

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE BMP ANTAGONİSTİ
OLAN GREMLİNİN PULMONER HİPERTANSİYON
HASTALIĞININ PATOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Gamze KARADAŞ DURSUN**

**Danışman
Prof. Dr. Nurhan CÜCER**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2016
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE BMP ANTAGONİSTİ
OLAN GREMLİNİN PULMONER HİPERTANSİYON
HASTALIĞININ PATOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Gamze KARADAŞ DURSUN**

**Danışman
Prof. Dr. Nurhan CÜCER**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TOA-2015-6012 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Aralık 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Gamze KARADAŞ DURSUN

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Deneyisel Hayvan Modelinde BMP Antagonisti Olan Gremlinin Pulmoner Hipertansiyon Hastalığının Patolojisindeki Rolünün Araştırılması” Adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Gamze KARADAŞ DURSUN

Danışman

Prof. Dr. Nurhan CÜCER

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

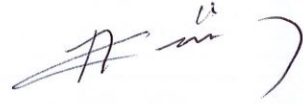
Prof. Dr. Nurhan CÜCER danışmanlığında Gamze KARADAŞ DURSUN tarafından hazırlanan “Deneyisel Hayvan Modelinde BMP Antagonisti Olan Gremlinin Pulmoner Hipertansiyon Hastalığının Patolojisindeki Rolünün Araştırılması” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

.... / ... / 2016

JÜRİ:

İmza

Danışman : Prof. Dr. Nurhan CÜCER
(ERÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)



Üye : Doç. Dr. Recep ERÖZ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet ALISARI



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemedi, bu alanda yetişebilmem için elinden gelen tüm imkanları eksiksiz sağlayan danışman hocalarım Prof. Dr. Nurhan CÜCER ve Doç. Dr. Metin AYTEKİN'e,

Tüm yüksek lisans öğrenciliğim boyunca yardımlarıyla bana destek olan ekip arkadaşlarım Muazzez DERYA ANDEDEN ve Pınar ALTIN'a,

Sevgili aileme bana verdikleri tüm emekleri ve itinaları için fedakar anneme, babama ve can kardeşime,

Son olarak tez çalışmam boyunca sabrı ve desteğiyle yanımdan ayrılmayan sevgili eşim Recep Burak DURSUN'a ve canımdan ayrılmayan kızım Cansın Umay'a,

Benimle bu yolda yürüyen ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gamze KARADAŞ DURSUN

Kayseri, Kasım 2016

DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE BMP ANTAGONİSTİ OLAN GREMLİNİN PULMONER HİPERTANSİYON HASTALIĞININ PATOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Gamze KARADAŞ DURSUN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2016
Danışman: Prof. Dr. Nurhan CÜCER**

ÖZET

Amaç: Gremlin, Kemik Morfogenetik Protein (BMP)’lere bağlanarak ligandların hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasına engel olan bir antagonist proteindir. Bu çalışmadaki hipotezimiz, İdiyopatik Pulmoner Arter Hipertansiyon (IPAH) vasküler hücrelerinde gremlinin BMP2 sinyaline alternatif veya/birlikte VEGFR2 sinyal yolağı aracılığıyla anjiyogenezi ve proliferasyonu stimüle ettiğini göstermekir. Çalışmamızın amacı Pulmoner Arter Hipertansiyonu (PAH) rat modelinde oluşturarak Gremlin ve VEGFR2 seviyelerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 48 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. İki gruba ayrılan ratlardan Grup 1 kontrol grubu olup normaksi şartları sağlandı. Grup 2 ise PAH grubu olup Sugren-5416 enjekte edilerek hipoksik şartlar altında çalışmayı tamamladı. Öncelikle kateterizasyon işlemi yapılarak pulmoner arter basınçları (PAB) ölçüldü. Her iki gruptan alınan akciğer ve kan örnekleriyle, mRNA ekspresyonu, western blot analizi ve immunohistokimyasal boyamalar yapılarak Gremlin ve VEGFR2 seviyeleri belirlendi. İstatistiksel analizler için JMP versiyon: 5.0.1.2 programı kullanıldı.

Bulgular: PAH rat modelinde PAB değerleri kontrollere göre yüksek bulundu [PAP mmHg, Ort±SS: PAH 19.03±1.77, kontrol 10.58±0.40, p=0.00012]. Gremlin mRNA ekspresyon seviyeleri PAH’lı ratlarda kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05). VEGFR2 mRNA ekspresyon seviyeleri PAH ve kontroller karşılaştırıldıklarında anlamlı bir fark görülmedi. Plazma Gremlin seviyesi PAH’lı ratlarda kontrollere göre yüksek bulundu. Gremlin kan plazma seviyesi (ng/mL), [ortalama±standart sapma PAH 15.0 ± 2.1, kontrol 11.6 ± 2.8 p<0.01]. Plazma VEGFR2 ekspresyon seviyeleri PAH ve kontroller karşılaştırıldıklarında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark bulunmadı. [VEGF kan plazma seviyesi (ug/mL), ortalama±standart sapma PAH 78.2 ± 18.6 , kontrol 63.9 ± 32.3 $p=0.68$]. Gremlin protein ekspresyonu PAH'lı ratlarda kontrollere göre artış gösterdiği görülürken VEGFR2 de bir fark gözlemlenmemiştir. İmmunohistokimyasal boyama ile damar lümeni üzerinde Gremlin ve VEGFR2 antikoru PAH ve kontrollerde relatif olarak gösterilmiştir.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında Sugen 5416 PAH rat modeli VEGFR proteini bloke edildiğinde BMP antagonisti olan Gremlinin VEGFR2'den bağımsız olarak PAH'da yüksek bulunmasıdır. Bu durum pulmoner hipertansiyon hastalığının patolojisinde BMP antagonisti olan Gremlinin rolü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: BMP, Gremlin, pulmoner arter hipertansiyonu (PAH), BMP antagonisti

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF BMP ANTAGONIST GREMLIN ON
THE PATHOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION DISEASE IN
EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL**

Gamze KARADAŞ DURSUN

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
M.Sc. Thesis, Desember 2016
Supervisor: Prof. Dr. Nurhan CÜCER**

ABSTRACT

Aim: Gremlin was an antagonist protein which inhibits ligands to bind cell surface receptors via binding Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). In this study, our hypothesis is that in IPAH vascular cells gremlin stimulates angiogenesis or proliferation together with BMP2 signaling or alternative of BMP2 signaling via VEGFR2 signal pathway. Aim of our study was to create Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) rat models and to assess Gremlin and VEGFR2 levels in created models.

Materials and Methods: In our study, 48 Sprague Dawly male rats were used. Rats were divided into two groups. Normoxic conditions were provided to Group 1, the control group. Sugen-5416 was injected to Group 2, PAH group, and Group 2 completed the study under hypoxic conditions. Initially, pulmonary arterial pressures (PAPs) were measured by catheterization. Gremlin and VEGFR2 levels were assessed by using mRNA expression, Western Blot Analysis and immunohistochemical staining with lung and blood samples which was taken from both groups. JMP version 5.0.1.2 program was used for statistical analyses.

Results: In PAH rat models, PAP scores were found higher compared to controls [PAP mmHg, $m \pm SD$: PAH $19,03 \pm 1.77$, control: 10.58 ± 0.40 , $p=0.00012$]. Gremlin mRNA expression levels in PAH rat models were found significantly higher compared to controls ($p < 0.05$). When expression levels between PAH rat models and controls were compared, a significant difference wasn't detected. In PAH rat models plasma Gremlin level was found higher compared to controls [Gremlin blood plasma level (ng/ml), $mean \pm SD$, PAH: 15.0 ± 2.1 , controls: 11.6 ± 2.8 , $p < 0.01$]. When plasma VEGFR2

expression levels between PAH rat models and controls were compared, a statistically significant difference wasn't detected [VEGFR2 blood plasma level (ng/ml), mean $\pm$ SD, PAH: 78.2 $\pm$ 18.6, control:63.9 $\pm$ 32.3, p=0,68]. While in Gremlin protein expression an increasement was shown in PAH rat models compared to controls, a difference wasn't detected in VEGFR2. In PAH and controls, Gremlin and VEGFR2 antibodies on vein lumens were shown relatively by immunohistochemical staining.

Conclusion: When the results which have gained are assessed, in PAH, BMP antagonist Gremlin is found higher independent from VEGFR2 since Sugan 5416 PAH rat models VEGFR is blocked. It is shown that in pathology of pulmonary hypertension disease, BMP antagonist Gremlin can have a role.

Key Words: BMP, Gremlin, pulmonary arterial hypertension (PAH), BMP antagonist.

İÇİNDEKİLER

DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE BMP ANTAGONİSTİ OLAN GREMLİNİN PULMONER HİPERTANSİYON HASTALIĞININ PATOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR	xiv
TABLolar LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pulmoner Arter Hipertansiyonu.....	4
2.1.1. Sınıflandırılması.....	4
2.1.2. Prevalansı	4
2.1.3. Belirtileri	5
2.1.4. Tanı Yöntemleri	6
2.1.4.1. Elektrokardiyografi (EKG).....	6
2.1.4.2. Toraks Grafisi	6
2.1.4.3. Solunum Fonksiyon Testleri (SFT)	6
2.1.4.4. Ekokardiyografi	6
2.1.4.5. Ventilasyon/Perfüzyon Akciğer Sintigrafisi.....	7
2.1.4.6. Egzersiz Kapasitesi.....	7
2.1.4.7. Sağ Kalp Kateterizasyonu (SKK) Ve Vazoreaktivite.....	7

2.1.4.8. Biyomarkerler	8
2.1.5. Tanısal Yaklaşım.....	9
2.1.6. Tedavisi	10
2.1.6.1. Destek Tedavileri.....	10
2.1.6.1.1. Oksijen	10
2.1.6.1.2. Diüretikler	11
2.1.6.1.3. Digoksin	11
2.1.6.2. Özgül İlaç Tedavileri	11
2.1.6.2.1. Kalsiyum Kanal Blokerleri (KKB)	11
2.1.6.2.2. Prostanoidler	11
2.1.6.2.3. Endotelin Reseptör Antagonistleri (ERA)	12
2.1.6.2.4. Fosfodiesteraz tip-5 inhibitörleri.....	13
2.1.7. Patofizyolojisi	14
2.1.8. Genetiği	17
2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	17
2.3. BMP II Mutasyonları	19
2.4. BMP ve Gremlin.....	21
2.5. PAH ve Gremlin	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Hayvan Modeli Oluşturma	24
3.2. mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçülmesi	25
3.2.1. RNA İzolasyonu.....	25
3.2.1.1. Roche High Pure RNA kit protokolü	25
3.2.1.1.1. Kit içeriği	25
3.2.1.1.2. Haricen Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar	26
3.2.1.1.3. Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	26
3.2.1.1.4. Deney Protokolü	26
3.2.2. cDNA Sentezi.....	28
3.2.2.1. Haricen Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar	28

3.2.2.2. Kit Protokolü	28
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	31
3.2.4.1. Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar.....	31
3.2.4.2. Deney Protokolü	31
3.2.5. RT-PCR.....	32
3.3. Western Blot Analizi	33
3.3.1. Protein Lizatı Hazırlama	33
3.3.2. Gerekli Malzemeler ve Teçhizatlar	33
3.3.3. Deney protokolü.....	34
3.3.4. Bradford Methodu	34
3.3.5. Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar	34
3.3.6. Protein Lizatlarının Jel Elektroforezi İçin Hazırlanması	35
3.3.7. Jel Elektroforezi	35
3.3.8. Elektrotansfer İşlemi.....	37
3.3.9. Bloklama	37
3.3.10. Antikor İnkübasyonu.....	38
3.3.11. Görüntüleme İşlemi.....	39
3.4. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).....	39
3.4.1. Gremlin için ELISA	39
3.4.1.1. Kit İçeriği.....	39
3.4.1.2. Gerekli Malzemeler	39
3.4.1.3. Deney Protokolü	40
3.4.2. VEGFR2 için ELISA	41
3.4.2.1. Kit İçeriği.....	41
3.4.2.2. Gerekli Malzemeler	41
3.4.2.3. Deney Protokolü	42
3.5. İmmunohistokimyasal Boyama	42

4. BULGULAR	45
4.1. Hayvan Modeli Oluşturma	45
4.2. mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçölmesi	45
4.3. Western Blot Analizi	48
4.4. ELISA	50
4.5. İmmunohistokimyasal Boyama	51
5. TARTIşMA VE SONUÇ	53
6. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİş	74

KISALTMALAR

AHA	: American Heart Association
BDH	: Bağ Dokusu Hastalığı
BMP	: Kemik Morfogenetik Protein
BMPR	: Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü
BNP	: Beyin Natriüretik Peptit
cDNA	: complementary Deoxyribo Nucleic Acide
cGMP	: cyclic Guanosine Monophosphate
CRP	: C-Reaktif Protein
DAB	: Diamino benzidin
DAN	: Differential Screening Selected Gene Abbrative in Neuroblastoma
DLCO	: Akciğer Karbon Monoksit Difüzyon Kapasitesi
dH₂O	: distile Hidrojen monoksit
DKH	: Doğumsal Kalp Hastalığı
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EKG	: Elektrokardiyografi
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ET-1	: Endotelin-1
ESC	: Avrupa Kardiyoloji Derneği
ERA	: Endotelin Reseptör Antagonisti
ERS	: Avrupa Solunum Derneği
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FPAH	: Familyal Pulmoner Arter Hipertansiyonu
HbA_{1c}	: Hemogloblin A _{1c}
H&E	: Hematoksilen & Eozin

HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HRP	: Horseradish Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IPAH	: İdiyopatik Pulmoner Arter Hipertansiyonu
KGA	: Kan Gazı Analizi
KKB	: Kalsiyum Kanal Blokeri
KPAH	: Kronik Pulmoner Arter Hipertansiyonu
KPET	: Kardiyopulmoner Egzersiz Testi
KTEPH	: Kronik Troboembolik Pulmoner Hipertansiyonu
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NO	: Nitrik Oksit
Oligo dT	: Oligo deoksitimin
PA	: Pulmoner Anjiyografi
PAB	: Pulmoner Arter Basıncı
PAH	: Pulmoner Arter Hipertansiyonu
PAKB	: Pulmoner Atrial Kan Basıncı
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PEA	: Pulmoner Endarterektomi
PFT	: Pulmoner Fonksiyon Testi
PH	: Pulmoner Hipertansiyon
PKH	: Pulmoner Kapiller Hemanjiomatosiz
PKUB	: Pulmoner Kapiller Uç Basıncı
PTX3	: Pentaksin 3
PVD	: Pulmoner Vasküler Direnç
PVDF	: Polyvinylidene difluoride
PVR	: Pulmoner Vasküler Rezistans

PVOH	: Pulmoner Venooklüziv Hastalık
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RNASin	: Ribonükleaz inhibitörü
RT-PCR	: Real Time Polymeraz Zincir Reaksiyonu
RTase	: Reverse transkriptaz
SA	: Sağ Atrial
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SFT	: Solunum Fonksiyon Testi
SKK	: Sağ Kalp Kateterizasyonu
SPAB	: Sistolik Pulmoner Arter Basıncı
SV	: Sağ Ventrikül
TBE	: Tris-Borik asit-Edta
TBS-T	: Tris Buffered Saline-Tween
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
THALES	: Turkish Congenital Heart Disease Pulmonary Hypertension Study
TY	: Triküspit Yetersizliği
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü
V/P	: Ventilasyon/Perfüzyon
YÇBT	: Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi
6-DYT	: 6 Dakika Yürüme Testi
6-DYM	: 6 Dakika Yürüme Mesafesi
α – SMA	: Smooth Muscle Actin
μg	: Mikrogram
ul	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Pulmoner arter hipertansiyonunun klinik sınıflandırılması.....	3
Tablo 2.2. Pulmoner arter hipertansiyonun fonksiyonel sınıflandırılması	5
Tablo 2.3. BMP Çeşitleri ve Fonksiyonları	21
Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması	24
Tablo 3.2. Her bir örnek için oluşturulan cDNA karışımı.....	29
Tablo 3.3. Her bir örnek için hazırlanan PCR karışımı	29
Tablo 3.4. Her bir örnek için oluşturulan RT-PCR karışımı	32
Tablo 3.5. Protein konsantrasyon ölçümü için standart dilüsyonları	34
Tablo 3.6. Her bir jel için oluşturulan karışımlar	35
Tablo 3.7. Birbirinden eşit oranda seyreltilerek elde edilen standart konsantrasyonları	40
Tablo 3.8. Birbirinden eşit oranda seyreltilerek elde edilen standart konsantrasyonları	42
Tablo 3.9. Doku takip aşamaları.....	43
Tablo 3.10. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Pulmoner hipertansiyon için tanısal yaklaşımı.....	9
Şekil 2.2. Sağlıklı ve PAH' lı arter formasyonu.	14
Şekil 2.3. PAH' lı damar lümeni	16
Şekil 2.4. BMP Sinyal Yolağı	19
Şekil 2.5. BMP Sinyal Yolağı Anjiyogenik Dengesi.....	20
Şekil 2.6. BMP antagonisti Gremlin ile ilişkisi	22
Şekil 4.1. Deney Gruplarının PAB' ları.....	45
Şekil 4.2. Gremlin ve GAPDH PCR görüntüleri..	46
Şekil 4.3. Gremlin mRNA ekspresyonu	47
Şekil 4.4. VEGFR2 ekspresyon seviyeleri.....	47
Şekil 4.5. VEGFR2 mRNA ekspresyonları Real Time RT-PCR ile değerlendirilmesi .	48
Şekil 4.6. VEGF reseptör ve Gremlin antikorları kullanılarak western blot analizleriyle protein seviye ölçümleri	49
Şekil 4.7. PAH' lı ve sağlıklı ratlardan elde edilen kan plazmalarından Gremlin proteinini için ELISA analizi.....	50
Şekil 4.8. PAH' lı ve sağlıklı ratlardan elde edilen kan plazmalarından VEGF proteinini için ELISA analizi.....	51
Şekil 4.9. İmmunohistokimyasal boyamalar	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipotez: İPAH vasküler hücrelerinde gremlinin BMP2 sinyaline alternatif veya/birlikte VEGFR2 sinyal yolağı aracılığıyla anjiyogenezi ve proliferasyonu stimüle eder.

Amaç: PAH rat modeli oluşturmak ve akciğer dokularında ve plazmada Gremlin ve VEGFR2 seviyelerini belirlemek.

Pulmoner arter hipertansiyonu kardiyak kateterizasyon ile belirlenen dinlenme halinde pulmoner arter basıncında (PAB) ≥ 25 mmHg veya efor sırasında PAB > 30 mmHg artış şeklinde tanımlanan, kardiyopulmoner bozukluklara sebep olarak, hastaların pulmoner arterlerinde belirgin vazokonstriksiyon, vasküler yeniden şekillenme (remodeling) ve trombozla ilerleyen bir tablo seyrederek ve ileri aşamalarda sağ kalp yetmezliğiyle beraber ölümle sonuçlanır (1, 2)

Proje süresince öncelikli hedefimiz pulmoner arter rat modeli oluşturma ve oluşturulan modelde BMP antagonisti olan Gremlinin ve VEGFR2'nin akciğer dokularında ve plazmada seviyelerini belirlemektir. Çalışmamız pulmoner arter hipertansiyon mekanizmasını ve patofizyolojisini anlayabilmek ve tedavi yolları üretebilmek adına bizlere ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pulmoner Arter Hipertansiyonu

Pulmoner arter hipertansiyonu (PAH) ilk kez Ernst Von Romberg tarafından 1891 yılında tanımlanmıştır (3). Yıllar içinde tıbbın ilerlemesi sonucunda hastalığın patogenezi, epidemiyolojisi ve tedavisiyle ilgili bilgiler artmış ve 1891’de ortaya atılan bu tanım genişletilmiş ve sınıflandırılmıştır.

Şu an ki tanımıyla pulmoner arter hipertansiyonu, kardiyak kateterizasyon ile belirlenen dinlenme halinde pulmoner arter basıncında (PAB) ≥ 25 mmHg veya efor sırasında PAB > 30 mmHg artış şeklinde tanımlanan, kardiyopulmoner bozukluklara sebep olarak sağ ventriküler yetersizlik sonucu erken ölümle sonuçlanan progresif bir hastalıktır (1, 2, 4). PAH, ortalama pulmoner arter basıncı 25-35 mmHg arasında olduğunda hafif, 35-45 mmHg arası olduğunda orta, 45 mmHg’nın üzerinde olduğunda ise ağır PAH olarak gruplandırılır (5). Sistolik pulmoner arter basıncına göre de 36-49 mmHg arası hafif, 50-69 mmHg arası orta ve 70 mmHg ve üzeri ise ciddi PAH olarak sınıflandırılmaktadır (6, 7).

PAH hastalarının pulmoner arterlerinde belirgin vazokonstraksiyon, vasküler yeniden şekillenme (remodeling) ve trombozla ilerleyen bir tablo seyrederek ve ileri aşamalarda sağ kalp yetmezliği sonucu ölüme sebebiyet verir (1).

