

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**APELİNİN SIÇANLARDA GEBELİK VE DOĞUM  
SÜRECİNDEKİ MUHTEMEL ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Arş. Gör. Dr. Emine KAÇAR**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Selim KUTLU**

**ELAZIĞ  
2012**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

\_\_\_\_\_

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

\_\_\_\_\_

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Selim KUTLU

\_\_\_\_\_

Danışman

### Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel ve akademik tecrübesiyle bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Selim KUTLU'ya, çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a, deneysel aşamalarda destek ve yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Zübeyde ERCAN'a, akademik yardım ve desteğinden dolayı Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN'a, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a, Biyokimya A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Arş Gör. Dr. Ayşegül UZUN' a, bölüm asistanlarına ve benim bu günlere ulaşmamı sağlayan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Apelin, endokrin ve metabolik işlevlerde önemli fizyolojik etkilere sahiptir. Bu çalışmada gebelik ve laktasyon dönemlerindeki sıçanlarda plazma apelin düzeyleri ve gebe sıçan miyometriyumunda apelinin kontraksiyonlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada kontrol (diöstrus dönemi), gebeliğin 12., 18. ve 21. günüyle laktasyonun 2. ve 10. günündeki sıçanlarda plazma apelin konsantrasyonları ELISA yöntemiyle belirlendi. Ayrıca, gebeliğin 21. günündeki sıçan uterusunda, apelinin 0.01, 0.1, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarının izometrik kontraksiyonlar üzerindeki etkisi izole organ banyosu kullanılarak test edildi. Kalsiyumsuz ortamda ve protein kinaz C inhibitörüyle ön muamele edilmiş şartlarda apelinin uterus kontraksiyonlarını indükleyip indiklemediği araştırıldı.

Plazma apelin düzeyleri diöstrusta ve gebeliğin 12., 18. ve 21. günlerinde sırasıyla  $120.2 \pm 10.9$  ng/ml,  $101.9 \pm 14.5$  ng/ml,  $151.1 \pm 31.7$  ng/ml ve  $235.8 \pm 46.5$  ng/ml olarak belirlenirken, laktasyonun 2. ve 10. günlerinde  $111.4 \pm 19.2$  ng/ml ve  $143.3 \pm 13.2$  ng/ml olarak ölçüldü. 21 günlük gebe grubundaki apelin düzeyi anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.05$ ). 2 günlük laktasyon grubundaki apelin konsantrasyonu anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0.05$ ). Miyometriyum deneylerinde ise apelinin kasılmaları indüklediği gözlemlendi. Kasılma frekansı 0.01  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarda istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.01$ ). Ayrıca 1 ve 10  $\mu\text{M}$  doz uygulamasında kontraksiyonların genliği istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı (sırasıyla,  $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$ ). Kalsiyumsuz ortamda apelin uygulanması kasılmaları indükledi. Protein kinaz C inhibitörüyle önmuamele sonrası apelin uygulandığında herhangi bir kasılma gözlenmedi.

Bu araştırmanın bulguları sıçanlarda apelin düzeyinin gebeliğin sonunda arttığını ve hormonun uterus kontraksiyonlarını indüklediğini göstermektedir. Bu etki hücre içi depolardan  $\text{Ca}^{+2}$  salıverilmesi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu süreçte protein kinaz C yolağı rol oynamaktadır. Bu bulgular apelinin, sıçanlarda doğum sürecinin başlamasında rol oynayan endojen bir peptit olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apelin, miyometriyum, gebelik, kontraksiyon ve sıçan

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF POSSIBLE ROLE OF APELIN IN PREGNANCY AND BIRTH PROCESSES IN RATS

Apelin has important physiological effects on endocrine and metabolic functions. Plasma apelin levels in pregnant and lactating rat and the effect of apelin on contractions in pregnant rat were investigated in the present study.

Plasma apelin concentrations were determined by ELISA in control (in diestrus period), pregnant (12<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> day of pregnancy) and lactating (second and 10<sup>th</sup> day) rats. Additionally, the effect of apelin at 0.01 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M and 10 $\mu$ M concentrations on isometric contractions was tested in 21 daily pregnant rat uterus by using isolated organ bath. It was also investigated whether apelin induce uterus contractions in both pretreatment of protein kinase C inhibitor and calcium free conditions.

Plasma apelin levels were determined as 120.2 $\pm$ 10.9ng/ml, 101.9 $\pm$ 14.5ng/ml, 151.1 $\pm$ 31.7ng/ml ve 235.8 $\pm$ 46.5ng/ml in diestrus, and 12<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> days of pregnancy, respectively and at 111.4 $\pm$ 19.2ng/ml ve 143.3 $\pm$ 13.2ng/ml in second and 10<sup>th</sup> days of lactation. We observed that apelin induce contractions in myometrium experiments. Contraction frequencies were significantly high in 0.01 $\mu$ M, 1 $\mu$ M and 10 $\mu$ M doses of apelin ( $p$ <0.01). Moreover, the contraction amplitudes were significantly augmented in 1 $\mu$ M ve 10 $\mu$ M apelin applications ( $p$ <0.05 and  $p$ <0.01, respectively). Apelin treatment induced the contractions in calcium free condition. There was no contraction after application of apelin in protein kinase C inhibitor pretreatment experiment.

The results of this study showed that plasma apelin level increased at the end of pregnancy and this hormone induced uterus contractions in rat. This effect turns out by mediation of intracellular Ca<sup>+2</sup> release. Protein kinase C pathway plays a role in this process. These results reveal that apelin is an endogenous peptide may play a role at the beginning of parturition.

**Key words:** Apelin, myometrium, contraction, pregnancy and rat

## İÇİNDEKİLER

|   |            |
|---|------------|
| <b>BAŞLIK SAYFASI</b>   | <b>i</b>   |
| <b>ONAY SAYFASI</b>   | <b>ii</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR</b>   | <b>iii</b> |
| <b>ÖZET</b>   | <b>iv</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>v</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b>  | <b>ix</b>  |
| <b>TABLO LİSTESİ</b>  | <b>ix</b>  |
| <b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>  | <b>xi</b>  |
| <b>1.GİRİŞ</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1. Sıçanlarda Gebelik ve Doğum  | 3          |
| 1.1.1. Gebelik ve Gebeliğin Saptanması  | 4          |
| 1.1.2. Doğum  | 4          |
| 1.1.3. Laktasyon  | 5          |
| 1.2. Düz Kaslar   | 5          |
| 1.2.1. Düz Kas Kasılmasının Mekanizması   | 6          |
| 1.2.1.1. Düz Kas Kasılmasının Kalsiyum İyonları ile Düzenlenmesi                  | 6          |
| 1.2.1.2. Kasılmanın Düzenlenmesi  | 6          |
| 1.2.1.3. Miyoplazmik Kalsiyum Konsantrasyonunun Düzenlenmesi                      | 7          |
| 1.2.1.4. Sarkolemma   | 9          |
| 1.2.2. Düz Kasta Zar Potansiyelleri   | 9          |
| 1.2.2.1 Düz Kas Aksiyon Potansiyellerinin Oluşmasında Kalsiyum Kanallarının Önemi | 9          |
| 1.3.Miyometriyum  | 10         |
| 3.3.1.Miyometriyumda Uyarılabilirlik ve Kasılma                                   | 10         |
| 1.3.1.1.Miyometriyumda Sarkoplazmik Retikulum                                     | 11         |
| 1.3.2. Miyometriyum Kasılmasının Elektrofizyolojik Özellikleri                    | 12         |
| 1.3.2.1. Önder odaklar ( <i>Pacemaker</i> ):                                      | 12         |
| 1.3.2.2. Karakteristik Aksiyon Potansiyelleri                                     | 12         |
| 1.3.3. Hücre İçi Sinyal İletimi Mekanizmaları                                     | 13         |
| 1.3.3.1. G protein kenetli reseptör (GPCR)'ler                                    | 14         |

|   |    |
|---|----|
| 1.3.3.2. G proteinlerinin sınıflandırılması                                     | 15 |
| 1.3.3.3. G proteinlerinin yapısal özellikleri                                   | 18 |
| 3.3.3.4. G protein etkinliğinin düzenlenmesinde moleküler mekanizmalar          | 18 |
| 1.3.3.5. G protein işlevinin kovalent uyarlamalar ile düzenlenmesi              | 20 |
| 1.3.3.5.1. Fosforillenme  | 20 |
| 1.3.3.5.2. Lipit uyarlamaları   | 20 |
| 1.3.3.5.3. ADP ribozillenme   | 21 |
| 1.3.3.6. G Proteinleri ile düzenlenen efektörler                                | 22 |
| 1.3.3.6.1. Adenilat siklaz  | 22 |
| 1.3.3.6.2. Fosfolipaz C $\beta$   | 23 |
| 1.3.3.6.3. cGMP Fosfodiesteraz  | 23 |
| 1.3.3.6.4. Fosfoinositit 3-kinaz  | 24 |
| 1.3.3.6.5. Fosfolipaz A2  | 24 |
| 1.3.3.6.6. İyon kanalları   | 24 |
| 1.3.3.6.6.1 Na <sup>+</sup> kanalları   | 25 |
| 1.3.3.6.6.2. Cl <sup>-</sup> kanalları  | 25 |
| 1.3.3.6.6.3. GIRK (G protein-Gated inwardly rectifying (K <sup>+</sup> ) kanalı | 25 |
| 1.3.4. Miyometriyumda G Protein Sinyal Yolları                                  | 25 |
| 1.3.4.1. Miyometriyumda Fosfolipaz C  | 27 |
| 1.3.4.2. Miyometriyumda Adenilat Siklaz   | 27 |
| 1.3.4.3. Miyozin Hafif Zincir Fosforilasyonu, Kasılma ve Gevşeme                | 27 |
| 3.4. Apelin   | 28 |
| 1.4.1. Apelinin Biyokimyası ve Metabolizması                                    | 28 |
| 1.4.2. Apelin Reseptörü   | 30 |
| 1.4.3. Apelinin Etkileri  | 32 |
| 1.4.3.2. Besin Alımı Üzerine Etkileri   | 33 |
| 1.4.3.3. İnsülin ve Obeziteyle İlişkisi   | 34 |
| 1.4.3.4. Kardiyovasküler Etkileri   | 35 |
| 1.4.3.5. Sıvı-Elektrolit Dengesi ve Hipotalamo-Hipofizyal Eksenle İlişkisi      | 37 |
| 1.4.3.6. İmmün Sistem Üzerine Etkileri  | 37 |
| 1.4.3.7. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri                               | 38 |
| 1.4.3.8. Solunum Sistemi Üzerine Etkileri                                       | 38 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4.3.9. Üreme Sistemi Üzerine Etkileri        | 39        |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                      | <b>42</b> |
| 2.1. DeneY Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri | 42        |
| 2.2. DeneY Hayvanlarının Hazırlanması          | 42        |
| 2.4. DeneY Düzenęi                             | 43        |
| 2.4.1. Oksijenkarbondioksit kaynağı:           | 43        |
| 2.4.2. Organ banyosu                           | 43        |
| 2.4.2.1. Krebs Solüsyonunun Depolandığı Kısım  | 44        |
| 2.4.2.2. Organ Banyosu Hazneleri               | 44        |
| 2.4.2.3. Kanal ve Kapak Sistemi                | 44        |
| 2.4.2.4. İzometrik Transduser                  | 44        |
| 2.4.2.5. Amplifikatör                          | 44        |
| 2.5. Plazma Apelin Düzeyi Analizi              | 45        |
| 2.6. Apelinin Hazırlanması                     | 46        |
| 2.7. Chelerythrine Chloride Hazırlanması       | 47        |
| 2.8. DeneY Protokolleri                        | 47        |
| 2.8.1. Birinci protokol deneyleri              | 47        |
| 2.8.2. İkinci protokol deneyleri               | 47        |
| <b>3. BULGULAR</b>                             | <b>49</b> |
| 3.1. Birinci Protokol Grubu Bulguları          | 49        |
| 3.2. Protokol Grubu Bulguları                  | 50        |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                             | <b>53</b> |
| <b>5. KAYNAKLAR</b>                            | <b>58</b> |
| <b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>                             | <b>84</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Dişi Sıçanlar da ürogenital sistemin anatomisi. 3
- Şekil 2.** G proteinlerinin özgünlüğünü tanımlayan  $\alpha$  altbirimleri amino asit 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. 16
- Şekil 3.** Apelin peptitlerinin sentez ve metabolizması. Biyolojik olarak aktif peptitler gri renkte gösterilmiştir. QC glutaminil siklaz, ACE<sub>2</sub> anjiyotensin dönüştürücü enzim-2, P-glu-piroglutamilat, Phe-fenilalanin. 29
- Şekil 4.** Logaritma standart konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği 46
- Şekil 5.** Protokol grubunda diöstrus, gebeliğin 12., 18. ve 21. günü ve laktasyonun 2. ve 10. günündeki sıçanlarda plazma apelin düzeyleri. 49
- Şekil 6.** Spontan kasılmalar üzerinde apelinin 0.01, 0.1, 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlardaki etkilerini gösteren orijinal trase. 50
- Şekil 7.** 21 günlük gebe sıçanlarda uterus kontraksiyonlarının frekansı üzerinde apelinin etkileri.. 51
- Şekil 8.** 21 günlük gebe sıçanlarda apelinin uterus kontraksiyonlarının genliği üzerindeki etkileri.. 52
- Şekil 9.** Ca<sup>+2</sup> suz Krebs çözeltisinde protein kinaz C inhibitörü olan *chelerythrine chloride* 10 $\mu$ M dozda uygulandıktan sonra 10  $\mu$ M dozda uygulanan apelinin etkisini gösteren orijinal trase. 53

## TABLO LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 1.</b> G proteinlerinde lipit yapıları ve hücre zarına tutunum kalıntıları                  | 20 |
| <b>Tablo 2.</b> İnsan apelinin biyoaktif formlarının aminoasit dizisi ve apelin 12C terminal bölgesi | 29 |
| <b>Tablo 3.</b> Apelin ve Apelin Reseptörünün Karakteristik Özellikleri                              | 31 |
| <b>Tablo 4.</b> Apelin ve APJ'nin dokulardaki dağılımı   | 32 |
| <b>Tablo 5.</b> Krebs solusyonu içeriği mM/L   | 43 |
| <b>Tablo 6.</b> Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri     | 45 |

## KISALTMALAR LİSTESİ

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

## 1. GİRİŞ

Apelin ilk olarak 1998 yılında Totemato ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup (1), etkisini APJ reseptörü aracılığı ile göstermektedir (1). Apelin ekspresyonu ilk olarak kaudat nukleus, hipokampus, talamus, paraventriküler nukleus, preoptik alan, periventriküler hipotalamus, ventromedial ve dorsomedial nukleuslar ve frontal kortekste tespit edilmiştir (2). Daha sonraki çalışmalarda apelin mRNA, özellikle spinal kord, korpus kallosum, amigdala, substansiya nigra, hipofiz bezi, böbrekler, kalp, akciğerler, plasenta ve meme bezleri gibi insan merkezi sinir sistemi ve birçok perifer dokularda gösterilmiştir (3-5). 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 sistemi gibi birçok sistemdir. Üreme sisteminde sığır over folliküllerinde, granüloza hücrelerinin farklı gelişim safhalarında apelin mRNA ekspresyonu bulunmakla birlikte, APJ ekspresyonu, östrojen inaktif dominant folliküllerin granüloza hücrelerinde diğer folliküllere kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. Bununla birlikte intraluteal arterlerin düz kaslarında apelin ve APJ'nin lokalizasyonu gösterilmiştir ve apelin, vasküler endotelial büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi anjiyojenik faktörlerle birlikte etki ederek, korpus luteum (KL)'de anjiyojenik etkisini gösterir (6). Bu etkiyle kapillerin proliferasyonunu sağlar, preovulatuvar folikülün seçiminde rol alır, besin ve öncül maddelerin artmasına yol açar ve böylece dominant follikülün büyümesini sağlar (7). Apelin varlığı insan plasentasında 1. ve 3. trimesterde bulunmuştur (8). Normal plasentada apelin ekspresyonu plasental villuslarda, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlarda gebeliğin 1. trimesterinden 3. trimesterine kadar azalış gösterir, buna karşın APJ ekspresyon düzeyi plasentanın endotel hücrelerinin ve sitotrofoblastların sitoplâzmalarında artar. Umblikal kan plazmasında apelin konsantrasyonunun belirgin derecede yüksek olması, apelinin intrauterin gelişimdeki rolünü desteklemektedir. Hamilelik boyunca meme bezlerinin gelişimine paralel olarak apelin ve onun mRNA düzeyi giderek artar, hamileliğin sonlarında ve doğumda en yüksek seviyesine ulaşır (9). Doğumdan sonra da meme bezlerinde apelin düzeyi hala yüksektir ve 21 gün içinde seviyesi giderek düşerek bazal seviyesine iner (9). Sığır kolostrumunda apelinin büyük miktarlarda (14–93 pmol/ml)

sekresyonu gösterilmiştir (9). Ayrıca laktasyonda sıçan sütündeki apelin peptit içeriği 300-600 ng/ml gibi oldukça büyük miktarda bulunmuştur (10).

Bu bilgiler apelinin bazı üreme işlevleri üzerinde regülatör rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte, apelinin uterus kasılmaları üzerindeki olası etkisini konu alan bir araştırma bulgusu henüz bulunmamaktadır. Oysa ki apelinin insanlarda gebelik boyunca farklı plazma konsantrasyonlarına sahip olması (11), sıçan hipotalamusundaki oksitosin sentez bölgeleri olan SON ve PVN'da yüksek düzeyde eksprese edilmesi (11) ve sıçan miyometriyumunda APJ ekspresyonunun bulunması, hormonun gebelik ve doğumla ilgili olaylarda da etkili olabileceğinin açık göstergesidir.

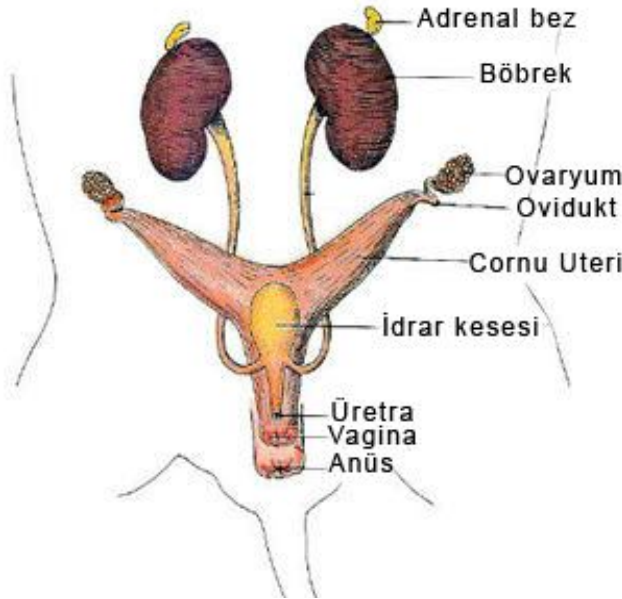
Memelilerde gebelik ve doğum süreçlerinde birçok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörlerin birbiriyle uyumlu olarak fizyolojik mekanizmaları oluşturmaları sonucunda doğum işlevi sağlıklı olarak meydana gelmektedir (12). Bununla birlikte doğumun gerçek mekanizması veya doğumu başlatan olayların ne olduğu halen aydınlatılmaya muhtaçtır (12). Progesteron, östrojen, kortizol, relaksin, oksitosin, kortikotropin serbestleştirici hormon, prostoglandinler ve katekolaminlerin tümü doğumun başlatılması ve sürdürülmesini ve uterusun en sonunda boşaltılmasını etkiler (12). Bu mekanizmaların etkinliğiyle ilgili bilinmeyen daha birçok nokta aydınlatılmayı beklemektedir. Son yıllarda özellikle metabolizma ve üreme işlevlerinin birbiriyle yakın ilişkisini konu alan çalışmalar gerek obezite fizyopatolojisinin araştırılmasında, gerekse gebelik ve doğum süreçlerinin anlaşılmasında önemli bakış açıları oluşturmaktadır. Bu tezin konusunu da, son yıllarda bilim dünyasına kazandırılan yeni bir hormon olan apelinin, gebelik ve doğum süreciyle ilgili bazı fizyolojik olaylara muhtemel etkilerinin araştırılması oluşturmuştur (12).

Bu tez çalışması apelinin gebe sıçanlarda miyometriyum kasılmaları üzerindeki olası etkilerini araştırmak için gerçekleştirilmiştir. Apelinin sıçanlarda uterus kontraksiyonları üzerindeki etkisini konu alan hiçbir araştırmanın bulunmaması, mevcut çalışmanın bilimsel değerini arttırmaktadır. Ayrıca apelinin olası etkisinde protein kinaz C (PKC) yolağının aracı rol oynayıp oynamadığının sorgulanması, henüz etki mekanizması tam olarak anlaşılammış olan apelinin, hücre içi sinyalleşmedeki bilinen bazı etkilerine yeni ek deliller sağlayabilecektir. Gebelik

ve laktasyon süreçlerindeki sıçanlarda plazma apelin konsantrasyonlarının belirlenmesi de hormonun bu süreçlerdeki olası etkilerinin anlaşılmasına yönelik yeni bulguların yorumlanmasında faydalı olabilecektir. Bu tez çalışmasının sonunda, metabolizma-obezite-gebelik-doğum etkileşimlerini konu alan yeni araştırmalar için önemli projeksiyonlar elde edilecektir.

