

## Kuzu İzole Pulmoner Arterlerinde Gelişen Hipoksik Pulmoner Vazokonstriksiyonda $G_i$ ve $G_s$ Proteinlerinin Rolü <sup>[1]</sup>

Metin ERBAŞ <sup>1</sup> Öner BALBAY <sup>2</sup> Özge UZUN <sup>3</sup> Ege GÜLEÇ BALBAY <sup>2</sup> Coşkun SILAN <sup>4</sup>

<sup>[1]</sup> Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje No: BAP 2002.07.03.131)

<sup>1</sup> Akçakoca Devlet Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kliniği, TR-81650 Düzce - TÜRKİYE

<sup>2</sup> Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, TR-81620 Düzce - TÜRKİYE

<sup>3</sup> Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, TR-14000 Bolu - TÜRKİYE

<sup>4</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, TR-17020 Çanakkale - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-10040

### Özet

Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon akciğerlerde ventilasyon perfüzyon dengesini sağlayan fizyolojik uyum mekanizmasıdır. Hipoksemi ile seyreden progressif akciğer hastalıklarının patogenezinde önemli rol oynamakla birlikte sağlıklı bireylerde de görülmektedir. Yoğun çalışmalara rağmen, hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonun mekanizması henüz bulunamamıştır.  $G$  proteinleri vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde reseptör aracılıklı sinyal iletimine aracılık ederek vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynayan membrana bağlı protein ailesidir. Biz bu çalışmada, kuzu izole pulmoner arterlerinde izlenen hipoksik vazokonstriksiyonun oluş mekanizmasında  $G_i$  ve  $G_s$  proteinlerinin rolünü saptamayı amaçladık. Pulmoner arterler yeni kesilmiş kuzuların sol akciğer alt loblarından izole edildi. Arterler Krebs-Henseleit solüsyonu ile dolu olan izole organ banyosuna asıldı ve izometrik kontraksiyonlar bilgisayarlı poligrafi sistemi ile bağlantılı olan izometrik transdüser yoluyla devamlı olarak kaydedildi. Solüsyon %75  $N_2$  - %20  $O_2$  - %5  $CO_2$  (Normoksik) ve %95  $N_2$  - %5  $CO_2$  (Hipoksik) karışımı içeren gazlar ile havalandırıldı. Organ banyosundaki parsiyel oksijen konsantrasyonu oksijen elektrodu kullanılarak sürekli olarak ölçüldü.  $G_i$  ve  $G_s$  proteinlerin rolünü araştırmak için kolera ve pertusis toksini kullanıldı. Çalışmada, dinlenme gerimindeki geniş çaplı pulmoner arterlerde hipoksiye bağlı bir gerim artışı izlenmedi ancak hipoksi 3  $\mu$ M 5-HT ile prekontrakte edilmiş dokularda kontraksiyona ( $1.7 \pm 0.5$  mN/mm<sup>2</sup>, n=10) sebep oldu. Hipoksik vazokonstriksiyon 2  $\mu$ g/ml kolera toksini ile inkübasyon sonrası inhibe ( $2.6 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>den  $1.0 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>'ye kadar, n=6) ve 2  $\mu$ g/ml pertusis toksini ile inkübasyon sonrası potansiyalize ( $0.6 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>den  $1.7 \pm 0.3$  mN/mm<sup>2</sup>'ye kadar, n=6) oldu. Bu sonuçlar  $G_i$  ve  $G_s$  proteinleri ile ilişkili sinyal iletiminin geniş çaplı kuzu izole pulmoner arterinde gelişen hipoksik vazokonstriksiyonda önemli bir mekanizma olabileceğini gösterdi.

**Anahtar sözcükler:** Hipoksi, Pulmoner vazokonstriksiyon, Kolera toksini, Pertusis toksini,  $G$  proteinleri, Kuzu

## The Role of $G_i$ and $G_s$ Proteins in Hypoxic Vasoconstriction of Lamb Isolated Pulmonary Artery Rings

### Summary

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is an intrapulmonary adaptive mechanism that matches alveolar ventilation to perfusion. However during prolonged alveolar hypoxia HPV occurs with many pulmonary diseases. Despite intensive studies, cellular mechanisms of HPV are still not well defined.  $G$  proteins are a family of membrane-associated proteins believed to be involved in the transduction of various signals including the regulation of vascular tonus. In this study, we aimed to determine the contribution of  $G_i$  and  $G_s$  proteins in hypoxic vasoconstriction of lamb isolated pulmonary artery rings. Pulmonary arteries were isolated from left lower lobe of freshly slaughtered lamb. Arteries suspended in an organ bath filled with Krebs-Henseleit solution and isometric contraction recorded continuously via an isometric transducer connected to a computerised polygraphy system. The solution aerated with 75%  $N_2$  - 20%  $O_2$  - 5%  $CO_2$  (normoxic) and 95%  $N_2$  - 5%  $CO_2$  (hypoxic)  $pO_2$  of bathing medium was measured continuously using an oxygen electrode. Pertussis toxin and cholera toxin were used to investigate the role of  $G_i$  and  $G_s$  proteins. In the present study, we observed that hypoxia had no effect on resting force in large artery rings, but it caused a further contraction ( $1.7 \pm 0.5$  mN/mm<sup>2</sup>, n=10) in 3  $\mu$ M 5-HT precontracted pulmonary arteries rings. Hypoxic vasoconstriction was inhibited by preincubation with 2  $\mu$ g/ml cholera toxins (from  $2.6 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>, to  $1.0 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>, n=6) and potentiated by preincubation with pertussis toxins (2  $\mu$ g/ml) (from  $0.6 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>, to  $1.7 \pm 0.3$  mN/mm<sup>2</sup>, n=6). These results indicate that signal transduction mediated by  $G_i$  and  $G_s$  proteins may be an important mechanism in the hypoxic vasoconstriction in lamb isolated large pulmonary arteries.

