

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNTERMEDİN'İN SIÇAN PULMONER VASKÜLER YATAĞA
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Uzm. Ecz. Hilmi Burak KANDİLCİ

Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2008

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNTERMEDİN'İN SIÇAN PULMONER VASKÜLER YATAĞA
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Uzm. Ecz. Hilmi Burak KANDİLCİ

Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Bülent GÜMÜŞEL

ANKARA
2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. İnci Şahin-Erdemli
(Hacettepe Üniversitesi)



Danışman:

Prof. Dr. Bülent Gümüşel
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Can Pekiner
(Hacettepe Üniversitesi)



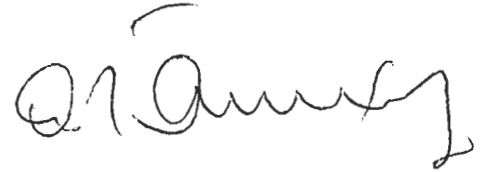
Üye:

Prof. Dr. Alper B. İskit
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. A. Tanju Özçelikay
(Ankara Üniversitesi)



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde yol gösterici katkıları ile tezimi yönlendiren hocam Prof. Dr. Bülent Gümüşel'e teşekkür ederim. Tezimin gelişmesinde katkıları olan Prof. Dr. İnci Şahin Erdemli ve Prof. Dr. Alper İskit'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütmeme izin veren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Serdar Uma'ya teşekkür ederim.

Tezimin kimyasal maddelerini temin ederek büyük destek sağlayan Dr. Howard Lippton'a teşekkür ederim.

Son olarak tüm çalışmalarımnda beni her zaman destekleyen eşim Tuğba'ya teşekkür eder, bu doktora tezini ona ithaf ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B. 08.T05.102.004).

ÖZET

Kandilci, H.B., İntermedin'in sıçan pulmoner vasküler yatağa etkilerinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2008. Bu tez çalışmasında, Krebs Henseleit solüsyonu ile perfüze edilen izole sıçan akciğer damar yatağında ve izole sıçan ana pulmoner arterinde (PA) intermedin peptidinin (rIMD) etkileri araştırıldı. Ayrıca, pulmoner hipertansiyon (PHT) oluşturulmuş sıçanlarda aynı vasküler yapılarda rIMD'in etkileri incelendi. U-46619 ile perfüzyon basıncı yükseltildiğinde, rIMD'in bolus enjeksiyonları perfüzyon basıncını doza bağımlı olarak azalttı. rIMD'in pulmoner perfüzyon basıncını düşürücü etkisi *N*⁰-Nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) ve CGRP₈₋₃₇ ile azalırken meklofenamat ve glibenklamid ile değişmedi. rIMD'in pulmoner perfüzyon basıncını düşürücü etkisine karşı desensitizasyon gelişmedi. PA'da U-46619 ile ön kasılma oluşturulduğunda, rIMD konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtı oluşturdu. rIMD'in gevşetici etkisi endotel tabakasının tahrip edilmesi, L-NAME, L-ornitin^w-asetamidin hidroklorür (L-NIO), 1H-[1,2,4] oksadiazolo [4,3-a] kinoksalin-1-on (ODQ), Rp-8-Br-PET-cGMPs, tetraetilamonyum, iberitoksin, KCl önkasılması ve kolera toksini ile azalırken meklofenamat, glibenklamid, apamin, SQ22536 ve KT5720 ile değişmedi. PA'da rIMD'in gevşetici etkisinin CGRP₈₋₃₇, hADM₂₂₋₅₂ ve rIMD₁₇₋₄₇ gibi sırasıyla CGRP, AM ve IMD reseptör antagonistleri ile anlamlı olarak azalması bu peptidin farklı endotelial kalsitonin reseptörü benzeri reseptör (CL)'lere seçici olmayan bir şekilde etki ettiğini akla getirmektedir. Bu sonuçlar, rIMD'in endotelde CL aracılı nitrik oksit salıvererek guanilat siklaz enzim aktivasyonu yaptığını ve buna bağlı protein kinaz G aracılı BK_{Ca} aktivasyonu ile PA'da gevşeme yanıtı oluşturduğunu düşündürmektedir. PHT'lu sıçanlardan elde edilen akciğerlerde rIMD ve asetilkolin (ACh) ile elde edilen pulmoner perfüzyon basıncını düşürücü etki kontrole göre değişmedi. PHT'lu sıçanlardan elde edilen PA'da rIMD ve ACh gevşeme yanıtları ise kontrole göre azaldı. PHT'lu sıçan akciğerlerinde ve izole PA'da rIMD veya ACh ile elde edilen gevşeme yanıtları arasındaki bu fark PHT'dan akciğerin farklı damar segmentlerinin farklı şekilde etkilendiklerini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: İntermedin/adrenomedullin-2, pulmoner damar yatağı, nitrik oksit, CGRP reseptörleri

ABSTRACT

Kandilci, H.B., Studies on the effects of intermedin on pulmonary vascular bed, Hacettepe University Health Sciences Institute PhD Thesis in Pharmacology, Ankara, 2008. In the present study, the effects of rat intermedin (rIMD) were investigated in the Krebs Henseleit perfused isolated rat lung and isolated main pulmonary artery (PA). The effects of rIMD on the same vascular tissues were also examined in pulmonary hypertensive (PHT) rats. Perfusion pressure which was pre-increased with U46619 was decreased by bolus injections of rIMD in a dose-dependent manner. Pretreatment with N_{ω} -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and CGRP₈₋₃₇ but not meclofenamate and glybenclamide significantly reduced the pulmonary vasodilator responses to rIMD. The pulmonary vasodilator responses to rIMD did not undergo desensitization. When PA was pre-contracted with U-46619, concentration-dependent relaxation was elicited by rIMD. rIMD induced relaxation in PA was inhibited by endothelium removal, L-NAME, L-ornitin^ψ-asetamidin hidroklorür (L-NIO), 1H-[1,2,4] oksadiazolo [4,3-a] quinoksalin-1-one (ODQ), Rp-8-Br-PET-cGMPs, tetraethylammonium, iberiotoxin, precontraction with KCl and cholera toxine while meclofenamate, glybenclamide, apamin, SQ22536 and KT5720 were without effect. Since rIMD induced relaxation in PA was significantly reduced by CGRP₈₋₃₇, hADM₂₂₋₅₂ and rIMD₁₇₋₄₇, it may be thought that this peptide induces relaxation by acting in an indiscriminant manner and possibly on different endothelial calcitonin receptor like receptors (CL). The present data suggest that endothelial CL cause nitric oxide release that activate guanylate cyclases which is then followed by protein kinase G mediated BK_{Ca} activation resulting in PA relaxation. The pulmonary vasodilator responses to rIMD and acetylcholine (ACh) was not different in pulmonary hypertensive rat lungs compared with controls. On the other hand, rIMD and ACh induced relaxant responses were diminished in PA rings obtained from PHT rats. The difference in rIMD and ACh response between whole lungs and PA rings brings to mind that PHT influences distinct vascular segments of lung in dissimilar ways.

Key words: Intermedin/adrenomedullin-2, pulmonary vascular bed, nitric oxide, CGRP receptors

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve hipotez	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalsitonin ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid ailesi	3
2.1.1. Kalsitonin ve CGRP	3
2.1.2. Amilin	3
2.1.3. Adrenomedullin	3
2.1.4. İntermedin/Adrenomedullin-2 (IMD/AM2)	5
2.1.4.1 IMD/AM2'nin bulunuşu, biyosentezi ve doku dağılımı	5
2.1.4.2. Fizyolojik etkileri	8
2.2. Kalsitonin geni ile ilişkili peptid reseptörleri	10
2.3. Peptidlerin vazodilatör mekanizmaları	12
2.3.1. Amilin	12
2.3.2. CGRP	12
2.3.3. Adrenomedullin	13
2.4. Diğer endojen nöropeptidlerin pulmoner dolaşımdaki rolleri	14
2.5. Pulmoner hipertansiyon (PHT)	15

2.6.	Pulmoner hipertansiyon tedavisinde alternatif yaklaşımlar	16
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1.	İzole sıçan akciğer perfüzyonu	19
3.2.	İzole organ banyosu	19
3.3.	Kronik hipoksi ile indüklenmiş pulmoner hipertansiyon modeli	20
3.4.	Kullanılan solüsyonlar ve maddeler	22
3.5.	Data analizi	23
4.	BULGULAR	24
4.1.	İzole sıçan akciğerinde pulmoner vasküler rezistans (PVR)'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra CGRP ve rIMD'in PAB'ına etkileri	24
4.2.	İzole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisinde NO'in katkısı	24
4.3.	İzole sıçan akciğeri'nde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisinde siklooksijenaz ürünleri ve K_{ATP} kanallarının rolü	27
4.4.	İzole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra CGRP ve rIMD'in PAB'ını düşürücü yanıtları üzerine CGRP ₈₋₃₇ 'nin etkisi	27
4.5.	İzole sıçan akciğeri'nde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD ve CGRP'nin desensitizasyon oluşturma potansiyelleri	27
4.6.	İzole sıçan ana pulmoner arter (PA) halkalarında submaksimal kasılma oluşturan K^+ ve U-46619 konsantrasyonlarının hesaplanması ve CGRP ailesi peptidlerinin oluşturdukları pulmoner damar gevşetici etkilerin incelenmesi	31
4.7.	PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında NO, siklooksijenaz ürünleri ve K_{ATP} kanallarının rolü	35

4.8.	PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarına IMD_{17-47} 'nin değişik konsantrasyonlarının ve AM, CGRP reseptör antagonistlerinin etkisi	35
4.9.	PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında G proteinlerinin rolü	40
4.10.	PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında siklik nükleotidlerin (cAMP, cGMP) rolü	40
4.11.	PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında fosfodiesteraz enzimlerinin (PDE 3, 4, 5) rolü	43
4.12.	PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında protein kinaz A ve G (PKA, PKG)'nin rolü	43
4.13.	PA'de rIMD, CGRP, AM ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında K^+ kanallarının rolü	46
4.14.	PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında kalsiyum ile aktive olan K^+ kanallarının rolü	46
4.15.	Pulmoner hipertansiyon grubunda rIMD'in izole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra PAB'na ve U-46619 ile önkasılma oluşturulmuş PA halkaları üzerine etkisi	49
5.	TARTIŞMA	52
6.	SONUÇ VE YORUM	63
	KAYNAKLAR	64
	EK-Bu tez çalışmasının sonuçlarının sunulduğu yayınlar ve bildirimler	90

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AngII	Anjiotensin-II
AM	Adrenomedullin
ANP	Atriyal natriüretik peptid
BK _{Ca}	Büyük kondüktanslı kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı
BNP	Beyin natriüretik peptid
cAMP	3',5'- siklik adenzin monofosfat
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
cGMP	3',5'-siklik guanozin monofosfat
CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
CNP	C-tipi natriüretik peptid
CL	Kalsitonin reseptör benzeri reseptör
CT	Kalsitonin reseptörü
CTX	Kolera toksini
EDHF	Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon yapan faktör
eNOS	Endotel kaynaklı nitrik oksit sentaz
ET-1	Endotelin-1
ET-3	Endotelin-3
G proteini	GTP'ye bağımlı düzenleyici proteinler
G _s	G proteini stimülatör tipi
G _i	G proteini inhibitör tipi
G _{q/11}	G proteini q/11 alt tipi
G ₀	G proteini 0 alt tipi
I/R	İskemi-reperfüzyon
IMD/AM2	İntermedin/Adrenomedullin2
IP ₃	İnositoltrifosfat
icv	İntraserebroventriküler
ip	İntraperitoneal
iv	İntravenöz
K _{ATP}	ATP'ye duyarlı potasyum kanalı
L-NAME	N ⁰ -Nitro-L-arginin metil ester
L-NIO	L-ornitin ^ψ -asetamidin
L-NMMA	N ^G -mono-metil-L-arginin
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NO [·]	Nitrik oksit

PA	Ana pulmoner arter
PAB	Ana pulmoner arter basıncı
PDE	Fosfodiesteraz enzimi
PHT	Pulmoner hipertansiyon
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PKG	Protein kinaz G
PLC	Fosfolipaz C
PVR	Pulmoner vasküler rezistans
PYY	Peptid tirozin Y
RAMP	Reseptör aktivitesini modifiye eden protein
RIA	Radyoimmünassay
rIMD	Sıçan intermedini
SK _{Ca}	Küçük kondüktanslı kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı
SP	P maddesi
TEA	Tetraetilamonyum
VIP	Vazoaktif intestinal peptid

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Bölünme bölgeleri gösterilmiş 148 amino-asitlik prepropeptid prekürsörünün işlenmesinden elde edilen insan prepro-intermedin parçalarının şematik gösterimi	6
2.2. Fare, sıçan ve insan IMD/AM2 prekürsörlerinin amino asid ardışıklarının karşılaştırılması	8
3. Kronik hipoksi uygulamak için kullanılan sistem	21
4.1. İzole sıçan akciğeri'nde PVR'nin yükseltilmesinden sonra rIMD ve CGRP'nin PAB'ına etkileri.	25
4.2. İzole sıçan akciğerinde PVR'nin yükseltilmesinden sonra rIMD ve ACh'in PAB'ını düşürücü yanıtı üzerine L-NAME'in etkisi.	26
4.3. İzole sıçan akciğeri'nde PVR'nin yükseltilmesinden sonra rIMD'in PAB'ını düşürücü yanıtı üzerine meklofenamat ve glibenklamid'in etkisi.	28
4.4 İzole sıçan akciğeri'nde PVR'nin yükseltilmesinden sonra rIMD ve CGRP'nin PAB'ını düşürücü yanıtı üzerine CGRP ₈₋₃₇ 'nin etkisi.	29
4.5. İzole sıçan akciğeri'nde PVR'nin yükseltilmesinden sonra rIMD'in tek bir bolus CGRP enjeksiyonundan sonra PAB'ını düşürücü etkisi ve rIMD'in bolus enjeksiyonları ile elde edilen doz yanıt eğrileri.	30
4.6. İzole sıçan PA halkalarında K ⁺ 'un artan konsantrasyonları ile elde edilen kasılma yanıtı ve U-46619 ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi.	32
4.7. İzole sıçan PA halkalarında rIMD ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisini gösteren deney trasesi.	33
4.8. İzole sıçan PA halkalarında AM, rIMD, CGRP ve ACh ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrileri.	34
4.9. İzole sıçan PA halkalarında rIMD ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine endotel hasarı, L-NAME, L-NIO, meklofenomat ve glibenklamidin etkisi.	36

4.10.	İzole sıçan PA halkalarında CGRP ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine CGRP ₈₋₃₇ 'nin etkisi ve rIMD ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine CGRP ₈₋₃₇ ve AM ₂₂₋₅₂ 'nin etkisi.	37
4.11.	İzole sıçan PA halkalarında AM ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine AM ₂₂₋₅₂ 'nin etkisi ve rIMD ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine IMD ₁₇₋₄₇ 'nin etkisi.	38
4.12.	İzole sıçan PA halkalarında CGRP ve AM ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine IMD ₁₇₋₄₇ 'nin etkisi ve rIMD ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine CGRP ₈₋₃₇ AM ₂₂₋₅₂ 'nin birlikte etkisi.	39
4.13.	İzole sıçan PA halkalarında rIMD ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine kolera toksininin etkisi.	41
4.14.	İzole sıçan PA halkalarında rIMD ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine ODQ ve SQ22536'nin etkisi ve ACh ve izoproterenol ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine ODQ ve SQ22536'nin etkisi.	42
4.15.	İzole sıçan PA halkalarında rIMD ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine rolipram, zaprinast ve sildenafilin etkisi.	44
4.16.	İzole sıçan PA halkalarında rIMD ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine KT5720 ve Rp-8-br-PET-cGMPs'in etkisi.	45
4.17.	İzole sıçan PA halkalarında rIMD, CGRP, AM'nin ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine TEA'un etkisi ve 60 mM K ⁺ ile önkasılma sonrasında rIMD'in gevşeme yanıtları.	47
4.18.	İzole sıçan PA halkalarında rIMD ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine iberitoksin ve apaminin etkisi.	48
4.19.	PHT oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen akciğerlerde PVR'nin yükseltilmesinden sonra rIMD ve ACh'in PAB'ını düşürücü etkileri.	50
4.20.	PHT oluşturulmuş sıçanlardan elde edilen PA halkalarında rIMD, ACh ve NS1619'un gevşetici etkisi.	51
5.1.	rIMD'in gevşetici etkisinde rol oynayabilecek hücre içi mekanizmalar.	62

TABLÖLAR

4.1.	Pulmoner hipertansiyon grubunda hematokrit, bazal perfüzyon basıncı ve sağ ventrikül hipertrofi değerleri	50
------	---	----

GİRİŞ

Kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ailesi yapısal olarak birbirine benzeyen peptidlerden oluşmaktadır. Memelilerde bu ailenin üyeleri kalsitonin, CGRP- α , CGRP- β , amilin, adrenomedullin (AM), kalsitonin reseptörü stimüle eden peptid ve intermedin/adrenomedullin2 (IMD/AM2)'dir. Bu peptidler periferik dokular ile santral ve periferik sinir sisteminde yaygın bir şekilde dağılım göstererek, güçlü damar gevşetici etki (CGRP, AM), besin alımında azalma (amilin) ve kemik rezorbsiyonunda azalma (kalsitonin) gibi çeşitli biyolojik etkiler oluşturmaktadır (177). CGRP ailesinin oluşturduğu biyolojik etkiler kalsitonin reseptörü (CT) veya kalsitonin reseptörü benzeri reseptör (CL) aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu reseptörlerin fonksiyon gösterebilmesi için reseptör aktivitesini kontrol eden proteinlere (RAMP1, RAMP2 ve RAMP3) ihtiyaç bulunmaktadır. CGRP ailesi üyelerinin yapısal benzerlikleri ve bazı biyolojik aktivitelerinin ortak özellikler göstermesinden dolayı bu peptitlerin aynı reseptör üzerinden etki gösterdikleri düşünülmüştür. Ancak, yapılan çalışmalar sonucunda bu peptidlerin kendilerine özgü farklı reseptör alt tiplerini etkiledikleri konusunda kesin kanıtlar elde edilmiştir (182).

IMD/AM2, preprointermedin'in enzimatik kesilmesi sonucu oluşan 47 amino asitlik yeni izole edilmiş bir peptittir. IMD/AM2'nin sıçanda hipotalamus ve hipofizde bulunması bu peptidin santral sinir sisteminde etkili olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca, yapılan çalışmalarda IMD/AM2'nin, endokrin stres yanıtı ile hipofiz arka lobundan oksitosin salgılanmasında rolü olduğu ve gastrointestinal sistemde gastrik boşalmayı stimüle ettiği belirtilmiştir (17). IMD/AM2'nin intravenöz (i.v) uygulanmasının normotansif ve hipertansif deney hayvanlarında sistemik arteriyel kan basıncını düşürdüğü ve vasküler direnci azaltarak renal kan akımını artırdığı gösterilmiştir (190, 209). Etki mekanizmasına yönelik yapılan çalışmalarda mezenterik arterde *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada IMD/AM2 ile indüklenen damar gevşetici etkide nitrik oksit (NO[•]) ve CL reseptörlerinin aracılık edebildiği, 3',5'- siklik guanozin monofosfat (sGMP) ve 3',5'-siklik adenozin monofosfat (sAMP) aracılı olduğu ve kalsiyum ile aktive olan K⁺ kanalları üzerinden

gerçekleştığı bildirilmiştir (40).

Güçlü vazodilatör etkilerinden dolayı CGRP ailesi peptidlerinin pulmoner hipertansiyon (PHT) gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olabilecekleri bildirilmektedir (118). PHT patolojisinde vazodilatör mekanizmalardaki bozuklukların önemli rol oynayabileceği öne sürülmektedir (29, 156). Dolayısıyla, PHT'un spesifik ve etkili tedavisi için yan etkisi az olan yeni ilaçların geliştirilmesi önemlidir.

Akciğerlerde IMD/AM2'nin ekspresyonu gösterilmiştir. Ancak, bugüne kadar IMD/AM2'nin pulmoner vasküler yataktaki etkileri ve bu etkinin mekanizması henüz incelenmemiştir. Ayrıca, bu peptidin pulmoner hipertansiyon oluşturulmuş akciğer damar yatağındaki etkileri de bilinmemektedir.

1.1. Amaç ve Hipotez

Bu tez çalışmasında, sıçan pulmoner damar yatağında ve izole ana pulmoner arter halkalarında IMD/AM2 peptidinin etkileri ile bu etkinin mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca kronik hipoksi ile PHT oluşturulmuş sıçanlarda aynı vasküler yapılarda IMD/AM2 peptidinin etkilerinin incelenmesi de hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kalsitonin ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid ailesi

2.1.1. Kalsitonin ve CGRP

Bu ailenin ilk peptidi, tiroid bezinden izole edilen kalsitonindir. Bu peptid vücutta kalsiyum dengesinden sorumludur ve güçlü hipokalsemik etkilidir (52). Daha sonraki yıllarda kalsitonin geninin CGRP isimli 37 amino asitlik bir peptid daha sentezleyebileceği anlaşılmıştır (9). Bu peptid bilinen en güçlü vazodilatör peptid olarak ifade edilmiştir (219). CGRP, endotel bağımlı etkisinin yanı sıra (46), endotelden bağımsız olarak sistemik arter basıncında azalma, pulmoner dolaşımında ise dilatör yanıt oluşturmaktadır (152, 155, 198, 215). CGRP'nin, hipoksik pulmoner hipertansiyonla ilişkili olarak hipoksi ile indüklenen sağ ventrikül hipertrofinde görülen doku yeniden modellenmesini (remodelling) önleyici etkisi vardır (215). Olası diğer gen ürünlerinin araştırılması sonucunda CGRP' den sadece birer amino asit farkları olan iki formu CGRP α ve CGRP β peptidleri de tanımlanmıştır (182) Sığıçanda CGRP α daha çok duyuşal sinirlerde bulunurken, CGRP β ise barsakta enterik otonomik sinirlerde daha yaygın bulunmaktadır (165).

2.1.2. Amilin

CGRP'ye yapısal benzerlik gösteren amilin insan amiloid plaklarından izole edilmiştir (221). Amilin güçlü bir şekilde gastrik boşalmayı ve gastrik asit sekresyonunu inhibe etmekte ve insülinin iskelet kasındaki metabolik etkilerine zıt etki oluşturmaktadır (97). Ayrıca amilin geni silinmiş farelerde kilo alımı ve ağrı algısında azalma gözlenmektedir (77). Amilin kemik metabolizması üzerinde kalsitonin benzeri, damarlarda ise CGRP benzeri etki göstermektedir (77, 78).

2.1.3. Adrenomedullin

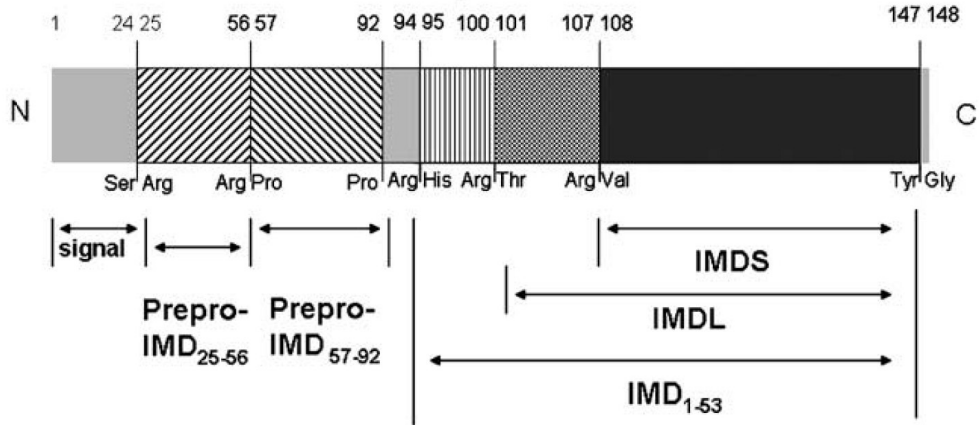
CGRP ailesinin diğer bir üyesi adrenomedullindir (AM). AM ilk kez insan

feokromasitoma hücrelerinden izole edilmiştir (124). AM'in kardiyovasküler, su-tuz dengesi, büyüme ve gelişme, beyin iskemi-reperfüzyon hasarı ve diyabet gibi birçok fizyolojik ve patolojik durumda önemli yeri olduğu bilinmektedir (35, 94). AM'nin vücut dışından uygulanması ya da gen tedavisinin dokuları ve hücreleri *in vivo* ve *in vitro* çeşitli hasarlara karşı koruduğu bildirilmiştir (44, 95, 113, 202, 218) AM'nin CGRP'ye benzer bir şekilde akciğerlerde spesifik bağlanma bölgeleri bulunduğu ve her ikisinde damar düz kasında hücresel sAMP'ı arttırdıkları bilinmektedir (69). AM'nin sistemik arteriyel kan basıncını düşürdüğü ve pulmoner vasküler yatakta vazodilatör etki gösterdiği bilinmektedir (62, 82). Fötal koyun akciğerlerinde, AM'nin dilatör etkisinin büyük kısmının nitrik oksit (NO) salıvermesine bağlı olduğu, bir kısmının da ATP'ye duyarlı potasyum kanalları (K_{ATP}) aktivasyonuna bağlı olduğu gösterilmiş ve bu etkinin CGRP reseptöründen bağımsız gerçekleştiği bildirilmiştir (207). AM'nin kalsiyumsuz ortamda fenilefrin ve kafeinin kasılma yanıtlarını etkilemediği, dolayısıyla hücre içi kalsiyum depolarına bağlı kasılmayı da değiştirmedeği, pulmoner damar kasılmasını reseptör aracılı Ca^{+2} girişini etkileyerek düzenlediği öne sürülmüştür (82). İnsan AM'nin sıçan aortik düz kas hücrelerinde (69) ve mezenşiyal hücrelerde (127) sAMP birikmesi yaptığı bilinmektedir. İntravenöz uygulanan AM'nin sıçan damar düz kas hücrelerindeki potasyum kanallarını açarak hücre hiperpolarizasyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (195). Diğer taraftan Shimekake ve diğ. (201) AM'nin sıçan torasik aort şeritlerinde sGMP miktarını artırdığını ve bu etkinin N^G -monometil-L-arjinin (L-NMMA) inkübasyonu ile azaldığını bildirmişlerdir. Hayakawa ve diğ. (90) sıçan aortunda yaptıkları çalışmada AM ile indüklenen damar düz kas gevşeme yanıtının endotel tabakasının uzaklaştırılması ya da guanilat siklaz veya nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin inhibe edilmesi ile azaldığını göstermişlerdir. AM'nin endotel hücrelerinde spesifik reseptörlere bağlanarak sıçan aort endotelinden NO (90), sıçan böbrek damar yatağından endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) (220) ve sıçan pulmoner arter endotelinden prostanoid (227) oluşumuna yol açarak gevşeme yanıtları oluşturdukları bildirilmiştir. Sıçanlarda N^0 -Nitro-L-arginin metil ester hidroklorid (L-NAME) ile kronik NOS inhibisyonu yapılarak indüklenen kardiyomiyosit hipertrofisinde, kalp dokusundaki AM miktarının arttığı ve miyositlerdeki AM reseptörlerinin upregülasyona uğradığı bildirilmiştir (18).

2.1.4. İntermedin/Adrenomedullin-2 (IMD/AM2)

2.1.4.1. IMD/AM2'nin bulunuşu, biyosentezi ve doku dağılımı

IMD/AM2, kalsitonin, amilin, CGRP ve AM'nin üyesi olduğu kalsitonin peptid ailesinin en son izole edilen üyesidir (190, 209). Kortikotropin saliverici hormon ailesi peptidlerini belirlemek için kullanılan yöntemlerle (98) memeli türleri (fare, sıçan, insan) ve teleostlardan (zebra balığı ve balon balığı) IMD/AM2 benzeri tamamlayıcı deoksiribonükleik asit (cDNA)'ler klonlanmıştır (208). Birbirinden bağımsız iki araştırma grubu eş zamanlı olarak genomik araştırmalarla bu peptidi keşfetmişlerdir. Bir grup bu peptidi ilk olarak balon balığı'ndan izole etmiş ve adrenomedullin-2 olarak adlandırmışken (209), diğer grup ise bu peptidi hipofizin pars intermediasında yüksek oranda bulunduğu için intermedin adını vermeyi tercih etmiştir (190). İnsan IMD/AM2'si ortak bir prekürsör olan 148 amino asitlik prepro IMD/AM2'den oluşmaktadır. Bu yapı, posttranslasyonel olarak 101-147 ve 108-147 amino asit sıralamasına denk gelen IMD/AM2₁₋₄₇ (uzun) ve IMD/AM2₈₋₄₇ (kısa) adlı biyolojik olarak aktif iki olgun peptide işlenmektedir (190, 209) (Şekil 2.1). Ayrıca preproIMD/AM2'nin Arg⁹³-Arg⁹⁴ arasından bölünmesi elde edilen IMD/AM2₉₅₋₁₄₇'nin (IMD/AM2₁₋₅₃) endojen olarak oluşabilen ve biyoaktif bir preproIMD/AM2 parçası olduğu gösterilmiştir (229) (Şekil 2.1). Fakat prepro IMD/AM2 türler arasında tam olarak korunmadığı için AM prekürsöründe (prepro AM) olduğu gibi IMD/AM2 geninden daha farklı aktif peptidlerin kodlanamayacağı düşünülmüştür. Bu görüşü destekler biçimde IMD/AM2'nin insan nöroblastoma ve sıçan iskelet kası miyoblastlarında sAMP oluşumunu artırdığı, ancak amidlenmemiş veya disülfid bağı olmayacak şekilde kesilmiş IMD/AM2 parçalarının (IMD/AM2₁₇₋₄₇) ya da proIMD/AM2₅₅₋₈₅'nin bu hücrelerde bir etkisinin görülmediği rapor edilmiştir (190). Roh ve diğer. (190)'nin bu çalışmalarındaki sonuçlarına göre, IMD/AM2 peptidinde α -amidasyon ve 8-16. amino asitler arasındaki disülfid bağlarının biyoaktivite için önemli olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 2.1: Bölünme bölgeleri gösterilmiş 148 amino asitlik prepropeptid IMD/AM2 prekürsörünün işlenmesinden elde edilen insan preproIMD/AM2 parçalarının şematik gösterimi. Bell ve McDermott (16)'dan alınmıştır.