### 1.1. Sıçanlarda Gebelik ve Doğum

Sıçanlar, vücudu tipik memeli tüyleri ile kaplı ve fiziksel olarak fuziform yapıda kemirgen türü hayvanlardır. Büyüme erkek sıçanlarda 2 yaşına kadar devam ederken, dişi sıçanlar genellikle daha küçüktür ve hayatlarının ilk birkaç ayında olgun hale gelirler (13-15). Yetişkin dişi sıçanlarda ovaryum, foliküllerle dolu bir yapıdadır ve böbreklere yakın yerleşimlidir. Helezonik yapıdaki oviduk ovaryumu iki kornulu yapıdaki uterusu bağlar (Şekil 1).



**Şekil 1.** Dişi Sıçanlar da ürogenital sistemin anatomisi (16).

Sıçanlardaki bazı reproduktif parametreler söz konusu olduğunda ortalama değerler, yavru sayısı ortalama 10, doğum ağırlığı 6 g, puberteye ulaşma süresi ortalama 8-10 hafta, östrus siklusu 4-5 gün, östrus süresi 12-24 saat ve ortalama gebelik süresi 20-22 gündür (17).

### **1.1.1. Gebelik ve Gebeliğin Saptanması**

Vaginal sürüntüde sperm görülmesi sıçanlarda gebeliğin belirlenmesi açısından önemli bir tanı aracıdır. Abdominal palpasyon ile fetuslar gebeliğin 10. gününden itibaren saptanabilir, fakat 12. günden sonra daha belirgin hale gelir (18). 14. günde meme bezi gelişimi ve meme başlarında büyüme gözlemlenebilir. Progesteron değerleri ise gebeliğin 7. ve 13. günlerinde en yüksek düzeye ulaşır (13). Gebeliğin başlangıcından doğuma kadar ortalama 21-23 gün sürmektedir. Fakat anne, önceki gebelikten doğan yavrularını emziriyorsa, bu süre uzayabilir (13). Yırtılmış blastositin implantasyonu gebeliğin 5. gününde meydana gelir (19). Diğer hayvan türlerinden farklı olarak sıçan embriyosu, östrojen üretmez ve maternal östrojen implantasyonu düzenler. Gebeliğin ilk yarısı boyunca, koitus tarafından indüklenen prolaktin dalgaları ile uyarılan ovaryumdan progesteron salıverilir (20). Gebeliğin 2. yarısında plasenta da progesteron üretmeye başlar (21). Ovaryum gebelik boyunca östrojen salgılamaya devam eder. Bunun amacı gebelik korpus luteumunun aktive edilmesi ve devamlılığının sağlanmasıdır. Östrojen sıçan plasentası tarafından üretilmez ve plasental progesteron da gebeliğin devamı için yeterli değildir. Sıçan plasentası diskoidal ve hemokoriyaldir (22). Serum LH değerinde gebeliğin 11. gününde diğer günlere göre önemli düzeyde artış meydana gelir (23). Plasental luteotrop hormonların gelişimi 16. günde gerçekleşir ve gebelik korpus luteumunun büyüklüğü de bu dönemde artar (24). Doğumdan sonraki ilk 24 saatte dişi fertil post partum östrusu ortaya çıkar (25).

### **1.1.2. Doğum**

Simfizis pubisin gevşemesi gebeliğin 17. gününde başlar ve doğumdan hemen önce en belirgin duruma gelir. Korpus luteum tarafından gebeliğin ikinci yarısında üretilen relaksin hormonu serviksin ve simfizis pubisin gevşemesinden sorumludur (26). Doğumun gerçekleşmesini sağlayan fizyolojik olayların tetikleyici mekanizması tam olarak belli değildir. Bununla birlikte birçok kolaylaştırıcı faktörün etkinliği bilinmektedir. Gebeliğin son döneminde östrojenin sekresyonu artarken, progesteron dramatik bir şekilde azalmaktadır. Higuchi ve ark. (27) hipofizden oksitosin hormonu sekresyonu artışının uterus kontraksiyonlarına neden olduğunu göstermişlerdir. Bir nöroendokrin refleks olan Ferguson refleksinde serviksin fetus

kaynaklı gerimi bir seri nöroendokrin cevabı stimüle eder ve bu durum oksitosin üretimine neden olur. Doğum sırasında ilk yavrunun atılmasından 1,5-4 saat önce belirgin bir vaginal akıntı görülür (13). Doğum başlangıcı esnasında anne sıçan değişen aralıklarla kafes içerisinde dolaşır ve bu esnada vücudunu uzatır (esneme hareketi). Sonunda arka bacakları ekstensiyon pozisyonunda abdomen üzerine uzanır ve vulvayı yalar. Doğum esnasında anne sıçan yarım çömelmiş vaziyette durur. Tüm doğum süreci yavru sayısına bağlı olarak değişmekle birlikte 55 dakika ile 4 saat (ortalama 1.5 saat) kadar sürmektedir (21). Yavru doğduktan sonra, anne plasentayı doğum kanalından çeker ve yer (27). Sonra yavruyu yalayarak amniyotik örtüyü kaldırır. Tüm yavrular doğmadan emzirme gerçekleşmez. Yavru sayısını etkileyen faktörler arasında tür, soy ve anne yaşı sayılabilir. En çok yavru genellikle ikinci doğumda elde edilir (25).

### **1.1.3. Laktasyon**

Tipik bir laktasyon periyodu 3 hafta sürmektedir. Laktasyon başlangıcı prolaktine, glukokortikoidlere ve gebeliğin son günlerinde artan plazma kortikosteronuna bağlıdır. Östrus siklusu ve ovulasyon laktasyon esnasında gecikir ve emzirmenin bitiminden itibaren yeniden başlar. Ovulasyon laktasyon döneminde meydana gelmemektedir. Bununla birlikte, doğumdan sonraki 24 saat içerisinde oluşan bir LH dalgasına bağlı olarak postpartum ovulasyon gerçekleşir (28). Bu esnada başarılı bir fertilizasyon meydana gelirse, implantasyon engellenebilir ve blastosit laktasyon sonuna kadar uterusu kalabilir. İmplantasyon korpus luteum kaynaklı progesteron ve ovaryum kaynaklı östrojenin baskısı sonucu gecikir. Laktasyonun ilk iki haftasındaki dişilerde yapılan yiyecek kısıtlaması laktasyonel diöstrusu uzatmaktadır (29).

### **1.2. Düz Kaslar**

İnsan vücudunda bulunan toplam kas kitlesi içinde kalp kası ile beraber % 10'luk kısmı kaplar. İskelet kası çapından 30 kat daha küçük, 1-5 mikrometre çapa ve 20-500 mikrometre boya sahiptir. Düz kas kasılmasının birçok özelliği iskelet kasındaki gibidir fakat düz kas liflerinin iç fiziksel düzenlenmesi tamamen farklıdır (30).

Her organın düz kası, diğer organlardan çeşitli bakımlardan ayırt edicidir. Ancak genel olarak çok birimli ve üniter (tek birimli) düz kaslar olarak iki kısımda incelenir (30). Çok birimli düz kaslar birbirinden ayrı düz kas liflerinden oluşmuştur ve en önemli özelliği her lifin diğerinden bağımsız kasılabilmesi ve temel olarak sinir sinyalleriyle kontrol edilmesidir (30). Gözün silyer ve iris kası ile piloerektör kas çok birimli düz kaslardan bazılarıdır. Üniter düz kaslar ise yüzlerce veya binlerce düz kas lifi kütesinden meydana gelir. Hücre membranları birçok noktada birbirine bitişiktir, bu sayede bir kas lifinde oluşturulan güç yanındakine aktarılabilir (30). Ayrıca, hücre membranları, aksiyon potansiyelinde iyonların bir kas hücresinden yanındaki hücreye serbestçe akabilmesini veya aksiyon potansiyeli dışındaki basit iyon akımlarının bir liften ötekine geçebilmesini ve böylelikle kas liflerinin birlikte kasılmasını sağlayan birçok yarık bağlantı (gap junction) ile birleştirilmiştir (30). Barsaklar, safra kanalları, üreterler, uterus ve kan damarları gibi birçok iç organın duvarında bu düz kas türü yer alır (30).

### **1.2.1. Düz Kas Kasılmasının Mekanizması**

Düz kaslar, kimyasal özellikleri iskelet kasındakilere benzeyen aktin ve miyozin filamentleri içerir ancak düz kasta iskelet kasındaki aktin ve miyozin filamentlerinin çizgili yerleşimi yoktur. Kas lifinde dağınık serpilmiş birçok aktin filamentleri arasında az sayıda miyozin filamentleri vardır. Bunların çapı aktin filamentlerinin iki katından fazladır. Düz kas kasılma süreci kalsiyum iyonları ile aktive edilir ve kasılmada gerekli olan enerji adenozin trifosfatın (ATP) adenozin difosfata (ADP) yıkılmasıyla elde edilir (30).

#### **1.2.1.1. Düz Kas Kasılmasının Kalsiyum İyonları ile Düzenlenmesi**

İskelet kasında olduğu gibi çoğu düz kasta da kasılma için gerekli öncü uyarıyı intraselüler kalsiyum iyon artışı sağlar. Bu artış farklı tiplerdeki düz kaslarda düz kas lifinin sinirsel ya da hormonal yolla uyarılması, lifin gerilmesi veya lifin çevresindeki kimyasal değişikliklerle meydana gelebilir (30).

#### **1.2.1.2. Kasılmanın Düzenlenmesi**

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış iskelet kasında aktini etkilerken düz kasta miyozini etkiler (yani kasılma miyozin tarafından düzenlenir). Hücre içi

kalsiyumdaki artış miyozindeki hafif zinciri fosforile ederek daha sonra aktinle etkileşmesine, böylece kuvvet oluşumuna yol açan kalsiyum-kalmoduline bağlı bir protein kinazı aktive eder (30). Kalmoduline dört kalsiyum molekülü bağlanır. Kalsiyum-kalmodulin kompleksi miyozinin düzenleyici hafif zincirini fosforile eden miyozin hafif zincir kinazını (MLCK) aktive eder (30). Bu zincir fosforile değilken miyozin başının aktinle tutunma ayrılma döngüsü oluşmaz, fakat düzenleyici zincir fosforile olduğunda bağlanma ve sonraki bütün döngüsel işlemlerden geçme, dolayısı ile kasta kasılma olayının meydana gelmesi sağlanır (30). Miyozin çapraz köprüsünü aktive etmede bu fosforilasyon basamağına ek olarak bir ATP molekülü de gereklidir (30).

Düz kastaki miyozin çapraz köprü siklusu çizgili kastakine benzerdir. Aktin filamanına tutunmayı takiben çapraz köprü, ince filamanı kalın filamanın merkezine doğru iterek dişli çark etkisi oluşturur ve kuvvet meydana gelir. Bu sırada miyozin başından ADP ve Pi serbestleşerek ATP'nin bağlanmasına izin verir (30). ATP, miyozinin aktine afinitesini azaltarak miyozinin aktinden ayrılmasını sağlar. Yeni bağlanan ATP'nin enerjisi daha sonra miyozin başında şekil değişikliği meydana getirmede (yani başı yeniden siklusa hazır hale getirmede) kullanılır, böylece çapraz köprü bir diğer kasılma siklusu için hazırdır (30). Miyozin çapraz köprüsü fosforile kaldığı sürece çapraz köprü siklusu devam eder. Çapraz köprü siklusu çizgili ve düz kas için benzer kinetik gösterir ancak düz kaslarda daha yavaştır (30).

Bu döngü miyoplazmik kalsiyum konsantrasyonu azalınca kadar her siklus için bir ATP'nin hidroliziyle devam eder. Kalsiyum konsantrasyonundaki azalmayla birlikte MLCK inaktif duruma geçer ve çapraz köprüler, miyozin fosfataz tarafından defosforile edilir ve kasılma durur (30). Dolayısıyla kasın gevşemesi için gerekli zaman, büyük ölçüde hücredeki aktin miyozin fosfataz miktarı ile belirlenir (30).

### **1.2.1.3. Miyoplazmik Kalsiyum Konsantrasyonunun Düzenlenmesi**

Düz kasta aktivasyonla kasılma arasındaki bağlantıyı sağlayan mekanizmalar, biri sarkolemmada diğeri sarkoplazmik retikulum (SR)'da olmak üzere, iki kalsiyum havuzu içerir (30). Sarkolemma hücre dışı kalsiyum havuzundan (yani hücre dışı sıvıdan) kalsiyum giriş-çıkışını düzenler. SR membranları miyoplazmayla hücre içi havuz arasındaki kalsiyum hareketlerini belirler (30). İskelet kasının kasılması hücre

dışı kalsiyuma ihtiyaç duymazken, düz kasın kasılmasında hücre dışı kalsiyum önemlidir (30). Bu nedenle miyoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesi yalnızca SR ile değil, sarkolemmayla da ilişkilidir (30). Çeşitli faktörler düz kas miyoplazmik kalsiyum konsantrasyonunu değiştirebilir (30). Bu, aksiyon potansiyelinin etkisiyle SR'den salıverilen kalsiyumun kontraktıl aygıtı tamamen aktive ettiği iskelet kasındaki tersinedir (30).

Hücrenin uyarılması SR kalsiyum kanallarının açılmasına yol açar ve miyoplazmik kalsiyum konsantrasyonu hızla artar (30). Bu salınım ikinci haberci inozitoltrifosfat (IP<sub>3</sub>)'ın SR'deki reseptörlerine bağlanmasıyla ilişkilidir (30). IP<sub>3</sub>, fosfolipaz C'yi aktive eden bir G protein aracılığıyla bağlantılı sarkolemmal reseptörler üzerine etkili olan bir uyarıcı tarafından oluşturulur (30). Fosfolipaz C bir membran fosfolipidi olan fosfatidilinositol bifosfatı (PIP<sub>2</sub>) IP<sub>3</sub> ve diaçil gliserole hidrolize eder. Daha sonra IP<sub>3</sub> SR'ye difüze olarak IP<sub>3</sub> kapılı kalsiyum kanalının açılmasına yol açar. Bu da kalsiyumun SR'den miyoplazma içerisine alınmasıyla sonuçlanır (30). Bu kompleks süreç SR'den dereceli kalsiyum salınımına izin verebilir ve çoğu farklı nörotransmitterin ve hormonun düz kas kasılmasını etkilemesini de sağlayabilir. SERCA'nın aktivitesiyle SR tarafında tekrar kalsiyum biriktirilir. Bununla birlikte miyoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun azalmasında kalsiyumun düz kas hücresinden çıkışı da rol oynar (30). SR'nin kalsiyumla yeniden dolması sadece sitozolik kalsiyumun yeniden birikmesine değil, hücre dışı kalsiyuma da bağlıdır (30). Hücre dışı kalsiyuma bağımlılığın "bileşke SR" olarak adlandırılan SR'ye yakın noktalardaki sarkolemmada bulunan bir "depo işlevli" kalsiyum kanalının çalışmasını yansıttığı düşünölmektedir (30).

SR'de IP<sub>3</sub> reseptörüne ek olarak sarkolemmadan kalsiyum girişı dönemlerinde aktive olabilen ve ryanodin reseptörü (RYR) olarak isimlendirilen kalsiyum kapılı kalsiyum kanalı bulunur (30). Düz kas dahil çoğu hücrede, miyoplazmik kalsiyumun lokalize yükselmesiyle sonuçlanan kısa süreli spontan RYR açılmaları meydana gelir (30). Bu spontan lokalize miyoplazmik kalsiyum konsantrasyon artışları, kalsiyuma duyarlı floresan boyalarla çalışıldığında "kalsiyum kıvılcımları" olarak adlandırılan kısa parlak flaşlar oluşturur (30). Düz kasta cAMP artışı özellikle SR'nin sarkolemmaya yakın olduğu yerlerde (bileşke SR) kalsiyum kıvılcımlarının sıklığında artışla birlikte (30). Bu kıvılcımların frekansındaki artma

sarkolemmadaki büyük iletkenliğe sahip kalsiyum kapılı  $K^+$  kanalının aktivasyonu ile damar düz kasını hiperpolarize eder (30). Bu hiperpolarizasyon daha sonra hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu azaltır ve gevşeme oluşur (30).

#### **1.2.1.4. Sarkolemma**

Düz kas hücresinden kalsiyumun çıkışı sarkolemmal kalsiyum-ATPaz aktivitesiyle ve bir  $3Na^+/Ca^{+2}$  antiporteri (dışarıya çıkan her bir kalsiyum için hücreye üç sodyum girer) aracılığıyla oluşur (30). Hücreden kalsiyum çıkışı SERCA tarafından SR'de kalsiyum depolanmasıyla yarışır ve böylece SR'de kalsiyum birikimini azaltır (30). SR'de kalsiyum içeriğinin azalmasının, daha sonra bileşke SR'ye yakın sarkolemmadaki "depo" işlevli kalsiyum kanalını aktive eden ve SR'nin tamamen hücre dışı sıvıdan gelen kalsiyumla dolmasını sağlayan kalsiyum giriş faktörünün SR'den salınmasıyla sonuçlandığı düşünülmektedir (30). Bununla birlikte, düz kasın sürekli kasılmasının hücre dışı kalsiyuma gerek duyduğu açıktır (30).

#### **1.2.2. Düz Kasta Zar Potansiyelleri**

Düz kasta zar potansiyellerinin nicel değeri kasın o andaki durumuna bağlıdır. Normal istirahat halinde hücre içi potansiyeli genellikle -50 ila -60 milivolt kadar olup, iskelet kasından yaklaşık 30 milivolt daha az negatiftir (30).

##### **1.2.2.1 Düz Kas Aksiyon Potansiyellerinin Oluşmasında Kalsiyum Kanallarının Önemi**

Düz kas hücre zarı, iskelet kasından çok daha fazla voltaj kapılı kalsiyum kanallarına, fakat daha az voltaj kapılı sodyum kanallarına sahiptir (30). Dolayısıyla, çoğu düz kasta aksiyon potansiyeli oluşumunda sodyum katkısı azdır. Onun yerine, aksiyon potansiyelinden başlıca sorumlu olan, kalsiyum iyonlarının lifin içine akımıdır (30). Bu durum, sinir lifleri ve iskelet kas liflerindeki sodyum kanalları gibi kendini yeniden oluşturan bir şekilde oluşur (30). Ancak kalsiyum kanalları sodyum kanallarından çok daha yavaş açılır ve üstelik onlardan daha uzun süre açık kalır. Bazı düz kas liflerinin uzamış platolu aksiyon potansiyellerinden büyük ölçüde bu olay sorumludur (30).

Aksiyon potansiyeli sırasında hücrelere kalsiyum girişinin diğer bir önemli özelliği de, hücre içine giren kalsiyumun düz kas kasılma mekanizmasına doğrudan etki ederek kasılmaya neden olmasıdır. Dolayısıyla kalsiyum bir defada iki iş görür (34).

### 1.3. Miyometriyum

Uterus, tunika seroza (perimetriyum), tunika muskularis (miyometriyum) ve tunika mukoza (endometriyum) olmak üzere üç tabakadan meydana gelmiştir. Perimetriyum periton tarafından oluşturulurken, miyometriyum uterus duvarının en kalın katmanını meydana getirir. Miyometriyumda bulunan düz kas hücreleri iç tarafta sirküler, dış tarafta ise longitudinal olarak seyrederek. Endometriyum ise düz bir örtü şeklinde dış taraftaki kas tabakasına yapışık durumda yer alır (30-32).

Miyometriyum, spontan ve fazik kasılabilen bir düz kastır. Miyometriyal kasılmalar nöronal veya hormonal bir uyarı olmaksızın meydana gelebilen miyojenik özelliktedir (33). Gebelik boyunca miyometriyal aktivite zayıf koordineli olmayan kasılmalar (Braxton-Hicks kasılmaları) şeklinde iken, gebeliğin sonuna doğru doğum ve güçlü kasılmalar için uyarılara hazır durumdadır (34, 35). Uyarılar lokal, maternal, mekanik ve fetal kaynaklı olabilirler (36). Doğum sırasında meydana gelen koordineli uterus kasılmaları, uyarılmaya hazır durumdaki miyometriyumda yüksek frekans ve genlikte kontraksiyonların ortaya çıkmasına sebep olur (30, 36, 37).

