

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**APELİNİN SIÇANLARDA İN VİTRO UTERUS**  
**KASILMALARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Danışman: Doç. Dr. Selim KUTLU**  
**Zübeyde ERCAN**

**2011**

## ONAY SAYFASI

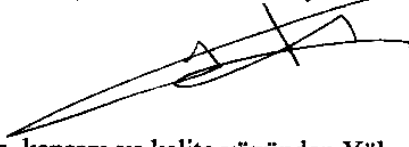
Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Selim KUTLU

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

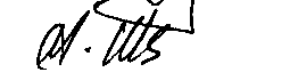
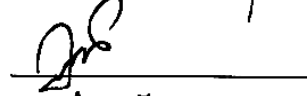
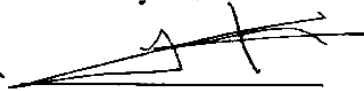
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Doç. Dr. Selim KUTLU

Doç. Dr. Aladdin POLAT

Doç. Dr. Merve ÖZCAN

Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYSAL



**TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel ve akademik tecrübesiyle bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr Selim KUTLU'ya, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk Keleştimur'a, deney aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Emine Kaçar'a, akademik yardım ve desteğinden dolayı Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Mete Özcan'a, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Engin Şahna ve bölüm asistanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

**İÇİNDEKİLER**

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
<b>1. ÖZET</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	2
<b>3. GİRİŞ</b>	3
3.1. Düz Kaslar	3
3.1.1. Düz Kaslarda Kasılma	4
3.2. Miyometriyum	7
3.2.1. Miyometriyumda Uyarılabilirlik ve Kasılma	7
3.2.1.1. Miyometriyumda Sarkoplazmik Retikulum	8
3.2.2. Miyometriyum Kasılmasının Elektrofizyolojik Özellikleri	10
3.2.2.1. Önderodaklar (Pacemaker)	10
3.2.2.2. Karakteristik Aksiyon Potansiyelleri	10
3.2.3. Miyometriyumda G-protein Sinyal Yolları	11
3.2.3.1. Miyometriyumda Fosfolipaz C	13
3.2.3.2. Miyometriyumda Adenilat Siklaz	14
3.2.4. Miyozin Hafif Zincir Fosforilasyonu, Kasılma ve Gevşeme	14
3.3. Apelin	14
3.3.1. Apelin Biyokimyası ve Metabolizması	15
3.3.2. Apelin Reseptörü	17
3.3.3. Apelinin Fizyolojik Etkileri	19
3.3.3.1. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri	19

3.3.3.2. İmmün Sistem Üzerine Etkileri	20
3.3.3.3. Besin Alımı Üzerine Etkileri	20
3.3.3.4. Apelinin İnsülin ve Obeziteyle İlişkisi	21
3.3.3.5. Apelinin Sıvı-Elektrolit Dengesi ve Hipotalamo-Hipofizyal Eksenle İlişkisi	22
3.3.3.6. Kardiyovasküler Etkileri	23
3.3.3.7. Apelin ve Solunum Sistemi	24
3.3.3.8. Apelinin Düz Kaslar Üzerine Etkisi	25
3.3.3.9. Apelinin Diğer Etkileri	26
3.3.3.10. Üreme Sistemi ve Apelin	26
<b>AMAÇ</b>	29
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	30
4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri	30
4.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	31
4.3. Krebs Solüsyonu	31
4.4. İzole Organ Banyosu	32
4.5. Apelinin Hazırlanması	33
4.6. Deney Protokolü	33
4.7. İstatistiksel Metot	34
<b>5. BULGULAR</b>	35
5.1. Birinci Protokol Grubu Bulguları	35
5.2. İkinci Protokol Grubu Bulguları	37
<b>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	39
<b>7. KAYNAKLAR</b>	43
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	61

**KISALTMALAR LİSTESİ**

<b>SR</b>	: Sarkoplazmik Retikulum
<b>IP<sub>3</sub></b>	: İnozitol Trifosfat
<b>DAG</b>	: Diaçil Gliserol
<b>PLC</b>	: Fosfolipaz C
<b>MHZ</b>	: Miyozin Hafif Zincir
<b>MHZK</b>	: Miyozin Hafif Zincir Kinaz
<b>GTP</b>	: Guanozin Trifosfat
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Monofosfat
<b>PKC</b>	: Protein Kinaz C
<b>AR</b>	: Apelin Reseptörü
<b>ICV</b>	: İntraserebrovasküler
<b>IV</b>	: İntravenöz
<b>ADH</b>	: Antidiüretik Hormon
<b>FSH</b>	: Follikülü Stimüle Edici Hormon
<b>LH</b>	: Luteinleştirici Hormon
<b>L-NAME</b>	: Nitrik Oksit Sentez İnhibitörü
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>cGMP</b>	: Siklik Guanozin Monofosfat
<b>PI3K</b>	: Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz
<b>ERK1/2</b>	: Ekstrasellüler Sinyal-Düzenleyici Protein Kinaz
<b>KL</b>	: Korpus Luteum
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	: Prostaglandin F2 Alfa

## 1. ÖZET

Yeni bir hormon olan apelin mide, yağ dokusu, kalp gibi birçok organın yanısıra özellikle beyinde hipotalamustan sekrete edilmektedir. Endokrin sistem, kardiyovasküler sistem ve metabolik işlevler gibi birçok vücut fonksiyonunda olası etkileri henüz araştırılma aşamasında olan apelin için, üreme sistemi de önemli bir hedef bölgedir. Bu çalışmada apelinin uterus kontraksiyonları üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada diöstrus dönemindeki dişi yetişkin Wistar türü (n=12) sıçanlardan elde edilen miyometriyum şeritleri, içinde Krebs çözeltisi bulunan izole organ banyosuna yerleştirildi. 1 gr gerim altında spontan kasılmalar gözlemlendi. İzometrik miyometriyum kasılmaları üzerinde 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlardaki apelinin etkisi araştırıldı. 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanan apelinin kontraksiyonların frekansını anlamlı düzeyde artırdığı görüldü ( $p<0.05$  ve  $p<0.001$ ). Sadece 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyondaki apelin uygulamasından sonra kontraksiyonların genliği anlamlı düzeyde arttı ( $p<0.01$ ). Benzer deney protokolü  $\text{Ca}^{+2}$  bulunmayan Krebs çözeltisi kullanılarak tekrarlandı. Bu grupta da 10  $\mu\text{M}$  apelinin uterus kasılmalarını indüklediği gözlemlendi.

Bu araştırmanın sonuçları apelinin sıçan uterusunda kontraksiyonları belirgin olarak indüklediğini göstermektedir. Kalsiyumsuz ortamda da aynı etkinin görülmesi, apelinin hücre içi depolardan  $\text{Ca}^{+2}$  salıverilmesini indükleyerek kontraksiyonları stimüle ettiğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apelin, miyometriyum, izometrik kontraksiyon, sıçan

## 2. ABSTRACT

A newly discovered hormone, apelin, is secreted in brain especially in hypothalamus in addition to stomach, adipose tissue and heart. There are many investigations regarding the effect of apelin on many body functions such as endocrine system, cardiovascular system and metabolic processes. But there are guide limited researchs including the effect of apelin on reproductive functions. Therefore, we looked into the effect of apelin on myometrial contractions in dioestrus rat.

Myometrial strips were removed from adult female Wistar rats (on dioestrus) following decapitation and placed in a jacketed organ bath containing Krebs solution, and isometric contractions were evaluated in this study. After equilibration, spontaneous contractions were recorded and the effects of bath application of increasing concentrations of 0.01 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M ve 10 $\mu$ M apelin on the amplitude and frequency (number of contraction-relaxation cycles/ 10-min) of contractions were evaluated by 10min intervals. One Way ANOVA was used for statistical analysis. Apelin significantly increased frequency of contractions at 1 $\mu$ M and 10 $\mu$ M concentrations ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively). Apelin also increased the peak amplitude of concentrations at only 10 $\mu$ M concentration ( $p < 0.01$ ). The other experimental protocol was repeated by using  $Ca^{+2}$  free Krebs solution. Apelin (10 $\mu$ M) was induced contractions in this group, as well.

The results of this study show that apelin induces myometrial contractions in rat. It can conclude that apelin stimulates myometrial contractions by inducing  $Ca^{+2}$  release from intracellular stores, because apelin has same effect in calcium free medium.

**Keywords:** Apelin, myometrium, isometric contraction, rat

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. Düz Kaslar

Vücudun yaklaşık % 40'ı iskelet kası, % 10'u düz kas ve kalp kasıdır (1, 2). Düz kaslar mikroskopik olarak görünür çizgilenmelerinin olmayışı nedeniyle iskelet kası ve kalp kasından ayrılırlar (3, 4, 5, 6).

Düz kas hücreleri tek çekirdekli dirler ve iskelet kaslarına göre çok küçük olmakla birlikte, boyları 20-500 mikrometre, çapları ise 1-5 mikrometre kadardır (1, 6).

Düz kaslarda  $Ca^{+2}$  için depo görevi gören bir hücre içi sarkoplazmik retikulum (SR) membran ağı vardır. Düz kasın SR'sindeki  $Ca^{+2}$  kanalları,  $Ca^{+2}$  aktiveli  $Ca^{+2}$  kanalı olan ryanodin reseptörü (RyR) ve inozitol 1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ )-kapılı  $Ca^{+2}$  kanalları olmak üzere 2 tiptir. RyR tipik olarak hücre içi  $Ca^{+2}$ 'nin artmasıyla aktive olur.  $IP_3$  kapılı  $Ca^{+2}$  kanalı ise, bazı hormonal faktörlerin etkisiyle açığa çıkan  $IP_3$  tarafından aktive edilir (7, 8, 9).

SR'ye elektriksel bağlantı sağlayan iskelet kasındaki T tübülleri düz kas hücrelerinde bulunmaz. Bunun yerine düz kasın sarkolemmasında 'kaveol' olarak adlandırılan cepler, uzunlamasına sıralanmıştır. Kaveollar hücrelerin yüzey/hacim oranını artırır (7, 10, 11).

Düz kaslar genellikle tek birimli ve çok birimli düz kaslar olmak üzere iki fonksiyonel kategoriye ayrılır. Tek birimli düz kaslarda, düz kas hücreleri elektriksel olarak birbirleriyle bağlantılıdır. Bu bağlantı hücreler arasındaki düşük dirençli 'gap junction' adı verilen yarık bağlantılarla sağlanır ve sinsityal fonksiyona sahiptir. Böylece bir hücrenin elektriksel uyarılmasını komşu düz kas hücrelerinin uyarılması takip eder. Bu tip kaslar ince bağırsak, ureter, uterus gibi içi boşluklu organ duvarlarında bulunur (4, 12, 13).

Çok birimli düz kaslar ise ayrı ayrı birimlerden oluşmuşlardır, yarık bağlantılar birkaç tane veya yoktur. Her bir lif diğerinden bağımsız olarak çalışır ve temel olarak sinir sinyalleri ile kontrol edilir. Gözün siliyer ve iris kası ile derideki piloerektör kaslar çok birimli düz kaslardandır (1, 4, 13).

Düz kaslar sinir sinyalleri, hormonlar, pace-maker aktivite, ilaçlar, kasın gerilmesi gibi pek çok sinyal tipiyle uyarılabilirler (4, 7).

### 3.1.1. Düz Kaslarda Kasılma

Düz kaslarda hücre dışı  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu  $10^{-3}$  M, hücre içi ise  $10^{-7}$  M'dır (1). Bu durum hem hücre içi ile hücre dışı arasında, hem de SR ile miyoplazma arasında çok yüksek bir  $Ca^{+2}$  gradiyenti oluşturur. Bu fark,  $Ca^{+2}$ 'nin hücre zarı ile SR zarından geçişi için bir kuvvet oluşturarak  $Ca^{+2}$ 'nin protein yapılı kanallar aracılığıyla geçişine yol açar. Bu kanallar, çoğunlukla kapalıdır ve voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olarak  $Ca^{+2}$  geçirgenliği sağlarlar (14). Sarkolemma hücre dışı sıvıdan  $Ca^{+2}$  giriş çıkışını düzenler. Düz kas kasılmasında hücre dışı  $Ca^{+2}$  önemlidir. Bu yüzden miyoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu yalnızca SR ile değil, aynı zamanda sarkolemmal aktiviteyle de düzenlenir (8, 15).

Hücrenin uyarılması, SR'deki  $Ca^{2+}$  kanallarının açılmasına yol açar ve miyoplazmik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu hızla artar. Bu salıverilme, ikinci haberci  $IP_3$ 'ün SR'deki reseptörlerine bağlanmasıyla gerçekleşir.  $IP_3$ , hücre dışında bulunan agonistlerin ilgili reseptöre bağlanması sonucu, G proteini aracılığıyla aktivasyon gösteren fosfolipaz C (PLC) enzimi tarafından oluşturulur. PLC bir membran fosfolipidi olan fosfatidilinozitol bifosfatı,  $IP_3$  ve diaçil gliserole (DAG) hidrolize eder. Daha sonra  $IP_3$ , SR'ye diffüze olarak  $IP_3$ -kapılı  $Ca^{+2}$  kanallarını açar, bu da kalsiyumun SR'den miyoplazma içerisine hızla salıverilmesiyle sonuçlanır (8, 16, 17, 18, 19).

SR'deki diğerk bir kanal olan RYR'lerin aktivasyonu öncelikle voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarından hücre içine giren  $Ca^{+2}$  ile gerçekleşir. Miyoplazmik kalsiyumun lokalize yükselmesiyle kısa süreli RYR açılmaları meydana gelir. Bu spontan, lokalize miyoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyon artışları, 'Ca<sup>+2</sup> kıvılcımları' olarak adlandırılan kısa parlak flaşlar oluştururlar (20, 21). Bu kıvılcımların frekansındaki artma sarkolemmadaki büyük iletkenliğe sahip  $Ca^{+2}$  kapılı  $K^{+}$  kanalını aktive ederek düz kasta hiperpolarizasyona yol açar. Bu hiperpolarizasyon daha sonra hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu azaltır ve gevşeme meydana gelir (7, 21, 22, 23).

Hücrede miyoplazmadan  $Ca^{+2}$ 'nın uzaklaştırılması üç yolla gerçekleşir:

1. SR membranındaki  $Ca^{+2}$ -ATPaz (SERCA) pompaları aracılığıyla SR'ye  $Ca^{+2}$  alımının artması.
2. Hücre membranındaki  $Ca^{+2}$ -ATPaz (PMCA) yardımıyla  $Ca^{+2}$  'nın hücre dışına atılması (24).
3. Diğerk ikisine oranla daha az olmak üzere  $Na^{+}$ - $Ca^{+2}$  değıştirici yardımıyla olmaktadır (24).