IMD/AM2, diğer kalsitonin-benzeri peptidler gibi 7 bazlı amino bölgesinde bir disülfid köprüsü içerir (37, 190). Memeli IMD/AM2'ni AM'e yapısında karboksil ucunda amidlenme ve disülfid bağı ile takviye edilmiş altı amino asitlik molekül içi halka kalıntısı olması açısından benzemektedir (208, 209). Diğer taraftan AM ve IMD/AM2 arasındaki amino asit dizilim benzerliğinin çok az olduğu belirtilmiştir (memelilerde % 30) (208). Farede IMD/AM2 ve AM arasındaki dizilim benzerliği % 33'dür. Sıçan ve fare kıyaslandığında ise IMD/AM2'nin sinyal peptidi de dahil prekürsör dizilimindeki benzerlik % 90 kadardır (Şekil 2.2). Bu benzerlik AM'de görülen benzerlikten daha fazladır (% 79) (144). IMD/AM2 peptidinde glisin de dahil olduğu 48 amino asitlik karboksil ucu dizilim benzerliği bakımından daha iyi korunmuştur. Memeli ve teleost IMD/AM2 prekürsörleri arasındaki benzerlik ancak olgun peptid ile sınırlıdır. İnsan ve balığın olgun IMD/AM2'leri arasındaki benzerlik % 60, fare ve balon balığı IMD/AM2 ve AM'leri arasındaki benzerlik ise sırasıyla % 71 ve % 50'dir. Bu oran insan ve kemiriciler arasında % 87'ye çıkmaktadır. Yapılan analizler sonrasında değişik türlere ait IMD/AM2'lerin amino ucu dibazik bölünme

bölgelerinin konumları karşılaştırıldığında ancak birkaç amino asitlik farklar olduğunu bulunmuştur. Dibazik bölünme bölgesinden sonra gelen insan IMD/AM2'nin 7 amino asitlik arjinin bölgesi ise tüm türler arasında tamamen aynıdır.

IMD/AM2'in RT-PCR yöntemi ile memelilerde böbrek, kalp, akciğer, timus, gastrointestinal sistem, overler, submaksiller bez, beyin, ve hipofiz dokusunda, ayrıca sıçanda damar endotel hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (37, 190, 208, 209). Taylor ve diğ. (211) son olarak sıçan böbrek, mide, hipotalamus ve hipofizinde radioimmünoassay (RIA) yöntemiyle yüksek konsantrasyonlarda immünoreaktif IMD/AM2 varlığını göstermişlerdir. İnsanda ise IMD/AM2 immünohistokimyasal yöntemle hipotalamus, kalp ve böbrekte (206), RIA yöntemi ile koroner arterler ve renal arterlerin düz kas hücrelerinde, perikardiyal ven endotel hücrelerinde ve perikardiyal adipositlerde gösterilmiştir (162). Sıçanda IMD/AM2'nin miktarı incelenmiş, en yüksek olarak plazmada (205.2 ± 59.3 pg/ml) bulunmuştur. Bu değer sıçanda AM (10-100 pg/ml) (197) ve CGRP (2-25 pg/ml)'nin (73) plazma seviyelerinden yüksektir. Plazmadaki IMD/AM2'nin kaynağı lokal olarak vücutta herhangi bir yerde sentezlenerek dolaşıma salınması ya da AM gibi endotelden veya düz kas hücrelerinden salınması olabilir (205). Diğer bir alternatif de CGRP örneğinde olduğu gibi nöronlar tarafından salınmasıdır (236). Genomik analizler insan IMD/AM2'nin kromozom 22q13'ün distal kolunda, sentetik fare kromozomunda ise kromozom 15'de bulunduğunu göstermektedir. İnsan ve fare genomlarında IMD/AM2 aldehit redüktaz geni ile komşudur. Diğer bütün kalsitonin ve CGRP ailesi genleri insan kromozomu 11 ve 12'de yer almaktadır.

Taylor ve diğ. (210) IMD/AM2'in ön hipofiz hücrelerinde diğer CGRP ailesi üyelerinin etkilerine benzemeyen, kendine özgü bir etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. Diğer araştırmacılar da sıçanlarda oksitosin salgılayan hipotalamik nöronlarda farklı IMD/AM2 reseptörlerinin olabileceğini öne sürmektedirler (88).

Fare	1:	MAQLLMVTVTLGCISLLYL-LPGTLSGSLGKGLRHSRPREPPAKIPSSNLQPGHPSLQPV	59
Sıçan	1:	MAQLLMVTVTFGCISLLYL-LPGTLSGSLGKGLR---PREPPAKIPSSGFQPGHPSLRPV	56
İnsan	1:	MARIP--TAALGCISLLCLQLPGLSRSLGDFRPVKPREPPARSFSSSLQPRHPAPRPV	58
Fare	60:	VWKSRRHAPQPOGRCNRALAMVHLPQGGGSRHPGPORPTGSRRPFAQLLRVGCVLGTCQV	119
Sıçan	57:	VWKPP-HALQPOGRCNPALATVHLPQGGGSRHPGPORHVGSRRPFAQLLRVGCVLGTCQV	115
İnsan	59:	VWKLH-RALQAQRGAGLAPVMGQPLRDGGROHSGERRHSGFRRTQAQLLRVGCVLGTCQV	117
Fare	120:	QNLSHRLWQLVRPAGRRDSAPVDPSSPHSYG*	150
Sıçan	116:	QNLSHRLWQLVRPAGRRDSAPVDPSSPHSYG*	146
İnsan	118:	QNLSHRLWQLMGPAGRRDSAPVDPSSPHSYG*	148

Şekil 2.2 Fare, sıçan ve insan IMD/AM2 prekürsörlerinin amino asit ardışıklarının karşılaştırılması. Takei ve diğ. (209)'nden alınmıştır.

2.1.4.2. Fizyolojik etkileri

Yapılan çalışmalarda intraserebroventriküler (i.c.v.) IMD/AM2 uygulanmasının prolaktin, oksitosin, vazopressin ve adrenokortikotropin salınımı arttırdığı, büyüme hormonu salınımı ise inhibe ettiği bildirilmiştir (141, 209, 211, 212). Periferik IMD/AM2 uygulanmasının da anoreksi oluşturması yanısıra diürez ve natriürez gibi etkiler oluşturduğu saptanmıştır (73).

IMD/AM2'nin *in vivo* olarak biyoaktif olup güçlü hipotansif etki gösterdiği, sıçanlarda kalp atım hızını arttırdığı ve gıda alımı ile mide boşalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (37). IMD/AM2 mRNA'sı ile proteininin insan keratinositleri ve derisinde saptandığı ve atipik dermatitte IMD/AM2 mRNA'sının anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (123). Bu azalmanın inflamasyondan kaynaklanan ikincil bir fenomen olmadığı, atipik dermatit hastalarındaki derinin özelliği olduğu vurgulanmıştır. Diğer bir çalışmada sıçanlarda hamilelik sırasında IMD/AM2 reseptör antagonisti olduğu düşünülen IMD/AM2₁₇₋₄₇ infüzyonunun mitokondriyal apoptotik yolların aktivasyonu ile fötoplental büyümeyi engellediği belirlenmiştir (41).

Bilinci açık ve anestezi altındaki fare ve sıçanda IMD/AM2'ye sistemik ve lokal vasküler yanıtlar rapor edilmiştir (190, 209, 211). IMD/AM2'nin i.c.v. uygulaması sistemik arteriyel basıncı yükseltirken, i.v. uygulaması düşürmektedir (187, 189, 209, 211). Ayrıca IMD/AM2 spontan hipertansif sıçanlarda da sistemik arteriyel kan basıncını azaltmaktadır (190). Diğer dokulara göre böbrekte daha fazla ekspresyonu olan IMD/AM2'in *in vivo* intrarenal uygulanması renal kan akımını artırırken, renal vasküler direnci düşürmekte (73, 209), domuz böbrek arteriyel kondüktans damarlarını ise gevşetmemektedir. IMD/AM2'nin domuzda koroner arter halkalarını gevşetirken, pulmoner arter, renal ve femoral arter halkalarını etkilemediği (126) ve sıçanda kapasitans damarları gevşettiği bildirilmiştir (2).

Yapılan son çalışmalar AM ve CGRP'nin kalp ve böbrek dokusunda koruyucu etkili olduğu bu peptidlerin dışarıdan uygulanmaları veya gen tedavisi şeklinde verilmeleri ile hipertansiyon, miyokard iskemisi, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği gibi durumlarda yararlı olabileceği bildirilmektedir (50, 39). Ayrıca IMD/AM2'nin *in vitro* ortamda beyin endotel hücrelerinde hidrojen peroksitin oluşturduğu oksidatif hasara karşı AM gibi koruyucu etkisi olduğu da bildirilmiştir (45). IMD/AM2'nin öne sürüldüğü gibi AM ve CGRP ile aynı reseptörleri etkilemesi IMD/AM2'nin de koruyucu etkileri olabileceğini akla getirmektedir. Sıçan kalbinde IMD/AM2₁₋₅₃, IMD/AM2₁₋₄₇ ve IMD/AM2₈₋₄₇ iskemi ve reperfüzyon (I/R) hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (228, 230). Bu çalışmalarda, reperfüzyon sırasında IMD/AM2 uygulaması ile I/R sonucu gelişen kardiyak fonksiyon bozukluğu ve hasarda önemli derecede geriye dönüş oluşturabileceği bildirilmiştir.

IMD/AM2'nin etki mekanizmasının aydınlatılması amacı ile izole sıçan ventriküler miyositlerinde yapılan bir çalışmada, kalp kasılmasında protein kinaz C (PKC) ve protein kinaz A (PKA) aracılı artış gösterilmiştir (63). AM ve CGRP'nin vazodilatör etkilerini cAMP/PKA yolağı hariç, damar yatağında NO sentezini artırarak da gerçekleştirdikleri iyi bilinmektedir (19). Daha önceki çalışmalar, IMD/AM2'nin sıçan aort halkalarında kısmen endotel bağımlı gevşetici etki yaptığını göstermiştir (181). IMD/AM2₁₋₅₃'nin izole sıçan aortunda NO sentezini artırdığı da bildirilmiştir (229). Sıçan mezenterik arterinde, Chauhan ve diğ. (40) IMD/AM2 ile indüklenen

damar gevşetici etkinin NO⁻ ve reseptör aracılı olduğunu, sGMP, sAMP bağımlı ve kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalları üzerinden gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Bütün bu bulgular, IMD/AM2'nin CGRP ailesinin yeni bir üyesi olarak vazodilatör ve hipotansif etkilerini NO⁻ sentez ve salıverilmesini artırarak oluşturduğunu düşündürmektedir.

2.2 Kalsitonin geni ile ilişkili peptid reseptörleri

Kalsitonin/CGRP peptid ailesinin biyolojik yanıtları CT ve CL olarak adlandırılan, birbirleriyle yakın benzerlik gösteren ve G-proteini (GTP'ye bağımlı düzenleyici proteinler) ile kenetli olan reseptörler aracılığıyla gelişmektedir (182). G proteini stimülatör alt tipi (G_s) aracılı adenilat siklaz aktivasyonu bu reseptörlerle kenetli ana sinyal yolağını temsil etmektedir (129). Ayrıca G proteini q/11 alt tipi (G_{q/11}) aracılı fosfolipaz C-b, G proteini inhibitör alt tipi (G_i) ve/veya G proteini 0 alt tipi (G_o) aracılı potasyum kanalları, fosfotidilinositol 3-kinaz ve guanilat siklaz aktivasyonu da rapor edilmiştir (182). CL santral sinir sisteminde özellikle nöroendokrin ve otonomik kontrol, beslenme ve susama ile ilişkili alanlarda, akciğer, adrenal medulla, dalak, böbrek ve deride bulunmaktadır (53, 84). Ayrıca CL yaygın olarak sistemik ve pulmoner damarlardaki endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri ve kalpte de bulunmaktadır (57, 217).

CT ilk olarak 1991 yılında klonlanmıştır (142). CT, G proteini ile kenetlidir. CL reseptörü de sıçan ve insanda tanımlanmıştır (38). CL reseptörlerinin amilin, CGRP, AM veya IMD/AM2 reseptörü olarak fonksiyon gösterebilmesi için reseptör aktivitesini kontrol eden proteinlere (RAMP) ihtiyaç bulunmaktadır. RAMP ailesi üç üyeden oluşmaktadır; RAMP1, -2 ve -3. RAMP2 ve -3, CL reseptörünün AM reseptörü (sırasıyla AM₁ ve AM₂) gibi davranmasını sağlayan proteinlerdir. AM reseptörünün de vasküler düz kasta sAMP oluşumunu arttırdığı bilinmektedir. CL reseptörünün CGRP reseptörü olarak fonksiyon gösterebilmesi için RAMP1'e ihtiyacı bulunmaktadır (159). CGRP reseptörünün adenilat siklaz ile pozitif kenetli

olduğu bilinmektedir (7). CT'in kalsitonine bağlanmak ve yanıt oluşturmak için RAMP'lara ihtiyacı olmadığı halde bu proteinlerle etkileşebildiği bilinmektedir (182). CT/RAMP kombinasyonları ise amilin reseptörü olarak tanımlanmaktadır (48). RAMP1 beyin, omurilik, gastrointestinal sistem, adrenal bez, yağ dokusu, timus ve dalakta yaygın bir şekilde bulunmaktadır (53, 167). Damarlarda, RAMP1, CGRP₁ reseptörlerinin bulunduğu kanıtlar biçimde perivasküler sinirlerde, arter ve arteriyollerin düz kaslarında (178), ayrıca kardiyomiyositlerde ve kalpte kardiyomiyosit dışındaki dokularda (12) bulunmaktadır. RAMP2 akciğer, dalak, yağ dokusu ve böbrekte yüksek oranda eksprese edilmektedir (167). Kardiyovasküler sistemde RAMP2 makrovasküler ve mikrovasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunmaktadır (109). RAMP2, kardiyomiyositlerde ve daha az yaygın olmak üzere kalpte miyosit olmayan dokularda AM₁ reseptörlerinin bulunduğu işaret eden bir biçimde eksprese edilmektedir (12). RAMP3 ise daha az yoğun biçimde dağılmıştır. Yüksek oranda böbrekte, daha az olmak üzere akciğer, dalak ve timusda bulunmaktadır (167). RAMP3 erişkin kalbinde, kardiyomiyositlerde en az bulunan RAMP olarak az seviyede tayin edilmiştir (239). Bu bulgu AM₂ reseptörlerinin seyrek olduğuna işaret etmektedir. Fakat RAMP'ların birlikte eksprese edildikleri CL reseptörü için farklı afiniteler gösterdiği bilinmektedir. Tavşan aortik endotel hücrelerinde RAMP3 ve CL etkileşimi RAMP1 ve RAMP2 den daha yaygın gözlenmektedir (164). RAMP'ların dağılımı CL dağılımından daha geniş olduğu için hücre fonksiyonunda CL ile etkileşiminden farklı olarak daha geniş role sahip olduğunu düşündürmektedir (49, 214).

Chang ve diğ., CT ve CL'nin IMD/AM₂ peptidinin reseptörleri olabileceğini önermişlerdir (37). Transfekte hücrelerde yapılan bir çalışmada IMD/AM₂, CL/RAMP sistemi ile kenetlendiği ve AM ile CGRP'den fonksiyonel olarak farklı bir aktivite profili gösterdiği bildirilmiştir (190). Endojen olarak CL/RAMP ekspresyonu olan sıçan kültür hücrelerinin insan IMD/AM₂ ile muameleleri sonucu cAMP üretiminin arttığı gösterilmiştir (37). CGRP ve AM peptidlerinin fonksiyonel olarak etki gösterebilmesi için CL reseptör aktivasyonu ve beraberinde sırasıyla RAMP1, RAMP2 ve RAMP3 aktivasyonu gerekirken IMD/AM₂ selektif olmayan bir şekilde RAMP yardımcı reseptörlerinin agonisti olduğu gösterilmiştir (190).

2.3. Peptidlerin vazodilatör mekanizmaları

2.3.1. Amilin

Amilinin damarları gevşetici peptid olarak etki göstermesi büyük ve küçük çaplı damarlarda incelenmiş *in vitro* CGRP'den ortalama 100 kat daha az aktif olduğu ve kan basıncının düzenlenmesinde görev almadığı gösterilmiştir (14, 28, 85, 107). Amilinin damar gevşetici etkisi CGRP₈₋₃₇ ile bloke edilmesi yanıtın CGRP₁ reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir (87).

2.3.2. CGRP

CGRP'nin damarlarda oluşturduğu gevşeme yanıtlarının mekanizması hakkında birçok görüş ortaya atılmıştır. Genel olarak damar gevşetici etkinin CGRP₁ reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiği ve kompetitif olarak bu reseptörün antagonisti CGRP₈₋₃₇ tarafından yanıtın bloke edildiği bilinmektedir (16, 25, 151). CGRP'nin NO⁻ ve endotelden bağımsız olarak hücre içinde sAMP artışı ile ilişkili bir şekilde gevşeme oluşturduğu düşünülmektedir (26). Bu mekanizma perfüze sıçan mezenteri, kedi serebral arteri, köpek koroner arteri gibi dokularda gözlenmektedir (68, 86, 234). CGRP'nin endotel tabakası olmadan da gevşeme oluşturabilmesi, düz kas hücre kültürlerinde de gösterildiği gibi doğrudan düz kasa etki ettiğini ve adenilat siklazı aktive ettiği öne sürülmektedir (56, 96). sAMP'nin artışı protein kinaz A (PKA)'yı stimüle etmekte, büyük olasılıkla K⁺ kanallarını fosforile ederek açılmasını sağlamakta ve böylece gevşemeye yol açmaktadır. Nelson ve diğ. (171) K_{ATP} kanallarının CGRP aracılı gevşemeye katkısını göstermişlerdir.

Bugüne kadar dokuların büyük bir çoğunluğunda CGRP ile endotelden bağımsız gevşemeler rapor edilmiş olmasına karşın istisnalar da bulunmaktadır. Sıçan aortunda gevşeme ancak endotel varlığında oluşmakta ve nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri varlığında azalmaktadır (27, 80, 81). Aynı tip gevşeme yanıtları insan internal meme arterinde (186) ve sıçan pulmoner arterinde de (223) bildirilmiştir. Sıçan torasik aortunda CGRP ile sAMP ve sGMP miktarlarında anlamlı bir artış

olduğu bildirilmiş bu artışın da ancak endotel tabakasının varlığında olduğu gösterilmiştir (80). Bu çalışmada endotelden salıverilen NO' nun yanıtlarda önemli olduğu bildirilmiş, NO'nun guanilat siklaz aktivasyonu ve dolayısıyla sGMP akümülyasyonu yaparak düz kas hücrelerinde gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir. Damar endotel hücrelerinde sAMP' nin artışının önemi ve gevşemeye olan katkısı tam olarak ortaya konulmamıştır. Fakat sAMP artışının eNOS'u aktive edebildiği, artmış NO' sentez ve salıverilmesine yol açabileceği bildirilmiştir (70, 183). eNOS'un cAMP tarafından aktivasyonu büyük bir olasılıkla PKA aracılığı ile olmaktadır. Son yapılan bir çalışmada, PKA'nın katalitik alt ünitesinin eNOS'u fosforile ederek aktive edebildiği gösterilmiştir (31). Aiyar ve arkadaşları (8), HEK293 hücrelerinde CGRP'nin fosfolipaz C'yi (PLC) aktive ederek inozitol trifosfat (IP₃) aracılığı ile hücre içi kalsiyum miktarında artışa yol açtığını rapor etmişlerdir.

2.3.3. Adrenomedullin

AM'in damar gevşetici etkisinin mekanizması hakkında yapılmış çalışmalar türe ve damar yatağına göre farklılıklar göstermektedir. AM'in CGRP₈₋₃₇ ve AM₂₂₋₅₂'ye duyarlı bir şekilde gevşeme oluşturuyor olması CGRP ve AM reseptörlerinin birlikte gevşeme yanıtına katkısı olduğunu düşündürmektedir (201, 213). AM'nin endotel bağımlı NO' aracılı ve K⁺ kanalı bağımlı gevşeme yanıtı oluşturduğunu söyleyen çalışmalar bulunmaktadır (104, 132, 194, 213, 234). AM, endotel hücrelerinde CGRP gibi sAMP (104, 112) ve hücre içi kalsiyum seviyesini arttırmaktadır (201, 234). Damar düz kasında ise AM, sAMP düzeylerinde artışa ve hücre içi kalsiyum düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır (13, 69, 82, 234). Nishimatsu ve ark (174), AM ile sıçan aortunda NO' bağımlı gevşeme olduğunu bildirmiş ve eNOS'un stimülyasyonunda fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt-bağımlı bir yolak olduğunu öne sürmüşlerdir. İnsan koroner arterinde yapılan bir çalışmada, AM ile indüklenen NO' bağımlı gevşeme yanıtı selektif olarak AM₂₂₋₅₂ ile bloke edilirken, CGRP₈₋₃₇ ise cevabı bloke etmemiştir. Bu sonuçlar, AM ile indüklenen vazodilatasyonun NO' ve K⁺ kanalları üzerinden gerçekleştiğini ve sAMP'nin bu gevşeme yanıtlarına katkısının çok az olduğunu göstermektedir (213). Farklı çalışmalardan elde edilen

farklı sonuçlar AM₂₂₋₅₂'in özgülüğünün az olduğunu düşündürmektedir (94). CGRP ve AM ile indüklenen gevşeme mekanizmalarında benzerlikler bulunduğu kesindir. Bu benzerlik, CGRP ve AM'in aynı G proteini ile kenetli reseptör ile etkileşiyor olmasından ileri gelebilir. Hücre içi sinyal yollarındaki farklılıklar ise bu benzerliğin reseptörleri oluşturan farklı RAMP'lerden kaynaklandığını düşündürmektedir (74).

2.4. Diğer endojen nöropeptidlerin pulmoner dolaşımdaki rolleri

Memeli pulmoner dolaşımı, sağ ventrikül, endotel fonksiyonu, kollajen ve elastin durumu ile sıvı dengesi gibi damar düz kasını etkileyen birçok endojen faktör tarafından etkilenmektedir. Bu faktörlerin pulmoner dolaşımdaki dengesinin bozulması, yükseklik ya da pulmoner tıkanma bozukluklarına bağlı havayolu hipoksisi veya pulmoner hipertansiyon gibi pulmoner arter basıncının arttığı durumlara yol açmaktadır. Pulmoner dolaşımın peptiderjik düzenlenmesinde, endotelin-1 (ET-1), anjiyotensin II (AII), arjinin vazopressin, peptid tirozin Y (PYY), somatostatin₂₈ ve P maddesi (SP) vazokonstriktör; CGRP, AM, amilin, atrial natriüretik peptid (ANP), beyin natriüretik peptid (BNP), C tipi natriüretik peptid (CNP), vazoaaktif intestinal peptid (VIP), endotelin-3 (ET-3), somatostatin₁₄ gibi peptidler ise vazodilatör etki göstermektedir (118, 125, 138, 222). Bu peptidlerden ET-1'in damar endoteli ve düz kasında mitojenik etkileri de vardır (226). ET-1 vasküler endotel hücrelerinde (226) ve alveolar tip II pnömositlerde (150) bulunmaktadır. Sıçan akciğer havayollarının parasempatik ganglionlarında ET-1 kodlayan mRNA'lar tespit edilmiştir (157). G proteini ile kenetli endotelin reseptörlerinin varlığı ise kobay pulmoner arterlerinde gösterilmiştir (34). Kronik hipoksik koşullarda, akciğer dokusu ve pulmoner arterlerde ET reseptörlerinde artış olduğu bildirilmiştir (139). Diğer bir vazokonstriktör peptid olan AII pulmoner damar endoteli kaveollerinde yer almakta (118) ve AT1 reseptörleri aracılığı ile ET'e benzer şekilde pulmoner arter düz kas hücrelerinin proliferasyonunu stimüle edici etki göstermektedir (163). Sıçanda anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü guinaprilin hipoksinin başından itibaren verilmesi hipoksi ile indüklenen PHT gelişmesini azaltmış ve gelişmiş olan hipoksi ile indüklenen PHT'u da kısmen geri

döndürmüştür (175). Diğer nöropeptidlerden SP ise pulmoner perivasküler duyuşal sinirlerde CGRP ile beraber bulunmaktadır (33, 108). Sıçanlarda monokrotalin ile indüklenen pulmoner hipertansiyonda akciğer SP seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir (130). Somatostatinin ise pulmoner nöroendokrin hücre ve sinirlerde bulunduğu rapor edilmiştir (60). Sıçanda somatostatin₂₈ uygulaması ile hipoksi ile indüklenen PHT gelişimi artarken somatostatin₁₄'ün hipoksi ile indüklenen PHT gelişimini dengelediği gösterilmiştir (215). Keith ve Ekman (116) PYY benzeri immünoreaktiviteyi havayolu epiteli nöroendokrin hücrelerinde göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar daha sonra PYY'nin hipoksi ile indüklenen PHT'de doğrudan ya da dolaylı rolü olabileceğini öne sürmüşlerdir (115). ANP ve BNP peptidlerinin hipoksi ile indüklenen PHT ile görülen sağ ventrikül hipertrofisinin şiddetlenmesini önlediği ortaya konmuştur (6, 92). Ayrıca her iki peptidin de *in vitro* damar düz kas proliferasyonunu önleyebileceği bildirilmiştir (3, 11, 105). ET-3'ün sıçan pulmoner dolaşımında NO' aracılı doz bağımlı gevşeme oluşturduğu bulunmuştur (54). Pulmoner dolaşımında ET-3'ün gevşetici etkisinin kronik hipoksi ile ortadan kalktığı gösterilmiştir (67). VIP nöropeptidinin perivasküler sinirlerde, reseptörlerinin insan akciğer membranlarında olduğu bildirilmiştir (188). Li ve arkadaşları (140) köpeklerde hipoksi ile beraber sistemik ve lokal olarak akciğerde VIP salıverilmesi olduğunu göstermişler, bu durumun artmış pulmoner arter basıncını dengelemeye yönelik bir mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir.

2.5. Pulmoner hipertansiyon (PHT)

Memeli pulmoner dolaşımındaki damar rezistansı, doğrudan ya da dolaylı bir şekilde damar düz kasını, sağ ventriküler miyokardı, endotel fonksiyonunu, kollajen, elastin depolanması ve sıvı dengesini etkileyen birçok endojen ajanın etkisi altındadır. Pulmoner dolaşımın sistemik kan basıncından bağımsız olarak PHT geliştirdiği bilinmektedir. PHT gelişmesi için bilinen en iyi uyarıcı yüksek yerde gelişen havayolu hipoksisidir. Havayolu hipoksisine ve takiben hipoksi ile indüklenen PHT'a neden olan diğer durumlar uyku apnesi ya da kısıtlayıcı pulmoner düzensizlikler, doğuştan diyafragmatik fitik (59, 180), yeni doğanda atelaktazi, kronik obstrüktif pulmoner hastalık, yetişkin respiratuvar distres sendromu (237),

pnömoni ve sepsis'dir. PHT'un bilinen diğer nedenleri ise pirilizidin alkaloid olan monokrotalin enjeksiyonu (114) ve kilo kaybına yol açan fenfluramin, deksfenfluramin gibi serotonerjik etkili preparatlardır (4, 75, 83). Hipoksiye sekonder olarak PHT gelişmektedir. Hipoksi ile hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon oluşmasının pulmoner vasküler damar yatağında yeniden modellenmeyi tetiklediği bildirmiştir (185). Monokrotalin enjeksiyonu ise primer PHT oluşturmaktadır. Primer PHT, PHT'un etiyojisi bilinmeyen bir kategorisidir. Monokrotalin enjeksiyonu ile daha çok endotel hasarı oluşmakta ve pulmoner vasküler yatakta değişiklikler sonrasında PHT meydana gelmektedir (191). Dolayısıyla kronik hipoksi ile indüklenen PHT'un geri döndürülmesinde vazodilatör tedavinin etkili olduğu öne sürülürken, monokrotalin ile indüklenen PHT'da hasarlanan endotel, akyuvar, lökosit ilişkisi tedavi için hedef olarak görülmektedir (161). PHT modelleri arasındaki yukarıda bahsedilen farklılıkların yanısıra patofizyolojisinde ortak mekanizmalar da bulunmaktadır. Endotelin reseptör antagonisti bosentan kronik hipoksi veya monokrotalin ile indüklenen PHT oluşumunu önlemede başarılı bulunmuş (47, 66, 93), HIF-1 α gibi faktörlerin kronik hipoksi ve monokrotalin ile indüklenen PHT modellerinin ikisinde birden arttığı bildirilmiştir (131). PHT sağ ventrikül hipertrofisi, pulmoner vasküler hipertrofi, kas tabakasında kalınlaşma ve akciğer ödemi ile birlikte seyreder (99, 100). Bu nedenle, bu şartlarda normal pulmoner arter basıncın tedavi ile düşürülmesi önemlidir.

2.6. Pulmoner hipertansiyon tedavisinde alternatif yaklaşımlar

Bugüne kadar birçok konvansiyonel farmakolojik ajan PHT'u düzeltmek için kullanılmıştır. Bunlardan bazıları; metoprolol (β -reseptör antagonisti) (179), heparin sodyum (alyuvar kaynaklı büyüme faktörü inhibisyonu) (120), teprotid (anjiotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu) (158), bradikinin (pulmoner vazodilatasyon) (76) ve prostasiklin (148)'dir. Yukarıdaki ajanların kullanımını kısıtlayan faktörler istenmeyen yan etkileri ve efikasitelerinin sınırlı olmasıdır (58, 121, 128). Patolojik PHT endotelin ve tromboksan gibi vazokonstriktörlerin ekspresyonunu arttırırken, prostasiklin ve NO' gibi vazodilatörlerin ekspresyonunu azaltmaktadır (145). Bosentan gibi spesifik olmayan endotelin reseptör antagonistleri plasebo ile

karşılaştırıldığında egzersiz kapasitesini 16. haftada arttırmıştır (192). Fakat tromboksan sentaz inhibitörü ve reseptör antagonisti terbogrel primer PHT hastalarının egzersiz kapasitelerini düzeltememiştir. Aynı çalışmada hastalarda insidansı yüksek ve yoğun bacak ağrısı da gözlenmiş ve tedaviye son verilmiştir (133).