2.1.1. Sınıflandırılması

Pulmoner hipertansiyonun etiyolojisinde akciğer, kalp ve sistemik kökenli farklı hastalıklar ya da nedeni belli olmayan sebepler etkili olabilmektedir. 2009 yılında yapılan klinik sınıflandırma Simonneau ve arkadaşları tarafından yayımlanmıştır (8). Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) ve Avrupa Solunum Derneği (ERS) tarafından kabul edilen bu klinik sınıflandırma, iki yılda bir toplanan bilimsel kurul tarafından gerekli

görüldükçe güncellenmektedir. En son 2015 yılında kabul gören en güncel sınıflandırma Tablo 2.1'deki gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Pulmoner arter hipertansiyonunun klinik sınıflandırılması (8)

1. Grup: Pulmoner arteriyel hipertansiyon 1.1. İdiyopatik 1.2. Kalıtsal 1.2.1. BMPR2 mutasyonu 1.2.2. Diğer mutasyonlar 1.3. İlaç ve toksinlere bağlı 1.4. İlişkili hastalıklar 1.4.1. Bağ dokusu hastalıkları 1.4.2. HIV enfeksiyonu 1.4.3. Portal hipertansiyon 1.4.4. Konjenital kalp hastalığı 1.4.5. Şistozomiazis
2. Grup: Sol kalp hastalığına bağlı pulmoner hipertansiyon 2.1. Sistolik disfonksiyon 2.2. Diyastolik disfonksiyon 2.3. Kapak hastalıkları 2.4. Konjenital giriş/çıkış yolu darlığı ve konjenital kardiyomiyopatiler 2.5. Konjenital/edinilmiş pulmoner ven stenoz
3. Grup: Akciğer hastalıklarına ve/veya hipoksiye bağlı pulmoner hipertansiyon 3.1. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı 3.2. İnterstisyel akciğer hastalıkları 3.3. Karışık obstrüktif ve restriktif paterne sahip diğer akciğer hastalıkları 3.4. Uykuda solunum bozukluğu 3.5. Alveolar hipoventilasyon bozuklukları 3.6. Uzun süre yüksek rakıma maruziyet 3.7. Gelişme bozuklukları
4. Grup: Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon ve diğer pulmoner arter tıkanıklıkları 4.1. Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon 4.2. Diğer pulmoner arter tıkanıklıkları 4.2.1. Anjiyosarkom 4.2.2. Diğer intravasküler tümörler 4.2.3. Arteritler 4.2.4. Konjenital pulmoner arteriyel darlık 4.2.5. Parazitler (Hidatikler)
5. Grup: Sebebi bilinmeyen/multifaktöriyel pulmoner hipertansiyon 5.1. Hematolojik bozukluklar: kronik hemolitik anemi miyeloproliferatif hastalıklar, splenektomi 5.2. Sistemik hastalıklar: sarkoidoz, pulmoner histiyositoz, lenfanjiyoliyomatozis nörofibromatozis 5.3. Metabolik bozukluklar: glikojen depo hastalıkları, Gaucher hastalığı, tiroid hastalıkları 5.4. Diğer: pulmoner tümöral trombotik mikroanjiyopati, fibröz mediastinit, diyaliz alan/almayan kronik böbrek yetersizliği, segmenter pulmoner hipertansiyon.

2.1.2. Prevalansı

PAH nadir görülen bir hastalıktır. Endüstriyelleşmiş ülkelerde milyonda 1-2 olguya rastlanılabileceği tahmin edilmektedir (9, 10). Pulmoner hipertansiyon hastalığının ortalama hayatta kalma süresi 2.8 yıl olarak belirlenmiş ve ortalama 36.4 yaşlarında görülen PAH'ın 1.7/1.0 oranında kadınlarda daha sık görüldüğü saptanmıştır (9). Bu genel dağılımın ırklara göre de değişmediği görülmüştür (9, 11).

Farklı PAH gruplarının görülme sıklığına dair karşılaştırmalı epidemiyolojik veriler mevcut değildir. Bir ekokardiyografi laboratuvarında yapılan çalışmada, 4579 hastada PAH prevalansının (sistolik pulmoner arter basıncının (sPAB) > 40 mmHg) %10.5 olduğu gösterilmiştir. PAH saptanan 483 olgunun %78.7'sinde sol kalp hastalığı (Grup 2), %9.7'sinde akciğer hastalıkları ve hipoksi (Grup 3), %4.2'sinde PAH (Grup 1), %0.6'sında kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon (KTEPH) (Grup 4) saptanmış, %6.8'inde ise herhangi bir tanı konulamamıştır (12). Fransa'da yapılan bir araştırmada PAH hastalarının %39,2'sinde idiyopatik pulmoner arter hipertansiyon (İPAH) saptandığı, %3.9'unda da aile öyküsünde PAH olduğu bildirilmektedir. Akciğer hastalıklarına bağlı gelişen pulmoner arter hipertansiyonu (APAH) grubundaki hastaların %15.3'ünde bağ dokusu hastalığı (esas olarak sistemik skleroz), %11.3'ünde doğumsal kalp hastalığı (DKH), %10.4'ünde portal hipertansiyon, %9.5'inde iştah baskılayıcı ilaçlara bağlı PAH, %6.2'sinde ise insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV) enfeksiyonu yer almaktadır (11). PAH prevalansı yalnızca sklerodermada iyi bir şekilde tanımlanmıştır ve görülme sıklığı %7-12 arasında değişmektedir (13, 14).

Türkiye'de PAH epidemiyolojisine ilişkin geniş kapsamlı ilk veri olan "Turkish Congenital Heart Disease Pulmonary Hypertension Study" (THALES) çalışması, 2012 yılında Los Angeles'ta düzenlenen Amerikan Kalp Derneği (AHA) bilimsel toplantısında bildirilmiştir. Çalışmada 3 ay ile 79 yaş arasında, %58'i kadın 1034 DKH ilişkili PAH hastası incelenmiş ve bu hastaların %48.6'sında Eisenmenger sendromu saptanmıştır (15). Yapılan başka bir çalışmada ise PAH tanısı kesinleşen 70 hastanın yaş ortalaması 47±16 yıl ve %61'i kadın iken, DKH %27, KTEPH %24, BDH (sistemik skleroz) %14, İPAH %8, sol ventrikül diyastolik işlev bozukluğuna bağlı PAH %3, akciğer patolojileri %3, pulmoner venooklüzif hastalık (PVOH) %2, portal hipertansiyon %1 ve HIV enfeksiyonu %1 oranında bildirilmiştir (16).

2.1.3. Belirtileri

PAH belirtileri spesifik değildir ve hastalarda soluksuz kalma, halsizlik, bitkinlik, anjina, senkop ve karında gerginlik gibi yakınmalar görülebilir (9). Pulmoner hipertansiyonun fizik muayene bulguları arasında; sol parasternal kayma, ikinci kalp sesinin pulmoner bileşeninde şiddetlenme, triküspit yetersizliğine (TY) bağlı pansistolik üfürüm, pulmoner yetersizliğe bağlı diyastolik üfürüm ve sağ ventriküle ait üçüncü bir kalp sesi duyulur. İleri evrelerde jugular venöz dolgunluk, hepatomegali, periferik ödem, sağ kalp yetersizliği belirtileri bulgularına ulaşılabilir (1, 17). Bu belirtiler göz önüne alındığında hastanın tanı sonrası fonksiyonel sınıflandırması yapılarak klinik bir fikirde bulunulur (Tablo 2).

Tablo 2.2. Pulmoner arter hipertansiyonun fonksiyonel sınıflandırılması (18).

Sınıf 1	Pulmoner hipertansiyonu olan ancak buna bağlı fiziksel aktivite kısıtlanması olmayan hasta grubudur. Olağan fiziksel aktiviteler sonucunda beklenenin üzerinde dispne ya da halsizlik, göğüs ağrısı ya da bayılma hissine neden olmaz.
Sınıf 2	Pulmoner hipertansiyonu olan ve buna bağlı hafif fiziksel aktivite kısıtlanması olan hastalar. Hasta dinlenme sırasında rahattır. Olağan fiziksel aktiviteler sonucunda beklenenin üzerinde dispne ya da halsizlik, göğüs ağrısı ya da bayılma hissine neden olur.
Sınıf 3	Pulmoner hipertansiyonu olan ve buna bağlı belirgin fiziksel aktivite kısıtlanması olan hastalar. Hasta dinlenme sırasında rahattır. Olağan düzeyin altında fiziksel aktivite sonucunda beklenenin üzerinde dispne ya da halsizlik, göğüs ağrısı ya da bayılma hissine neden olur.
Sınıf 4	Pulmoner hipertansiyonu olan ve semptomlar gelişmeden hiçbir fiziksel aktivitede bulunamayan hastalar. Bu hastalarda sağ kalp yetersizliği bulguları vardır. Dispne ve/veya halsizlik dinlenme sırasında bile gözlemlenebilir. Her türlü fiziksel aktivitede rahatsızlık artar.

2.1.4. Tanı Yöntemleri

2.1.4.1. Elektrokardiyografi (EKG)

EKG’de sağ ventrikül hipertrofi, yüklenme (strain) ve sağ atriyal (SA) dilatasyon tespiti PAH’ı düşündüren bulgulardır. İPAH hastalarının %87’sinde EKG’de sağ ventrikül hipertrofisi, %79’unda ise sağ aks deviasyonu bulunmaktadır (9). Bu bulguların olmaması PAH’ı dışlayamayacağı gibi, şiddetli hemodinamik anormallik olmadığı kanısını doğurmaz. EKG düşük duyarlılık %55 ve özgüllük %70 oranları nedeniyle PAH’ın saptanmasında tarama testi olarak kabul edilmez. Ventriküler aritmiler nadir olarak izlenirken, ileri evrelerde atriyal flutter, atriyal fibrilasyon gibi supraventriküler aritmiler saptanabilir ve bunlar klinik tablonun ağırlaştığının göstergesidir (19).

2.1.4.2. Toraks Grafisi

İPAH hastalarının %90’ında tanı sırasında toraks grafisi anormaldir. Santral pulmoner arterlerde genişleme ve periferik kan damarlarında kayıplar izlenir. İleri olgularda SA’da ve SV’de genişleme görülebilir. PAH’ın şiddeti, radyolojik anormalliklerin boyutuyla doğru orantılı değildir (9).

2.1.4.3. Solunum Fonksiyon Testleri (SFT)

Solunum fonksiyon testleri ve arteriyel kan gazı analizi, altta yatan havayolu ya da akciğer parankim hastalığının pulmoner hipertansiyon gelişmesine katkısını gösterir. Pulmoner arteriyel hipertansiyon hastalarında genellikle karbon monoksit difüzyon kapasitesi düşük (tipik olarak beklenenin %40-80’i arasında) olarak bulunurken, akciğer volümlerinde hafif-orta derecede azalma saptanır (20, 21).

2.1.4.4. Ekokardiyografi

Ekokardiyografi PAH’ın belirlenmesinde önemli bir konumdadır. PAH’dan şüphelenilen hastalarda mutlaka ekokardiyografi uygulanmalıdır (7). Ekokardiyografi, pulmoner basınçların invaziv olmayan bir yöntemle ölçülebilmesinin yanı sıra, PAH’a sebebiyet verebilecek sol kalp hastalıklarının saptanmasında ve PAH’ın yol açtığı SV yük artışının, SV ve SA yapısal ve fonksiyonel değişikliklerinin ortaya konmasını sağlar.

2.1.4.5. Ventilasyon/Perfüzyon Akciğer Sintigrafisi

Tedavi edilme olasılığı olan KTEPH hastalarını belirlemek için, PAH hastalarına ventilasyon/perfüzyon akciğer sintigrafisi yapılmalıdır. Duyarlılığı bilgisayarlı tomografiden daha yüksek olduğu için, KTEPH'te ventilasyon/perfüzyon sintigrafisi tercih edilmektedir (22).

2.1.4.6. Egzersiz Kapasitesi

Hastalarda egzersiz kapasitesini değerlendirmek için 6 dakika yürüme testi (6-DYT) ve kardiyopulmoner egzersiz testi (KPET) kullanılmaktadır. 6-DYT teknik açıdan basit, ucuz, tekrarlanabilir ve büyük hasta gruplarına uygulanabilir bir testtir (23). Test sırasında yürünen mesafe ölçümünün yanında, efor dispnesi, oksijen satürasyonu ve koldan ölçülen arteriyal basınç kaydedilmektedir. Yapılan ilk çalışmalar, sağ kalımın yanı sıra bazal 6 dakika yürüme mesafesi (6-DYM) ve hemodinamik parametreler arasında anlamlı bir ilişki göstermiştir (24). PAH tedavisiyle ilgili hemen hemen tüm önemli klinik çalışmalarda, birincil sonlanma noktası kullanılmıştır (25). Yürüme mesafesinin; 332 metrenin (24) bazı makalelerde ise 250 metrenin (26) altında olması ve %10'un üzerinde oksijen desatürasyonu, PAH hastalarında olumsuz prognozu ifade etmektedir (27). Bu testin vücut ağırlığı, cinsiyet, boy, yaş ve hasta motivasyonundan etkilenmesi sebebiyle PAH altgruplarındaki yeterliliği kesinleşmemiştir. Kardiyopulmoner egzersiz testinde her basamakta sürekli olarak gaz değişimi ve ventilasyon kaydedilmektedir. Aynı zamanda sağ kalp kateterizasyonu ve Doppler ekokardiyografi birlikte değerlendirilmelidir (23).

2.1.4.7. Sağ Kalp Kateterizasyonu Ve Vazoreaktivite

PAH tanısını kesinleştirmek, hemodinamik anormallikleri saptamak ve pulmoner dolaşımın vazoreaktivitesini test etmek amacıyla sağ kalp kateterizasyonu (SKK) yapılmaktadır. SKK ile PAB (sistolik, diyastolik ve ortalama), sağ atrial basıncı, pulmoner kapiller uç basıncı (PKUB) ve sağ ventriküler basınç ölçülür ve kaydedilir. Kalp debisi 3 kez ölçülür ve ölçüm için genellikle termodilüsyon veya Fick yöntemi, bazen de biyoempedans yöntemi kullanılır. Pulmoner vasküler direncin (PVD) belirlenmesi için vena cava superior, pulmoner arter (PA) ve sistemik arter kanlarında oksijen satürasyonu belirlenmelidir. SKK ile ortalama PAB'ın ≥ 25 mmHg, PVD'nin >3 Wü (Wood ünite) üzerinde olması PAH tanısını kesinleştirir. Pulmoner kapiller uç

basıncı (PKUB) ≤ 15 mmHg olduğunda prekapiller PAH, PKUB >15 mmHg olduğunda ise postkapiller PAH tanısı konur (6).

PAH tanısı konulmak üzere SKK yapılırken, uzun vadeli kalsiyum kanal blokeri (KKB) tedavisinden fayda görecektir hastaları saptamak için vazoreaktivite testi uygulanır (28, 29). Akut vazodilatör testinde kısa etkili, güvenli ve kolay uygulanabilen, sistemik etkileri olmayan ya da sınırlı olan ilaçlar kullanılmalıdır. Bu amaçla en yaygın tercih edilen ajan (NO) nitrik oksittir (28). NO dışındaki seçenekler ise intravenöz epoprostenol veya intravenöz adenosin (sistemik vazodilatör etki riski bulunur) olabilir (30).

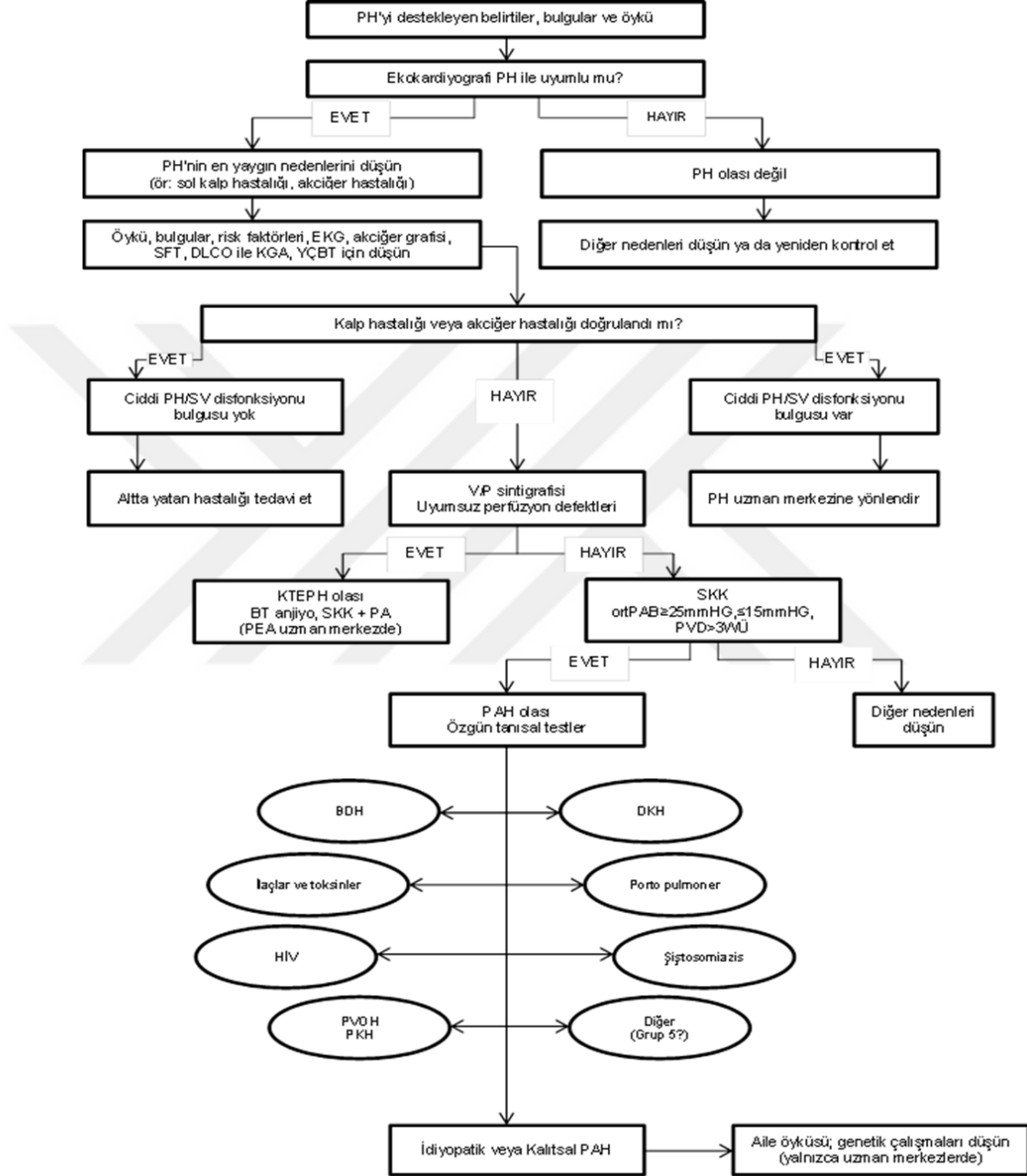
2.1.4.8. Biyomarkerler

Tüm PAH hastalarına rutin olarak biyokimya, hematoloji, immunoloji ve tiroid işlev testleri uygulanmaktadır. Bu testler altta yatan başka bir hastalığın varlığını tespit etmeye ya da PAH'ın kesin tanısında yardımcı olmaktadır. PAH tanısında özellikle dikkate alınması gereken bazı moleküller bulunmaktadır. Ayrıca PAH hastalığının mortalitesinde bilgi verecek olan son yıllarda çalışılmış biyomarkerler bulunmaktadır (31).

Yapılan çalışmalar yüksek plazma BNP (beyin natriuretik peptid) seviyelerinin şiddetli PAH ile korelasyon gösterdiğini belirtmiştir. Bu veriler PAH hastalarının pulmoner arter basıncında, pulmoner vasküler dirençte ve ortalama sağ arter basıncında analiz edilmiştir (32, 33). Yapılan bir diğer çalışmada ET-1'in (endotelin), 6 DYT, PVD ve kardiyak indeks ile aynı oranda güçlü korelasyon gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (34). İnsülin direnci bulunan PAH hastalarında PAH ve glikoz intoleransı arasında ilişki olduğu saptanmıştır (35, 36). Buna ek olarak HbA1c'nin (hemogloblin A1c) PAH hastalarında anlamlı artış göstermesi hastalığın seyrinde bir biyomarker olarak kullanılabileceğini göstermiştir (37). PAH hastalarında NO eksikliği bilinen bir durumdur. Araştırmalar NO ve reaksiyon ürünlerinin nefes ve idrar ölçümlerinde kontrollere göre daha düşük olduğunu göstermiştir (38). Dolayısıyla PAH'ın ilerlemesinin göstergesi olarak nefes nitrik oksit ölçümleri takip edilebilir bir biyomarker olarak işlev görmektedir. Araştırmalar göstermiştir ki, Pentraksin 3 (PTX3) molekülü spesifik bir PAH biyomarkeridir. 50 PAH hastasıyla yapılan bir çalışmada PTX3, BNP ve CRP (C-Reaktif Protein) molekülleri plazma seviyelerinde

incelendiğinde, PTX3'ün diğerlerine oranla bağ dokusu hastalıklarında daha iyi bir belirteç olduğu gösterilmiştir (39).