SERCA pompaları SR lümeni ile miyoplazma arasında yaklaşık olarak 10.000 katlık bir  $Ca^{+2}$  gradiyenti oluştururlar ve bunu sürdürürler (25). Pompalar ATP hidrolizinden elde ettiğı enerjiyle  $Ca^{+2}$ 'yı miyoplazmadan SR içine alır.  $Ca^{+2}$ , SR içine pompalandıktan sonra kalretikülin ve kalsekstrin gibi proteinlerce tamponlanır. Bu proteinlere büyük miktarlarda  $Ca^{+2}$  bağlanır. Böylece SR'de tamponlanan  $Ca^{+2}$  deposundaki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu yaklaşık olarak 10–15 mM'a ulaşır (26). Hücreden  $Ca^{+2}$  çıkışı SERCA tarafından SR'de  $Ca^{+2}$  depolanmasıyla yarışır ve böylece SR'de  $Ca^{2+}$  birikimini azaltır (7, 27, 28).

İskelet kası ve kalp kasında olduğu gibi  $Ca^{+2}$ , kasılmanın başlangıcında en önemli rolü oynar. Düz kasın kasılması hücre içi kalsiyumun artışıyla meydana gelir. İskelet kasındaki SR, kasılmada gerekli olan  $Ca^{+2}$ 'nin kaynağı iken, düz kaslarda  $Ca^{+2}$  iyonlarının hemen hepsi aksiyon potansiyeli veya diğer uyarılar sonucunda ekstraselüler sıvıdan kas hücresine girer (1, 29, 30). Bu geçiş öncelikli olarak voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla gerçekleşir. Bu kanalların aktivitesi depolarizasyon derecesine bağlıdır. Daha büyük bir depolarizasyon, hücreye daha fazla  $Ca^{+2}$  girişine ve daha güçlü bir kasılmaya yol açar (13).

Hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı, miyozindeki düzenleyici hafif zinciri (MHZ) fosforile ederek daha sonra aktinle etkileşmesine ve böylece kuvvet oluşumuna yol açan bir  $Ca^{+2}$ -kalmoduline bağımlı protein kinazı aktive eder. Kalmoduline 4  $Ca^{+2}$  molekülü bağlanır. Bu  $Ca^{+2}$ -kalmodulin kompleksi MHZ'İ fosforile eden miyozin hafif zincir kinazı (MHZK) aktive eder. Miyozin çapraz köprülerin fosforilasyonu ile miyozin başları aktine bağlanır ve çapraz köprü, ince filamanı kalın filamanın merkezine doğru çekerek dişli çark etkisi oluşturur ve kuvvet meydana gelir. Bu sırada miyozin başından adenozin difosfat ve  $P_i$  serbestleşerek ATP'nin bağlanmasına izin verir. ATP, miyozinin aktine affinitesini azaltarak miyozinin aktinden ayrılmasını sağlar. Yeni bağlanan ATP'nin enerjisi, başı yeniden sıklusa hazır hale getirmek için kullanılır. Böylece çapraz köprü bir diğer kasılma siklusu için hazırdır. Miyozin çapraz köprüsü fosforile kaldığı sürece çapraz köprü siklusu devam eder. Çapraz köprü siklusu miyoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu azalmaya kadar her siklus için bir ATP'nin hidroliziyle devam eder (15, 16, 21, 22, 31, 32, 33).

$Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki azalmayla birlikte MHZK inaktif duruma geçer ve çapraz köprüler, miyozin fosfataz enzimi tarafından defosforile edilir ve kasılma durur (7).

### 3.2. Miyometriyum

Fetüsün içinde yaşam bulduğu bir ortam olan uterus, tunika seroza (perimetriyum), tunika muskularis (miyometriyum) ve tunika mukoza (endometriyum) olarak adlandırılan üç tabakadan meydana gelmiştir. Perimetriyumu periton oluşturur. Miyometriyum, uterus duvarının en kalın katmanını meydana getirir. Buradaki düz kas hücreleri iç tarafta sirküler yönlü, dış tarafta ise longitudinal seyirlidir. Endometriyum, düz bir örtü şeklinde dış tarafındaki kas tabakasına yapışık durumdadır (7, 34, 35).

Miyometriyum spontan fazik kasılma üretebilen bir düz kastır. Miyometriyal kasılmalar nöral ya da hormonal bir uyarı olmaksızın gerçekleşebilen miyojenik özelliktedir (36). Gebelik boyunca miyometriyal aktivite, zayıf koordine olmayan kasılmalar (Braxton-Hicks kasılmaları) ile karakterizedir. Gebeliğin sonunda miyometriyum doğum ve kasılmalar için uyarılara hazırdır (37, 38). Bu uyarılar lokal, maternal, mekanik veya fetal kaynaklı olabilir (39). Doğum sırasındaki koordineli uterus kasılmalarının gelişmesi, uyarılmaya hazır durumdaki miyometriyumda yüksek frekans ve genlikteki kontraksiyonlarla ortaya çıkar (7, 39, 40).

#### 3.2.1. Miyometriyumda Uyarılabilirlik ve Kasılma

Miyometriyumda  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu kasılma ve uyarılmada önemli rol oynar. Miyometriyal hücrelerin sitozolünde serbest  $Ca^{+2}$  düşük ( $<10^{-7}$  M), hücre dışı sıvıda ve SR'de yüksek konsantrasyonda ( $10^{-3}$  M) bulunmaktadır. İstirahatteki serbest  $Ca^{+2}$  düzeyi kasılma esnasında ekstraselüler  $Ca^{+2}$ 'nın hücre içine girişiyle veya hücre içindeki depolardan salıverilmesiyle 150 nM'dan yaklaşık olarak 500 nM'a kadar artar (41, 42).

Kalsiyumun miyometriyal hücelere girişinde  $Ca^{+2}$  kanalları önemli rol oynar. Miyometriyal zarda iki tip  $Ca^{+2}$  kanalı tespit edilmiştir. Bunlar membran voltaj aktiveli (43, 44) ve hücreye ligand indüklemeli  $Ca^{+2}$  girişine izin veren reseptör aktiveli  $Ca^{+2}$  kanallarıdır (45, 46).

İnsan miyometriyumunda düşük voltajla aktivasyon gösteren geçici (T-tip) (47, 48) ve yüksek voltajla aktive olan uzun süreli (L-tip) kanallar (49, 50, 51, 52) olmak üzere voltajla aktive olan  $Ca^{+2}$  kanallarının 2 tipi bulunmuştur. T tip  $Ca^{+2}$  kanal mRNA ekspresyonu insan miyometriyumunda gösterilmiştir (53). İnsan ve sıçanlarda kasılma için gerekli olan  $Ca^{+2}$  akışının en büyük kaynağı L-tipi kanallardır (27, 48, 54, 55). T-tip kanallar ise spontan  $Ca^{+2}$  geçişini sağlarlar ve kasılmanın frekans ve genliğini artırır (56).

Kalsiyum iyonları miyometriyal hücre yüzey membranından PMCA ve  $Na^{+}/Ca^{+2}$  pompası aracılığıyla hücre dışına atılır.  $Na^{+}$  ve  $Ca^{+2}$  gradiyentleri birlikte,  $Na^{+}/Ca^{+2}$  pompası yoluyla  $Ca^{+2}$  akışını yönlendirerek membran voltajını ayarlarlar. Değişiriciler hücre içine 3  $Na^{+}$  girişini ve hücreden 1  $Ca^{+2}$  çıkışını sağlarlar.  $Ca^{+2}$  pompalarının  $Ca^{+2}$  a olan eğilimleri  $Na^{+}/Ca^{+2}$  değişiricilerden çok daha yüksektir ki bu da  $Ca^{+2}$  pompalarının  $Ca^{+2}$  çıkışında baskın mekanizma olduğunu gösterir (57, 58). Bununla birlikte gebe sıçanlarda değişiricilerle  $Ca^{+2}$ 'nin transferi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu % 60 azaltırken,  $Ca^{+2}$  pompalarıyla bu oran sadece % 30'dur (44).

### 3.2.1.1. Miyometriyumda Sarkoplazmik Retikulum

Kalsiyumun SR'den saliverilmesi SR membranındaki reseptöre bağlanan  $IP_3$ 'ün artışıyla başlar. Bu durum oksitosin gibi agonistlerin G protein aracılı reseptörlere bağlanması ile gerçekleşir. Saliverilen  $Ca^{+2}$  miktarını,  $IP_3$ , intraselüler  $Ca^{+2}$  ve SR'de depolanan  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu etkiler (45, 46, 57, 59, 60).

Miyometriyumda kalsiyumun SR'den saliverilmesindeki 2. mekanizma, SR membranındaki ryanodin reseptör kanalları aracılığıyla  $Ca^{+2}$  indüklemeli  $Ca^{+2}$  saliverilmesidir (46, 57, 59).

$Ca^{+2}$ 'nin SR'den saliverilmesinde diğere bir yol ise, SR'deki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu ve intraselüller  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu arasındaki  $Ca^{+2}$  gradiyenti nedeniyle meydana gelen pasif akıdır (61).

Miyometriyal SR'de  $Ca^{+2}$  depolanması,  $Ca^{+2}$  gradiyentine karşı çalışan SR'deki SERCA yoluyla olur. Bu mekanizma intraselüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu düşürür (46, 57).

SR'den  $Ca^{+2}$ 'nin spontan olarak saliverilmesi olarak bilinen  $Ca^{+2}$  kıvılcımları (62)  $Ca^{+2}$ -kapılı  $K^+$  kanallarını aktive edip hiperpolarizasyona yol açarak (63)  $Ca^{+2}$ -bağımlı  $Cl^-$  kanallarının aktivasyonu ile depolarizasyona sebep olur veya diğere sinyal yollarının aktivasyonu ile membran uyarılabilirliğini etkiler (32, 64). Bununla birlikte, gebe olmayan sıçanlarda  $Ca^{+2}$  kıvılcımları gözlenmemiştir (65). SR'den  $Ca^{+2}$ 'nin çıkışı, intraselüler alana  $Ca^{+2}$  girişine yol açar. Bu mekanizma doğum sırasında uyarılabilirliği artırır (46, 66).

SERCA pompaları ve ryanodin reseptörleri hücre içinde santral ve periferik olmak üzere iki ayrı alanda bulunur. Miyometriyal SR; yüzey membranına yakın olan periferik ya da yüzeysel SR ve hücre merkezine yakın olan santral veya derin SR olmak üzere iki kısma ayrılır (61). Düz kaslardaki bu alanlar arasında fonksiyonel yönden de farklılıklar gözlemlenmiştir (67). Yüzeysel SR, depolarizasyon sırasında hücreye  $Ca^{+2}$  girişini sağlarken, derin SR ise kasılma için  $Ca^{+2}$  sağlar. Bu fonksiyonel ayırım insan ve sıçan miyometriyal düz kaslarda mevcuttur (61, 66).

Kaveol yapıları, lipit yığınları olarak da bilinen yüzey membranındaki invajinasyonlardır ve periferel SR'ye yakın yerleşimlidir.  $Ca^{+2}$ -kapılı  $K^+$  kanalları ve  $Na^+$ - $Ca^{+2}$  değiştiricilerin her ikisi de kaveol içinde bulunurlar ve periferel SR, sitozolden daha fazla farklı  $Ca^{+2}$  ve  $Na^+$  konsantrasyonuna sahip sinyalleşme bölgesidir (57, 61, 66).

### **3.2.2. Miyometriyum Kasılmasının Elektrofizyolojik Özellikleri**

#### **3.2.2.1. Önder odaklar (*Pacemaker*):**

Miyometriyum sinirsel ya da hormonal uyarı olmaksızın kasılabilen bir kastır. Miyometriyumun spontan kasılmaları spontan bir şekilde depolarize olan ve aksiyon potansiyelini ateşleyen önderodak hücrelerin depolarizasyonunu takiben başlar. Önderodaklar anatomik olarak belirgin veya lokalizasyonları sabit değildir ve özelleşen hücrelerdir (46, 57, 68). Sıçan miyometriyumunda miyozitlerin yaklaşık % 25'i yavaş dalga veya zirve olmaksızın ortaya çıkan aksiyon potansiyeli şeklinde spontan elektriksel aktivite gösterir (61). Bir başka çalışmada 18–19 günlük gebe farelerden elde edilen miyometriyal hücrelerde spontan aktivite gözlenirken, 38–39 haftalık gebe insan miyometriyumlarında benzer koşullarda spontan kasılma olmadığı belirlenmiştir. Miyometriyum hücrelerindeki yarık bağlantıların hücrelerarası iletişimde oynadıkları önemli rol miyometriyal kasılmaların uterin sessizlik dönemindeki zayıf ve senkronize olmayan halinden doğumdaki güçlü senkronize kasılmalara geçişindeki etkileri yapılan deneylerde gösterilmiştir (69, 70, 71, 72).

#### **3.2.2.2. Karakteristik Aksiyon Potansiyelleri**

Çeşitli türlerin miyometriyumlarında basit dikensi potansiyeller ve kompleks potansiyeller olmak üzere iki tane belirgin aksiyon potansiyeli formu kaydedilmiştir. Basit dikensi potansiyeller; hızlı bir depolarizasyonu takiben hızlı bir repolarizasyondan

oluşur. L tipi  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla yayılan  $Ca^{+2}$  akımı depolarize fazın en büyük bölümünü oluşturur.  $Na^{+}$  akımının içeri girişiyle hızlı bir inaktivasyon meydana gelir. Dikensi potansiyeller 'burst' olarak adlandırılan gruplarda oluşurlar ve burstlerdeki artışların sayısı ve frekansı kasılma hızı ve amplitüdünü belirler (24, 57, 58, 73).

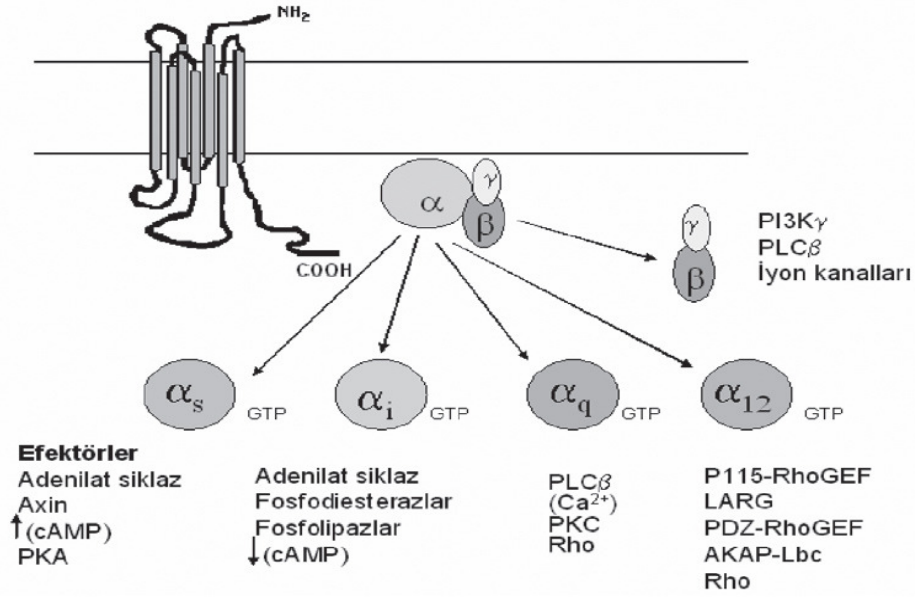
Kompleks aksiyon potansiyelleri, dikensi potansiyeli takiben sürekli bir depolarizasyon platosundan oluşur. Bu devamlı depolarizasyon zayıf  $K^{+}$  ve güçlü  $Ca^{+2}$  iletkenliğinden kaynaklanır. Bu platonun uzunluğu kasılma süresini gösterir (58).