Leeman ve diğ. (137) NO''in selektif pulmoner vazodilatör olarak kullanılabileceği öne sürmüşlerdir. NO' inhalasyonu ile lokal olarak pulmoner arterlerde gevşeme oluşmaktadır. Diğer taraftan, inhalasyon esnasında akciğerlerden absorbe olarak genel dolaşıma geçen NO' ise hızlı bir şekilde hemoglobin tarafından inaktive edilmektedir. Dolayısı ile, NO' sistemik arteriyel basıncı etkilemeden pulmoner arteriyel basıncı ve pulmoner damar rezistansını düşürerek pulmoner sisteme özgü etki oluşturmaktadır. NO' bazı yoğun bakım ünitelerinde oldukça yarar sağlayacak sonuçlarla inhalasyon şeklinde kullanılmaktadır (149, 166, 170). Ancak, yenidoğanda PHT ve neonatal solunum yetersizliğine bağlı kronik akciğer hastalığında mortaliteyi azalttığı bildirilmiş olsa da, yetişkin hastalarda kalıcı düzelme görülmemektedir (145). NO''in methemoglobinemi oluşturabildiği (106, 176), ayrıca metaboliti peroksinitritin DNA kırılmaları, endotelial ve havayolu epitelyum tabakasında hasar meydana getirdiği gösterilmiştir (15, 79).

Son yıllarda endojen akciğer nöropeptidlerinin PHT gibi hastalıklarda önemi artmıştır. Pulmoner damar basıncının akciğer içinde lokal olarak dengelenmesi bu görüşü desteklemektedir (134). CGRP benzeri immünoreaktivite havayolu mukozası sinir liflerinde ve damar düz kası etrafında bulunmuştur (33, 216). Buna ilave olarak CGRP ve mRNA'sı, havayolu epitelyumunun nöroendokrin hücrelerinde ve intrapulmoner ganglionların perikaryasında lokalize olmuştur (117). Bu nöroendokrin epitel hücreleri, havayolu oksijen miktarındaki değişikliklere karşı havayolu oksijen sensörü olarak lokal pulmoner vasküler tonu ayarlayarak fonksiyon göstermektedir (136, 235). Dolayısı ile CGRP stratejik olarak nöroendokrin hücrelerde, havayolu epitelinde, lokal damar yatağında bulunmakta ve bölgesel kan dağılımını kolaylaştırmaktadır (216).

Endojen CGRP'nin hipoksi ile indüklenen PHT'da koruyucu etki oluşturduğu ve

hipoksi ile indüklenen PHT'da dolaşımdaki CGRP'nin pulmoner arter basıncındaki artışa korele olarak azaldığı gösterilmiştir (115, 215). Ayrıca ekzojen sıçan α -CGRP infüzyonu ile hipoksi ile indüklenen PHT'un kısmen ya da tamamen önlendiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (119, 215). Amilinin de kronik hipobarik hipoksi ile indüklenmiş pulmoner arter basıncındaki yükselmeyi salin infüze edilmiş hipoksik kontrollere göre azalttığı bulunmuştur (118).

AM için akciğerde birçok bağlanma noktası bulunmakta ve PHT'un derecesine göre plazma AM seviyeleri artmaktadır. AM uzun süreli damar gevşetici etkiye sahiptir. AM'in vazodilatör etkisi sAMP ve NO' bağımlı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (145). Hayvan modellerinde, tekrarlanmış AM inhalasyonu ile pulmoner arter basıncını azalmış, sağ kalım ise artmıştır (169). Aynı araştırmacılar 10 mg/kg düzeyinde AM inhalasyonunun sistemik arteriyel basıncını etkilemeden PA basıncını ve pulmoner damar direncini azalttığını da göstermişlerdir (168). Ekzojen AM'in fetal koyun pulmoner kan akışını doza bağımlı olarak arttırdığı (61), monokrotalin ile indüklenen PHT'u azalttığı (233) bildirilmiştir. 20 yaşın altındaki primer ve sekonder PHT hastalarında, plazma AM benzeri immünoaktivite anlamlı olarak artmıştır (232). AM'in plazma miktarının da kronik hipoksik koşullarda arttığı bildirilmiştir (238). Mitral stenoza bağlı sekonder PHT hastalarında ise plazma AM seviyelerinin PHT gelişimi ile orantılı olarak arttığı gösterilmiştir (173).

GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyleerde Sprague Dawley sıçanlar (erkek, 200-250 g) kullanıldı (Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu karar no: 2005/32-2, 2007/19-3).

3.1. İzole sıçan akciğer perfüzyonu

Sıçanlar, tiyopental (30 mg/kg, i.p.) ile anesteziye edildi. Trakeal kanülasyondan sonra sternotomi yapıldı ve sağ ventriküle heparin (200 IU) enjekte edildi. Sağ ventrikülden pulmoner arter kanülasyonu yapılarak akciğer ve kalp izole edildi. Kalbin ana kısımları perfüzyonun serbest biçimde akabilmesi için ayrıldı. Sıçan akciğerleri modifiye Langendorff perfüzyon sistemine asıldı ve ventilatör (Model 683, Harvard) yardımıyla mekanik olarak oda havasıyla 55 solunum/dk hızında 2 cm H₂O'luk pozitif solunum sonu basıncında solunum yaptırıldı. Akciğerler, %95 O₂ - %5 CO₂ ile gazlandırılan 37°C'deki Krebs-Henseleit solüsyonu ile peristaltik pompa yardımıyla (Model M312, Gilson) 0.03 ml.g.dk⁻¹ hızında perfüze edildi. Perfüzyon basıncındaki değişiklikler sisteme Y bacağı ile bağlı basınç transdüseri ile ölçülerek transdüser data kayıt sistemi (Maycom TDA 97) aracılığı ile bilgisayara kaydedildi. Böyle bir sistemde akım sabit olduğundan ölçülen basınçtaki değişiklik direkt olarak pulmoner damar yatağındaki direnç değişikliğini yansıtmaktadır. 30 dk.'lık stabilizasyondan sonra bazal perfüzyon basıncı tromboksan A₂ mimetik U-46619 ile (3×10^{-9} - 3×10^{-8} M) 8-10 mmHg yükseltildi. Daha sonra akciğer damar yatağının 100 µl hacimde bolus olarak verilen rIMD (0.3-3 µg) ve CGRP (1-3 µg) enjeksiyonuna olan yanıtları incelendi. Bu yanıtlar çeşitli antagonistlerin [L-NAME (10^{-4} M), meklofenamat (10^{-6} M), glibenklamid (10^{-6} M), CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M)] varlığında tekrarlandı. Deneyleerin sonunda papaverin yanıtı elde edildi (180 µg/100 µl). Antagonistler perfüzyon rezervuarına U-46619 ile perfüzyon basıncı yükseltilmeden 30 dk. önce eklendi ve en son molar konsantrasyonları şeklinde ilave edildi.

3.2. İzole organ banyosu

Sıçanlar kafalarına vurularak sersemletildikten sonra karotid arterleri kanatılarak öldürüldü. Göğüs kafesi açılarak, akciğerler izole edildi ve soğuk Krebs-Henseleit

solüsyonu içine alındı. Doku çevresindeki fazla yağ ve bağ dokusu temizlenip, pulmoner arter ana dalından yaklaşık 2.5-3 mm.'lik halka preparatı hazırlandıktan sonra 5 ml'lik Krebs-Henseleit solüsyonu içeren organ banyosuna yerleştirildi. İki tane paslanmaz çelikten kanca PA lümenine yerleştirildi. Solüsyon 37°C de % 95 O₂ - %5 CO₂ ile gazlandırıldı. Kasılmalar izometrik olarak kuvvet transdüseri yardımıyla ölçülüp bilgisayara aktarıldı (Biopac Versiyon: 3.7.0).

Preparata deney başlangıcında 1 g bazal gerim uygulanarak 1 saat dinlendirildi. 30 dk aralıklarla 60 mM KCl ile ardı ardına alınan kasılmalar stabil hale geldikten sonra preparat 1 saat dinlendirildi. 30 nM U-46619 ile oluşturulan ön kasılmadan sonra rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) ile konsantrasyona bağımlı gevşeme ve sonrasında papaverin (10⁻⁴ M) yanıtı alındı. Bu yanıtlar bazı maddeler [L-NAME (10⁻⁴ M), L-NIO (3x10⁻⁵ M), meklofenamat (10⁻⁶ M), glibenklamid (10⁻⁶ M), CTX (2µg/ml), ODQ (10⁻⁵ M), SQ22536 (10⁻⁴ M), rolipram (10⁻⁵ M), zaprinast (10⁻⁵ M), sildenafil (10⁻⁷ M), KT5720 (10⁻⁴ M), Rp-8-br-PET-cGMPs (3x10⁻⁵ M), TEA (10⁻² M), iberitoksin (10⁻⁷ M), apamin (3x10⁻⁷ M)] ve antagonistler [CGRP₈₋₃₇ (10⁻⁶ M), AM₂₂₋₅₂ (10⁻⁶ M), IMD₁₇₋₄₇ (10⁻⁶, 10⁻⁸ M)] ile 30 dk inkübasyon sonrasında tekrarlandı.

Diğer bir deney grubunda, PA preparatlarında damar lümeninden forseps sokularak ıslak filtre kağıdı üzerinde damarın yuvarlanması ile endotel tabakası hasarlandı. Bu hasar 30 nM U-46619 ile alınan ön kasılmanın ardından 1 µM ACh ile anlamlı bir gevşeme elde edilmemesi (<%5) ile kontrol edildi. Daha sonra rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları alındı.

3.3. Kronik hipoksi ile indüklenmiş pulmoner hipertansiyon modeli

Sıçanlarda kronik hipoksi (yüksek-yükseklik) ile indüklenen PHT oluşturabilmek için “hipobarik hipoksi” modeli seçildi. Deneylerin yapıldığı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarının deniz seviyesinden yüksekliği ortalama 850 m'dir (Bu yükseklikteki barometrik basınç: ~ 690 mmHg). Düşük-yükseklik kontrol deneylerinin hepsi aynı laboratuvarında gerçekleştirildi. Sıçanlara hipobarik hipoksi uygulayabilmek için 50x50x50 cm'lik pleksiglas kafesler (Önder Kimya, Siteler, Ankara) kullanıldı (Şekil 3). Bu kafeslerdeki atmosfer

basıncını yaklaşık olarak yarıya düşürebilmek için (~ 6000 metre) vakum pompası (Zihni Vakum Pompaları, Pendik, İstanbul) kullanıldı. Sıçanlar bir gün boyunca atmosfer basıncı $\frac{1}{4}$ oranında düşürülen kafeste aklimatize edildikten sonra kronik hipoksi kafesinde (atmosfer basıncı $\frac{1}{2}$ oranında düşürülerek) 3 hafta tutuldu (199). Bu süre içinde kafesler her gün yarım saat açılarak yem ve su ilavesi yapıldı, 3-4 günde bir sıçanların kafesleri temizlendi. 3 haftanın sonunda kafeslerden alınan sıçanlarda kronik hipoksi geliştiğini gösterebilmek için bazı parametreler incelendi. Sıçanlar anesteziyeye edildikten sonra akciğerler izole edilmeden önce 3-4 ml kan örneği alındı ve kontrol hayvanlarından alınan kan ile hematokrit düzeyleri karşılaştırıldı (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı/ Roche Diagnostics Systems). Yine kronik hipoksiye bağlı gelişen pulmoner hipertansiyonun bir göstergesi olarak bu hayvanlardan izole edilen kalplerde sağ ventrikül hipertrofisine bakıldı. Bunun için sağ ventrikül serbest duvarı ayrıldıktan sonra sol ventrikül ve septum bir bütün olarak izole edildi. Daha sonra sağ ventrikül serbest duvarı ve sol ventrikül+septum birbirinden ayrı olarak tartıldı. Sağ ventrikül hipertrofisi, kronik hipoksik hayvanların “sol ventrikül+septum (yaş ağırlığı) / sağ ventrikül (yaş ağırlığı)” oranının, normal hayvanların oranı ile karşılaştırılmasıyla belirlendi (184).



Şekil 3. Kronik hipoksi uygulamak için kullanılan sistem: Kronik hipoksi (altta) ve aklimatizasyon (üstte) kafesleri.

PHT gelişen sıçanlar kafesten alındıktan sonra 1 saat içerisinde bölüm 3.1’de belirtilen şekilde akciğerler izole edilerek perfüzyon deney protokolü tekrarlandı. Bu protokolda 1 µg rIMD ve 1 µg ACh’in bolus enjeksiyonunun pulmoner arter basıncı (PAB) üzerine etkileri incelendi.

Diğer bir deney grubunda ise, PHT gelişen sıçanlardan PA halkaları bölüm 3.2’de belirtilen şekilde izole edilerek rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M), ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) ve NS1619 (10^{-5} M) ile gevşeme yanıtı alındı.

3.4. Kullanılan solüsyonlar ve maddeler

Deneyleerde standart fizyolojik solüsyon olarak Krebs-Henseleit kullanıldı (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, ve glukoz 11.1.

Heparin; Nevparin[®], Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. (İstanbul, Türkiye), sodyum tiyopental; Pental sodyum[®], İbrahim Ethem İlaç Sanayii A.Ş. (İstanbul, Türkiye)’den, Peptidler rIMD (sıçandan elde edilen IMD/AM2₁₋₄₇) ve iberitoksin Bachem laboratuvarlarından (Torrance, CA, Amerika), hAM₁₃₋₅₂, hαCGRP, hIMD₁₇₋₄₇, hAM₂₂₋₅₂ ve rCGRP₈₋₃₇ Phoenix laboratuvarlarından (Mountainview, CA, Amerika), 1-[4-etoksi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-okso-3-propil-1*H*-pirazolo[4,3-*d*]pirimidin-5-yl) fenilsülfonyl]-4-metilpiperazin sitrat (Sildenafil) Pfizer’den (New York, Amerika), apamin, *N*^ω-Nitro-L-arginin metil ester hidroklorür (L-NAME), L-ornitin^ω-asetamidin hidroklorür (L-NIO), (9*S*,10*S*,12*R*)-2,3,9,10,11,12 – heksahidro - 10-hidroksi-9-metil-1-okso-9,12-epoksi-1*H* diindolo [1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*] pirolo [3,4-*i*][1,6] benzodiazosin-10-karboksilik asit heksil ester (KT5720), Rp-β-fenil-1,*N*²-eteno-8-bromoguanozin 3',5'-siklik monofosforotioat sodyum tuzu hidratı (Rp-8-br-PET-cGMPs), 1*H*-[1,2,4] oksadiazolo [4,3-*a*] kinoksalin-1-on (ODQ), izopreterenol, asetilkolin (ACh), meklofenamat sodyum, glibenklamid, tetraetilamonyum klorür (TEA), 4-[3-(siklopentiloksi)-4-metoksifenil]-2-pirolidinon (Rolipram), 1,4-dihidro-5-(2-propoksifenil)-7*H*-1,2,3-tiriazolo (4,5-*d*) pirimidin-7-on (Zaprinast), kolera toksini (CTX), 11-dideoksi-9α,11α-methanoepoksi prostaglandin F_{2α} (U-46619) 1,3-Dihidro-1-[2-hidroksi-5-(triflurometil)fenil]-5-(triflurometil)-2*H* benzimidazol-2-on (NS1619), papaverin hidroklorür Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO,

Amerika)'dan, 9-(tetrahydro-2'-furyl) adenin (SQ22536) Calbiochem (Darmstadt, Almanya)'den temin edilmiştir.

Tüm maddeler distile suda çözüldü. Ancak, glibenklamid, sildenafil, rolipram, zaprinast, ODQ ve NS1619 DMSO'da; KT5720 ise metanol'de çözüldü. Bu çözücüler gevşeme ve kasılma yanıtlarını tek başlarına denediklerinde değiştirmediler. Peptidlerin 10^{-6} M'luk stok solüsyonları istenilen dilüsyonlara (10^{-7} - 10^{-10} M) distile su ile seyreltildi. Bütün maddeler (7-90 μ l hacminde) banyo ortamında en son molar konsantrasyon olacak şekilde ilave edildi.

3.5. Data analizi

İzole akciğer perfüzyonunda PAB'ını düşürücü etki ve izole PA'de alınan gevşeme yanıtları U-46619 ön kasılmasının %'si olarak ifade edildi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi.

Deney gruplarından elde edilen PAB'ını düşürücü etki ve gevşeme yanıtlarının istatistiksel anlamlılığı Student'in *t*-testi ya da tek yönlü varyans analizi ve bunu takiben Student-Newman-Keuls post hoc testi kullanılarak değerlendirildi. *p* değeri 0.05'den küçük ise ortalamalar arasındaki fark anlamlı olarak kabul edildi. EC₅₀, EC₈₀, E_{maks}, pD₂ değerlerinin hesaplanmasında Graphpad 4.0 kullanıldı.

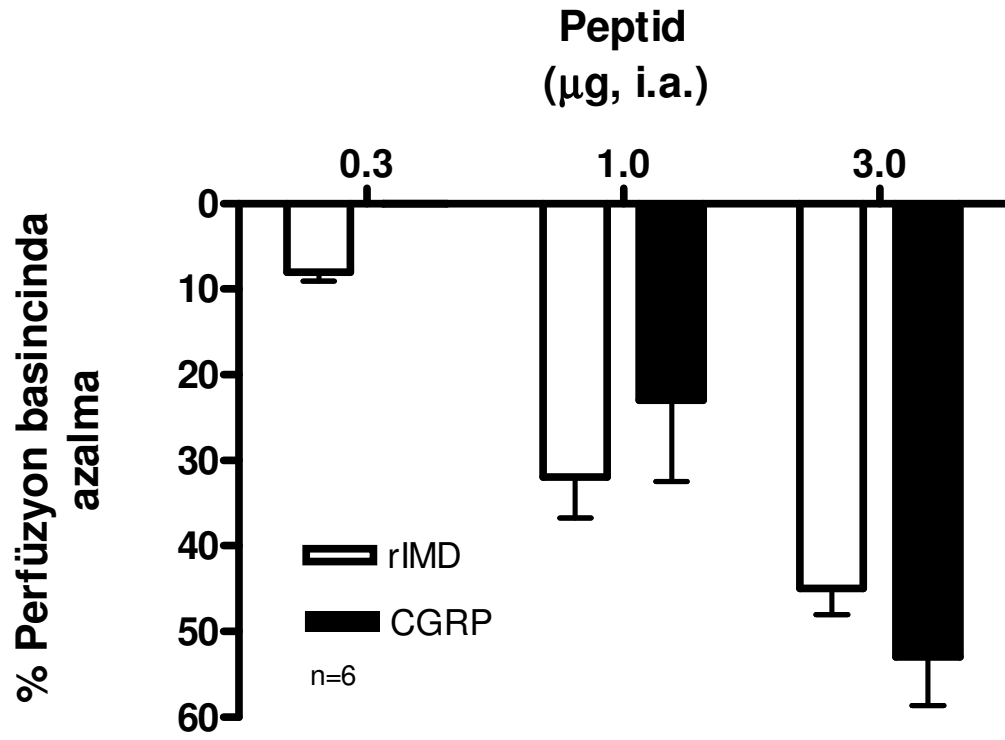
BULGULAR

4.1. İzole sıçan akciğerinde pulmoner vasküler rezistans (PVR)'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra CGRP ve rIMD'in PAB'ına etkileri

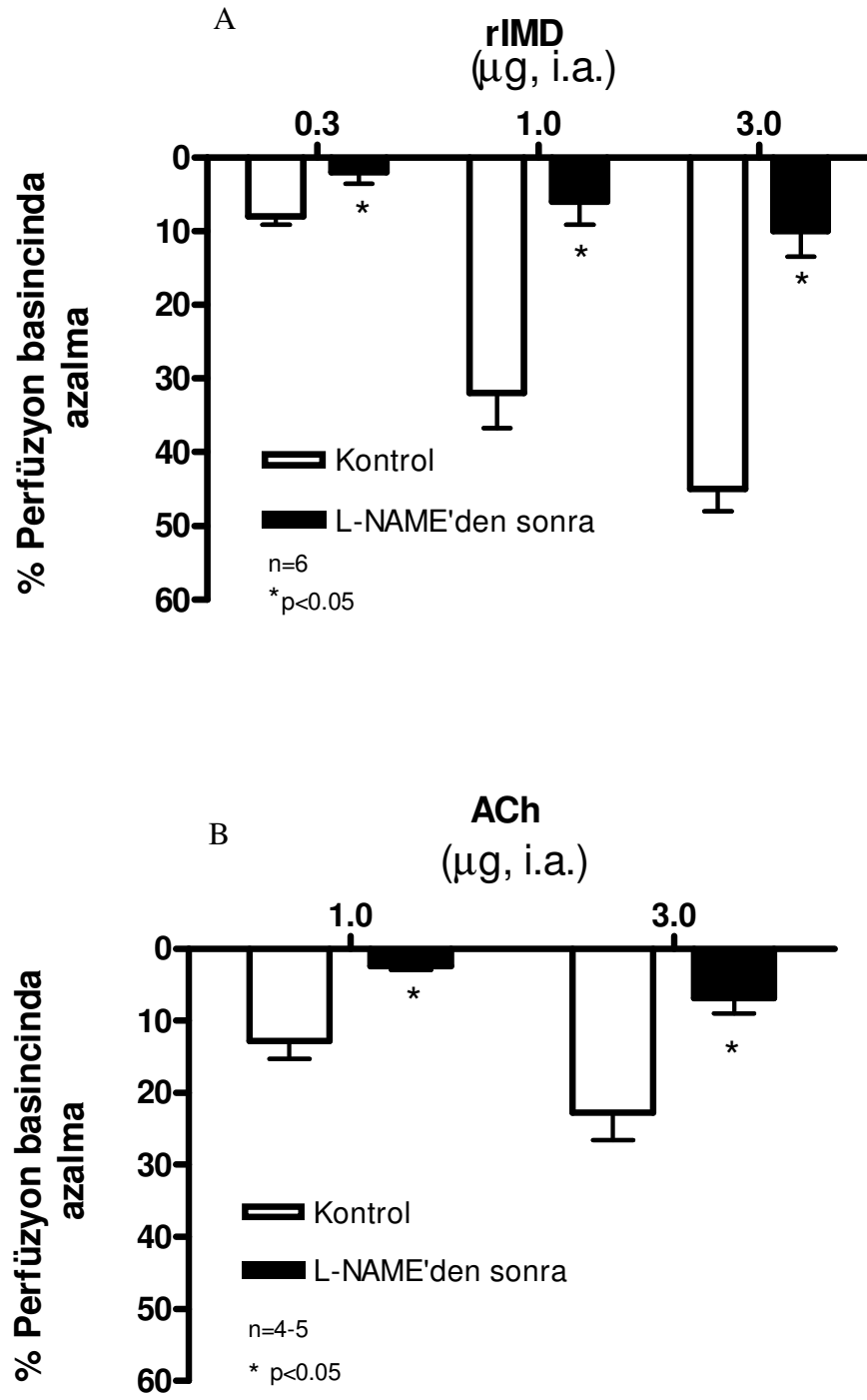
İzole sıçan akciğerinde bazal şartlarda 3 µg'a kadar rIMD'in bolus enjeksiyonları PAB'da herhangi bir değişiklik oluşturmadı (data verilmedi). Diğer bir deney grubunda, PVR'nin U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD'in (0.3-3 µg) bolus enjeksiyonları doza bağımlı olarak PAB'ını düşürdü (Şekil 4.1). Daha sonra uygulanan bolus papaverin (180µg) de PAB'ı düşürdü (% 94.33±3.42, n=6). Deney şartlarımızda perfüzyon akım hızı ve sol atriyum basıncı sabit olduğu için PAB'ındaki değişiklikler doğrudan PVR'deki değişimi göstermektedir. Aynı deney koşullarında CGRP (1-3 µg) perfüzyon basıncını rIMD'e benzer şekilde düşürdü (Şekil 4.1).

4.2. İzole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisinde NO'nun katkısı

L-NAME (10^{-4} M), rIMD (0.3-3 µg)'nin PAB düşürücü etkisini kontrole göre anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$; Şekil 4.2A). Aynı şekilde L-NAME (10^{-4} M) ACh (1-3 µg)'nin perfüzyon basıncı düşürücü etkisini de kontrole göre anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$; Şekil 4.2B).



Şekil 4.1. İzole sıçan akciğerinde PVR'nin U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD (0.3-3 µg) ve CGRP (1-3 µg)'nin PAB'ına etkileri.



Şekil 4.2. PVR'si U-46619 ile yükseltilmiş izole sıçan akciğerinde rIMD (0.3-3 μg) (A) ve ACh (1-3 μg)'in (B) PAB'ını düşürücü yanıtı üzerine L-NAME (10^{-4} M)'in etkisi. * $p<0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.

4.3. İzole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisinde siklooksijenaz ürünleri ve K_{ATP} kanallarının rolü

rIMD yanıtındaki siklooksijenaz ürünleri ve K_{ATP} kanallarının rolü iki ayrı deney grubunda araştırıldı. Perfüzyon ortamına meklofenamat (10^{-6} M) (Şekil 4.3A) ve glibenklamid (3×10^{-6} M) (Şekil 4.3B) eklenmesinden sonra U-46619 ile PVR yükseltildiğinde rIMD'in PAB düşürücü etkisi kontrolden farklı bulunmadı.

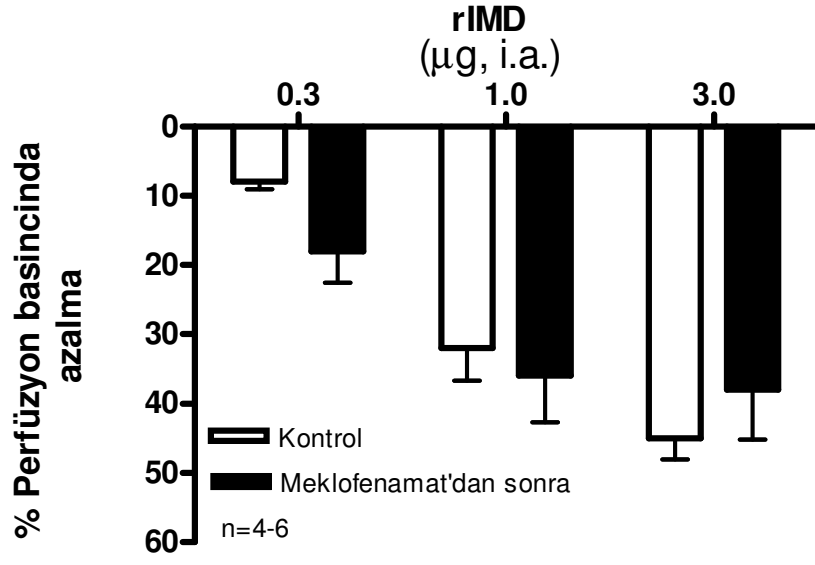
4.4. İzole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra CGRP ve rIMD'in PAB'ını düşürücü yanıtları üzerine CGRP₈₋₃₇'nin etkisi

rIMD ve CGRP'nin doza bağımlı perfüzyon basıncını düşürücü yanıtlarına CGRP reseptörlerinin katkısını inceleyebilmek için ortama CGRP₁ reseptör antagonisti CGRP₈₋₃₇ eklendi. CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M) rIMD (0.3-3 μ g)'in doza bağımlı PAB düşürücü etkisini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı ($p < 0.05$, Şekil 4.4A). CGRP (1-10 μ g)'nin doza bağımlı PAB'ını düşürücü etkisi de CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M) uygulamasından sonra anlamlı olarak azaldı ($p < 0.05$, Şekil 4.4B).

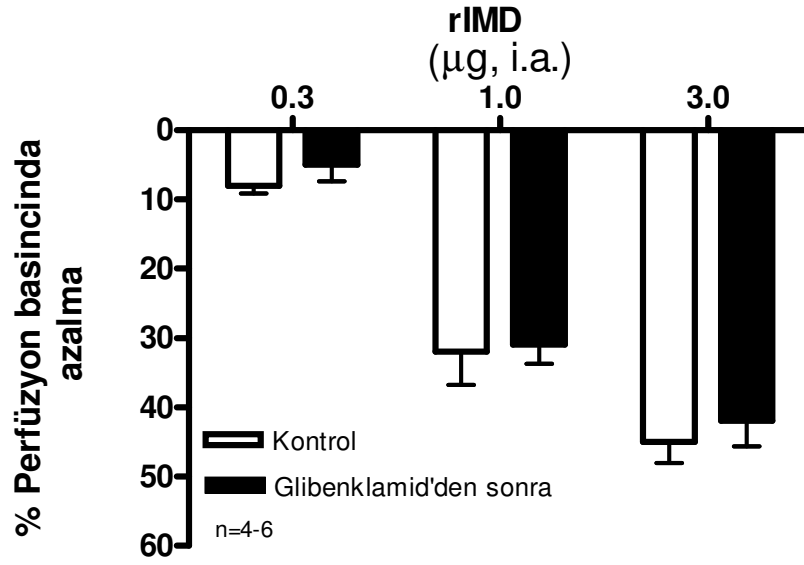
4.5. İzole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra rIMD ve CGRP'nin desensitizasyon oluşturma potansiyelleri

CGRP'nin rIMD üzerinde heterolog desensitizasyon oluşturma potansiyeli ile rIMD'in homolog desensitizasyon oluşturma potansiyeli incelendi. rIMD (10 μ g)'in PAB'ını düşürücü etkisi CGRP tek doz bolus (10 μ g) uygulanmasından sonra tekrarlandığında değişmedi ($p < 0.05$; Şekil 4.5A). rIMD (0.3-3 μ g)'in tekrarlanan bolus enjeksiyonları ile doza yanıt eğrileri değişmedi (Şekil 4.5B).