2.1.5. Tanısal Yaklaşım



Şekil 2.1. Pulmoner hipertansiyon için tanısal yaklaşım (40)

KGA: Kan gazı analizi; **DKH:** Doğumsal kalp hastalığı; **BDH:** Bağ dokusu hastalığı; **KTEPH:** Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon; **DLCO:** Akciğerlerin karbon monoksit difüzyon kapasitesi; **EKG:** Elektrokardiyogram; **YÇBT:** Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi; **PA:** Pulmoner anjiyografi; **PAH:** Pulmoner arteriyel hipertansiyon; **PAKB:** Pulmoner arteriyel kan basıncı; **PKH:** Pulmoner kapiller hemanjiyomatozis; **PEA:** Pulmoner endarterektomi; **PFT:** Pulmoner fonksiyon testi; **PH:** Pulmoner hipertansiyon; **PVOH:** Pulmoner venooklüzif hastalık; **PVR:** Pulmoner vasküler rezistans; **SKK:** Sağ kalp kateterizasyonu; **SV:** Sağ ventrikül; **V/P:** Ventilasyon/perfüzyon; **x-ışını:** Göğüs radyogramı

2.1.6. Tedavisi

Son yıllarda PAH tedavisi ile ilgili ilaç çalışmaları önemli başarılar kaydetmiş ve ilaçlar ruhsatlandırılarak klinik kullanıma sunulmuştur. Yakın zamanda yine diğer bazı ilaçlarda ruhsatlandırılacaktır. Verilen ilaç tedavileriyle hastaların klinik seyrinde olumlu yönde değişimler gözlenmektedir. Hastalığın tedavisi için rehabilitasyon hizmetleri, destek ve kombinasyon tedavileri, özgül ilaç tedavisiyle birleştirilerek hastanın hastalıkla mücadelesi sağlanmalıdır. Ayrıca hastalar hafif soluksuz kalmayı tolere edecek şekilde spor yapmalıdır.

Yapılan bir çalışmada egzersiz programı yürüten hastaların egzersiz kapasitelerini arttırdıkları gözlemlenmiştir. PAH'ın ileri evrelerinde efordan kaçınan hastalarda kas kayıpları görülmüş, bu sorunun semptomların elverdiği ölçüde aktif hareket ederek giderilebileceği sonucuna varılmıştır (41).

Başka bir çalışmada ise PAH hastalarında gebeliğin %30–50 mortaliteyle bağlantılı olduğu bildirildiğinden gebe kalmanın PAH hastalığını şiddetlendirdiğine dair uzmanlar görüş birliğine varmışlardır (42).

PAH hastalarının enfeksiyon hastalıklarına karşı duyarlılığı olup, hastaların %7'sinin ölüm nedeni enfeksiyon hastalıklarıdır. Kontrollü çalışmalar bulunmamakla beraber enfeksiyonlara karşı aşılama önerilmektedir (9).

Çoğu PAH hastasında gelişen anksiyete ve depresyon yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir. Bu sebepten ötürü PAH hastalarına psikososyal destek sağlanmalıdır. Hastaların ve ailelerinin destek gruplarına katılmaya teşvik edilmesi, hastalıkla baş etme, özgüven ve geleceğe bakış açılarından yararlı katkılar sağlayabilmektedir (41).

2.1.6.1. Destek Tedavileri

2.1.6.1.1. Oksijen

PAH hastalarına oksijen uygulanması pulmoner vasküler direncin azaldığını gösterebilir, PAH olgularında uzun süreli oksijen tedavisinin olumlu etkiler gösterdiğine dair bir çalışma yoktur. Hekimler PAH hastalarına oksijen uygulama konusunda şüpheli

davranmakla beraber, ayaktan oksijen alan hastaların semptomlarında olumlu gelişmeler gözlenmiştir (9).

2.1.6.1.2. Diüretikler

Sağ kalp hasarı bulunan hastalarda diüretiklerin olumlu etkisi analiz edilmemiştir. Ancak PAH hastalarında periferik ödemin tedavisinde kullanılmaktadır. Kullanan çoğu hastanın ödemlerinde ve nefes darlıklarında azalma kaydedilmiştir (43).

2.1.6.1.3. Digoksin

Digoksin'in İPAH hastalarında akut olarak kalp debisini iyileştirdiği gösterilmiştir fakat, uzun süreli tedavilerde etkinliği henüz bilinmemektedir. PAH hastalarında gözlenen atriyal taşiaritmilerin tedavisinde, ventrikül hızını yavaşlatmak amaçlı digoksin kullanılabilir (44).

2.1.6.2. Özgül İlaç Tedavileri

2.1.6.2.1. Kalsiyum Kanal Blokerleri (KKB)

Sadece İPAH, KPAH ve anoreksijeniklere bağlı PAH hastalarına yapılan vazoreaktivite testi sonucu pozitif saptanan olgulara KKB başlanması önerilmektedir. Vazoreaktivite testi pozitif saptanan İPAH hastalarının yaklaşık yarısının uzun süreli KKB tedavisinden fayda gördüğü bildirilmiştir (28, 29). Bu amaçla en çok kullanılan ajanlar nifedipin, diltiazem ve daha az olarak amlodipindir. Bu ajanların İPAH'ta etkinliği gösterilmiş dozları hastadan hastaya değişkenlik göstermektedir. Tedavi başladıktan 3-4 ay sonra yeterli klinik yanıt elde edilemez ise tedaviye diğer spesifik ilaçlar eklenmelidir. Vazoreaktivite testi uygulanamayan ya da negatif yanıt alınan olgularda oluşabilecek şiddetli yan etkiler nedeniyle (hipotansiyon, senkop ve sağ ventrikül yetersizliği gibi) KKB verilmesi önerilmez (29).

2.1.6.2.2. Prostanoidler

Prostasiklin, endotel hücreleri tarafından üretilen ve bütün damar yataklarında güçlü vazodilatasyona neden olan bir bileşiktir. PAH patogeneğinde, endotel disfonksiyonu sonucunda azalan prostasiklin sentezine bağlı olarak yeterli vazodilatatör etki oluşmamaktadır. PAH tedavisinde, bu etki mekanizmasından yola çıkılarak prostasiklin

analogları kullanılmaktadır. Güncel tedavide kullanılan prostasiklin analoglar arasında; beraprost, epoprostenol, iloprost ve treprostinil yer almaktadır (45).

Bunlardan ilki olan Beraprost kimyasal açıdan stabil ve oral yoldan aktif olan ilk prostasiklin analogudur. Yapılan çalışmalarda egzersiz kapasitesinde kısa süreli (3-6 ay) düzelme izlenirken, hemodinamik yarar sağlanmadığı görülmüştür (46).

Bir diğer prostasiklin analogu Epoprostenol'un yarılanma ömrü 3-5 dakikadır ve kateter aracılığıyla sürekli infüzyon şeklinde uygulanır. İPAH ve skleroderma ilişkili PAH hastalarının dahil edildiği üç randomize klinik çalışmada semptomlarda iyileşme, egzersiz kapasitesinde artış ve hemodinamik iyileşmeler bildirilmiştir (47). Bir diğer çalışmada ise İPAH hastalarında sağ kalımı olumlu etkilediği gösterilmiştir ve bu özelliğe sahip olan PAH için kullanılan ilk spesifik ajanıdır (48).

İloprost stabil formda prostasiklin analogudur. İntravenöz, inhaler ve oral formları mevcuttur. En sık görülen yan etki kızarma ve çene ağrısıdır. Iloprost ile yapılmış çalışmalarda hastaların egzersiz kapasitesi, semptomlar, PVD ve klinik olaylarda iyileşme olduğu gösterilmiştir (49).

Kullanılan diğer bir ajan Treprostinildir. Epoprostenol'un bir trisiklik benzidin analogudur ve kimyasal yapısı oda sıcaklığında uygulamaya yetecek ölçüde stabildir. Treprostinil ile yapılmış dünya çapında en geniş randomize klinik çalışmada egzersiz kapasitesinde, hemodinamik durum ve semptomlarda iyileşme sağlandığı gösterilmiştir (50).

2.1.6.2.3. Endotelin Reseptör Antagonistleri (ERA)

PAH hastalarında plazmada ve akciğer dokusunda endotelin sisteminin aktive olduğu gösterilmiştir. Endotelin-1, pulmoner vasküler düz kas hücrelerinde iki ayrı reseptör izoformu olan endotelin-A ve endotelin-B reseptörlerine bağlanarak vazokonstriktör ve mitojen etkiler yaratır. PAH tedavisinde bu reseptörlere bağlanarak endotelin-1'in etkisini nötralize eden ilaçlar arasında; bosentan, ambrisentan, macitentan ve sitaksentan yer almaktadır (51).

Ambrisentan endotelin-A reseptörü için seçici, propanoik asit sınıfından sülfonamid olmayan bir ERA'dır. Ambrisentan bir pilot ve iki randomize klinik çalışmada

değerlendirilmiş ve İPAH, BDH ve HIV enfeksiyonu ilişkili PAH hastalarında semptomların, egzersiz kapasitesinin, hemodinamik durumun ve klinik tablonun kötüleşmesine kadar geçen süre bakımından etkili olduğu gösterilmiştir. Karaciğer toksisitesi diğer ERA'lara göre daha düşük olmakla birlikte, hastalarda periferik ödem artmıştır (52).

Sitaksentan oral yoldan etkili seçici bir endotelin-A reseptör antagonistidir. İPAH, BDH ve DKH ilişkili PAH hastaları üzerinde yapılan iki randomize klinik çalışmada, egzersiz kapasitesinde artış ve hemodinamik iyileşmeler gösterilse de yüksek oranda karaciğer toksisitesi izlenmesi nedeniyle 2010 yılında piyasadan geri çekilmiştir (53).

Bosentan oral yoldan aktive olan çifte endotelin-A ve endotelin-B reseptör antagonistidir ve bu sınıftan sentezlenen ilk moleküldür. Bosentan beş randomize klinik çalışmada PAH (İPAH, BDH ve Eisenmenger ile ilişkili PAH) hastalarında değerlendirilmiş ve egzersiz kapasitesi, fonksiyonel sınıf, hemodinamik durum, ekokardiyografi ve Doppler değişkenleri ve klinik tablonun ağırlaşmasına kadar geçen süre bakımından düzelme sağladığı gösterilmiştir (54-56).

2.1.6.2.4. Fosfodiesteraz tip-5 inhibitörleri

cGMP (siklik guanozin monofosfat) yıkımından sorumlu enzim olan fosfodiesteraz tip-5 inhibisyonu, bu enzimin eksprese edildiği yerlerde NO/cGMP yolu üzerinden vazodilatasyona yol açmaktadır. Akciğerlerdeki damarlarda bol miktarda fosfodiesteraz tip-5 bulunduğu için, PAH'ta fosfodiesteraz tip-5 inhibitörlerinin potansiyel klinik yararları araştırılmıştır. Ayrıca, fosfodiesteraz tip-5 inhibitörleri antiproliferatif etki yapmaktadır (57, 58). Fosfodiesteraz tip-5 inhibitörleri olan sildenafil, tadalafil ve vardenafilin üçü de, önemli düzeylerde pulmoner vazodilatasyona neden olmaktadır (58).

Sildenafil oral yoldan aktif, güçlü bir seçici fosfodiesteraz tip-5 inhibitörüdür. Kontrol uygulanmayan bir dizi çalışmada, sildenafilin İPAH'ta ve BDH, DKH ve KTEPH ile bağlantılı PAH'ta olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (59-61). 278 PAH hastasını kapsayan bir randomize klinik çalışmada; egzersiz kapasitesi, semptomlar ve hemodinamik durumda iyileşme olduğu doğrulanmıştır (62).

Tadalafil günümüzde erektil işlev bozukluğu tedavisi için onaylanmış, günde bir kez uygulanan seçici bir fosfodiesteraz tip-5 inhibitörüdür. Günde bir kez 5, 10, 20, ya da 40 mg tadalafil uygulanan 406 PAH hastasının (yaklaşık %50'sine ayrıca bosentan tedavisi) değerlendirildiği bir randomize klinik çalışmada, en yüksek dozda egzersiz kapasitesi, semptomlar, hemodinamik durum ve klinik tablonun ağırlaşmasına kadar geçen süre bakımından olumlu sonuçlar elde edilmiştir (63).

Vardenafil günde iki doz alınan bir diğer fosfodiesteraz tip-5 inhibitörüdür. Yapılan bir çalışmada, vardenafil ile tedavi edilen 66 PAH hastasında günde iki doz 5 mg vardenafilin egzersiz kapasitesi, hemodinamikler ve klinik kötüleşme 26 zamanı üzerinde olumlu sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir. Yan etki profili sildenafil ile benzer olan ilaç, henüz PAH tedavisi için onay almamıştır (64).

2.1.7. Patofizyolojisi

Pulmoner dolaşım; düşük basınçlı, akım hızı yüksek ve düşük vasküler dirence karşı çalışan bir sistemdir. PAH'da normalde ince olan pulmoner arter duvarları kalınlaşır ve pulmoner arter lümeni daralır. Bunlara bağlı olarak pulmoner direnç ve arter basınçları artar, sağ ventrikül yetersizliği gelişir (65). Pulmoner vasküler direncin artışı; distal pulmoner arterlerde medial hipertrofi, tunika intima proliferatif ve fibrotik değişiklikler, perivasküler inflamatuvar infiltrasyon, vazokonstriksiyon, trombozis, adventisyal kalınlaşma ve sonuç olarak pulmoner damarlarda remodeling denilen yeniden yapılanmaya sebep olmaktadır (6). PAH'ın tüm tiplerinde ortak bazı histolojik özellikler vardır (Şekil 2.2).

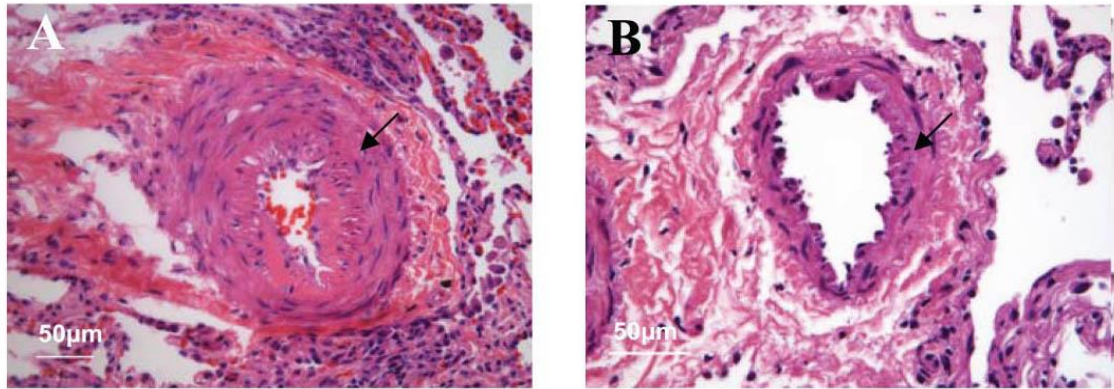


Şekil 2.2. Sağlıklı ve PAH'lı arter formaasyonu. A. Sağlıklı pulmoner arterde damar formasyonu B. Damar direnci gelişen ve kan akımı azalan damar formasyonu C. Damar duvarı hasar gören ve kan akımının yavaşladığı damar formasyonu (66).

Bunlar arasında; tunika intimal fibrozis, vasküler düz kas hücrelerinin distal lokalizasyon, hücre çoğalması ile pulmoner arteriyel tıkanmadır. Bunlara ek olarak, ağır PAH formlarında “neointima” adı verilen ekstrasellüler matriksin ve miyofibroblastların artmış birikimi ile karakterize lezyonlar izlenmektedir. Daha ileri evrelerde damar lümenini daraltan, endotel-benzeri hücrelerin artmış proliferasyonu ile karakterize pleksiform lezyonlar görülür (67, 68). Organize olmayan bu yeni damarlanma %80 oranında idiyopatik pulmoner hipertansiyonda görülürken, ikincil PH ancak çok ileri evrelerdeki hastalık tablosunda görülebilir. Ayrıca pulmoner arteriollerin intima, media, adventisya tabakalarında inflamatuvar hücre infiltrasyonu da mevcuttur (Şekil 2.3).

Pulmoner damarlarda remodeling (yeniden yapılanma) şu şekilde gerçekleşir. Endotel, damar duvarının bir tabakasıdır ve hemodinamik değişikliklerin gerçekleştiği ara birimdir. Endotelde hasara bağlı hücresel farklılaşma ve çoğalmanın dışında, endotel geçirgenliği ve metabolizmasının bozulması, büyüme faktörlerinin artışı ve koagülasyon yolunun etkilenmesi de söz konusudur. Tüm uyaranlara bağlı olarak (hipoksi, artmış kan akımı, ilaçlar, toksinler) hipertansif pulmoner dolaşımdaki endotel kaynaklı vazokonstriktör mediyatörler ve büyüme faktörleri artarken, vazodilatörler ve çoğalmayı engelleyen mediatörler azalır, böylece damar yeniden yapılanmasıyla başlar ve bu da pulmoner damarlarda hipertansif durumun sürdürülmesine sebep olur (68).

Damarın tunika intimasında bulunan düz kas hücreleri; Pulmoner hipertansiyon oluşumu sırasında hipertrofiye uğrar, çoğalır, göç eder ve bağ dokusu artışıyla yapısı değişir. Proksimalde yer alan ve daha büyük olan damarlarda hipertrofi yapısal değişikliklerden sorumlu temel mekanizmayken daha distalde, küçük ve dirençli damarlarda hiperplazi ana patolojidir. Pulmoner arter düz kas hücrelerindeki DNA sentezi ve fibroblastlardaki kollajen yapımı artar (69).



Şekil 2.3. PAH'lı damar lümeni. A. Kalınlaşmış ve pleksiform lezyon görülen damar lümeni B. Sağlıklı damar duvarı (31)

Damarın tunika adventiyasında bulunan fibroblastların çoğalmasının pulmoner hipertansiyona bağlı yeniden yapılanmada etkin bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca adventisya tabakasında α -SMA (smooth muscle actin) kontraktil proteininde artış olduğu da saptanmıştır (70).

Pulmoner hipertansiyon sürecinde elastin ve kollajen depolanması artmaktadır. Mikrovasküler yatakta tip IV kollajen ve elastin endotel hücreleri tarafından sentezlenirken büyük çaplı damarlarda düz kas hücreleri ve fibroblastlar sırasıyla tunika media ve tunika adventisyadan kollajen ve elastin sentezler. Bağ dokusunda kollajen ve elastin bir taraftan yapılırken diğer taraftan yıkılır ve böylece denge korunur. Bağ dokusunu parçalayan enzimler matriks metalloproteinazlar (kollajenazlar ve elastazlar), bu enzimleri dengeleyen ve parçalanmayı yavaşlatan grup ise doku matriks metalloproteinaz inhibitörleridir (70, 71).

Patofizyolojisinde birçok sebep yer almasına rağmen en önemli mekanizma ilerleyici endotelial hücre işlev bozukluğudur. Endotel hücrelerinin vasküler düz kas hücrelerine farklılaşmasıyla birlikte çeşitli araçların salınımı veya araçlar arası dengenin bozulması gibi faktörler PAH'ın gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Vasküler endotelium vasküler tonusu, hemostazisi, kemotaksisi, vasküler komponentlerin büyüme, farklılaşma ve hasarlara verilen cevabı düzenleyen nontrombojenik yarı geçirgen bir bariyerdir (72). Pulmoner vasküler direncin düşük tutulmasında ve bunun sürdürülmesinde primer fonksiyonu pulmoner vasküler endotelium yapar. Endotelial hücreler vasküler fonksiyonlarda major regülatörlerdir. Endotelial disfonksiyon ile vazokonstriktörlere karşı vazodilatör salınımı, düz kas hücrelerinin büyüme ve yer

değiştirmelerine karşı inhibisyon, protrombotik mediatörlere karşı antitrombotik mediatör üretimi ve proinflamatuvar aktiviteye karşı antinflamatuvar aktivite arasındaki denge bozulur (6). Bu düzenlemenin yapılmasında vazodilatörler (prostasiklin ve nitrik oksit), vazokonstriktörler (endotelin-1, tromboksan A2, serotonin), mitojenlere karşı büyüme inhibitörleri, protrombotik mediatörlere karşı antitrombotikler arasında kompleks bir denge söz konusudur. Bu dengenin vazokonstriktör lehine bozulması PAH'a neden olur. PAH hastalarında bu sebeple prostasiklin ve NO sentaz azalmışken Tromboksan A2 ve Endotelin 1 artmıştır (73).

2.1.8. Genetiği

Familiyal pulmoner arteriyel hipertansiyon (FPAH) ilk kez 1954 yılında Dresdale tarafından gündeme getirildi (74). İnsidansı düşük olan bu hastalığın bazı bilim insanlarınca düşük penetrans göstermesinden kaynaklandığı düşünölmekteydi (75). 1997 yılında araştırmacılar familiyal primer pulmoner hipertansiyon için bir geni, 2q31-32 kromozom lokasyonunda buldular (76, 77). Ardından kemik morfogenetik proteinleri reseptörünü [Bone (kemik) morfogenetik protein reseptörü tip 2 (BMP2)] şifreleyen gende bulunan mutasyonlar, genetik PAH'ın ana sebebi olarak tanımlandı (78). Bu mutasyonlar ayrıca FPAH'lı hastaların %70'inde, sporadik olan idiyopatik PAH'lı hastaların %26'sında ve fenfluramin kullanan PAH'lı hastaların % 9'unda tespit edilmiştir (78-80). Apoptoz ve proliferasyon ile ilişkili olan BMP2, TGF- β ailesinin bir üyesi olup (80, 81), halen BMP2 sinyalindeki azalmanın nasıl PAH'a sebep olduğu tam olarak aydınlatılmış değildir (81).

2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF damar endotel hücrelerine özğü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. Ferrara ve Henzel, 1989'da endotel hücre mitojeni olarak tanımladıkları faktörü VEGF olarak isimlendirmişlerdir (82). Remodelingde rol oynayan faktörlerden biri de vazokonstriksiyondur. Vazokonstriksiyon intimal tabakada artış, fibrozis, in-situ tromboz ve pleksojenik değişikliklerle kendini gösterir. Vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) aşırı eksprese edilmesi; endotelial hücre, makrofajlar ve vasküler düz kas hücrelerinin spesifik olarak artışına bu da yeniden modellemeye sebep olan bir durumdur (83).