### 3.2.3. Miyometriyumda G Protein Sinyal Yolları

Miyometriyumda G proteinleri intraselüler sinyalleşmeyle ilişkili olup miyometriyal kasılma ve gevşemenin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücre içinde  $Ca^{+2}$  artışıyla PLC, G protein bağlı plazma membran reseptörlerinin aktivasyonu sonucu stimüle edilir. Bu mekanizma ayrıca kalsiyum kanalları aracılığıyla kalsiyum girişini de uyarır. G proteinleri 7 transmembran bölgeye sahip olarak plazma zarındaki hücre yüzeyi reseptörleri ve efektörleri ile kenetlenerek hücrel sinyal iletiminde önemli roller üstlenirler. G proteinleri GTP'nin bağlandığı ve hidrolizlendiği bir  $\alpha$  altbirim ile bir  $\beta\gamma$  kompleksinden oluşmaktadır (74).  $\alpha$ -altbirimi guanin nükleotit bağlama bölgesi ile doğal GTPaz etkinliğinden sorumlu bölgeyi içerir ve ayrıca, G proteinlerinin reseptör ve efektör ile etkileşimlerinin özgüllüğünü belirler. G proteinlerinin özgüllüğünü tanımlayan  $\alpha$  altbirimleri aminoasit dizilerinin benzerliğine göre *G $\alpha$ s*, *G $\alpha$ i/o*, *G $\alpha$ q/11* ve *G $\alpha$ 12/13* olmak üzere dört aileye ayrılmıştır ve etkileştikleri efektör moleküllerde farklılıklar bulunmaktadır (75). *G $\alpha$ i/o* ailesinin üyelerinden olan *G $\alpha$ i*, adenilat siklazın baskılanması ile cAMP derişiminde azalmaya neden olan G proteindir ve *G $\alpha$ i1*, *G $\alpha$ i2*, *G $\alpha$ i3* olmak üzere üç tipi bulunmaktadır. PLC'nin oluşturduğu  $IP_3$  ve DAG gibi ikinci habercilerin düzenleyicisi ise *G $\alpha$ q/11*'dir (41, 76). PLC'nin G protein aracılı

düzenlenmesinde iki farklı mekanizma vardır ve bu mekanizmalar boğmaca toksini inhibisyonuna duyarlılıklarına göre ayırt edilir. PLC  $\beta$  izoformlarının hepsi G proteinlerinden boğmaca toksinine duyarsız  $G_{\alpha q/11}$  ailesinin üyeleri ile uyarılabilir. PLC  $\beta$ 'nın boğmaca toksinine duyarlı düzenlenmesinin  $G_{\alpha i/o}$  ailesinin boğmaca toksine duyarlı üyelerinin  $\beta\gamma$ -altbirimleri aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir. G proteinleri inaktif durumdayken  $\alpha$ -altbirimi,  $\beta\gamma$  kompleksi ve GDP birbirine bağlıdır. Bu durumda G proteini hücre dışı reseptörle ya da hücre içi efektör sistemleri ile etkileşim halinde değildir. Bir sinyal molekülünün G protein kenetli reseptöre bağlanmasıyla reseptör uyarılır. Uyarılan reseptör,  $\alpha$  altbiriminin guanin nükleotit bağlama bölgesinden GDP'nin serbestlenmesine ve yerine GTP'nin bağlanmasına yol açar. GTP'nin bağlanması, G proteininde yapısal değişikliğe neden olur ve GTP bağlı  $\alpha$  altbirimi, uyarılmış reseptörden ve  $\beta\gamma$ 'den ayrılır. Sonra, hem  $\alpha$ -altbirimi hem de  $\beta\gamma$  kompleksi iyon kanalları ya da enzimler gibi efektörlerin aktivitesini düzenlerler (76, 77).

İnsan miyometriyumunda çeşitli G proteinleri bulunmuştur.  $G_{\alpha s}$  adenil siklaz aktivitesini uyarır,  $G_{\alpha 1-3}$  izoformları ve  $G_{\alpha 0}$  adenil siklazı inhibe eder,  $G_{\alpha q}$  ve  $G_{\alpha 11}$  PLC aktivitesini etkiler ve tüm bu proteinler gebe ve gebe olmayan miyometriyumlarda gösterilmiştir (77, 78).  $G_{\alpha 1}$ ,  $G_{\alpha 3}$ ,  $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha 11}$  proteinleri gebe ve gebe olmayan kadınlarda benzer seviyelerde iken, gebelerde  $G_{\alpha 2}$  azalmış ve  $G_{\alpha 0}$  artmıştır.  $G_{\alpha s}$  ekspresyonunun gebelerdeki büyük orandaki artışı  $G_{\alpha s}$ 'ye bağlı adenil siklaz aktivitesinin artmasına yol açar. Böylece gebelik boyunca intraselüler cAMP seviyesi artar ve bu da uterin sessizliğe neden olur (45).



**SEKİL 1:** G proteinlerinin özgülüğünü tanımlayan  $\alpha$ -altbirimleri amino asit dizilerinin benzerliğine göre Gas, Gai/o, G $\alpha$ q/11 ve G $\alpha$ 12/13 olmak üzere dört aileye ayrılmıştır ve etkileştikleri efektör moleküllerde farklılıklar bulunmaktadır (75).

### 3.2.3.1. Miyometriyumda Fosfolipaz C

PLC, uygun ligandın membrandaki bulunan agonistlerin reseptöre bağlanması sonucu G proteini aracılığıyla aktivasyon gösterir. Oksitosin, vazopressin, prostaglandin F<sub>2</sub> alfa (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) gibi birkaç hormon PLC yolağını kullanan spesifik reseptörlere bağlanırlar. Uyarılmış reseptörün G proteinini stimülasyonu sırasında dissosiasiyeye olan  $\alpha$  alt birim PLC'yi aktive etmektedir. Daha sonra bu enzim miyometriyum hücre membranında bulunan fosfatidilinozitol bifosfatın iki ayrı ikinci haberci olan DAG ve IP<sub>3</sub>'e parçalanmasını sağlar (45). IP<sub>3</sub> sitozolden geçerek SR zarında bulunan IP<sub>3</sub>'e duyarlı Ca<sup>2+</sup> kanallarına bağlanarak Ca<sup>2+</sup> salgılanmasına neden olur. DAG ise protein kinaz C (PKC) enzimini aktive eder. PKC bazı proteinleri fosforilleyerek hücre çoğalmasında rol alır (45, 79).

### 3.2.3.2. Miyometriyumda Adenilat Siklaz

Adenilat siklaz enzimi ATP'den cAMP oluşumunu indüklemektedir. cAMP, etkisini inaktif protein kinaz A enzimini aktive ederek gösterir. Protein kinaz A, bir hücresel protein olan MHZK'yı fosforile eder ve bu enzimin kalsiyum kalmodulin kompleksine olan affinitesini azaltır (45). Böylece miyometriyal gevşemeye yol açar. Aynı zamanda protein kinaz A, PLC'yi inhibe ederek kalsiyum girişini engeller ve kalsiyum pompalarının aktivasyonunu inhibe ederek de düz kaslarda gevşemeye yol açar (45).

### 3.2.4. Miyozin Hafif Zincir Fosforilasyonu, Kasılma ve Gevşeme

Miyometriyal düz kaslardaki kuvvet üretimi intraselüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu ile düzenlenir.  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki artış  $Ca^{+2}$ -kalmodulin kompleksinin şekillenmesine ve miyozin hafif zincirlerin fosforile olarak aktomyozin çapraz köprü formasyonuna yol açar ve kasılma gerçekleşir. İntraselüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu azaldığında, MHZK aktivasyonu durur ve miyozin hafif zincir fosfataz aracılığıyla MHZ defosforile olarak gevşeme meydana gelir. MHZ'in defosforilasyonu miyozin ATPaz'ın aktivasyonunu inhibe eder, böylece çapraz köprü siklusu bazal seviyesine döner (46, 57).

### 3.3. Apelin

Apelin, orfan reseptör APJ'nin ilk endojen ligandı olarak tanımlanan 36 aminoasitten oluşmuş peptit yapılı bir hormondur (80). Orjinal olarak ilk defa sığır midesinden izole edilmiştir (81). Bu peptide APJ-reseptör ligandı olmasından dolayı 'apelin' adı verilmiştir (80, 82).

İnsanlarda apelin ekspresyonu ilk olarak kaudat nukleus, hipokampus, talamus, paraventriküler nukleus, preoptik alan, periventriküler hipotalamus, ventromedial ve

dorsomedial nükleuslar ve frontal kortekste belirlenmiştir (83). Daha sonraki çalışmalarda, apelin mRNA, özellikle spinal kord, korpus kallozum, amigdala, substansiya nigra, hipofiz bezinin yanısıra böbrekler, kalp, akciğerler, plasenta ve meme bezleri gibi insan merkezi sinir sistemi ve birçok perifer dokularda gösterilmiştir (84, 85, 86).

### **3.3.1. Apelinin Biyokimyası ve Metabolizması**

İnsanlarda apelin geni kromozom Xq 25–26,1'de yerleşmiştir (83). Apelin, 77 aminoasitten oluşan bir öncül maddeden derive olmaktadır (87) ve apelin-12,13,16,17,19 ve 36 gibi birkaç aktif peptit formlarına ayrılır (80, 82, 87). 23 tane aminoasit bu öncül maddenin C uç kısmında lokalize olmuştur ve C uç kısmı türler arasında büyük benzerlik göstermektedir (80).

İlk bulunan apelin peptiti apelin-36 olsa da, daha sonraki çalışmalarda apelinin daha kısa diğer formları da insan dokularında ve sığır kolostrumunda tespit edilmiştir (80, 82, 88).

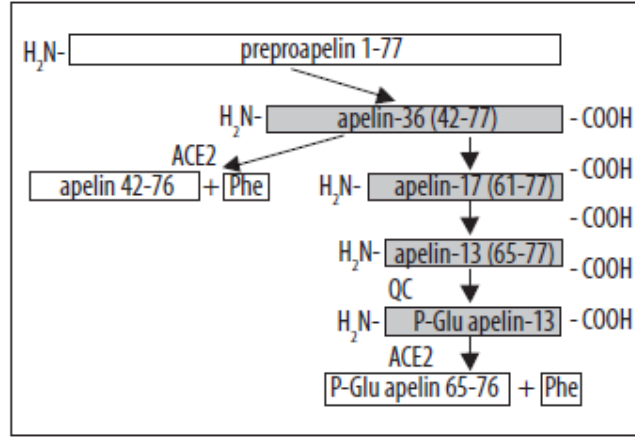
Apelin reseptörünün aktivasyonuna yol açan apelin peptitleri en az 12 C uç kalıntısına sahiptirler (86, 89, 90). Son 12 C uç aminoasit formu en kısa aktif sıradır, apelin-11 ve daha kısa peptitler inaktiftirler (90). Apelin 13, apelin reseptörü aktive etme yeteneğine sahip en kısa aminoasit dizisine sahiptir. Apelin 12 ise çok daha fazla aktiftir. Bu nedenle preproapelinin 65-77 son kısmı (C-uç) apelinin biyolojik aktivitesi ve reseptöre bağlanması için büyük önem taşımaktadır (82, 91). Apelinin N uç kısmı ise ligand reseptör etkileşiminde anahtar rol oynar (86). N uç kısmının aminoasit sırası LVQPRGPRSGPGPWQGG şeklindedir ve bu diziliş bilinen protein ve peptitlerin hiçbirisiyle benzer değildir. Bu kısım ayrıca hidrofobik aminoasit yönüyle zengindir (80).

APELİN-36	H2N- LVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQ <b>RPRLSHKGMPF</b> - COOH
APELİN-17	H2N-KFRRQ <b>RPRLSHKGMPF</b> -COOH
PYR-APELİN-13	HN-Pyr- <b>RPRLSHKGMPF</b> -COOH
APELİN-13	H2N-Q <b>RPRLSHKGMPF</b> -COOH
APELİN-12	H2N- <b>RPRLSHKGMPF</b> -COOH

**TABLO:1** İnsan apelinin biyoaktif formlarının aminoasit dizisi ve apelin-12 C terminal bölgesi (her bir peptit dizisinde koyu renkli olarak yazılmıştır). Pyr: piroglutamilat.

Apelin peptitlerinin biyolojik aktiviteleri peptit uzunluklarıyla ters orantılıdır. Apelin-17 apelin-36'dan daha güçlü, apelin 13'den daha zayıf bir etkiye sahiptir (80). Apelin-13 apelin-17'den 8 kat, apelin-36'dan 60 kat daha etkindir (80).

Apelin 13'ün piroglutamilat formu yapı olarak apelin-13'den daha stabildir ve çoğunlukla apelinin kısa formu olarak piroglutamilat kullanılmaktadır (88). Bazı çalışmalarda, apelin-13'ün reseptöre bağlanma eğiliminin apelin-36'dan daha fazla olduğu gösterilmiştir (92) ve apelin-36 reseptörden daha zor ayrılır (82).



**SEKİL 2:** Apelin peptitlerinin sentez ve metabolizması. Biyolojik olarak aktif peptitler gri renkte gösterilmiştir. QC-glutaminil siklaz, ACE2-anjiyotensin dönüştürücü enzim-2, P-glu-piroglutamilat, Phe-fenilalanin (93).

Apelin metabolizmasının bilinen tek yolu anjiyotensin dönüştürücü enzimdir (94). Ancak son yıllarda apelin-13 ve apelin-36'nın C uç kısmından fenilalanini ayıran bu enzimden başka çinko içerikli karboksipeptidaz enzimi de bulunmuştur (91). Plazmadaki başlıca apelin peptitleri apelin-13 ve daha az olarak apelin-17'dir (93). Sıçanlarda plazma apelin seviyesi 23 pmol/L iken (26), insanlarda ise 89.8 pq/ml kadardır (95). Apelinin plazmadaki konsantrasyonu diğer dokulara göre oldukça azdır. Bu da apelinin dolaşımda bir endokrin faktör olmasının yanında, nörotransmitter olarak parakrin bir ekiye sahip olabileceğini göstermektedir (87).

### 3.3.2. Apelin Reseptörü

1992 yılında O'Dowd ve arkadaşları anjiyotensin tip 1 reseptör geniyle oldukça büyük diziliş benzerliği gösteren bir gen keşfetmişlerdir (81). Bu yeni gen, APJ olarak isimlendirilerek G protein bağlı reseptör olarak kodlanmıştır (81). APJ, Tatamoto ve arkadaşları 1998 yılında apelin tanımlayana kadar orfan olarak kalmıştır (80). APJ

(apelin reseptörü, AR, anjiyotensin 1 benzeri reseptör) orjinal olarak insan genomik DNA'sından polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla izole edilmiştir (81). 380 aminoasitten oluşan bu reseptörün geni 11. kromozomun q12.1 kısmında yerleşmiştir (81). Bu reseptör için İnsan Genom Örgütü APLNR sembolünü onaylamıştır. Bu reseptör, AGTRL1, APJ, APJR ve FLJ90771 gibi birkaç isme de sahiptir (96). APJ fare, sıçan, maymun, inek, zebra ve kurbağa gibi diğer birkaç türde de tanımlanmıştır (96).