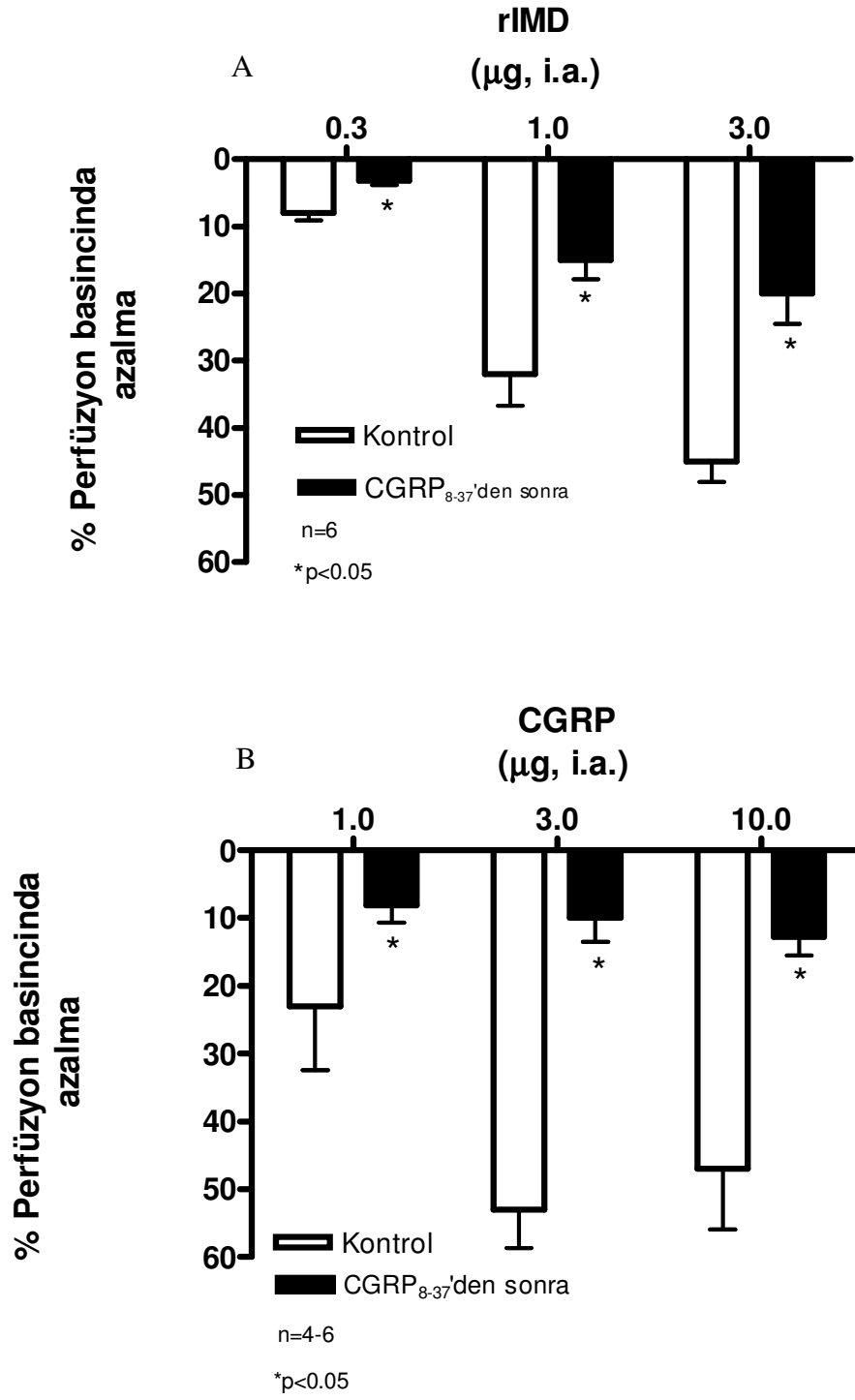
A



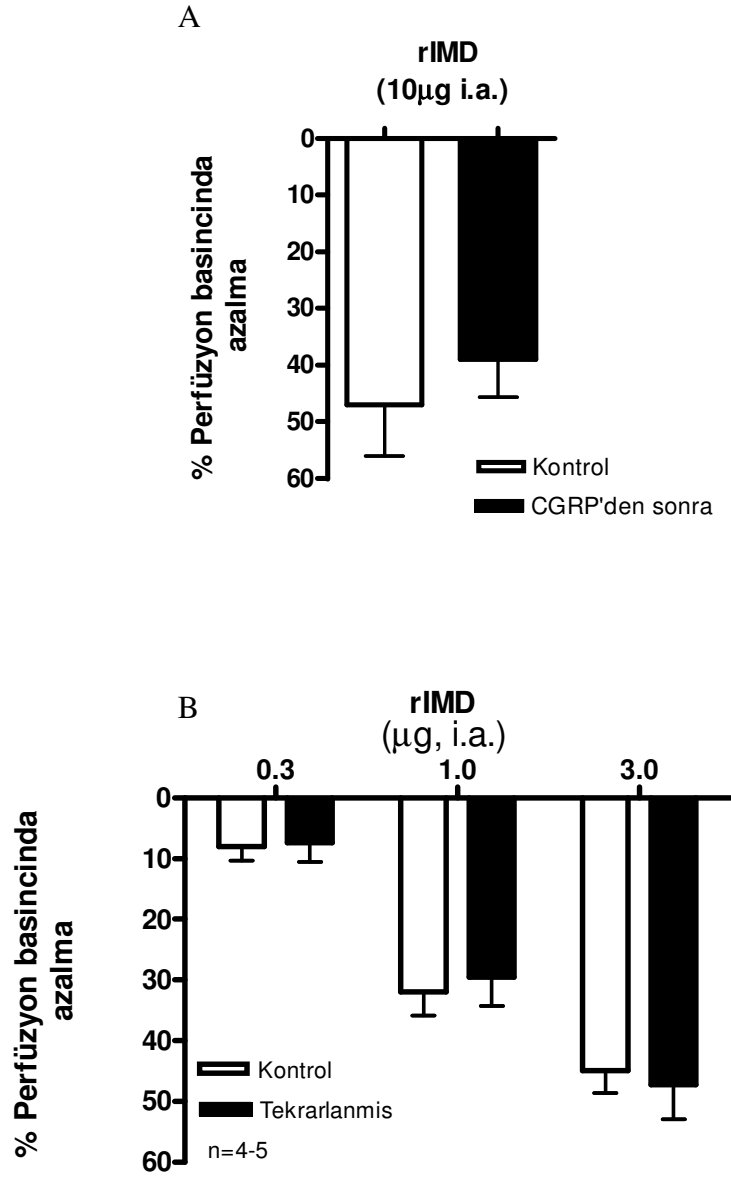
B



Şekil 4.3. PVR'si U-46619 ile yükseltilmiş izole sıçan akciğerinde rIMD (0.3-3 µg)'in PAB'ı düşürücü yanıtı üzerine meklofenamat (10^{-6} M) (A) ve glibenklamid (3×10^{-6} M) (B)'in etkisi.



Şekil 4.4. İzole sıçan akciğerinde PVR U-46619 ile yükseltildikten sonra rIMD (0.3-3 μg) (A) ve CGRP(1-10 μg) (B)'nin PAB'ı düşürücü yanıtları üzerine CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M)'nin etkisi.* $p<0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.5. PVR'si U-46619 ile yükseltilmiş izole sıçan akciğerinde rIMD (10 μ g)'in tek bir bolus CGRP (10 μ g) enjeksiyonundan sonra PAB'ını düşürücü etkisi (A). rIMD (0.3-3 μ g)'nin bolus enjeksiyonları ile elde edilen doz yanıt eğrileri (B).* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.

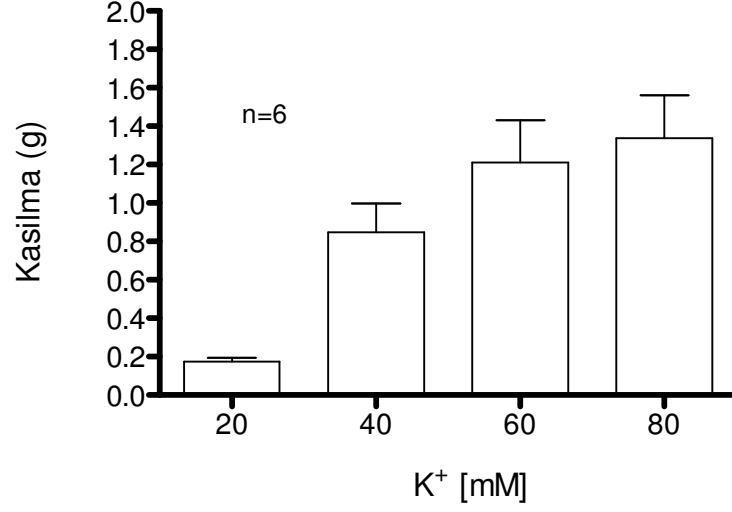
4.6. İzole sıçan ana pulmoner arter (PA) halkalarında submaksimal kasılma oluşturan K^+ ve U-46619 konsantrasyonlarının hesaplanması ve CGRP ailesi peptidlerinin oluşturdukları pulmoner damar gevşetici etkilerin incelenmesi

PA'dan hazırlanan halka preparatlarda, bazal durumda banyo ortamına artan konsantrasyonlarda rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) eklenmesi tonusta herhangi bir değişiklik meydana getirmedi (data verilmedi).

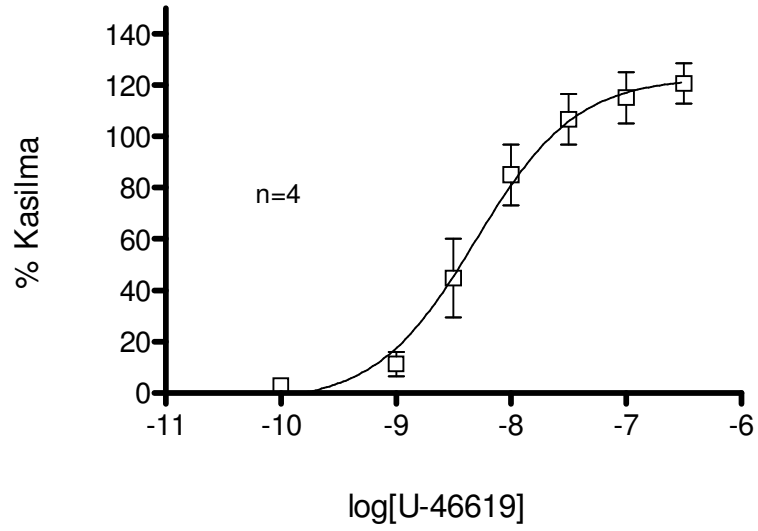
PA halkalarının değişik konsantrasyonlarda K^+ içeren Krebs Henseleit çözeltileri kullanılarak submaksimal kasılma oluşturan konsantrasyonu 60 mM olarak belirlendi. Bu konsantrasyon referans alınarak tromboksan A_2 reseptörleri (TxA_2) üzerinden etki gösteren U-46619'nın submaksimal kasılma oluşturan konsantrasyonu 30 nM olarak hesaplandı ($\log EC_{80}$: -7.56 ± 0.19 M; Şekil 4.6. A, B).

30 nM U-46619 ile stabil bir kasılma oluşturulduktan sonra kümülatif rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtı elde edildi (Şekil 4.7, 4.8.A). CGRP ailesine ait diğer peptidler [AM (10^{-11} - 10^{-6} M), CGRP (10^{-10} - 10^{-6} M)] ve endotel bağımlı gevşeme yanıtı oluşturan ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) ile de konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları alındı (Şekil 4.8.A, ve B). rIMD diğer peptidlerden potent (pD_2 : rIMD; 8.15 ± 0.08 , CGRP; 7.91 ± 0.09 , AM; 7.73 ± 0.1 ve ACh; 6.85 ± 0.17) ve efikasitesi yüksek bulundu (E_{maks} %: rIMD; 66.27 ± 2.33 , CGRP; 49.25 ± 2.53 , AM; 49.02 ± 2.43 , ACh; 66.94 ± 3.62) ($p < 0.05$; Şekil 4.8A). Deney sonunda papaverin (10^{-4} M) ile de gevşeme yanıtı elde edildi (% 97.98 ± 1.02 , $n=6$).

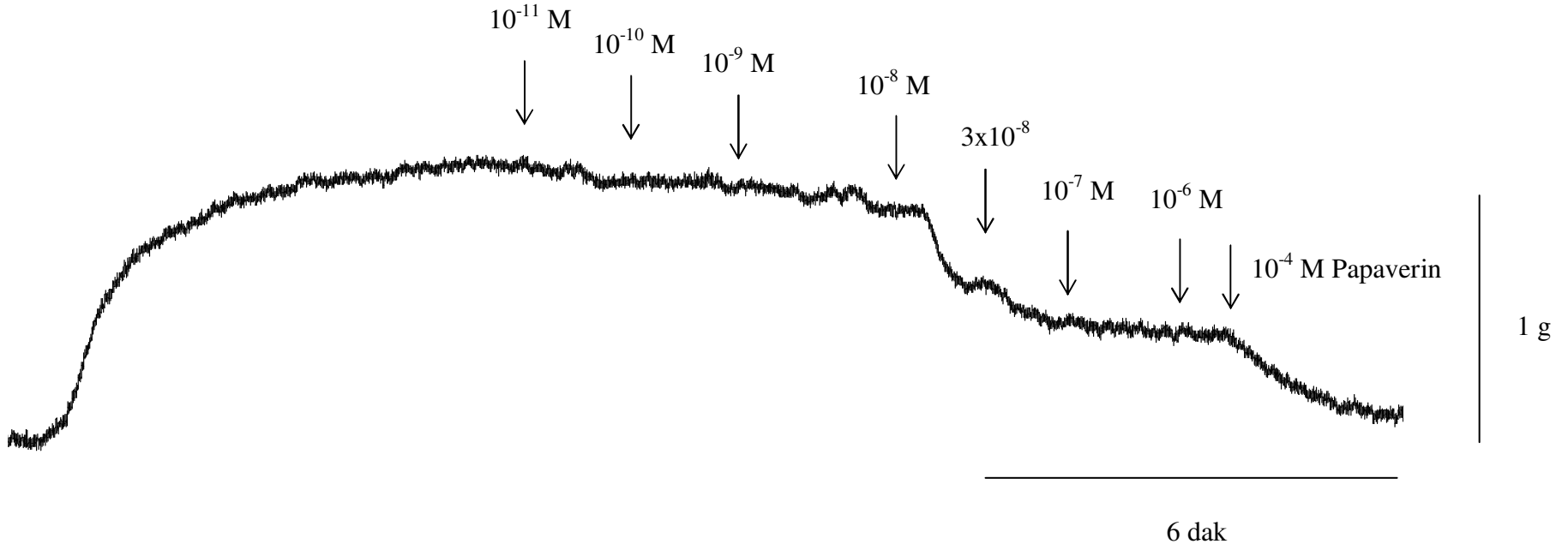
A



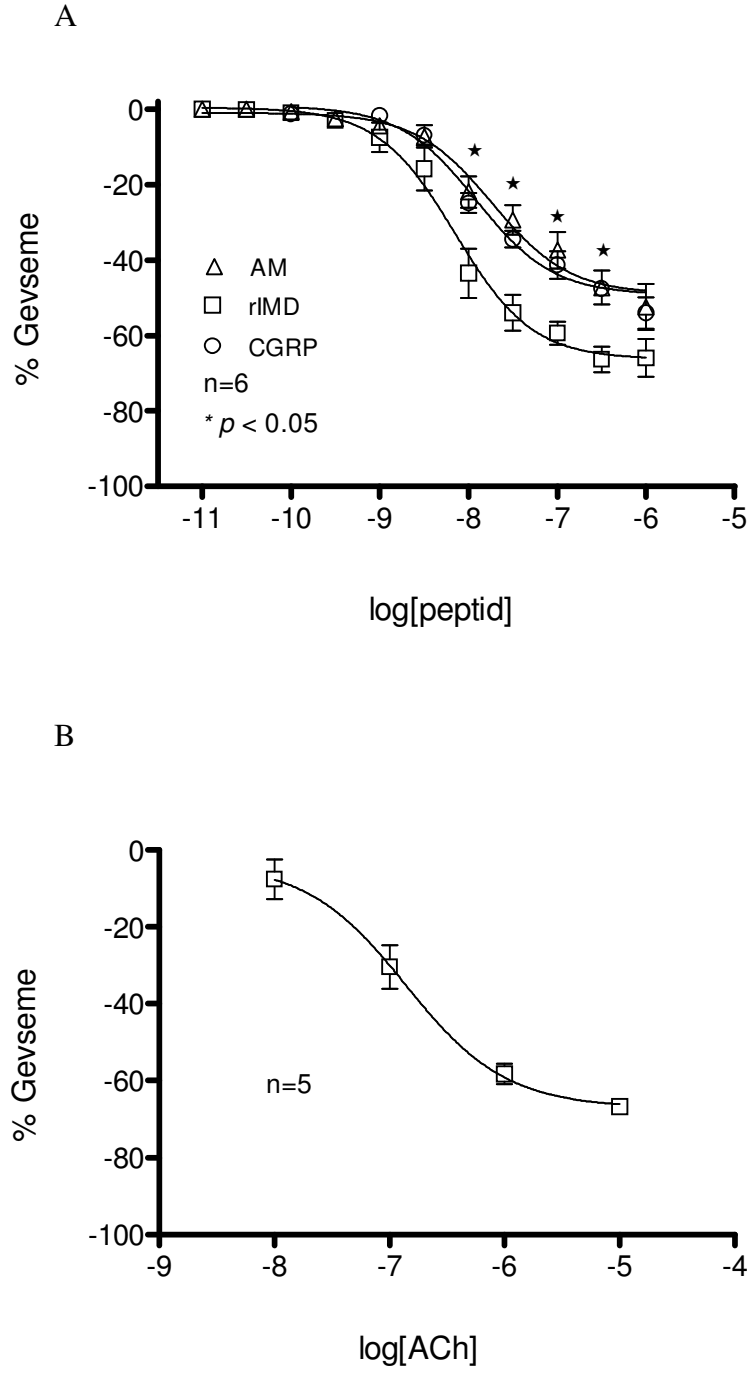
B



Şekil 4.6. İzole sıçan PA halkalarında K⁺ artan konsantrasyonlarını (20-80 mM) içeren Krebs Henseleit çözeltileri ile elde edilen kasılma yanıtı (A) ve U-46619 (10⁻¹⁰-10⁻⁶ M) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi (B).



Şekil 4.7. 30 nM U-46619 ile önkasılma oluşturulmuş izole sıçan PA'inde rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) ile elde edilen konsantrasyona bağımlı gevşemeleri gösteren deney trasesi.



Şekil 4.8. 30 nM U-46619 ile ön kasılma sonrasında izole sıçan PA'de AM, rIMD, CGRP (10^{-10} - 10^{-6} M) (A) ve ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) (B) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrileri. $*p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.

4.7. PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında NO', siklooksijenaz ürünleri ve K_{ATP} kanallarının rolü

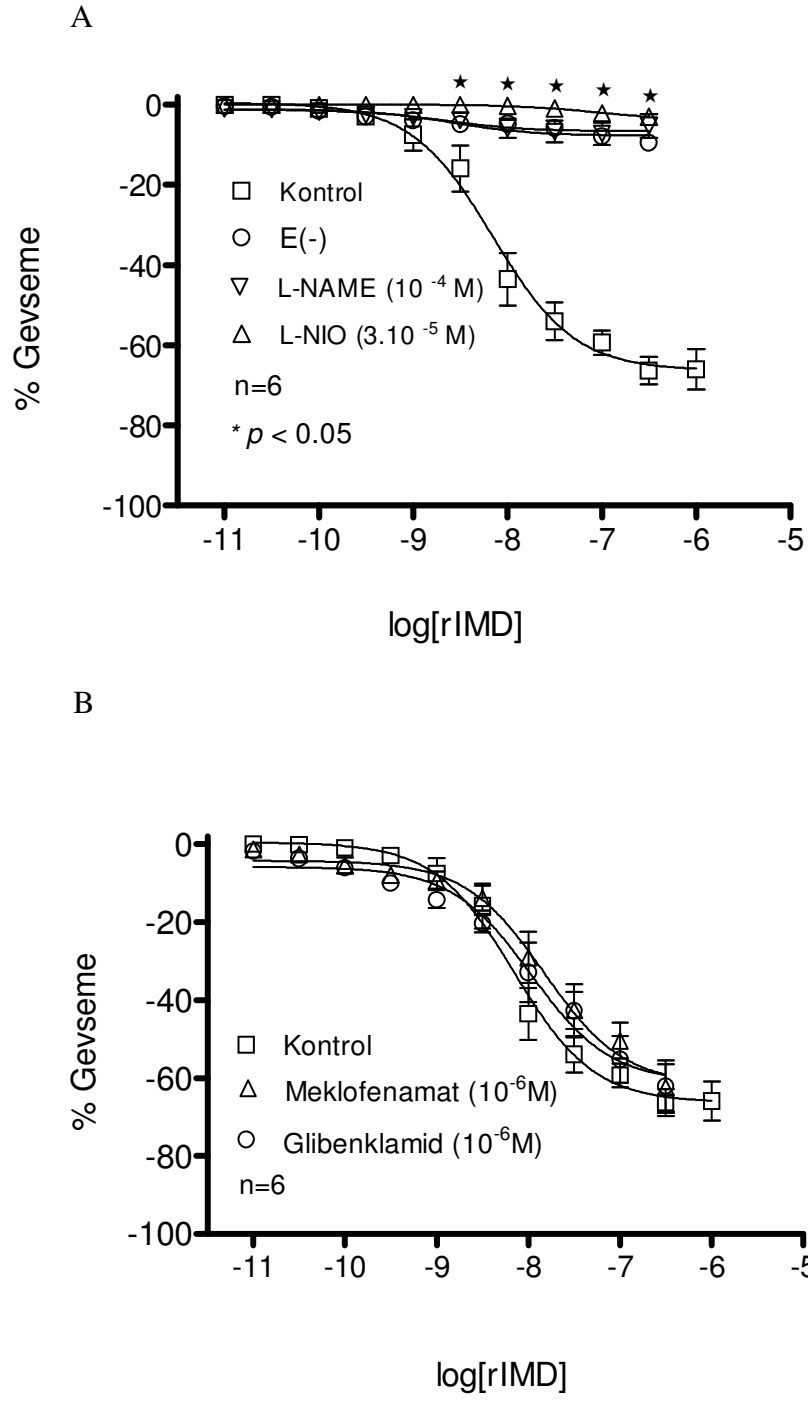
PA'de endotel tabakasının uzaklaştırılması, rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıtını tamamen ortadan kaldırırken ($p<0.05$, Şekil 4.9A) izoproterenol (10^{-11} - 3×10^{-7} M)'ün gevşeme yanıtını ise değiştirmede (E_{maks} : e(+) 52.8 ± 6.5 , e(-) 48.7 ± 6.5 , $p>0.05$, $n=6$). Aynı şekilde, nitrik oksit sentaz inhibitörleri L-NAME (10^{-4} M) ve L-NIO (3×10^{-5} M) ile de rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) yanıtlarının tamamen bloke olduğu görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.9A). K_{ATP} kanallarının ve siklooksijenaz ürünlerinin bu gevşeme yanıtındaki katkısını araştırmak için yapılan deneylerde K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-6} M) ve siklooksijenaz enzim inhibitörü meklofenomat (10^{-6} M)'in ortama eklenmesi rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) gevşeme yanıtını değiştirmede ($p>0.05$, Şekil 4.9B).

4.8. PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarına IMD₁₇₋₄₇'nin değişik konsantrasyonlarının ve AM, CGRP reseptör antagonistlerinin etkisi

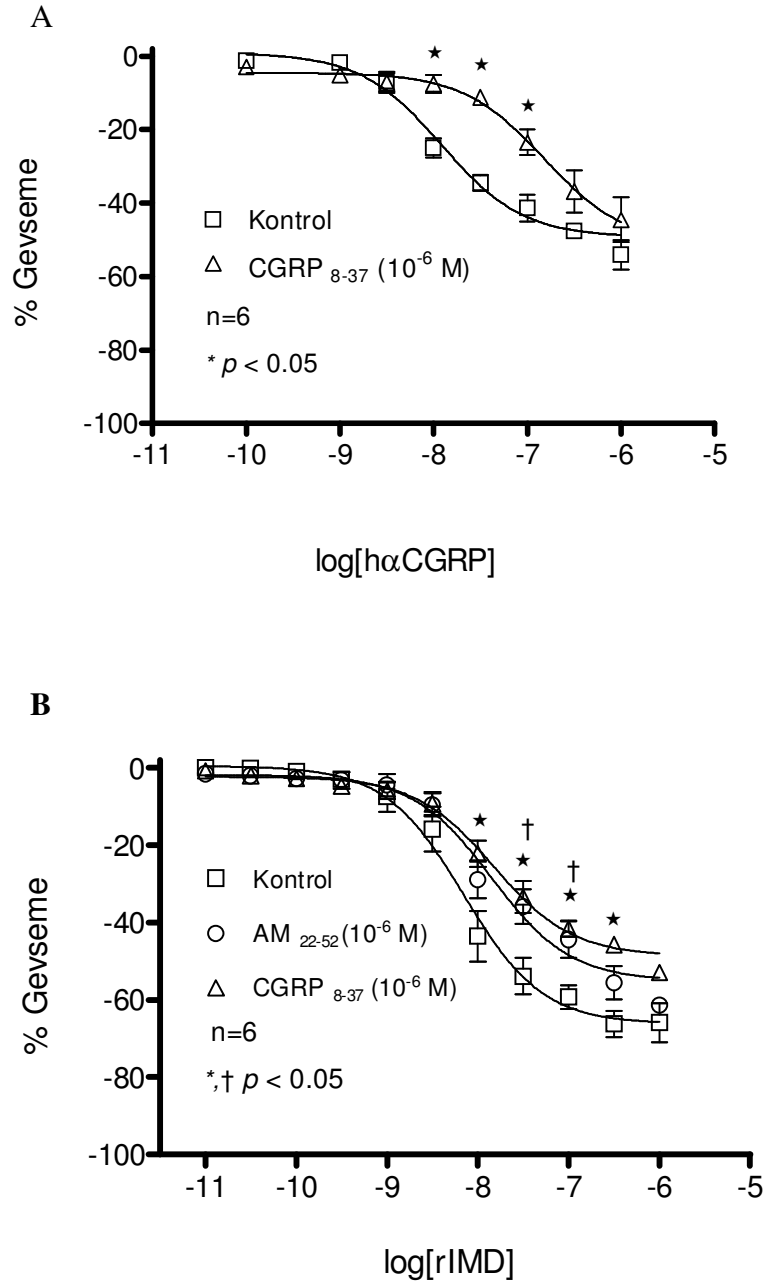
Sıçan PA'de CGRP₁ reseptör antagonisti CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M) ortama eklendiğinde, CGRP (10^{-10} - 10^{-6} M)'nin oluşturduğu gevşeme yanıt eğrisini kompetitif bir şekilde bloke ederken, rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıt eğrisini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe etti ($p<0.05$, Şekil 4.10A, B).

AM₁ ve AM₂ reseptörlerinin non-selektif antagonisti olan AM₂₂₋₅₂ (10^{-6} M) ile inkübasyon AM (10^{-11} - 10^{-6} M) ve rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıtında bir inhibisyon oluşturdu ($p<0.05$, Şekil 4.11A, 4.10B).

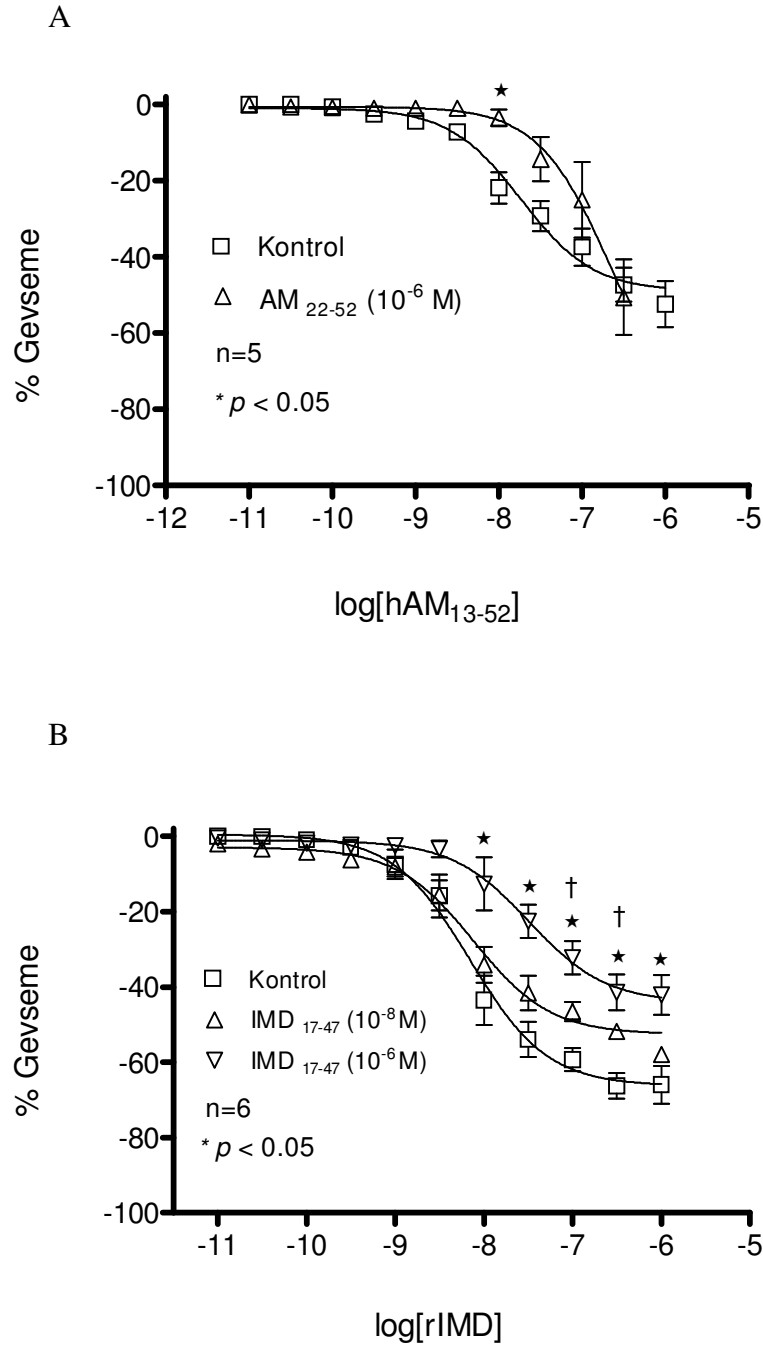
PA, rIMD reseptörlerinin spesifik antagonisti olabileceği bildirilen IMD₁₇₋₄₇'in farklı konsantrasyonları (10^{-6} , 10^{-8} M) ile inkübe edildiğinde rIMD yanıtına karşı konsantrasyona bağımlı bir şekilde inhibe ettiği görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.11B). IMD₁₇₋₄₇ (10^{-6} M) AM ve CGRP (10^{-10} - 10^{-6} M)'nin oluşturduğu pulmoner arter gevşeme yanıtlarını ise etkilemedi ($p>0.05$, Şekil 4.12A, B). CGRP₈₋₃₇ ve AM₂₂₋₅₂ (10^{-6} M) birlikte kullanılması rIMD yanıtını IMD₁₇₋₄₇ (10^{-6} M)'nin oluşturduğu inhibisyona eşit şekilde inhibe etti ($p<0.05$, Şekil 4.12C).