**Keywords:** Hypoxia, Pulmonary vasoconstriction, Cholera toxins, Pertussis toxins  $G$ -proteins, Lamb



İletişim (Correspondence)



+90 532 3777301



oner.balbay@gmail.com

## GİRİŞ

Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon (HPV) hipoksiye karşı pulmoner arterlerde ortaya çıkan fizyolojik adaptasyon mekanizmasıdır. HPV ile kötü ventilasyonlu akciğer bölgelerindeki kan akımı ventilasyonu normal olan bölgelere doğru yönlendirilir ve arteriyel hipoksemi minimale indirilmeye çalışılır. Ancak HPV'nin sürekli olması ile pulmoner arterlerde direnç artar ve pulmoner hipertansiyon (PHT) ortaya çıkar <sup>[1]</sup>.

HPV'nin mekanizması son yarım yüzyıldır birçok araştırmaya konu olmuştur. Hipoksik vazokonstriksiyon balık, amfibi, kuş ve memeli gibi birçok türde gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmalarda hipoksi süresinin uzunluğu, canlı türü ve üzerinde çalışılan arterlerin büyüklüğü ile farklılık gösteren çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür <sup>[2]</sup>. Çoğu araştırmada HPV'nin pulmoner vasküler endotelden salınan çeşitli mediatörlere bağlı geliştiği ya da hipoksinin pulmoner vasküler düz kas üzerinde yaptığı doğrudan etki ile ortaya çıktığı ileri sürülmüştür <sup>[1]</sup>. Ancak, sonraki çalışmalarda pulmoner vasküler düz kas hücrelerindeki oksijene duyarlı iyon kanallarının ve lokal nöral kontrol mekanizmalarının da önemli rolü olduğu ortaya konmuştur <sup>[3]</sup>.

Ökaryot canlıların hücrelerinde izlenen reseptör aracılıklı sinyal iletiminde çeşitli proteinler rol oynamaktadır. Guanin nükleotit bağlayıcı proteinler (G proteinleri) reseptör aracılıklı sinyal iletiminde rol oynayan ve bu yolla hücre fonksiyonlarını etkileyen membrana bağlı protein grubudur. Bu proteinler yoluyla iyon kanal aktivitesi, veziküler transport ve nörotransmitter salınımı gibi birçok hücre fonksiyonu değiştirilebilmektedir <sup>[4]</sup>. G proteinleri vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde reseptör aracılıklı sinyal iletimine aracılık ederek vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar <sup>[5]</sup>. Ancak literatürde pulmoner vasküler yapılar da gelişen HPV'nin oluşum mekanizmasında G proteinlerinin rolünü inceleyen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

G proteinleri kolera toksini (CTX) ve pertusis toksini (PTX) gibi çeşitli bakteriyel toksinlere maruz bırakıldığında yapısal değişimlere uğramaktadır <sup>[6]</sup>. CTX G<sub>i</sub> proteininin α subünitindeki arjinin rezidüsünü etkileyerek G<sub>i</sub> proteininde kalıcı aktivasyona, PTX ise G<sub>s</sub> proteininin α subünitindeki sistein rezidüsünü etkileyerek G<sub>s</sub> proteininde inaktivasyona yol açmaktadır <sup>[7]</sup>. Bu yapısal değişimler ile G protein fonksiyonları etkilenmekte, pulmoner vasküler endotel ve düz kas fonksiyonları değişmekte ve beraberinde HPV'nin şiddetinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır <sup>[5]</sup>.

Sunulan çalışmada, CTX ve PTX kullanarak kuzu izole pulmoner arterlerinde izlenen hipoksik vazokonstriksiyonda G<sub>i</sub> ve G<sub>s</sub> proteinlerinin rolünün saptanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Deneyler Düzce Belediyesi mezbahasında günlük olarak kesilen kuzuların akciğerlerinden izole edilen pulmoner arterlerde gerçekleştirildi. Çalışma 4-9 aylık kuzularda gerçekleştirildi. Deneyler sırasında yaklaşık 90 kuzu akciğeri kullanılarak çalışma 6 aylık bir dönemde tamamlandı. Kullanılan bütün kimyasal maddeler Sigma Chemical Co' dan (St. Louis USA) sağlandı ve kimyasal maddeler distile suda çözüldü.

### Pulmoner Arterlerin Disseksiyonu ve İzole Organ Banyosuna Asılması

Pulmoner arterler günlük olarak kesilen kuzuların sol akciğer alt lobunun ilk dalından izole edildi. İzole edilen arterlerin çapları yaklaşık 0.3-0.4 cm, uzunlukları 0.3-0.5 cm idi. Arterler halka şeklinde kesildi, yağ ve bağ dokudan temizlendi. İzolasyondan sonra arter dokuları Krebs-Heinseleit solüsyonu içeren bir petri içine alındı. İzole edilen arterler izole organ banyosuna çengeller yardımıyla asıldı. Deneylere pulmoner arterlerde önceden belirlenen 5 g optimum dinlenme gerimiyle devam edildi. İzole organ banyoları 10 ml Krebs-Heinseleit çözeltisi içermektedir ve %75 N<sub>2</sub>, %20 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> (normoksik koşullar) karışımı içeren gaz ile havalandırılmıştır. Hipoksik koşullar ise %95 N<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> gaz karışımı ile sağlanmıştır.