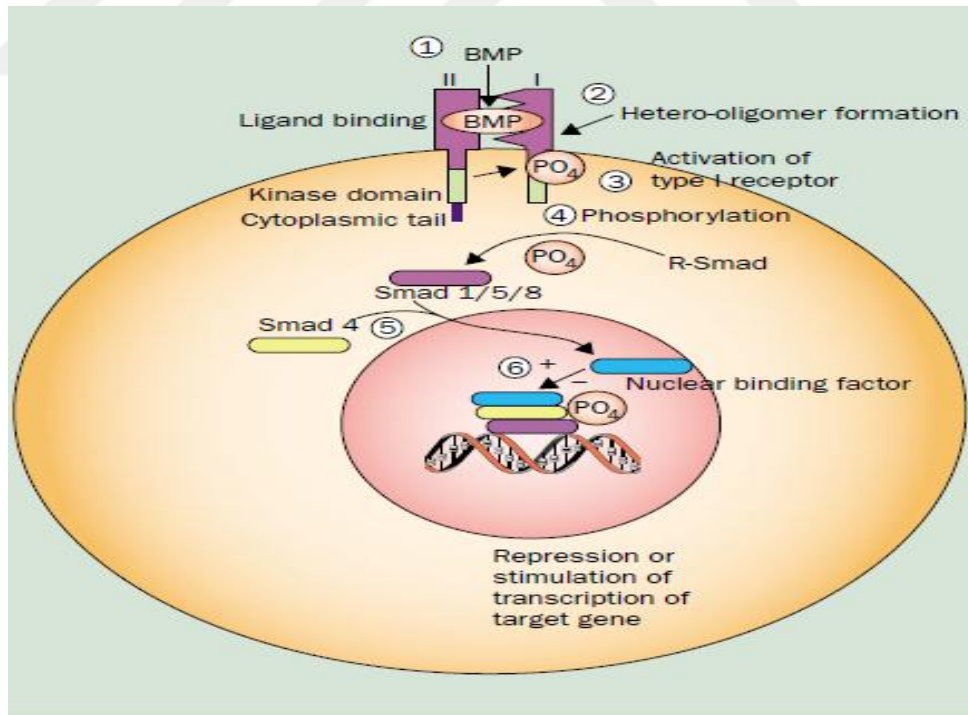
VEGF endotel hücrelerinin proliferasyonuna ve migrasyonuna sebep olur. Bu büyüme faktörü, özellikle anjiyogenezde kritik rol oynar. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır (84). VEGF gen ailesi içinde; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plakental büyüme faktörü, VEGF-E ve VEGF-F olmak üzere 7 VEGF yeri tanımlanmıştır. Temel olarak anjiogenez, lenfanjiogenez ve damar geçirgenliğini düzenleyen bu faktörlerin tanımlanan VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır. VEGF biyoaktivitesini VEGFR-1 ve VEGFR-2 isimli tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile gösterir. VEGF izoformlarından VEGF-A'nın PH gelişiminde koruyucu rolü olduğunu gösteren ve pulmoner vasküler yeniden yapılanmada VEGF-B'nin sorumlu olduğunu destekleyen hayvan modelli çalışmalar bulunmaktadır (85). VEGFR2 (Flk-1/KDR) VEGF-A'nın mitojenik, anjiyogenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. Endotel hücre büyümesi, farklılaşması, göçü ve tübül oluşumunu düzenler (86).

İdiyopatik PAH olgularında VEGFR-1 ekspresyonu artmışken, pleksiform lezyonlarda VEGFR-2 eksprese edildiği gösterilmiştir (87). VEGFR2 (Flk 1/KDR) VEGF-A'nın mitojenik, anjiyogenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. Endotel hücre büyümesi, farklılaşması, göçü ve tübül oluşumunu düzenler (86). Yapılan çalışmalarda SUGEN 5416 verilerek VEGFR2 bloke edilen ve hipoksiye maruz bırakılan ratlarda şiddetli PAH gelişmiştir (88). VEGF ve VEGFR2 ve ekspresyonu TGF- β sinyal yolağındaki bir mutasyonu işaret ederek akciğerlerde pleksiform lezyonlara sebebiyet verir (89).

VEGF, endotel hücrelerine ek olarak hemopoetik kök hücrelerde, megakaryositlerde, retina öncü hücrelerinde, damar düz kas hücrelerinde ve bazı tümör hücrelerinde (küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, nöroblastoma, meme ve mide kanserleri) bulunur. Diğer bilinen büyüme faktörlerinden platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insulin benzeri büyüme faktörü -1 (IGF-1) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) de vasküler yeniden şekillenme ve PH gelişiminde rol oynadığı düşünülen moleküller arasında sayılmaktadırlar (90).

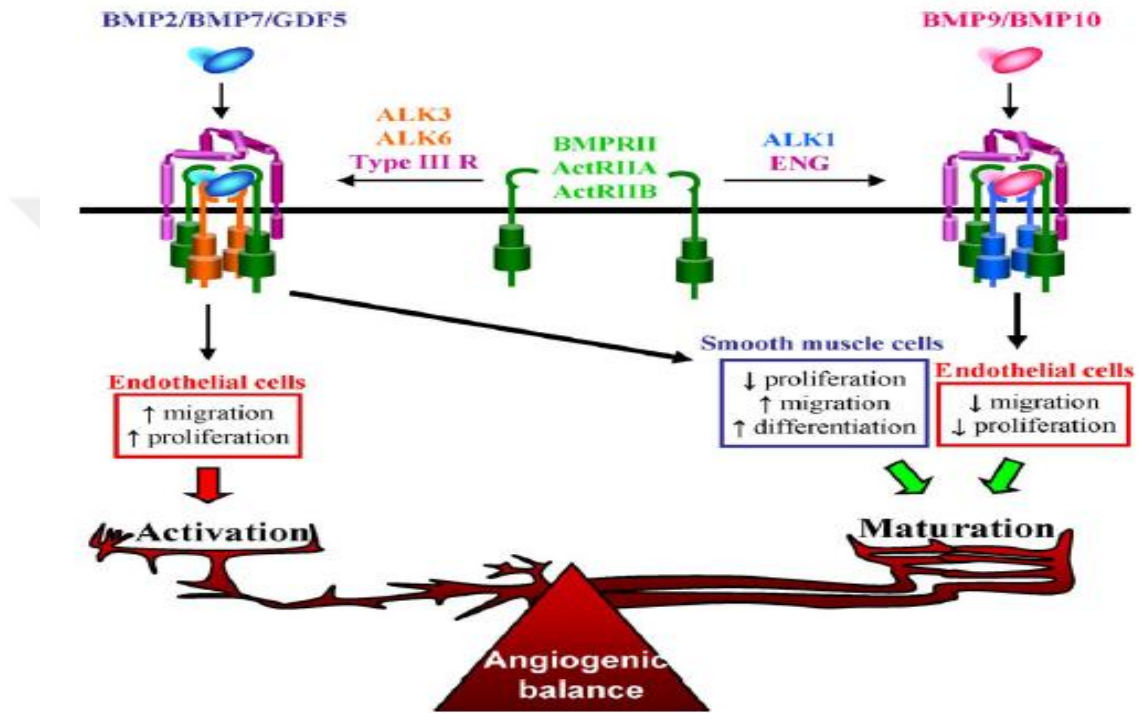
2.3. Kemik Morfogenetik Protein Reseptör Tip II Mutasyonları

PAH'ın oluşma sebebi tam olarak bilinmemekle beraber, kalıtsal PAH olguları üzerine yapılan genetik çalışmalarda bazı genetik bozuklukların patogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir (91). Transforme edici büyüme faktör (TGF- β) ailesi, hücre proliferasyonu ve migrasyonu, hücre, farklılaşması, apoptoz, hücre dışı matriks salgısı ve depolanması gibi işlevlerde rol alan sitokin büyüme faktörlerini içermektedir. TGF- β ailesi; TGF- β izoformları (TGF- β 1, β 2, β 3), kemik morfogenetik protein (BMP), aktivin ve büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi değişik fonksiyonlarda görev alan mediyatörleri içerir. Kemik morfogenetik protein tip II reseptöründeki (BMPR II) mutasyonlar PAH'ın ciddiyetinin göstergesi olarak gelişmektedir. BMPR II'deki mutasyonlar bir veya daha fazla akrabası etkilenmiş olan bireylerin (kalıtsal PAH) %70'den fazlasında ve idiyopatik PAH hastalarının %11-40'ında bildirilmiştir (80, 92). BMPR II geni dört fonksiyonel alandan oluşmaktadır: ligand bağlayan, kinaz, transmembran ve sitoplazmik alanlar (Şekil 2.4) (92).



Şekil 2.4 BMP Sinyal Yolağı. BMPR II/BMPR I reseptör kompleksi aktive olduğu zaman Smad ailesini de içine alan sayısız sitoplazmik mediatörlerin fosforilasyonuna sebep olur. Smad proteinlerinden 1, 5 ve 8 fosforlanır ve translokasyon için Smad 4 ile kompleks oluşturarak hücre içinde gen transkripsiyonu gerçekleşir (93).

Smad sinyal yolu hücrenin büyümesinin inhibisyonu ve apoptozisi uyarması ile ilişkilidir. TGF- β sinyal yolağındaki mutasyon hücreyi apoptoza götürmez tam tersine hücrenin büyümesi ve çoğalmasını tetikler. BMP sinyalizasyonunun azalması pulmoner dolaşımda apoptotik mekanizmaların veya antiproliferatif etkinin bozulmasına yol açar (Şekil 2.5) (94).



Şekil 2.5. BMP Sinyal Yolağı Anjiyogenik Dengesi. BMP alt gruplarının endotel hücrelerinde ve düz kas hücrelerindeki görevleri farklılık gösterir. BMP sinyalizasyonundaki bir mutasyon proliferatif etkiyi ve dolayısıyla anjiyogenik dengeyi tamamen değiştirebilir. Dengenin bozulması ise hastalıkların oluşmasına zemin hazırlar (95).

Pulmoner dolaşımı etkileyen örneğin; serotonin ve reseptör taşıyıcıları, tromboksan A2, endotelin ve reseptörleri gibi bir çok vazoaktif bileşeni kodlayan genlerde anormallik olması, viral enfeksiyonlar, hipoksiye kronik maruziyet gibi dış uyaranlar PAH oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (96). Bu da BMPRII'deki mutasyonun veya reseptörlerindeki disfonksiyonun ve Smad proteinlerin sinyal iletimindeki yetersizliklerinin tek başına PAH oluşumunu tetikleyemeyeceğini göstermektedir (97). Yapılan deneysel çalışmalarda idiyopatik PAH' ın yanı sıra hipoksemik PAH olgularında da BMPRII mutasyonlarının rolü olduğu belirtilmektedir (98).

2.4. BMP ve Gremlin

BMP ilk olarak 1965 yılında bir ortopedi cerrahı olan Marshall Urist tarafından keşfedildi ve 1979 yılında izole edildi (99, 100). Kemik morfogenetik proteinleri, büyüme faktörleri grubundan TGF- β süperaillesinin yapısal ve fonksiyonel üyeleridir. Embriyogenez sırasında, embriyonik vücut planı oluşturulması (101), hücre apoptozisi (102), sinir hücrelerinin farklılaşması (103, 104), organogenez sırasında epitelyal-mezenkimal etkileşimleri düzenlemek gibi birçok görevleri vardır. BMP'ler ayrıca osteojenik olmayan yapıların gelişimine katkıda bulunur. Nöral indüksiyon ile ektodermal hücrelerin farklılaşmasının belirlenmesinde ilk adımı temsil etmektedirler (105). BMP'ler 30 kDa ağırlığındaki homodimerik proteinlerdir (106). Yaklaşık olarak 20 BMP çeşidi vardır ve bunlardan fonksiyonları bilinenler Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

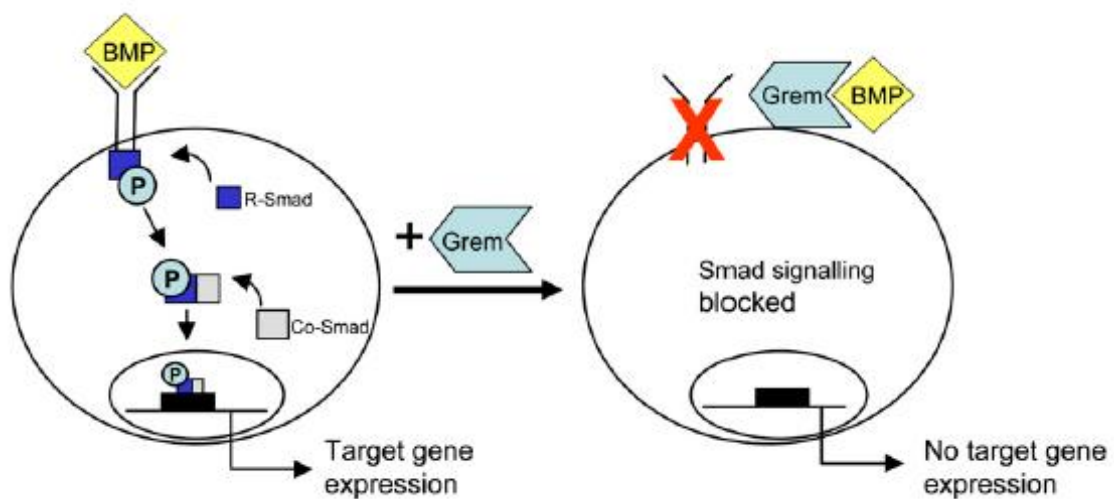
Tablo 2.3. BMP Çeşitleri ve Fonksiyonları (107)

BMP'ler	Fonksiyonları
BMP 1	Kartilaj indüksiyonu ve metalloproteaz
BMP 2	Kartilaj ve kemik formasyonu
BMP 3	Kemik gelişiminin negatif regülatörü
BMP 4	Kemik ve diş gelişimi
BMP 5	Kartilaj gelişimi
BMP 6	Eklem ve karaciğer gelişimi
BMP 7	Böbrek gelişimi
BMP 8	Kartilaj ve kemik formasyonu
BMP 9	Merkezi sinir sistemi, karaciğer gelişimi ve anjiogenez
BMP 10	Kalp gelişimi
BMP 11	Merkezi sinir sistemi gelişimi
BMP 12	Tendon ve kartilaj gelişimi
BMP 13	Tendon gelişimi
BMP 14	Kartilaj gelişimi
BMP 15	Oosit gelişimi

BMP'nin negatif sinyalizasyonundan BMP antagonistleri sorumludur. BMP'nin en yaygın antagonistleri noggin (108), gremlin (109), Cerberus (110), Twisted gastrulation (111), Chordin ve Crossveinless2'dir. BMP antagonistleri ekstraselüler regülörlerdir ve anjiyogenezden sorumludurlar (112).

Bu antagonistlerden biri olan gremlin DAN (differential screening selected gene abberative in neuroblastoma) familyasına ait sistein zincirlerinden oluşan BMP2, BMP4, ve BMP7'ye bağlanarak ligandların hücre yüzey reseptörleriyle etkileşimini engelleyen bir proteindir. Gremlin BMP'lere bağlanarak reseptör ve ligandın etkileşimine mani olur. Bu şekilde Smad 1/5/8'in fosforilasyonuna engel olarak BMP sinyalizasyonunun aksamasına sebebiyet verir (94).

Bu durumda TGF- β sinyali baskılanır (Şekil 2.6). Anjiogenez, proliferasyon, apoptozis, differansiyasyon, kemotaksis ve ekstraselüler matriks üretimi gibi fonksiyonları olan BMP'nin çalışmasına mani olur (4). Fizyolojik yollarda ve bazı hastalıkların patolojilerinden sorumlu oldukları bilinmektedir. Akciğer fibrozisinde, böbrek ve karaciğer işlev bozukluklarında gremlinin rol oynadığı bildirilmiştir (113). Yapılan çalışmalarda gremlinin diyabet dahil fibrotik böbrek hastalıklarında payı olduğu düşünülmektedir (114). Ayrıca gremlinin idiyopatik ve kalıtsal PAH hastalarının akciğer endotellerinde ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir (2).



Şekil 2.6. BMP antagonisti Gremlin ile ilişkisi. BMP antagonisti gremlin ekstraselüler alanda nonkovalent bağlarla BMP'ye bağlanır ve transkripsiyonu engeller (115).

2.5. PAH ve Gremlin

Gremlinin akciğer hücrelerindeki durumu ilk önce embriyonik fare akciğerlerinde tespit edilmiştir. Gremlinin aşırı ekspresyonu ile insan surfaktant proteini kullanılan transgenik farelerin distal solunum yolu epitellerinde aşırı ekspresyona ve normal solunum yollarında bozulmaya sebebiyet verdiği görülmüştür. Aynı çalışmada delesyona uğratılan gremlin geninin yokluğunda, akciğer septal gelişim kusurları ve bronşiol kayıplarına neden olduğu saptanmıştır (116). Bu bulgular ışığında gremlinin akciğer gelişiminde merkezi bir rol üstlendiği, yokluğunda ve aşırı ekspresyonunda pulmoner anomalilere sebebiyet verdiği ortaya çıkmıştır. Gremlinin, BMP'ler ve antagonistleriyle koordine ve dengeli bir gelişim göstermesi sağlıklı bir akciğer gelişimi bakımından kritik öneme sahiptir (117).

Bir mikroarray tarama analizinde, gremlinin hipoksik akciğerlerin endotel hücrelerinde transkripsiyonda görevli kapalı bir gen bölgesi olduğu tanımlaması yapılmıştır. Gremlin hipoksik hücre kültürü modelleri altında tanımlanan 90 genden bir tanesidir. Yapılan bir çalışmada 48 saat hipoksi altında tutulan ve normaksi altında tutulan kemirgen akciğerleri karşılaştırıldığında hipoksi altında bulunan hayvanların aşırı gremlin ekspresyonu gösterdiği, kronik pulmoner hastalıkları mimik ettiği saptanmıştır (118). Daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki BMP yolağındaki değişimler sonucu kemirgen hipoksi modellerinde pulmoner fibrozis ve astım gibi kronik akciğer hastalıkları ortaya çıkmaktadır (119).

PAH hastalığında, gremlinle yapılan çalışmalar; gremlinin, pulmoner vasküler direnç ve yeniden modellemede (remodeling) merkezi bir rol üstlenmiş olduğunu göstermektedir. Gremlin ekspresyonunun artışı PAH gelişimine ve BMP sinyalizasyonunun azalmasına sebebiyet vermektedir (2).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

PAH oluşum mekanizmasını ve patogenezi anlamak adına atılması gereken ilk adım PAH deney modeli oluşturmaktır. Bu sebeple literatürde bilinen insan PAH patolojisine en yakın model olan PAH Sugan 5416 hipoksik rat modeli laboratuvar ortamında oluşturuldu. Deney hayvanlarıyla çalışmada gerekli olan etik kurul onayı, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun tarafından verildi.

3.1. Hayvan Modeli Oluşturma

Bu çalışmada toplam 48 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ağırlıkları doğumlarını takiben 200-300 gr olacak şekilde seçildi. Tablo 3. 1’de deney grupları gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması

	Ajan	Ventilasyon	Denek Sayısı	Maruziyet
Grup 1	-	Normaksi	24	3,5 hafta
Grup 2	Sugen 5416	Hipoksi	24	3,5 hafta

48 adet denek iki gruba ayrılarak hasta ve sağlıklı kontrol grubu oluşturuldu. Grup 1 kontrol grubu olup 24 denek normaksik koşullarda %21 O₂ ile havalandırılmış ortamdaki herhangi bir besin ve su kısıtlaması olmayan kafeslerde tutuldu. Grup 2 deney grubu ise subkutan enjeksiyonla sugen 5416 verilerek hipoksi düzeneği kurulmuş %10 O₂ altında besin ve su kısıtlaması olmayan pleksicam kafesler içerisinde tutuldu.

Grup 2 denekleri bir defalık yapılan Sugan 5416 (20 mg/kg) enjeksiyonunun ardından 3,5 hafta süreyle hipoksi altında tutuldu. Grup 1 ise normaksik koşullarda 3,5 haftayı tamamladı. Kafesler içinde tutulan ratlar günün normal düzeninde, 21 °C sıcaklık ve 12

saatlik aydınlık/karanlık ortam gözetilerek su ve besin ihtiyaçları sağlandı. Süre sonunda grup 1 ve 2 ratları ketamin (80-100mg/kg) + xylazin (5-10 mg/kg) anestezi dozu ayarlanarak uyutuldu. Anestezi altındaki ratların PAB'ları ölçülerek PAH modeline ulaşıp ulaşılmadığı test edildi.

Oluşturulan hipoksi sugen-5416 PAH rat modeli ve normaksi altındaki kontrol deney gruplarının toraks bölgesi cerrahi aletlerle açıldı. Kalbin sağ apikal ucundan seldinger iğnesi girilerek rat için uygun mikro kateter sağ ventriküle yerleştirildi Kalbin sağ apikal ucundan girilen mikro kateter ADINSTRUMENTS PowerLab. 4/5 cihazı kullanılarak hem hipoksi sugen-5416 PAH rat modelinde, hem de normaksi ortamdaki kontrollerde PAB'ları kayıt edildi.