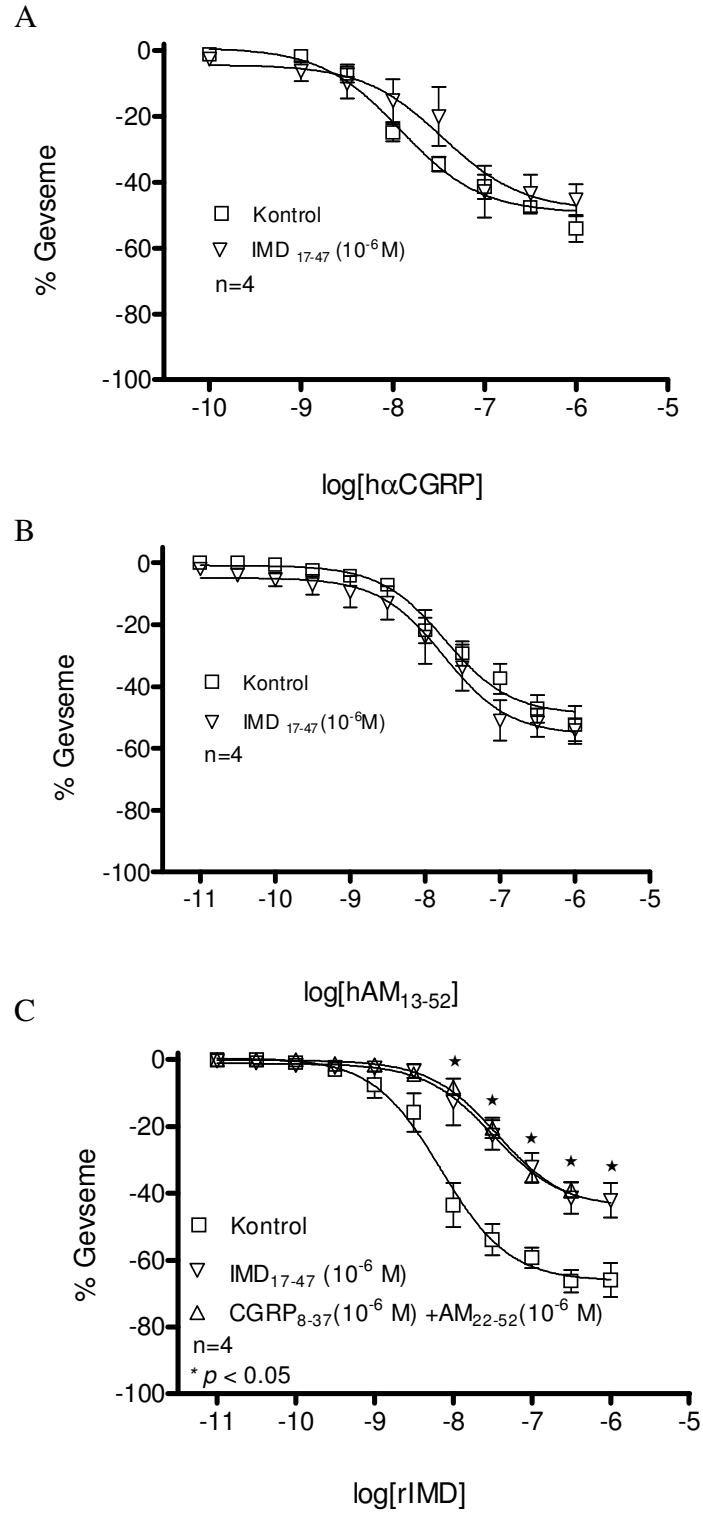
Şekil 4.9. 30 nM U-46619 ile ön kasılma oluşturulmuş sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine endotel hasarı, L-NAME (10^{-4} M) ve L-NIO (3×10^{-5} M) (A) ile meklofenamat (10^{-6} M) ve glibenklamid (10^{-6} M)'in (B) etkisi.* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.10. Sıçan PA halkalarında CGRP (10⁻¹⁰-10⁻⁶ M) ile elde edilen konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtına CGRP₈₋₃₇ (10⁻⁶ M)'nin etkisi (A). rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine CGRP₈₋₃₇ ve AM₂₂₋₅₂ (10⁻⁶ M) etkisi (B). * *p* < 0.05 CGRP₈₋₃₇ kontrolü ile karşılaştırıldığında, † *p* < 0.05 AM₂₂₋₅₂ kontrolü ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.11. Sıçan PA halkalarında AM (10^{-11} - 10^{-6} M) ile elde edilen konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtına AM₂₂₋₅₂ (10^{-6} M)'nin etkisi (A). rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine IMD₁₇₋₄₇ (10^{-6} , 10^{-8} M)'in etkisi (B). * *p* < 0.05 IMD₁₇₋₄₇ (10^{-6} M) kontrolü ile karşılaştırıldığında, † *p* < 0.05 IMD₁₇₋₄₇ (10^{-8} M) kontrolü ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.12. CGRP (10^{-10} - 10^{-6} M) (A) ve AM (10^{-11} - 10^{-6} M) (B) ile elde edilen konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtına IMD_{17-47} (10^{-6} M)'nin etkisi. rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) ile elde edilen konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtına $CGRP_{8-37}$ ve AM_{22-52} (10^{-6} M)'nin birlikte etkisi (C). * $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.

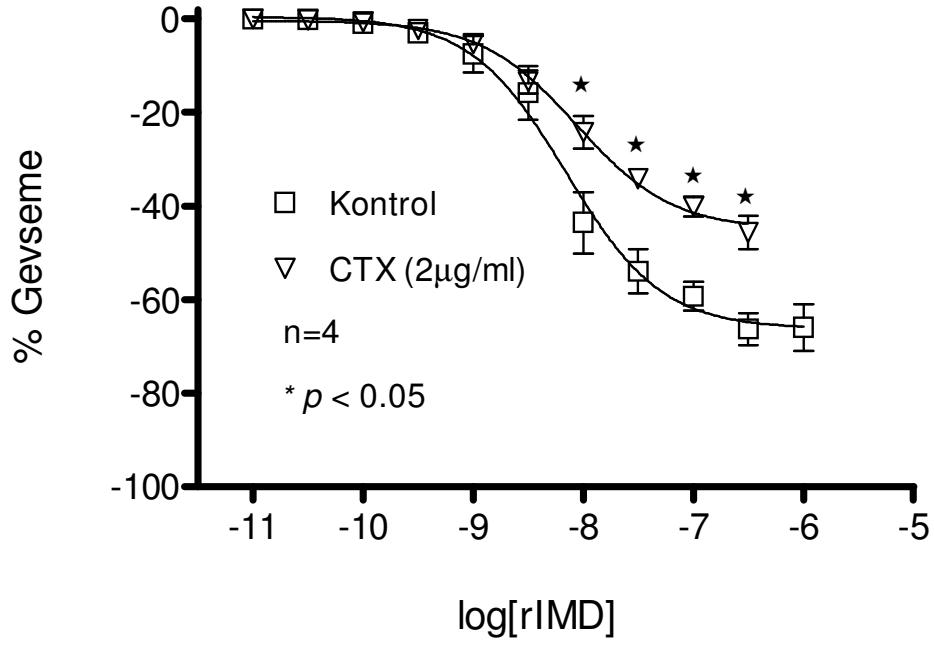
4.9. PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında G proteinlerinin rolü

Sıçan PA halkalarında rIMD reseptörleri aracılı gevşeme yanıtında G proteinlerinin katkısını araştırmak için G_{as} aktivatörü kolera toksini (CTX) kullanıldı. rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in oluşturduğu gevşeme yanıtı CTX (2 µg/ml) ile inhibe oldu ($p < 0.05$, Şekil 4.13).

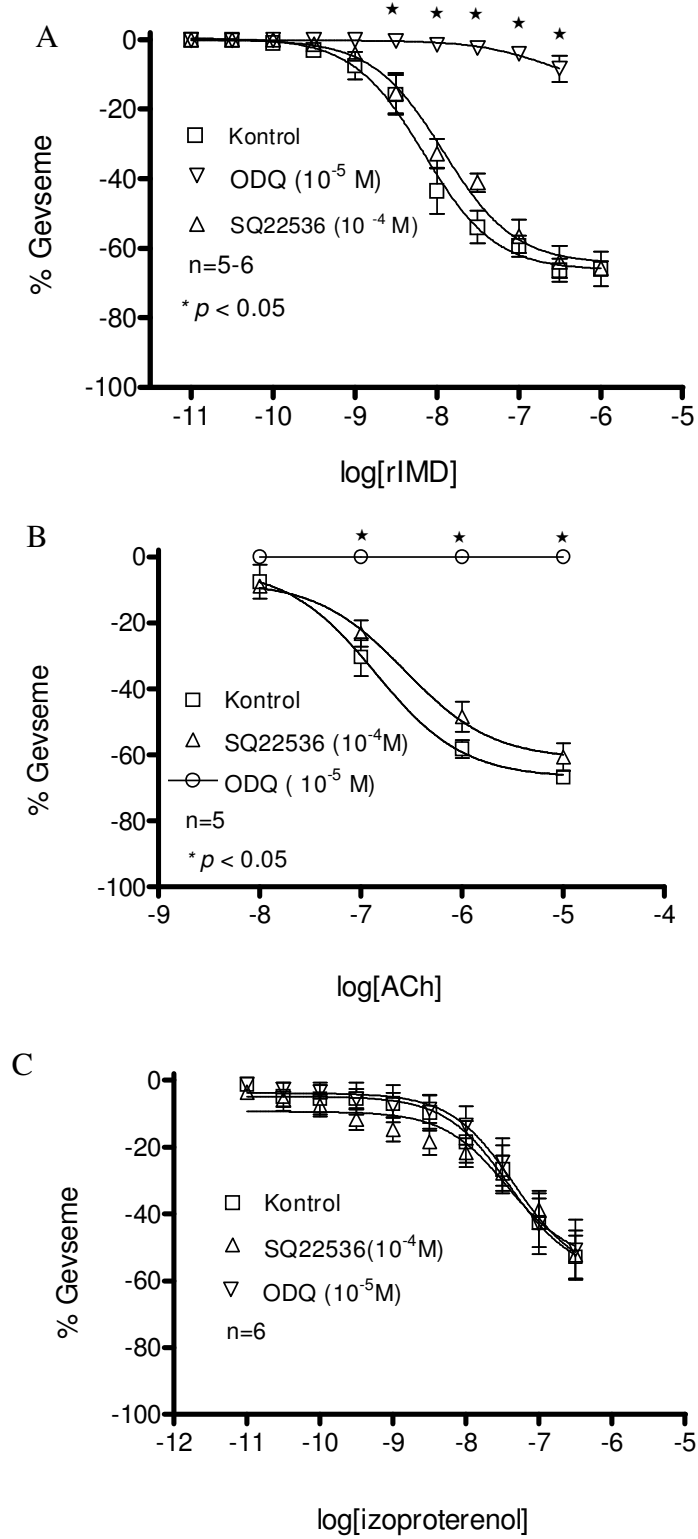
4.10. PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında siklik nükleotidlerin (sAMP, sGMP) rolü

Sıçan PA halkalarında rIMD reseptörleri aracılı gevşeme yanıtının hücre içi mekanizmalarını belirlemek için guanilat siklaz enzim inhibitörü ODQ ve adenilat siklaz enzim inhibitörü SQ22536 kullanıldı. rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıtı ODQ (10^{-5} M) ile tamamen bloke olurken ($p < 0.05$, Şekil 4.14A), SQ22536 (10^{-4} M) ile değişmedi ($p > 0.05$, Şekil 4.14A).

SQ22536 (10^{-4} M) ile inkübasyon 30 nM U-46619 ile önkasılma sonrasında elde edilen ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) ve izoproterenol (10^{-11} - 3×10^{-7} M) gevşeme yanıt eğrilerini değiştirmede ($p > 0.05$, Şekil 4.14B, C). ODQ (10^{-5} M) ile inkübasyon, 30 nM U-46619 ile önkasılma sonrasında elde edilen ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) gevşeme yanıtını ortadan kaldırırken ($p < 0.05$, Şekil 4.14B), izoproterenol (10^{-11} - 3×10^{-7} M) yanıtını etkilemedi ($p > 0.05$, Şekil 4.14C).



Şekil 4.13. Sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıtları üzerine kolera toksininin (CTX, 2 µg/ml) etkisi.* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.14. Sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıtları üzerine ODQ (10^{-5} M) ve SQ22536 (10^{-4} M)'nın etkisi (A). ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) (B) ve izoproterenol (10^{-11} - 3×10^{-7} M) (C) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi üzerine ODQ (10^{-5} M) ve SQ22536 (10^{-4} M)'nın etkisi.* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.

4.11. PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında fosfodiesteraz enzimlerinin (PDE 3, 4, 5) rolü

30 nM U-46619 ile önkasılma oluşturulmuş sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) gevşeme yanıtlarında fosfodiesteraz enzimlerinin katkısını araştırmak için PDE 3 ve 4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M) ile PDE 5 inhibitörleri olan zaprinast (10^{-5} M) ve sildenafil (10^{-7} M) kullanıldı.

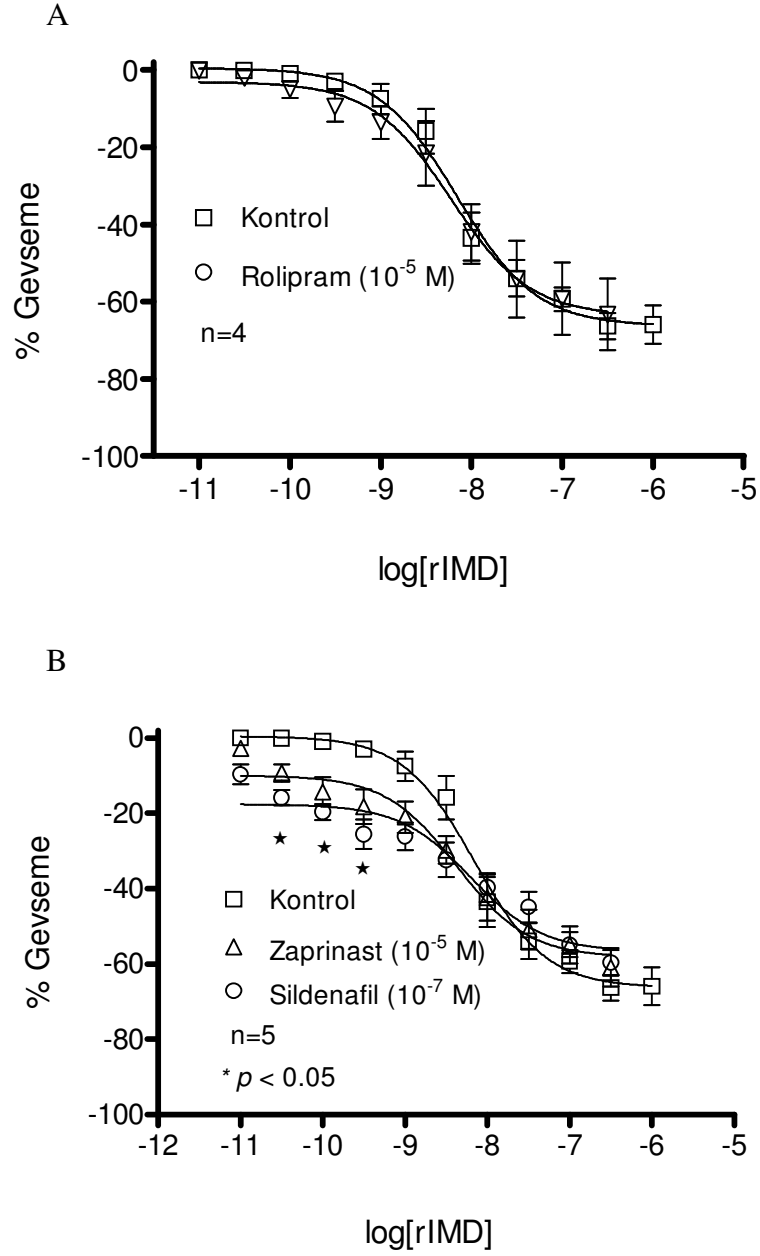
sAMP nükleotidinin yıkımından sorumlu olan PDE 3 ve 4 enziminin rolipram (10^{-5} M) ile inhibe edilmesi rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) gevşeme yanıtını değiştirmedir ($p>0.05$, Şekil 4.15A).

sGMP nükleotidinin yıkımını sağlayan PDE 5 enziminin zaprinast (10^{-5} M) veya sildenafil (10^{-7} M) ile inhibe edilmesi rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in düşük konsantrasyonlarda oluşturduğu gevşeme yanıtlarını potansiyalize etti ($p<0.05$, Şekil 4.15B).

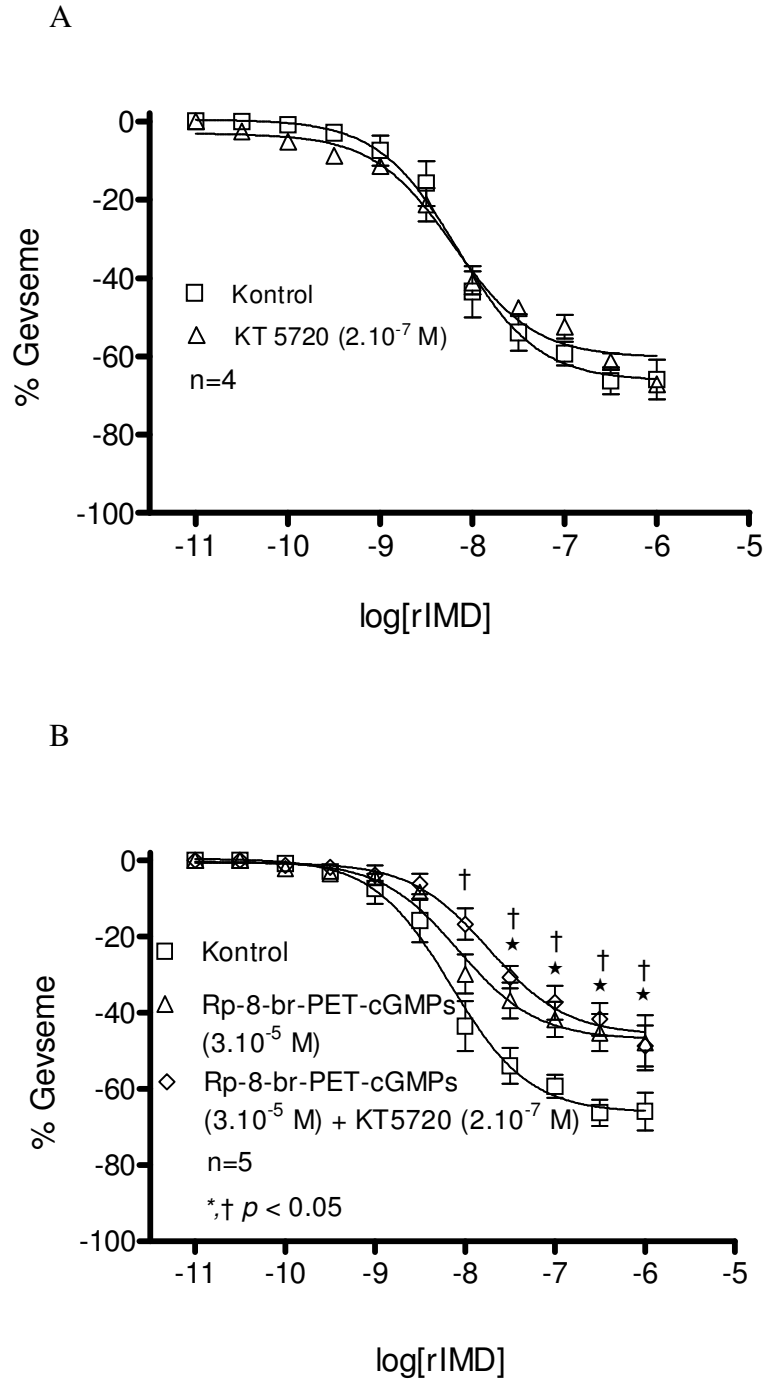
4.12. PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında protein kinaz A ve G (PKA, PKG)'nin rolü

Sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarında hücre içinde oluşan siklik nükleotidlerin hangi tip protein kinazları aktive ettiklerini araştırmak için protein kinaz A inhibitörü KT5720 kullanıldı. rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) gevşeme yanıt eğrisi KT5720 (2×10^{-7} M) ile değişmedi ($p>0.05$, Şekil 4.16A).

Protein kinaz G inhibitörü Rp-8-br-PET-cGMPs (3×10^{-5} M)'nin ortama eklenmesi rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) gevşeme yanıt eğrisini inhibe etti ($p<0.05$, Şekil 4.16B). Her iki protein kinaz inhibitörünün birlikte kullanılması ise yanıtta daha fazla bir inhibisyon oluşturmadı (Şekil 4.16B).



Şekil 4.15. Sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarına rolipram (10^{-5} M) (A) ile zaprinast (10^{-5} M) ve sildenafil (10^{-7} M) (B)'in etkileri. * $p < 0.05$ Zaprinast ve sildenafil kontrolü ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.16. Sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon yanıt eğrileri üzerine KT5720 (2×10^{-7} M) (A) ve Rp-8-br-PET-cGMPs (3×10^{-5} M) (B)'nin etkisi. * $p < 0.05$ Rp-8-br-PET-cGMPs kontrolü ile karşılaştırıldığında. † $p < 0.05$ Rp-8-br-PET-cGMPs + KT5720 kontrolü ile karşılaştırıldığında.

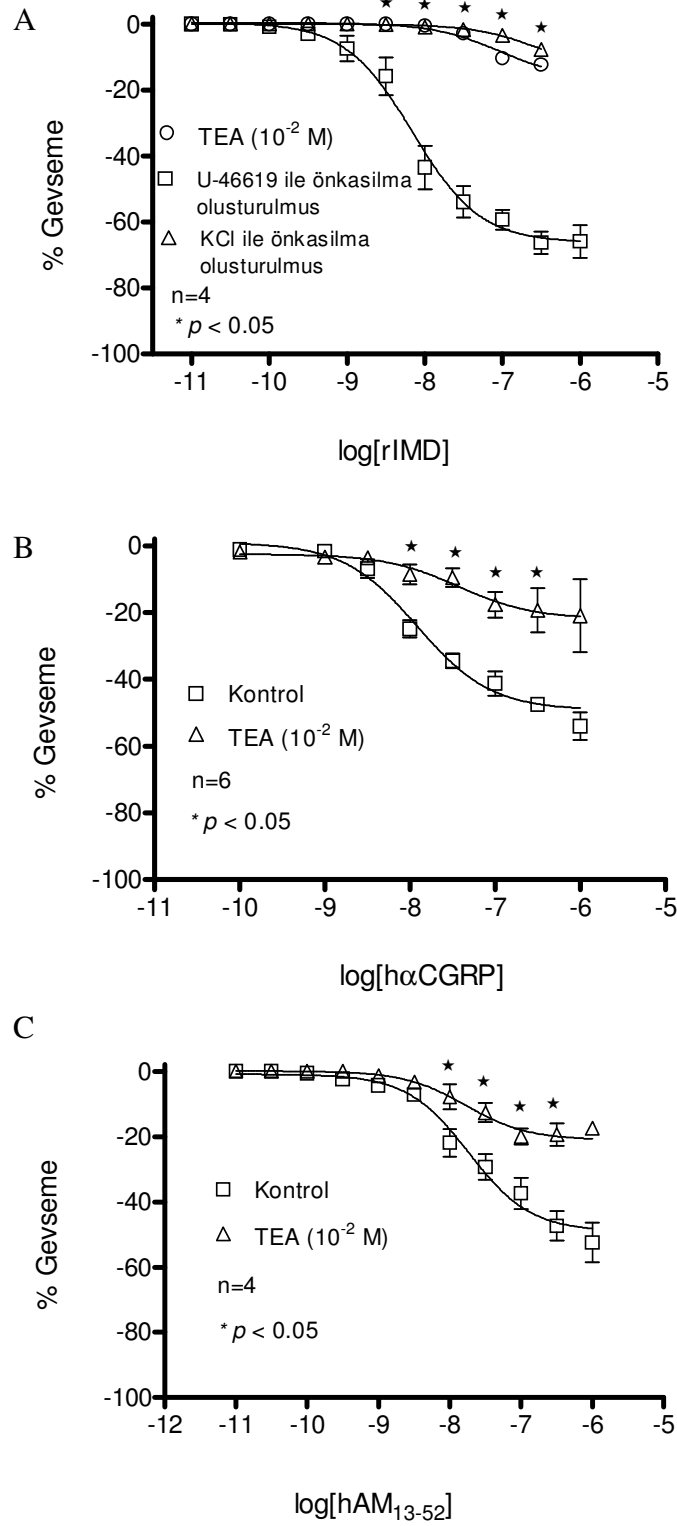
4.13. PA'de rIMD, CGRP, AM ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında K⁺ kanallarının rolü

Sıçan PA halkaları 60 mM K⁺ ile kasıldığında rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M)'in gevşeme yanıtları tamamen inhibe oldu ($p<0.05$, Şekil 4.17A). rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M)'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarına K⁺ kanallarının etkisini araştırmak için spesifik olmayan K⁺ kanal blokörü tetraetilamonyum (TEA) kullanıldı. TEA (10⁻² M) ile inkübasyon CGRP (10⁻¹⁰-10⁻⁶ M), rIMD ve AM (10⁻¹¹-10⁻⁶ M)'in oluşturduğu gevşeme yanıtını da bloke etti ($p<0.05$, şekil 4.17A,B,C).

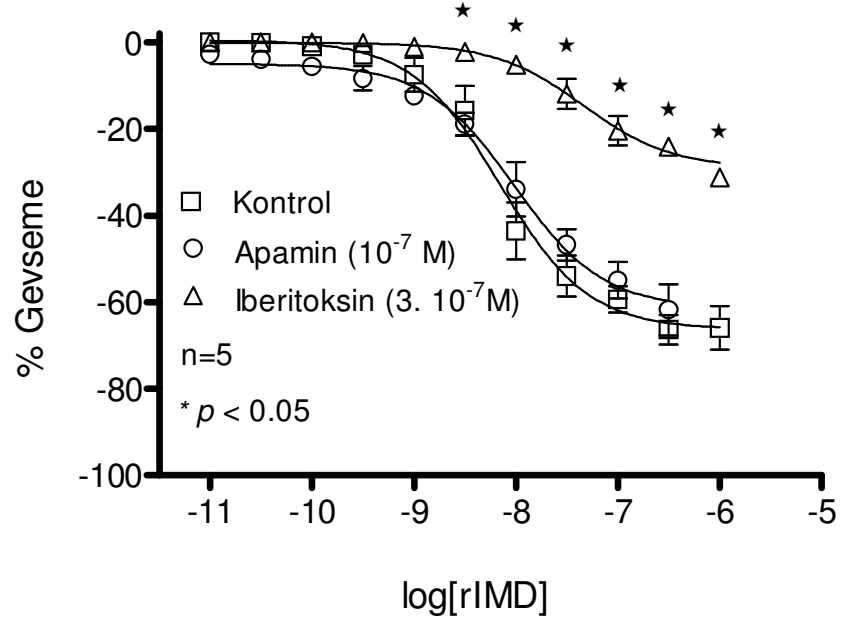
4.14. PA'de rIMD ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında kalsiyum ile aktive olan K⁺ kanallarının rolü

Sıçan PA halkalarında rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M)'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarına BK_{Ca}'nın katkısını araştırmak için spesifik BK_{Ca} inhibitörü iberitoksin kullanıldı. İberitoksin (3x10⁻⁷M), rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak inhibe etti ($p<0.05$, Şekil 4.18).

Aynı şekilde küçük kondüktanslı kalsiyum ile aktive olan K⁺ kanallarının (SK_{Ca}) etkisini araştırmak için kullanılan spesifik SK_{Ca} inhibitörü apamin (10⁻⁷ M), rIMD (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) yanıtını değiştirmede (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Sıçan PA halkalarında rIMD (A), CGRP (B), AM (10^{-11} - 10^{-6} M) (C)'in gevşeme yanıtları üzerine TEA (10^{-2} M)'un etkisi. 60 mM K^+ ile önkasılma sonrasında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıtları (A). * $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.18. Sıçan PA halkalarında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M)'in gevşeme yanıtları üzerine iberitoksin (3×10^{-7} M) ve apamin (10^{-7} M)'in etkisi.* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.

4.15. Pulmoner hipertansiyon grubunda rIMD'in izole sıçan akciğerinde PVR'ın U-46619 ile yükseltilmesinden sonra PAB'ına ve U-46619 ile önkasılma oluşturulmuş PA halkaları üzerine etkisi

PHT oluşturulmuş sıçanlarda kan hemotokrit değerlerinde ve bazal perfüzyon basınçlarında istatistiksel olarak anlamlı artış ve sağ kalp hipertrofisi gözlemlendi (Tablo 4.1.).