#### 3.3.1. Miyometriyumda Uyarılabilirlik ve Kasılma

Miyometriyumda kasılma ve uyarılmada en önemli iyon  $Ca^{+2}$ 'dir. Miyometriyal hücrelerin sitozolünde serbest  $Ca^{+2}$   $10^{-7}$  M'dan düşük konsantrasyonda bulunurken, hücre dışı sıvıda ve SR'de daha yüksek konsantrasyonda ( $10^{-3}$  M) bulunmaktadır (38, 39). Ekstraselüler kalsiyumun miyometriyal hücrelere girişinde  $Ca^{+2}$  kanalları önemli rol oynar. Miyometriyal zarında iki tip  $Ca^{+2}$  kanalı bulunmaktadır. Bunlar voltaj kapılı ve ligand kapılı  $Ca^{+2}$  kanallarıdır (40, 41). İnsan miyometriyumunda düşük voltajla aktivasyon gösteren (T tipi) (42, 43) ve yüksek voltajla aktive olan (L tipi, 44-47) 2 tip voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanalı bulunmaktadır (48). İnsan ve sıçanlarda düz kas kasılması için gerekli olan ekstraselüler  $Ca^{+2}$ 'un en önemli kaynağı L tipi  $Ca^{+2}$  kanallarıdır (49-52). T tipi  $Ca^{+2}$  kanalları ise spontan  $Ca^{+2}$  geçişini sağlayarak, kasılmanın frekans ve genliğinin artmasına sebep olurlar (53).

$\text{Ca}^{+2}$  iyonları miyometriyal hücre yüzey membranında bulunan PMCA ve  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  pompası aracılığıyla hücre dışına atılır.  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  pompası hücre içine 3  $\text{Na}^{+}$  girişini ve hücreden 1  $\text{Ca}^{+2}$  çıkışını sağlar.  $\text{Ca}^{+2}$  pompaları  $\text{Ca}^{+2}$ 'un hücre dışına çıkışında ana rolü oynar çünkü  $\text{Ca}^{+2}$ 'a afiniteleri  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  pompasından çok daha yüksektir (54, 55). Bununla birlikte gebe sıçanlarda  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  pompasıyla  $\text{Ca}^{+2}$ 'un transferi  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunu % 60 azaltırken,  $\text{Ca}^{+2}$  pompalarıyla bu oran sadece % 30'dur (41).

### **1.3.1.1.Miyometriyumda Sarkoplazmik Retikulum**

Kalsiyumun SR'den saliverilmesi SR membranındaki reseptöre bağlanan  $\text{IP}_3$ 'ün artışıyla başlar. Bu durum oksitosin gibi agonistlerin G protein aracılı reseptörlere bağlanması ile gerçekleşir. Salıverilen  $\text{Ca}^{+2}$  miktarını,  $\text{IP}_3$ , intraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  ve SR'de depolanan  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu belirler (54, 56, 43, 57, 58). Miyometriyumda kalsiyumun SR'den salıverilmesindeki 2. mekanizma, SR membranındaki  $\text{Ca}^{+2}$  indüklemeli RYR kanal aracılıklı  $\text{Ca}^{+2}$  salıverilmesidir (54, 43, 57).

$\text{Ca}^{+2}$ 'nin SR'den salıverilmesinde bir diğer yol ise, SR'deki  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu ile intraselüller  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu arasındaki  $\text{Ca}^{+2}$  gradiyentine bağlı meydana gelen pasif  $\text{Ca}^{+2}$  akışıdır (59).

Miyometriyal SR'de  $\text{Ca}^{+2}$  depolanması,  $\text{Ca}^{+2}$  gradiyentine karşı çalışan SR'deki SERCA yoluyla olur. Bu mekanizma intraselüller  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunun düşmesine yol açar (54, 43).

SR'den  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin spontan olarak salıverilmesi  $\text{Ca}^{+2}$  kıvılcımları olarak adlandırılır (60). Bu kıvılcımlar  $\text{Ca}^{+2}$  kapılı  $\text{K}^{+}$  kanallarını aktive edip hiperpolarizasyon meydana getirir (61).  $\text{Ca}^{+2}$  bağımlı  $\text{Cl}^{-}$  kanallarının aktivasyonuna yol açarak depolarizasyona sebep olur veya diğer sinyal yollarının aktivasyonu ile membran uyarılabilirliğini etkiler (62, 63). Bu durum sadece gebe sıçanlarda gözlenmiştir (64). SR'den  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin çıkışı, intraselüler alana  $\text{Ca}^{+2}$  girişine yol açar. Bu mekanizma doğum sırasında uyarılabilirliği artırır (43, 65).

SERCA pompaları ve ryanodin reseptörleri hücre içinde santral ve periferik olmak üzere iki ayrı yerleşim gösterir. 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 (59). Düz kaslardaki bu alanlar arasında fonksiyonel yönden de farklılıklar gözlemlenmiştir (66). 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 kaslarında mevcuttur (65, 59).

Kaveol yapıları, lipit yığımları 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 (54, 65, 59).

### **1.3.2. Miyometriyum Kasılmasının Elektrofizyolojik Özellikleri**

#### **1.3.2.1. 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 önder odak hücrelerin depolarizasyonunu takiben başlar. Önder odaklar anatomik olarak belirgin veya lokalizasyonları sabit değildir ve özelleşen hücrelerdir (54, 43, 67). Sıçan miyometriyumunda miyozitlerin yaklaşık % 25' i yavaş dalga veya zirve olmaksızın ortaya çıkan aksiyon potansiyeli şeklinde spontan elektriksel aktivite gösterir (59). Bir başka çalışmada 18–19 günlük gebe farelerden elde edilen miyometriyal hücreler spontan aktivite gösterirken, 38–39 haftalık gebe insan miyometriyumlarında benzer koşullarda spontan kasılma olmadığı gösterilmiştir. Uterin miyozitlerin yarık bağlantı yoluyla hücreler arası iletişimi ve bu miyozitlerin miyometriyal kasılmaların uterin sessizlik dönemindeki zayıf ve senkronize olmayan halinden doğumdaki güçlü senkronize kasılmalara geçişindeki etkisi yapılan deneylerde gösterilmiştir (68-71).

#### **1.3.2.2. 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 "burst" lerdeki artışların sayısı ve frekansı kasılma hızı ve amplitüdünü belirler (54, 55,72, 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 (55).

### 1.3.3. Hücre İçi Sinyal İletimi Mekanizmaları

Hücrelerin tümü transmembran sinyal sistemlerine sahiptir ve bu sistemler hormonlar, nörotransmitterler veya duyuşsal uyarınlar gibi hücre dışı sinyaller sayesinde çevreden bilgi alırlar. Bu temel işlem hücrelerin birbirleri ile iletişim kurmasını sağlar. Transmembran sinyal sistemlerinin tümü temel olarak, reseptör ve efektör olmak üzere iki bileşenden oluşur. Reseptör hücre dışı uyarınları tanır, efektör ise ilgili reseptör denetiminde hücre içi sinyal oluşturabilir (74). Hücre dışı sinyallerin, hücre içine girişi genel olarak hidrofobik moleküllerin hücre zarından difüzyonu ile, iyon kanalları aracılığı ile, G protein kenetli reseptörler aracılığı ile ve enzim aktivitesine sahip reseptörler aracılığı ile olmak üzere dört farklı yoldan gerçekleşir. Hücre zarının sitoplazmik yüzüne yerleşik olarak bulunan heterotrimerik G proteinleri (Guanin Nükleotit Bağlayan Proteinler) küçük monomerik GTP bağlayan proteinleri de içine alan geniş GTPaz üst ailesinin üyesidirler.  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimlerinden oluşan G proteinleri binden fazla hücre yüzey reseptörü ile kenetlenerek, enzim ve iyon kanalı gibi pek çok efektör üzerinden sinyal iletimine aracılık ederler. Heterotrimerik G proteinleri aracılığıyla gerçekleşen olaylar dizisi, duyuşsal algılama, nöronal etkinlik, hormonal etkinlik, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi çeşitli sistemlerin düzenlenmesi ile sonuçlanır (74). Transmembran sinyal sistemlerinin moleküler düzenlenmesi oldukça karmaşıktır ve bu nedenle, bazı önemli sinyal moleküllerinin ve G proteinlerinin tarihsel keşfinden bahsetmek yararlı olacaktır. 1957 yılında Sutherland ve Rall (75, 76) adenilat siklazın epinefrin, glukagon ve NaF ile uyarıldığını ve ürününün cAMP olduğunu saptamışlardı, ancak G proteinleri ve hormon reseptörlerinin varlığı bilinmiyordu. Bundan 10 yıl sonra hormona duyarlı adenilat siklazın düzenleyici alt birimindeki özgün bir bölge ile

hormon ligandının allosterik etkileşiminin, katalitik birimin aktivitesini düzenlediği ortaya çıkarıldı. 1960'ların sonunda Birnbaumer ve Rodbell (77) yağ hücresi adenilat siklazında yaptıkları çalışmalarda, adenilat siklaz enziminin çeşitli hormon reseptörleri tarafından uyarıldığı ve bu reseptörlerin katalizörlerinden farklı oldukları sonucuna varmışlardır. Birkaç yıl sonra Orly ve Schramm (78) reseptör ve adenilat siklazın birbirlerinden bağımsız olduğunu göstermişlerdir. 1981'de Shorr ve ark. (79)  $\beta$  adrenerjik reseptörünü saflaştırmışlar ve hücre zarını yedi kez kat eden ilk G protein reseptörünü karakterize etmişlerdir. Kısa bir süre sonra Rodbell ve Birnbaumer (80) GTP' nin adenilat siklaz enziminin hormonal uyarısındaki rolünü tanımlamışlardır. Pfeufer ve Helmreich (81) adenilat siklaz kompleksinden GTP bağlayan bir proteini ayırmışlar, 1977'de Ross ve Gilman (82) ise hormona duyarsız adenilat siklaz sistemine 40 kDa'luk GTP bağlayan bir proteini, GTP varlığında ekleyerek uyarının yeniden oluştuğunu bildirmişlerdir. O zaman Ns olarak adlandırılan ve şimdi G $\alpha$ s olarak bilinen bu protein yine Gilman ve ark. (83) tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Gilman ve ark. (84) o zamana kadar G proteinleri ile ilgili çalışmalarından dolayı Tıp ve Fizyoloji alanında Nobel ödülünü kazanmışlardır.

### **1.3.3.1. G protein kenetli reseptörler**

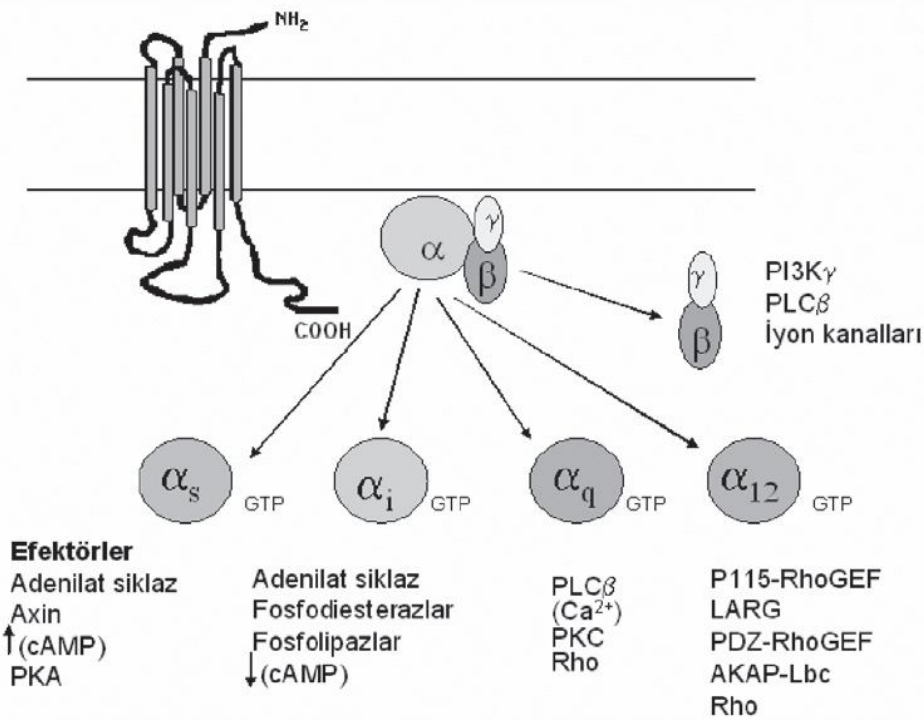
Klasik G protein kenetli reseptörler (G protein coupled receptor-GPCR) ailesi heptahelikal veya serpentin reseptörler olarak adlandırılır. Son zamanlarda kullanılan bu isimleri, G protein kenetli reseptörlerin hücre zarını yedi kez kat eden ve hücre dışına bakan bir N ucu ile hücre içine bakan bir C ucuna sahip olduğunu ifade etmektedir. Bununla birlikte son birkaç yıldır, heptahelikal veya serpentin olmayan bir grup reseptör veya proteinin, biyolojik etkilerinin bir kısmını heterotrimerik G proteinlerinin aracılığı ile gerçekleştirdikleri belirlenmiştir (85). Bu reseptörler, hücre dışı bir ligand bağlama bölgesi, bir transmembran bölge (domain) ve bir sitozolik bölgeye sahip, hücre zarını bir kez kat eden ve protein tirozin kinaz etkinliğine sahip proteinlerdir ve klasik olmayan GPCR'ler olarak tanımlanmaktadır (85). Epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, platelet kökenli büyüme faktörü, insülin, insülin-benzeri büyüme faktörü reseptörleri bu ailedendir (86, 87). Klasik GPCR'ler lipitler, biyojenik aminler, peptitler, proteinler, nükleotitler, koku

veya ışık gibi farklı tipteki pekçok uyarın tarafından etkinleşir ve guanin nükleotitlerini bağlayan heterotrimerik G proteinleri ile kenetlenerek enzim veya iyon kanalları dahil olmak üzere çeşitli efektörlerin etkinliğini düzenlerler. Salgı hızının kontrolü, kas kasılması ve metabolik işlemler gibi kısa dönemli etkiler ve büyüme ile farklılaşma gibi uzun dönemli etkiler GPCR'ler tarafından düzenlenir. Klasik GPCR'lerin 1000'den fazla üyesi olduğu bilinmektedir ve yapısal farklılıklarına göre üç aileye ayrılmaktadırlar (88). Bu aileler içinde en geniş ve en çok çalışılanı, rodopsin/ $\beta$  adrenerjik reseptör benzeri reseptörleri kapsayan A ailesidir. A ailesinin üyelerinin hepsinde korunmuş olan kalıntı Asp-Arg-Tyr motifindeki arjinindir. A reseptör ailesinin büyük bir bölümünde, ikinci ve üçüncü hücre dışı ilmikleri (ECL2 ve 3) bağlayan bir disülfid köprüsü bulunmaktadır; ayrıca karboksil ucunda palmitoyillenmiş bir sistein kalıntısı dördüncü hücre içi ilmiği oluşturabilmektedir. B reseptör ailesinin üyeleri, disülfid köprü ağı oluşturduğu düşünülen, birçok sisteinin yer aldığı uzun bir amino ucu ile tanımlanmıştır. B ailesinde A ailesine benzer, ECL2 ve 3'ü bağlayan bir disülfid köprüsü bulunmakla birlikte, palmitoyillenme bölgesi eksiktir. B reseptör ailesi çeşitli peptit, hormon ve nöropeptitleri bağlar. Ca ailesi üyeleri 500-600 amino asitten oluşmuş, olağandışı uzunlukta bir amino ucu ile tanımlanmaktadır. Metatropik glutamat reseptörleri, GABA reseptörleri ve kalsiyum reseptörleri gibi üyeleri olan C ailesi, ECL 2 ve 3'te yerleşik sisteinler dışında A ve B reseptör aile üyeleri ile ortak amino asitler içermezler (89).

### 1.3.3.2. G proteinlerinin sınıflandırılması

G protein aracılı sinyal sistemlerinin çeşitliliğinin temelinde, G proteinlerinin modüler yapısı ve birçok alt tiplerin varlığı yatar. Bugüne değin 20  $\alpha$ , 5  $\beta$  ve 13  $\gamma$  altbirimi tanımlanmıştır (90).  $G\alpha$  altbirimleri moleköl ağırlıkları 39-52 kDa arasında değişmektedir.  $\alpha$  altbirimleri guanin nükleotit bağlama bölgesi ile doğal GTPaz etkinliğinden sorumlu bölgeyi içerir ve ayrıca, G proteinlerinin reseptör ve efektör ile etkileşimlerinin özgülüğünü belirler. B alt birimlerinin moleköl ağırlığı 35-39 kDa,  $\gamma$  altbirimlerinin moleköl ağırlığı ise 7-8 kDa arasında değişmektedir (91,92). G proteinlerinin özgülüğünü tanımlayan  $\alpha$  alt birimleri amino asit dizilerinin benzerliğine göre  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$  / o,  $G_{\alpha q}$  / 11 ve  $G_{\alpha 12}$  / 13 olmak üzere dört aileye

ayrılmıştır (Tablo 1) (74, 90, 93). Şimdiye kadar 16 genin ürünü olan 20  $\alpha$  altbirimi tanımlanmıştır. Dokuların hepsinde bulunan adenilat siklaz sistemi ve retinal çubuk dış segmentlerinde bulunan cGMP fosfodiesteraz yolakları, G protein reseptör ve G protein efektör etkileşimlerinin anlaşılmasında model olarak kullanılmıştır (84, 94). Hormon ve koku reseptörleri, G $\alpha$ s ailesinin (G $\alpha$ s ve G $\alpha$ olf) üyeleri ile etkileşerek adenilat siklazı uyarır ve cAMP sentez hızını artırır. Tek bir öncül mRNA'nın kırılması ile molekül ağırlıkları 44.2 kDa ile 45.7 kDa arasında değişen dört farklı G $\alpha$ s polipeptiti sentezlenir; ancak, bu polipeptitler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jellerinde 45 kDa ağırlığında G $\alpha$ s-S (kısa) ve 52 kDa ağırlığında G $\alpha$ s-L (uzun) olmak üzere iki bant olarak göç ederler. Şimdiye kadar adenilat siklazın 8 izoformu olduğu gösterilmiştir ve bunların hepsi de G $\alpha$ s ile uyarılır. Bunlara ek olarak G $\alpha$ s iskelet kasındaki dihidropiridine duyarlı voltaj kapılı Ca<sup>2+</sup> kanallarını uyarır ve kardiyak Na<sup>+</sup> kanallarının baskılanmasına yol açar (84, 94).



**Şekil 2.** G proteinlerinin özgünlüğünü tanımlayan  $\alpha$  altbirimleri amino asit 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 (93).

Koku alma epitelyumunda bulunan ve koku reseptörleri ile bağlantılı G $\alpha$ olf (olfactory) proteini adenilat siklazın kokuya özgü formu ile etkileşir. G $\alpha$ i / o ailesinin

üyelerinden olan *Gai*, adenilat siklazın baskılanması ile cAMP derişiminde azalmaya neden olan G proteindir ve *Gai1*, *Gai2*, *Gai3* olmak üzere üç tipi bulunmaktadır. *Gai* / o ailesinden olan *Gao* beyin zar proteinlerinin %1-2'sini oluşturur ve daha çok nöronal konilerde bulunur. *Gao*'nun etkisini esas olarak  $\beta\gamma$  kompleksi ile yaptığı düşünülmektedir. Fakat efektörleri direkt olarak düzenleyip düzenlemediği bilinmemektedir (75). *Gaz* proteyini sinir sistemi ve trombositler gibi çeşitli dokularda bulunmaktadır. *Gai/o* ailesinin *Gaz* dışındaki tüm üyeleri boğmaca (pertussis) toksini ile ADP ribozillenir. *Gaz* proteini, *Gai* ile bazı benzer fonksiyonel özelliklere sahiptir fakat özellikle Rap1GAP ve bazı RGS proteinleri ile etkileşimleri gösterilmiştir (95). Bu ailenin üyelerinden olan *gustducin* ve transdusiner duyuşal fonksiyonlar ile ilişkilidir (96, 97). Fotoreseptör çubuk hücrelerinin dış segmentinde bulunan rodopsin ışık ile uyarılır ve transdusin 1 (*Gat-r*)' i aktive eder. Uyarılmış *Gat-r* cGMP özgün fosfodiesterazı uyararak cGMP'nin sitoplazmik derişiminde azalmaya yol açar. Retinal konilerde bulunan G proteini ise transdusin2 (*Gat-c*) olarak isimlendirilir. *Gat-c* koni opsinleri ile bağlantılıdır ve farklı bir fosfodiesterazı aktive eder. Transdusine benzer bir başka G proteini sadece tat alma tomurcuklarında eksprese edilir ve "gustducin" *Gagus* olarak anılır. *Gagust* ile transdusinin amino asit dizileri %80 benzerlik göstermektedir (91, 94). Birçok hormon, nörotransmitter ve büyüme faktörünün etkileri fosfoinositite özgün fosfolipaz C' yi uyarma yetenekleri ile açıklanır. Fosfolipaz C, zar lipidi fosfotidilinositol 4,5-bifosfat (Ins (1,4,5) P2)' in hidrolizini katalizler ve inositol 1,4,5-trifosfat (Ins (1,4,5) P3) ile diaçilgliserol gibi ikincil ulakların oluşumuna yol açar (91). Bu yolakların düzenleyicisi olan *Gaq* / 11 ailesinin üyeleri *Ga11*, *Gaq*, *Ga14*, *Ga15*, ve *Ga16*' dır. *Gaq* ve *Ga11* bir karışım olarak sığır beyni ile sıçan karaciğerinden ve bunlara benzer bir protein hindi eritrositlerinden saflaştırılmıştır (98, 99) *Gaq/11* ailesinin üyeleri, boğmaca ve kolera toksini ile ADP ribozillenmez. *Gaq* ve *Ga11* pekçok dokuda bulunur fakat *Gaq* / 11 ailesinden olan *Ga15* ve *Ga16* bilindiği kadarıyla daha çok hematopoetik hücrelerde bulunur (92). *Gaq* ile *Ga11*'in amino asit dizileri %88' lik bir benzerlik gösterirken, *Ga14* ve *Ga16* proteinleri ile *Gaq* arasında %55-60 benzerlik vardır (91). *Ga12* ve *Ga13* proteinleri pek çok yerde bulunur. *Ga12* ve *Ga13* proteinlerinin fonksiyonları henüz açıklığa kavuşmamıştır fakat bu proteinlerin aktive mutantları ile yapılan çalışmalar, fosfolipaz A<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiş-tokuş proteini veya c-jun NH<sub>2</sub> terminal kinaz

gibi efektörleri uyararak çeşitli sinyal yollarını indükledikleri gösterilmiştir (74, 100, 101).