APJ ekspresyonu, sıçanlarda hemen hemen tüm perifer dokularda gösterilmiştir ancak kalp ve akciğerlerde en yüksek oranda bulunmuştur (82). Daha düşük seviyede sıçan böbrek, hipofiz bezi ve iskelet kasında (97) ve ayrıca endokardiyal ve endotelial hücrelerde eksprese edilmektedir (86, 98, 99, 100). Sıçan beyinde özellikle hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler nükleuslarda, hipofiz ön lobunda, epifiz bezi, olfaktor sistem nükleuslarında ve hipofiz ara lobda da ekspresyonu gösterilmiştir (101). İnsanlarda ise APJ mRNA; karaciğer, mide, pankreas, vasküler endotelial ve düz kas hücreleri, plasenta, adipoz doku, akciğerler, kalp, timus, prostat, testis, ovaryum, dalak, barsaklar ve beyin olmak üzere birçok merkezi ve perifer dokularda bulunmuştur (73, 83, 86, 97, 98, 99). Ayrıca büyük çaplı kan damarlarında otoradyografiyle apelin bağlı bölümlerin varlığı belirlenmiştir (102). Beyinde APJ ekspresyonu, beyaz maddenin glial hücrelerinde (103), serebral korteks, epifiz bezi, hipofiz bezi, hipokampus, piriform korteks, dentat girus, lateral olfaktor traktus nükleusları, dorsal rafe nükleuslarında ve hipotalamusta (86, 99, 103) gösterilmekle birlikte beyindeki en yoğun ekspresyon bölgeleri hipotalamustaki paraventriküler ve supraoptik nükleuslar olarak tespit edilmiştir (83, 97).

Fare apelin reseptörü 377 aminoasitten oluşmuştur ve insan apelin reseptörüyle % 91 diziliş benzerliği vardır. Sıçan apelin reseptörü ise 377 aminoasitten oluşmuştur ve insan reseptörüyle % 89 diziliş benzerliği vardır (96).

APJ ile Angiotensin II (AT2) reseptör arasında önemli yapısal benzerlik (aminoasit dizilişi yönüyle % 30–40 benzerlik gösterir) olmasına rağmen AT2, APJ ile etkileşime girmemektedir. Her iki reseptör arasında tüm aminoasit dizisinde 115 aminoasit (% 30) (104) ve transmembran bölgede 86 aminoasit (% 54) aynıdır (81), aynı zamanda doku ekspresyonunda yüksek oranda benzerlik vardır (86). Bu benzerliklere rağmen AT2, apelin reseptörüne bağlanmadığı gibi, apelin de AT1 reseptöre bağlanmamaktadır (83, 105).

### **3.3.3. Apelinin Fizyolojik Etkileri**

Yeni bir hormon olmasına rağmen apelinin organ ve sistemler üzerindeki etkilerini konu alan birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Peptidin etki alanları genel olarak, metabolizma, kardiyovasküler sistem, hipotalamo-hipofizyal sistem ve üreme sistemidir.

#### **3.3.3.1. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri**

Kemirgenlerin gastrointestinal traktuslarında apelin ve APJ bulunmuştur (106, 107, 108). Apelin ekspresyonu, en yüksek düzeyde mide fundusunda ve daha az olarak barsaklarda gösterilmiştir. Duodenum ve kolona kıyasla ileumda daha yüksek miktarda eksprese edilir (107).

Apelin in vitro ortamda, mide hücre proliferasyonunu artırır. Apelin–13 kemirgen intestinal dokudan kolesistokinin sekresyonunu stimüle eder (107). Apelin–13 ve APJ, gastrik entero-kromafin benzeri hücrelerde de eksprese edilir ve gastrik asit sekresyonunu inhibe eder (109).

### 3.3.3.2. İmmün Sistem Üzerine Etkileri

APJ insan (HIV) ve maymun immün yetmezlik virüslerinin hedef hücre içine girişinde bir koreseptör olarak işlev görmektedir (110, 111). Benzer şekilde APJ'nin, HIV tarafından membrana tutunma ve hücreye giriş için kullanıldığı gösterilmiştir (99, 110, 112). Apelin peptitleri HIV'in APJ eksprese eden beyindeki NP-2/CD4 hücrelerine girişini inhibe etmektedir (113, 114, 115). Apelin peptitlerinin bu inhibitör etkisi moleküler büyüklükleriyle ilgilidir (113, 116). Apelin-36 en yüksek inhibitör etkiyi gösterirken onu sırasıyla apelin-17, apelin-13 ve apelin-12 izlemektedir. Apelin reseptörüne bağlanmayan apelin-11'in ise herhangi bir etkisi yoktur (58). Son olarak HIV ile enfekte olmuş dokulardaki apelin ekspresyonu normal dokulara göre daha az bulunmuştur (113).

Apelin immün sinyalleşmede etkilidir ve insanlarda hücre serilerinde T hücrelerinin kolinerjik aktivitesini etkiler. İn vitro, apelin-36 fare dalak hücrelerinde CD3 aktivasyonu ile kısmen sitokin üretimini baskılayarak (88, 117) fare ovaryum hücreleri üzerinde kemotaksik aktivite gösterir (82).

### 3.3.3.3. Besin Alımı Üzerine Etkileri

Apelin-13'ün piroglutamilat formunun intraserebrovasküler (İCV) uygulanması, sadece aç hayvanlarda ve doz bağımlı olarak besin alımını anlamlı düzeyde artırır (118). Bir başka çalışmada ise hormonun İCV uygulanması hem aç hem de tok hayvanlarda besin alımını azaltmıştır (119). O'Shea ve arkadaşları apelin-13'ün İCV uygulandığında gündüz besin alımını stimüle ettiğini gece ise baskıladığını göstermişlerdir (120).

Apelin 13 hem intravenöz (İV) hem de intraperitoneal uygulandığında besin alımını etkilememiştir (119, 121).

### 3.3.3.4. Apelinin İnsülin ve Obeziteyle İlişkisi

Apelin mRNA ve proteini insan ve fare yağdoku hücrelerinde bulunmuştur (122). Büyük miktarda beyaz adipoz dokudan, daha az miktarda kahverengi adipoz dokudan eksprese edilmektedir (122).

İnsülin yağ dokuda apelin sentezini stimüle eder (122, 123, 124) ve plazma apelin seviyesi hiperinsülinemi ve insülin direnciyle ilişkili olarak obezitede önemli düzeyde artış gösterir (93). Plazma apelin konsantrasyonu obez farelerde zayıf farelere göre 2–4 kat daha yüksektir (122, 123). Bununla birlikte, obez hayvan modellerinde apelin ekspresyonundaki artışın en büyük belirleyicisi yağ dokudan çok insülin seviyesidir (122). Hiperinsülinemik obez farelerde hem adipozitlerdeki apelin sentezi hem de plazmada apelin seviyesi oldukça yükselmiştir (122).

Apelinin insülin sekresyonu üzerinde belirgin inhibe edici etkisi belirlenmiştir (100). İn vivo ve in vitro apelin–36, glikozla indüklenmiş insülin sekresyonunu stimüle etmektedir (100).

Yağ dokudaki apelin ekspresyonu açlıkta güçlü bir şekilde inhibe olur ve yemekten sonra plazma insülin ve apelin seviyesinin artmasına paralel yağ doku apelin mRNA düzeyleri hızla normale döner (122).

Yağ dokudan apelin ekspresyonu yağ hücrelerinin hipertrofi derecesini yansıtır (84). Apelin yağ dokunun damarlanmasına yol açar (125).

Apelin, yağ dokuda normal ve insülin dirençli kemirgenlerde glikoz kullanımını artırarak plazma glikoz seviyesini düşürür (126). Obez ve insülin dirençli farelerde apelin insülin duyarlı dokularda glikoz alımını artırır (126).

Plazma apelin seviyesi, tip 2 diyabetli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşüktür (127, 128). Ancak daha önce tedavi gören tip 2 diyabetli hastalarda bu

bulgulara zıt sonuçlar elde edilmiştir (129). Apelinin bu hastalarda bazal ve glikoz uygulandıktan 2 saat sonraki plazma seviyesi yükselmiştir ve glikoz toleransı da azalmıştır (129). Ayrıca deneysel olarak diyabet oluşturulmuş farelerde apelin ekspresyonu azalmıştır (122). İnsülinin tersine, glikozun apelin sentezi üzerinde herhangi bir etkisi yoktur (122, 124).

Apelinin, insan ve kemirgen pankreas dokularında baskın olarak alfa ve beta hücrelerde ekspresyonu gösterilmekle beraber apelin pankreasta ve yağ dokuda glikokortikoidlerce negatif yönde regüle edilir (124). Plazma apelinini insanlarda vücut kitle indeksiyle pozitif korelasyona sahiptir (130).

### **3.3.3.5. Apelinin Sıvı-Elektrolit Dengesi ve Hipotalamo-Hipofizyal Eksenle İlişkisi**

Apelin ve APJ, hipotalamusta vazopressin ve oksitosinin sentezlendiği supraoptik ve paraventricüler çekirdeklerde bol miktarda eksprese edilir (97, 101, 131, 132, 133). Normal hidrate sıçanlarda apelinin santral ve periferal uygulanması su alımını artırmaktadır (83, 91, 118).

İzole sıçan hipotalamik doku örneklerinde, apelin antidiüretik hormon salınımını stimüle eder (118). Buna zıt olarak bir başka çalışmada, apelinin farelerde ICV uygulandığında vazopressinerjik nöronların aktivitesini ve vazopressin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (132) diürezisi artırır (97, 134, 135) su alımına yol açarak dehidratasyonu azaltır (118, 132). Dehidratasyon, apelin (135) ve APJ (136) ekspresyonunu artırır ve ADH ekspresyonunu azaltır (135).

Apelinin İCV uygulanması plazma adrenokortikotropik hormon ve kortizölü artırır, prolaktin, follikül stimüle edici hormon (FSH), luteinizan hormon (LH) ve tiroid stimüle edici hormonu baskılar, büyüme hormonu üzerinde ise herhangi bir etkisi

yoktur. İn vitro, apelin-13 hipotalamik doku örneklerinden kortikotropik hormon ve arjinin vazopressin salınımını stimüle eder, fakat nöropeptit Y üzerinde herhangi bir etkisi yoktur (118). Apelin-17'nin in vitro olarak perfüzyon sistemiyle ön hipofize uygulanması bazal adrenokortikotropik hormon sekresyonunu anlamlı düzeyde artırır (137).

### 3.3.3.6. Kardiyovasküler Etkileri

Apelin kardiyovasküler sistemde güçlü vazodilatatör ve pozitif inotropik etkiye sahiptir. Apelinin güçlü doz bağımlı inotropik etkisi, sıçanlarda (138, 139, 140) ve farelerde in vivo olarak gösterilmiştir (141, 142). İn vitro çalışmalarda da apelinin güçlü pozitif inotropik etkisi direk olarak sıçan (142, 143, 144) ve insan (145) kalp dokusunda belirlenmiştir.

Apelinin inotropik etkisi PKC ve PLC aktivitesinin sonucudur. İzole sıçan kalbinde PLC'nin blokajı apelinin pozitif inotropik etkisini % 68 oranında azaltır. Benzer sonuç PKC'nin blokajıyla da elde edilmiştir (142). PLC DAG yoluyla PKC'yi aktive eder.

Apelin sıçan kardiyak miyozitlerde kalsiyum geçişinin amplitüdünü PKC'den bağımsız olarak artırırken, SERCA ve  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  pompasının aktivitesini PKC bağımlı olarak artırır, ancak SERCA üzerindeki etkisi daha azdır. Böylece SERCA ile içeri alınan kalsiyum miktarı pompa ile dışarı atılan kalsiyum miktarından daha az olduğundan SR'deki  $\text{Ca}^{+2}$  içeriği azalır. Ayrıca apelin ryanodin reseptör aktivasyonunu da artırarak daha fazla kalsiyum salıverilmesini sağlar ve bu etki ise PKC'den bağımsızdır (146).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pompaları, PKC, PLC apelinin pozitif inotropik etkisinde önemli rol oynarlar (142).

Apelinin pozitif inotropik etkisinin hızlı bir artışla geçici olduğunu gösteren çalışmaların (144) yanısıra yavaş bir şekilde artarak sürekli bir inotropik cevaba yol açtığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (139, 142, 147).

Kemirgenlerde eksojen apelin uygulaması nitrik oksit (NO) bağımlı mekanizmayla hızlı bir şekilde kan basıncında ve ortalama kapiller basınçta düşüğe yol açar, güçlü vazodilatör ve venodilatör etki gösterir (83, 91, 132, 148, 149, 150, 151, 152, 153).

Apelinin periferel uygulanmasına zıt olarak İCV uygulanması uyanık sıçanlarda ortalama arteryel basınçta doz bağımlı artışa yol açar (152). Apelinin kan basıncının düzenlenmesindeki santral etkisi, periferel etkisinden daha büyüktür (152, 154).

Apelin in vitro, insan safen vende (102, 105) ve mamarian arterde (145) vasküler düz kas üzerine direk etkiyle vazokonstriksiyona sebep olur.

Apelin ve APJ'nin insanlarda kalp yetmezliğinin patofizyolojisinde rolü vardır (95, 104) ve NO bağımlı mekanizma yoluyla kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu etki gösterebilir (140, 150, 155, 156, 157).

Apelin-APJ eksenini, kalbin kasılma gücünü artırarak başlangıçta kompensatuar olarak işlev görerek erken dönemde sentezi artar (104, 138, 139, 158), fakat daha sonra kalp yetmezliğinin son döneminde sentezi azalmaya başlar (104, 159, 160, 161).

### **3.3.3.7. Apelin ve Solunum Sistemi**

Apelin solunum fizyolojisinde önemli bir role sahiptir. Sıçan akciğerlerinde yüksek miktarlarda apelin ve APJ mRNA ekspresyonu gösterilmiştir (82, 87). Apelin-13'ün traktus solitarius mikroyenjeksiyonu apineyle sonuçlanmıştır (154). Plazma apelinini kronik parankimal akciğer hastalığında azalmıştır (162). Kronik hipoksik pulmoner hipertansiyonu olan sıçan modelinde, akciğer dokusundaki apelin

konsantrasyonu azalmıştır ancak pulmoner doku kitlesinin artması sonucu toplam pulmoner apelin içeriği aynı kalmıştır (163).

Pulmoner apelin içeriği hipoksiyle değişmez ve plazma apelin seviyesiyle aralarında bir korelasyon yoktur. Apelin normoksik sıçan arterinde vazokonstrüktör tonusu düzenler ve bu etkisi hipokside görülmemiştir (163).