PHT oluşturulmuş izole sıçan akciğerinde U-46619 ile PVR yükseltildiğinde tek doz bolus rIMD (1 µg)'in ve ACh (3µg)'in PAB düşürücü etkisi kontrole göre farklı bulunmadı ($p>0.05$, Şekil 4.19). Aynı deney grubunda papaverinin (180µg) PAB'ını düşürücü etkisi de kontrole göre değişmedi (kontrol: % 94.33±3.42; PHT: % 99.16±0.84, $p>0.05$, n=4-6).

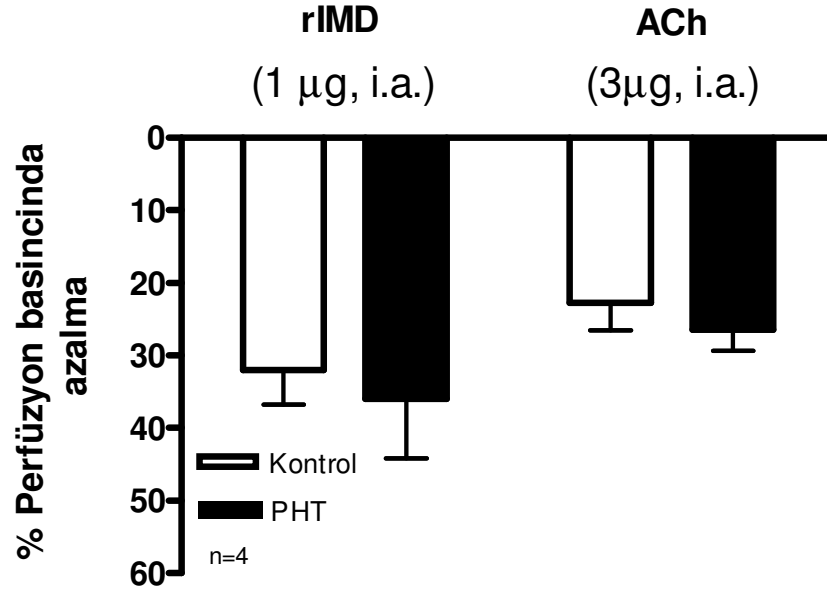
PHT oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen PA halkalarında ise rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) ve ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) gevşeme yanıtı kontrol sıçanlardan elde edilen yanıtlara göre anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$, Şekil 4.20A, B). Papaverin (10^{-4} M) gevşeme yanıtı ise değişmedi (kontrol: % 97.98±1.02; PHT: % 95.10±2.41, $p>0.05$, n=4-6).

PHT oluşturulmuş izole PA halkalarında rIMD gevşeme yanıtında meydana gelen azalmanın mekanizmasını araştırmak amacıyla spesifik BK_{Ca} aktivatörü NS1619 kullanıldı. PHT oluşturulmuş sıçan PA halkalarında 30 nM U-46619 ile önkasılma sonrasında NS1619 (10^{-5} M) gevşeme yanıtı kontrole göre anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$, Şekil 4.20C).

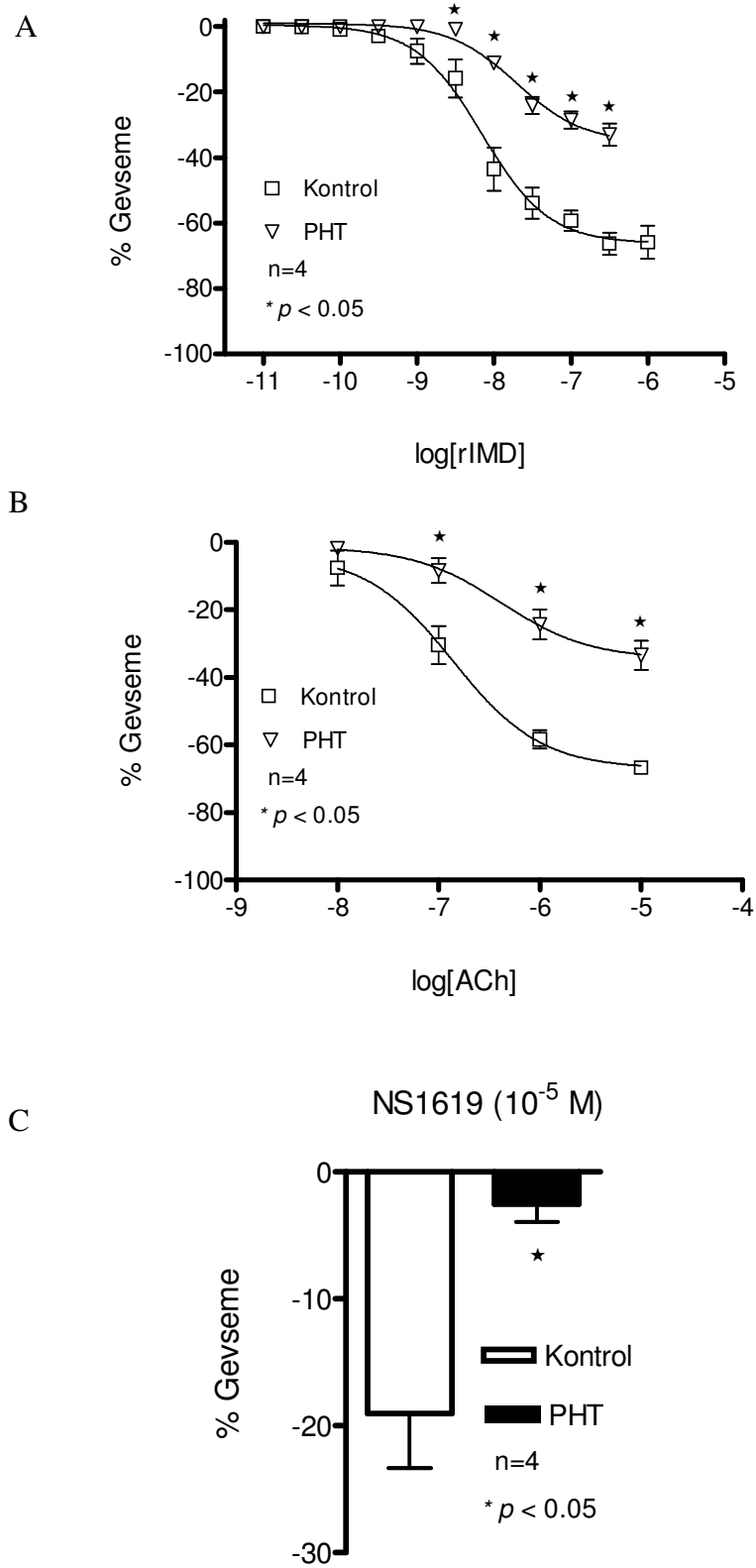
Tablo 4.1. Pulmoner hipertansiyon grubunda hematokrit, bazal perfüzyon basıncı ve sağ ventrikül hipertrofi değerleri.

	Kontrol	PHT
Bazal perfüzyon Basıncı (mmHg)	3.82±0.02	6.82±0.38*
% Hematokrit	39.8±0.3	53.5±1.7*
Solventrikül+septum /sağ ventrikül	7.3±0.04	4.35±0.38*

* $p<0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında
n=4-6



Şekil 4.19. PHT oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen akciğerlerde PVR U-46619 ile yükseltildikten sonra rIMD (1 µg)'in ve ACh (3 µg)'in PAB'ını düşürücü etkileri.



Şekil 4.20. PHT oluşturulmuş sıçanlardan elde edilen PA halkalarında 30 nM U-46619 ile önkasılma sonrasında rIMD (10^{-11} - 10^{-6} M) (A), ACh (10^{-8} - 10^{-5} M) (B) ve NS1619 (10^{-5} M) (C)'un gevşetici etkisi.* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında.

TARTIŞMA

İzole sıçan akciğer perfüzyon sisteminde perfüzyon akımı sabit ve sol atrium basıncı sıfır olduğunda ölçülen basınçtaki değişiklik direkt olarak PVR'deki değişiklikleri yansıtmaktadır. İzole sıçan pulmoner damar yatağında PVR'nin U-46619 ile yükseltilmesi sonrasında rIMD'in bolus enjeksiyonu doza bağımlı PAB'ını düşürücü etki oluşturmaktadır. Bulgularımız rIMD'in farede *in vivo* doza bağımlı hipotansiyona neden olduğunu (209) ve IMD/AM₂₁₋₄₇'nin sıçanda i.p. uygulamasının hipotansif etkiye yol açtığını gösteren çalışmalar ile uyumludur (190). Sıçan pulmoner vasküler yatağında CGRP de PAB'ını düşürmektedir ve bu etki CGRP₁ reseptör antagonisti (CGRP₈₋₃₇) ile inhibe olmamaktadır. Bu bulgu da pulmoner damar yatağında yapılmış olan diğer *in vivo* çalışmalar ile paralellik göstermektedir (82, 101). Sonuçlarımıza göre CGRP₈₋₃₇, rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisinde inhibisyon oluşturdu. Roh ve diğ. (190) de IMD/AM₂₁₋₄₇'nin hipotansif etkisinin normotansif ve spontan hipertansif sıçanlarda CGRP₈₋₃₇ uygulaması ile büyük ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Ancak, CGRP₈₋₃₇ ile rIMD yanıtında görülen inhibisyon bu antagonist ile CGRP yanıtında görülen inhibisyondan daha az bulundu. *In vitro* yapılan biyokimyasal çalışmalar rIMD'in biyolojik yanıt oluşturmak için birden fazla reseptör mekanizması üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Spesifik olarak IMD/AM₂'nin transfekte 293T hücrelerinde CGRP₁, AM₁ ve AM₂ reseptörlerini, CGRP'nin ise sadece CGRP₁ reseptörünü aktive ettiği bildirilmiştir (190). Bu durum, rIMD'in CGRP₁ reseptör aktivasyonundan bağımsız bir şekilde diğer gevşetici mekanizma(lar) (AM reseptörleri gibi) ile de yanıt oluşturabileceğini düşündürmektedir. Sıçanda CGRP₈₋₃₇ ile rIMD'ine olan dilatör yanıtların tamamen ortadan kalkmaması, rIMD'in farklı yollardan uygulanmasına ya da kan damarlarında CL ailesinin farklı reseptörlerinin bulunmasına bağlı olabilir.

Sıçan pulmoner damar yatağında rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisi eNOS inhibitörü L-NAME ile inhibe olmuş ancak tamamen ortadan kalkmamıştır. Bu sonuçlar, rIMD'in sıçan pulmoner yatağında oluşturduğu dilatör etkinin CGRP reseptörlerinin yanı sıra farklı mekanizma(lar) ile gerçekleştiği hipotezine destek vermektedir. Literatürde L-NAME'in sıçan pulmoner vasküler yatağında CGRP'ye olan dilatör

yanıtı değiştirmediği gösterilmiştir (91, 101). Bu da, rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisinin CGRP₈₋₃₇ ile bloke edilemeyen ksımından NO'in sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, Taylor ve diğ. (211) sıçan sistemik damar yatağında L-NMMA'in i.v. uygulanmasından sonra rIMD'in vazodilatör yanıtının tamamen ortadan kalkmadığını göstermişlerdir. Diğer taraftan, literatürde CGRP₈₋₃₇'nin sıçanda rIMD'in i.p. uygulanması ile oluşan sistemik hipotansif yanıtı tamamen ortadan kaldırdığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (190). Bu da, rIMD'in CGRP reseptörleri üzerinden oluşturduğu etkinin sistemik ve pulmoner vasküler yataklarda farklı olabileceğini düşündürmektedir. Bir başka çalışmada ise, rIMD'in i.c.v. uygulanması ile vazokonstriksiyon oluştuğu ve bunun sempatik sinir sistemini aktivasyonu sonucunda geliştiği bildirilmiştir (211).

rIMD'in pulmoner vasküler yanıtlarına karşı homolog desensitizasyon oluşmadı. rIMD'in vasküler yanıtı öncesinde CGRP uygulaması ile de desensitizasyon gelişmedi. Bu sonuçlar, G-proteini ile kenetli rIMD reseptörlerin desensitize olmadığını düşündürmektedir. Ancak CGRP'ye karşı sıçan ve birçok türün damar yatağında protein kinazların rol oynayabileceği desensitizasyon geliştiği bildirilmiştir (89, 200). Sıçan aortik düz kas hücrelerinde AM ile sAMP oluşumunun yanıtın önce 20 dakikalık CGRP veya AM inkübasyonu ile değişmediği gözlenmiştir. Aynı alışmada, CGRP ile sAMP oluşumunun ise yanıtın önce CGRP veya AM inkübasyonu ile anlamlı olarak azaldığı bildirilmiş ve bu azalma PKA inhibisyonu ile nlenmiştir (64).

In vitro organ banyosu deneylerinde U-46619 ile nkasilma oluşturulmuş endotelli PA halkalarında rIMD ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtı elde edildi. Sonuçlarımız rIMD'in bilinen en güçlü endojen vazodilatörler CGRP (27, 219), AM ve endotel kaynaklı gevşetici faktör salıveren ACh'e göre daha potent, efikasitesinin de CGRP ve AM'den yüksek olduğunu göstermektedir. Ren ve diğ. (187) sıçanda i.v. IMD/AM₂₁₋₄₇'nin hipotansif etkisinin eşit dozdaki AM ya da IMD/AM₂₁₋₅₃'den daha potent olduğunu bildirmiştir. Fare (i.v.) ve sıçana (i.p) uygulanan IMD/AM₂ hipotansif etkisi AM'e göre potent bulunmuştur (190, 209). Bulgularımız bu çalışmalarla uyumludur. Diğer taraftan, sıçanda i.v. IMD/AM₂₁₋₄₇'nin CGRP ile eşit

fakat AM'ine göre daha az gevşeme yanıtı oluşturduğu da bildirilmiştir (211). Fujisawa ve diğ. (72) ise sıçanda i.v. IMD/AM2'nin uygulamasının AM ile benzer etki gösterdiğini fakat IMD/AM2'nin bu etkisinin daha kısa süreli olduğunu bildirmişlerdir. Yukarıda bahsedilen çalışmalar IMD/AM2'nin etkisinin uygulama yolu ve etki yerine göre farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir.

Sıçan PA halkalarında rIMD yanıtı AM reseptörlerinin antagonisti olarak bildirilen AM₂₂₋₅₂ ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı. Sonuçlarımıza göre zayıf antagonistik etki gösterdiği öne sürülen (94) AM₂₂₋₅₂, AM yanıtını da rIMD yanıtı gibi inhibe etti. Literatürde, AM₂₂₋₅₂'nin spontan hipertansif sıçanlarda IMD/AM2'in sistemik hipotansif etkisi üzerine zayıf antagonistik aktivitesi saptanmış ve bu etkinin normotansif sıçanlarda görülmediği belirtilmiştir (190). CGRP₈₋₃₇ ise diğer çalışmalarla uyumlu olarak (224) CGRP'nin gevşetici yanıtını kompetitif, rIMD yanıtını ise non-kompetitif olarak inhibe etti. CGRP₈₋₃₇'nin rIMD yanıtı üzerindeki bu etkisi AM₂₂₋₅₂'nin yaptığı inhibisyondan daha güçlü bulundu. CGRP₈₋₃₇ ve AM₂₂₋₅₂'nin birlikte kullanılması antagonistlerin tek başına kullanılmasından daha fazla ve non-kompetitif bir inhibisyon oluşturdu. Spesifik rIMD'in antagonisti olduğu öne sürülen IMD/AM₁₇₋₄₇, CGRP ve AM'nin pulmoner arter gevşetici yanıtlarını değiştirmezken rIMD yanıtını non-kompetitif olarak inhibe etti. IMD₁₇₋₄₇'nin oluşturduğu inhibisyon CGRP ve AM antagonistlerinin birlikte kullanılması ile elde edilen inhibisyon ile eşdeğer bulundu. PA halkalarında elde edilen bu sonuçlar izole akciğer perfüzyon bulgularımızda olduğu gibi rIMD gevşeme yanıtının CGRP₁ ve AM reseptörleri üzerinden gelişebileceğini düşündürmektedir. Ancak rIMD ya da CGRP ve AM antagonistleri ile rIMD yanıtının tamamen inhibe olmaması henüz tanımlanmamış reseptörlerin de rIMD yanıtına aracılık edebileceğini akla getirmektedir. Sıçan santral sinir sisteminde rIMD'e özgü bu tip reseptörlerin bulunabileceği bildirilmiştir (88). Ayrıca, rIMD reseptör antagonisinin diğer peptidlerin (CGRP ve AM) yanıtlarını etkilememesi bu antagonistin rIMD'in oluşturduğu yanıtı spesifik olduğuna işaret etmektedir.

rIMD'in PA'de gevşetici etkisi akciğer perfüzyon bulgularımızla paralel olarak L-NAME ile inhibe oldu. Literatürde L-NAME'in eNOS inhibisyonu dışında da

etkileri (32, 143) gösterildiği için farklı bir kimyasal yapısı olan diğer bir NOS inhibitörü L-NIO kullanıldı. Bu NOS inhibitörü de rIMD yanıtlarını L-NAME'e benzer şekilde inhibe etti. rIMD'in izole PA halkalarındaki gevşetici yanıtı akciğer perfüzyon bulgularımızdaki gibi meklofenamat ve glibenklamid inkübasyonu ile değişmemiştir. Bu sonuçlar rIMD'in oluşturduğu gevşetici etkide siklooksijenaz ürünleri ve K_{ATP} kanallarının rol olmadığını göstermektedir. Benzer olarak sıçan akciğeri ve halkalarında yapılan bir çalışmada da meklofenamat ve glibenklamid ile AM yanıtlarında bir değişiklik gözlenmediğini rapor edilmiştir (82). Damar düz kas hücreesindeki guanilat siklaz enziminin ODQ ile inhibe edilmesi ya da endotel tabakasının uzaklaştırılması da rIMD gevşeme yanıtlarını inhibe etti. Aynı şekilde ODQ, NO' aracılı etki oluşturduğu bilinen ACh yanıtını da inhibe etti. Bütün bu bulgular rIMD'in sıçan akciğer damar yatağında ve ana pulmoner arterlerde endotelden NO' salıverilmesine yol açarak etki gösterdiği hipotezini desteklemektedir.

Literatüre göre, dışarıdan uygulanan rIMD veriliş yolu ve reseptör yoğunluğuna göre CGRP ve AM reseptörlerinin her ikisini birden etkileyebilmektedir (17). CGRP'nin oluşturduğu etki dokuların büyük çoğunluğunda endotelden bağımsız gerçekleşmektedir. CGRP'nin damar düz kas hücresinde sAMP birikmesi sonrasında K^+ kanal aktivasyonu ve membran hiperpolarizasyonu yaptığı kabul edilmektedir (26). Daha az sıklıkla CGRP'nin endoteldeki CGRP veya AM reseptörleri aracılığıyla NO' salıverilmesine yol açtığı da bildirilmiştir (16, 26). Diğer bir çalışmada ise sıçan pulmoner arterinde CGRP'nin endotele bağımlı etkisi gösterilmiştir (223). AM yanıtı da türe ve damar tipine göre farklılıklar göstermektedir. CGRP₈₋₃₇ ya da AM₂₂₋₅₂ ile inhibe olabilen, endotele bağımlı ya da bağımsız etkiler bildirilmiştir (26). Yoshimoto ve diğ. (234) endotelsiz sıçan aortunda AM ve CGRP'nin sAMP oluşumuna yol açmadığını göstermişlerdir. Endotelli sıçan aortik striplerinde ise CGRP verilmesi ile sAMP ve sGMP düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir (225). Literatürde peptidlerin damarlarda oluşturdukları gevşeme yolları açısından bir çelişki vardır. Fakat büyük olasılıkla CGRP gibi (151) aynı reseptörler üzerinden etki gösteren rIMD'in gevşetici etkisinin

mekanizması da cinsine, damar çapına ve damar lokalizasyonuna v.b. nedenlere göre farklılık göstermektedir.

Pulmoner arter halkalarında rIMD gevşeme yanıtları sAMP oluşumuna yol açan adenilat siklaz enziminin inhibitörü SQ22536 ya da sAMP'ye bağımlı aktive olan PKA enzimin inhibitörü KT5720 ile değişmedi. Aynı şekilde sAMP yıkımından sorumlu olan fosfodiesteraz 3 ve 4 inhibitörü rolipram da rIMD'in gevşeme yanıtını etkilemedi. Bu bulgular endotelde rIMD reseptörü aracılı sAMP-PKA-eNOS aktivasyonunun rIMD'in oluşturduğu gevşemede rol oynamadığını düşündürmektedir (Şekil 5.1). Literatürde ise, CGRP ve AM'in pulmoner damar yatağında hücre içi sAMP-PKA ya da NO'-sGMP aracılı gevşeme oluşturduğu bildirilmiştir (82, 234). Ancak SQ22536, damar yataklarında genel olarak adenilat siklaz aracılı gevşeme oluşturduğu bilinen izoproterenol yanıtlarını inhibe etmedi. İzole sıçan ana pulmoner arterinde ODQ'nun da izoproterenol gevşeme yanıtlarını inhibe etmemesi, bu yanıtlarının mekanizmasında NO' ve cAMP oluşumunun ana yolak olmadığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar Bieger ve diğ. (21) çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

Deney sonuçlarımız rIMD gevşeme yanıtlarında NO''in katkısını ortaya koymaktadır. Ancak rIMD indüksiyonu ile oluşan sGMP'nin çapraz etkileşim sonucu sAMP yıkımından sorumlu olan fosfodiesteraz 3'ü (sGMP ile inhibe olan fosfodiesteraz) inhibe edebileceği ve sAMP birikimi yaparak gevşeme oluşturabileceği göz ardı edilmemelidir (193). Başka bir deyişle, rolipram zaten inhibe durumdaki fosfodiesteraz 3 ve 4 üzerinde daha fazla bir inhibisyon oluşturmamakta ve rIMD gevşeme sonuçlarını değiştirmemektedir. Bu hipotezlerin kanıtlanabilmesi için siklik nükleotidlere özgü kitlerle ölçüm yapılması gerekmektedir. Bulgularımıza göre sGMP yıkılmasından sorumlu spesifik fosfodiesteraz enzim-5 inhibitörleri zaprinast ve sildenafil ile rIMD gevşeme yanıtlarının potansiyalize olması rIMD yanıtının sGMP aracılı geliştiğinin bir diğer göstergesidir. Protein kinaz G (PKG) inhibitörü Rp-8-br-cGMPs ile rIMD gevşeme yanıtlarının anlamlı bir şekilde inhibe olması bu yanıtın NO' salıverilmesi ile oluşan sGMP'nin protein kinaz G aracılı etki gösterdiğini desteklemektedir. Bizim bulgularımızla uyumlu bir şekilde pulmoner arterde PKG'nin sAMP veya sGMP

aracılı gevşemede önemli rol oynadığı bildirilmiştir (1). Bizim deney koşullarımızda sGMP PKG inhibe durumda iken daha önce öne sürüldüğü gibi (145) PKA üzerinden yanıt oluşturmamaktadır. Ayrıca PKA ve PKG inhibitörlerinin birlikte kullanılması ile tek başına protein kinaz G inhibisyonundan fazla bir inhibisyon elde edilememiştir. Dolayısıyla sonuçlarımız rIMD gevşeme yanıtı ile oluşan siklik nükleotidlerin çapraz olarak her iki protein kinazı (A ve G) aktive etmediğini düşündürmektedir (Şekil 5.1).

Akciğerlerde immünoreaktif rIMD varlığı tespit edilmiştir (211). Bunun dışında çeşitli damarların hem endotel hem de düz kas hücrelerinde CL ve RAMP'ların bulunduğu bilinmektedir (84). Sonuçlarımıza göre rIMD endotelsiz PA halkalarında akut bir vasküler etkiye sahip değildir. Bu bulgu aynı tip reseptörler üzerinden etki gösteren AM ve CGRP'nin sıçan torasik aorta düz kasında direkt kasılmayı inhibe edici bir etkiye sahip olmaksızın endotel hücresinde Ca^{+2} artışına yol açarak eNOS'u aktive ettiğini ve NO' salıverilmesine yol açtığını bildiren çalışma ile uyumluluk göstermektedir (234). Çalışmamızda endotel hücrelerinin hasarlanması sırasında pulmoner düz kas hücrelerindeki rIMD reseptörlerinin zarar görmüş olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla izoproterenol kullanılarak düz kastaki diğer bir reseptör türü olan β -adrenerjik reseptörlerinin sağlamlığı test edilmiştir. Endotelli ve endotelsiz preparatlarda izoprotorenole yanıtlar değişmemesi düz kastaki rIMD reseptörlerinin zarar görmediğini göstermektedir. Bu reseptörlerin fonksiyonu açık değildir, ancak uzun süreli olarak AM'e maruz kalmanın iNOS'u indükleyerek vasküler fonksiyonları etkileyebileceği bildirilmiştir (102). Dolayısıyla aynı durum rIMD için de söz konusu olabilir.

Endoteldeki rIMD reseptörleri aracılığıyla gevşeme yanıtının kolera toksini ile inhibe olması bu reseptörlerin kolera toksinine duyarlı bir G-proteini ile kenetli olduğunu düşündürmektedir. Kolera toksini sürekli G_{os} aktivasyonuna yol açarak inhibisyon yapmaktadır. Ancak G_{os} - adenilat siklaz yolağı yukarıdaki bulgularımızda belirtildiği gibi etkin bir yolak olarak gözükmemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, AM'nin kolera toksinine duyarlı G-proteini üzerinden fosfolipaz C aktivasyonu (201)

ya da fosfatidilinozitol 3-kinaz/Akt bağımlı bir yolak ile eNOS aktivasyonu yapabildiği bildirilmiştir (174).

Deneilerimizde izole PA'da rIMD, AM ve CGRP gevşeme yanıtları spesifik olmayan K^+ kanal inhibitörü TEA ile inhibe oldu. Bu durum CGRP ailesi peptidlerinin genel olarak K^+ kanalları üzerinden etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, rIMD gevşeme yanıtında BK_{Ca} 'nın spesifik inhibitörü iberitoksin ile yaklaşık olarak %50, PKG'nin inhibe edilmesi ile de yaklaşık olarak %25 azalma elde edildi. İnhibisyon oranlarındaki bu fark NO-PKG- BK_{Ca} yolağının rIMD yanıtında tek mekanizma olmadığını göstermektedir. Tavşan aortik düz kas hücrelerinde NO'nin direkt olarak BK_{Ca} 'ları aktive edebildiği bildirilmiştir (22). Ancak sonuçlarımıza göre ODQ ile guanilat siklazın inhibisyonu ile yanıtın tamamen ortadan kalkması sGMP oluşumunun rIMD yanıtında kritik bir basamak olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla rIMD gevşeme yanıtının mekanizması olarak NO'nin direkt K^+ kanalları üzerinde bir etkisinden daha çok siklik nükleotidlerle doğrudan aktive olabilen K^+ kanallarını akla getirmektedir (231). Benzer bir durum PA'de rIMD gevşemesi için de geçerli olabilir (Şekil 5.1). sGMP'ye bağımlı BK_{Ca} kanal aktivasyonunun gevşeme ile sonuçlandığı bir yolak daha önceden çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (10, 20, 22, 122, 231). Bu nedenle, rIMD'in spesifik IMD/AM2 reseptörleri üzerinden bu yolağı aktive ederek pulmoner damar yatağında kasılma yanıtlarını düzenleyici bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Sıçan PA halkalarında rIMD, U-46619 önkasılması sonrasında gevşeme yanıtına yol açarken, KCl önkasılması sonrasında gevşeme yanıtı oluşturmamıştır. Bu fark, rIMD'in pulmoner damar düz kasını hiperpolarize ederek gevşeme oluşturduğunu düşündürmektedir. Böyle bir varsayım damar düz kas hücre membranı hiperpolarize edildiğinde reseptöre-bağılı Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} girişinin azaldığını gösteren daha önceki çalışmalarla desteklenebilir (51, 110, 111, 160). Bulgularımıza göre izole PA'de rIMD gevşeme yanıtının eNOS inhibisyonu ile tamamen bloke edilmesi bu yanıtta EDHF'nin katkısının olmadığını akla getirmektedir. Ancak, izole akciğer damar yatağında L-NAME ile rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisi tamamen bloke olmadığı için bu yanıtlarda az da olsa bir EDHF katkısı olabileceği düşünülebilir. Bu sonuç akciğer damar yatağında EDHF'nin katkısının proksimalden distale doğru arttığı

bulguları ile paralellik göstermektedir (42). Endotelde çeşitli agonistler aracılığıyla NO[•]'in sentez/saliverilmesi hücre dışında Ca⁺² varlığına bağlıdır (204). Hem hücre dışından gelen hem de hücre içi depolardan serbest hale geçen Ca⁺², eNOS aktivasyonunda önemli bir adım olan serbest Ca⁺² konsantrasyonunda artışa yol açabilir (71, 135, 154). Agonist ile indüklenen endotel hücresinde Ca⁺² konsantrasyonundaki artış membran K⁺ geçirgenliğini değiştirerek hücrenin hiperpolarizasyona yol açabilir (30, 43, 196). Endotel bağımlı vazodilatörler sitoplazmik Ca⁺² miktarında artışa ve sonrasında BK_{Ca} kanallarının açılmasına neden olabilirler. Bu kanalların açılması K⁺'un hücre dışına çıkışını artırıp endotel hücresini hiperpolarize etmekte ve agonist stimülasyonu süresince Ca⁺² girişini sağlayan elektrokimyasal gradienti artırmaktadır (5, 146, 154). Bulgularımıza göre spesifik SK_{Ca} inhibitörü apamin rIMD gevşeme yanıtında herhangi bir değişiklik meydana getirmemi. Bu sonuç, rIMD gevşeme yanıtında endotel hücresindeki SK_{Ca}'ların hiperpolarizasyon sonucu Ca⁺² miktarında artışa yol açmadığını düşündürmektedir (Şekil 5.1). Ancak endotel hücresinde BK_{Ca}'lar da bulunmaktadır (172). Dolayısı ile BK_{Ca}'ların NO[•] oluşumuna katkısı SK_{Ca}'lar için bahsedilen mekanizmadaki gibi göz önünde bulundurulmalıdır.