### 1.3.3.3. G proteinlerinin yapısal özellikleri

Gat.GTP $\gamma$ S, Gat.GDP, Gat.AIF4 ile Gai1.GTP $\gamma$ S, Gai1. GDP ve Gat.AIF4'nin kristal yapılarının çözümlenmesi ile G protein  $\alpha$  altbirimlerinin yapılarına dair pek çok bilgi elde edilmiştir (102, 103).  $\alpha$  altbirimi temel olarak iki işlevsel bölgeden oluşur: GTPaz ailesine üye tüm proteinlerde gözlenen, GTP'nin bağlanmasına ve hidrolizine yarayan ortak bir GTPaz bölgesi ve GTP'yi proteinin göbeğine gömen, heterotrimerik G proteinlerine özgü  $\alpha$  sarmal bölgesi. GTPaz bölgesi, altı uzun  $\beta$  şeridi çevreleyen beş  $\alpha$  sarmaldan oluşmuştur. Bu bölge tüm GTPaz' larda nükleotit bağlanmasını sağlayan korunmuş bölgeleri içerir. Bunlar, GTP bağlama (GXGXXGKS), Mg<sup>+2</sup> bağlama (DXXG) ve guanin halka bağlama (NKXD) motifleridir. GTPaz bölgesinde reseptörlerin, efektör moleküllerinin ve  $\beta\gamma$  kompleksinin bağlanma bölgeleri bulunur.  $\alpha$  altbiriminin ikinci bölgesi tamamıyla bir  $\alpha$  sarmal yapıdadır ve işlevi bilinmemektedir fakat bu bölgenin guanin nükleotidini kendisi ile GTPaz bölgesi arasına gömen bir "kapak" oluşturduğu düşünülmektedir (104). G  $\beta$  altbirimi N ucundaki yaklaşık 20 amino asit içeren  $\alpha$  sarmal yapısında bir bölge ile yedi kez tekrarlanan WD-40 (trp, asp; WD) motifinin oluşturduğu pervane şeklindeki bir bölgeden oluşmaktadır (105). G $\gamma$  ve G $\beta$  altbirimleri N uçlarından paralel bir bükümlü büküm yapı oluşturarak etkileşirler ve yalnızca denatüre edici koşullarda birbirlerinden ayrılan bir dimer oluştururlar. B $\gamma$  kompleksi,  $\alpha$  altbiriminin reseptöre ilginliğinin (afinite) arttırılmasında ve doğrudan yada G protein  $\alpha$  altbirimi ile birlikte çeşitli efektörlerin düzenlenmesinde görev yapar (106).  $\beta\gamma$  dimeri, G $\alpha$ -GDP'deki hidrofobik cebe bağlanır. GTP, G $\alpha$ ' ya bağlanarak hidrofobik cebi ortadan kaldırır ve G $\alpha$ ' nın G $\beta\gamma$  kompleksine olan ilginliğini azaltır (107). B $\gamma$  kompleksinin ayrıca G protein kenetli reseptör kinazların hücre zarına alınmasına yolaçtığı düşünülmektedir.

### 3.3.3.4. G protein etkinliğinin düzenlenmesinde moleküler mekanizmalar

G proteinleri inaktif (sessiz) durumdayken  $\alpha$  altbirimi,  $\beta\gamma$  kompleksi ve GDP birbirine bağlıdır (105). GDP bağlı dinlenim durumunda heterotrimerik yapıda bulunan G proteini hücre dışı reseptörle yada 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  $\beta\gamma$  dimerinden ayrılır. Sonra, hem  $\alpha$  altbirimi hem de  $\beta\gamma$  kompleksi iyon kanalları ya da enzimler gibi efektörlerin aktivitesini düzenlerler. G protein  $\alpha$  altbirimi GTPaz aktivitesine sahiptir ve  $\alpha$  altbirimine bağlı GTP' yi GDP ve inorganik fosfata (Pi) hidrolizler. Oldukça yavaş seyreden GTP hidrolizi, efektör  $\alpha$  altbirim kompleksinin ayrılmasına neden olur ve düzenleyici sinyal sonlanır. GDP bağlı  $\alpha$  altbirimi ile  $\beta\gamma$  altbirimleri bir araya gelerek inaktif G proteinini oluştururlar ve uyarılmış reseptör varlığında yeni bir döngüye girebilirler. G proteinlerinin uyarılmasında hız belirleyici aşama, nükleotit bağlama cebinden GDP' ni serbestlenmesidir. GDP, heterotrimerik G proteininden  $G\alpha$  altbirimi tipine göre değişen bir hızda kendiliğinden salıverilir. Örneğin,  $G\alpha_o$ ' dan GDP' nin serbestlenmesi için  $k_{off}$  0.19 dak<sup>-1</sup> iken,  $G\alpha_i2$  için  $k_{off}$  0.072 dak<sup>-1</sup>' dir (105,108). G  $\alpha$  altbirimlerinin uyarılmamış hali ise  $G\beta\gamma$  kompleksinin bağlanması ile kontrol edilir. Örneğin,  $Mg^{+2}$  yokluğunda  $G\beta\gamma$  kompleksinin,  $G\alpha_o$ ' nın GDP' ye ilginliğini yaklaşık 300 kez artırdığı gösterilmiştir. G proteinin reseptör ile uyarılması sonucu, GDP' nin salıverilmesi büyük ölçüde kolaylaşır (94). G protein  $\alpha$  altbiriminin GTPaz aktivitesini düzenleyen proteinlere RGS (Regulators of G protein signalingproteins; G protein sinyalini düzenleyici proteinler) adı verilmektedir. RGS ailesinin 30' dan fazla üyesi olduğu ve hepsinde ortak olan RGS bölgesinin bulunduğu bilinmektedir. Bu bölge  $\alpha$  altbirimine bağlanır ve GTPaz' ı uyararak GTP hidroliz hızını düzenler. Normal olarak yavaş olan içsel GTP hidrolizi, bir RGS proteinin bağlanması ile artar ve RGS' ler böylece etkin G protein sinyal süresini azaltarak negatif sinyal düzenleyicileri olarak görev yaparlar. RGS protein ekspresyonunda ve işlevinde herhangi bir bozulma, sinyal süresinin artmasına neden olur (109, 110). RGS' lerin G protein aracılı sinyal kinetiğini düzenlemenin yanısıra sinyal iletiminin özgünlüğünü etkiledikleri ve bazı durumlarda efektör işlevini üstlenebildikleri düşünülmektedir.

### 1.3.3.5. G protein işlevinin kovalent uyarlamalar (modifications) ile düzenlenmesi


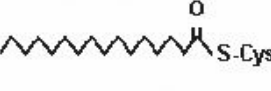
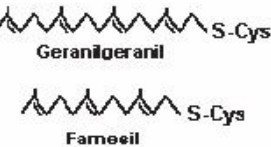
#### 1.3.3.5.1. Fosforillenme

G protein sinyal iletim şelaleleri (*cascades*) G proteinlerinin  $\alpha$  veya  $\beta\gamma$  altbirimlerinde çeviri sonrası gerçekleşen fosforillenme ve / veya açillenme gibi uyarlamalarla da düzenlenir. Örneğin, *Gai* aile üyelerinde, *G $\alpha$*  altbirimlerinin protein kinaz C ile fosforillenmeleri, sinyal iletimini baskılar (111,112). GDP bağlı *G $\alpha$* 'nin protein kinaz C tarafından fosforillenmesi, heterotrimer oluşumunu engeller ve RGSZ1' in GAP etkinliğini durdurur (113,114). *G $\alpha$*  ve *G $\alpha$* ' in GDP bağlı formları da kinazların substratlarıdır ve *G $\alpha$* 12' nin fosforillenmesi  $\beta\gamma$  ile etkileşimini engeller (115, 116).  $\beta$  ve  $\gamma$  altbirimlerinin fosforillendiğine dair de çalışmalar vardır (117). Özetle; fosforillenme  $\alpha$  ve  $\beta\gamma$  aracılı sinyal iletimini ayrıştırmakla kalmaz, belli  $\beta\gamma$  efektörlerinin seçici olarak modüle edilmesini de düzenler (105).

#### 1.3.3.5.2. Lipit uyarlamaları

Proteinler, hücre zarlarına yönelimleri sırasında, özgün lipitler tarafından eş zamanlı veya çeviri sonrası değişimlere uğrarlar. Bu hücresel işlemlere lipitlenme adı verilir (Tablo 2) (118). Lipit modifikasyonlarının, özellikle transmembran sinyal sistemlerindeki sinyal moleküllerinin işlevlerinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. G proteinlerinin  $\alpha$  altbirimlerinde palmitoyillenme ve/veya miristoyillenme ve  $\gamma$  altbirimlerinde prenillenme olduğu gösterilmiştir fakat  $\beta$  altbirimlerinde herhangi bir lipit modifikasyonu bildirilmemiştir.

**Tablo 1.** G proteinlerinde lipit yapıları ve hücre zarına tutunum kalıntıları

| Lipit      | Yapı  | Uyarlanan proteinler  | Uyarlanma bölgesi    |
|------------|---|---|----------------------|
| N-Miristol |  | Trimerik G proteinleri ( $\alpha$ )<br>NRTK                               | NH <sub>2</sub> -ucu |
| S-Palmitol |  | Trimerik G proteinleri ( $\alpha$ )<br>GPKR<br>Ras                        | İnternal             |
| S-Prenil   |  | Trimerik G proteinleri ( $\gamma$ )<br>Küçük G proteinleri<br>Retinal GRK | COOH-ucu             |

NRTKs: non-reseptör tirozin kinazlar (RTKs: Hücre zarını yedi kez kat eden büyüme faktörü reseptörleri), GPKR: G proteinleri ile kenetlenen reseptörler, GRK: özgün reseptör kinaz (118) karbonlu doymuş yağ asidi olan bir miristatın çevrimle eş-zamanlı ve geri dönüşümsüz olarak eklenmesiyle gerçekleşir (119). Miristat proteine kararlı bir amit bağı ile bağlanır. Bu nedenle miristoyillenme geri dönüşümsüz bir modifikasyondur. Miristoyillenme sadece G $\alpha$ i ailesinin  $\alpha$  altbirimlerinde olur. Şimdiye kadar incelenen tüm G protein  $\alpha$  alt birimlerinden G $\alpha$ t hariç hepsi 16 karbonlu doymuş yağ asidi, palmitat içerir. Palmitoyillenme,  $\alpha$  altbiriminin N ucuna yakın sistein kalıntısı ile palmitatın tiyoester bağı ile geri dönüşümlü bağlanması sonucu oluşur (113). G protein  $\gamma$  altbirimleri, 20 karbonlu izoprenoidgeranilgeranil veya retinaya özgü  $\gamma$ 1, 15 karbonlu izoprenoid farnesil tarafından kovalent olarak değişime uğrar. Prenillenen proteinlerde, geranilgeranil veya farnesil yapısı  $\gamma$ 'nın C-ucundaki "CAAX" kutusundaki sistein kalıntısına kalımlı bir tiyoeter bağı ile tutunur. Prenillenme sonrası CAAX-COOH bölgesinin en sonundaki üç amino asit proteolitik olarak kırılır ve yeni oluşan C ucu karboksil metillenir (120). İzoprenillenmenin, farnesillenme mi yoksa geranilgeranillenmemi olacağı X' e bağımlı olarak gerçekleşir. CAAX motifindeki X bir Ser, Met, Gln veya Ala ise proteinde farnesillenme, eğer Leu var ise geranilgeranillenme olur (118). G protein  $\gamma$  altbirimlerinde izoprenillenme engellenirse  $\beta\gamma$  kompleksi, ne lipit zarı ve  $\alpha$  altbirimi ile etkileşir ne de efektör moleküllerine sinyal iletilir (121, 122). Lipit modifikasyonları aynı zamanda protein protein etkileşimlerini düzenler. Örneğin, G $\alpha$ 'nın Nmiristoyillenmesi G $\beta\gamma$  ve efektör etkileşimlerini düzenler; G $\alpha$ s' in palmitoyillenmesi ise G $\beta\gamma$ ' ya ilginliğini artırır.

#### 1.3.3.5.3. ADP ribozillenme

G protein  $\alpha$  altbirimlerinin bazılarında kolera toksini veya boğmaca toksini ile ADP ribozillenme bölgesi bulunur. Bu bakteri toksinlerinin birçoğu NAD<sup>+</sup>'nin ADP riboz grubunu, bazı G proteinlerine özgün olarak aktarılmasını katalizleyen etkinliklere sahiptir (123). Kolera toksini, NAD' nin ADP riboz grubunun, G $\alpha$ s, olf, t, gust  $\alpha$  altbirimlerinin ortalarına yakın arginin (G $\alpha$ s-Arg201) kalıntısına aktarılmasını katalizler (124). G $\alpha$ s' in CTX ile ADP ribozillenmesi, GTP hidrolizini engeller ve böylelikle adenilat siklaz geriye dönüşümsüz olarak uyarılır ve cAMP düzeyi artar, bağırsaktaki epitelyum hücrelerinin foksiyonunu değiştirir ve aşırı su

kaybı olur. Boğmaca toksininin (PTX)  $G_{\alpha i}$ ,  $\alpha$ ,  $t$ ,  $\gamma$  proteinleri üzerinde ADP ribozillediği bölge  $\alpha$  altbiriminin karboksilucundan dört amino asit uzaklıktaki sisteindir (125, 126). G proteinin PTX ile ADP ribozillenmesi sonucu olarak,  $G_{\alpha i}$ ,  $\alpha$ ,  $t$ ,  $\gamma$  proteinleri ile özgün reseptörleri etkileşemez. GDP/GTP değiş tokuşu, GTPaz etkinlikleri ve adenilatsiklazın baskılanması gibi fiziksel özellikler G proteinlerinin boğmaca toksinince ADP ribozillenmesi ile değişmemektedir. ADP ribozillenmeyen  $G_{\alpha q/11}$  ve  $G_{\alpha 12/13}$  ile  $G_{\alpha i}$  ailesinden olan  $G_{\alpha z}$ ' de sistein kalıntısı bulunmamaktadır (123).

### **1.3.3.6. G Proteinleri ile düzenlenen efektörler**

G proteinleri ile düzenlenen efektör moleküllerinin klonlanması ile dokuya özgü ekspresyon profillerinde bir efektörün birkaç izoformu olduğu ve bu izoformların Gprotein  $\alpha$  altbirimleri ve/veya  $\beta\gamma$  altbirimleri tarafından farklı biçimde düzenlendikleri ortaya çıkmıştır. Gprotein  $\alpha$ .GTP ve  $\beta\gamma$  altbirimlerinin doğrudan etkileştiği efektör proteinler; retinal cGMP fosfodiesteraz, adenilat siklazlar, fosfolipazlar, fosfolipit kinaz ve iyon kanallarıdır (127).

#### **1.3.3.6.1. Adenilat siklaz**

Tüm hücrelerde bulunan adenilat siklazlar, ATP' nin hücreiçi ikinci haberci cAMP' ye dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Adenilat siklazın şimdiye kadar farklı işlevsel özelliklere sahip dokuz izoformu tanımlanmıştır (121, 128, 129). Memeli adenilat siklaz izoformları yaygın olarak eksprese olurlar. Ancak, tip I ve II esas olarak nöronlarda, tip III ise yalnızca koku epitelinde bulunur (129). Her bir adenilat siklaz enziminin düzenlenmesi, oldukça şaşırtıcı bir değişkenlik gösterir. Tüm izoformlar  $G_{\alpha s}$  tarafından uyarılır.  $G_{\alpha s}$  proteinin aktivasyonu adenilat siklazı uyarır ve cAMP derişiminin artmasını yol açar. Artan cAMP derişimi PKA'yı aktive eder. PKA'nın katalitik altbirimleri çekirdeğe doğru hareket ederek CREB gen düzenleyici proteinini fosforiller ve böylece gen transkripsiyonunun uyarılmasıyla hücrel yanıt oluşur. G protein  $\beta\gamma$  altbirimleri adenilatsiklaz tip I' i baskılarken tip II ve tip IV izoformları  $G_{\beta\gamma}$  tarafından uyarılır. Tip II ve tip IV' ün uyarıcı düzenlenmesi  $G_{\alpha s}$ ' in varlığına da bağımlıdır. Adenilatsiklaz tip II' nin uyarılması için  $G_{\alpha s}$  ile kıyaslandığında  $\beta\gamma$ ' nin oldukça yüksek derişimlerine gereksinim vardır (130, 131). Bu nedenle bu altbirimlerin, yüksek düzeylerde eksprese edilen  $G_{\alpha i}/\alpha$

ailesinin üyelerinden sağlandığı düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar,  $G_{\alpha i}$ 'nin üç tipinin de tip V ve tip VI adenilatsiklaz enzimlerinin baskılanmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Tip I adenilat siklaz seçici olarak  $G_{\alpha o}$  tarafından baskılanırken tip I ve tip V adenilat siklazlar  $G_{\alpha z}$  tarafından baskılanabilir (128, 131, 132). Hücre içi  $Ca^{+2}$  adenilat siklaz aktivitesini düzenleyen önemli düzenleyicidir. Adenilat siklaz tip I ile tip VIII ve daha az olmak üzere tip III,  $Ca^{+2}$  kalmodulinile uyarılır. Diğer izoenzimler  $Ca^{+2}$ 'a oldukça duyarsızdır. Adenilat siklaz izoformlarının farklı düzenlenmeleri, bu enzimlerin G protein aracılı sinyalyolaklarında bütünleştirici olarak görev yapabildiklerini düşündürmektedir.

#### **1.3.3.6.2. Fosfolipaz C $\beta$**

Memeli sistemlerdeki fosfolipaz C enzimleri,  $-\beta$ ,  $-\gamma$  ve  $-\delta$  olmak üzere üç aileden oluşur ve her birinin çeşitli izoenzimleri vardır (133). Hormonların, nörotransmitterlerin ve büyüme faktörlerinin birçoğu G protein kenetli reseptörler aracılığı ile fosfolipaz C'yi uyarır. Fosfolipaz C, fosfotidil-4,5-bifosfat'ın hidrolizini katalizleyerek, inositol-1,4,5-trifosfat ile diaçilgliserol ikinci ulaklarının oluşumuna yol açar. G proteinleri ile düzenlenen PLC  $\beta$  ailesinin en azından dört izoformu (PLC  $\beta$ 1-4) vardır (134). Adenilat siklazların düzenlenmesinde olduğu gibi, her birinin G proteinleri ile özgül etkileşim biçimleri vardır. Fosfolipaz C (PLC)'nin G protein aracılı düzenlenmesinde en azından iki farklı mekanizma vardır ve bu mekanizmalar boğmaca toksin inhibisyonuna duyarlılıklarına göre ayırt edilir. PLC $\beta$  izoformlarının hepsi G proteinlerinden boğmaca toksinine duyarsız  $G_{\alpha q/11}$  ailesinin üyeleri ile uyarılabilir. PLC  $\beta$ 'nin boğmaca toksinine duyarlı düzenlenmesinin  $G_{\alpha i} / o$  ailesinin boğmaca toksine duyarlı üyelerinin  $\beta\gamma$  altbirimleri aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir (135).

#### **1.3.3.6.3. cGMP Fosfodiesteraz**

cGMP fosfodiesteraz (PDE) omurgalıların çubuk fotoreseptör hücrelerinin görsel uyarılmasında merkezi rol oynar. Fotopigment rodopsinin bir fotonu soğurması ile PDE uyarılarak, cGMP hidrolizlenir. Ardından, cGMP kapılı katyon kanallarının kapanmasıyla hücre zarı hiperpolarize olur (136). Retinal G $\alpha t$  proteini PDE'nin rodopsin tarafından düzenlenmesine aracılık eder.

#### 1.3.3.6.4. Fosfoinositit 3-kinaz

Fosfoinositit (PI) 3 kinazlar ATP bağımlı enzimler ailesindedir ve myo-inositol içeren fosfolipitlerden, fosfotidilinositol (PI), fosfotidilinositol 4 fosfat ve PIP2' nin sırasıyla fosfotidilinositol 3 fosfat, fosfotidilinositol 3,4 bifosfat ve fosfoinositol 3,4,5 trifosfat' a fosforillenmesini katalizler. Birçok memeli hücresi PI<sub>3</sub> kinaz aktivitesin sahiptir ve heterotrimerik G proteinlerinin  $\beta\gamma$  altbirimleriyle uyarılır. Memeli hücrelerinin biçoğu heterotrimerik G proteinlerinin  $\beta\gamma$  altbirimleri ile uyarılabilen PI<sub>3</sub> kinazaktivitesine sahiptir (129).