PAB ölçümünün ardından PAH grubu ve kontroller sakrifiye edilerek; mRNA ekspresyon seviyelerinin analiz edilmesi, ELISA, western blot analizi ve immunohistokimyasal boyamalar yapmak üzere akciğer ve kan örnekleri alındı. Elde edilen doku ve kan örnekleri Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD. laboratuvarında -80 °C'de deney gününe kadar saklandı.

3.2. mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçülmesi

PAH'lı ve kontrol gruplarının mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması amacıyla öncelikle RNA izolasyonu ardından cDNA sentezi ve kantitatif ve RT-PCR yapılmak üzere -80 °C'de saklanan akciğer doku örnekleri kullanıldı.

3.2.1. RNA İzolasyonu

Ticari olarak satılan RNA izolasyon kiti: Roche High Pure RNA Tissue Kit (Cat # 12033674 001) kullanıldı.

3.2.1.1. Roche High Pure RNA kit protokolü

3.2.1.1.1. Kit içeriği

Lizis Buffer (yeşil kapak)

DNase I (liyofilize) (beyaz kapak)

DNase İnkübasyon Buffer (beyaz kapak)

Wash Buffer I (siyah kapak)

Wash Buffer II (mavi kapak)

Elution Buffer (renksiz kapak)

Filtreli tüpler

2 ml toplama tüpleri

3.2.1.1.2. Haricen Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar

Homojenizatör

%96'lık etil alkol

Vortex

Santrifüj

Hassas terazi

20-200 ul mikropipet ve pipet ucu

2 ml'lik eppendorf tüpler

3.2.1.1.3. Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

DNase I: Kit ilk kez kullanılacağı zaman bu işlem uygulandı. Toz halindeki DNase I enzimi 550 ul Elution Buffer'da çözdürüldü ve vortekslendi. Eppendorf tüplere 50'şer ul dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

Wash Buffer I: Kit ilk kez kullanılacağı zaman bu işlem uygulandı. Wash Buffer I şişesine 20 ml saf alkol eklendi. Bu işlem yapıldıktan sonra, şişenin üzerine tarih yazılarak etiketlendi. Oda sıcaklığında saklandı.

Wash Buffer II: Kit ilk kez kullanılacağı zaman bu işlem uygulandı. Wash Buffer II şişesine 40 ml saf alkol eklendi. Bu işlem yapıldıktan sonra, şişenin üzerine tarih yazılarak işaretlendi. Oda sıcaklığında saklandı.

3.2.1.1.4. Deney Protokolü

2 ml'lik eppendorf tüplere her bir örnekten 20-25 mg tartılarak konuldu.

Üzerine 400 ul Lizis Buffer eklendi.

Homojenizatörün ayarı önce 5'e sonra 7'ye getirilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Her örnekten sonra homojenizatör temizlendi.

5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Homojenize örnekler 13000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.

Supernatant 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Doku parçaları almamaya dikkat edilerek 100'er ul çekildi.

Supernatanta 200 ul % 96'lık etil alkol eklendi. Hafifçe çalkalandı.

Supernatant ve alkolün olduğu bu karışım altta 2ml'lik toplama tüpü olacak şekilde filtreli tüpe aktarıldı.

13000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.

Alt tüpteki süzüntü döküldü. Tüpler tekrar birleştirildi (toplama tüpü ve filtreli tüp).

Enzim karışımı hazırlandı.

X (bir örnek için)

90 ul DNase inkübasyon buffer

10 ul DNase I enzim bir ependorf içinde hazırlandı.

Filtreli tüpe her bir örnek için 100 ul bu karışımdan eklendi.

Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

Filtreli tüpe 500 ul wash buffer I eklendi.

8000 g de 15 saniye santrifüj edildi.

Alt tüpteki süzüntü döküldü. Tüpler tekrar birleştirildi (toplama tüpü ve filtreli tüp).

Filtreli tüpe 500 ul wash buffer II eklendi.

8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.

Alt tüpteki süzüntü döküldü. Tüpler tekrar birleştirildi (toplama tüpü ve filtreli tüp).

Filtreli tüpe 300 ul wash buffer II eklendi.

13000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.

Alt tüpteki süzüntü döküldü. Filtreli tüpün altına bu defa 1,5 ml'lik ependorf tüp konuldu.

Filtreli tüpe 100 ul elution buffer eklendi.

8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

Bu şekilde RNA konsantrasyon ve absorbans ölçümü için hazır hale getirildi. Bir gece -80 °C buzdolabında saklandı. Thermo Scientific uDrop Plate cihazı kullanılarak RNA saflık derecesi belirlendi.

3.2.2. cDNA Sentezi

mRNA kalıbı hazır hale gelen PAH ve sağlıklı kontrol örneklerinin cDNA sentezi için ticari olarak satılan Abm cDNA sentez kiti (Cat # G236) kullanıldı.

3.2.2.1. Haricen Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar

Vortex

Nanodrop

Santrifüj

Heat Block

2-20 ul lik ve 0,2- 2 ul'lik mikropipet ve pipet uçları

3.2.2.2. Kit Protokolü

Tüm örneklerin RNA konsantrasyonları ve absorbansları ölçüldü. RNA absorbans değeri OD260/280 nm = 1,8-2,0 saflık derecesinde olan örnekler saf kabul edilip cDNA sentezi yapıldı. Örneklerin konsantrasyonları 0,5 ug/ul olacak şekilde hazırlandı. Protokole göre mix hazırlandı. Tablo 3.2 'de gösterilmiştir.

RNA örneği + dH₂O = 12,5 ul

Tablo 3.2. Her bir örnek için oluşturulan cDNA karışımı

Mix	X ul (Her bir örnek için)
Oligo dT	1
dNTP	1
5x Buffer	4
RNAasin	0,5
RTase enzim	1
Toplam	7,5 ul

Her bir 12,5 ul'lik RNA diluentine 7,5 ul mix dağıtıldı. Toplam hacim 20 ul oldu.

Örnekler 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Hemen ardından buza alındı. Heat block 85 °C'te ayarlandı. 85 °C de 5 dakika inkübe edildi. Tekrar buza alındı. Bir müddet soğutulduktan sonra -80 °C' de saklandı.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

rGAPDH_1 primeri için tüm örneklerle PCR yapıldı. Rat için uygun housekeeping gen olan GAPDH seçildi. PCR mixi hazırlandı. Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

GAPDH nükleotit dizisi

GAPDH Forward 5'-AACCTGCCAAGTATGATGACATCA-3'

GAPDH Reverse 5'-TGTTGAAGTCACAGGAGACAACCT-3'

Tablo 3.3. Her bir örnek için hazırlanan PCR karışımı

PCR Mix	X ul (Her bir örnek için)
10X Buffer	2
dNTP (2,5 mM)	0,8
dH ₂ O	14
Taq Polimeraz enzimi	0,2
Primer F (20 mM)	1
Primer R (20 mM)	1
Toplam	19 ul

PAH ve sağlıklı kontrol cDNA örneklerinden 1 ul alınıp 0,2 ml'lik pcr tüplerine konuldu. 19 ul pcr mixinden eklendi. Kısa bir vorteks ve spin yapıldı. PCR cihazına örnekler yerleştirilip, cihaz programına reaksiyon döngüsü girildi.

GAPDH PCR Döngüsü

95 °C' de 5 dakika

95 °C' de 30 saniye

58 °C' de 20 saniye

72 °C' de 30 saniye

72 °C' de 10 dakika

4 °C' de sonsuz

Gremlin nükleotit dizisi

Gremlin Forward 5' CCA GCA GCT GAA GGG AAA AAG AAA 3'

Gremlin Reverse 5' TGG CCG TAA CAG AAG CGA TTG A 3'

PCR Döngüsü

95 °C' de 5 dakika

95 °C' de 30 saniye

58 °C' de 20 saniye

72 °C' de 30 saniye

72 °C' de 10 dakika

4 °C' de sonsuz

VEGFR2 nükleotit dizisi

VEGFR2 Forward TAG CAC GAC AGA GAC TGT GAG GT

VEGFR2 Reverse TGA GGT GAG AGA GAT GGG TAG G

PCR Döngüsü

95 °C' de 5 dakika

95 °C' de 30 saniye

62 °C' de 20 saniye

72 °C' de 30 saniye

72 °C' de 10 dakika

4 °C' de sonsuz

PCR döngüsü sonlandıktan sonra cihazdan çıkarılıp agaroz jel elektroforezi yapılana dek -20 °C' de saklandı.

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

3.2.4.1. Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar

Trizma Base

Borik asit

EDTA

Agaroz

100 bp Ladder

Loading dye (Yükleme Boyası)

Etidyum Bromid

Elektroforez tankı ve tarağı

Karıştırıcı

Erlen mayer

Mikrodalga fırın

UV görüntüleme cihazı

3.2.4.2. Deney Protokolü

Öncelikle 10x TBE (Tris, borik asit, EDTA karışımı) hazırlandı. Bunun için 108 gr Tris, 55 gr borik asit, 7,5 gr EDTA tartılıp 200 ml distile suda karıştırıcı üzerinde çözdürüldü. Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Bu karışım 10x olduğundan ihtiyaç duyulan 1x TBE için seyreltme yapıldı.

10x TBE karışımından 100 ml alınıp 900 ml distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı. 1x TBE hazırlanmış oldu. Elde edilen 1x TBE'den mini elektroforez tepsisi için 50 ml alındı. %3 lük agaroz jel yapmak için 1,5 gr agaroz tartılıp 50 ml 1x TBE'de erlen içerisinde çözdürüldü. Mikrodalga fırında arada karıştırmak suretiyle 4 dakika kadar pişirildi. Biraz soğutulduktan sonra 2 ul EtBr eklendi ve iyice karışması sağlandı. Elektroforez tepsisine tarak yerleştirilip jel döküldü. Jel donduktan sonra tarak çekildi. Birinci kuyucuğa 100 bp ladder diğer kuyucuklara da örnekler ve negatif kontrol

eklendi. 100 V'da 50 dakika koşturuldu. Fusion FX görüntüleme cihazında jel görüntüsü alındı.

3.2.5. RT-PCR

GAPDH ve Gremlin primeri için kalitatif bir analiz olan Real Time-Polimerase Chain Reaction (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yapıldı. Floresan işaretleme için SYBR Green kullanıldı.

Tablo 3.4. Her bir örnek için oluşturulan RT-PCR karışımı

Mix	X ul (her bir örnek için)
SYBR Green	10 ul
Primer F (5 mM)	2,5 ul
Primer R (5 mM)	2,5 ul
Toplam	15 ul

cDNA 1 ul + dH₂O 4 ul = 5 ul cDNA

5 ul cDNA + 15 ul mix = 20 ul toplam hacim

rGAPDH için RT-PCR Döngüsü

95 °C'de 10 dakika

95 °C'de 30 saniye

58 °C'de 20 saniye

72 °C'de 30 saniye

rGremlin için RT-PCR Döngüsü

95 °C'de 10 dakika

95 °C'de 30 saniye

58 °C'de 20 saniye

72 °C'de 30 saniye

rVEGFR2 için RT-PCR Döngüsü

95 °C’de 5 dakika

95 °C’de 30 saniye

62 °C’de 20 saniye

72 °C’de 30 saniye

Ürünler Roche Light Cycler 480 cihazında ve ilgili protokolde okutuldu.

3.3. Western Blot Analizi

Grup 1 ve grup 2 ratlarından anestezi altında toplanan akciğer dokularında Gremlin proteinin ve VEGFR2’nin gözlenebilmesi için elde edilen örneklerden protein lizati hazırlandı. Lizatlar jel elektroforezinde yürütüldü. Membrana aktarılıp primer ve sekonder antikor ile muamele edildi.

3.3.1. Protein Lizati Hazırlama

Elde ettiğimiz Grup 1 kontrol rat akciğer örnekleriyle, Grup 2 PAH rat akciğer örneklerinden western blot analizinde jele yüklemek üzere protein lizati hazırlandı.

3.3.2. Gerekli Malzemeler ve Teçhizatlar

Homojenizatör

Santrifüj

Lysis Buffer (Parçalama tamponu)

Proteinase inhibitor cocktail (Proteinaz inhibitör karışımı)

Akciğer doku örnekleri

Cryo tüp

1,5 ml’lik ependorf tüp

Mikropipet (100-1000 ul)

Pipet ucu

Buz kalıbı

3.3.3. Deney protokolü

X bir örnek için

Lysis Buffer 475 ul

10X proteinaz inhibitör karışımı 25 ul

Bir örnek için toplam 500 ul olacak şekilde örnek sayısına göre bu karışım hazırlandı. Örnek dokuları -80 °C buzdolabından çıkarıldı. Doku ve karışım buz üzerindeyken çalışıldı. Ortalama 20-25 mg doku örneği tartılarak cryo tüp içerisine konuldu. Her bir doku üzerine 500 ul lysis buffer-proteinase inhibitor cocktail karışımı eklendi. Homojenizatör ile önce 5 daha sonra 7 ayarında homojenize edildi. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından örnekler cryo tüplerden ependorflara alındı. Yaklaşık 500 ul kadar parçalanmış doku örneği ependorflara aktarıldı. 13000 rpm’de +4 °C’de 30 dakika santrifüj edildi. Supernatant 100 ul’er şeklinde yaklaşık 300 ul kadar çekilip yeni bir ependorfa aktarıldı.

3.3.4. Bradford Methodu

Bradford analizinde proteinlerin nicel olarak tayini yapıldı.

3.3.5. Gerekli Malzeme ve Teçhizatlar

Protein konsantrasyonuna bakılmak üzere her bir örneğin protein lizatından 2 ul alındı ve 998 ul dH₂O ile seyreltildi (1/500). BSA (Bovine serum albümine) konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde distile su ile hazırlandı. Bunun için 0,1 gr BSA tartıldı ve 50 ml distile su ile homojen olana dek karıştırıldı. Bu karışım standart stoğu oldu.

Standart Hazırlanması

Tablo 3.5. Protein konsantrasyon ölçümü için standart dilüsyonları

Standart 1 (666 ug/ml)	Stok BSA 250 ul + dH ₂ O 500 ul
Standart 2 (222 ug/ml)	Standart 1 250 ul + dH ₂ O 500 ul
Standart 3 (74 ug/ml)	Standart 2 250 ul + dH ₂ O 500 ul
Standart 4 (24 ug/ml)	Standart 3 250 ul + dH ₂ O 500 ul
Standart 5 (8 ug/ml)	Standart 4 250 ul + dH ₂ O 500 ul
Standart 6 (2,7 ug/ml)	Standart 5 250 ul + dH ₂ O 500 ul
Standart 7 (0,9 ug/ml)	Standart 6 250 ul + dH ₂ O 500 ul

Hazırlanan tüm standartlardan 100 ul, Bradford boyasından 100 ul alındı ve 96'lık plate kuyucuklarına dublike olarak konuldu. Negatif için 100 ul dH₂O, 100 ul boya konuldu. Tüm örneklerden 100 ul alındı ve 100 ul boya ile karıştırılarak kuyucuklara yerleştirildi. Multiskan GO Microplate-Thermo Fisher cihazının ilgili programında okutuldu. Elde edilen değerlere 1/500 olan dilusyon faktöründe eklenip jele yüklemek için konsantrasyonu 80 ug/ul'ye ayarlandı. (Tablo 3.5)

3.3.6. Protein Lizatlarının Jel Elektroforezi İçin Hazırlanması

X (bir örnek için)

Lysis Buffer 12,5 ul

Protein lizati (80ug/ul)

%20 merkaptotanol içeren 4X SDS Buffer

Toplam hacim 50 ml olacak şekilde hazırlanıp 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

3.3.7. Jel Elektroforezi

Jel standın ayaklarına, gri süngerler parafin sarılarak konuldu. Cam plâtelere, su ve %70'lik etil alkolle 3 kez temizlendi. Spacerli plate arkada, kesik küt uçlu plate önde olacak şekilde yeşil tutacıklara sıkıştırıldı. Bu yeşil aparatlar standa mandalla tutturuldu. Sızıntının olup olmadığı pastör pipeti ile su konularak test edilir. Sızıntı olup olmadığını kontrol edilip, ince kurutma kağıdı ile su çekildi. Separation jel (ayırma jeli) ve Stacking Jel (istifleme jeli) Tablo 3. 6'daki gibi hazırlandı.

Tablo 3.6. Her bir jel için oluşturulan karışımlar

Separation gel (%10'luk, 10mL) pH: 8.8		Stacking gel (%4'lük, 5mL) pH: 6.8	
ProtoGel	3.33 mL	ProtoGel	0.65 mL
Resolving Buffer	2.5 mL	ProtoGel Stacking Buffer	1.25 mL
dH ₂ O	4.06 mL	dH ₂ O	3.05 mL
% 10 APS	100 ul	%10 APS	25 ul
TEMED	10 ul	TEMED	5 ul

Önce pastör pipeti ile separation jel döküldü. Baloncukları yok etmek için üzerine yaklaşık 500 ul izopropanol eklendi. 20 dakika polimerize olması beklendi. Stacking jel

(istifleme jeli) hazırlanmaya başlandı. Stacking jeli hazırlarken, TEMED (Tetramethylethylenediamine)'i koymadan önce separation jel donduğu için, yeşil aparatla beraber stanttan çıkarıldı. İzopropanol boşaltıldı. Bir piset içerisine su konularak pisetle yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu. Stacking jel dökülüp, 10 bölmeli tarak yerleştirildi. 30 dakika boyunca polimerize olması beklendi. Yeşil-beyaz elektrotlu aparatın arka tarafında jel, ön tarafında plate olacak şekilde yerleştirildi. Jelin kesik plate olan tarafı ile plastik plate iç tarafı birbirine bakacak şekilde yerleştirildi. Alttaki yeşil mandallar kapatıldı. Elektrotlardan siyah olan (-) solda kırmızı olan (+) sağda olacak şekilde oturtuldu.

10X Running Buffer (Koşturma Tamponu) (Stok)

144 gr Glisin

30 gr Tris

100 ml %10' luk SDS hazırlanıp distile suyla 1 L'ye tamamlandı.

Kullanırken bu stok Running Buffer 1X'e seyreltildi. 100 ml 10X Running Buffer + 900 ml distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Tank içerisine 1X Running Buffer konuldu. Jelin olduğu elektrotlu bölümün en üst seviyesine kadar 1X Running Buffer dolduruldu. Boş kuyu kalmayacak şekilde marker ve örnekler yüklendi.

Marker	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	4X SDS
(15 ul)	(50ul)	(50ul)	(50ul)	(50ul)	(50ul)	(50ul)	buffer

Önce 70 V'da koşturuldu. Örnekler stacking jelden separation jele geçince 100 V'a yükseltildi. En aşağıya inene kadar koşturuldu.

Kullanılan marker: Precision Plus Dual Color Standarts (Bio-Rad, Cat:161-0374)

1X Transfer Buffer

Glycine 28.8 gr

Tris 6,04 gr

Methanol 200 ml

Hazırlanıp toplam hacim distile su ile 2 L'ye tamamlandı.

3.3.8. Elektrotransfer İşlemi

Jel koştuktan sonra, plateler dikkatlice ayrılıp stacking jel kısmı bisturi ile kesilip atıldı. Bir tarafı siyah diğer tarafı beyaz olan transfer ünitesi açılıp bu ünitenin iki tarafına birer sünger yerleştirildi. Süngerlerin üzerine jelin büyüklüğüne uygun olarak kesilmiş ve transfer buffer ile ıslatılmış whatman kağıtları (kurutma kağıtları) yerleştirildi. Koşmuş olan jel nazıkçe ve kırmadan transfer ünitesinin siyah tarafındaki whatman kağıdının üzerine yerleştirildi. Jelin üzerine parlak kısmı üste kalacak şekilde membran yerleştirildi. PVDF (Polyvinylidene fluoride) membran kullanıldığından aktive etmek için metanol ile ıslatıldı. Transfer ünitesi sandviç gibi kapatıldı. Siyah-kırmızı alt kısmı açık olan elektrotlu aparata bu transfer ünitesi yerleştirildi. Transfer ünitesinin siyah tarafı ve elektrotlu aparatın siyah tarafı birbirine denk gelecek şekilde oturtuldu. Bu elektrotlu aparat arkada siyah önde kırmızı olacak şekilde tanka yerleştirildi. Tank tamamen transfer buffer ile dolduruldu. Bir buz kalıbı da tankın içine yerleştirildi ve tank buz ile dolu bir kapta çalıştırıldı. 100 V'da 1 saat 20 dakika koşturuldu.

3.3.9. Bloklama

% 5'lik blok solüsyonu için 5 gr süt tozu tartılıp 100 ml TBS-T solüsyonu ile çözdürüldü.

1X TBS-T Hazırlanması

Tris 1,2114 gr

Sodyum Klorit 17,9 gr

Tween 20 1 ml hazırlanıp 1 L'ye tamamlandı.

Transfer tamamlandıktan sonra membranın jele değen kısmı üstte kalacak şekilde, % 5'lik blok solüsyonundan membranın tamamına temas edecek miktarda alınıp boş bir kaba konuldu. 1 saat süreyle 90 rpm'de orbital çalkalayıcıda karıştırıldı.

3.3.10. Antikor İnkübasyonu

Primer antikor: Gremlin Antibody –Santa Cruz -sc-28873

Seyreltme oranı: 1/500

Hazırlanışı: 10 ml % 5' lik blok solüsyonu

20 ul Gremlin antikor

Primer antikor: VEGFR2 Cell Signaling 55B11

Seyreltme Oranı: 1/1000

Hazırlanışı: 10 ml %5'lik BSA solüsyonu

10 ul VEGFR2 antikor

Bloklama bittikten sonra membranın bulunduğu kaptan blok solüsyonu döküldü. Üzerine seyreltilmiş antibody döküldü. Kap streç film ile sarıldı. Soğuk odada +4 °C 90 rpmde orbital çalkalayıcıda overnight (16-18 saat) inkübasyona bırakıldı.