Kronik hipoksi uygulanarak pulmoner hipertansiyon (PHT) oluşturulmuş sıçanlardan elde edilen izole PA halkalarında rIMD ve ACh yanıtlarında kontrole göre anlamlı azalma oluştu. Düz kas gevşeme yanıtının değişmeden rIMD ve ACh yanıtının azalması PHT ile pulmoner damar yatağında endotel hasarı oluştuğunu akla getirmektedir. Bazı araştırmacılar (103) kronik hipoksiye bağlı endotel yanıtlarının korunduğunu hatta potansiyalize olduğunu söylerken, yanıtların inhibe olduğunu bildirmiş olanlar da vardır (65). Genel olarak kronik hipoksik sıçanlardan elde edilen proksimal ve rezistans pulmoner arterlerin çeşitli reseptör bağımlı gevşetici ajanlara azalmış endotel bağımlı yanıt verdiği kabul edilmektedir (36, 55, 153, 189, 199). Ayrıca reseptörden bağımsız yanıt oluşturan Ca⁺² iyonoforu A-23187'ye de azalmış yanıtlar bildirilmiştir (36, 199).

Selektif BK_{Ca} aktivatörü NS1619'un oluşturduğu gevşeme yanıtlarının da kontrole göre azalması rIMD gevşeme yanıtındaki azalmanın mekanizmasının BK_{Ca} kanalları

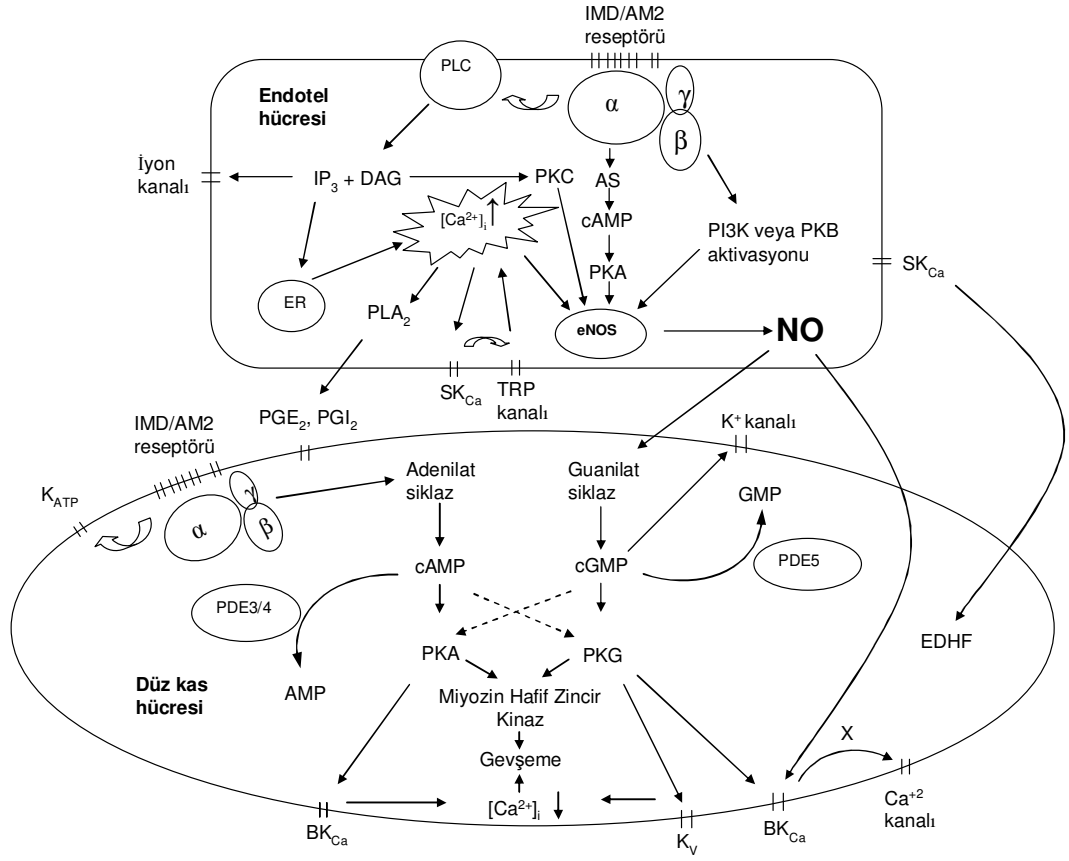
üzerinden geliştiğini akla getirmektedir. Bunu açıklar nitelikte, Bonnet ve diğerleri (24) kronik hipoksi uygulanarak PHT oluşturulmuş sıçanlardan proksimal PA düz kas hücreleri izole etmiş ve bu hücrelerden iyon akım kayıtları almışlardır. Bu çalışmada, +60 mV' da alınan BK_{Ca} akımının amplitüdünde anlamlı bir azalma bulunmuştur. Aynı şekilde BK_{Ca} mRNA'sı ve BK_{Ca} kanalı α -alt ünitesinin protein ekspresyonunda da azalma göstermişlerdir. Diğer taraftan, izole akciğer perfüzyonu ile elde ettiğimiz sonuçlara göre pulmoner hipertansiyon grubunda rIMD, ACh ve papaverine olan yanıtlar değişmedi. Pulmoner arter damar yatağı boyunca K_v ve BK_{Ca} kanallarının heterojen ekspresyonu bulunmaktadır. Proksimal PA düz kas hücrelerinde BK_{Ca} fazla iken, rezistans PA düz kas hücrelerinde 4-aminopiridine duyarlı K_v kanalları bulunmaktadır (23). Sonuçlarımıza göre TEA ve iberitoksin ile rIMD yanıtında gelişen inhibisyon birbirine çok yakındır. Dolayısıyla rIMD büyük oranda K⁺ kanallarından BK_{Ca} kanallarını aktive ederek gevşeme oluşturmaktadır. Gümüsel ve diğ. (82) de izole sıçan PA'lerinde AM yanıtının BK_{Ca} kanalları üzerinden geliştiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak, PHT oluşması ile akciğer PAB'ını belirleyen rezistans arterlerdeki K_v kanallarının ekspresyonu veya aktivitesinde BK_{Ca}'ların aksine bir değişiklik olmadığı düşünülebilir. Bu durum, akciğer perfüzyonunda rIMD ve ACh yanıtlarında kontrole göre bir değişiklik görülmemesinin bir açıklaması olabilir.

Kronik hipokside proksimal pulmoner arterlerde sGMP ölçümüne dayanarak bazal NO' üretiminin de azaldığı bildirilmiştir (199). Shirai ve diğ. (203) de 4 haftalık hipoksik akciğerlerin rezistans arterlerinin eNOS ekspresyonunda % 89-94 artış olurken proksimal arterlerde daha az bir artış meydana geldiğini öne sürmüşlerdir. Dolayısıyla, PHT oluşması sonucunda eNOS ekspresyonlarında meydana gelen bu değişiklik de rIMD ve ACh ile perfüzyonda yanıtların aynı kalmasının diğer bir açıklaması olabilir. Çünkü izole akciğer perfüzyonunda rezistans arterlerdeki eNOS ekspresyonundaki artış rIMD yanıtında rol oynayan BK_{Ca}'da görülen ekspresyon ya da aktivite azalmasını NO' miktarını artırarak kompanse edebilir.

Ayrıca kronik hipoksi ile sGMP'yi yıkan fosfodiesteraz aktivitesinin proksimal arterlerde artarken, rezistans arterlerde değişmediği öne sürülmüştür (147). Bizim

deney koşullarımız altında, PHT oluşturulmuş sıçanlarda rIMD ve ACh ile gevşemeye neden olan cGMP miktarı proksimal arterlerde azalmış, rezistans arterlerde değişmemiş olabilir. Dolayısı ile bu durum akciğer perfüzyonu ve izole PA'de elde ettiğimiz bulgular arasındaki farkın açıklaması olabilir. İzole akciğer perfüzyonunda PAB'ını rezistans arterler belirlediği için yukarıdaki çalışmalara göre rIMD ve ACh yanıtlarında değişme olmamasının ve ana pulmoner arterdeki azalmış gevşetici yanıtların sebebi akciğerdeki farklı damar bölümlerindeki farklı fosfodiesteraz aktivitesi olabilir.

rIMD'in PHT oluşmuş sıçan akciğerinde kontrole göre PAB düşürücü etkisinde azalma olmadı. Ayrıca IMD/AM2'nin gevşetici etkisinin ACh'e göre daha uzun sürdüğü (yaklaşık 30 dk.) bildirilmiştir (72). Bu sonuçlar IMD/AM2'nin PHT tedavisinde vazodilatör olarak kullanılmasını akla getirmektedir.



Şekil 5.1. rIMD'in gevşetici etkisinde rol oynayabilecek hücre içi mekanizmalar.

SONUÇ VE YORUM

Bu tez çalışmasında sıçan pulmoner damar yatağında perfüzyon basıncı arttırıldığında rIMD'in PAB'ını düşürücü etki oluşturduğu ilk kez gösterilmiştir. Bu çalışmadaki bulgular, CL reseptörleri ve NO' salıverilmesinin rIMD'in PAB'ını düşürücü etkisine aracılık ettiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca izole pulmoner arterde rIMD'in NO' oluşumu sonrasında PKG yolağı üzerinden BK_{Ca}'ları aktive ederek damar gevşemesine yol açtığı öne sürülmektedir.

rIMD PHT oluşturulmuş sıçan akciğerlerinde PAB'ını düşürücü etkisini sürdürmekte, bu etki CGRP ile AM reseptörlerinin her ikisi üzerinden de oluşmaktadır. Bu nedenle IMD/AM2 PHT tedavisinde vazodilatör etkili bir peptid olarak düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Abdel-Latif, A.A. (2001). Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226, 153-163.
2. Abdelrahman, A.M., ve Pang, C.C. (2006). Effect of intermedin/adrenomedullin-2 on venous tone in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373, 376-380.
3. Abell, T.J., Richards, A.M., Ikram, H., Espiner, E.A., ve Yandle, T. (1989). Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 160, 1392–1396.
4. Abenhaim, L., Moride, Y., Brenot, F., Rich, S., Benichou, J., Kurz, X., Higenbottam, T., Oakley, C., Wouters, E., Aubier, M., Simonneau, G., ve Begaud, B. (1996). Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med*, 335, 609-616.
5. Adams, D.J., Barakeh, J., Laskey, R., ve Van Bremen, C. (1989). Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *Faseb J*, 3, 2389-2400.
6. Adnot, S., Chabrier, P.E., Brun-Buisson, C., Viossat, I., ve Braquet, P., (1988). Atrial natriuretic factor attenuates the pulmonary pressor response to hypoxia. *J. Appl. Physiol*, 65, 1975–1983.
7. Aiyar, N., Disa, J., Siemens, I.R., ve Nambi, P. (1997). Differential effects of guanine nucleotides on [125I]-hCGRP(8-37) binding to porcine lung and human neuroblastoma cell membranes. *Neuropeptides*, 31, 99-103.
8. Aiyar, N., Disa, J., Stadel, J.M., ve Lysko, P.G. (1999). Calcitonin gene-related peptide receptor independently stimulates 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and Ca²⁺ signaling pathways. *Mol Cell Biochem*, 197, 179–185.
9. Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S., ve Evans, R.M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298, 240-244.

10. Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., ve Weir, E.K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7583-7587.
11. Arjona, A.A., Hsu, C.A., Wrenn, D.S., ve Hill, N.S. (1997). Effects of natriuretic peptides on vascular smooth muscle cells derived from different vascular beds. *Gen. Pharmacol*, 28, 382–392.
12. Autelitano, D.J., ve Ridings, R. (2001). Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression. *Peptides*, 22, 1851–1857.
13. Barker, S., Kapas, S., Corder, R., ve Clark, A.J. (1996). Adrenomedullin acts via stimulation of cyclic AMP and not via calcium signalling in vascular cells in culture. *J Hum Hypertens*, 10, 421–423.
14. Baskaya, M.K., Suzuki, Y., Anzai, M., Seki, Y., Saito, K., Takayasu, M., Shibuya, M., ve Sugita, K. (1995). Effects of adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin on cerebral circulation in dogs. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15, 827–834.
15. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., ve Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1620-1624.
16. Bell, D. ve McDermott, B.J. (1996). Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol Rev*, 48, 253–288.
17. Bell, D., ve McDermott, B.J. (2008). Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol*, 153(1), 1-16.
18. Bell, D., Zhao, Y.Y., Kelso, E.J., McHenry, E.M., Rush, L.M., Lamont, V.M., Nicholls, D.P., ve McDermott, B.J. (2006). Upregulation of adrenomedullin and its receptor components during cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, 904-914.

19. Beltowski, J., ve Jamroz, A. (2004). Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol*, 56, 5-27.
20. Bialecki, R.A., ve Stinson-Fisher, C. (1995). KCa channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle. *Am J Physiol*, 268, 152-159.
21. Bieger, D., Parai, K., Ford, C.A., ve Tabrizchi, R. (2006). beta-adrenoceptor mediated responses in rat pulmonary artery: putative role of TASK-1 related K channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 373, 186-196.
22. Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., ve Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368, 850-853.
23. Bonnet, S., ve Archer, S.L. (2007). Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*, 115, 56-69.
24. Bonnet, S., Savineau, J.P., Barillot, W., Dubuis, E., Vandier, C., ve Bonnet, P. (2003). Role of Ca(2+)-sensitive K(+) channels in the remission phase of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary diseases. *Cardiovasc Res*, 60, 326-336.
25. Brain, S.D. ve Cambridge, H. (1996). Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol*, 27, 607-611.
26. Brain, S.D., ve Grant, A.D. (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 84, 903-934.
27. Brain, SD, Williams T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R., ve MacIntyre, I. (1985). Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 313, 54-56.
28. Brain, S.D., Wimalawansa, S., MacIntyre, I., ve Williams, T.J. (1990). The demonstration of vasodilator activity of pancreatic amylin amide in the rabbit. *Am J Pathol*, 136, 487-490.

29. Brett, S.J., Simon, J., Gibbs, R., Pepper, J.R., ve Evans, T.W. (1996). Impairment of endothelium-dependent pulmonary vasodilation in patients with primary pulmonary hypertension. *Thorax*, 51, 89-91.
30. Busse, R., Fichtner, H., Luckhoff, A., ve Kohlhardt, M. (1988). Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol*, 255, 965-969.
31. Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Frohlich, L.G., Sickmann, A., Meyer, H.E., Lohmann, S.M., ve Schmidt, H.H. (2000). Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 275, 5179-5187.
32. Buxton, I.L., Cheek, D.J., Eckman, D., Westfall, D.P., Sanders, K.M., ve Keef, K.D. (1993). NG-nitro L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res*, 72, 387-395.
33. Cadieux, A., Springall, D.R., Mulderry, P.K., Rodrigo, J., Ghatei, M.A., Terenghi, G., Bloom, S.R., ve Polak, J.M. (1986). Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations. *Neuroscience* 19, 605-627.
34. Cardell, L.O., Uddman, R., ve Edvinsson, L. (1992). Evidence for multiple endothelin receptors in the guinea-pig pulmonary artery and trachea. *Br J Pharmacol* 105, 376-380.
35. Caron, K.M., ve Smithies, O. (2001). Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 615-619.
36. Carville, C., Raffestin, B., Eddahibi, S., Blouquit, Y., ve Adnot, S. (1993). Loss of endothelium-dependent relaxation in proximal pulmonary arteries from rats exposed to chronic hypoxia: effects of in vivo and in vitro supplementation with L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22, 889-896.
37. Chang, C.L., Roh, J., ve Hsu, S.Y. (2004). Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: a comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates. *Peptides*, 25, 1633-1642.

38. Chang, C.P., Pearse, R.V., 2nd, O'Connell S, ve Rosenfeld, M.G. (1993). Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron*, 11, 1187-1195.
39. Chao, J., Kato, K., Zhang, J.J., Dobrzynski, E., Wang, C., Agata, J., ve Chao, L. (2001). Human adrenomedullin gene delivery protects against cardiovascular remodeling and renal injury. *Peptides* 22, 1731-1737.
40. Chauhan, M., Ross, G.R., Yallampalli, U., ve Yallampalli, C. (2007). Adrenomedullin-2, a novel calcitonin/calcitonin-gene-related peptide family peptide, relaxes rat mesenteric artery: influence of pregnancy. *Endocrinology*, 148, 1727-1735.
41. Chauhan, M., Yallampalli, U., Reed, L., ve Yallampalli, C. (2006). Adrenomedullin 2 antagonist infusion to rats during midgestation causes fetoplacental growth restriction through apoptosis. *Biol Reprod*, 75, 940-947.
42. Chen, G., ve Suzuki, H. (1989). Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol*, 410, 91-106.
43. Chen, G.F, ve Cheung D.W. (1992). Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circ Res*, 70, 257-263.
44. Chen, L., Kis, B., Busija, D.W, Yamashita, H., ve Ueta, Y. (2005). Adrenomedullin protects rat cerebral endothelial cells from oxidant damage in vitro. *Regul Pept*, 130, 27-34,
45. Chen, L., Kis, B., Hashimoto, H., Busija, D.W., Takei, Y., Yamashita, H., ve Ueta, Y. (2006). Adrenomedullin 2 protects rat cerebral endothelial cells from oxidative damage in vitro. *Brain Res*, 1086, 42-49.
46. Chen, R.Y., ve Guth, P.H. (1995). Interaction of endogenous nitric oxide and CGRP in sensory neuron-induced gastric vasodilation. *Am J Physiol*, 268, 791-796.
47. Chen, S.J., Chen, Y.F., Meng, Q.C., Durand, J., Dicarlo, V.S., ve Oparil, S. (1995). Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*, 79, 2122-2131.

48. Chen, W.J, Armour, S., Way, J., Chen, G., Watson, C., Irving, P., Cobb, J., Kadwell, S., Beaumont, K., Rimele, T., ve Kenakin, T. (1997). Expression cloning and receptor pharmacology of human calcitonin receptors from MCF-7 cells and their relationship to amylin receptors. *Mol Pharmacol*, 52, 1164-1175.
49. Christopoulos, A., Christopoulos, G., Morfis, M., Udawela, M., Laburthe, M., Couvineau, A. Kuwasako, K., Tilakaratne, N., ve Sexton, P.M. (2003). Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem*, 278, 3293–3297.
50. Christopoulos, G., Perry, K.J., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N.J., Main, M.J., Ford, S.M, ve Sexton, P.M. (1999). Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol*, 56, 235-242.
51. Cook, N.S., Weir, S.W., ve Danzeisen, M.C., (1988). Anti-vasoconstrictor effects of the K⁺ channel opener cromakalim on the rabbit aorta--comparison with the calcium antagonist isradipine. *Br J Pharmacol*, 95, 741-752.
52. Copp, D.H. (1994). Calcitonin: discovery, development, and clinical application. *Clin Invest Med*, 17, 268-277.
53. Cottrell, G.S., Roosterman, D., Marvizon, J.C., Song, B., Wick, E., Pikiros, S. Wong, H., Berthelie, C., Tang, Y., Sternini, C., Bunnett, N.W., ve Grady, E.F. (2005). Localisation of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in enteric neurons, dorsal root ganglia and the spinal cord of rat. *J Comp Neurol*, 490, 239–255.
54. Crawley, D.E., Liu, S.F., Barnes, P.J., ve Evans, T.W. (1992). Endothelin-3 is a potent pulmonary vasodilator in the rat. *J Appl Physiol*, 72, 1425-1431.
55. Crawley, D.E., Zhao, L., Giembycz, M.A., Liu, S., Barnes, P.J., Winter, R.J., ve Evans, T.W. (1992). Chronic hypoxia impairs soluble guanylyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in the rat. *Am J Physiol* 263, 325-332.
56. Crossman, D.C., Dashwood, M.R., Brain, S.D., McEwan, J., ve Pearson, J.D. (1990). Action of calcitonin gene-related peptide upon bovine vascular endothelial and smooth muscle cells grown in isolation and co-culture. *Br J Pharmacol*, 99, 71–76.

57. Cueille, C., Pidoux, E., de Vernejoul, M.C., Ventura-Clapier, R., ve Garel, J.M. (2002). Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 294, 340–346.
58. Cuiper, L.L., Price, P.V., ve Christman, B.W. (1996). Systemic and pulmonary hypertension after abrupt cessation of prostacyclin: role of thromboxane A₂. *J Appl Physiol*, 80, 191-197.
59. Cutz, E., Ma, T.K., Perin, D.G., Moore, A.M., ve Becker, L.E. (1997). Peripheral chemoreceptors in congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 155, 358-363.
60. Dayer, A.M., De Mey, J., ve Will, J.A. (1985). Localization of somatostatin-, bombesin-, and serotonin-like immunoreactivity in the lung of the fetal rhesus monkey. *Cell Tissue Res*, 239, 621-625.
61. de Vroomen, M., Takahashi, Y., Gournay, V., Roman, C., Rudolph, A.M., ve Heymann, M.A. (1997). Adrenomedullin increases pulmonary blood flow in fetal sheep. *Pediatr Res*, 41, 493-497.
62. DeWitt, B.J., Cheng, D.Y., Caminiti, G.N., Nossaman, B.D., Coy, D.H., Murphy, W.A., ve Kadowitz, P.J. (1994). Comparison of responses to adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the pulmonary vascular bed of the cat. *Eur J Pharmacol*, 257, 303-306.
63. Dong, F., Taylor, M.M., Samson, W.K., ve Ren, J. (2006). Intermedin (adrenomedullin-2) enhances cardiac contractile function via a protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathway in murine ventricular myocytes. *J Appl Physiol*, 101, 778-784.
64. Drake, W.M., Lowe, S.R., Mirtella, A., Bartlett, T.J., ve Clark, A.J. (2000). Desensitisation of calcitonin gene-related peptide responsiveness but not adrenomedullin responsiveness in vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol*, 165, 133-138.
65. Eddahibi, S., Adnot, S., Carville, C., Blouquit, Y., ve Raffestin, B. (1992). L-arginine restores endothelium-dependent relaxation in pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *Am J Physiol*, 263, 194-200.

66. Eddahibi, S., Raffestin, B., Clozel, M., Levame, M., ve Adnot, S. (1995). Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am J Physiol*, 268, 828-835.
67. Eddahibi, S., Springall, D., Mannan, M., Carville, C., Chabrier, P.E, Levame M, Raffestin B, Polak J, ve Adnot S. (1993). Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia. *Am J Physiol*, 265, 571-580.
68. Edvinsson, L., Fredholm, B.B., Hamel, E., Jansen, I., ve Verrecchia, C. (1985). Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci Lett*, 58, 213–217.
69. Eguchi, S., Hirata, Y., Iwasaki, H., Sato, K., Watanabe T.X., Inui, T., Nakajima, K., Sakakibara, S., ve Marumo, F. (1994). Structure-activity relationship of adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 135, 2454-2458.
70. Ferro, A., Queen, L.R., Priest, R.M., Xu, B., Ritter, J.M., Poston, L., ve Ward, J.P. (1999). Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol*, 126, 1872–1880.
71. Forstermann, U., Pollock, J.S., Schmidt, H.H., Heller, M., ve Murad, F. (1991). Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1788-1792,
72. Fujisawa, Y., Nagai, Y., Miyatake, A., Miura, K., Shokoji, T., Nishiyama, A., Kimura, S., ve Abe, Y. (2006). Roles of adrenomedullin-2 in regulating the cardiovascular and sympathetic nervous systems in conscious rats. *Am J Physiol*, 290, 1120–1127.
73. Fujisawa, Y., Nagai, Y., Miyatake, A., Takei, Y., Miura, K., Shoukouji, T., Nishiyama, A., Kimura, S., ve Abe, Y. (2004). Renal effects of a new member of adrenomedullin family, adrenomedullin2, in rats. *Eur J Pharmacol*, 497(1), 75–80.
74. Fukai, N., Shichiri, M., Ozawa, N., Matsushita, M., ve Hirata, Y. (2003). Coexpression of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-

- modifying protein 2 or 3 mediates the antimigratory effect of adrenomedullin. *Endocrinology*, 144, 447–453.
75. Gaul, G., Blazek, G., Deutsch, E., ve Heeger, H. (1982). A case of chronic pulmonary hypertension after fenfluramine intake. *Wien Klin Wochenschr*, 94, 618-622.
 76. Gavras, I., ve Gavras, H. (1988). Role of bradykinin in hypertension and the antihypertensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Med Sci*, 295, 305-307,
 77. Gebre-Medhin, S., Mulder, H., Pekny, M., Westermark, G., Tornell, J., Westermark, P., Sundler, F., Ahren, B., ve Betsholtz, C. (1998). Increased insulin secretion and glucose tolerance in mice lacking islet amyloid polypeptide (amylin). *Biochem Biophys Res Commun*, 250, 271-277.
 78. Gebre-Medhin, S., Mulder, H., Zhang, Y., Sundler, F., ve Betsholtz, C. (1998). Reduced nociceptive behavior in islet amyloid polypeptide (amylin) knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 63, 180-183.
 79. Gow, A.J., Thom, S.R., ve Ischiropoulos, H. (1998). Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol*, 274, 112-118.
 80. Gray, D.W. ve Marshall, I. (1992). Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *Br J Pharmacol* 107, 691–696.
 81. Gray, D.W. ve Marshall, I. (1992). Nitric oxide synthesis inhibitors attenuate calcitonin gene-related peptide endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 212, 37–42.
 82. Gumusel, B., Hao, Q., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., Champion, H.C., Chang, J.K., Mehta, J.L., ve Lipton, H. (1998). Analysis of responses to adrenomedullin-(13-52) in the pulmonary vascular bed of rats. *Am J Physiol*, 274, 1255-1263.
 83. Gurtner, H.P. (1985). Aminorex and pulmonary hypertension. A review. *Cor Vasa*, 27, 160-171.

84. Hagner, S., Knauer, J., Haberberger, R., Goke, B., Voigt, K., ve McGregor, G.P. (2002). Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell Tissue Res*, 310, 41–50.
85. Hall, J.M., ve Brain, S.D. (1999). Interaction of amylin with calcitonin gene-related peptide receptors in the microvasculature of the hamster cheek pouch in vivo. *Br J Pharmacol*, 126, 280–284.
86. Han, S.P., Naes, L., ve Westfall, T.C. (1990). Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J Pharmacol Exp Ther*, 255, 423-428.
87. Hasbak, P., Sams, A., Schifter, S., Longmore, J., ve Edvinsson, L. (2001). CGRP receptors mediating CGRP-, adrenomedullin- and amylin-induced relaxation in porcine coronary arteries. Characterization with “Compound 1” (WO98/11128), a non-peptide antagonist. *Br J Pharmacol*, 133, 1405–1413.
88. Hashimoto, H., Hyodo, S., Kawasaki, M., Shibata, M., Saito, T., Suzuki, H., Otsubo, H., Yokoyama, T., Fujihara, H., Higuchi, T., Takei, Y., ve Ueta, Y. (2007). Adrenomedullin 2 (AM2)/intermedin is a more potent activator of hypothalamic oxytocin-secreting neurons than AM possibly through an unidentified receptor in rats. *Peptides*, 28, 1104-1112.
89. Hashimoto, K., Uchida, S., ve Yoshida, H. (1989). Effects of calcitonin gene-related peptide on the adenylate cyclase system in cultured rat skeletal muscle cells. *Life Sci*, 45(23), 2183–92.
90. Hayakawa, H., Hirata, Y., Kakoki, M., Suzuki, Y., Nishimatsu, H., Nagata, D., Suzuki, E., Kikuchi, K., Nagano, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Sugimoto, T., ve Omata, M. (1999). Role of nitric oxide-cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat. *Hypertension*, 33, 689-693.
91. Heaton, J., Lin, B., Chang, J.K., Steinberg, S., Hyman, A., ve Lipton, H. (1995). Pulmonary vasodilation to adrenomedullin: a novel peptide in humans. *Am J Physiol*, 268, 2211–25.
92. Hill, N.S., Klinger, J.R., Warburton, R.R., Pietras, L. ve Wrenn, D.S. (1994). Brain natriuretic peptide: possible role in the modulation of hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol*, 266, 308–315.

93. Hill, N.S., Warburton, R.R., Pietras, L., ve Klinger, J.R. (1997). Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*, 83, 1209-1215.
94. Hinson, J.P., Kapas, S., ve Smith, D.M. (2000). Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*, 21, 138–167.
95. Hippenstiel, S., Witzernath, M., Schmeck, B., Hocke, A., Krisp, M., Krull, M., Seybold, J., Seeger, W., Rascher, W., Schutte, H., ve Suttorp, N. (2002). Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res*, 91, 618-625.
96. Hirata, Y., Takagi, Y., Takata, S., Fukuda, Y., Yoshimi, H., ve Fujita, T. (1988). Calcitonin gene-related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 151, 1113–1121.
97. Hoppener, J.W., Ahren, B., ve Lips, C.J. (2000). Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 343, 411-419.
98. Hsu, S.Y., ve Hsueh, A.J. (2001). Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med*, 7, 605-611.
99. Hultgren, H.N., ve Marticorena, E.A. (1978). High altitude pulmonary edema. Epidemiologic observations in Peru. *Chest*, 74, 372-376.
100. Hunter, C., Barer, G.R., Shaw, J.W., ve Clegg, E.J. (1974). Growth of the heart and lungs in hypoxic rodents: a model of human hypoxic disease. *Clin Sci Mol Med*, 46, 375-391.
101. Hyman, A.L., Hao, Q., Tower, A., Kadowitz, P.J., Champion, H.C., Gumusel, B., ve Lipton, H.L. (1998). Novel catheterization technique for the in vivo measurement of pulmonary vascular responses in rats. *Am J Physiol*, 274, 1218–29.
102. Ikeda, U., Kanbe, T., ve Shimada, K. (1996). Adrenomedullin increases inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells stimulated with interleukin-1. *Hypertension*, 27, 1240-1244.