### 3.3.3.8. Apelinin Düz Kaslar Üzerine Etkisi

Apelin ve APJ, düz kas hücrelerinde eksprese edilir (85, 89, 102). Apelin in vitro ve in vivo, düz kas hücrelerinde doz bağımlı olarak MHZ'in fosforilasyonuna yol açar (164). Apelin, sıçan miyozitlerinde  $Ca^{+2}$  geçişinin amplitüdünü artırır ve elektriksel stimülasyon boyunca SR'deki  $Ca^{+2}$  içeriğini azaltır. Apelinin bu etkisi üzerinde PKC'nin önemli bir katkısı vardır. SR'deki kalsiyum içeriğinin azalması PKC bağımlı mekanizmayla olurken,  $Ca^{+2}$  geçişinin artması ise PKC'den bağımsızdır (147).

Sıçan torasik aortadan izole edilen vasküler düz kaslarda apelin, PI3K (fosfatidil inositol 3 kinaz)/Akt-ERK1/2 sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak stimüle eder. Apelin APJ'ye bağlandığında PI3K'nın fosforilasyonuna yol açar o da Akt (hücre proliferasyonu, migrasyonu ve apoptoza karşı koruma için gerekli bir enzim) ve onun sinyal molekülü olan ERK1/2' yi (ekstraselüler sinyal düzenleyici protein kinaz) aktive eder, siklin D1 sentezlenir ve bu döngü hücre proliferasyonuna yol açar (165, 166). Bir başka çalışmada apelin fare osteoblastik hücrelerde JNK (hücre proliferasyonunda ve apoptozda önemli rolü olan bir enzim) ve PI3-K/Akt yolağını kullanarak proliferasyonu stimüle ettiği ve apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (131).

Apelin, insan umbilikal arter düz kas hücrelerinde yapılan çalışmada serum yoksunluğuna bağlı olarak meydana gelen apoptozu baskılar ve bu anti apoptotik

etkisini PI3-K/Akt sinyal yolları aracılığıyla APJ reseptörlerini kullanarak gerçekleştirir. Apelin bu yolları aktive ederek hücrel gelişimin devamını sağlar (167). Apelinin, aynı yolağı kullanarak insan osteoblast hücrelerinde de apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (167).

### **3.3.3.9. Apelinin Diğer Etkileri**

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinde embriyonik formasyon sırasında apelin reseptörlerinin ekspresyonu gözlemlenmiştir (98). Apelin, ERK ve Akt fosforilasyonuna yol açar ve in vitro bu endotel hücrelerin proliferasyonunu sağlar. Apelin gözde vitröze enjekte edildiğinde retinal vasküler ağdaki endotel hücreleri artırır (168).

Apelin osteoblastlarda eksprese edilerek bu hücrelerde proliferasyonu stimüle eder (167, 169). Nöronlarda apoptozu inhibe eder (170).

### **3.3.3.10. Üreme Sistemi ve Apelin**

Sığır over folliküllerinde granüloza hücrelerinin farklı gelişim safhalarında apelin mRNA ekspresyonu bulunmamakla birlikte APJ ekspresyonu, östrojen-inaktif dominant folliküllerin granüloza hücrelerinde diğer folliküllere kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. Apelin mRNA östrojen-inaktif dominant folliküllerin teka hücrelerinde diğerlerine kıyasla anlamlı düzeyde artış gösterir. APJ mRNA ekspresyonu ise preovulator folliküllerin teka hücrelerinde küçük folliküllere göre artmıştır (171, 172).

FSH, in vitro kültür granüloza hücrelerinde APJ ekspresyonunu inhibe eder. LH, teka hücrelerinde apelin ve APJ mRNA ekspresyonunu stimüle eder. Progesteron, granüloza hücrelerinde APJ ekspresyonunu stimüle eder (172).

Apelin ve APJ'nin intraluteal arterlerin düz kaslarında lokalizasyonu gösterilmiştir. Apelin mRNA erken (1-7 gün) ve orta (8-12 gün) luteal safhalarda yüksek seviyededir en yüksek seviyesine geç dönemde ulaşır (173), bu seviye istatistiksel

olarak hamilelik dönemindekinden daha fazladır (171). APJ mRNA ise, erken luteal fazda artar, en yüksek seviyesine orta luteal fazda ulaşır (171). Luteal fazın sonunda APJ ve apelin düşmeye başlar ve KL'nin gerilemesiyle aşırı bir düşüş gösterirler (171).

Apelin, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi anjiyojenik faktörlerle birlikte KL'de anjiyojenik etki gösterir (174). Bu etkiyle kapillerin proliferasyonunu sağlar, preovulator follükülün seçiminde rol alır, besin ve öncül maddelerin artmasına yol açar ve böylece dominant follükülün büyümesini sağlar (171).

Sığır KL'sinde  $PGF_{2\alpha}$  lutealize yol açar ve apelin ve APJ ekspresyonunu artırır. Ayrıca bu etki sadece orta KL'de 0,5–2 saat içinde görülür.  $PGF_{2\alpha}$ 'nin apelin ve APJ ekspresyonunu 0,5–2 saat süresince artırması, luteal kan akımındaki artış zamanıyla tamamen uyumludur.  $PGF_{2\alpha}$  enjeksiyonundan 4 saat sonra vazokonstriksiyona bağlı olarak luteal kan akışında bariz bir düşüş meydana gelir, apelin ve APJ ekspresyonu da aynı şekilde azalır (175).

Apelin-APJ sistemi sığır KL'sinin düz kas hücrelerinde lokalizedir ve eNOS-NO sistemi yoluyla etkisini gösterir. Apelin düz kas hücrelerinde  $Ca^{+2}$  miktarını artırır, eNOS kalmoduline  $Ca^{+2}$  bağımlı olarak bağlanır kısa süre içinde NO sekrete edilir (175). NO üretimiyle vazodilatasyon meydana gelir, sonrasında kan basıncı düşer böylece apelin eNOS-NO sinyal yollarının modülasyonu ile luteal kan akışı üzerinde düzenleyici rol oynar (173).

Apelin insan plasentasında 1. ve 3. trimesterde bulunmuştur (176). Normal plasentada apelin ekspresyonu plasental villuslarda, sitotrofoblast ve sityotrofoblastlarda gebeliğin 1. trimesterinden 3. Trimesterine kadarki dönemde azalış gösterir, buna karşın APJ ekspresyon düzeyi plasentanın endotel hücrelerinin ve

sitotrofoblastların sitoplazmalarında artar. Buna zıt olarak, preeklampsili gebelerde (106), plasental villuslardaki endotelial hücrelerde kısmi artışla beraber, tüm plasental bölümlerde hem apelin hem de APJ ekspresyonu çok güçlü bir şekilde artmıştır (176).

Apelin-36 ve apelin mRNA hipertansif gebelerde normal gebelere kıyasla daha düşük bulunmuştur (177). Gestasyonel diyabetes mellitusu ve normal glikoz toleransı olan gebelerde subkutanöz adipoz doku, visseral adipoz doku ve plasental dokularda apelin ve APJ ekspresyonunda anlamlı bir fark yoktur (64).

Maternal apelin konsantrasyonu normal sıçanlarda gebeliğin son haftasında yaklaşık olarak % 50 oranında düşüş gösterir. Bunun sebebi fetoplasental dokunun eliminasyonunun artışıdır (178).

İnsanlarda maternal apelin konsantrasyonu, fetal, 1 günlük ve 4 günlük neonatallerdeki düzeyiyle kıyaslandığında anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. Fetal 1 günlük apelin konsantrasyonu ise 4 günlük konsantrasyonuna göre düşüktür. Umbilikal plazma örneğinde apelin konsantrasyonunun belirgin derecede yüksek olması apelinin intrauterin gelişimdeki rolünü düşündürmektedir. Doğum sonrası 1. gün dolaşımdaki apelinin hızlı bir şekilde düşmesi plasentanın ayrılmasının sonucudur. 4. gündeki artışı ise ölü uterusu giderek artan anjiyogenezden kaynaklanmaktadır. Ayrıca apelin konsantrasyonu ile doğum ağırlığı, cinsiyet ve doğum sayısı arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (179).

Apelin mRNA çeşitli dokularda tespit edilmekle beraber en yüksek düzeydeki ekspresyonu gebe sıçanların meme bezlerinde bulunmuştur (88). Emziren sıçanların meme bezlerinde de apelin yüksek oranda eksprese edilir (88). Hamilelik boyunca meme bezlerinin gelişimine paralel olarak apelin mRNA düzeyi giderek artar, hamileliğin sonlarında ve doğumda en yüksek seviyesine ulaşır (88). Doğumdan sonra

da meme bezlerinde apelin düzeyi hala yüksektir ve 21 gün içinde seviyesi giderek düşerek bazal düzeye iner (88). Apelin sığır, sıçan ve insan sütünde bulunmuştur (88). Sığır kolostrumunda apelinin büyük miktarlarda (14–93 pmol/ml) sekresyonu gösterilmiştir (88). Ayrıca laktasyondaki sıçan sütündeki apelin peptit içeriği ~ 300-600 ng/ml gibi oldukça büyük miktarda bulunmuştur (107). Bu bulgulara rağmen apelinin gebelik ve doğum süreçlerindeki rolü belirsizdir. Uterus kontraksiyonları üzerinde apelinin nasıl bir etkiye sahip olduğu bilinmemektedir.

**Amaç:** Bu tez çalışmasında apelinin in vitro sıçan uterus şeritlerindeki kontraksiyonlar üzerindeki olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

#### 4. GEREÇ VE YÖNTEM

##### 4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen, 200-250 g ağırlığında 12 adet Wistar cinsi intak dişi sıçan kullanıldı.

Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, 21<sup>0</sup>C oda sıcaklığında, plastik kafeslerde tutuldu. Cam şişelerdeki çeşme suyuyla ve Elazığ Yem Fabrikası'nda hazırlanan pelet halindeki özel sıçan yemleriyle beslendi (Tablo 2).

Buğday	150
Mısır	100
Arpa	270
Kepek	80
Soya	294
Balık Unu	80
Tuz	6
*Kavimix VM 23-Z	2
Methionin	2
**DCP	16
*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D <sub>3</sub> , 12 mg E, 0.8 mg K <sub>3</sub> , 0.8 mg B <sub>1</sub> , 2.4 mg B <sub>2</sub> , 1.2 mg B <sub>6</sub> , 0.006 mg B <sub>12</sub> vitaminleri, 16 mg Nikotin amid, 3.2 mg Cal. D. Panth., 0.32 mg Folik asid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0.8 mg I, 0.2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.	
**% 18 fosfor, %25 kalsiyum, %0.2 flor'dan oluşur.	

**TABLO:2** Kullanılan sıçan yeminin içeriği (g/kg).

## 4.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Sıçanlardaki cinsel döngü 4–5 gün sürmekte ve 4 ayrı periyotta sınıflanmaktadır: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus. Proöstrus 12–14 saat, östrus 25–27 saat, metöstrus 6–8 saat ve diöstrus 55–57 saat sürmektedir.

Deneylerin hazırlık aşamasında sıçanların östrus siklusları günlük olarak sabah 08.00–09.00 saatleri arasında vajinal simirle takip edildi. Sıçanlardan alınan simir örnekleri mikroskop altında incelenerek diöstrus dönemindeki hayvanlar tespit edildi ve sadece diöstrus grubundaki hayvanlar çalışma için kullanıldı.

## 4.3. Krebs Solusyonu

Krebs çözeltisi in vivo ortamdaki fizyolojik şartları in vitro ortamda da belli ölçülerde sağlayan bir çözeltilidir. İçeriği itibariyle uterus düz kas hücrelerinin kasılabilirlik özelliklerini optimal düzeyde in vitro olarak sürdürebilmelerine imkan sağlamaktadır.

Krebs içeriği mM/L olarak aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmış olup pH'ı 7.4'e ayarlanmıştır:

NaCl	: 118
KCl	: 4,7
MgSO <sub>4</sub>	: 1,2
Glikoz	: 11,5
CaCl <sub>2</sub>	: 2,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: 1,18
NaHCO <sub>3</sub>	: 15,8
EDTA	: 0,016

#### 4.4. İzole Organ Banyosu

Çift çeperli yapıya sahip olan izole organ banyosu sistemi (MAY IOBS 99), stant, depo, amplifikatör, hazneler, termostatlı dolaşım pompası, O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> karışım tüpü (HABAŞ), kayıt ünitesi ile sıvı ve gaz taşıma aparatlarından oluşmaktadır.

Termostatlı dolaşım pompası, içerisinde bulunan distile suyu istenen sıcaklığa ayarlayarak izole organ banyosunun çift çeperli bütün bölümlerinde sirküle ederek ısınmasını sağlayan bir cihazdır. Mevcut sistemde cihaz 37<sup>0</sup>C sıcaklığa ayarlanmıştır.

Deneylerde 5 ml hacimde 2 adet hazne kullanılmıştır. Hazneler de tüm sistem gibi çift çeperli yapıdadır ve haznelerin dış çeperinde termosirkülatörde ısıtılmış distile su sirküle olmaktadır. İç çeperde ise Krebs çözeltisi yer alır. Miyometriyum şeritlerinin yerleştirildiği iç çeperde bütün deneysel uygulamalar gerçekleştirilmektedir. Bütün deney boyunca haznenin alt bölgesindeki girişten % 95 O<sub>2</sub> ve % 5 CO<sub>2</sub> karışımıyla haznedeki Krebs çözeltisi sürekli olarak gazlandırılmıştır.

İzometrik güç dönüştürücü, haznelerdeki düz kas şeritlerinde oluşan izometrik kasılmalarından kaynaklanan fiziksel kuvvetleri algılayarak, bunları elektriksel sinyallere çevirmektedir. Bu sinyaller eşzamanlı olarak amplifikatöre ulaşır. Amplifiye edilen elektriksel sinyaller orijinal trasedekilerle uyumlu frekans ve genlik parametreleri olarak kayıt ünitesine iletilmektedir.

Veri kayıt ve analiz sistemi bilgisayar ve yazılım programından oluşmaktadır. Kayıt ünitesinde, organ banyosundaki kas şeritlerinin kasılmalarının oluşturduğu genlik ve frekans parametreleri eşzamanlı olarak kaydedilmektedir. Bu kayıtlar daha sonra analiz edilerek, her bir kas şeridinde ilaç uygulamalarından önce ve sonraki sürelerde ortaya çıkan kasılma parametreleri frekans ve genlik olarak belirlenmiştir.

#### 4.5. Apelinin Hazırlanması

Çalışmada sentetik apelin 13 (Sigma Chem Com, St Louis, ABD) kullanıldı. Hormonun 1 µg'lık flakonu içine Krebs çözeltisi eklendi ve vortekste karıştırılarak çözdürüldü. Aynı işlem kalsiyumsuz Krebs çözeltisi kullanılarak diğer bir apelin flakonunda tekrarlandı. Apelin çözeltileri küçük plastik ependorf tüplere ayrılarak organ banyosuna uygulanana kadar -20 °C'de saklandı.

#### 4.6. Deney Protokolü

Deneylerde diöstrus dönemindeki hayvanlardan elde edilen uterus şeritleri kullanıldı. 12 hayvandan çıkarılan şeritlere 2 ayrı protokol şeklinde apelin uygulamaları yapıldı. 1. protokolda normal Krebs çözeltisinde oluşan kasılmalar üzerindeki apelin etkisi test edildi. 2. protokolda ise kalsiyumsuz Krebs çözeltisi kullanılarak apelin uygulaması tekrarlandı.