### İzometrik Kasılmaların Saptanması ve Hesaplanması

Pulmoner arter dokularındaki kasılma değerleri sürekli olarak Biopac Student Lab (BSL) bilgisayar programından izlendi ve kaydedildi. Kasılma değerleri milinewton (mN) cinsinden ölçüldü. Ancak her dokunun kesit alanı dolayısıyla kasılma gücü farklı olacağı için hesaplamamızda BSL programından elde edilen kasılma değerleri değil formülle hesaplanan izometrik kasılma değerleri kullanıldı. İzometrik kasılmalar aşağıdaki formüle uygun olarak BSL sisteminden elde edilen kasılma değerinin arterin kesit alanına (mm<sup>2</sup>) bölünmesi ile saptandı <sup>[8,9]</sup>.

$$\text{İzometrik kasılma (mN/mm}^2\text{)} = \frac{\text{Kasılma değeri (mN)}}{A}$$

Bu formülü hesaplamak için aşağıdaki formüle göre hesaplanan A değeri kullanıldı.

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

A: Arterin enine kesit alanı

β: Arter halkasının yoğunluğu (Koyun karotit arterinde 1.05 mg/mm<sup>3</sup> olduğu bildirilmiştir <sup>[10]</sup>)

W: Filtre kağıdında kurutulmuş arterin ağırlığı (mg)

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

### Prekontraktıl Agonistin Saptanması

Pulmoner arterlerde hipoksinin etkisi damarın ön gerimine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle hipoksiye bağlı gelişen vazokonstriksiyonu daha kolay tespit etmek için prekontraktıl bir madde kullanımı yararlı olmaktadır [11]. Yapılan deneysel çalışmalarda pulmoner arterlerde histamin, noradrenalin, ET-1, sodyum florid ve 5-HT gibi maddeler prekontraktıl agonist olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda ise 5-HT kasılma süresi ve büyüklüğü ile uygun profil göstermesi nedeni ile prekontraktıl agonist olarak seçildi. Deneylerimizde kullanılacak olan 5-HT'nin EC<sub>50</sub> değeri 3 µM olarak belirlendi.

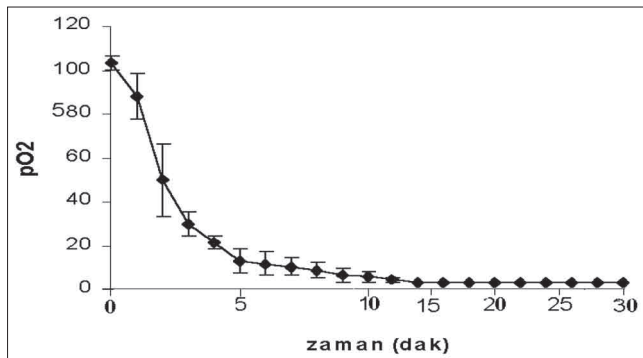
### Deney Protokolü

İzole edilen damarlar optimum dinlenme geriminde 1 saat dengelenmeye bırakıldı. Daha sonra izole edilmiş pulmoner arterlerin deneye uygun ve kasılan bir doku olup olmadığının tesbiti için iki kez ardarda 40 µM KCl uygulaması yapıldı. Ardarda benzer kasılma yanıtı alındıktan sonra deneylere geçildi.

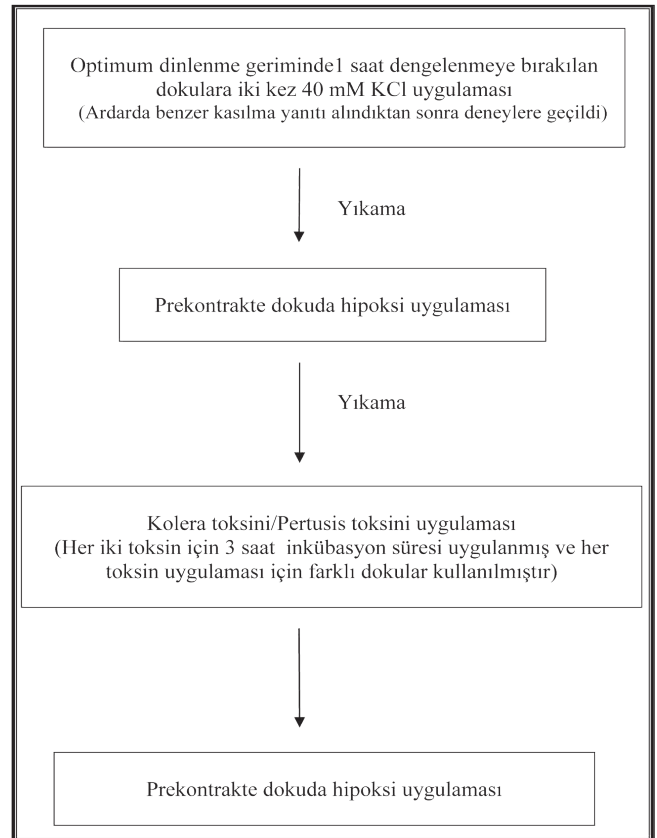
Deneylerimizde öncelikle kuzu izole pulmoner arterlerinde normoksi ve hipoksiye bağlı gerim değişiklikleri hem optimum dinlenme geriminde hem de 3 µM 5-HT ile prekontrakte dokularda araştırıldı. Her iki doku önce 30 dak. süre ile normoksik gaz karışımı ile (%75 N<sub>2</sub>, %20 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub>) daha sonra 30 dak. boyunca hipoksik gaz karışımı ile (%5 CO<sub>2</sub>-% 95 N<sub>2</sub>) havalandırıldı. Normoksi ve hipoksi uygulaması sırasında dakikalık gerim değişiklikleri kaydedildi ve ortalamaları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar ortalama±standart sapma olarak hesaplandı ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının saptanması için student's t testi kullanıldı. P<0.05 değerler anlamlı kabul edildi.

Deneyler süresince oksijenmetre ile ortamın oksijen konsantrasyonu ölçüldü. Hipoksi uygulaması sonucu ortamın PaO<sub>2</sub> değerinin zamana karşı değişimi Şekil 1'de gösterildi.