Seyreltilen antikor kullanıldıktan sonra -20 °C'de saklanarak 5-6 kez daha kullanılmak üzere kaldırıldı.

Memran üzerine 1X TBS-T döküldü. 3 defa 15'er dakika yıkama yapıldı.

Sekonder antikor: Primer antikora uygun olarak seçilen sekonder antikor

Host: Goat Anti- Antijen: Rabbit Ig(H+L) Thermo scientific: Lot # 0C16797310

Seyreltme oranı: 1/5000

Hazırlanışı: 10 ml % 5'lik blok solüsyonu

2 ul sekonder antikor

Yıkamadan sonra 1X TBS-T döküldü. Üzerine seyreltilmiş sekonder antikor eklendi. Oda sıcaklığında 90 rpmde orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. TBS-T ile 3 kez 15' er dakika yıkama işlemi yapıldı.

3.3.11. Görüntüleme İşlemi

Yıkama işleminden sonra TBS-T döküldü. Membran üzerine pipetle HRP western substrat damlatıldı. Görüntüleme işlemi Fusion FX görüntüleme cihazı western blot programıyla yapıldı (Resim 4.4).

3.4. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

3.4.1. Gremlin için ELISA

Ticari olarak satılan ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) kit: Rat Gremlin YHB1432Ra Shangai LZ Biotech marka kullanıldı.

3.4.1.1. Kit İçeriği

Coated ELISA plate (Antijen emdirilmiş plate)

Standart Solusyon (32 ng/ml) 0,5 ml

Streptavidin-HRP 6 ml

Stop Solusyonu 6 ml

Chromogenic Reagent A 6 ml (Substrat Solusyonu A)

Chromogenic Reagent B 6 ml (Substrat Solusyonu B)

Anti GREM 1 ml

Standart Dilusyon Tamponu 3 ml

Yıkama Tamponu (20 ml*30)

3.4.1.2. Gerekli Malzemeler

37 °C inkübatör

Multipipet, otomatik pipet ve pipet uçları

Tek kullanımlık ependorf tüpler

ELISA okuyucu cihaz

Distile su

Kurutma kağıdı

3.4.1.3. Deney Protokolü

Kit kullanmaya başlamadan en az 30 dakika önce oda sıcaklığına getirildi. Yıkama solüsyonu 30 kez seyreltilerek 600 ml solüsyon hazırlandı. Standart dilusyonlar Tablo 3.7'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3.7. Birbirinden eşit oranda seyreltilerek elde edilen standart konsantrasyonları.

Konsantrasyon	Standart numarası	Dilue edilen miktar
32 ng/ml	Standart no:7	240 ul standart 32 ng/ml
16 ng/ml	Standart no:6	120 ul standart 32 ng/ml + 120 ul Diluent
8 ng/ml	Standart no:5	120 ul standart 16 ng/ml + 120 ul Diluent
4 ng/ml	Standart no:4	120 ul standart 8 ng/ml + 120 ul Diluent
2 ng/ml	Standart no:3	120 ul standart 4 ng/ml + 120 ul Diluent
1 ng/ml	Standart no:2	120 ul standart 2 ng/ml + 120 ul Diluent
0,5 ng/ml	Standart no:1	120 ul standart 1 ng/ml + 120 ul Diluent

Blank kuyucuğunda 50 ul diluent + 50 ul Streptavidin-HRP

Standart kuyucuklarında 50 ul standart + 50 ul HRP

Örnek kuyucuklarında 40 ul kan plazması + 10 ul Anti-GREM + 50 ul HRP

Plate düzeni oluşturulup tüm örnekler, blank ve standart kuyucukları eklendikten sonra plate nazikçe çalkalandı. 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Ardından içindeki tüm sıvılar dökülüp multipipetle her bir kuyucuğa 300 ul yıkama solüsyonu gelecek şekilde 5 kez yıkandı. Yıkama bittikten sonra chromogen reagent A ve chromogen reagent B eşit oranda karıştırılıp her bir kuyucuğa toplam karışımdan 100 ul gelecek şekilde dağıtıldı. 37 °C'de 10 dakika karanlık ortamda, ışıktan muhafaza ederek inkübasyona alındı. Bu 10 dakika boyunca mavi renk değişimi gözlemlendi. Süre sonunda stop solüsyonundan her bir kuyucuğa 50 ul gelecek şekilde dağıtıldı. Sarı renk değişimi

gözlendi. 15 dakika içerisinde ELISA Thermo Fischer Multiskan Go Reader cihazında 450 nm’de okutuldu.

3.4.2. VEGFR2 için ELISA

Ticari olarak satılan ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) kit: Rat VEGFR2 Cloud Clone Corp.SEB367Ra marka ürün kullanıldı.

3.4.2.1. Kit İçeriği

Coated ELISA plate (Antijen emdirilmiş plate)

Standart Solusyon 2 adet

Stop Solusyonu 6 ml

Detection Reagent A 12 ml

Detection Reagent B 12 ml

Standart Dilusyon Tamponu 3 ml

TMB Substrat 9 ml

Yıkama Tamponu (20 mlx30)

3.4.2.2. Gerekli Malzemeler

37 °C inkübatör

Multipipet, otomatik pipet ve pipet uçları

Tek kullanımlık ependorf tüpler

ELISA okuyucu cihaz

Distile su

PBS tamponu (Tuz Tamponu)

Kurutma kağıdı

3.4.2.3. Deney Protokolü

Kit kullanmaya başlamadan en az 15 dakika önce oda sıcaklığına getirildi. Yıkama solüsyonu 30 kez distile suyla seyreltilerek 600 ml solüsyon hazırlandı. Standart dilusyonlar Tablo 3.8'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3.8. Birbirinden eşit oranda seyreltilerek elde edilen standart konsantrasyonları.

Konsantrasyon	Standart numarası	Dilue edilen miktar
8000 pg/ml	Standart no:8	1000 ul standart diluent ile hazırlandı
4000 pg/ml	Standart no:7	500 ul standart 8000 pg/ml + 500 ul Diluent
2000 pg/ml	Standart no:6	500 ul standart 4000 pg/ml + 500 ul Diluent
1000 pg/ml	Standart no:5	500 ul standart 2000 pg/ml + 500 ul Diluent
500 pg/ml	Standart no:4	500 ul standart 1000 pg/ml + 500 ul Diluent
250 pg/ml	Standart no:3	500 ul standart 500 pg/ml + 500 ul Diluent
125 pg /ml	Standart no:2	500 ul standart 250 pg/ml + 500 ul Diluent
62,5 pg/ml	Standart no:1	500 ul standart 125 pg/ml + 500 ul Diluent
Blank		Diluent

Standart hazırlığı tamamlandıktan sonra örnekler 1/100 oranında PBS ile seyreltildi. Her bir standart, blank ve örnek numuesi dublike olarak 100 ul'ler halinde plate kuyucuklarına eklendi. 2 saat 37 °C'de inkübasyona alınır. İnkübasyon süresi dolduktan sonra Detection Reagent A tüm kuyucuklara 100 ul'ler halinde konulur ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Ardından 3 kez yıkama tamponuyla 350 ul'ler halinde yıkama yapılır ve Detection Reagent B 100 ul'ler halinde kuyucuklara eklenip 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. 5 kez yıkama tamponuyla 350 ul'ler halinde yıkama yapıldı. TMB Substrat solüsyonu 90 ul eklenip alüminyum folyo ile ışık görmesi engellendi. 10-20 dakika bekletilip mavi renk değişimi gözlemlendi. Vakit tamamlandıktan sonra Stop solüsyonu 50 ul eklendi ve ELISA Reader cihazında 450 nm'de okutuldu.

3.5. İmmunohistokimyasal Boyama

İmmuno histokimyasal boyama için Grup 1 ve Grup 2'den alınan akciğer dokuları %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokulara rutin doku takip aşamaları uygulandı (Tablo 3.9) ve parafine gömülerek bloklandı.

Tablo 3.9. Doku takip aşamaları

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Musluk suyu	1 saat	7	Absolü Alkol	1 saat
2	%50 Alkol	1 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
3	%70 Alkol	1 gece	9	Ksilen	20 dk
4	%80 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dk
5	%96 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dk
6	Absolü Alkol	1 saat	12	Parafin	2 saat

Parafin bloklardan alınan 5-6 µm'lik kesitler lamlara yayıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler (H&E) hematoksilen-eozin (Tablo 3.10) ile boyandı.

Tablo 3.10. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	14	Eozin	3-5 dk
2	Ksilen I	15 dk	15	Akarsu	1 dk
3	Ksilen II	15 dk	16	%50 Alkol	1 dk
4	Ksilen III	15 dk	17	%70 Alkol	1 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	18	%80 Alkol	1 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	19	%96 Alkol	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	2 dk
9	%70 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	2 dk
10	%50 Alkol	5 dk	23	Ksilen I	20 dk
11	Akarsu	2 dk	24	Ksilen II	20 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	25	Ksilen III	20 dk
13	Akarsu	5 dk	26	Kapatma	

Bir gece 60 °C'de tutulan kesitler, önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Distile su ile yıkandı. Daha sonra kesitler 12 dakika % 3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Antijen geri kazanımı için %10'luk sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600 w'de 5 dakika kaynatılan kesitler 10 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içerisinde bekletildi. PBS ile yıkandı. Bundan sonraki

aşamalar için Large Volume Detection System boyama kiti kullanıldı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere oda sıcaklığında 5 dakika Ultra V blok uygulandı. Hemen ardından kesitler primer antikor VEGFR / Gremlin bir gece 4 °C’de inkübe edildi. Negatif kontrol için, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler Biotinylated goat anti polyvalent ile 10 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra streptavidin peroksidaz ile 10 dakika muamele edilen kesitler yıkandı. İmmünreaktivitelerini görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 1-5 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika distile su ile yıkandı. Gill hematoksilin ile zıt boyanan kesitler birkaç kez distile su ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma solüsyonu (Entellan®, Merck) ile kapatılarak Olympus BX51 mikroskopunda incelendi.

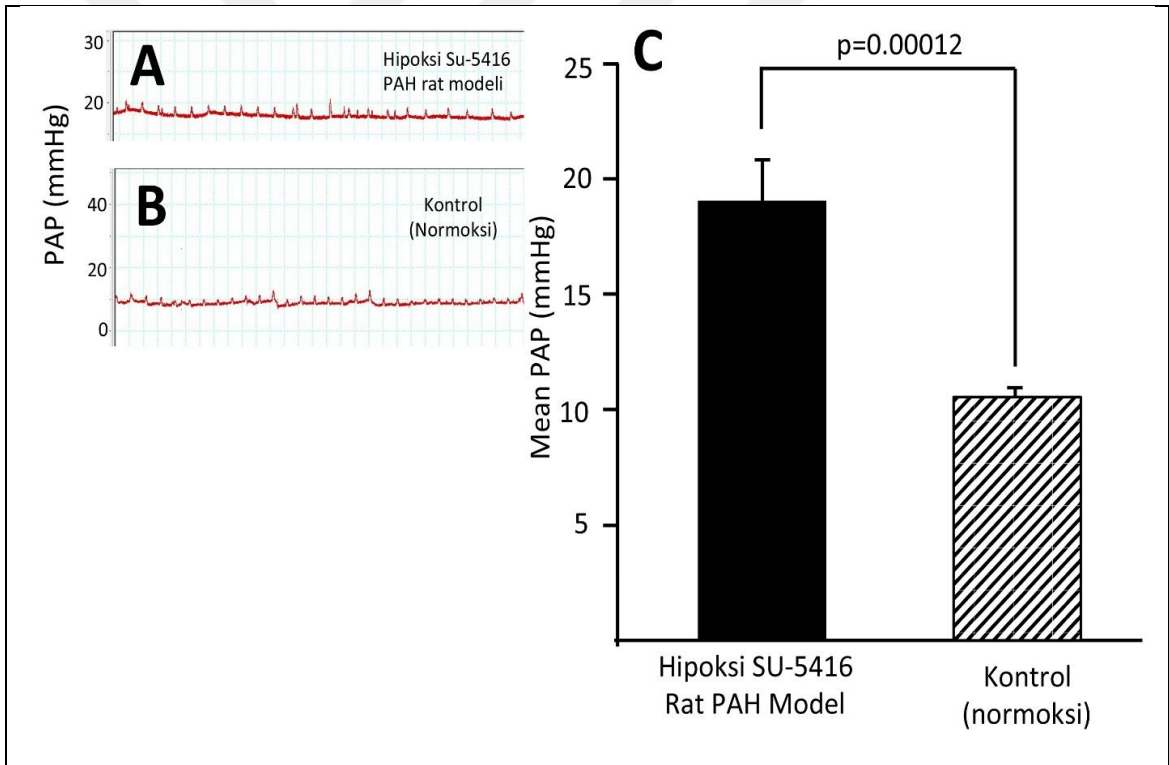
3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler JMP versiyon: 5.0.1.2. programında Student t testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Hayvan Modeli Oluşturma

Pulmoner arter basınçları PAH hipoksi SU-5416 rat modelinde kontrollere göre çok yüksek bulundu [Pulmoner arter basıncı (PAP) mmHg, ortalama±standart sapma PAH 19.03 ± 1.77 , kontrol 10.58 ± 0.40 , $p=0.00012$]

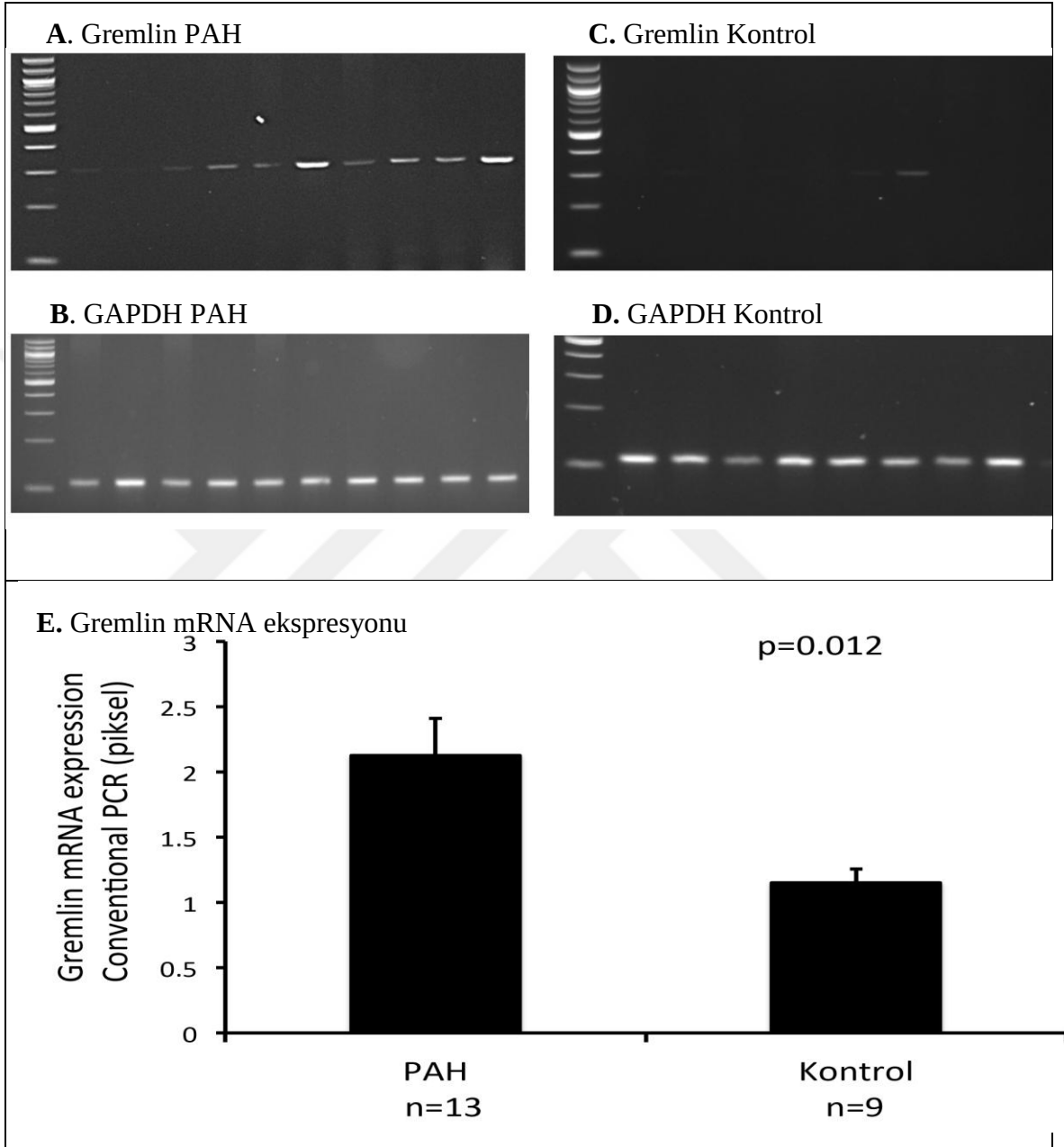


Şekil 4.1. Deney gruplarının PAB ları. A. Grup 2 PAH modeli oluşturulmuş ratların PAB'ları, B. Grup 1 kontrol grubu ratların PAB'ları, C. PAH modeli oluşturulmuş ve sağlıklı kontrol grubunun pulmoner arter basınçları bar grafiğı.

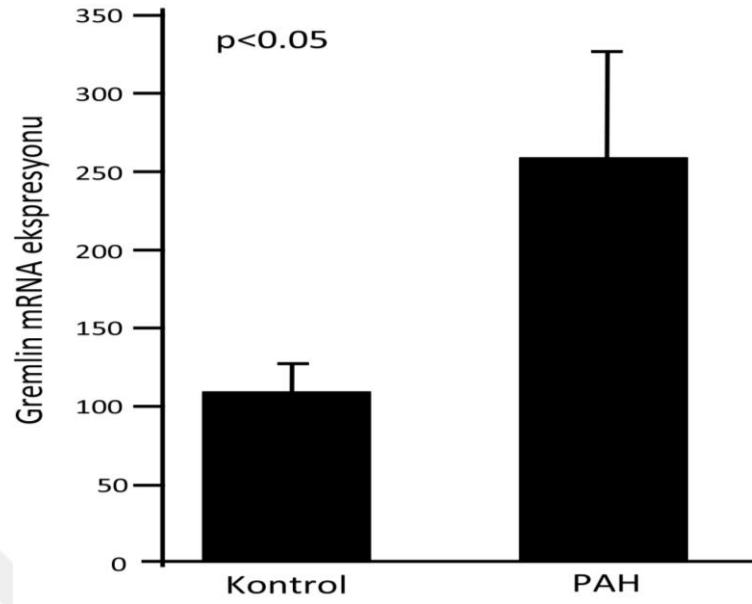
4.2. mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçülmesi

Sakrifiye edilen Sugan 5416 PAH rat modeli ve kontrol gruplarında elde edilen DNA örnekleriyle PCR (Şekil 4.4) ve RT-PCR yapılarak GAPDH, Gremlin (Şekil 4.2.) ve

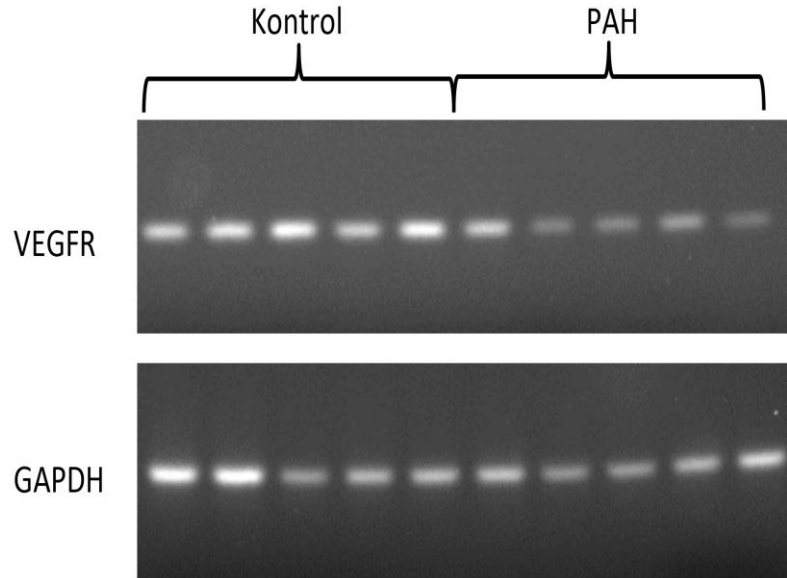
VEGFR2'nin ekspresyon seviyeleri Deltadelta Ct hesaplama yöntemiyle relatif mRNA ekspresyonları hesaplandı (Şekil 4.3).