#### 1.3.3.6.5. Fosfolipaz A<sub>2</sub>

Fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) prostanoidlerin sentezindeki hız sınırlayıcı aşama olan, plazma zarı lipitlerinden araşidonik asitin salınmasını katalizler (137). Bu enzimler, düşük moleköl ağırlıklı salgılanan türler ve yüksek moleköl ağırlıklı sitozolik enzimler olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Bu iki enzim sınıfının düzenlenmesi karmaşıktır. Enzimin her iki tipinin de agonist ile uyarılan araşidonat metabolizmasında önemli rolleri bulunmaktadır (137). G protein  $\beta\gamma$  altbirimlerinin, retinal PLA<sub>2</sub> aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (138).

#### 1.3.3.6.6. İyon kanalları

G proteinlerinin K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> ve Na<sup>+</sup>, a seçici iyon kanallarının açılıp-kapanmasında ve modülasyonunda önemli rolleri vardır. Kalp K<sup>+</sup> kanalları gibi örneklerde iyon kanallarının G proteinlerince doğrudan düzenlenmesi çok olası olsa da, iyon kanal etkinliğinin ölçümlerindeki teknik zorlukları nedeniyle ikinci ulaklar gibi dolaylı mekanizmaları göz ardı etmek zordur (139,140). Ca<sup>+2</sup> kanalları G proteinleri birçok Ca<sup>+2</sup> kanalını düzenler. Voltaj kapılı Ca<sup>+2</sup> kanalları fonksiyonel olarak L-, N-, T- ve P tip olarak sınıflandırılmaktadır. Nöronlardaki w-conotoxin'e duyarlı L- ve N-tipi Ca<sup>+2</sup> kanalları ile kalpteki L-tipi dihidropiridine duyarlı Ca<sup>+2</sup> kanalı, G proteinleri ile düzenlenir (141, 142). Voltaja bağımlı Ca<sup>+2</sup> kanallarının G protein kenetli reseptörler tarafından inhibisyonu ilk kez civciv dorsal kök gangliyon preparasyonlarında ve hemen bunun arkasından pek çok hücre soyunda bildirilmiştir (143). Ayrıca bazı çalışmalar, opioid ve katekolamin reseptörleri ile kenetlenen G $\alpha$ 'nun Ca<sup>+2</sup> kanallarının inhibisyonunda rolü olabileceğini düşündürmektedir (144).

#### **1.3.3.6.6.1 Na<sup>+</sup> kanalları**

Kalp hücrelerinin  $\beta$  adrenerjik uyarılmasında, hızlı Na<sup>+</sup> akımı baskılanmakta ve bu Na<sup>+</sup> akımının baskılanmasında Gas' in doğrudan bir rolü olduğu düşünülmektedir (145). Böbrek epitel hücre soyundaki amilorid' e duyarlı Na<sup>+</sup> kanalının boğmaca toksinine duyarlı mekanizma ile uyardığı tanımlanmıştır. Bazı çalışmalar G $\alpha$ i3' ün Na<sup>+</sup> kanalı aktivasyonunda rolü olduğunu vurgulamaktadır (146). Bu kanalın düzenlenmesinde dolaylı mekanizmaların da rolü olduğu düşünülmektedir.

#### **1.3.3.6.6.2. CF kanalları**

Kalp ve epitel hücrelerdeki CF kanallarının uyarılmasının G protein bağımlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Hava yolu epitel hücrelerindeki kistik fibroz transmembran iletken düzenleyici (CFTR) kanalın, boğmaca toksinine duyarlı G proteinleri ile baskılanabileceği kanıtlanmıştır. Henüz tanımlanmamış bir kalp CF kanalının Gas ile doğrudan düzenlendiği gösterilmiştir ancak ikinci ulaklara bağımlı mekanizmalar da göz ardı edilmemektedir (147).

#### **1.3.3.6.6.3. GIRK (G protein-Gated inwardly rectifying (K<sup>+</sup>) kanalı**

GIRK ( G protein kapılı içe doğru düzeltilmiş K<sup>+</sup> ) kanalları, kalpte, merkezi ve periferel sinir sistemlerinde ve endokrin dokularda bulunurlar ve yavaş baskılayıcı postsinaptik sinyal ile hormon salgılanmasını, boğmaca toksinine duyarlı GPCR' ler aracılığı ile kontrol ederler (148). GIRK kanallarının uyarılması, boğmaca toksinine duyarlı G protein (G $\alpha$ i / o ve G $\alpha$ q / 11)' inden serbestlenen  $\beta\gamma$  dimerinin doğrudan kanala bağlanmasıyla gerçekleşir (149). Merkezi sinir sisteminde hipokampusdaki GIRK kanalları, postsinaptik ucda K<sup>+</sup> iletkenliğini artırarak inhibitör nörotransmitter geçişine aracılık eder. Otonom sinir sistemindeki GIRK kanalları ise vagus siniri aracılığıyla parasempatik sistem tarafından düzenlenmesiyle ilişkilidir.

#### **1.3.4.Miyometriyumda G Protein Sinyal Yolları**

Miyometriyumda G proteinleri intraselüler sinyalleşmeyle ilişkili olup miyometriyal kasılma ve gevşemenin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücre içinde Ca<sup>+2</sup> artışıyla PLC, G protein bağılı 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 iletisinde önemli roller üstlenirler. G proteinleri GTP' nin bağlandığı ve hidrolizlendiği bir  $\alpha$  altbirim ile bir  $\beta\gamma$  kompleksinden oluşmaktadır (150).  $\alpha$  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 (93).  $G_{\alpha i/o}$  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 (151, 38). 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  $\beta$ ' nin boğmaca toksinine duyarlı düzenlenmesinin  $G_{\alpha i / o}$  ailesinin boğmaca toksine duyarlı üyelerinin  $\beta\gamma$  altbirimleri aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir. G proteinleri inaktif (sessiz) 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 (151, 152).

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 kadınlarda gösterilmiştir (152, 153).  $G_{\alpha 1}, G_{\alpha 3}, G_{\alpha q}, G_{\alpha 11}$  proteinleri gebe ve gebe olmayan kadınlarda benzer seviyelerde iken, gebelerde  $G_{\alpha i2}$  azalmış ve  $G_{\alpha 0}$  artmıştır. Ancak en önemlisi  $G_{\alpha s}$  ekspresyonunun gebelerdeki büyük orandaki artışı  $G_{\alpha s}$ ' ye bağlı adenil

siklaz aktivitesinin artmasına yol açar. Böylece gebelik boyunca intrasellüler cAMP seviyesi artar ve bu da uterin sessizliğe yol açar (42).

#### **1.3.4.1. Miyometriyumda Fosfolipaz C**

PLC, hücre dışında bulunan agonistlerin reseptöre bağlanması sonucu G proteini aracılığıyla aktivasyon gösterir. OT, vazopressin, prostaglandin F2 alfa (  $PGF2\alpha$  ) gibi birkaç hormon PLC yolağını kullanan reseptörler üzerinde etkisini gösterir. 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 haberciye, DAG ve  $IP_3$  e parçalanmasını sağlar (42).  $IP_3$  sitozolden geçerek SR zarında bulunan  $IP_3$  e duyarlı  $Ca^{+2}$  kanallarına bağlanarak  $Ca^{+2}$  salgılanmasına neden olur. DAG ise protein kinaz C (PKC) enzimini aktive eder. PKC bazı proteinleri fosforilleyerek hücre çoğalmasında rol alır (42).

#### **1.3.4.2. Miyometriyumda Adenilat Siklaz**

Adenilat siklaz enzimi ATP'den cAMP üretmektedir. cAMP, etkisini inaktif protein kinaz A enzimini aktive ederek gösterir. Protein kinaz A, bir hücrel protein olan MLCK' yi fosforile eder ve bu enzimin kalsiyum kalmodulin kompleksine olan affinitesini azaltır (42). Böylece miyometriyal gevşemeye yol açar. Aynı zamanda protein kinaz A, PLC' yi inhibe ederek kalsiyum girişini ve kalsiyum pompalarının aktivasyonunu inhibe ederek de düz kaslarda gevşemeye yol açar (42).

#### **1.3.4.3. Miyozin Hafif Zincir Fosforilasyonu, Kasılma ve Gevşeme**

Miyometriyal düz kaslardaki kuvvet üretimi intrasellüler  $Ca^{+2}$  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. İntrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu azaldığında, MLCK aktivasyonu durur ve miyozin hafif zincir fosfataz aracılığıyla MLC defosforile olarak gevşeme meydana gelir. MLC' nin defosforilasyonu miyozin ATPaz' ın aktivasyonunu inhibe eder böylece çapraz köprü siklusu bazal seviyesine döner (43, 54).

### 3.4. Apelin

Orfan reseptör APJ' nin ilk endojen ligandı olarak tanımlanan 36 aminoasitten oluşmuş peptit yapılı bir hormon olan apelin ilk olarak 1998 yılında Totemato ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (1). İlk kez sığır midesinden izole edilmiş olup (154). APJ reseptör ligandı olmasından dolayı 'apelin' olarak adlandırılmıştır (1, 155).

İnsanlarda apelin ekspresyonu ilk olarak kaudat nükleus, hipokampus, talamus, paraventriküler nükleus, preoptik alan, periventriküler hipotalamus, ventromedial ve dorsomedial nükleuslar ve frontal kortekste tespit edilmiştir (2). Daha sonraki çalışmalarda, apelin mRNA, özellikle spinal kord, korpus kallosum, amigdala, substantia nigra, hipofiz bezi (3) aynı zamanda böbrekler, kalp, akciğerler, plasenta ve meme bezleri gibi insan merkezi sinir sistemi ve birçok perifer dokularda gösterilmiştir (3-5).

#### 1.4.1. Apelinin Biyokimyası ve Metabolizması

İnsanlarda apelin geni Xq 25–26, 1 kromozomunda yerleşmiş olup (2). 77 aminoasitten oluşan öncül bir maddeden sentezlenmektedir (156).

Apelin 12, 13, 16, 17, 19 ve 36 gibi birkaç aktif peptit formuna ayrılır (1, 155, 156). 23 tane aminoasit bu öncül maddenin C uç kısmında lokalize olmuş olup ve C uç kısmı türler arasında büyük benzerlik göstermektedir (1).

İlk bulunan apelin peptiti apelin 36 olup, daha sonraki çalışmalarda apelinin daha kısa diğer formları da insan dokularında ve sığır kolostrumunda tespit edilmiştir (1, 155, 157).

Apelin reseptörünün aktivasyonuna yol açan apelin peptitleri en az 12 C uç kalıntısına sahip olmalı (158-160). Apelinin en kısa aktif aminoasit kısmı son 12 C uç aminoasit formunda yer alır, apelin-11 ve daha kısa peptitler inaktiftirler (160). Apelin reseptörünü aktive etme yeteneğine sahip en kısa aminoasit dizisi Apelin 13' de bulunmaktadır. 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 (155, 161). Apelinin N uç kısmı ise ligand reseptör etkileşiminde anahtar rol oynar (155). N uç kısmının aminoasit sırası LVQPRGPRSGPGPWQGG şeklindedir ve bu diziliş bilinen protein ve peptitlerin

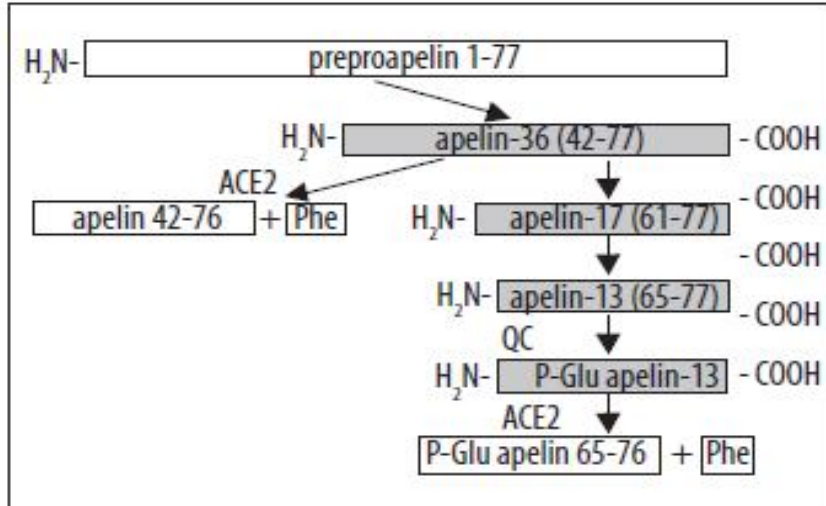
hiçbiriyle benzer değildir. Bu kısım ayrıca hidrofobik aminoasit yönüyle zengindir (1).

**Tablo 2.** İnsan apelinin biyoaktif formlarının aminoasit dizisi ve apelin 12 C terminal bölgesi (her bir peptit dizisinde koyu renkli olarak yazılmıştır). Pyr: piroglutamilat.

|               |  |
|---------------|--|
| APELİN-36     | H2N-LVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQ <b>RPRLSHKGMPMF</b> -COOH |
| APELİN-17     | H2N-KFRRQ <b>RPRLSHKGMPMF</b> -COOH                    |
| PYR-APELİN-13 | HN-Pyr- <b>RPRLSHKGMPMF</b> -COOH                      |
| APELİN-13     | H2N-QRPRLSHKGMPMF-COOH                                 |
| APELİN-12     | H2N-RPRLSHKGMPMF-COOH                                  |

Apelin peptitlerinin biyolojik aktiviteleri peptit uzunluklarıyla ters orantılıdır. Apelin-13, apelin-17' den 8 kat, apelin-36'dan 60 kat daha güçlü etkinliğe sahiptir (1).

Apelin-13' ün piroglutamilat formu yapı olarak apelin-13'ten daha stabildir ve çoğunlukla apelinin kısa formu olarak piroglutamilat kullanılmaktadır (157). Bazı çalışmalarda, apelin-13'ün reseptöre bağlanma eğiliminin apelin-36'dan daha fazla olduğu gösterilmiştir (162) ve apelin-36 reseptörden daha zor ayrılır (155).



**Şekil 3.** Apelin peptitlerinin sentez ve metabolizması. Biyolojik olarak aktif peptitler gri renkte gösterilmiştir. QC glutaminil siklaz, ACE<sub>2</sub> anjiyotensin dönüştürücü enzim-2, P-glu-piroglutamilat, Phe-fenilalanin (163).

Apelin metabolizmasının bilinen tek yolu anjiyotensin dönüştürücü enzimdir (164). Ancak son yıllarda apelin-13 ve apelin-36'nın C uç kısmından fenilalanini ayıran bu enzimden başka çinko içerikli karboksipeptidaz enzimi de bulunmuştur (161). Plazmadaki başlıca apelin peptitleri apelin-13 ve daha az olarak apelin-17' dir (163). Sıçanlarda plazma apelin seviyesi 23 pmol/L iken, insanlarda ise 89.8 pq/ml kadardır (165). Apelinin plazmadaki konsantrasyonu diğer dokulara göre oldukça azdır. Bu da apelinin dolaşımında sadece bir hormon gibi değil, nörotransmitter gibi parakrin bir etkiye sahip olabileceğine işaret etmektedir (156).

#### **1.4.2. Apelin Reseptörü**

1992 yılında O'Dowd ve arkadaşları anjiyotensin tip 1 reseptör geniyle aminoasit dizilimi olarak oldukça büyük benzerlik gösteren bir gen keşfettilerinde bu yeni geni, APJ olarak isimlendirerek G protein bağlı reseptör olarak kodlamışlardır (154). Tatemoto ve arkadaşları 1998 yılında apelin tanımlayana kadar adı orfan olarak kalmıştır (1). APJ (apelin reseptörü, anjiyotensin 1 benzeri reseptör) orjinal olarak insan genomik DNA'sından polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla izole edilmiştir (154). 380 aminoasitten oluşan bu reseptörün geni 11. kromozomun q12.1 kısmında yerleşmiştir (154). Bu reseptör için İnsan Genom Örgütü APLNR sembolünü onaylamıştır. Bu reseptör, AGTRL1, APJ, APJR ve FLJ90771 gibi birkaç isme de sahiptir (166). APJ fare, sıçan, maymun, inek, zebra ve kurbağa gibi diğer birkaç türde de tanımlanmıştır (166).

Sıçanlarda APJ ekspresyonu, kalp ve akciğerlerde en yüksek oranda bulunmakla birlikte hemen hemen tüm dokularda gösterilmiştir (155). Daha düşük seviyede sıçan böbrek, hipofiz bezi ve iskelet kasında (167) ve ayrıca vasküler, endokardiyal ve endotelial hücrelerde eksprese edilmiştir (168-171). Sıçan beyinde özellikle hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler bölgelerinde ve hipofiz ön lobunda yoğun olmakla birlikte (172) epifiz bezi, olfaktor sistem nükleuslarında ve hipofiz ara lobda da ekspresyonu gösterilmiştir (173). 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 dokuda bulunmuştur (2, 73, 168-170, 172). Ayrıca büyük çaplı kan damarlarında otoradyografiyle apelin bağlı bölümlerin varlığı

tespit edilmiştir (174). Beyinde APJ ekspresyonu, beyaz maddenin glial hücrelerinde (175), serebral korteks, epifiz bezi, hipofiz bezi, hipokampus, piriform korteks, dentat girus, lateral olfaktor traktus nükleusları, dorsal rafe nükleuslarında ve hipotalamusta (169, 170, 175) gösterilmekle birlikte beyindeki en yoğun ekspresyon bölgeleri hipotalamustaki paraventriküler ve supraoptik nükleuslar olarak tespit edilmiştir (2,172).

Fare apelin reseptörü 377 aminoasitten oluşmuş olup, insan apelin reseptörüyle % 91 diziliş benzerliği gösterirken, sıçan apelin reseptörü ise 377 aminoasitten oluşmuştur ve insan reseptörüyle % 89 diziliş benzerliği gösterir (166).

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 ) (176) ve transmembran bölgede 86 aminoasit ( % 54) (154), aynı zamanda doku ekspresyonunda (170) yüksek oranda benzerlik vardır. Bu benzerliklere rağmen AT2, apelin reseptörüne bağlanmadığı gibi, apelin de AT1 reseptöre bağlanmamaktadır (2, 177).

**Tablo 3.** Apelin ve Apelin Reseptörünün Karakteristik Özellikleri (Klein MJ 2005).

|                        | Apelin Reseptörü (APJ)                    | Apelin             |
|------------------------|---|--------------------|
| Eşanlamlısı            | Angiotensin reseptör-like 1               | APJ endojen ligand |
| Moleküler sınıf        | 7-transmembranöz G protein-bağlı reseptör | Peptid ligand      |
| Aminoasit sayısı       | 380                                       | 77 (prekürsör)     |
| Moleküler ağırlık (Da) | 42.660                                    | 8.569              |
| mRNA boyutu (bp)       | 1143                                      | 234                |
| Kromozom Lokusu        | 11q12.1                                   | X25-26.3           |

**Tablo 4.** Apelin ve APJ'nin dokulardaki dağılımı (Kleinz MJ 2005).

|                   | APJ |      |       | Anelin |      |       |
|-------------------|-----|------|-------|--------|------|-------|
|                   | Rat | Fare | İnsan | Rat    | Fare | İnsan |
| Bevin             | ++  | +    | +++   | +      | +++  | ++    |
| Serebellum        | +   |      | +     | +      |      | +     |
| Hipofiz bezi      | +   |      | +     | +      |      | ++    |
| Spinal kord       | +++ | ++   | +     | ++     |      | ++    |
| Adrenal bez       | +   |      |       | +      |      |       |
| Tiroid bezi       | ++  |      |       |        |      |       |
| Dalak             | -   | +    | +++   | -      | +    |       |
| Timus             |     | +    | +     |        | -    |       |
| Kalp              | ++  | +++  | +     | ++     | ++   | +     |
| Endotel hücreleri | ++  |      |       |        |      |       |
| Akciğer           | +++ | ++   | ++    | +++    | ++   | +     |
| Mide              | +   |      | +     | +      |      | -     |
| İnce barsak       | +   |      | ++    | +      |      | -     |
| Kalın Barsak      | +   |      | ++    | +      |      |       |
| Karaciğer         | +   | +    |       | -      | -    | -     |
| Pankreas          | -   |      | +     | -      |      | +     |
| Böbrek            | +   | +    | +     | +      | +    | +     |
| Testis            | +   | +    | +     | +      | ++   | +     |
| Prostat           |     |      | +     |        |      | +     |
| Ovaryum           | +   | +    | +     | +      | +    |       |
| Uterus            | +   | +    | +     | +      | -    | -     |
| Plasenta          | ++  |      | ++    |        |      | +++   |
| Meme              | +   |      |       | ++     |      |       |
| İskelet Kası      | ++  | ++   | +     | +      | +    | -     |
| Adipoz Doku       | ++  |      |       | +      |      |       |
| Kıkırdak          | ++  |      |       |        |      |       |

### 1.4.3. Apelinin 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.

#### **1.4.3.1. Düz Kaslar Üzerine Etkisi**

Apelin ve APJ, düz kas hücrelerinde eksprese edilir (174, 178, 179). Apelin in vitro ve in vivo, düz kas hücrelerinde doz bağımlı olarak MLC'nin fosforilasyonuna yol açar (180). Apelin, sıçan miyozitlerinde  $Ca^{+2}$  geçişinin amplitüdünü artırır ve elektriksel stimülasyon boyunca SR'deki kalsiyum 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 (178).