103. Isaacson, T.C., Hampl, V., Weir, E.K., Nelson, D.P., ve Archer, S.L. (1994). Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol*, 76, 933-940.
104. Ishihara, T., Kato, J., Kitamura, K., Katoh, F., Fujimoto, S., Kangawa, K., ve Eto, T. (1997). Production of adrenomedullin in human vascular endothelial cells. *Life Sci*, 60, 1763–1769.
105. Itoh., H., Pratt, R.E. ve Dzau, V.J. (1990). Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 86, 1690–1697.
106. Iwamoto, J., Krasney, J.A., ve Morin, F.C., 3rd. (1994). Methemoglobin production by nitric oxide in fresh sheep blood. *Respir Physiol*, 96, 273-283.
107. Jansen-Olesen, I., Kaarill, L., ve Edvinsson, L. (2001). Characterization of CGRP1 receptors in the guinea pig basilar artery. *Eur J Pharmacol*, 414, 249–258.
108. Ju, G., Hokfelt, T., Brodin, E., Fahrenkrug, J., Fischer, J.A., Frey, P., Elde, R.P., ve Brown, J.C. (1987). Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res*, 247, 417-431.
109. Kamitani, S., Asakawa, M., Shimekake, Y., Kuwasako, K., Nakahara, K., ve Sakata, T. (1999). The RAMP2/CRLR complex is a functional adrenomedullin receptor in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 448, 111–114.
110. Karaki, H., Murakami, K., ve Urakawa, N. (1986). Mechanism of inhibitory action of sodium nitroprusside in vascular smooth muscle of rabbit aorta. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 280, 230-240.
111. Karaki, H., Sato, K., ve Ozaki, H. (1988). Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic Ca²⁺-tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 151, 325-328.
112. Kato, J., Kitamura, K., Kangawa, K., ve Eto, T. (1995). Receptors for adrenomedullin in human vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 289, 383–385.

113. Kawai, J., Ando, K., Tojo, A., Shimosawa, T., Takahashi, K., Onozato, M.L., Yamasaki, M., Ogita, T., Nakaoka, T., ve Fujita, T. (2004). Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury in mice. *Circulation*, 109, 1147-1153.
114. Kay, J.M., Keane, P.M., Suyama, K.L., ve Gauthier, D. (1982). Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension. *Thorax*, 37, 88-96.
115. Keith, I.M., ve Ekman, R. (1992). Dynamic aspects of regulatory lung peptides in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Exp Lung Res*, 18, 205-224.
116. Keith, I.M., ve Ekman, R. (1990). PYY-like material and its spatial relationship with NPY, CGRP and 5-HT in the lung of the Syrian golden hamster. *Cell Tissue Res*, 262, 543-550.
117. Keith, I.M., Pelto-Huikko, M., Schalling, M., ve Hokfelt, T. (1991). Calcitonin gene-related peptide and its mRNA in pulmonary neuroendocrine cells and ganglia. *Histochemistry*, 96, 311-315.
118. Keith, I.M. (2000). The role of endogenous lung neuropeptides in regulation of the pulmonary circulation. *Physiol Res*, 49, 519-537.
119. Keith, I.M., Ekman, R., Kraiczi, H., ve Sandler, R. (1995). CGRP treatment of chronic-hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Faseb J*, 9, 601.
120. Kentera, D., Susic, D., ve Zdravkovic, M. (1985). Hypotensive effect of heparin on experimental chronic pulmonary hypertension in rats. *Basic Res Cardiol*, 80, 142-146.
121. Ketsen, S., Dainauskas, J., McLaughlin, V., ve Rich, S. (1999). Development of nonspecific interstitial pneumonitis associated with long-term treatment of primary pulmonary hypertension with prostacyclin. *Chest*, 116, 566-569.
122. Khan, S.A., Mathews, W.R., ve Meisheri, K.D. (1993). Role of calcium-activated K⁺ channels in vasodilation induced by nitroglycerine, acetylcholine and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, 267, 1327-1335.

123. Kindt, F., Wiegand, S., Loser, C., Nilles, M., Niemeier, V., Hsu, S.Y., Steinhoff, M., Kummer, W., Gieler, U., ve Haberberger, R.V. (2007). Intermedin: a skin peptide that is downregulated in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 127, 605-613.
124. Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H., ve Eto, T. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 192, 553-560.
125. Klinger, J.R., Siddiq, F.M., Swift, R.A., Jackson, C., Pietras, L., Warburton, R.R., Alia, C., ve Hill, N.S. (1998). C-type natriuretic peptide expression and pulmonary vasodilation in hypoxia-adapted rats. *Am J Physiol*, 275, 645-652.
126. Kobayashi, Y., Liu, Y.J., Gonda, T., ve Takei, Y. (2004). Coronary vasodilatory response to a novel peptide, adrenomedullin 2. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31(2), 49-50.
127. Kohno, M., Yokokawa, K., Yasunari, K., Kano, H., Horio, T., ve Takeda, T. (1995). Stimulation of cyclic adenosine monophosphate formation by the novel vasorelaxant peptide adrenomedullin in cultured rat mesangial cells. *Metabolism*, 44, 10-12.
128. Kulkarni, H., Srinivas, A., Vora, A., Kerkar, P., ve Dalvi, B. (1996). Acute hemodynamic response to vasodilators in primary pulmonary hypertension. *J Postgrad Med*, 42, 7-11.
129. Kuwasako, K., Cao, Y.N., Nagoshi, Y., Tsuruda, T., Kitamura, K., ve Eto, T. (2004). Characterisation of the human calcitonin gene-related peptide receptor subtypes associated with receptor activity-modifying proteins. *Mol Pharmacol*, 65, 207-213.
130. Lai, Y.L., Thacker, A.A., ve Diana, J.N. (1996). Hypoxemia and elevated tachykinins in rat monocrotaline pneumotoxicity. *Lung* 174, 195-203.
131. Lai, Y.L., ve Law, T.C. (2004). Chronic hypoxia- and monocrotaline-induced elevation of hypoxia-inducible factor-1 alpha levels and pulmonary hypertension. *J Biomed Sci*, 11, 315-321.

132. Lang, M.G., Paterno, R., Faraci, F.M., ve Heistad, D.D. (1997). Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke*, 28, 181–185.
133. Langleben, D., Christman, B.W., Barst, R.J., Dias, V.C., Galie, N., Higenbottam, T.W., Kneussl, M., Korducki, L., Naeije, R., Riedel, A., Simonneau, G., Hirsch, A.M., Rich, S., Robbins, I.M., Oudiz, R., McGoon, M.D., Badesch, D.B., Levy, R.D., Mehta, S., Seeger, W., ve Soler, M. (2002). Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension. *Am Heart J*, 143, 4.
134. Laros, C.D. (1971). Local chemical regulation of the flow resistance in the bronchial tree and pulmonary circulation. *Respiration*, 28, 120-136.
135. Laskey, R.E., Adams, D.J., Purkerson, S., ve van Bremen, C. (1991). Cytosolic calcium ion regulation in cultured endothelial cells. *Adv Exp Med Biol*, 304, 257-271.
136. Lauweryns, J.M., Cokelaere, M., Deleersynder, M., ve Liebens, M. (1977). Intrapulmonary neuro-epithelial bodies in newborn rabbits. Influence of hypoxia, hyperoxia, hypercapnia, nicotine, reserpine, L-DOPA and 5-HTP. *Cell Tissue Res*, 182, 425-440.
137. Leeman, M., de Beyl, V.Z., Delcroix, M., ve Naeije, R. (1994). Effects of endogenous nitric oxide on pulmonary vascular tone in intact dogs. *Am J Physiol*, 266, 2343-2347.
138. Levin, E.R., Gardner, D.G., ve Samson, W.K. (1998). Natriuretic peptides. *N Engl J Med*, 339, 321–328.
139. Li, H., Chen, S.J., Chen, Y.F., Meng, Q.C., Durand, J., Oparil, S., ve Elton, T.S. (1994). Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol*, 77, 1451-1459.
140. Li, X., Lu, W.C., ve Zhu, Y.J. (1990). The relation of vasoactive intestinal peptide and acute hypoxia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 29(1), 8-10, 59.
141. Lin Chang, C., Roh, J., Park, J.I., Klein, C., Cushman, N., Haberberger, R.V., ve Hsu, S.Y. (2005). Intermedin (IMD) functions as a pituitary paracrine factor regulating prolactin release. *Mol Endocrinol*, 19(11), 2824–38.

142. Lin, H.Y., Harris, T.L., Flannery, M.S., Aruffo, A., Kaji, E.H., Gorn, A., Kolakowski, L.F., Jr., Lodish, H.F., ve Goldring, S.R. (1991). Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*, 254, 1022-1024.
143. Lipton, H.L., Hao, Q., ve Hyman, A. (1992). L-NAME enhances pulmonary vasoconstriction without inhibiting EDRF-dependent vasodilation. *J Appl Physiol*, 73, 2432-2439.
144. Lopez, J., ve Martinez, A. (2002). Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin. *Int Rev Cytol*, 221, 1-92.
145. Lawson, S.M. (2004). Alternatives to nitric oxide. *Br Med Bull*, 70, 119-131.
146. Luckhoff, A., ve Busse, R. (1990). Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch*, 416, 305-311.
147. Maclean, M.R., Johnston, E.D., McCulloch, K.M., Pooley, L., Houslay, M.D., ve Sweeney, G. (1997). Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*, 283, 619-624.
148. Magnani, B., ve Galie, N. (1996). Prostacyclin in primary pulmonary hypertension. *Eur Heart J*, 17, 18-24.
149. Mariani, G., Barefield, E.S., ve Carlo, W.A. (1996). The role of nitric oxide in the treatment of neonatal pulmonary hypertension. *Curr Opin Pediatr*, 8, 118-125.
150. Markewitz, B.A., Kohan, D.E., ve Michael, J.R. (1995). Endothelin-1 synthesis, receptors, and signal transduction in alveolar epithelium: evidence for an autocrine role. *Am J Physiol*, 268, 192-200.
151. Marshall, I. (1992). Mechanism of vascular relaxation by the calcitonin gene-related peptide. *Ann NY Acad Sci*, 657, 204-215.
152. Martling, C.R., Saria, A., Fischer, J.A., Hokfelt, T., ve Lundberg, J.M. (1988). Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with

- substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul Pept*, 20, 125-139.
153. Maruyama, J., ve Maruyama, K. (1994). Impaired nitric oxide-dependent responses and their recovery in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Am J Physiol*, 266, 2476-2488.
154. Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, P., ve Bohme, E. (1989). Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*, 164, 678-685.
155. McCormack, D.G., Mak, J.C., Coupe, M.O., ve Barnes, P.J. (1989). Calcitonin gene-related peptide vasodilation of human pulmonary vessels. *J Appl Physiol*, 67, 1265-1270.
156. McIntyre, R.C. Jr., Banerjee, A., Agrafojo, J., ve Fullerton, D.A. (1995). Pulmonary hypertension in acute lung injury is due to impaired vasodilation with intact vascular contractility. *J Surg Res*, 58, 765-770.
157. McKay, K.O., Black, J.L., Diment, L.M., ve Armour, C.L. (1991). Functional and autoradiographic studies of endothelin-1 and endothelin-2 in human bronchi, pulmonary arteries, and airway parasympathetic ganglia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17(7), 206-209.
158. McKenzie, J.C., Hung, K.S., Mattioli, L., ve Klein, R.M. (1984). Reduction in hypertension-induced protein synthesis in the rat pulmonary trunk after treatment with teprotide (SQ 20881). *Proc Soc Exp Biol Med*, 177, 377-382.
159. McLatchie, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G., ve Foord, S.M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393, 333-339.
160. Meisheri, K.D., Swirtz, M.A., Purohit, S.S., Cipkus-Dubray, L.A., Khan, S.A., ve Oleynek, J.J. (1991). Characterization of K⁺ channel-dependent as well as -independent components of pinacidil-induced vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther*, 256, 492-499.

161. Mitani, Y., Maruyama, K., ve Sakurai, M. (1997). Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation*, 96, 689-697.
162. Morimoto, R., Satoh, F., Murakami, O., Totsune, K., Suzuki, T., Sasano, H., Ito, S., ve Takahashi, K. (2007). Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney. *Peptides* 28, 1095-1103.
163. Morrell, N.W., Upton, P.D., Higham, M.A., Yacoub, M.H., Polak, J.M., ve Wharton, J. (1998). Angiotensin II stimulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via the AT1 receptor. *Chest*, 114, 90S-91S.
164. Muff, R., Leuthauser, K., Buhlmann, N., Foord, S.M., Fischer, J.A., ve Born, W. (1998). Receptor activity modifying proteins regulate the activity of a calcitonin gene related peptide receptor in rabbit aortic endothelial cells. *FEBS Lett*, 441, 366–368.
165. Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., Spokes, R.A., Jones, P.M., Pierson, A.M., Hamid, Q.A., Kanse, S., Amara, S.G., Burrin, J.M., Legon, S., ve diğ. (1988). Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience*, 25, 195-205.
166. Muller, W., Kachel, W., Lasch, P., Varnholt, V., ve Konig, S. (1996). Inhaled nitric oxide during extracorporeal membrane oxygenation for the treatment of severe persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Artif Organs*, 20, 60-63.
167. Nagae, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Mori, K., Yahata, K., Kasahara, M., Suganami, T., Makino, H., Fujinaga, Y., Yoshioka, T., Tanaka, I., ve Nakao, K. (2000). Rat receptor-activity modifying proteins (RAMPs) for adrenomedullin/CGRP receptor: cloning and upregulation in obstructive nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 270, 89–93.
168. Nagaya, N., Kyotani, S., Uematsu, M., Ueno, K., Oya, H., Nakanishi, N., Shirai, M., Mori, H., Miyatake, K., ve Kangawa, K. (2004). Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 109, 351-356.
169. Nagaya, N., Okumura, H., Uematsu, M., Shimizu, W., Ono, F., Shirai, M., Mori, H., Miyatake, K., ve Kangawa, K. (2003). Repeated inhalation of

adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, 2125-2131.

170. Nakagawa, T.A., Morris, A., Gomez, R.J., Johnston, S.J., Sharkey, P.T., ve Zaritsky, A.L. (1997). Dose response to inhaled nitric oxide in pediatric patients with pulmonary hypertension and acute respiratory distress syndrome. *J Pediatr*, 131, 63-69.
171. Nelson, M.T., Huang, Y., Brayden, J.E., Hescheler, J., ve Standen, N.B. (1990). Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature*, 344, 770-773.
172. Nilius, B., Viana, F., ve Droogmans, G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol*, 59, 145-170.
173. Nishikimi, T., Nagata, S., Sasaki, T., Tomimoto, S., Matsuoka, H., Takishita, S., Kitamura, K., Miyata, A., Matsuo, H., ve Kangawa, K. (1997). Plasma concentrations of adrenomedullin correlate with the extent of pulmonary hypertension in patients with mitral stenosis. *Heart*, 78, 390-395.
174. Nishimatsu, H., Suzuki, E., Nagata, D., Moriyama, N., Satonaka, H., Walsh, K., Sata, M., Kangawa, K., Matsuo, H., Goto, A., Kitamura, T., ve Hirata, Y. (2001) Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res*, 89, 63-70.
175. Nong, Z., Stassen, J.M., Moons, L., Collen, D., ve Janssens, S. (1996). Inhibition of tissue angiotensin-converting enzyme with quinapril reduces hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling. *Circulation*, 94, 1941-1947.
176. Offner, P.J., Ogura, H., Jordan, B.S., Pruitt, B.A. Jr., ve Cioffi, W.G. (1996). Cardiopulmonary effects of combined nitric oxide inhibition and inhaled nitric oxide in porcine endotoxic shock. *J Trauma*, 41, 641-646.
177. Ogoshi, M., Inoue, K., Naruse, K., ve Takei, Y. (2006). Evolutionary history of the calcitonin gene-related peptide family in vertebrates revealed by comparative genomic analyses. *Peptides*, 27, 3154-3164.

178. Oliver, K.R., Wainwright, A., Edvinsson, L., Pickard, J.D., ve Hill, R.G. (2002). Immunohistochemical localisation of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying proteins in the human cerebral vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 620–629.
179. Ostadal, B., Ressler, J., Urbanova, D., Widimsky, J., Prochazka, J., ve Pelouch, V. (1978). The effect of beta adrenergic blockade on pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy and polycythaemia, induced in rats by intermittent high altitude hypoxia. *Basic Res Cardiol*, 73, 422-432.
180. O'Toole, S.J., Irish, M.S., Holm, B.A., ve Glick, P.L. (1996). Pulmonary vascular abnormalities in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol*, 23, 781-794.
181. Pan, C.S., Yang, J.H., Cai, D.Y., Zhao, J., Gerns, H., Yang, J., Chang, J.K., Tang, C.S., ve Qi, Y.F. (2005). Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin 2. *Peptides*, 26, 1640-1646.
182. Poyner, D.R., Sexton, P.M., Marshall, I., Smith, D.M., Quirion, R., Born, W., Muff, R., Fischer, J.A., ve Foord, S.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev*, 54, 233-246.
183. Queen, L.R., Xu, B., Horinouchi, K., Fisher, I., ve Ferro, A. (2000). Beta(2)-adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ Res*, 87, 39–44.
184. Rabinovitch, M., Gamble, W., Nadas, A.S., Miettinen, O.S., ve Reid, L. (1979). Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol*, 236, 818-827.
185. Rabinovitch, M., Kontsam, M.A., Gamble, W.J., Papanicolaou, N., Aronovitz, M.J., Treves, S., ve Reid, L. (1983). Changes in pulmonary blood flow affect vascular response to chronic hypoxia in rats. *Circ Res*, 52, 432-441.
186. Raddino, R., Pela, G., Manca, C., Barbagallo, M., D'Aloia, A., Passeri, M., ve Visioli, O. (1997). Mechanism of action of human calcitonin gene-related peptide in rabbit heart and in human mammary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 29, 463–470.

187. Ren, Y.S., Yang, J.H., Zhang, J., Pan, C.S., Yang, J., Zhao, J., Pang, Y.Z., Tang, C.S., ve Qi, Y.F. (2006). Intermedin 1–53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats. *Peptides*, 27, 74–79.
188. Robberecht, P., Waelbroeck, M., de Neef, P., Camus, J.C., Coy, D.H., ve Christophe, J. (1988). Pharmacological characterization of VIP receptors in human lung membranes. *Peptides*, 9, 339-345.
189. Rodman, D.M. (1992). Chronic hypoxia selectively augments rat pulmonary artery Ca²⁺ and K⁺ channel-mediated relaxation. *Am J Physiol*, 263, 88-94.
190. Roh, J., Chang, C.L., Bhalla, A., Klein, C., ve Hsu, S.Y. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem*, 2004, 279(8), 7264–74.
191. Rosenberg, H.C., ve Rabinovitch, M. (1988). Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*, 255, 1484-1491.
192. Rubin, L.J., Badesch, D.B., Barst, R.J., Galie, N., Black, C.M., Keogh, A., Pulido, T., Frost, A., Roux, S., Leconte, I., Landzberg, M., ve Simonneau, G. (2002). Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 346, 896-903.
193. Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E., ve Beavo, J.A. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*, 93, 280-291.
194. Sabates, B.L., Pigott, J.D., Choe, E.U., Cruz, M.P., Lipton, H.L., Hyman, A.L., Flint, L.M., ve Ferrara, J.J. (1997). Adrenomedullin mediates coronary vasodilation through adenosine receptors and K_{ATP} channels. *J Surg Res*, 67, 163–168.
195. Sakai, K., Saito, K., ve Ishizuka, N. (1998). Adrenomedullin synergistically interacts with endogenous vasodilators in rats: a possible role of K(ATP) channels. *Eur J Pharmacol*, 359, 151-159.
196. Sakai, T. (1990). Acetylcholine induces Ca-dependent K currents in rabbit endothelial cells. *Jpn J Pharmacol*, 53, 235-246.

197. Samson, W.K., Murphy, T.C., ve Resch, Z.T. (1998). Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin-derived peptides in conscious rats. *Am J Physiol*, 274, 1505-1509.
198. Samuelson, U.E. ve Jernbeck, J. (1991). Calcitonin gene-related peptide relaxes porcine arteries via one endothelium-dependent and one endothelium-independent mechanism. *Acta Physiol Scand*, 141, 281-282.
199. Shaul, P.W., Wells, L.B., ve Horning, K.M. (1993). Acute and prolonged hypoxia attenuate endothelial nitric oxide production in rat pulmonary arteries by different mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22, 819-827.
200. Sheykhzade, M., ve Berg Nyborg, N.C. (2004). Homologous desensitization of calcitonin gene-related peptide-induced relaxation in rat intramural coronary arteries. *Eur J Pharmacol*, 484(1), 91-101.
201. Shimekake, Y., Nagata, K., Ohta, S., Kambayashi, Y., Teraoka, H., Kitamura, n K., Eto, T., Kangawa, K., ve Matsuo, H. (1995). Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 270, 4412-4417.
202. Shimosawa, T., Shibagaki, Y., Ishibashi, K., Kitamura, K., Kangawa, K., Kato, S., Ando, K., ve Fujita, T. (2002). Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation*, 105, 106-111.
203. Shirai, M., Pearson, J.T., Shimouchi, A., Nagaya, N., Tsuchimochi, H., Ninomiya, I., ve Mori, H. (2003). Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*, 139, 899-910.
204. Singer, H.A., ve Peach, M.J. (1982). Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension*, 4, 19-25.
205. Sugo, S., Minamino, N., Kangawa, K., Miyamoto, K., Kitamura, K., Sakata, J., Eto, T., ve Matsuo, H. (1994). Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*, 201, 1160-1166.
206. Takahashi, K., Kikuchi, K., Maruyama, Y., Urabe, T., Nakajima, K., Sasano, H., Imai, Y., Murakami, O., ve Totsune, K. (2006). Immunocytochemical

- localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides*, 27, 1383-1389.
207. Takahashi, Y., de Vroomen, M., Gournay, V., Roman, C., Rudolph, A.M., ve Heymann, M.A. (1999). Mechanisms of adrenomedullin-induced increase of pulmonary blood flow in fetal sheep. *Pediatr Res*, 45, 276-281.
 208. Takei, Y., Hyodo, S., Katafuchi, T., ve Minamino, N. (2004). Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function. *Peptides*, 25, 1643-1656.
 209. Takei, Y., Inoue, K., Ogoshi, M., Kawahara, T., Bannai, H., ve Miyano, S. (2004). Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett*, 556(1-3), 53-8.
 210. Taylor, M.M., Bagley, S.L., ve Samson, W.K. (2006). Intermedin/Adrenomedullin-2 inhibits growth hormone release from cultured, primary anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 147, 859-864.
 211. Taylor, M.M., Bagley, S.L., ve Samson, W.K. (2005) Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(4), 919-27.
 212. Taylor, M.M., ve Samson, W.K. (2005) Stress hormone secretion is altered by central administration of intermedin/adrenomedullin-2. *Brain Res*, 1045(1-2), 199-205.
 213. Terata, K., Miura, H., Liu, Y., Loberiza, F., ve Gutterman, D.D. (2000). Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279, 2620-2626.
 214. Tfelt-Hansen, J., Hansen, J.L., Smajilovic, S., Terwilliger, E.F., Haunso, S., ve Sheikh, S.P. (2006). Calcium receptor is functionally expressed in rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol*, 290, 1165-1171.
 215. Tjen, A.L.S., Ekman, R., Lipton, H., Cary, J., ve Keith, I. (1992). CGRP and somatostatin modulate chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol*, 263, 681-690.

216. Tjen, A.L.S., Kraiczi, H., Ekman, R., ve Keith, I.M. (1998). Sensory CGRP depletion by capsaicin exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Regul Pept*, 74, 1-10.
217. Totsune, K., Takahashi, K., Mackenzie, H.S., Murakami, O., Arihara, Z., Sone, M., Mouri, T., Brenner, B.M., ve Ito, S. (2000). Increased gene expression of adrenomedullin and adrenomedullin-receptor complexes, receptor-activity modifying protein (RAMP)2 and calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) in the hearts of rats with congestive heart failure. *Clin Sci*, 99, 541–546.
218. Tsuruda, T., ve Burnett, J.C. Jr. (2002). Adrenomedullin: an autocrine/paracrine factor for cardiorenal protection. *Circ Res*, 90, 625-627.
219. Van Rossum, D., Hanisch, U.K., ve Quirion, R. (1997). Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 649-678.
220. Wangenstein, R., Quesada, A., Sainz, J., Duarte, J., Vargas, F., ve Osuna, A. (2002). Role of endothelium-derived relaxing factors in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Eur J Pharmacol*, 444, 97-102.
221. Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., ve Sletten, K. (1986). A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun*, 140, 827-831.
222. Wilkins, M.R., Redondo, J., ve Brown, L.A. (1997). The natriureticpeptide family. *Lancet*, 349, 1307–1310.
223. Wisskirchen, F.M., Burt, R.P., ve Marshall, I. (1998). Pharmacological characterization of CGRP receptors mediating relaxation of the rat pulmonary artery and inhibition of twitch responses of the rat vas deferens. *Br J Pharmacol*, 123, 1673-1683.
224. Wisskirchen, F.M., Doyle, P.M., Gough, S.L., Harris, C.J., ve Marshall, I. (2000). Bioactive beta-bend structures for the antagonist halpha CGRP(8 - 37) at the CGRP(1) receptor of the rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol*, 129, 1049-1055.
225. Wisskirchen, F.M., Gray, D.W., ve Marshall, I. (1999). Receptors mediating CGRP-induced relaxation in the rat isolated thoracic aorta and porcine isolated

- coronary artery differentiated by h(alpha) CGRP(8-37). *Br J Pharmacol*, 128, 283-292.
226. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., ve Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415.
227. Yang, B.C., Lipton, H., Gumusel, B., Hyman, A., ve Mehta, J.L. (1996). Adrenomedullin dilates rat pulmonary artery rings during hypoxia: role of nitric oxide and vasodilator prostaglandins. *J Cardiovasc Pharmacol*, 28, 458-462.
228. Yang, J.H., Jia, Y.X., Pan, C.S., Zhao, J., Ouyang, M., Yang, J., Chang, J.K., Tang, C.S., ve Qi, Y.F. (2005). Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun*, 327, 713-719.
229. Yang, J.H., Pan, C.S., Jia, Y.X., Zhang, J., Zhao, J., Pang, Y.Z., Yang, J., Tang, C.S., ve Qi, Y.F. (2006). Intermedin1-53 activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Biochem Biophys Res Commun*, 341, 567-572.
230. Yang, J.H., Qi, Y.F., Jia, Y.X., Pan, C.S., Zhao, J., Yang, J., Chang, J.K., ve Tang, C.S. (2005). Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Peptides*, 26, 501-507.
231. Yao, X., Segal, A.S., Welling, P., Zhang, X., McNicholas, C.M., Engel, D., Boulpaep, E.L., ve Desir, G.V. (1995). Primary structure and functional expression of a cGMP-gated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11711-11715.
232. Yoshibayashi, M., Kamiya, T., Kitamura, K., Saito, Y., Kangawa, K., Nishikimi, T., Matsuoka, H., Eto, T., ve Matsuo, H. (1997). Plasma levels of adrenomedullin in primary and secondary pulmonary hypertension in patients <20 years of age. *Am J Cardiol*, 79, 1556-1558.
233. Yoshihara, F., Nishikimi, T., Horio, T., Yutani, C., Takishita, S., Matsuo, H., Ohe, T., ve Kangawa, K. (1998). Chronic infusion of adrenomedullin reduces pulmonary hypertension and lessens right ventricular hypertrophy in rats administered monocrotaline. *Eur J Pharmacol*, 355, 33-39.

234. Yoshimoto, R., Mitsui-Saito, M., Ozaki, H., ve Karaki, H. (1998). Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Br J Pharmacol*, 123, 1645–1654.
235. Youngson, C., Nurse, C., Yeger, H., ve Cutz, E. (1993). Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature*, 365, 153-155.
236. Zaidi, M., Bevis, P.J., Abeyasekera, G., Girgis, S.I., Wimalawansa, S.J., Morris, H.R., ve MacIntyre, I. (1986). The origin of circulating calcitonin gene-related peptide in the rat. *J Endocrinol*, 110, 185-190.
237. Zapol, W.M., ve Hurford, W.E. (1993). Inhaled nitric oxide in the adult respiratory distress syndrome and other lung diseases. *New Horiz*, 1, 638-650.
238. Zhao, L., Brown, L.A., Owji, A.A., Nunez, D.J., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., ve Wilkins, M.R. (1996). Adrenomedullin activity in chronically hypoxic rat lungs. *Am J Physiol*, 271, 622-629.
239. Zhao, Y., Bell, D., Smith, L.R., Zhao, L., Devine, A.B., McHenry, E.M., Nicholls, D.P., ve McDermott, B.J. (2006). Differential effects of components of the cardiomyocyte adrenomedullin/intermedin receptor system following blood pressure reduction in nitric oxide-deficient hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*, 316, 1269–1281.

EK

Bu tez çalışmasının sonuçlarının sunulduğu yayınlar ve bildiriler:

Yayınlar

Kandilci HB, Gumusel B, Wasserman A, Witriol N, Lipton H "Intermedin/adrenomedullin-2 dilates the rat pulmonary vascular bed: Dependence on CGRP receptors and nitric oxide release" Peptides 27, 1390-6, 2006.

Kandilci HB, Gumusel B, Lipton H. "Intermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) relaxes rat main pulmonary arterial rings via cGMP-dependent pathway: Role of nitric oxide and large conductance calcium- activated potassium channels (BKCa)" Peptides doi 10.1016/j.peptides.2008.04.008

Bildiriler

Kandilci HB, Gümüsel B, Wasserman A, Witriol N, Lipton H "Intermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) dilates the rat pulmonary vascular bed: Dependence on CGRP receptors and nitric oxide release" 15. Dünya Farmakoloji kongresi Pekin-Çin, 2-7 Temmuz 2006. Acta Pharmacologica Sinica 27, 376.

Kandilci HB, Gumusel B, Lipton H " Intermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) relaxes rat pulmonary arterial rings in a nitric oxide and endothelial dependent manner" Experimental Biology, Washington D.C., ABD, 27 Nisan-02 Mayıs 2007. Faseb Journal 21 (6), A1440.

Kandilci HB, Gumusel B. "İntermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) sıçan ana pulmoner arter halkalarında endotele bağımlı, protein kinaz G ve Ca⁺² ile aktive olan büyük kondüktanslı K⁺ kanalı aracılı gevşeme oluşturmakta" 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 24-27 Ekim 2007.

Kandilci HB, Gumusel B, Lipton H, Witriol N "Intermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) relaxes rat pulmonary arterial rings via protein kinase G (PKG) and BKCa channel dependent pathway: The effect of chronic hypoxia induced pulmonary hypertension" Experimental Biology, San Diego, CA, 5-9 Nisan 2008. Faseb Journal 22, 1150.11.