Deneylerimizde CTX ve PTX toksininin HPV gelişmiş kuzu izole pulmoner arterleri üzerindeki etkisinin gösterilmesi için Şekil 2'deki protokol uygulandı. Bu protokole göre kuzu izole pulmoner arterleri öncelikle 3 µM 5-HT ile



Şekil 1. 30 dakikalık hipoksi uygulaması boyunca değişen pO<sub>2</sub> değerleri  
Fig 1. Changes in pO<sub>2</sub> values during 30 min hypoxia



Şekil 2. Deney protokolü

Fig 2. Experimental protocol

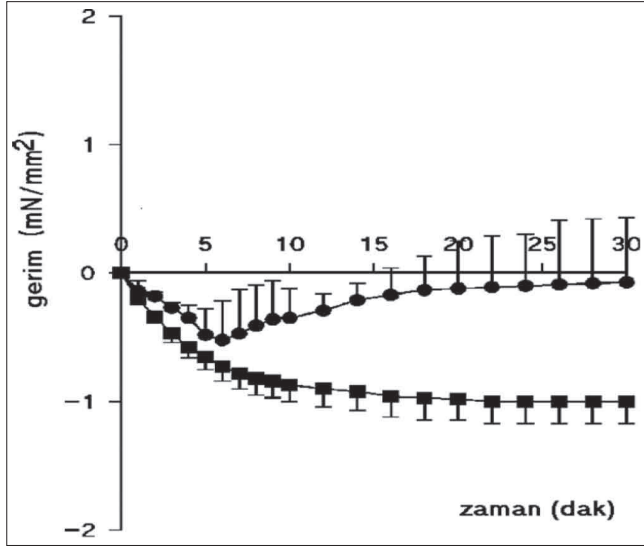
prekontrakte edildi ve bu dokulara 30 dak. süre ile hipoksi uygulandı. Bu işlemlerden sonra normoksik koşullara geri dönüldü ve yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra dokular kolera ve pertusis toksini ile 3 saat inkübasyona bırakıldı. CTX ya da PTX 2 µM/ml konsantrasyonlarda kullanıldı [12,13]. İnkübasyon süresi bitiminde dokular 3 µM 5-HT ile tekrar prekontrakte edildi ve dokulara 30 dak. hipoksi uygulaması yeniden yapıldı (5-HT ile prekontrakte edilen dokular, ortalama 5 dak. süren optimum prekontraksiyon sağlanıncaya kadar yani kasılma eğrisi plato çizene kadar normoksik gaz ile havalandırılmıştır ve daha sonra hipoksi uygulamasına geçilmiştir). Normoksik koşullarda prekontraksiyon sonrası elde edilen maksimum kasılma değerlerinin ortalamaları ile prekontrakte dokuda hipoksi uygulaması sonrası elde edilen maksimum kasılma değerlerinin ortalamaları alınarak, bu ortalamalar arasındaki fark hesaplandı. Bu işlem her iki toksin verilmeden önce ve verildikten sonra ayrı ayrı yapıldı. Bulunan her iki farkın (Toksine verilmesinin öncesi ve sonrası) arasındaki anlamlılığının saptanması için student's t testi kullanıldı. P<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi. Tüm hesaplamalar instat programı kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

### Kuzu İzole Pulmoner Arterlerinde Hipoksinin Etkisi

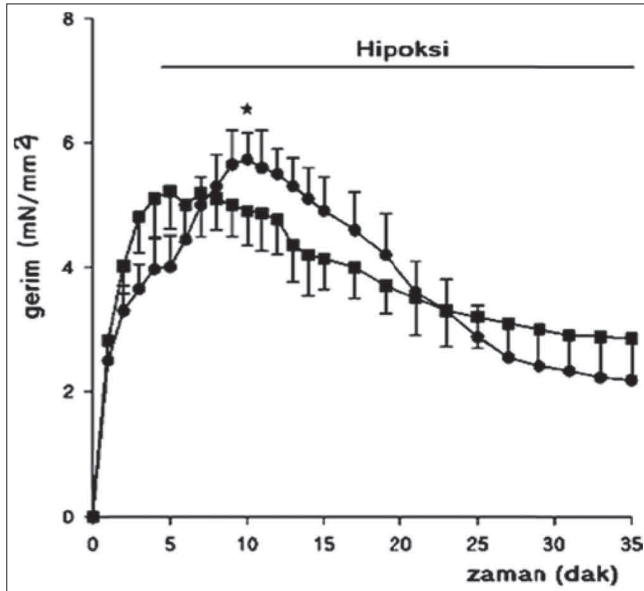
#### Dinlenme Gerimindeki Kuzu İzole Pulmoner Arterlerinde

**Hipoksinin Etkisi:** Dinlenme gerimindeki geniş çaplı izole pulmoner arterlerde hipoksiye bağlı bir gerim artışı belirlenmemiştir (Şekil 3). Bu arterlerde hipoksi boyunca  $-0.25 \pm 0.12$  N/mm<sup>2</sup> (n=10) gerim kaybı olurken, normoksi uygulaması sonunda  $-1.03 \pm 0.17$  N/mm<sup>2</sup> (n=10) gerim kaybı



**Şekil 3.** Dinlenme gerimindeki izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması; g Normoksi boyunca izole pulmoner arterlerde oluşan gerim değişikliği (n=10), nHipoksi boyunca izole pulmoner arterlerde oluşan gerim değişikliği (n=10)

**Fig 3.** Hypoxia in resting force on isolated pulmonary arteries; g Changes of force in isolated pulmonary arteries during normoxia (n=10), n Changes of force in isolated pulmonary arteries during hypoxia (n=10)



**Şekil 4.** 3 mM 5-HT ile prekontrakte edilmiş izole pulmoner arterlerde hipoksinin etkisi; g Normoksi boyunca 5-HT'nin oluşturduğu kasılma (n=10), n 5-HT ile prekontraksiyon sonrası 30 dak. hipoksi uygulaması ile oluşan HPV (n=10)