Her iki protokol grubundaki hayvanlar hergün sabah aynı saatlerde dekapite edildi (08:00-10.00). Dekapite edilen sıçanların karın bölgeleri açılarak uterusları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Uterus dokuları alınan örnekler, içerisinde Krebs çözeltisi bulunan petri kaplarına alındı. Bu uteruslardan 1.2 cm uzunlukta, 2 mm genişlikte ve 1 mm kalınlıkta küçük longitudinal miyometriyum kesitleri hazırlandı. Kesitler izole organ banyosundaki cam hazneler içerisindeki düzeneğe 1 gr gerim uygulanarak yerleştirildi ve izometrik kasılmalar kaydedildi. Bu gerim düzeyi bütün deney periyodunda sabit olarak kaldı.

Birinci protokolda yaklaşık olarak yarım saatlik bir uyum periyodunu takiben spontan kasılma gösteren miyometriyum kesitleri için, spontan kasılmalar azaldıktan sonra 10 dk kontrol kayıtları yapıldı ve sonrasında organ banyosundaki konsantrasyonu sırasıyla 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM olacak şekilde, apelin dozları onar dakika arayla

uygulandı. İkinci protokolde ise miyometriyum kesitleri yerleştirildikten 30 dk sonra ortam,  $Ca^{+2}$  bulunmayan Krebs çözeltisi ile değiştirildi ve hemen sonrasında spontan kasılmaların tamamen bittiği gözlemlendi. 10 dk'lık kontrol kaydından sonra 10  $\mu$ M apelin tek doz olarak uygulandı ve sonraki 10 dk'lık süre de kaydedildi. Kasılmaların frekans (10 dakikadaki kasılma sayısı) ve genlik (gr) parametreleri aritmetik ortalama (AO)  $\pm$  standart hata (SH) değerleri olarak belirlendi.

#### **4.7. İstatistiksel Metot**

Bütün değerler; ortalama  $\pm$  standard sapma (AO  $\pm$  SS) olarak belirlendi. İstatistiksel analizler ve grafikler sırasıyla; SPSS 12.0 ve Sigma Plot 10.0 programları kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplandı. Tek yönlü varyans analizinin Post-Hoc hesaplaması için de *Tukey* testi kullanıldı. Tüm analizlerde  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

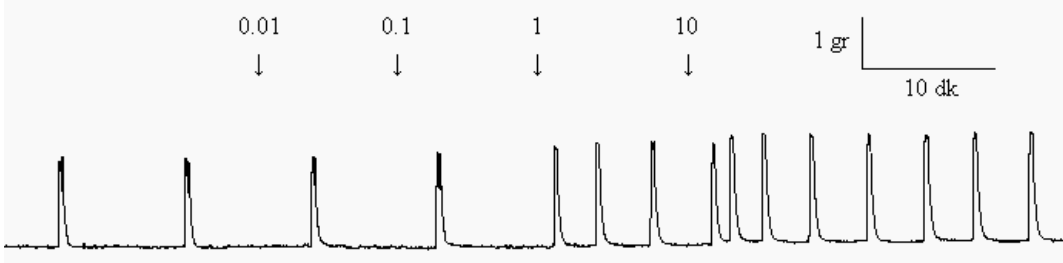
### 4.3. Birinci Protokol Grubu Bulguları

Miyometriyum kesitleri Krebs solusyonu içeren organ banyosu haznesine yerleştirildikten sonra, gerime bağlı olarak oluşan spontan kontraksiyonlar uzun bir süre takip edildi. Olası etkisini belirlemek amacıyla 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyon oluşturacak şekilde deneme amaçlı olarak hazneye apelin uygulandı. Uygulamayı takiben kasılmaların frekans ve genliğinde belirgin artış ortaya çıktı. Bu uygulama aynı şartlarda tekrarlandı ve aynı sonuç gözlemlendi. Bu bulgular sonucunda apelinin uterus kasılmaları üzerinde uyarıcı etkiye sahip olduğu görüldü. Apelinin etki ettiği konsantrasyonu belirlemek için hormon, 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda kümülatif olarak uygulandı. Uygulamalardan önce kasılma frekansının 1-2 kasılmaya kadar azalması beklendi. 10 dk'lık kontrol kayıtlarından sonra apelin dozları hazneye eklendi (Resim 1).

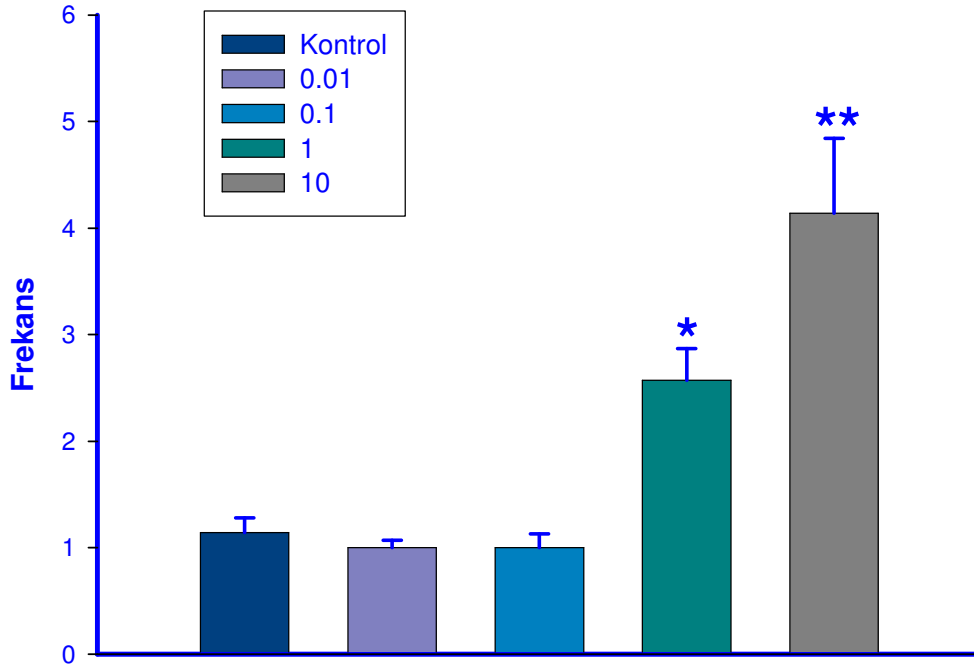
Kontrol grubunda kontraksiyonların frekansı  $1.14 \pm 0.14$  (n=6) olarak belirlendi. Apelin uygulandıktan sonra frekans değerleri sırasıyla  $1.00 \pm 0.07$  (n=6),  $1.00 \pm 0.08$  (n=6),  $2.57 \pm 0.30$  ve  $4.14 \pm 0.70$  (n=6) olarak hesaplandı. 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanan apelinin kontraksiyonların frekansını anlamlı düzeyde artırdığı (p<0.05 ve p<0.001), diğer 2 dozun ise frekans üzerinde etkili olmadığı görüldü (Grafik 1).

Kontraksiyonların genlikleri kontrol grubunda  $1.47 \pm 0.05$  (n=6) şeklindeydi. Apelinin kümülatif olarak uygulanmasından sonraki genlik değerleri ise sırasıyla  $1.45 \pm 0.06$  (n=6),  $1.50 \pm 0.05$  (n=6),  $1.73 \pm 0.06$  (n=6) ve  $1.91 \pm 0.10$  (n=6) olarak belirlendi. Genlik parametresi üzerindeki apelinin stimülatör etkisi sadece 10  $\mu\text{M}$  dozda

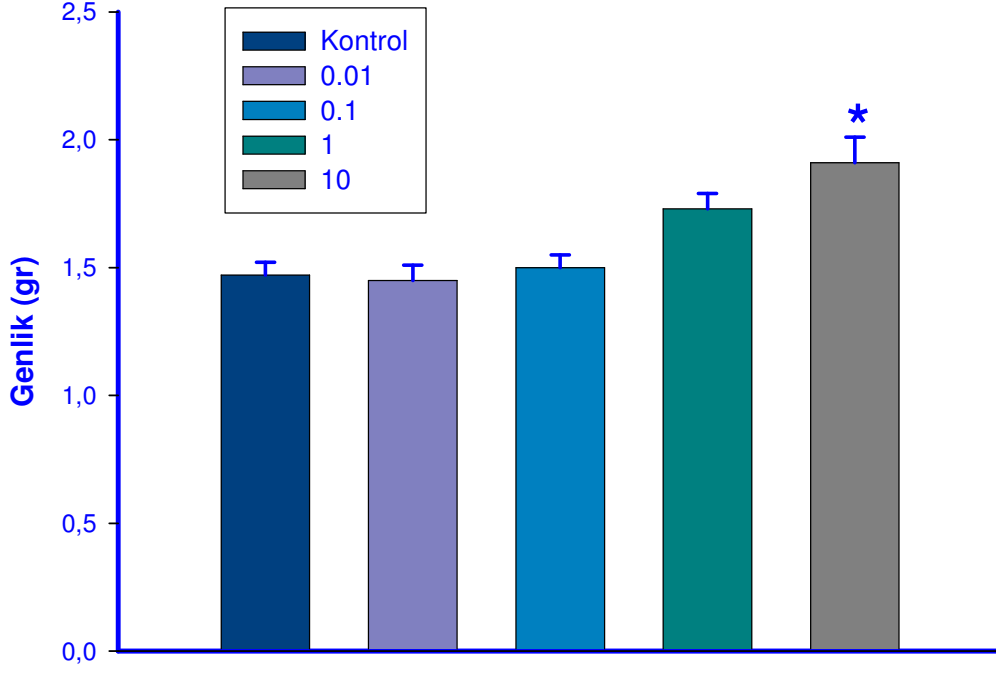
ortaya çıktı ( $p<0.01$ ). Diğer konsantrasyonlardaki apelin uygulaması istatistiksel olarak belirgin bir artışa yol açmadı (Grafik 2).



**Resim 1:** 1. Protokol grubuna örnek olarak 5. uterus şeriti orijinal trase: Spontan miyometriyum kasılmaları üzerinde 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1 $\mu$ M ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarda apelinin etkisi.



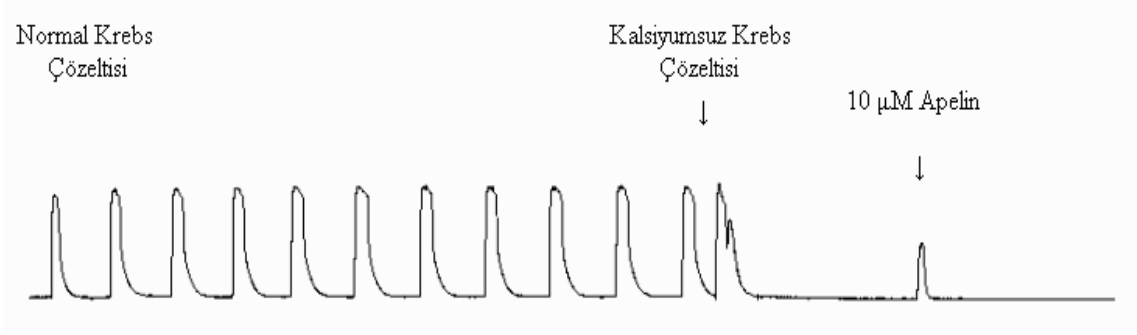
**Grafik 1:** Apelinin 1. Protokol Grubunda Kasılma Frekansı Üzerindeki Etkileri. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.001$  (Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc Tukey Testi).



**Grafik 2:** Apelinin 1. Protokol Grubunda Kasılma Genliği Üzerindeki Etkileri.  
\*  $p < 0.05$ . (Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc *Tukey* Testi).

## 5.2. İkinci Protokol Grubu Bulguları

İkinci protokolde düzenli spontan kasılmalar devam ederken organ banyosu içeriği  $\text{Ca}^{+2}$ 'suz Krebs çözeltisi ile değiştirildi ve kasılmaların hemen durduğu gözlemlendi. 10 dk sonra apelin 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda uygulandı ve meydana gelen değişiklikler kaydedildi (Resim 2). 10  $\mu\text{M}$  dozda apelin uygulanması sonucu bütün şartlarda 1 kasılma meydana geldi.



**Resim 2:** 2. Protokol grubuna örnek olarak 2. uterus şeriti orijinal trase: Kalsiyumsuz ortamda 10 µM konsantrasyonda apelinin etkisi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Apelin 1998 yılında sığır midyesinden izole edilerek APJ'nin endojen ligandı olarak bulunmuştur (80) ve biyolojik etkilerini APJ aracılığıyla göstermektedir (150, 167). Apelinin APJ'ye bağlandığında cAMP formasyonunu inhibe ettiği ve hücre proliferasyonunda ve apoptozda önemli role sahip bir enzim olan mitojen aktifeli protein kinaz ve fosfatidilinozitol 3 kinaz yollarını aktive ettiği gösterilmiştir (104, 134, 168, 180, 181). Apelin insan embriyonik böbrek hücrelerinde ERK1/2' yi APJ'nin G<sub>i2</sub> proteine bağlanmasıyla aktive eder. Apelin etkili ERK1/2 aktivasyonu G<sub>βγ</sub> alt ünitesi aracılığıyla olmayıp PKC bağımlıdır (182). Apelin hamster ovaryum hücrelerinde forskolinle uyarılmış cAMP üretimini pertussis toksin duyarlı G proteini aracılığıyla inhibe etmektedir (180). Aynı hücrelerde apelin G proteinin α alt birimi aracılığıyla Ras bağımsız olarak ERK'yi (183), P70S6 kinazı ise ERK bağımlı ve fosfatidilinozitol 3 kinaz Akt bağımlı olarak 2 tane sinyal iletim kaskadı aracılığıyla aktive ettiği belirlenmiştir (181). Benzer etki insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde de gösterilmiştir (181). P70S6, protein sentezini artırarak endotelial hücre proliferasyonunda rol oynar (178, 184). Bu bilgiler APJ'nin büyük oranda inhibitör G<sub>i/o</sub> proteinine bağlandığını göstermektedir (88, 185).

Apelin ve reseptörünün ağırlıklı olarak kalp, akciğerler, yağ doku ve meme bezleri olmak üzere birçok dokuda ekspresyonu gösterilmiştir (82, 84, 87, 88, 122). İnsanlarda plasenta, over ve uterus dokularında da apelin ekspresyonu tespit edilmiştir (176). Bu da üreme sisteminin, hormon için muhtemel bir etki alanı oluşturduğunu düşündürmektedir.