Sıçan torasik aortadan izole edilen vasküler düz kaslarda apelin,  $PI_3K$  (fosfatidil inositol 3 kinaz)/Akt-ERK1/2 sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak stimüle eder. Apelin APJ'ye bağlandığında  $PI_3K$ 'nin 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 (ekstrasellüler sinyal düzenleyici protein kinaz) aktive eder, siklin D1 sentezlenir ve bu döngü hücre proliferasyonuna yol açar (181, 182). Bir başka çalışmada apelin fare osteoblast hücrelerinde JNK (hücre proliferasyonunda ve apoptozda önemli rolü olan bir enzim) ve  $PI_3K$ /Akt yolağını kullanarak proliferasyonu stimüle ettiği ve apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (162).

Apelin, insan umbilikal arter düz kas hücrelerinde yapılan çalışmada serum yoksunluğuna bağlı olarak meydana gelen apoptozu baskılar ve bu anti apoptotik etkisini  $PI_3K$ /Akt sinyal yolları aracılığıyla APJ reseptörlerini kullanarak gerçekleştirir. Apelin bu yolları aktive ederek hücre gelişiminin devamını sağlar (183). Apelinin, aynı yolağı kullanarak insan osteoblast hücrelerinde de apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (183).

#### **1.4.3.2. Besin Alımı Üzerine Etkileri**

Apelin-13'ün intraserebroventriküler (İCV) yolla uygulanması, sadece aç hayvanlarda ve doz bağımlı olarak besin alımını anlamlı düzeyde artırır (184). Buna zıt olarak, bir başka çalışmada İCV uygulanması hem aç hem de tok hayvanlarda besin alımını azaltmıştır (185). O'Shea ve arkadaşları apelin-13'ün İCV

uygulandığında gündüz besin alımını stimüle ettiğini gece ise baskıladığını göstermişlerdir (186).

Apelin-13 intravenöz (İV) uygulandığında ise, 24 saat aç bırakılmış ve aç olmayan sıçanlarda herhangi bir etkisi olmamıştır (185). Apelin intraperitoneal uygulandığında da besin alımı üzerinde etkisi olmamıştır (187).

### **1.4.3.3. İnsülin ve Obeziteyle İlişkisi**

Apelin mRNA ve proteini insan ve fare yağ doku ve hücrelerinde bulunmuştur (188). Büyük miktarda beyaz adipoz dokudan, daha az miktarda kahverengi adipoz dokudan eksprese edilmektedir (188).

İnsülin yağ dokuda apelin sentezini stimüle eder (188-190) ve plazma apelin seviyesi hiperinsülinemi ve insülin direnciyle ilişkili olarak obezitede önemli düzeyde artış gösterir (163). Plazma apelin konsantrasyonu obez farelerde zayıf farelere göre 2–4 kat daha yüksektir (188,191). Bununla birlikte, obez hayvan modellerinde apelin ekspresyonundaki artışın en büyük belirleyicisi yağ dokudan çok insülin seviyesidir (188). Hiperinsülinemik obez farelerde hem adipozitlerde hem de plazmada apelin seviyesi oldukça yükselmiştir (188).

Apelinin insülin sekresyonu üzerinde belirgin inhibe edici etkisi belirlenmiştir (171). *In vivo* ve *in vitro* apelin–36, glikozla indüklenmiş insülin sekresyonunu stimüle eder (171).

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 (188). Yağ dokudan apelin ekspresyonu yağ hücrelerinin hipertrofi derecesini yansıtır (192). Apelin yağ dokunun damarlanmasına yol açar (193). Apelin, yağ dokuda normal ve insülin dirençli kemirgenlerde glikoz kullanımını artırarak plazma glikoz seviyesini düşürür (194). Obez ve insülin dirençli farelerde apelin insülin duyarlı dokularda glikoz alımını artırır (194).

Plazma apelin seviyesi, tip 2 diyabetli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşüktür (195, 196). Ancak daha önce tedavi gören tip 2 diyabetli hastalarda bu bulgulara zıt sonuçlar elde edilmiştir (197). Apelinin bu hastalarda bazal ve glikoz uygulandıktan 2 saat sonraki plazma seviyesi yükselmiştir ve glikoz

toleransı da azalmıştır (197). Ayrıca deneysel olarak diyabet oluşturulmuş farelerde apelin ekspresyonu azalmıştır (188). İnsülinin tersine, glikozun apelin sentezi üzerinde herhangi bir etkisi yoktur (188,190).

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 (160). Plazma apelinini insanlarda vücut kitle indeksiyle pozitif korelasyona sahiptir (190).

#### **3.4.3.4. Kardiyovasküler Etkileri**

Apelin kardiyovasküler sistemde güçlü vazodilatatör ve pozitif inotropik etkiye sahiptir. Apelinin güçlü doz bağımlı inotropik etkisi, sıçanlarda (198-200) ve farelerde (201) in vivo olarak gösterilmiştir (201, 202). İn vitro çalışmalarda da apelinin güçlü pozitif inotropik etkisi direk olarak sıçan (202-204) ve insan kardiyak dokularında gösterilmiştir.

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 blokajında da elde edilmiştir (202). PLC, DAG yoluyla PKC'yi aktive eder. Apelinin sodyum iyonu üzerindeki etkisi PKC ile ilişkilidir ve apelinin sodyum üzerindeki etkisi PKC inhibitörü kullanıldığında % 90 azalır (203). PKC'nin aktivasyonu  $Na^+/H^+$  değiştiriciyi fosforile eder. Bu değiştirici protonları dışarı çıkarıp sodyumu içeri alarak içeride sodyum miktarında artışa yol açar ve hücre içinin pH'ını alkali duruma getirir. Bu durum miyofilamentlerin kalsiyuma olan hassasiyetini artırarak pozitif inotropik etkiye yol açar (202, 203). Aynı zamanda sodyumun artışıyla indirek olarak  $Na^+/Ca^{+2}$  değiştirici aktifleşir, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve dolayısıyla da kontraktilitede artış meydana gelir.  $Na^+/Ca^{+2}$  veya  $Na^+/H^+$  değiştiricilerin blokajı apelinin inotropik etkisini % 60 veya daha fazla oranda azaltır (202).

Apelin sıçan kardiyak miyozitlerde kalsiyum geçişinin amplitüdünü PKC'den bağımsız olarak artırırken, SERCA ve  $Na^+/Ca^{+2}$  değiştiricilerin aktivitesini PKC bağımlı olarak artırır. Ancak SERCA üzerindeki etkisi daha azdır. Böylece SERCA ile içeri alınan kalsiyum miktarı değiştirici ile dışarı atılan kalsiyum miktarından daha az olduğundan SR'deki kalsiyum içeriği azalır. Ayrıca apelin ryanodin reseptör

aktivasyonunu da artırarak daha fazla kalsiyum salıverilmesini sağlar ve bu etki ise PKC'den bağımsızdır (205).  $Na^+/Ca^{+2}$  ve  $Na^+/H^+$  değiştiriciler, PKC ve PLC apelinin pozitif inotropik etkisinde önemli rol oynarlar.

Apelinin pozitif inotropik etkisinin hızlı bir artışla geçici olduğunu gösteren çalışmaların (204) yanısıra yavaş bir şekilde artarak sürekli bir inotropik cevaba yol açtığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (178, 199, 202).

Apelinin kalpte interkale disk etrafındaki yüksek miktardaki konsantrasyonu hücrel elektriksel iletişimde rolü olduğunu gösterir (204). Apelin sıçan kültür kardiyomyozitlerinde tek katmanda iletim hızını, spontan aktivasyon frekansını artırır. Aksiyon potansiyelinin yayılmasını ve kontraktiletiyi direk olarak etkiler (204).

Kemirgenlerde eksojen apelin uygulaması nitrik oksit (NO) bağımlı mekanizmayla hızlı bir şekilde kan basıncında ve ortalama kapiller basınçta düşüőe yol açar, güçlü vazodilatör ve venodilatör etki gösterir (2, 161, 206-212).

Apelinin hipotansif etkisi NO/L-arjinin sistem aracılığıyla olur (160). Apelin endotelial hücrelerde endotelial nitrik oksit sentaz fosforilasyonunu stimüle eder (208). NO, guanil siklazı aktive eder, cGMP seviyesi artarak vasküler düz kaslarda gevşeme meydana gelir (213). Nitrik oksit sentez inhibitörü (L-NAME), intraperitoneal uygulandığında sistolik kan basıncını vahşi tip ve APJ olmayan farelerde artırır. L-NAME uygulandıktan 15 dk sonra apelin uygulandığında, daha önce L-NAME ile tedavi edilmemiş vahşi tip farelerde sistolik kan basıncı akut ve geçici bir şekilde azalır. Buna karşın, L-NAME ile tedavi edilmiş vahşi tip ve APJ olmayan farelerde aynı doz apelin uygulaması sistolik kan basıncında hemen hemen hiçbir değişikliğe yol açmaz (208).

Apelinin periferal uygulanmasına zıt olarak İCV uygulanması uyanık sıçanlarda ortalama arteriyel basınçta doz bağımlı artışa yol açar (210). Apelinin kan basıncının düzenlenmesindeki santral etkisi, periferal etkisinden daha büyüktür (210, 214).

Apelin in vitro, insan safen vende ve mamarian arterde (174, 177) vasküler düz kas üzerine direk etkiyle vazokonstriksiyona sebep olur.

Apelin ve APJ'nin insanlarda kalp yetmezliğinin patofizyolojisinde rolü vardır (176, 215) ve NO bağımlı mekanizma yoluyla kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu etkisini gösterir (200, 208, 216-218).

Apelin APJ eksenini, kalbin kasılma gücünü artırarak başlangıçta kompensatuvar olarak işlev görerek erken dönemde artar (176, 198, 199, 219), fakat daha sonra kalp yetmezliğinin son döneminde azalmaya başlar (220-222).

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

Apelin ve APJ, hipotalamusta vazopressin ve oksitosinin sentezlendiği supraoptik ve paraventricüler çekirdeklerde bol miktarda eksprese edilir (11, 162, 212-224). Normal hidrate sıçanlarda apelinin santral ve periferik uygulanması su alımını artırır (2, 161, 184).

İzole sıçan hipotalamik doku örneklerinde, apelin ADH salınımını stimüle eder (184). Buna zıt olarak bir başka çalışmada, apelin farelerde ICV uygulandığında vazopressinerjik nöronların aktivitesini ve vazopressin salınımını inhibe eder, plazma vazopressin konsantrasyonunu azaltır (212) diürezisi artırır (11, 225, 226), su alımına yol açarak dehidratasyonu azaltır (184, 212). Dehidratasyon, apelin (226) ve APJ (227) ekspresyonunu artırır ve ADH ekspresyonunu azaltır (226).

Apelinin ICV uygulanması plazma adrenokortikotropik hormon ve kortizolü artırır, prolaktin, follikülü stimüle edici hormon (FSH), luteinleştirici 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 (184). Apelin-17'nin in vitro, perfüzyon sistemiyle ön hipofize uygulanması bazal adrenokortikotropik hormon sekresyonunu anlamlı düzeyde artırır (228).

#### **1.4.3.6. İmmün Sistem Üzerine Etkileri**

APJ insan ve maymun immün yetmezlik virüslerinin hedef hücre içine girişinde bir koreseptör olarak işlev görmektedir (229, 230). Benzer şekilde APJ'nin, HIV tarafından membrana tutunma ve hücreye giriş için kullanıldığı gösterilmiştir (229, 231, 232). Apelin peptitleri HIV'in APJ eksprese eden beyindeki NP-2/CD4 hücrelerine girişini inhibe etmektedir (233- 235). Apelin peptitlerinin bu inhibitör

etkisi moleküler büyüklükleriyle ilgilidir (233, 234). 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 (55). Son olarak HIV ile enfekte olmuş dokulardaki apelin ekspresyonu normal dokulara göre daha az bulunmuştur (233).

Apelin immün sinyalleşmede etkilidir ve insanlarda hücre serilerinde T hücrelerinin kolinerjik aktivitesini etkiler, in vitro apelin-36 fare dalak hücrelerinde CD3 aktivasyonu ile kısmen sitokin üretimini baskılayarak (99, 236) fare ovaryum hücreleri üzerinde kemotaksik aktivite gösterir (155).

#### **3.4.3.7. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri**

Kemirgenlerin gastrointestinal traktuslarında apelin ve APJ bulunmuştur (10, 237, 238). Apelin ekspresyonu, en yüksek düzeyde mide fundusunda ve daha az olarak bağırsaklarda gösterilmiştir. Duodenum ve kolona kıyasla ileumda daha yüksek miktarda eksprese edilir (10).

Apelin in vitro, mide hücre proliferasyonunu artırır. Apelin-13 kemirgen intestinal dokudan kolesistokinin sekresyonunu stimüle eder (10). Apelin-13 ve APJ, gastrik enterokromafin benzeri hücrelerde de eksprese edilir ve gastrik asit sekresyonunu inhibe eder (239).

#### **3.4.3.8. Solunum Sistemi Üzerine Etkileri**

Apelin solunum fiziolojisinde önemli bir role sahiptir. Sıçan akciğerlerinde yüksek miktarlarda apelin ve APJ mRNA ekspresyonu gösterilmiştir (155, 156). Yüksek miktarda APJ mRNA da sıçan medulla oblongatasında bulunmuştur (155). Apelin-13'ün traktus solitarius mikroyenjeksiyonu apne ile sonuçlanmıştır (214). Plazma apelin kronik parankimal akciğer hastalığında azalmıştır (240). Kronik hipoksik pulmoner hipertansiyonu olan sıçan modelinde, akciğer dokusundaki apelin konsantrasyonu azalmıştır ancak pulmoner doku kitlesinin artması sonucu toplam pulmoner apelin içeriği aynı kalmıştır (241). Pulmoner apelin içeriği hipoksiyle değişmez ve plazma apelin seviyesiyle aralarında bir korelasyon yoktur. Apelin normoksik sıçan arterinde vazokonstriktör tonusu düzenler ve bu etkisi hipokside görülmemiştir (241).

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinde embriyonik formasyon sırasında apelin reseptörlerinin ekspresyonu gözlemlenmiştir (168). 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 (242).

Apelin osteoblastlarda eksprese edilerek bu hücrelerde proliferasyonu stimüle eder, apoptozu baskılar (183, 243). Nöronlarda apoptozu inhibe eder (186).

### 3.4.3.9. Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Sığır over folliküllerinde granüloza hücrelerinin farklı gelişim safhalarında apelin mRNA ekspresyonu bulunmamasıyla birlikte APJ ekspresyonu, östrojen inaktif dominant folliküllerin granüloza hücrelerinde diğer folliküllere kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. APJ mRNA ekspresyonu ise preovulator folliküllerin teka hücrelerinde küçük folliküllere göre artmıştır (244, 245).

Granüloz hücre apoptozunda APJ mRNA ekspresyonu anlamlı düzeyde yüksektir (245). 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 uyarır (245).

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 (246), bu seviye istatistiksel olarak hamilelik dönemindekinden daha fazladır (244). APJ mRNA ise, erken luteal fazda artar, en yüksek seviyesine orta luteal fazda ulaşır (244). Luteal fazın sonunda APJ ve apelin düşmeye başlar ve KL'nin gerilemesiyle aşırı bir düşüş gösterirler (244).

Apelin, vasküler endotelial büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi anjiyojenik faktörlerle birlikte etki ederek, KL'de anjiyojenik etkisini gösterir (247). Bu etkiyle kapillerlerin proliferasyonunu sağlar, preovulator follikülün seçiminde rol alır, besin ve öncül maddelerin artmasına yol açar ve böylece dominant follikülün büyümesini sağlar (244).

Sığır KL'sinde  $PGF_{2\alpha}$  luteolizise 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 akışındaki artış zamanıyla tamamen uyumludur.  $PGF_{2\alpha}$  injeksiyonundan 4 saat sonra vazokonstriksiyona bağlı olarak luteal kan akışında bariz bir azalma meydana gelir, apelin ve APJ ekspresyonu da aynı şekilde bir düşüş gösterir (248).

Apelin APJ sistemi sığır KL'sinin düz kas hücrelerinde lokalizedir ve eNOS NO sistemi yoluyla etkisini gösterir. Apelin düz kas hücrelerinde  $Ca^{+2}$ 'u artırır, eNOS kalmoduline  $Ca^{+2}$  bağımlı olarak bağlanır ve kısa süre içinde NO salınır (248). NO üretimiyle vazodilatasyon meydana gelir, sonrasında kan basıncı düşer. Böylece apelin eNOS NO sinyal yollarının modülasyonu ile luteal kan akışı üzerinde düzenleyici rol oynar (246).

Apelin insan plasentasında 1. ve 3. trimesterde bulunmuştur (249). Normal plasentada apelin ekspresyonu plasental villuslarda, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlarda 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 (237), plasental villusların endotel hücrelerindeki kısmi artışla beraber, tüm plasental bölümlerde hem apelin hem de APJ ekspresyonu çok güçlü bir şekilde artmıştır (249).

Apelin-36 mRNA hipertansif gebelerde normal gebelere kıyasla daha düşük bulunmuştur (250). Gestasyonel diyabetes mellituslu ve normal glikoz toleransı olan gebelerde subkutanöz adipoz doku, visseral adipoz doku ve plasental dokularda apelin ve APJ ekspresyonunda anlamlı bir fark yoktur (63).

Maternal apelin konsantrasyonu normal sıçanlarda gebeliğin son haftasında yaklaşık olarak % 50 oranında düşüş gösterir. Bunun sebebi fetoplasental dokunun eliminasyonunun artışıdır (251). 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 desteklemektedir. Doğum sonrası 1. gün dolaşımdaki apelinin hızlı bir şekilde düşmesi plasentanın ayrılmasından kaynaklanmaktadır. 4. gündeki artışı ise ölü uterusu giderek artan anjiyogenez nedeniyledir. Ayrıca apelin konsantrasyonu ile

doğum ağırlığı, cinsiyet ve doğum sayısı arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (252).

Apelin mRNA çeşitli dokularda tespit edilmekle beraber en yüksek düzeydeki ekspresyonu gebe sıçanların meme bezlerinde bulunmuştur (253). Emziren sıçanların meme bezlerinde de apelin yüksek oranda eksprese edilir (253). Hamilelik boyunca meme bezlerinin gelişimine paralel olarak apelin ve mRNA düzeyi giderek artar, hamileliğin sonlarında ve doğumda en yüksek seviyesine ulaşır (253). Doğumdan sonra da meme bezlerinde apelin düzeyi hala yüksektir ve 21 gün içinde seviyesi giderek düşerek bazal seviyesine iner. Apelin sığır, sıçan ve insan sütünde bulunmuştur (253). Sığır kolostrumunda apelinin büyük miktarlarda (14–93 pmol/ml) sekresyonu gösterilmiştir (253). Ayrıca laktasyondaki sıçan sütündeki apelin peptit içeriği 300-600 ng/ml gibi oldukça büyük miktarda bulunmuştur (10).

**Amaç:** Bu tez çalışması apelinin gebe sıçanlarda miyometriyum kasılmaları üzerindeki olası etkilerini araştırmak için gerçekleştirilmiştir. Apelinin sıçanlarda uterus kontraksiyonları üzerindeki etkisini konu alan hiçbir araştırmanın bulunmaması, mevcut çalışmanın bilimsel değerini arttırmaktadır. Ayrıca apelinin olası etkisinde, PKC yolağının aracı rol oynayıp oynamadığının sorgulanması, henüz etki mekanizması tam olarak anlaşılammış olan apelinin, hücre içi sinyalleşmedeki bilinen bazı etkilerine yeni ek deliller sağlayabilecektir. Gebelik ve laktasyon süreçlerindeki sıçanlarda plazma apelin konsantrasyonlarının belirlenmesi de hormonun bu süreçlerdeki olası etkilerinin anlaşılmasına yönelik yeni bulguların yorumlanmasında etkili olabilecektir. Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi sonucunda, metabolizma-obezite-gebelik-doğum etkileşimlerini konu alan yeni araştırmalar için önemli bakış açıları ortaya çıkacaktır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezin'den temin edilen, 200-250 g ağırlığında 41 adet Wistar cinsi intak dişi sıçan kullanıldı.

Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, 22±1 °C oda sıcaklığında, plastik kafeslerde tutuldu. Cam şişelerdeki çeşme suyuyla ve Elazığ Yem Fabrikası'nda hazırlanan pelet halindeki özel sıçan yemleriyle beslendi.