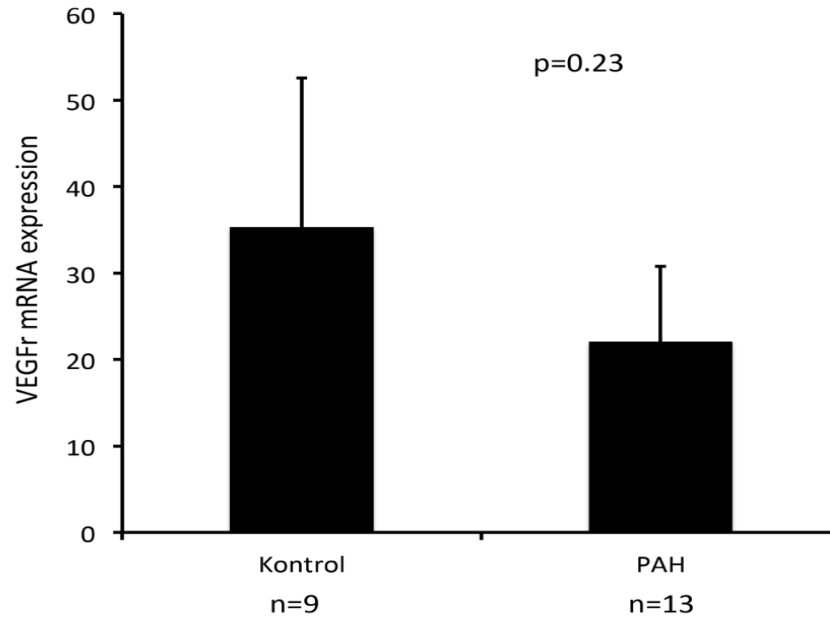
Şekil 4.2. Gremlin ve GAPDH PCR görüntüleri. A. PAH'lı ratların akciğerlerinden elde edilen dokulardan Gremlin ekspresyon seviyesi belirlendi. B. Housekeeping gen olan GAPDH ile PAH'lı dokuların ekspresyon seviyeleri belirlendi. C. Sağlıklı ratların Gremlin ekspresyon seviyesi belirlendi. D. Sağlıklı ratların GAPDH ekspresyon seviyesi belirlendi. E. Convensiyonel PCRlar imaje J programı ile pikselleri hesaplanarak bar grafiği oluşturuldu.



Şekil 4.3. Gremlin mRNA ekspresyonu. Gremlin mRNA ekspresyonu Real Time RTQ-PCR ile değerlendirildi ve Deltadelta Ct hesaplama yöntemiyle relatif gremlin mRNA ekspresyonları hesaplanmas.



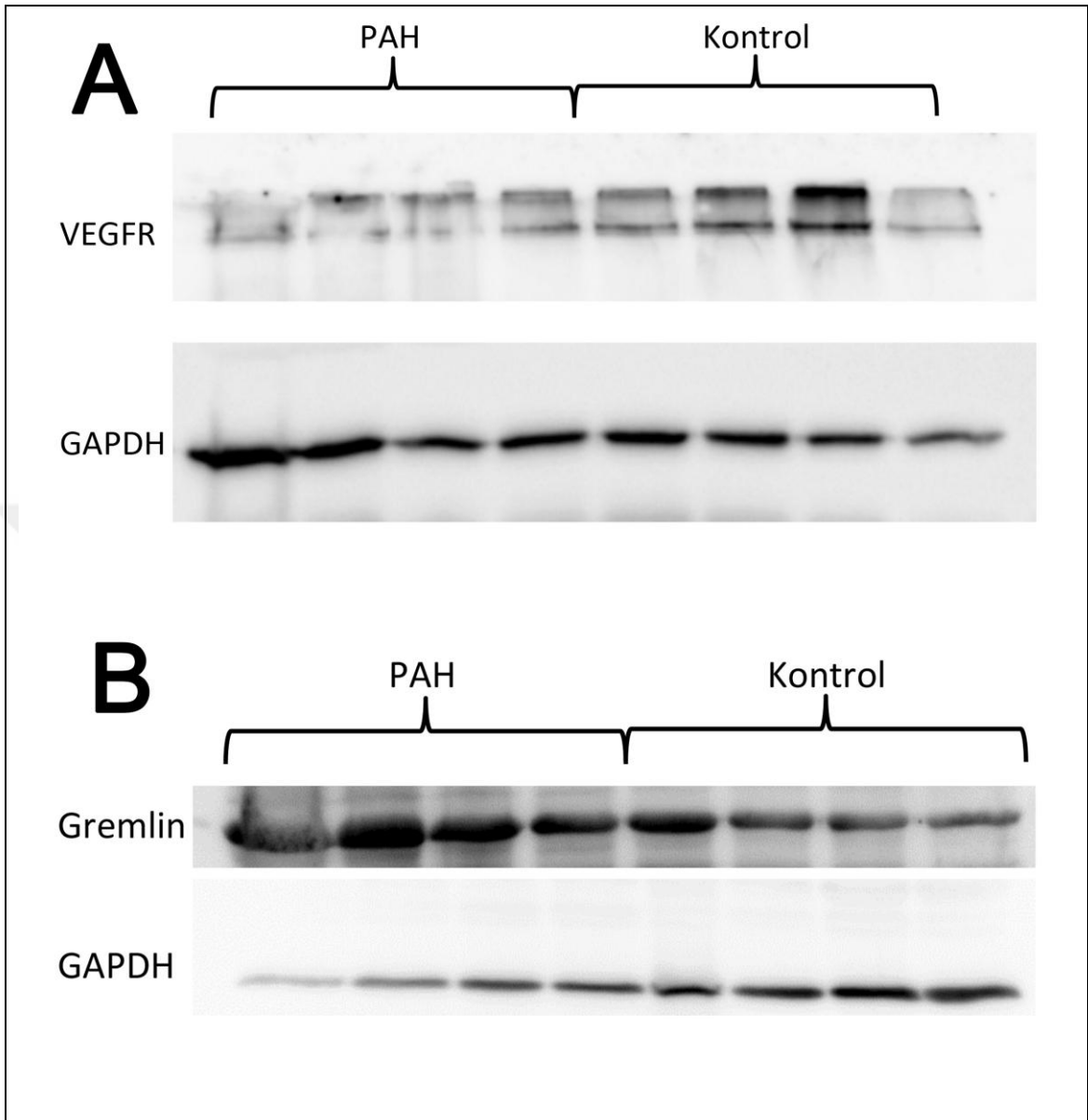
Şekil 4.4. VEGFR2 ekspresyon seviyeleri. VEGFR2 ekspresyon seviyeleri PAH'lı ve sağlıklı ratlarda belirlendi.



Şekil 4.5. VEGFR2 mRNA ekspresyonları Real Time RT-PCR ile değerlendirilmesi.

4.3. Western Blot Analizi

PAH'lı ve sağlıklı ratlarından anestezi altında toplanan akciğer dokularında Gremlin proteinin ve VEGFR2'nin gözlenebilmesi için elde edilen örneklerden protein lizati hazırlandı. Lizatlar jel elektroforezinde yürütüldü. Membrana aktarılıp primer ve sekonder antikor ile muamele edildi (Şekil 4.6). VEGFR proteinlerinde bir fark belirlenmezken, Gremlin protein ekspresyonu PAH ratlarda kontrollere göre artış olduğu gözlemlendi.

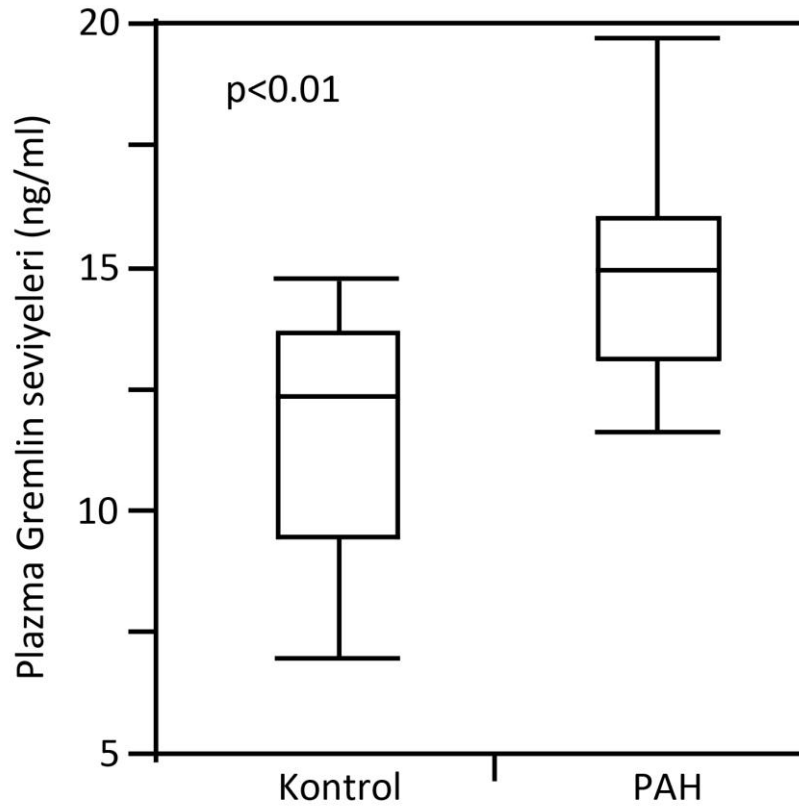


Şekil 4.6. VEGF reseptör ve Gremlin antikorları kullanılarak western blot analizleriyle protein seviye ölçümleri. VEGFR proteinlerinde bir fark belirlenmezken (A), Gremlin protein ekspresyonu PAH ratlarda kontrollere göre artış olduğu gözlemlendi (B).

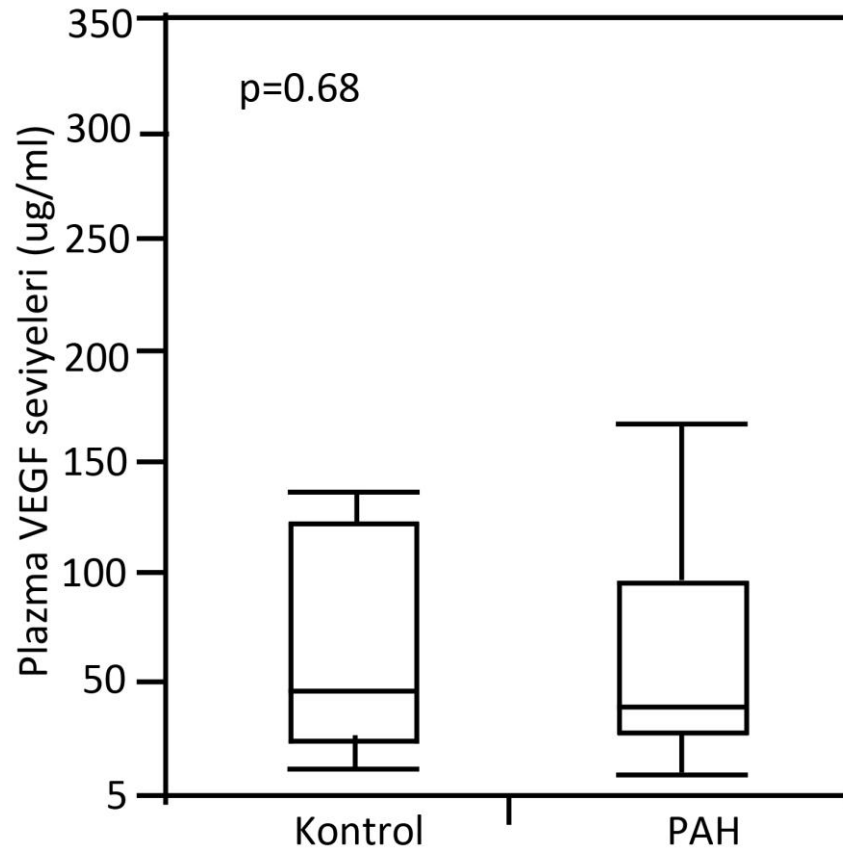
4.4. ELISA

Plazmada Gremlin ve VEGFR2 seviyesi ticari olarak satın alınan; Rat Gremlin YHB1432Ra Shangai LZ Biotech (Şekil 4.7) ve Rat VEGFR2 Cloud Clone Corp. SEB367Ra ELISA kitleri yardımıyla gerçekleştirildi (Şekil 4.8).

İstatistiksel olarak plazma Gremlin seviyeleri PAH'lı ratların sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdi. Gremlin kan plazma seviyesi (ng/mL), ortalama±standart sapma PAH 15.0 ± 2.1 , kontrol 11.6 ± 2.8 $p<0.01$]



Şekil 4.7. PAH'lı ve sağlıklı ratlardan elde edilen kan plazmaları Gremlin proteini için ELISA analizi.

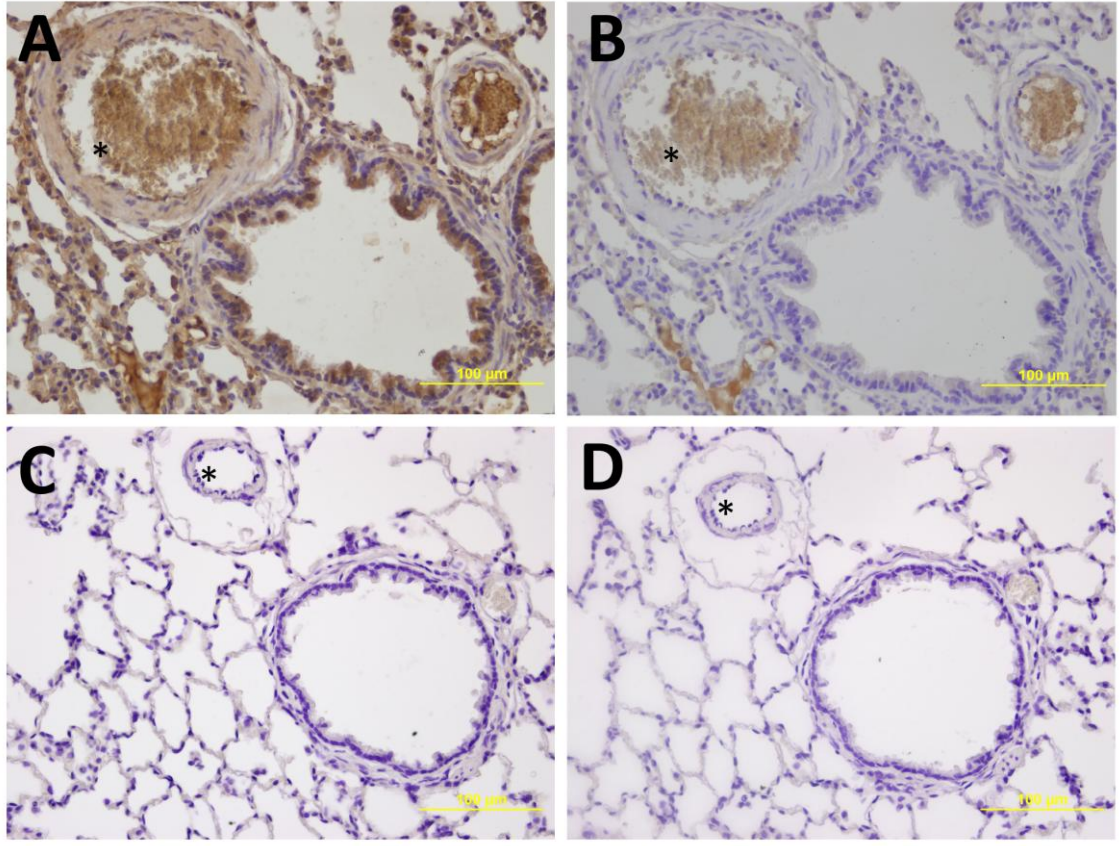


Şekil 4.8. PAH'lı ve sağlıklı ratlardan elde edilen kan plazmaları VEGF proteini için ELISA analizi

Plazma VEGF seviyelerinde anlamlı bir fark belirlenmedi [VEGF kan plazma seviyesi (ug/mL), ortalama±standart sapma PAH 78.2 ± 18.6 , kontrol 63.9 ± 32.3 $p=0.68$]. İstatistiksel olarak plazma VEGF seviyeleri PAH'lı ratlar ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark belirlenmedi.

4.5. İmmunohistokimyasal Boyama

İmmuno histokimyasal boyama için PAH'lı ratlardan ve sağlıklı ratlardan elde edilen akciğer dokuları %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokulara rutin doku takip aşamaları uygulandı ve parafine gömülerek bloklandı. Gremlin ve VEGFR2 antikorları ile muamele edilip görüntü alındı (Şekil 4.9). İmmunohistokimyasal boyamalar sonucu Gremlin boyamasının PAH rat akciğerlerinde yoğun şekilde boyandığı görüldü. VEGFR proteininde pek bir boyanma gözlemlenmedi.



Şekil 4.9. İmmunohistokimyasal Boyamalar. (A). VEGF boyaması ise gözlenmedi (C). Her iki boyama için negatif boyamalar da yapıldı (B ve D).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

PAH nadir görülen, hızlı gelişen, öldürücü bir hastalıktır. Endüstriyelmiş ülkelerde milyonda 1-2 olguya rastlanılabileceği tahmin edilmektedir (9, 10). PH hastalığının ortalama hayatta kalma süresi 2.8 yıl olarak belirlenmiş ve ortalama 36.4 yaşlarında görülen PAH'ın 1.7/1.0 oranında kadınlarda daha sık görüldüğü saptanmıştır (9). Bu genel dağılımın ırklara göre de değişmediği görülmüştür (9, 11). PH hastalığının hala patogenezinin neler olduğu tam aydınlatılamamıştır. Hastalığın patogenezi ortaya çıkarıldığında hastalığın gerilemesi ve iyileşmesi için alternatif tedavi yolları ortaya çıkabilecektir. Bu hastalığın günümüze kadar bilinen özellikleri arasında düz kas hücre proliferasyonu, vasküler yenilenme (remodeling), anormal hücreler arası matriks bulunmaktadır. Fakat düz kas hücre proliferasyonunun veya vasküler yenilenmenin nasıl gerçekleştiği hala bilinmemektedir (69).

TGF- β ailesi, hücre proliferasyonu ve migrasyonu, hücre, farklılaşması, apoptoz, hücre dışı matriks salgısı ve depolanması gibi işlevlerde rol alan sitokin büyüme faktörlerini içermektedir. TGF- β ailesi; TGF- β izoformları (TGF- β 1, β 2, β 3), kemik morfogenetik protein (BMP), aktivin ve büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi değişik fonksiyonlarda görev alan mediyatörleri içerir. BMPR II mutasyonlar PAH'ın ciddiyetinin göstergesi olarak gelişmektedir. BMPR II'deki mutasyonlar bir veya daha fazla akrabası etkilenmiş olan bireylerin %70'den fazlasında ve idiyopatik PAH hastalarının %11-40'ında bildirilmiştir (80, 92). Yapılan deneysel çalışmalarda idiyopatik PAH' ın yanı sıra hipoksemik PAH olgularında da BMPR II mutasyonlarının rolü olduğu belirtilmektedir (98).

BMPR2'yi şifreleyen gende bulunan mutasyonlar, genetik PAH'ın ana sebebi olarak tanımlanmıştır (78). Bu mutasyonlar ayrıca FPAH'lı hastaların %70'inde, sporadik olan idiyopatik PAH'lı hastaların %26'sında ve fenfluramin kullanan PAH'lı hastaların %9'unda tespit edilmiştir (78-80). Apoptoz ve proliferasyon ile ilişkili olan BMPR2,

TGF- β ailesinin bir üyesidir (80, 81). Fakat halen BMPR2 sinyalindeki azalmanın nasıl PAH'a sebep olduğu tam olarak aydınlatılmış değildir (120).

BMP'nin negatif sinyalizasyonundan BMP antagonistleri sorumlu olup en yaygın antagonistleri noggin (108), gremlin (109), Cerberus (110), Twisted gastrulation (111), Chordin ve Crossveinless2 dir (112). BMP antagonistleri ekstrasellüler regülörlerdir ve anjiyogenezden sorumludurlar. BMP reseptöründeki anormalliklerin BMP'ye bağlanan veya downstream BMP efektör moleküllerin aktivasyonu PAH hastalığının patogenezinin oluşmasına sebep olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (2).

Gremlin intrasellüler veya ekstrasellüler yol ile BMP sinyal yolağını antagonize ettiği bilinmektedir (94). PAH hastalığında, gremlinle yapılan çalışmalar; gremlinin, pulmoner vasküler direnç ve yeniden modellemede (remodeling) merkezi bir rol üstlenmiş olduğunu göstermektedir. Gremlin ekspresyonunun artışı PAH gelişimine ve BMP sinyalizasyonunun azalmasına sebebiyet vermektedir (2).

Tezimizde BMP antagonisti olan Gremlin'in PAH hastalığının patolojisinde önemli bir role sahip olabileceğini gösterdik. Bu BMP antagonistinin kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (121) ve bu durum PAH'li hastaların proliferen hücreleri için de geçerli olabileceğini düşünüyoruz.

Tezimizin sonuçları Gremlin seviyelerinin PAH rat modelinde kontrollere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Çok hızlı ilerleyen bu kardiyopulmoner hastalıkta küçük pulmoner arterler daha çok etkilenir ve bu arterler vasküler proliferasyon ve remodeling sebebiyle fonksiyon bozukluğuna uğrarlar (122). Bu bozulmada Gremlinin de rolü olabileceği ihtimalini göstermektedir.

Hipoksi Sugen 5416 rat modeli ile ratlarda PAH hastalığı oluşturuldu. Ratları başka tekniklerle de PAH yapma imkanımız olsa da Hipoksi Sugen 5416 rat modelini seçmemizin sebebi bu rat modelinin insan PAH hastalığına en yakın oluşundadır. Diğer rat modellerinden olan Hipoksi veya monokrotolin rat modellerinde küçük arterlerde hastalığa özgü pleksiform lezyonlar oluşmazken hipoksi Sugen 5416 modelinde pleksiform lezyonlar oluşmaktadır. Bu hastalığa sahip insanların akciğerleri çok hassas olduğu için deneyler kesinlikle hastalar üzerinde yapılamamakta ve uygun hayvan

modelleri aranmaktadır. Bu sebeple çalışma için en uygun rat modeli kullanılmıştır. Bu rat modeli ve kontrollerin pulmoner arter basınçları ölçüldüğünde literatürdeki verilere paralel sonuçlar elde edilmiştir.