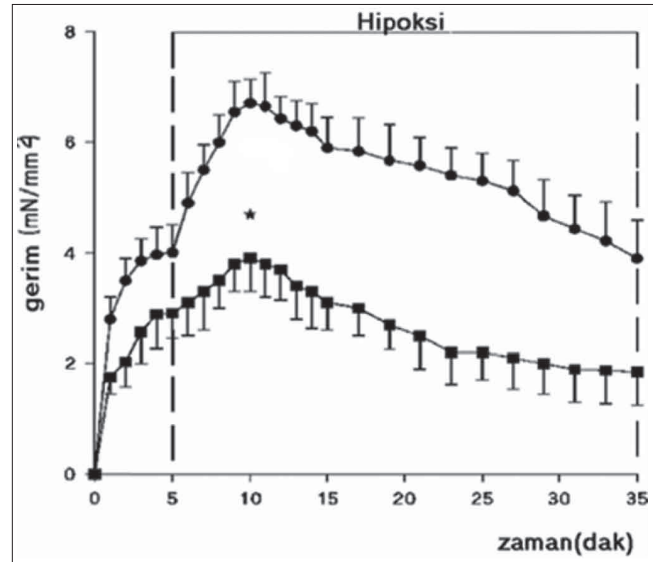
**Fig 4.** The effect of hypoxia on isolated pulmonary arteries precontracted by 3mM 5-HT: g 5-HT inuced contraction during normoxia (n=10), n Changes of force in isolated pulmonary arteries during hypoxia (n=10). HPV during 30 min hypoxia after precontracted by 3 mM 5-HT

gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

**Kuzu Prekontrakte Pulmoner Arterlerinde Hipoksinin Etkisi:** 3  $\mu$ M 5-HT ile prekontrakte edilen geniş çaplı kuzu izole pulmoner arterlerinde prekontraksiyonun platoya ulaştığı anda başlatılan ile hipoksi uygulaması (30 dak.) kontraksiyona neden olmuştur ( $1.7 \pm 0.5$  mN/mm<sup>2</sup>, n=10). Normoksi esnasında ise bu kontraksiyon  $0.10 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup> (n=10) olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4).

### Geniş Çaplı Kuzu İzole Pulmoner Arterlerinde Kolera ve Pertusis Toksininin HPV Üzerine Etkisi

**Kolera Toksininin HPV Üzerine Etkisi:** Prekontrakte kuzu izole pulmoner arterlerinde oluşan kontraksiyon ( $2.6 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>, n=6) 2 mg/ml kolera toksini varlığında inhibe olmuştur ( $1.0 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>, n=6) (Şekil 5).



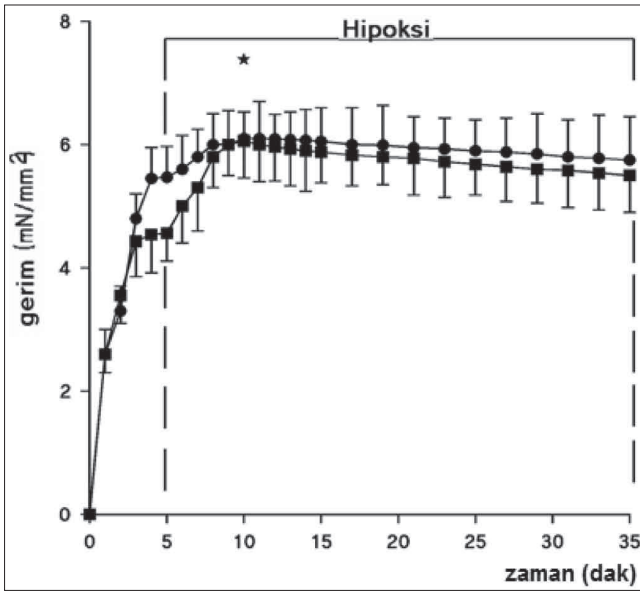
**Şekil 5.** 3 mM 5-HT ile prekontrakte edilmiş izole pulmoner arterlerde kolera toksininin HPV üzerine etkisi; g 5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6), g 2 mg/ml kolera toksini varlığında 5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6)

**Fig 5.** The effect of cholera toxin on HPV in isolated pulmonary arteries precontracted by 3 mM 5-HT; g Hypoxia application to isolated pulmonary arteries precontracted by 5-HT (n=6), n Hypoxia application to isolated pulmonary arteries precontracted by 5-HT in the presence of 2 mg/ml cholera toxin (n=6)

**Pertusis Toksininin HPV Üzerine Etkisi:** Prekontrakte pulmoner arterlerde hipoksi uygulamasına bağlı gelişen kasılma yanıtı, pertusis toksini (2 mg/ml) ile inkübe edildikten sonra potansiyalize olmuştur (sırasıyla  $0.6 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>,  $1.7 \pm 0.3$  mN/mm<sup>2</sup>, n=6) (Şekil 6).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Sunulan bu çalışmada izole pulmoner arterlerde HPV oluşum mekanizmasında G<sub>i</sub> ve G<sub>s</sub> proteinlerinin rolünü araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla önce kuzu pulmoner



**Şekil 6.** 3 mM 5-HT ile prekontrakte edilmiş izole pulmoner arterlerde pertusis toksininin HPV üzerine etkisi; n 5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6), g 2 mg/ml pertusis toksini varlığında 5-HT ile prekontrakte izole pulmoner arterlerde hipoksi uygulaması (n=6)

**Fig 6.** The effect of pertusis toxin on HPV in isolated pulmonary arteries precontracted by 3 mM 5-HT; g Hypoxia application to isolated pulmonary arteries precontracted by 5-HT (n=6), n Hypoxia application to isolated pulmonary arteries precontracted by 5-HT in the presence of 2 mg/ml pertusis toxin (n=6)

arterlerinde hipoksinin etkisi belirlenmiştir. Ardından prekontrakte pulmoner arterlerde kolera toksinine bağlı olarak HPV'nin inhibe olduğu ama pertusis toksini varlığında hipoksiye bağlı kasılmanın arttığı belirlenmiştir.