Miyometriyumda kasılma, hücre dışından voltaj duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi ve SR'den  $Ca^{+2}$  salıverilmesi sonucu hücre içi  $Ca^{+2}$  artışıyla meydana gelir. Reseptörleri aracılığıyla etki gösteren OT,  $PGF_{2\alpha}$  gibi birkaç hormon PLC yolağını kullanırlar. PLC'nin aktivasyonu 2 tane ikinci habercinin aktivasyonunu sağlar. DAG PKC'yi uyarır ve  $IP_3$  SR'den  $Ca^{+2}$ 'yı mobilize eder.  $Ca^{+2}$ -kalmodulin kompleksi MHZK enzimini aktive ederek MHZ'in fosforilasyonuna yol açar ve miyozin aktin etkileşmesiyle kasılma gerçekleşir (43, 178). Gebelikte aktin ve miyozin miktarı artar ve uterus hipertrofiye uğrar. Gebelikle birlikte fetüs ve gelişen dokulara paralel kan akışı da artar. Uterus böylece gebelik boyunca gelişerek doğumda güçlü ve sık kasılmalar için hazırlanır. Bunun sonucunda fetüs ve plasantanın vücut dışına çıkarılması (doğum) mümkün olur. Doğumda miyometriyumun kasılmasında etkili birçok lokal ve genel faktörün varlığı bilinmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda keşfedilen birçok yeni hormon, sitokin gibi maddelerin miyometriyum kasılmaları üzerindeki muhtelif etkileri ortaya konmuştur.

Miyometriyal hücrelerde kasılmanın düzenlenmesinde iskelet kasında olduğu gibi kalsiyum iyonları büyük rol oynar. Ancak, düz kaslarda SR iyi gelişmediğinden, kasılma için gerekli olan kalsiyum, daha ziyade ekstraselüler sıvıdan kaynaklanmaktadır. Miyometriyumda fazik kasılmalardan hemen önce ekstraselüler ortamdan hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi ile intraselüler  $Ca^{+2}$  seviyesi artmaktadır (54, 57, 186). Miyometriyumdaki spontan aktivitenin tamamen eksternal kalsiyum varlığına bağlı olduğu belirtilmiştir. Eğer miyometriyum kesitlerinin bulunduğu ortamda  $Ca^{+2}$  yoksa spontan kasılmaların aniden durduğu ve spontan aktivitenin yok olduğu gösterilmiştir (23). Ortama  $Ca^{+2}$  eklendiğinde spontan aktivitenin yeniden başladığı gözlemlenmiştir (54).

Miyometriyumda bulunan voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanallarına, bu kanalların blokörü olan nifedipin uygulandığında, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düştüğü ve spontan kasılmanın amplitüdünde azalma meydana geldiği gösterilmiştir (187). Bu bilgiler de miyometriyal spontan kasımlarda eksternal kalsiyumun önemini göstermektedir (54, 186, 187).

Spontan kasımlarda, SR'de bulunan  $Ca^{2+}$  iyonunun ise herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (188). SR'de bulunan  $Ca^{2+}$  serbestleyen kanalın blokleri olan ryanodin kullanıldığında, spontan kasılmanın gücünde herhangi bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (54, 188, 189).

Bu çalışmada apelinin, miyometriyum kontraksiyonları üzerinde stimülatör etkiye sahip olduğu bilinen literatür bulgularına göre, ilk defa belirlenmiştir. Deneyleerde ortamda kalsiyum varlığında apelin hormonunun artan dozlarda uygulanması ile miyometriyumda spontan kasımların genlik ve frekansında belirgin artış meydana gelmiştir. Spontan kasımlarda oluşan bu uyarıcı etki, apelin hormonunun miyometriyal hücrelerde hücre içi  $Ca^{+2}$  artışına sebep olduğunu düşündürmektedir. Çünkü benzer deney protokolü  $Ca^{+2}$  içermeyen Krebs çözeltisiyle tekrarlandığında, apelinin yine miyometriyum kontraksiyonunu indüklediği gözlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak apelinin, gebe olmayan dişi sıçanların izole miyometriyumlarında hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesini sağlayarak kontraksiyonları indüklediği ileri sürülebilir. Apelinin bazı hücrelerde intraselüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu arttırarak etki ettiği bazı çalışmalarla ortaya konmuştur. Choe ve arkadaşları insan beyin nöron hücre kültürlerinde, apelinin hücre içi kalsiyum düzeyini artırdığını göstermişlerdir (190). Medhurst ve arkadaşları da sıçan bazofilerinden derive edilen RBL-2H3 kültür hücrelerinde apelin peptitlerinin hücre içi kalsiyumu artırdığını bulmuşlardır (86).

Apelin kalpte pozitif inotropik etkisini PKC ve PLC aktivitesiyle göstermektedir. PLC; DAG yoluyla PKC'yi aktive eder. PKC'nin aktivasyonu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  değiştirici pompayı fosforile eder. Bu pompa, protonları dışarı çıkarıp sodyumu içeri alarak hücre içindeki sodyum miktarında artışa yol açar. Böylece hücre iinin pH'ını alkali duruma getirir. Bu durum miyofilamentlerin kalsiyuma olan hassasiyetini arttırarak pozitif inotropik etkiye yol açar (142, 143). Aynı zamanda sodyumun artışıyla indirek olarak  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  pompası aktifleşir. Hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu artar ve dolayısıyla da kontraktilitede artış meydana gelir. Apelin uterusta kontraksiyonları stimüle ederken diğer bir düz kas olan damarları gevşeterek vazodilatasyona yol açmakta ve hipotansif etki gösterir. Apelinin hipotansif etkisi NO/L-arjinin sistem aracılığıyla gerçekleşir (90). Apelin endotelial hücrelerde endotelial nitrik oksit sentaz fosforilasyonunu stimüle eder (150). NO, guanil siklazı aktive eder, cGMP seviyesi artarak vasküler düz kaslarda gevşeme meydana gelir. Apelin, iki ayrı düz kasta farklı mekanizmalarla etki ederek farklı etkilere yol açmaktadır. Tüm bu bilgiler apelinin birkaç farklı reseptör alt tipinin bulunabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; apelin düşük konsantrasyonlarda sıçan miyometriyumunda kontraksiyonlar üzerinde herhangi bir etki göstermezken, doz bağımlı olarak spontan kasılmaların amplitüt ve frekansında artışa yol açmaktadır. Apelin sıçan miyometriyum kasılmaları üzerindeki bu stimülatör etkisini muhtemelen  $\text{IP}_3$  yolağı aracılığıyla hücre içi depolardan  $\text{Ca}^{+2}$  salıverilmesini indükleyerek gerçekleştirmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Arthur C. Guyton & John E. Hall. Textbook of Medical Physiology 11th edition. 2007.
2. Brooks SV. Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Adv Physiol Educ* 2003; 27: 171.
3. Fung Y. Biomechanics, 2nd ed. Springer. 1993.
4. Ganong's Review of Medical Physiology, 23rd edition, 2010.
5. Hille B. Ionic channels of excitable membranes, 3rd edition. Sinauer Associates 2001.
6. Horowitz A. Mechanisms of Smooth Muscle Contraction. *Physiol Rev* 1996; 76: 967.
7. Berne M, Matthew L. Levy physiology; 2008.
8. Chen Q, Van Breemen C. Function of Smooth Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1995; 26: 335.
9. Motta P. Ultrastructure of smooth muscle. Lancaster, England, Kluwer Academic. 1990.
10. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle. *Physiol Rev* 1995; 75: 487.
11. Somylo AP, Somylo AV. Signal Transduction And Regulation in Smooth Muscle. *Nature* 1994; 372: 231.
12. Chirst GJ. Gap Junctions in Vascular Tissues. *Circ Res* 1996; 79: 631.
13. Fox Human Physiology. Eight edition. 2003.
14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc 2002; 852-862.
15. Huizinga JD. Intercellular Communication in Smooth Muscle. *Experientia* 1992; 48: 932.
16. Berridge MJ. Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling. *Nature* 1993; 361: 315.
17. Karaki H. Calcium Movements, Distribution and Functions in Smooth muscle. *Pharmacol Review* 1997; 49: 157.
18. Putney JW. Channeling calcium. *Cell Biology* 2001; 410: 648.
19. Raeymaekers L, Wuytack F. Ca<sup>2+</sup> pumps in smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* 1993; 14: 141.
20. Jaggar JH, Lederer WJ, Nelson MT et al. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(2): 235-56.
21. Nelson MT. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995; 270: 633.
22. Missiaen L. Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol ther* 1992; 56: 191.
23. Shmigol AV, Eisner D, Wray S. Simultaneous measurements of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] in rat uterine smooth muscle cells. *J physiol* 2001; 531: 707.
24. Burdyga FV, Babich LF, Kosterin SA, et al. The calcium pump in the sarcolemma controls smooth muscle relaxation. *Biofizika* 1994; 39(2): 365-71.
25. Sanders KM, Koh SD, Ördög T, et al. A Novel Pacemaker Mechanism Drives Gastrointestinal Rhythmicity. *News Physiol Sci* 2000; 15: 291-298.
26. Van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 315-29.

27. Matthew A, Shmygol A, Wray S. Ca<sup>2+</sup> entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res* 2004; 7(4): 617-24.
28. Wray S, Burdyga T, Kupittayanant S, et al. The physiological basis of uterine contractility: a short review. *Exp Physiol* 2001; 86(2): 239-46.
29. Kuriyama H, Inoue R, Itoh T, et al. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev* 1998; 78(3): 811-920.
30. Lee CH, Kuo KH, Poburko D, et al. Ca(2+) oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(5): 1571-83.
31. Lincoln TM, Conwell TL. Towards an Understanding of The Mechanism of Action of Cyclic AMP and Cyclic GMP in Smooth Muscle Relaxed. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 7655.
32. Miriel V. Local and cellular Ca<sup>2+</sup> transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J physiol* 1999; 518: 815-24.
33. Murphy RA. What is special about smooth muscle? The significance of covalent crossbridge regulation. *FASEB J* 1994; 8: 311.
34. Kawarabayashi T, Tsukamoto T. Changes in responsiveness of freshly isolated longitudinal muscle cells from rat uterus towards oxytocin during gestation: contractility and calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128(1-2): 77-84.
35. Snyder SW, Rigby SL, Adams HR. Evidence for decidual modulation of contractile function in the pregnant rat uterus. *Life Sci* 1994; 55(5): 399-411.
36. Shmygol A, Gullam J, Blanks A, et al. Multiple mechanisms involved in oxytocin-induced modulation of myometrial contractility. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(7): 827-32.
37. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, et al. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta* 1994; 15(4): 341-53.
38. Lye SJ, Freitag CL. Local and systemic control of myometrial contractile activity during labour in the sheep. *J Reprod Fertil* 1994; 90(2): 483-92.
39. Ou CW, Chen ZQ, Qi S, et al. Increased expression of the rat myometrial oxytocin receptor messenger ribonucleic acid during labor requires both mechanical and hormonal signals. *Biol Reprod* 1998; 59(5): 1055-61.
40. White MM, Zamudio S, Stevens T, et al. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocr Rev* 1995; 16(6):739-51.
41. Waldo GL, Boyer JL, Harden TK, et al. Purification of an AIF4- and G-protein beta gamma-subunit-regulated phospholipase C-activating protein. *J Biol Chem* 1991; 266(22): 14217-25.
42. Word RA, Casey ML, Kamm KE, et al. Effects of cGMP on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, myosin light chain phosphorylation, and contraction in human myometrium. *Am J Physiol* 1991; 260: 861-7.
43. Heaton RC, Eisner DA, Wray S. Effects of metabolic inhibition and changes of intracellular pH on potassium permeability and contraction of rat uterus. *J Physiol* 1993; 465: 43-56.
44. Shmigol AV, Eisner D, Wray S. Properties of voltage-activated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. *J Physiol* 1998; 511: 803-11.

45. Monga M, Andres RL, Sanborn BM, et al. Cocaine acutely increases rat myometrial contractile activity by mechanisms other than potentiation of adrenergic pathways. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(6): 1502-6.
46. Monir-Bishty E, Kupittayanant S, Pierce SJ, et al. The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium. *BJOG* 2003; 110(12): 1050-6.
47. Knock GA, Aaronson PI. Calcium antagonistic properties of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide in human myometrial myocytes. *J Pharmacol* 1999; 127(6): 1470-8.
48. Young RC, McLaren MD, Smith LH. T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(4): 785-92.
49. Chien EK, Phillippe M, Saunders T. The mechanisms underlying Bay K 8644-stimulated phasic myometrial contractions. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3(3): 106-12.
50. Collins PL, Idriss E, Kulp TM, et al. Human fetal membranes inhibit calcium L-channel activated uterine contractions. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(5): 1173-9.
51. Mershon JL, Mikala G, Schwartz A. Changes in the expression of the L-type voltage-dependent calcium channel during pregnancy and parturition in the rat. *Biol Reprod* 1994; 51(5): 993-9.
52. Parkington HC, Coleman HA. Ionic mechanisms underlying action potentials in myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988; 15(9): 657-65.
53. Blanks AM, Astle S, Bru-Mercier G, et al. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. *J Physiol* 2007; 581: 915-26.
54. Mironneau J. Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. *J Physiol* 1973; 233(1): 127-41.
55. Ohya Y, Sperelakis N. Modulation of single slow (L-type) calcium channels by intracellular ATP in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1989; 414(3): 257-64.
56. Lee SE, Ahn DS, Lee YH. Role of T-type Ca Channels in the Spontaneous Phasic Contraction of Pregnant Rat Uterine Smooth Muscle. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009; 13(3): 241-9.
57. Kupittayanant S, Burdyga T, Wray S. The effects of inhibiting Rho-associated kinase with Y-27632 on force and intracellular calcium in human myometrium. *Pflugers Arch* 2001; 443(1): 112-4.
58. Parkington HC, Coleman HA. Excitability in uterine smooth muscle. *Front Horm Res* 2001; 27: 179-200.
59. Shmygol A, Wray S. Modulation of agonist-induced Ca<sup>2+</sup> release by SR Ca<sup>2+</sup> load: direct SR and cytosolic Ca<sup>2+</sup> measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium* 2005; 37(3): 215-23.
60. Young RC, Zhang P. The mechanism of propagation of intracellular calcium waves in cultured human uterine myocytes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 84(6): 1228-34.
61. Shmygol A, Wray S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. *Cell Calcium* 2004; 35(6): 501-8.
62. Bolton TB, Gordienko DV. Confocal imaging of calcium release events in single smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1998; 164(4): 567-75.
63. Blaustein MP, Church PJ, Golovina VA, et al. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Acad Sci* 2002; 976: 356-66.