PAH haline getiren ratlardan ve kontrol grubundan alınan kan ve dokular Gremlin ve VEGFR2 ekspresyonları için incelendi. VEGF proteini westernblot tekniği ile ve mRNA ekspresyonu ise hem konvansiyonel hem de Real Time RTQ-RT PZR ile incelendi. Sonuçlarımızda VEGF ekspresyonunu gerek mRNA ve gerekse protein seviyesinde yüksek beklerken kontrollere göre istatistiksel olarak bir fark bulunmadı. Bunun sebebi ise ratlara verdiğimiz Sugen 5416 maddesinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Çünkü Sugen 5416 maddesi direkt VEGF reseptörlerine bağlanarak bu reseptörleri bloke eder ve bu sayede endotel hücreler fonksiyonlarını yitirirler.

Bununla birlikte Gremlin mRNA ve protein ekspresyonları incelendiğinde her ikisinin de PAH rat modelinde kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. İşte bu yüksek seviye Gremlin molekülünün PAH hastalığının oluşmasında bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Doku boyamaları da gremlin molekülünün yoğun şekilde PAH li ratların akciğerlerinde üretildiğini gösteriyor. Bu üretimden dolayı mı hastalık ilerliyor yoksa Gremlin üretimi hastalığın iyileşmesi için vücudun bir cevabı mı bilinmemektedir. Fakat hipoksi ve endotel hücrelerin fonksiyonunun kaybetmesinden sonra Gremlin artışı hastalığın şiddetini arttırdığı izlenimi vermektedir.

Bu durum sadece doku seviyesinde değil aynı zamanda ELISA sonuçları Gremlin üretiminin sirkülasyona da yansıdığını göstermektedir. Ratların kanlarındaki Gremlin miktarları incelendiğinde PAH rat modelinde belirgin ve anlamlı şekilde Gremlin seviyesinin kontrollere göre çok daha yüksek olması Gremlinin bu hastalığın patolojisinde önemli bir role sahip olacağını daha da desteklemektedir.

Gremlin BMPlere çok sağlam bir şekilde bağlanırlar ve bunların sekresyonunu engellerler (123), böylelikle pulmoner sirkülasyonda BMPleri bloke ederler (124, 125). Buna ek olarak, Gremlin akciğer doku anjiogenezini BMP'yi bloke ederek gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (4).

Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlar bize Gremlinin PH patobiyolojisinde bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu çalışmamız ileriki çalışmalar ile desteklendiği takdirde hastalığın tedavisine alternatif yeni yaklaşımların oluşmasına katkıda bulunmuş olacaktır. Gremlin gibi diğer BMP antagonistler de değerlendirilerek bu antagonistlerin bloke edilmesi ile hastalığın gerilemesi bir ileri çalışma konusu olacaktır.



6. KAYNAKLAR

1. Rubin LJ, Badesch DB. Evaluation and management of the patient with pulmonary arterial hypertension. *Annals of internal medicine*. 2005; 143(4): 282-92.
2. Cahill E, Costello CM, Rowan SC, Harkin S, Howell K, Leonard MO, et al. Gremlin plays a key role in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circulation*. 2012; 125(7): 920-30.
3. E VR. On sclerosis of pulmonary arteries. *Dtsch Arch Klin Med*. 1891(48).
4. Stabile H, Mitola S, Moroni E, Belleri M, Nicoli S, Coltrini D, et al. Bone morphogenic protein antagonist Dm/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood*. 2007; 109(5): 1834-40.
5. Andersen A, Nielsen JM, Peters CD, Schou UK, Sloth E, Nielsen-Kudsk JE. Effects of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil in the pressure overloaded right heart. *European journal of heart failure*. 2008; 10(12): 1158-65.
6. Galie N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *European heart journal*. 2004; 25(24): 2243-78.

7. Gorcsan J, 3rd, Edwards TD, Ziady GM, Katz WE, Griffith BP. Transesophageal echocardiography to evaluate patients with severe pulmonary hypertension for lung transplantation. *The Annals of thoracic surgery* 1995; 59(3): 717-22.
8. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 54: 43-54.
9. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Annals of internal medicine* 1987; 107(2): 216-23.
10. Taichman DB, Mandel J. Epidemiology of pulmonary arterial hypertension. *Clinics in chest medicine* 2007; 28(1): 1-22.
11. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 173(9): 1023-30.
12. Gabbay E, Reed A, Williams TJ. Assessment and treatment of pulmonary arterial hypertension: an Australian perspective in 2006. *Internal medicine journal* 2007; 37(1): 38-48.
13. Hachulla E, Gressin V, Guillemin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis and rheumatism* 2005; 52(12): 3792-800.
14. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Annals of the rheumatic diseases* 2003; 62(11): 1088-93.

15. Frank DB, Hanna BD. Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease and Eisenmenger syndrome: current practice in pediatrics. *Minerva pediatrica* 2015; 67(2): 169-85.
16. Kayikcioglu M, Kultursay H. [Seven years of experience in patients with pulmonary arterial hypertension in Ege University Hospital: diagnostic approach of a single center]. *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology* 2008; 8(4): 279-85.
17. Raiesdana A LJ. Pulmonary artery hypertension. *Annals of Medicine*.2006(38).
18. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43(12): 40-7.
19. Tongers J, Schwerdtfeger B, Klein G, Kempf T, Schaefer A, Knapp JM, et al. Incidence and clinical relevance of supraventricular tachyarrhythmias in pulmonary hypertension. *American heart journal* 2007; 153(1): 127-32.
20. Sun XG, Hansen JE, Oudiz RJ, Wasserman K. Pulmonary function in primary pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41(6): 1028-35.
21. Meyer FJ, Ewert R, Hoeper MM, Olschewski H, Behr J, Winkler J, et al. Peripheral airway obstruction in primary pulmonary hypertension. *Thorax* 2002; 57(6): 473-6.
22. Tunariu N GS, Win Z, Gin-Sing W, Graham A, Gishen P, Al-Nahhas A. . Ventilation-perfusion scintigraphy is more sensitive than multidetector CTPA in detecting chronic thromboembolic pulmonary disease as a treatable cause of pulmonary hypertension. *Journal of nuclear medicine* 2007(48).
23. Laboratories ATSCoPSfCPF. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; 166(1): 111-7.

24. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, et al. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000; 161(2): 487-92.
25. McLaughlin VV, Oudiz RJ, Frost A, Tapson VF, Murali S, Channick RN, et al. Randomized study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 174(11): 1257-63.
26. Sitbon O, Humbert M, Nunes H, Parent F, Garcia G, Herve P, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 40(4): 780-8.
27. Paciocco G, Martinez FJ, Bossone E, Pielsticker E, Gillespie B, Rubenfire M. Oxygen desaturation on the six-minute walk test and mortality in untreated primary pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 2001; 17(4): 647-52.
28. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 111(23): 3105-11.
29. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1992; 327(2): 76-81.
30. Galie N, Ussia G, Passarelli P, Parlangeli R, Branzi A, Magnani B. Role of pharmacologic tests in the treatment of primary pulmonary hypertension. *The American journal of cardiology* 1995; 75(3): 55-62.

31. Aytekin M, Comhair SA, de la Motte C, Bandyopadhyay SK, Farver CF, Hascall VC, et al. High levels of hyaluronan in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2008; 295(5): 789-99.
32. Nagaya N, Ando M, Oya H, Ohkita Y, Kyotani S, Sakamaki F, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a noninvasive marker for efficacy of pulmonary thromboendarterectomy. *The Annals of thoracic surgery*. 2002;74(1):180-4.
33. Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, Neurohr C, Vogeser M, Behr J. Characterization of brain natriuretic peptide in long-term follow-up of pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2005; 128(4): 2368-74.
34. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, et al. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120(5): 1562-9.
35. Zamanian RT, Hansmann G, Snook S, Lilienfeld D, Rappaport KM, Reaven GM, et al. Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 2009; 33(2): 318-24.
36. Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, et al. Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Circulation* 2007; 115(10): 1275-84.
37. Pugh ME, Robbins IM, Rice TW, West J, Newman JH, Hemnes AR. Unrecognized glucose intolerance is common in pulmonary arterial hypertension. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2011; 30(8): 904-11.

38. Kaneko FT, Arroliga AC, Dweik RA, Comhair SA, Laskowski D, Oppedisano R, et al. Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998; 158(3): 917-23.
39. Tamura Y, Ono T, Kuwana M, Inoue K, Takei M, Yamamoto T, et al. Human pentraxin 3 (PTX3) as a novel biomarker for the diagnosis of pulmonary arterial hypertension. *PloS one* 2012; 7(9) :45834.
40. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* 2009; 30(20): 2493-537.
41. Mereles D, Ehlken N, Kreuscher S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation* 2006; 114(14): 1482-9.
42. Bedard E, Dimopoulos K, Gatzoulis MA. Has there been any progress made on pregnancy outcomes among women with pulmonary arterial hypertension? *European heart journal* 2009; 30(3): 256-65.
43. Fallah F. Recent strategies in treatment of pulmonary arterial hypertension, a review. *Global journal of health science* 2015; 7(4): 307-22.
44. Rich S, Seidlitz M, Dodin E, Osimani D, Judd D, Genthner D, et al. The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114(3): 787-92.

45. Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular pharmacology* 1995; 48(5): 890-6.
46. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, et al. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39(9): 1496-502.
47. Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB, et al. Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Annals of internal medicine* 1990; 112(7): 485-91.
48. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1996; 334(5): 296-301.
49. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 2002; 347(5): 322-9.
50. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, et al. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; 165(6): 800-4.
51. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1993; 328(24): 1732-9.

52. Galie N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon MD, Keogh AM, et al. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 46(3): 529-35.
53. Barst RJ, Langleben D, Frost A, Horn EM, Oudiz R, Shapiro S, et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004; 169(4): 441-7.
54. Castro G. [Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomized placebo-controlled study]. *Revista portuguesa de cardiologia : orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology* 2001; 20(11): 1151-2.
55. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2002; 346(12): 896-903.
56. Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galie N, Boonstra A, et al. Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *The European respiratory journal* 2004; 24(3): 353-9.
57. Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 172(1): 105-13.
58. Tantini B, Manes A, Fiumana E, Pignatti C, Guarnieri C, Zannoli R, et al. Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic research in cardiology* 2005; 100(2): 131-8.
59. Bhatia S, Frantz RP, Severson CJ, Durst LA, McGoon MD. Immediate and long-term hemodynamic and clinical effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension receiving vasodilator therapy. *Mayo Clinic proceedings* 2003; 78(10): 1207-13.

60. Michelakis ED, Tymchak W, Noga M, Webster L, Wu XC, Lien D, et al. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003; 108(17): 2066-9.
61. Ghofrani HA, Schermuly RT, Rose F, Wiedemann R, Kohstall MG, Kreckel A, et al. Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003; 167(8): 1139-41.
62. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2005; 353(20): 2148-57.
63. Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, Oudiz RJ, Simonneau G, Safdar Z, et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009; 119(22): 2894-903.
64. Jing ZC, Yu ZX, Shen JY, Wu BX, Xu KF, Zhu XY, et al. Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 183(12): 1723-9.
65. Md MV, Md GC, Md GP, Md LP, Md GG, Md Phd RF. Tirofiban: a critical reappraisal of the clinical use, recent developments and future perspectives. *Future cardiology* 2006; 2(1): 17-27.
66. Kucera ET. *The Role of Gremlin 1 in Idiopathic Pulmonary Hypertension* 2013.
67. Chan SY, Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2008; 44(1): 14-30.
68. Olschewski H, Rose F, Grunig E, Ghofrani HA, Walmrath D, Schulz R, et al. Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 2001; 138(6): 367-77.

69. Önen ZP KG. Pulmoner damarların yeniden yapılanması. 2007. 18-25.
70. Das M DE, Bouche D, Reyland MR, Stenmark KR. . Chronic hypoxia induces aggregated growth responses in pulmonary arterial adventitial fibroblast. American journal of respiratory and critical care medicine 2000(22): 15-25.
71. Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, Kressin DC, Marlar RA. Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. Chest 1996; 110(3): 710-7.
72. Nicod LP. The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. Swiss medical weekly 2007; 137(31-32): 437-42.
73. Budhiraja R, Tudor RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. Circulation 2004; 109(2): 159-65.
74. Dresdale DT, Michtom RJ, Schultz M. Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. Bulletin of the New York Academy of Medicine 1954; 30(3): 195-207.
75. Loyd JE, Butler MG, Foroud TM, Conneally PM, Phillips JA, 3rd, Newman JH. Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. American journal of respiratory and critical care medicine 1995; 152(1): 93-7.
76. Morse JH, Jones AC, Barst RJ, Hodge SE, Wilhelmsen KC, Nygaard TG. Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus (PPH1) to chromosome 2q31-q32. Circulation 1997; 95(12): 2603-6.
77. Nichols WC, Koller DL, Slovis B, Foroud T, Terry VH, Arnold ND, et al. Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. Nature genetics 1997; 15(3): 277-80.

78. Newman JH, Trembath RC, Morse JA, Grunig E, Loyd JE, Adnot S, et al. Genetic basis of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future directions. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43(12): 33-9.
79. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *Journal of medical genetics* 2000; 37(10): 741-5.
80. International PPHC, Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nature genetics* 2000; 26(1): 81-4.
81. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *American journal of human genetics* 2000; 67(3): 737-44.
82. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1989; 161(2): 851-8.
83. Rubin LJ. Pathology and pathophysiology of primary pulmonary hypertension. *The American journal of cardiology* 1995; 75(3): 51-4.
84. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical pharmacology* 2004; 68(6): 1017-21.
85. Wanstall JC, Gambino A, Jeffery TK, Cahill MM, Bellomo D, Hayward NK, et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovascular research*. 2002; 55(2): 361-8.

86. Rahimi N. Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Experimental eye research* 2006; 83(5): 1005-16.
87. Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T, Ikeda E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathology international* 2000; 50(6): 472-9.
88. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001; 15(2): 427-38.
89. Yeager ME, Halley GR, Golpon HA, Voelkel NF, Tudor RM. Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension. *Circulation research*. 2001; 88(1): 2-11.
90. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of cellular and molecular medicine* 2005; 9(4): 777-94.
91. Said SI. Mediators and modulators of pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006; 291(4): 547-58.
92. Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, et al. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Human mutation* 2006; 27(2): 121-32.
93. Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003; 361(9368): 1533-44.

94. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425(6958): 577-84.
95. David L, Feige JJ, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 2009; 20(3): 203-12.
96. Newman JH. Pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 172(9): 1072-7.
97. Beppu H, Ichinose F, Kawai N, Jones RC, Yu PB, Zapol WM, et al. BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004; 287(6): 1241-7.
98. Takahashi H, Goto N, Kojima Y, Tsuda Y, Morio Y, Muramatsu M, et al. Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006; 290(3): 450-8.
99. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* 2005; 38(10): 1463-73.
100. Marukawa E, Asahina I, Oda M, Seto I, Alam MI, Enomoto S. Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles. *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 2001; 39(6): 452-9.
101. Jones CM, Lyons KM, Lapan PM, Wright CV, Hogan BL. DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development*. 1992;115(2):639-47.

102. Zou H, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 1996; 272(5262): 738-41.
103. Paralkar VM, Weeks BS, Yu YM, Kleinman HK, Reddi AH. Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: potentiation and binding to type IV collagen. *The Journal of cell biology* 1992; 119(6): 1721-8.
104. Shah NM, Groves AK, Anderson DJ. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 1996; 85(3): 331-43.
105. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth factors* 2004; 22(4): 233-41.
106. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *Journal of cell science* 2000; 113 (7): 1101-9.
107. Bandyopadhyay A, Yadav PS, Prashar P. BMP signaling in development and diseases: a pharmacological perspective. *Biochemical pharmacology* 2013; 85(7): 857-64.
108. Re'em-Kalma Y, Lamb T, Frank D. Competition between noggin and bone morphogenetic protein 4 activities may regulate dorsalization during *Xenopus* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92(26): 12141-5.
109. Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Molecular cell* 1998; 1(5): 673-83.
110. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 1998; 280(5368): 1455-7.

111. Oelgeschlager M, Larrain J, Geissert D, De Robertis EM. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 2000; 405(6788): 757-63.
112. Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, May SR, et al. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 2000; 403(6770): 658-61.
113. Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA, Brazil DP. Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. *Nephron Physiology* 2006; 103(3): 139-48.
114. Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 2004; 131(14): 3401-10.
115. Costello CM, Cahill E, Martin F, Gaine S, McLoughlin P. Role of gremlin in the lung: development and disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2010; 42(5): 517-23.
116. Shi W, Zhao J, Anderson KD, Warburton D. Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001; 280(5): 1030-9.
117. Lu MM, Yang H, Zhang L, Shu W, Blair DG, Morrissey EE. The bone morphogenic protein antagonist gremlin regulates proximal-distal patterning of the lung. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2001; 222(4): 667-80.
118. Costello CM, Howell K, Cahill E, McBryan J, Konigshoff M, Eickelberg O, et al. Lung-selective gene responses to alveolar hypoxia: potential role for the bone morphogenetic antagonist gremlin in pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2008; 295(2): 272-84.

119. Kariyawasam HH, Xanthou G, Barkans J, Aizen M, Kay AB, Robinson DS. Basal expression of bone morphogenetic protein receptor is reduced in mild asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008; 177(10): 1074-81.
120. Deng Z, Haghighi F, Helleby L, Vanterpool K, Horn EM, Barst RJ, et al. Fine mapping of PPH1, a gene for familial primary pulmonary hypertension, to a 3-cM region on chromosome 2q33. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000; 161(3): 1055-9.
121. Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(40): 14842-7.
122. Tudor RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62(25): 4-12.
123. Sun J, Zhuang FF, Mullersman JE, Chen H, Robertson EJ, Warburton D, et al. BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281(39): 29349-56.
124. Anderson L, Lowery JW, Frank DB, Novitskaya T, Jones M, Mortlock DP, et al. Bmp2 and Bmp4 exert opposing effects in hypoxic pulmonary hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010; 298(3): 833-42.
125. Frank D, Johnson J, de Caestecker M. Bone morphogenetic protein 4 promotes vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension *Chest* 2005; 128(6): 590-1.



T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 10.12.2014

Toplantı Sayısı: 11

Karar No:14/163

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 10.12.2014 tarihinde

Prof. Dr. Harun ÜLGER'in başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Harun ÜLGER	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Abdullah İNCİ	Prof. Dr.	Veteriner Fak.	
Özlem CANÖZ	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fak.	
Gökçen Yuvalı ÇELİK	Prof. Dr.	Eczacılık Fak.	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fak.	
Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	
Servet KESİM	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fak.	
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	DEKAM	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Av.	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Katılmadı
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Der. Başk.	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	Katılmadı

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.'dan, Doç. Dr. Metin AYTEKİN tarafından sunulan "Deneysel hayvan modelinde BMP antagonisti olan Gremlin'in pulmoner hipertansiyon hastalığının patolojisindeki rolünün araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 10.12.2014

Etik kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmza

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Gamze KARADAŞ DURSUN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 15.05.1989 SİVAS

Medeni Durumu: Evli

e-posta: gamzekaradas@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Melikgazi/Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	75. Yıl Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2006

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

A. SCI, SSCI, AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

B. HAKEMLİ KONGRE / SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

6. Uluslararası Katılımlı Trk Romatoloji Kongresi (Antalya, 25-29 Mart 2014)
“Sistemik Siklerozlu Hastalarda Serum Hiyaülronan Düzeyi ve Cilt Dokusu Hiyalüronan Yoğunluklarının Klinik Parametrelerle İlişkisi” (Sözlü Sunum).

40. Ulusal Fizyoloji Kongresi (Kayseri, 2-6 Eylül 2014) “Ekstraselüler Matriksin Pulmoner Hipertansiyon Üzerine Etkilerinin Hayvan Modelinde Araştırılması” (Sözlü Sunum).

Turkish Society of Physiological Sciences 41st National Physiology Congress (2015 Turkey) “The Role of Pentraxin 3 in Identification of Slow and Rapid Aortic Stenosis Progressions ” (*Poster*).

4. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Bilim Günleri (İstanbul, 2016) “Balın Yara İyileştirme Mekanizmasının Araştırılması” (*Poster*).

4. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Bilim Günleri (İstanbul, 2016) “Postpartumdaki Plazma Hiyalüronan Seviyesi İle Doğum Sayısı Arasındaki İlişkinin Araştırılması” (*Poster*).

V. Bozok Bilim Çalıştayı: Nano Karbon Malzemeler ve Uygulamaları (Yozgat, 28-29 Nisan 2016) “Akut Miyokardiyal Enfarktüsli Hastalarda Hiyalüronan Düzeyinin Araştırılması” (*Sözlü Sunum*).

V. Bozok Bilim Çalıştayı: Nano Karbon Malzemeler ve Uygulamaları (Yozgat, 28-29 Nisan 2016) “Investigations Of The Role Of Hyaluronan On The Pathology Of Pulmonary Artery Hypertension In Rat Model” (*Sözlü Sunum*).

Türk Kardiyoloji Kongresi (Antalya, Ekim 2016) “Abnormal hyaluronan levels in patients with acute myocardial infarction.” (*Poster*).