Araştırmamızda geniş çaplı pulmoner arterler kullanılmıştır ve çapları yaklaşık 3-4 mm'dir. Oysa literatürde HPV'nin asıl bölgesinin çoğunlukla dar çaplı pulmoner arterler olduğuna vurgu yapılmaktadır [14,15]. Bununla birlikte pulmoner arterlerin hipoksi ya da çeşitli vazokonstriktör mediyatörlere kasılma cevabının bölgesel farklılık gösterdiği de bilinmektedir [16]. Bu açıdan literatürdeki çalışmalarını değerlendirdiğimizde HPV'nin sunulan bu çalışmada olduğu gibi geniş çaplı pulmoner arterlerde de hatta pulmoner venlerde de oluşabildiği dikkati çekmektedir [17,18]. İzole preparatlardaki çalışmalar açısından aradaki fark dar çaplı pulmoner arterlerde genellikle prekontraksiyonun gerekmesiz hipoksiye kasılma yanıtının alınabilmesidir [19]. Diğer taraftan dinlenme gerimindeki koyun izole pulmoner arterlerinde yapılan bir çalışmada burada sunulan araştırmaya benzer şekilde geniş çaplı pulmoner arterlerde hipoksinin prekontraksiyonun olmaksızın kasılmaya neden olmadığı da gösterilmiştir [17]. Bizim bulgularımız da bu sonucu desteklemektedir. Bu konuda başka bulgular da vardır. Örneğin, 20 dak. hipoksiye maruz bırakılmış dar (0.38-0.68 mm) ve geniş çaplı (2.2-4.5 mm) insan pulmoner arterlerinde yapılan başka bir çalışmada dinlenme geriminde benzer bir hipoksik vazokonstriksiyon gözlenmiştir [20]. Pulmoner arterler içerisindeki düz kas hücreleri

değişik tiptedir. Hücrelerin büyüklüğü, biçimi, organel içeriği ve kontraktıl proteinleri farklıdır [21]. Rat aortik hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada epitelooid ve iğsi olmak üzere ilk defa iki farklı hücre yapısı ortaya konulmuştur [22]. Epitelooid hücreler vazokonstriktör cevaptan sorumludur ve  $K_{Ca}$  kanallarından zengindir.  $K_{Ca}$  kanalları hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyini artırmaktadır. ET-1 gibi vazokonstriktör ajanlar iğsi hücreleri depolarize, epitelooid hücreleri ise hiperpolarize ederek hücre içi kalsiyum düzeylerini artırmaktadır. Öküz pulmoner arterlerinde yapılan diğer bir çalışmada ise immunolojik, morfolojik ve sitoskeletal protein dağılımı açısından 4 farklı hücre fenotipi tanımlamıştır [21]. Bu çalışmalar bize hipoksiye karşı pulmoner damar yatağında neden farklı yanıtların ortaya çıktığını açıklamaktadır.

Pulmoner arterlerde hipoksinin etkisi damarın ön gerimine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle hipoksiye bağlı gelişen vazokonstriksiyonu daha kolay tespit etmek için prekontraktıl bir madde kullanımı yararlı olmaktadır. Rodman ve ark. [11] izole rat pulmoner arterleri üzerinde yaptıkları çalışmada norepinefrin, angiotensin II, fenilefrin, U46619 gibi prekontraktıl maddelerin kullanılması ile kontrol grubuna göre hipoksik vazokonstriksiyonun daha şiddetli olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada HPV'nin çeşitli türlerde sadece prekontraktıl ajan kullanımı sonrası ortaya çıktığı ileri sürülmüştür. Çalışmamızda 5-HT kasılma süresi ve büyüklüğü ile uygun profil göstermesi nedeni ile prekontraktıl agonist olarak seçilmiştir. 3  $\mu$ M 5-HT ile prekontrakte edilen geniş çaplı kuzu izole pulmoner arterlerinde 30 dak. süre ile hipoksi uygulaması kontraksiyona neden olmuştur. Bu sonuç geniş çaplı kuzu izole pulmoner arterlerinde de hipoksik vazokonstriksiyonun meydana geldiğini ve HPV'nin ortaya çıkarılması için en azından kuzu pulmoner arterlerinde prekontraktıl agoniste ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Prekontrakte agonist kullanımı HPV'nin gelişiminde asıl rolü oynamamakta sadece HPV'nin şiddetinin artırmaktadır [23].

G proteinleri reseptör aracılı sinyallere aracılık ederler ve böylece uyarana bağlı olarak hücrenin cevabının oluşumunu sağlarlar. Düz kasın kontraksiyonunda G proteinlerinin rolünü anlamaya yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, ratlarda yapılan bir çalışmada kan basıncının regülasyonunda  $G_s$  proteinleri ile ilişkili  $\alpha_1$  adrenoreseptörler sorumlu tutulmuştur [24]. İnsan koroner arterleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada adozin reseptörü içeren koroner arterlerde  $G_s$  proteini aracılığı ile vazodilatasyon meydana geldiği gösterilmiştir [25]. Düz kas kasılmasında önemli rolü olan  $K^+$  kanallarına bağlı asetilkolin, histamin gibi bazı ligand reseptörleri ile G proteini ilişkilidir [26].  $G_s$  proteini yine  $K_{Ca}$  üzerinde doğrudan etki göstererek düz kasları gevşetmektedir. Bununla beraber  $G_s$  proteini ile ilişkili olarak  $PGE_2$ , prostasiklin ve vazoaaktif intestinal peptid düz kas reseptörleri saptanmıştır [27]. Bu çalışmalar  $G_s$  proteinleri ile vasküler yapılar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Bununla birlikte HPV'de bu proteinlerin doğrudan rolü üzerine bir araştırma bulunmaktadır [28].