64. Takeda M, Nelson DJ, Soliven B. Calcium signaling in cultured rat oligodendrocytes. *Glia* 1995; 14(3): 225-36.
65. Burdyga T, Noble K, Wray S. In situ calcium signaling: no calcium sparks detected in rat myometrium. *Acad Sci* 2007; 1101: 85-96.
66. Noble K, Wray S, Zhang J. Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *J Physiol* 2006; 570: 29-35.
67. Daniel EE, Kwan CY, Schilling WP, et al. Regulation of vascular tone: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73(5): 551-7.
68. Duquette RA, Burdyga T, Mobasher A, et al. Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking?. *Biol Reprod* 2005; 72(2): 276-83. 69.
69. Buhimschi C, Boyle MB, Saade GR, et al. Uterine activity during pregnancy and labor assessed by simultaneous recordings from the myometrium and abdominal surface in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(4): 811-22.
70. Doret M, Bukowski R, Garfield RE, et al. Uterine electromyography characteristics for early diagnosis of mifepristone-induced preterm labor. *Obstet Gynecol* 2005; 105 (4): 822-30.
71. Tabb TN, Garfield RE. Molecular biology of uterine contractility. *Clin Obstet Gynecol* 1992; 35(3): 494-504.
72. Miller SM, Daniel EE, Garfield RE. Improved propagation in myometrium associated with gap junctions during parturition. *Am J Physiol* 1989; 256: 130-41.
73. Leprêtre N, Mironneau J. Alpha 2-adrenoceptors activate dihydropyridine-sensitive calcium channels via Gi-proteins and protein kinase C in rat portal vein myocytes. *Pflugers Arch* 1994; 429(2): 253-61.
74. Landry Y, Gies JP. Heterotrimeric G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling, a base for drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 2002; 2(4): 361-72.
75. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(2): 79-94.
76. Pang IH, Sternweis PC. Purification of unique alpha subunits of GTP-binding regulatory proteins (G proteins) by affinity chromatography with immobilized beta gamma subunits. *J Biol Chem* 1990; 265(30): 18707-12.
77. Duc-Goiran P, Bourgeois C, Ferré F, et al. Identification and expression of Go1 and Go2 alpha-subunit transcripts in human myometrium in relation to pregnancy. *Biol Reprod* 1999; 60(6): 1528-35.
78. Europe-Finner GN, López Bernal A, Phaneuf S, et al. Identification and expression of G-proteins in human myometrium: up-regulation of G alpha s in pregnancy. *Endocrinology* 1993; 132(6): 2484-90.
79. Hedin KE, Clapham DE, Duerson K. Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal* 1993; 5(5): 505-18.
80. Tatemoto K, Fujii R, Fujino M, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 471-6.
81. O'Dowd BF, Chan A, George SR, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993; 136: 355-60.

82. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000; 275: 21061–7.
83. Lee D.K, Cheng R, Fan T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J. Neurochem* 2000; 74: 34-41.
84. De Falco M, Artigiano F, Cavallotti I, et al. Apelin expression in normal human tissues. *In Vivo* 2002; 16: 333–336.
85. Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept* 2004; 118(3): 119-25.
86. Medhurst AD, Davis RP, Ellis C, et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003; 84 (5): 1162-72.
87. Kawamata Y, Fujii R, Fujino M, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1538: 162-171.
88. Habata Y, Fujii R, Fujino M, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Act* 1999; 1452: 25-35.
89. Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005; 107 (2): 198-211.
90. Tatemoto K, Kumaki I, Kumano K, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001; 99 (2-3): 87-92.
91. Lee DK, Cheng R, George SR, et al. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 2005; 146: 231–236.
92. Pires I, Adelino F, Moreira L. Apelin: A Novel Neurohumoral Modulator of the Cardiovascular System. Pathophysiologic Importance and Potential Use as a Therapeutic Target. *Rev Port Cardiol* 2005; 24(10) : 1263-1276.
93. Bełtowski J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity?. *Med Sci Monit* 2006; 12(6): 112-9.
94. Vickers C, Baronas E, Dick L, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277: 14838–14843.
95. Foldes G, F. Horkay, I. Szokodi, et al. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 480–485.
96. Sarah L, Maguire J, Pitkin J, et al. Apelin Receptor Nomenclature, Distribution, Pharmacology, and Function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 331–342.
97. O'Carroll AM, Lolait SJ, Palkovits M, et al. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1492(1): 72-80.
98. Devic E, Audigier Y, Bodin S, et al. Amino acid sequence and embryonic expression of *msr/apj*, the mouse homolog of *Xenopus X-msr* and human APJ. *Mech Dev* 1999; 84: 199-203.

99. Edinger AL, Choe W, Faulds D, et al. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1998; 72: 7934–7940.
100. Sörhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B. The APJ receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 2005; 31: 12–7.
101. De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 2000; 72(6): 400–7.
102. Katugampola SD, Davenport AP, Maguire JJ, et al. [(125)I]-(Pyr(1)) Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol* 2001; 132 (6): 1255-60.
103. Matsumoto M, Akiho H, Hidaka K, et al. Low stringency hybridization study of the dopamine D4 receptor revealed D4-like mRNA distribution of the orphan seven-transmembrane receptor, APJ, in human brain. *Neurosci Lett* 1996; 219: 119–122.
104. Chen MM, Ashley EA, Deng DX, et al. Novel role for the potent endogenousinotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 2003; 108: 1432–1439.
105. Katugampola SD, Davenport AP, Kuc RE, et al. G protein-coupled receptors in human atherosclerosis: comparison of vasoconstrictors (endothelin and thromboxane) with recently de-orphanized (urotensin-II, apelin and ghrelin) receptors. *Clin Sci* 2002; 103 Suppl 48: 171-5.
106. Susaki E, Wang G, Cao G, et al. Apelin cells in the rat stomach. *Regul Pept* 2005; 129: 37–41
107. Wang G, Anini Y, Englander EW, et al. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 2004; 145(3): 1342-8.
108. Wang G, Kundu R, Han S, et al. Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul Pept* 2009; 158: 32–39.
109. Lambrecht NW, Yakubov I, Zer C, et al. Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion. *Physiol Genomics* 2006; 25: 153–165.
110. Choe H, Farzan M, Konkel M, et al. The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 72: 6113–6118.
111. Rucker J, Berson JF, Collman RG, et al. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 1997; 12: 8999-9007.
112. Zhang Y, Barklis E, Love Z, et al. Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol* 1998; 72(3): 1782-9.
113. Cayabyab M, Hinuma S, Farzan M, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 2000; 74(24): 11972-6.
114. Min-Xu Z, Hui-Yu L, Yuji H, et al. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *Maebashi* 2000; 371-8512.

115. Puffer BA, Baribaud F, Coughlan CM, et al. Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology* 2000; 276(2): 435-44.
116. Zou MX, Liu HY, Haraguchi Y, et al. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett* 2000; 473(1): 15-8.
117. Horiuchi Y, Fujii T, Kamimura Y, et al. The endogenous, immunologically active peptide apelin inhibits lymphocytic cholinergic activity during immunological responses. *J Neuroimmunol* 2003; 144: 46-52.
118. Taheri S, Murphy K, Cohen M, et al. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1208-1212.
119. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 2003; 353: 1-4.
120. O'Shea M, Hansen MJ, Tatemoto K, et al. Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci* 2003; 6(3): 163-7.
121. Higuchi K, Chiba S, Gotoh K, et al. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 2007; 148(6): 2690-7.
122. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764-1771.
123. Castan-Laurell I, Vítkova M, Daviaud D, et al. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 905-910.
124. Wei L, Hou X, Tatemoto K. Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept* 2005; 132: 27-32.
125. Kunduzova O, Alet N, Delesque-Touchard N, et al. Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J* 2008; 22: 4146-4153.
126. Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8: 437-445.
127. Erdem G, Dogru T, Tasci I, et al. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116: 289-292.
128. Zhang Z, Yu B. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J* 2009; 122: 2360-2365.
129. Li L, Yang G, Li Q, et al. Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 544-548.
130. Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, et al. Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul Pept* 2005; 130: 7-13.
131. Falcão-Pires I, Vasconcelos M, Magalhaes J, et al. Distinct contractile effects of apelin in intact hearts and isolated papillary muscles. *Eur J Heart Failure* 2005; 1: 48-49.

132. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, et al. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001; 77(4): 1085-96.
133. Reaux A, Gallatz K, Llorens-Cortes C, et al. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 2002; 113 (3): 653-62.
134. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(28): 10464-9.
135. Reaux-Le Goazigo A, Morinville A, Bulet A, et al. Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2004; 145(9): 4392-400.
136. O'Carroll AM, Lolait SJ. Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 661-666.
137. Reaux-Le Goazigo A, Alvear-Perez R, Bluet-Pajot MT, et al. Cellular localization of apelin and its receptor in the anterior pituitary: evidence for a direct stimulatory action of apelin on ACTH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292(1): 7-15.
138. Atluri P, Morine KJ, Liao GP. Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression. *Cell Mol Biol Lett* 2007; 12(1): 127-38.
139. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 2004; 110: 187-93.
140. Jia YX, Pan CS, Zhang J. Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Regul Pept* 2006; 133(1-3):147-54.
141. Ashley EA, Powers J, Chen M. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005; 65(1):73-82.
142. Szokodi I, Foldes G, Ilves M, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002; 91 (5): 434-40.
143. Dai T, Ramirez G, Gao WD. Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur J Pharmacol* 2006; 553(1-3): 222-8.
144. Farkasfalvi K, Stagg MA, Coppen SR. Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357(4): 889-95.
145. Maguire JJ, Kleinz MJ, Pitkin SL, et al. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 2009; 54(3): 598-604.
146. Wang C, Du JF, Wu F, et al. Apelin decreases the SR Ca<sup>2+</sup> content but enhances the amplitude of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(6): 2540-6.
147. Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept* 2005; 126(3): 233-40.

148. Cheng X, Cheng XS, Pang CC. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 470(3): 171–5.
149. El Messari S, Iturrioz X, Fassot C, et al. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J Neurochem* 2004; 90(6): 1290-301.
150. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279: 26274–26279.
151. Roberts EM, Pope GR, Newson MJ, et al. Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic stimuli in apelin receptor knockout mice. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 301–308.
152. Kagiya S, Fukuhara M, Matsumura K, et al. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul Pept* 2005; 125(1-3): 55-9.
153. Mitra A, Katovich MJ, Mecca A, et al. Effects of central and peripheral injections of apelin on fluid intake and cardiovascular parameters in rats. *Physiol Behav* 2006; 89(2): 221–5.
154. Seyedabadi M, Goodchild AK, Pilowsky PM. Site-specific effects of apelin-13 in the rat medulla oblongata on arterial pressure and respiration. *Auton Neurosci* 2002; 101(1-2): 32-8.
155. Kleinz MJ, Baxter GF. Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase. *Regul Pept* 2008; 146(1-3): 271-7.
156. Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, et al. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2007; 102(6): 518-28.
157. Zeng XJ, Zhang LK, Wang HX, et al. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides* 2009; 30(6): 1144-52.
158. Sheikh AY, Chun HJ, Glassford AJ, et al. In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(1): 88-98.
159. Chandrasekaran B, Dar O, Mc Donagh T. The role of apelin in cardiovascular function and heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008; 10(8): 725-32.
160. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, et al. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006; 8(4): 355-60.
161. Miettinen KH, Magga J, Vuolteenaho O, et al. Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy. *Regul Pept* 2007; 140(3): 178-84.
162. Goetze JP, Rehfeld JF, Carlsen J. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease. *Regul Pept* 2006; 133: 134-8.
163. Andersen C.U, Markvardsen L.H, Hilberg O, et al. Pulmonary apelin levels and effects in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Respiratory Medicine* 2009; 103: 1663-1671.
164. Yamaoka K, Hiram M, Inoue M, et al. Synthetic ciguatoxins selectively activate Nav1.8-derived chimeric sodium channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2009; 284(12): 7597-605.

165. Li F, Li L, Qin X, Pan W, et al. Apelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation: the regulation of cyclin D1. *Front Biosci* 2008; 13: 3786-92.
166. Liu C, Su T, Li F, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys* 2010; 42(6): 396-402.
167. Xie H, Tang SY, Cui RR, et al. Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regul Pept* 2006; 134(2-3): 118-25.
168. Llorens-Cortès C, Beaudet A. Apelin, a neuropeptide that counteracts vasopressin secretion. *Med Sci* 2005; 21(8-9): 741-6.
169. Xie H, Yuan LQ, Luo XH, et al. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis* 2007; 12(1): 247-54.
170. Zhang Q, Yao F, Modgil A, et al. Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336(2): 372-80.
171. Schilffarth S, Antoni B, Schams D, et al. The expression of apelin and its receptor APJ during different physiological stages in the bovine ovary. *Int J Biol Sci* 2009; 5(4): 344-50.
172. Shimizu T, Kosaka N, Murayama C, et al. Apelin and APJ receptor expression in granulosa and theca cells during different stages of follicular development in the bovine ovary: Involvement of apoptosis and hormonal regulation. *Anim Reprod Sci* 2009; 116(1-2): 28-37.
173. Shirasuna K, Shimizu T, Sayama K, et al. Expression and localization of apelin and its receptor APJ in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteolysis. *Reproduction* 2008; 135(4): 519-25.
174. Kasai A, Shintani N, Oda M, et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325(2): 395-400.
175. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1991; 145(3): 201-27.
176. Cobellis L, De Falco M, Mastrogiacomo A, et al. Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Histol Histopathol* 2007; 22: 1-8.
177. Liao YM, Qiao FY, Zhonghua F. Expression of Apelin in placentas of patients with hypertensive disorders complicating pregnancy. *Jun* 2007; 42(6): 382-5.
178. Van Mieghem T, Van Bree R, Van Herck E, et al. Maternal Apelin Physiology during Rat Pregnancy: The Role of the Placenta. *Placenta* 2010; 31: 725-730.
179. Malamitsi-Puchner A, Gourgiotis D, Boutsikou M, et al. Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term. *Acta Paediatr* 2007; 96: 1751-4.
180. Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, et al. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290 (1): 539-45.
181. Masri B, Audigier Y, Cornu M, et al. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *Faseb J* 2004; 18 (15): 1909-11.
182. Bai B, Tang J, Liu H, et al. Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway. *Acta Biochim Biophys* 2008; 40(4): 311-8.
183. Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, et al. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev* 2002; 110(1-2): 183-6.

184. Yu Y, Sato JD. MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol* 1999; 178(2): 235-46.
185. Sorli SC, Audigier Y, Knibiehler B, et al. Therapeutic potential of interfering with apelin signalling. *Drug Discov Today* 2006; (23-24): 1100-6.
186. Adebisi A, Adaikan PG, Prasad RN. Effect of benzyl isothiocyanate on spontaneous and induced force of rat uterine contraction. *Pharmacol Res* 2004; 49(5): 415-22.
187. Cook, J.L, Zaragoza D.B, Sung, D.H, et al. Expression of myometrial activation and stimulation genes in a mouse model of preterm labour: Myometrial activation, stimulation, and preterm labour. *Endocrinology* 2000; 41: 1718–1728.
188. Mironneau J, Macrez N, Morel J et al. Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. *Journal of Physiology* 2002; 538: 707–716.
189. Kupittayanant S, Luckas M, Wray S. Effects of inhibiting the sarcoplasmic reticulum on spontaneous and oxytocin-induced contractions of human myometrium. *British Journal of Obstetrics Gynaecology* 2002; 109: 289–296.
190. Choe W, Sculcove J, Albright A, et al. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol* 2000; 1: 61-9.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1982 Elazığ'ın Keban ilçesi doğumluyum. İlköğrenimimi 1994 yılında Elazığ Vali Yusuf Yakupoğlu İlkokulu'nda, ortaöğrenimimi 1997 yılında Elazığ Ortaokulu'nda ve lise öğrenimimi ise 2001 yılında Elazığ Atatürk Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladım. Yükseköğrenimimi 2003-2008 yılları arasında Ankara Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümü'nde tamamladım. 2008 yılından bu yana Elazığ Özel Nobel Fizik Tedavi Merkezi'nde fizyoterapist olarak çalışmaktayım.