### 2.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Sıçanlardaki cinsel döngü 4-5 gün sürmekte ve bu döngü 4 ayrı periyotta sınıflandırılmaktadır: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus. Proöstrus 12-14 saat, östrus 25-27 saat, metöstrus 6-8 saat ve diöstrus 55-57 saat sürmektedir. Deneyleerin 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 proöstrus dönemindeki hayvanlar tespit edildi. Bu sıçanlar her kafeste 1 dişi bir erkek olacak şekilde yerleştirildi. Ertesi sabah vajinal sürüntüde sperm görülen hayvanlar gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Gebeliğin başlangıç tarihi aynı olan hayvanlar aynı kafeslerde tutularak deney gününe kadar takip edildi.

Deneyleer, 2 ayrı protokol şeklinde gerçekleştirildi. 1. protokolde hayvanlar diöstrus döneminde 1, gebelik dönemi için 3, laktasyonda da 2 grup olmak üzere 6 gruba ayrıldılar. Gebeliğin 12., 18. ve 21. günleri ile laktasyonun 2. ve 10. günlerindeki sıçanlar deney grupları olarak seçildiler. Bu protokol gruplarındaki hayvanlardan (21 günlük gebe grup hariç), plazma apelin konsantrasyonunu belirlemek için, belirtilen günlerde hafif eter sedasyonu altında 1 ml kan örnekleri toplandı.

2. protokolde ise kontraksiyon deneyleeri gerçekleştirildi. Bu amaçla 1. protokoldeki 21 günlük gebe sıçanların uterusları kullanıldı.

### 2.3. Krebs Solusyonu

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

sağlamaktadır. Çalışmada kullanılan çözeltinin pH'ı 7.4' e ayarlanmıştır. Krebs solusyonu içeriği mM/L olarak aşağıdaki tabloda belirtilmiştir:

**Tablo 5.** Krebs solusyonu içeriği mM/L

|        |       |
|--------|-------|
| NaCl   | 118   |
| KCl    | 4,7   |
| MgSO4  | 1,2   |
| Glikoz | 11,5  |
| CaCl2  | 2,4   |
| KH24   | 1,18  |
| NaHCO3 | 15,8  |
| EDTA   | 0,016 |

#### **2.4. Deney Düzenegi**

Çalışmada kullanılan organ banyosu sistemi (Biyopac) iki hazneli bir sistemdir. Bu sistemde iki ayrı düz kas şeridiyle aynı anda çalışılabilmektedir. Sistemin üniteleri şunlardan oluşmaktadır:

1. Oksijen karbondioksit kaynağı
2. Organ banyosu
3. Termostatlı dolaşım pompası
4. Amplifikatör
5. Kayıt ünitesi

##### **2.4.1. Oksijen karbondioksit kaynağı:**

Düz kasların kasılabilmesi için gereken gaz karışımı in vitro ortamda optimal olarak %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub>'den oluşmaktadır. İzole organ banyosu ve kayıt sisteminde de bu karışımda hazırlanmış O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> içeriği hazneye sürekli olarak sirküle edildi.

##### **2.4.2. Organ banyosu**

İçerisinde % 95 oksijen ve % 5 karbondioksitle sürekli gazlandırılan termostat kontrolü ile 37 °C' de sabit tutulan, Krebs solusyonu bulunan ısı çeketli çift çeperli bir cihazdır. 4 kısımdan oluşmaktadır.

#### **2.4.2.1. Krebs Solüsyonunun Depolandığı Kısım**

500 ml hacme sahiptir ve iç içe iki katmandan oluşur. Bunların arasındaki boşlukta termosirkülatörden gelen su bulunur. İç katmanın içinde ise Krebs solüsyonu mevcut olup, buradan istenilen miktarda alınıp kullanılabilir.

#### **2.4.2.2. Organ Banyosu Hazneleri**

5 ml hacime sahiptir. Bunlarda iç içe iki katmandan oluşmaktadır. Yine iki katman arasında termosirkülatörde ısıtılmış su bulunmaktadır. İç katmanın içinde ise Krebs solüsyonu ve çalışmalarda kullanılan düz kas şeritleri mevcuttur. Miyometriyum şeritleri biri hazne içinde diğeri dışında yer alan iki çengel arasına ipek iplik yardımıyla asılmaktadır.

#### **2.4.2.3. Kanal ve Kapak Sistemi**

Bu sistem yardımıyla krebs solüsyonunun tüm organ banyosu boyunca dolaşımı sağlanmaktadır.

#### **2.4.2.4. İzometrik Güç Çevirgeci**

Bu cihaz sayesinde haznelere içinde yer alan düz kas şeritlerinde meydana gelen izometrik kontraksiyonlardan kaynaklanan fiziksel kuvvetler algılanmakta ve bu fiziksel kuvvetler elektriksel sinyallere çevrilerek, ölçümler değerlendirme ünitesine yönlendirilmektedir.

#### **Termosirkülatör**

İçerisinde distile su bulunmakta olup, mevcut suyu 36,7 °C'ye kadar ısıtmaktadır. Isıtılan su Krebs solüsyonunun depolandığı alana ve haznelere çeşitli yollarla gitmektedir. Krebs solüsyonunun depolandığı alan ve haznelere iç içe iki katmandan oluştuğundan, katmanlar arasında bir boşluk yer almaktadır. Termostat hassasiyet aralığı 36,7 ± 0,1 °C' dir. Termosirkülatörden gelen ısıtılmış su bu boşlukta dolaşmakta ve böylece banyo ortamının vücut sıcaklığında olması sağlanmaktadır.

#### **2.4.2.5. Amplifikatör**

Transducerden gelen elektriksel sinyalleri alır ve bunları amplifiye eder. Yani bu elektriksel sinyaller daha da büyütülür.

#### 2.4.2.6. Kayıt ünitesi

Bilgisayar ve yazılım programından (Biopac) oluşmaktadır. Yapılan çalışma sonuçlarının kişiler tarafından gözlenmesini sağlamaktadır. Bu sonuçlar pikler şeklinde monitöre yansımaktadır. Piklerin entegre alan, frekans ve amplitütlerine bakarak yorumlar yapılmaktadır.

#### 2.5. Plazma Apelin Düzeyi Analizi

Plazma apelin konsantrasyonları Trabzon Karadeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. ELISA'da apelin düzeyi analizi yapılırken kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeleri üreticileri ile Tablo 6'da listelenmiştir.

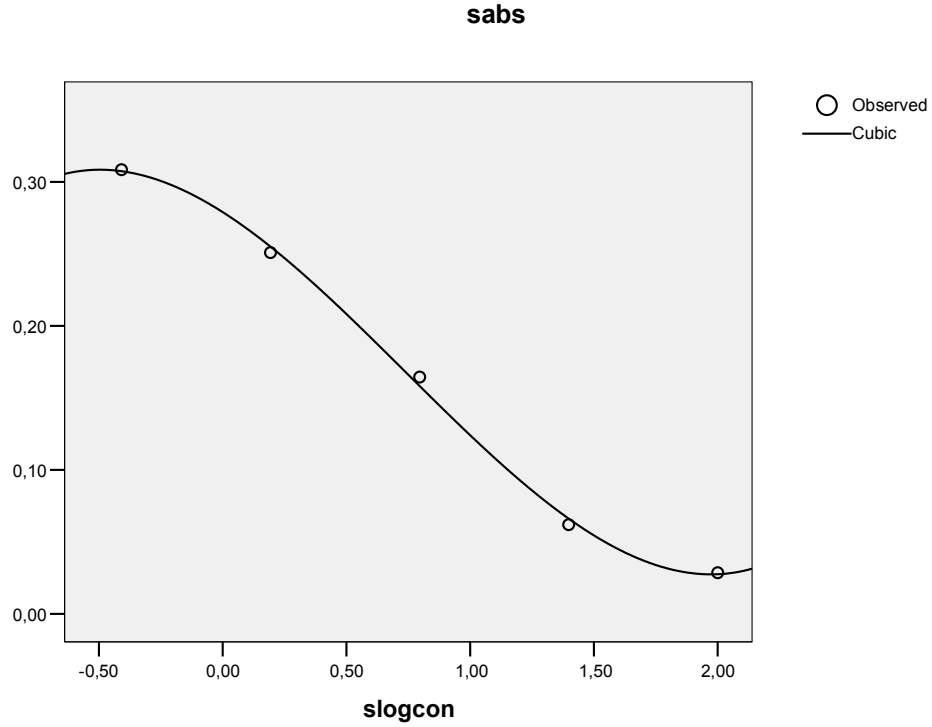
**Tablo 6.** Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri.

| Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler | Marka / Model             |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Dondurucu                            | Vestel, Arçelik, Bosch    |
| ELISA yıkayıcısı                     | Diagnostics Pasteur LP 35 |
| ELISA okuyucusu                      | VERSA                     |
| Çalkalayıcı                          | Nüve, SL 350              |
| Hassas analitik terazi               | Oertling NA 164           |
| Manyetik karıştırıcı                 | Ikamag RH                 |
| Otomatik pipet, 0.5-10 µL            | Biohit, Proline           |
| Otomatik pipet, 10-100 µL            | Socorex                   |
| Otomatik pipet, 50-200 µL            | Biohit, Proline           |
| Otomatik pipet, 100-1000 µL          | Transferpette             |
| Otomatik pipet, 1-5 mL               | Exelpette                 |
| Santrifüj                            | Heraeus, Labofuge 200     |
| Vorteks karıştırıcı                  | Nüve, NM 110              |

Plazma Apelin-13 seviyeleri üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kit (Cat.No. S-1416, BACHEM,UK) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbanları VERSA (Designed by molecular

Divices in California, USA) marka *micro plate* okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar ng/mL olarak belirlendi. Kitin ölçüm aralığı 0-100 ng/mL idi.

Örneklerin Apelin-13 seviyelerinin belirlenmesinde aşağıdaki standart grafiği kullanıldı.



**Şekil 4.** Logaritma standart konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği

Yukarıdaki logaritma standart konsantrasyonuna karşı absorbans grafiğine göre belirlenen  $Y = (-1.074X^3) + (3.889X^2) - (5.025X) + 2.106$  formülü kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Elde edilen verilerin anti logaritması alınarak örnekler değerlendirildi.

## 2.6. 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. Diğer deneyler için, farklı bir apelin flakonuna  $Ca^{+2}$  içermeyen Krebs çözeltisi eklenerek hormon çözdürüldü. Apelin çözeltileri küçük plastik ependorf tüplere ayrılarak organ banyosuna uygulanana kadar -20 °C'de saklandı.

## 2.7. Chelerythrine Chloride Hazırlanması

Çalışmada sentetik protein kinaz C inhibitörü olan *chelerythrine chloride* (Sigma Chem Com, St Louis, ABD) kullanıldı. Hormonun 1 µg'lık flakonu içine  $Ca^{+2}$  içermeyen Krebs çözeltisi eklendi ve vortekste karıştırılarak çözdürüldü. *Chelerythrine chloride* çözeltileri küçük plastik ependorf tüplere ayrılarak organ banyosuna uygulanana kadar  $-20^{\circ}C$ ' de saklandı.

## 2.8. Deney Protokolleri

### 2.8.1. Birinci protokol deneyleri

Bu protokol, plazma apelin konsantrasyonunun gebelik öncesine kıyasla gebeliğin başlangıç, orta ve son döneminde ve laktasyon sürecinde nasıl bir trase izlediğini belirlemek amacıyla planlandı. 6 grup sıçan kullanıldı. 1. grup diöstrus dönemindeki sıçanlardan meydana getirildi (n=6). Gebeliğin 12 (n=7), 18 (n=7) ve 21. gün (n=7)günündeki hayvanlardan gebelik grupları oluşturuldu. Laktasyonun 2 (n=7) ve 10 (n=7) günündeki sıçanlar da laktasyon grupları şeklinde düzenlendi. Hayvanlara sabah saat 09.00' da hafif eter sedasyonu uygulandı. Sıçanların kuyruk venlerinden pediatrik intraket kullanılarak yaklaşık 1 ml kan alındı. Kanlar EDTA ve aprotininli tüplere konarak soğutmalı santrifüjde,  $+4^{\circ}C$ 'de, 3000 devir/dk'da 10 dk süreyle santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri plastik ependorf tüplere alınarak hemen kuru buz kabında donduruldu ve  $-80^{\circ}C$ 'de analiz edilinceye kadar saklandı. Örneklerin Trabzon'a taşınması, kuru buz kalıplarına gömülen örneklerin strofor kutu içine yerleştirilerek soğuk zincir kurallarına uyularak gerçekleştirildi.

### 2.8.2. İkinci protokol deneyleri

Birinci protokolde yer alan gebeliğin 21. günündeki sıçanlar dekapite edilerek uterusları hassas bir şekilde çıkarıldı. Uterus dokuları, içinde Krebs çözeltisi bulunan petri kaplarına alındı. Antimezenterik kenarlardan, çok hassas bir şekilde 12X2X1 mm ebatlarında longitudinal uterus şeritleri (strip) hazırlandı. Şeritler içerisinde % 95 oksijen ve % 5 karbondioksitle sürekli olarak gazlandırılan  $37^{\circ}C$  sıcaklıktaki Krebs solusyonu bulunan çift çeperli izole organ banyosuna alındı. Alt ucundan hazne dibindeki metal halkaya ipek sütür ipliyle sabitlenen şeritler, üst uçlarından da yine

ipek sütür ipi aracılığıyla izometrik gç dönüştürücüye bağlandı. Bu düzenekle izometrik kasılmaların, izometrik gç dönüştürücü ve amplifikatöre iletilerek genlik ve frekans parametrelerinin fiziksel büyüklükleriyle uyumlu bir Şekilde monitör ekranında görüntülenmesi sağlandı. Deneyleerin uygulanabilmesi için kesitlere, 1 g gerim uygulandı ve oluşan spontan izometrik kasılmalar takip edildi.

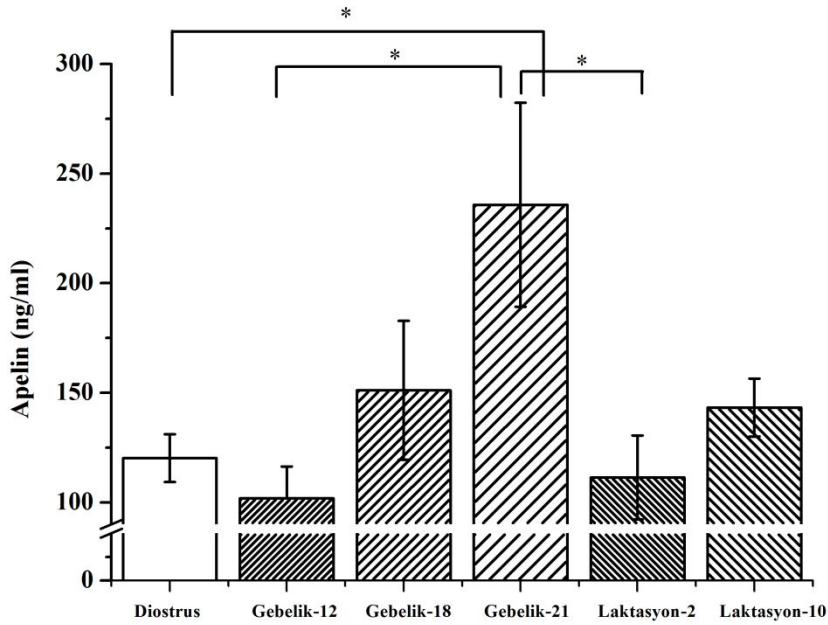
Spontan kasılma gösteren miyometriyum kesitleri spontan kasılmalarının bitmesine kadar gözetim altında tutuldular. Spontan kasılmalar bittikten sonra 10 dk. kontrol kayıtları yapıldı ve sonrasında organ banyosundaki konsantrasyonu sırasıyla 0.01, 0.1, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  olacak Şekilde, apelin dozları onar dakika arayla uygulandı. Kasılmaların frekans ve genlik parametreleri aritmetik ortalama (AO) $\pm$ standart hata (SH) değerleri olarak belirlendi. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 12.0 programında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılarak gerçekleştirildi.  $P<0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

Diğer bir düzenekte ise spontan kasılmalar düzenli olarak gözlendikten sonra organ banyosu haznesi hızla boŐaltılarak  $\text{Ca}^{+2}$  içermeyen Krebs zeltisi eklendi. Spontan kasılmaların tamamen durmasından sonraki 5 dk'lık bir sreden sonra ortama 10  $\mu\text{M}$  dozda apelin eklendi. Uygulamadan 2 dk. sonra bir adet kontraksiyon gözlendi. Aynı deney düzeneğine apelin eklenmeden 5 dk. nce protein kinaz C inhibitörü olan *chelerythrine chloride* 10  $\mu\text{M}$  dozda uygulandı ve ardından 10  $\mu\text{M}$  dozda apelin eklendi. Ancak kontraksiyon gözlenmedi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Birinci Protokol Grubu Bulguları

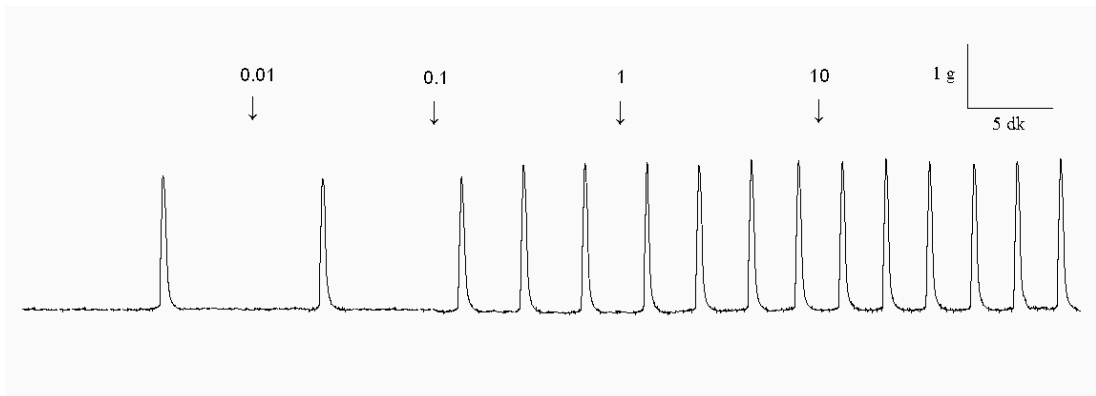
Bütün gruplardaki plazma apelin düzeyleri, kan örneklerinden ELİSA yöntemi kullanılarak  $AO \pm SH$  olarak tespit edildi. Hormon konsantrasyonları diöstrus ve gebeliğin 12., 18. ve 21. günlerinde sırasıyla  $120.2 \pm 10.9$  ng/ml,  $101.9 \pm 14.5$  ng/ml,  $151.1 \pm 31.7$  ng/ml ve  $235.8 \pm 46.5$  ng/ml olarak belirlendi. Laktasyonun 2. ve 10. günlerinde ise sırasıyla  $111.4 \pm 19.2$  ng/ml ve  $143.3 \pm 13.2$  ng/ml olarak ölçüldü. Bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu, 21 günlük gebe grubundaki apelin düzeyinin, hem kontrol (diöstrus) hem de 12 günlük gebe gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ , Şekil 6). Diğer gebe gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. 2 günlük laktasyon grubundaki apelin konsantrasyonu ise gebeliğin 21. günü değeriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0.05$ , Şekil 5.) Laktasyonun 10. günündeki sıçanlarda ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



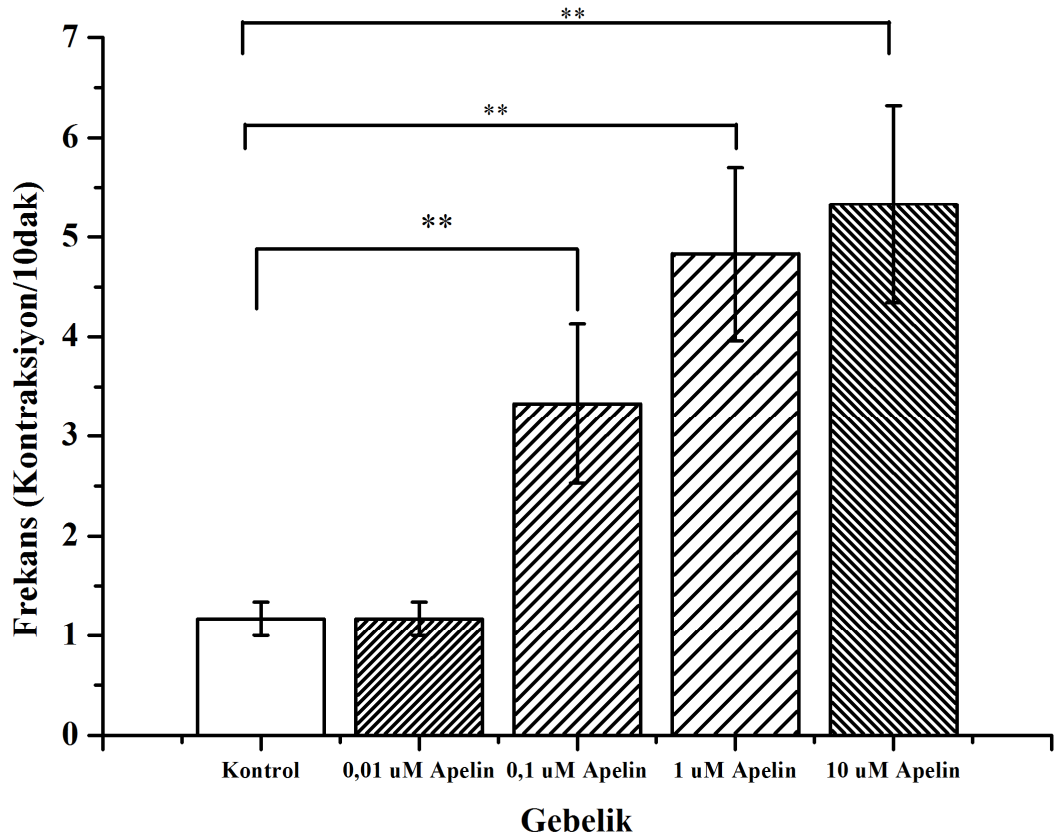
**Şekil 5.** Protokol grubunda diöstrus, gebeliğin 12., 18. ve 21. günü ve laktasyonun 2. ve 10. günündeki sıçanlarda plazma apelin düzeyleri. \*  $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılarak.