Bu araştırmada bizim çalışmamızda olduğu gibi CTX kullanılmış ve koyun izole pulmoner arterlerinde HPV yanıtı üzerine etkisi araştırılmıştır. CTX  $G_s$  proteininde bulunan  $\alpha$  subunitini etkileyerek bu proteinde kalıcı aktivasyona yol açmaktadır [7]. Sonuçta  $G_s$  proteininin ADP ribosilasyonunu katalize ederek adenilil siklazı aktive etmektedir [29]. Nitekim G proteinlerini aktive eden NaF varlığında da HPV inhibe olmaktadır [28]. Sonuç olarak araştırmamız kuzu izole pulmoner arterlerinde de adenilil siklaz aktivasyonunun HPV'yi inhibe ettiğini doğrulamaktadır.

Araştırmamızda HPV'nin oluşum mekanizmalarında  $G_s$  protein ile beraber  $G_i$  proteininin rolü de incelenmiştir. Bunun için  $G_i$  proteininin  $\alpha$  subunitindeki sistein rezidüsünün ribosilasyonunu katalizleyen ve  $G_i$  proteininde inaktivasyona yol açan PTX kullanılmıştır. Deneylerimizde prekontrakte dokularda izlenen hipoksik vazokonstriksiyon yanıtının PTX (2 mg/ml) ile 3 saat inkübe edildikten sonra potansiyalize olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç HPV oluşum mekanizmasında  $G_i$  proteininin rolü olabileceğini ortaya koymuştur. Bugüne kadar hipoksiye bağlı pulmoner vazokonstriksiyon yanıtında  $G_i$  proteinlerinin rolünü değerlendiren yeterli sayıda araştırma yoktur. Sweeny ve ark. nın yaptıkları bir çalışmada 5-HT ile prekontrakte edilmiş ve hipoksiye maruz bırakılmış inek pulmoner arterlerinde  $G_i$  proteininin aracılık ettiği bir mekanizma ile vasküler düz kas kasılmasını etkileyen cAMP düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir [30]. Bu araştırma sonucu bizim bulgularımızı desteklemektedir. Diğer taraftan CTX ile yaptığımız deneylerde elde ettiğimiz sonuçlarla da uyumludur. PTX duyarlı  $G_i$  proteini pulmoner dolaşım dışında birçok vasküler yatak endoteli ve düz kas hücreleri üzerinde saptanmıştır [31]. Bu proteinler düz kas kasılmasında önemli rolleri olan iyon kanallarının aktivitesini değiştirmekte ve çeşitli mediyatörlerin vasküler yapılar üzerinde oluşturdukları etkilere aracılık etmektedir. Albert ve ark. [32]  $G_i$  proteininin birden fazla potasyum kanalı için spesifik G proteini olduğunu ve hücre içine potasyum akımı sağladığını ileri sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada PTX sensitif  $G_i$  proteinleri yoluyla  $Ca^{+2}$  ve  $K^+$  kanallarında stimülasyon meydana geldiği vurgulanmıştır [25]. Rat ventrikül myositlerinde ise ventriküler  $K_{ATP}$  kanallarının  $G_i$  proteini yoluyla aktive edildiği gösterilmiştir [33]. İzole edilmiş domuz koroner arterinde NaF gibi G protein aktivatörleri ile EDRF-NO saliverilmesi artmakta ve endotel bağımlı vazodilatasyon sağlanmaktadır. PTX yoluyla bu aktivasyon engellenmektedir [34]. Köpek koroner arter endotelinde yapılan bir çalışmada serotonin reseptörleri ile ilişkili PTX sensitif G proteinleri gösterilmiştir. Yine kronik hipoksemiye maruz bırakılmış neonatal kuzu kardiyak miyositlerinde  $\beta$  adrenoseptörlerde azalma ve  $G_i$  proteinleri ile ilişkili  $M_2$  muskarinik reseptörlerin duyarlılığında artma saptanmıştır [35]. Akut hipoksiye maruz bırakılmış inek pulmoner arter adventisiasındaki fibroblastlarda  $G_i$  proteinlerinin aktive olduğu ortaya konmuştur [36]. Yapılan bu araştırmalar bizim çalışmamızda olduğu gibi hipoksinin vasküler yapılar üzerindeki etkilerine  $G_i$  proteini aracılıklı mekanizmaların da katılabilceğini göstermektedir.

