmonary and systemic vascular responsiveness to TNF_{α} in conscious rats, *J. Appl. Physiol.*, 74, 1905-1910. (1993).
157. STEVENS, CORNFIELD, D.N., McMURTY, I.F., RODMAN, D.: Acute reduction in pO_2 depolarise pulmonary artery endothelial cell and decrease $[Ca^{+2}]_i$, *Am. J. Physiol.*, 266, H1416-1421. (1994).
158. STILES G.L.: Adenosine receptor: Structure, functional regulation, *TIPS.*, 87, 486-490. (1986).

159. SUBJECK, J.R., THUNG-TAI, S.: Stress protein synthesis of mammalian cells, *Am. J. Physiol.*, 250, C1-C7. (1986).
160. SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W.: The properties of an adenin ribonucleotid produced with cellular particules ATP, Mg^{+2} and ephinephrine or glukagon, *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 3608. (1957).
161. SZIDON, J.P., FISHMAN, A.P.: Participation of pulmonary circulation in the defence reaction, *Am. J. Physiol.*, 220, 364-370. (1981).
162. TAYLOR, A.E.: cAMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{+2} by cAMP in vascular muscle cells, *Am. J. Physiol.*, 258, C399-400. (1990).
163. TRIGGLE, C.R., TABRIZCHI, R.: Effects of in vivo treatment with pertussis and cholera toxin on pressor effects mediated by α -adrenoceptor agonist and vasopressin changes in hypertension, *J. Vasc. Med. Biol*, 3, 197-204. (1991).
164. TSUDA, T.Y. KAWAHARA, K., SHIL, M K., KOIDA, M., ISHIDA, Y., YOKOYAMA, M.: Vasoconstrictor, induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells, *FEBS. Lett.*, 285, 44-48. (1991).
165. VADULA, M.S., KLEINMAN, J.G., MADDEN, J.A.: Effect of hypoxia and norephinephrine on cytoplasmic free Ca^{+2} in pulmonary and cerebral arterial myocytes, *Am. J. Physiol.*, 265, L591-L597. (1993).
166. VANHOUTE, P.M.: Endothelium derived relaxing and contracting factors and coronary vasospasm, *Adv. Nephrol.*, 19, 3-16. (1990).
167. VOEKEL, N.F., REEVES, J.J.: Release of vasodilator prostaglandins, PGI_2 from isolated rat lung during vasoconstriction, *Circ. Res.*, 48, 207-213. (1981).
168. VON EULER, U.S., LILJESTRAND, G.: Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat, *Acta. Physiol. Scand.*, 12, 301-320 (1947).
169. VOSTAL, J.G., JACSON, W.L., SHULMAN, N.R.: Cytosolic and stored Ca^{+2} antagonistically control tyrosine phosphorylation of spesific platelet proteins, *J. Biol. Chem.*, 266, 16911- 16916. (1991).
170. VOSTAL, J.G., FRANTANTONI, J.G.: Econazole inhibits thapsigargin-induced platelets Ca^{+2} influx by mechanisms other than cytocrome p-450 inhibition, *Biochem. J.* 295, 525-529. (1993).

171. VOYNO-YASENETSKAYA, T.A., TKACHUK, V.A., CHEKNYOVAE, G., PANCHEUKO, M.P., GRIGORIAN, G.Y., VAVREC, R.J., STEWART, J.M., RYAN, U.S.: Guanine nucleotide dependent, pertussis toxin sensitive regulation phosphoinositide turnover by bradykinin in bovine pulmonary artery endothelial cells, *FASEB J.*, 3, 44-51. (1989).
172. WALKER, B.R., HAYNES, J.R., WANG, H.L., VOELKEL, N.F.: Vasopressin induced pulmonary vasodilatation in rats, *Am. J. Physiol.*, 257, H415-H422. (1989).
173. WALSH, M.P.: Calcium dependent mechanisms of regulation of smooth muscle contractions, *Biochem. Cell. Biol.*, 69, 771-800. (1991).
174. WANSTALL, J.C., HUGHES, I.E., O'DONNELL, E.R.: Evidence that nitric oxide from the endothelium attenuates inherent tone in isolated pulmonary arteries from rats with hypoxic pulmonary hypertension, *Br. J. Pharmacol.*, 114, 109-144 (1995).
175. WADSWORTH, R.M.: Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia, *TIPS*, 15, 47-53 (1994).
176. WADSWORTH, R.M., KANE, K.A.: Role of potassium channels in the response to hypoxia in rat intrapulmonary artery rings, *Br. J. Pharmacol.*, 301P (1996).
177. WEBER, L.P., CHOW, W.L., MOSHENKO, J., BELSHER, S., MacLEOD, K.M.: Pharmacological investigation of signaling mechanisms contributing to phasic and tonic component of the contractile response of rat arteries to noradrenaline, *Can. J. Pharmacol.*, 73, 594-601. (1995)
178. WEBER, P.L., CHOW, L.W., ABEBE, W., MacLEOD, M.K.: Enhanced contractile responses of arteries from streptozocin diabetic rats to sodium fluoride, *Br. J. Pharmacol.*, 118, 115-122. (1996).
179. WEIR, K., Mc MURTY, I., TUCKER, A., REEVES, J.T., GROVER, F.R.: Prostaglandin synthase inhibitors do not decrease hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Appl. Physiol.*, 41, 718-714. (1976).
180. WEIR, K., ARCHER, S.L.: The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of channels, *FASEB J.*, 9, 183-189. (1995)
181. WILKINS, M.R., ZHAO, L., AL-TUBULY, R.: The regulation of pulmonary vascular tone, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 42, 127-131. (1996).

182. YANG, S.G., SAIFEDOINE, M., HOLLENBERG, M.D.: Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of epidermal growth factor-urugastrone and other agonists in gastric smooth muscle, *Can. J. Pharmacol.*, 70, 85-93. (1992)
183. YUAN, X.J., GOLDMAN, W.F., TOD, M., RUBIN, L.J., BLAUSTEIN, M.: Hypoxia reduced potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes, *Am. J. Physiol*, 264, L116-L123. (1993).
184. ZHAO, Y., PACKER, S., RHOADES, R.A.: Pulmonary vein contracts in response to hypoxia, *Am. J. Physiol.*, 265, L87-L92. (1993).
185. ZHAO, Y., PACKER, S., RHOADES, R.A.: Hypoxia-induced pulmonary arterial contraction appears to be dependent on myosin light chain phosphorylation, *Am. J. Physiol*, 15, L768-L774. (1997).
186. ZHENG, Y.Y., BENISHIM, C.G. PANG, P. K. T.: Guanine nucleotide binding proteins may modulate gating of calcium channels in vascular smooth muscle, I. Studies with flunitrazepam, *J.Pharmacol. Exp.Ther.*, 250, 343-350.(1989).

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
FARMASÖTİK İZLENİM MERKEZİ

X.ÖZGEÇMİŞ

1967 Ankara doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Ankara'da tamamladım. 1984 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Lisans eğitimime başladım ve 1989 yılında mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım ve 1991 yılında Araştırma Görevlisi olarak atandım. 1992 yılında "Bazı antibiyotiklerin plazma ve doku konsantrasyonlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle tayini" adlı Yüksek Lisans tezini hazırladım ve Doktora eğitimime başladım. Şu anda Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.