Sonuç olarak kuzu izole pulmoner arterlerinde yaptığımız bu çalışma HPV'nin mekanizmasında  $G_s$  proteinlerinin rolünü bir kez daha doğrulamaktadır. Diğer taraftan  $G_i$  proteinlerinin rolü olabileceğini de ilk kez göstermektedir. Bu mekanizmaların ayrıntılarının açıklanabilmesi için başka çalışmalara gereksinim olduğu açıktır. HPV'nin mekanizmasının aydınlanması hipoksemik akciğer hastalıklarının tedavisine yeni yaklaşımlar sağlayacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına destek sağlayan Düzce Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğüne katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. **Cutaia M, Rounds S:** Hypoxic pulmonary vasoconstriction, physiologic significance, mechanism, and clinical relevance. *Chest*, 97, 706-717, 1990.
2. **Ward JP, Aaronson P:** Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: Can any be right? *Res Physiol*, 115, 261-271, 1999.
3. **Dumas JP, Bardou F, Goriand M, Dumas M:** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Gen Pharmac*, 33, 289-297, 1999.
4. **Hamm H, Gilchrist A:** Heterotrimeric G-proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 189-196, 1996.
5. **Abebe W, Edwards J, Agrawal D:** G proteins in rat blood vessels identification. *Gen Pharmac*, 26, 65-73, 1995.
6. **Mallon C:** Heterotrimeric G-proteins and development. *Biochemical Pharmacol*, 53, 1-4, 1997.
7. **Miller V, Flavan N, Vanhoutte P:** Pertussis toxin reduces endothelium-dependent and independent responses to alpha-2 adrenergic stimulation in systemic canine arteries and veins. *J Pharmacol Exp Ther*, 257, 290-293, 1991.
8. **Wanstall JC, Hughes IE, O'Donnell ER:** Evidence that nitric oxide from the endothelium attenuates inherent tone in isolated pulmonary arteries from rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*, 114, 109-144, 1995.
9. **Demiryürek AT:** *In vitro* investigation of mechanism of hypoxia in pulmonary arteries. *PhD Thesis*, University of Strathclyde Department of Physiology and Pharmacology, 1991.
10. **Keatinge WR:** Sodium flux and electrical activity of arterial smooth muscle. *J Physiol*, 194, 183-200, 1968.
11. **Rodman DM, Yamaguchi T, O'Brien R, McMurty I:** Hypoxic vasoconstriction of isolated rat pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther*, 248, 952-959, 1989.
12. **Sabouni MH, Hussain T, Cushing DJ:** G proteins subserve relaxation mediated by adenosine receptors in human coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol*, 18, 696-702, 1991.
13. **Abebe W, Edwards J, Agrawal D:** G proteins in rat blood vessels-II Assessment of functional involvement. *Gen Pharmacol*, 26, 75-83, 1995.
14. **Kato M, Staub NC:** Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circ Res*, 19, 426-439, 1966.
15. **Nagasaka Y, Bhattacharya F, Gropper MA:** Micropuncture measurement of long microvascular pressure profile during hypoxia in cats. *Circ Res*, 54, 90-95, 1984.
16. **Kemp BK, Smolich JJ, Cocs TM:** Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and vein. *Br J Pharmacol*, 21, 441-450, 1997.
17. **Uzun Ö:** İzole koyun pulmoner arter ve ven preparatlarında hipoksi ile oluşan vazokonstriksiyonun etki mekanizmasının araştırılması. *Doktora Tezi*, Gazi Üniv. Sağlık Bil. Enst., 1998.
18. **Silan C, Kuscuoğlu E, Uzun O, Balbay Ö:** Effect of resveratrol in

acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated lamb pulmonary arteries and veins. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 841-845, 2009.

**19. Demiryürek AT, Wadsworth RM, Kane KA:** Pharmacological evidence for the role of mediators in hypoxia-induced vasoconstriction in sheep isolated intrapulmonary artery rings. *Eur J Pharmacol*, 203, 1-8, 1991.

**20. Demiryürek AT, Wadsworth RM, Kane KA, Peacock J:** The role of endothelium in hypoxic constriction of human pulmonary artery rings. *Am Rev Respir Dis*, 147, 283-290, 1993.

**21. Uzun Ö, Demiryürek T, Kancık İ:** Akut hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonun mekanizması. *FABAD J Pharm Sci*, 23, 119-125, 1998.

**22. Michelakis E, Weir EK:** The pathobiology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med*, 22, 419-432, 2001.

**23. LeeYO, Seo JH, Kang BK:** Effects of hypoxia on pulmonary vascular contractility. *Yonsei Med J*, 39, 261-267, 1998.

**24. Li XF, Triggle C:** Effects of pertussis and cholera toxins on  $\alpha$ -adrenoreceptor function in rat tail artery: Differences in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*, 71, 791-799, 1995.

**25. Hussian T, Mustafa J:** Regulation of G proteins by adenosine receptor agonist in coronary artery. *Am J Physiol*, 266, 1273-1279, 1994.

**26. Billington C, Penn R:** Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res*, 4, 1-23, 2003.

**27. Adeagbo A, Malik K:** Endothelium-dependent and BRL 34915-induced vasodilatation in rat isolated perfused mesenteric arteries: Role of G-proteins. *Br J Pharmacol*, 100, 427-434, 1990.

**28. Uzun Ö, Demiryürek AT, Kancık İ:** Role of G<sub>s</sub> proteins in hypoxic constriction of sheep pulmonary artery rings. *Pharmacol*, 64, 214-216, 2002.

**29. Gilman AG:** G proteins: Transducers of receptor generated signals. *Annu Rev Biochem*, 56, 615-649, 1987.

**30. Sweeney G, Templeton AGB, Clayton RA, Baird M, Sheridan S:** Contractile responses to sumatriptan in isolated bovine pulmonary artery rings: Relationship to tone and cyclic nucleotide levels. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26, 751-760, 1995.

**31. Flavahan NA, Vanhoutte P:** G proteins and endothelial responses. *Blood Vessels*, 27, 218-229, 1990.

**32. Albert PR, Robillard L:** G protein specificity: Traffic direction required. *Cell Signal*, 14, 407-418, 2002.

**33. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L:** Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 259, 820-826, 1990.

**34. Boulanger C, Vanhoutte P:** G proteins and endothelium-dependent relaxations. *J Vasc Res*, 34, 175-185, 1997.

**35. Kacimi R, Moalic J, Aldasev A, Vatner D, Richalet J, Crozatier B:** Differential regulation of G protein expression in rat hearts exposed to chronic hypoxia. *Am J Physiol*, 269, 1865-1873, 1995.

**36. Stenmark K, Gerasimovskaya E, Nemenof R, Das M:** Hypoxic activation of adventitial fibroblasts. Role in vascular remodelling. *Chest*, 122I, 326-334, 2002.