### 3.2. İkinci Protokol Grubu Bulguları

Miyometriyum kesitleri Krebs solusyonu içeren organ banyosu haznesine yerleştirildi. 1 gr gerim altında oluşan spontan kasılmalar uzun bir süre takip edildi. Apelinin olası etkisini belirlemek için deneme amaçlı olarak hazneye, 10 µM konsantrasyon oluşturacak şekilde apelin uygulandı. Uygulamayı takiben kasılmaların frekans ve genliğinde belirgin olarak artış gözlemlendi. Bu uygulama aynı şartlarda tekrarlandı ve aynı sonuçlar ortaya çıktı. Bu ön bulgular sonucunda apelinin uterus kasılmaları üzerinde stimülatör bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Apelinin etkili olduğu konsantrasyonu belirlemek için hormon, 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda kümülatif olarak hazneye uygulandı (Şekil 6). Apelinin stimülatör etkisinin belirgin olarak gözlemlenebilmesi için uygulamalardan önce kasılma frekansının 1-2 kontraksiyona kadar azalması beklendi. Kasılmaların dengelenmesinden sonra spontan kasılmalar 10 dk süreyle kontrol değerleri olarak kaydedildi. Bu dönemdeki kasılma frekansı  $1.17 \pm 0.17$  (n=7) şeklindeydi. Kontrol kayıtlarından sonra apelin dozları 10'ar dk'lık periyotlar halinde kümülatif olarak banyo haznesine eklendi. Apelin uygulamasından sonraki periyotlarda kasılma frekansları sırasıyla  $1.17 \pm 0.17$  (n=7),  $3.33 \pm 0.80$  (n=7),  $4.83 \pm 0.87$  (n=7) ve  $5.33 \pm 0.99$  (n=7) olarak belirlendi. Apelinin kontraksiyonların frekansını arttırıcı etkisi 0.1 µM, 1 µM ve 10 µM dozlarda istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.01$ ). Apelin etkisi genellikle uygulamadan yaklaşık 1-2 dk. sonra ortaya çıktı ve 10 dk'lık periyot boyunca devam etti.

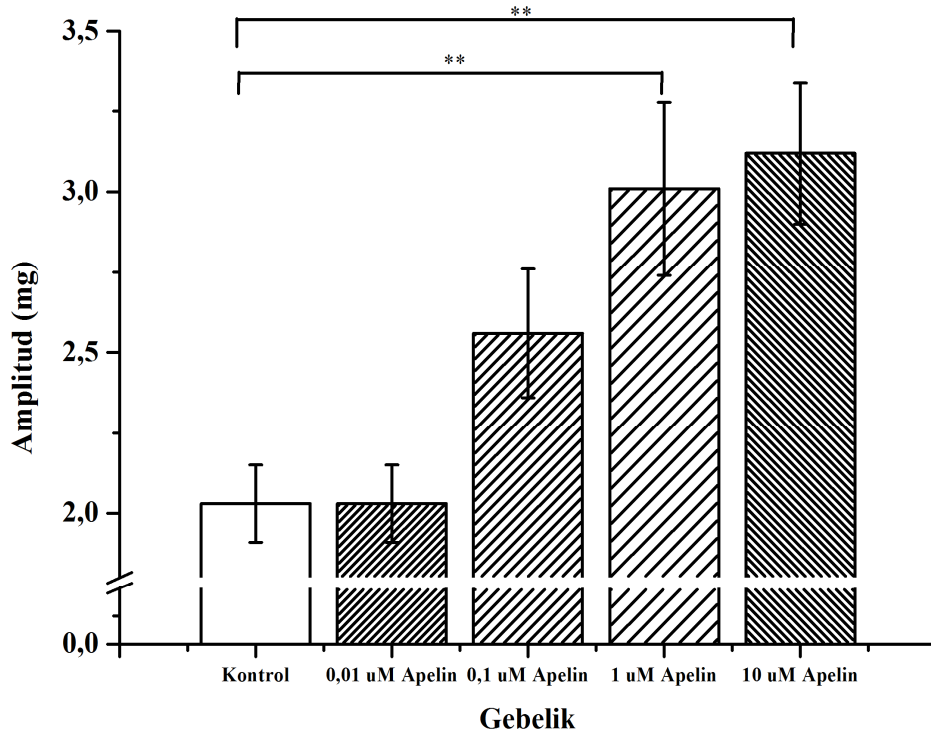


**Şekil 6.** Spontan kasılmalar üzerinde apelinin 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlardaki etkilerini gösteren orijinal trase.



**Şekil 7.** 21 günlük gebe sıçanlarda uterus kontraksiyonlarının frekansı üzerinde apelinin etkileri.  $p < 0.01$  \*\* Tek Yönlü Varyans Analizi.

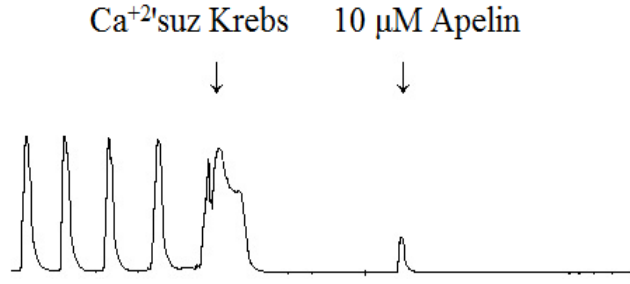
Kasılma genliği kontrol grubunda  $2.03 \pm 0.12$  g (n=7) iken, 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M apelin konsantrasyonlarında sırasıyla  $2.03 \pm 0.12$  g (n=7),  $2.56 \pm 0.20$  g (n=7),  $3.01 \pm 0.27$  g (n=7) ve  $3.12 \pm 0.22$  g (n=7) olarak tespit edildi. Apelin 1  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ) ve 10  $\mu$ M ( $p < 0.01$ ) konsantrasyonlarda kasılma genliği üzerindeki belirgin olarak artışa yol açtı. Diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya çıkmadı.



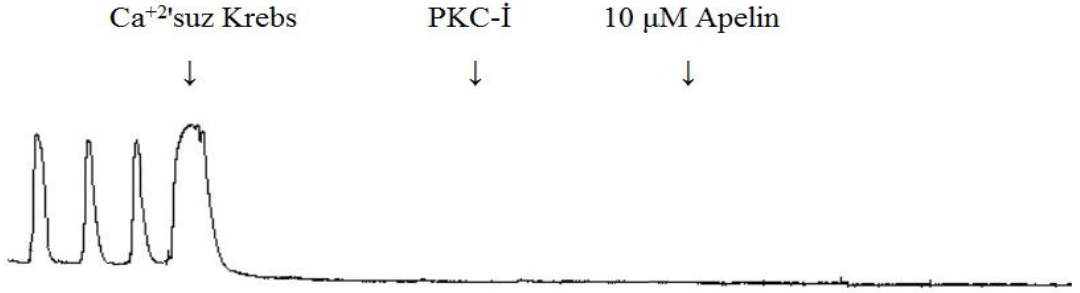
**Şekil 8.** 21 günlük gebe sıçanlarda apelinin uterus kontraksiyonlarının genliği üzerindeki etkileri.  $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$ \* Tek Yönlü Varyans Analizi.

İkinci protokol deneylerinin sonraki aşamasında myometriyum şeritleri aynı yöntemle izole organ banyo haznesine yerleştirildi. Spontan kasılmalar belirgin olarak ortaya çıktı. Bu aşamada organ banyosu  $Ca^{+2}$ 'suz Krebs çözeltisiyle değiştirildi ve spontan kontraksiyonların hemen kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 9). 5 dk'lık kontrol kaydından sonra, banyo haznesine 10  $\mu$ M konsantrasyonda apelin uygulandı ve kasılmaların indüklendiği gözlemlendi. 10  $\mu$ M dozda apelin uygulanması sonucunda bütün uygulamalarda sadece 1'er kasılma meydana geldi (n=6, Şekil 9).

$Ca^{+2}$ 'suz Krebs çözeltisinde gerçekleştirilen diğer deney düzeneğinde kasılmaların olmadığı kontrol kaydından sonra protein kinaz C inhibitörü olan *chelerythrine chloride* 10  $\mu$ M dozda uygulandı. *Chelerythrine chloride*'den 5 dk. sonra hazneye 10  $\mu$ M konsantrasyonda apelin eklendi. Fakat *chelerythrine chloride* ön muamelesinden (pretreatment) sonra apelin uygulanması sonucu (*chelerythrine chloride* uygulanmayan grubun aksine) hiçbir kasılma meydana gelmedi (Şekil 10).



**Şekil 9.** Ca<sup>2+</sup> suz Krebs çözeltisinde apelinin 10 μM konsantrasyonlardaki etkisini gösteren orijinal trase.



**Şekil 10.** Ca<sup>2+</sup> suz Krebs çözeltisinde protein kinaz C inhibitörü olan *chelerythrine chloride* 10μM dozda uygulandıktan sonra 10 μM dozda uygulanan apelinin etkisini gösteren orijinal trase.

#### 4. TARTIŞMA

Gebelik ve doğum süreçleri memelilerde birçok karmaşık fizyolojik mekanizmanın rol oynadığı olaylardır. Özellikle doğumun başlamasını sağlayan temel tetikleyici mekanizma halen tam olarak belirgin değildir. Bununla birlikte; hipotalamo-nörohipofizeyal sistemden oksitosin sekresyonunun meydana gelmesi, uterus içindeki fetus veya fetusların uterus duvarına yaptıkları giderek artan mekanik basıncın spontan miyometriyum kontraksiyonlarını uyarması, gebeliğin son döneminde miyometriyumdaki oksitosin reseptörlerinin up-regüle olması ve östrojen/progesteron oranının östrojen lehine değişmesi gibi mekanizmalar bu süreçte etkili olabilmektedir. Obstetrik bazı hastalıklarla ilgili patofizyolojik mekanizmaların anlaşılması, tedaviye yönelik yaklaşımlar için önem taşımaktadır. Bu da gebeliğin sonlanması ve doğumla ilgili temel faktörlerin daha iyi bilinmesiyle mümkün olabilecektir.

Son yıllarda özellikle metabolik işlevleriyle ön plana çıkan bazı hormonların üreme sistemi üzerindeki etkilerini konu alan çalışmalar ilgi odağı olmaktadır. Beslenme davranışı, enerji metabolizması ve obezite konularındaki araştırmalar, bu peptitlerin etki alanı bağlamında hem hipotalamus merkezli nöroendokrin süreçlerde hem de üreme sistemi eksenli bölgesel ilişkileri irdelemektedir. Apelin de bu alanda araştırmacıların ilgisini çeken yeni hormonlardan biridir. Apelin ve reseptörünün ağırlıklı olarak kalp, akciğerler, yağ doku ve meme bezlerinde olmak üzere birçok dokuda ekspresyonu gösterilmiştir (9, 155, 156, 188, 254). Ayrıca sıçan uterusunda da apelin ekspresyonu belirlenmiştir (255). İnsanlarda plasenta, over ve uterus dokularında da apelin varlığı tespit edilmiştir (8). Bu da apelinin bazı üreme işlevlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmanın bulguları apelinin, gebeliğin son dönemindeki sıçanlarda in vitro uterus kontraksiyonları üzerinde belirgin olarak stimülatör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Grubumuzun daha önceki çalışmalarında intak diöstrus grubu sıçanlarda da aynı bulgular elde edilmiştir. Apelin büyük olasılıkla, hücre içi depolardan  $Ca^{+2}$  salıverilmesini indükleyerek miyometriyum kontraksiyonları üzerinde stimülatör etki gerçekleştirmektedir. Çünkü  $Ca^{+2}$  bulunmayan ortamda da apelin miyometriyumda kasılmaları indüklemiştir. Apelinin bu etkisi yine büyük olasılıkla PKC yolağı aracılı olarak ortaya çıkmaktadır. PKC inhibitörü *chelerytine*

*chloride* ile ön muamele edilmiş ortamda apelinin kasılmaları indüklememesi, miyometriyum kasılmaları üzerindeki apelinin stimülatör etkisinde aracı rol oynayan hücre içi sinyal yolağının PKC aktivasyonu olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu yolak apelinin hücresel etki mekanizması için temel faktörlerden biridir. Çünkü apelinin kardiyomiyositlerde hücre içinde PKC yolağını aktive ettiği belirlenmiştir (205). Ayrıca apelin, APJ eksprese eden insan embriyonik böbrek hücrelerinde ERK1/2'yi APJ'nin Gi2 proteine bağlanmasıyla aktive eder. Apelin etkili ERK1/2 aktivasyonu da PKC bağımlıdır (256). Apelin forskolinle uyarılmış cAMP üretimini, APJ eksprese eden hamster ovaryum hücrelerinde pertussis toksin duyarlı G proteini aracılığıyla inhibe etmektedir (257). Aynı hücrelerde apelin G proteinin  $\alpha$  alt birimi aracılığıyla Ras bağımsız olarak ERK'yi (258), P70S6 kinazı ise ERK bağımlı ve fosfatidilinozitol-3 kinaz-Akt bağımlı olarak 2 tane sinyal iletim kaskadı aracılığıyla aktive eder (257). Bu etki insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde de gösterilmiştir (257). P70S6, protein sentezini artırarak endotelial hücre proliferasyonunda rol oynar (251, 259). Bu bilgiler APJ'nin büyük oranda inhibitör Gi/o proteinine bağlandığını göstermektedir (9, 260).

Miyometriyumda kasılma, hücre dışından voltaj duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla hücre içine giren ve SR'den salıverilen  $Ca^{+2}$  ile hücre içine artan  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu belli değere ulaştığı zaman meydana gelir. Kendilerine özgü reseptörleri aracılığıyla etki gösteren oksitosin,  $PGF_{2\alpha}$  gibi birkaç hormon PLC yolağını kullanır. PLC'nin aktivasyonu DAG ve PKC'yi uyarır ve oluşan  $IP_3$  SR'den  $Ca^{+2}$  salıverilmesini tetikler.  $Ca^{+2}$ -kalmodulin kompleksi MLCK enzimini aktive ederek MLC'nin fosforilasyonuna yol açar ve miyozin aktin etkileşmesiyle kasılma gerçekleşir (261, 251). Gebelikte miyometriyumdaki aktin ve miyozin miktarı artar ve uterus hipertrofiye uğrar. Gebelikle birlikte fetüs ve gelişen dokulara paralel olarak lokal kan akışı da artar. Uterus böylece gebelik boyunca gelişerek doğumdaki çok güçlü kasılmalar için hazırlanır. Bunun sonucunda fetüs ve plasentanın vücut dışına atılması (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. Miyometriyumda fazik kasılmalardan hemen önce ekstraselüler ortamdan hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi ile intraselüler  $Ca^{+2}$  seviyesi artmaktadır (49, 54, 262). Miyometriyumdaki spontan aktivitenin tamamen eksternal  $Ca^{+2}$  varlığına bağlı olduğu belirtilmiştir. Eğer miyometriyum kesitlerinin bulunduğu ortamda  $Ca^{+2}$  bulunmuyorsa spontan kasılmaların aniden durduğu ve aktivitenin yok olduğu gösterilmiştir (263). Ortama  $Ca^{+2}$  eklendiğinde spontan aktivite yeniden başlamaktadır (49). Miyometriyumda voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanalı blokörü olan nifedipin uygulandığında, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düştüğü ve spontan kasılmanın amplitüdünde azalma meydana geldiği gösterilmiştir (264). Bu bilgiler de miyometriyal spontan kasılmalarda eksternal kalsiyumun önemini göstermektedir (49, 262, 264).

Bu çalışmada diöstrus, gebeliğin farklı dönemleri ve laktasyonun farklı dönemlerinde bulunan sıçanların plazma apelin düzeyindeki değişimler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında plazma apelin düzeyinin gebeliğin son döneminde diöstrus ve gebeliğin 12. gününe kıyasla anlamlı derece arttığı tespit edilmiş, diğer gruplarda ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. 2 günlük laktasyon grubundaki apelin konsantrasyonu ise gebeliğin 21. günü değeriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Her ne kadar Van Mieghem ve arkadaşları maternal apelin konsantrasyonu normal sıçanlarda gebeliğin son haftasında yaklaşık olarak % 50 oranında düşüş gösterdiğini (251) belirtse de, elde ettiğimiz bulgular apelin hormonunun gebeliğin sonlarına doğru artış gösterdiğidir. Telejko ve ark (265) ile Kourtis ve ark. (266) yapmış oldukları çalışmalarda insanlarda gebeliğin sonlarına doğru apelin plazma düzeyi ile plasenta apelin mRNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca apelinin gebelik süresince giderek artması apelinin intrauterin gelişimde de rolü olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, Malamitsi-Puchner ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada insanlarda 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 düşük olarak tespit edilirken, umbilikal kan plazma örneğinde apelin konsantrasyonunun

belirgin derecede yüksek olması, apelinin intrauterin gelişimdeki rolünü desteklemektedir (252).

Apelinin bazı hücrelerde intraselüler kalsiyum konsantrasyonunu arttırarak bazı fizyolojik etkiler sergilediği bazı çalışmalarla ortaya konmuştur. Choe ve arkadaşları insan beyin nöron hücre kültürlerinde, apelinin hücre içi kalsiyum düzeyini arttırdığını göstermişlerdir (267). Medhurst ve arkadaşları da sıçan bazofilerinden derive edilen RBL-2H3 kültür hücrelerinde apelin peptitlerinin hücre içi kalsiyumu arttırdığını bulmuşlardır (3). Mevcut çalışmanın bulguları, apelinin miyometriyumda intraselüler  $Ca^{+2}$  salıverilmesini indükleyerek uterus kontraksiyonlarını stimüle ettiğini göstermektedir.  $Ca^{+2}$  bulunmayan ortamda apelinin kontraksiyonları indüklemesi bu kanıya yol açmaktadır. Bazı araştırmacıların bulguları da farklı hücre modellerinde apelinin intraselüler  $Ca^{+2}$  düzeyini arttırdığını ortaya koymuştur. Apelinin bu etki mekanizmasında büyük olasılıkla PKC yolağı aracı olmaktadır. Çünkü mevcut çalışmada PKC inhibitörü uygulandığı zaman apeline ait uterotonik etkinin kaybolduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; apelin düşük dozda gebe sıçan miyometriyumunda kontraksiyonlar üzerinde herhangi bir etki göstermezken, doz bağımlı olarak spontan kasılmalar üzerinde stimülatör etki göstermektedir. Apelinin sıçan miyometriyumundaki bu stimülatör etkisini hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesini indükleyerek gerçekleştirmektedir. Gebeliğin son dönemindeki sıçanlarda plazma apelinin konsantrasyonunun artması da, hormonun gebeliğin sonlanması ve doğum süreçlerinde oynayabileceği olası role ait ip uçları vermektedir. Apelinin bu konudaki fizyolojik etkilerinin tam olarak belirlenebilmesi, daha ileri düzeydeki çalışmalarla mümkün olabilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Tatemoto K, Fujii R, Fujino M, Fukusumi S, Habata Y, Hinuma S, Hosoya M, Kakegawa T, Kawamata Y, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Zou MX. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 471–476.
2. Lee DK, Cheng R, Fan T, George SR, Kariyawasam AP. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J. Neurochem* 2000; 74: 34-41.
3. Medhurst AD, Davis RP, Ellis C, Jennings CA, Robbins MJ, Winborn KY. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003; 84: 1162-1172.
4. De Falco M, Artigiano F, Cavallotti I, De Luca A, De Luca B, De Luca L, Esposito V, Groeger AM, Laforgia V, Onori N. Apelin expression in normal human tissues. *In Vivo* 2002; 16: 333–336.
5. Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept* 2004; 118: 119-125.
6. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, Hinuma S, Baba A. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 395-400.
7. Schilffarth S, Antoni B, Schams D, Meyer HH, Berisha B. The expression of apelin and its receptor APJ during different physiological stages in the bovine ovary. *Int J Biol Sci* 2009; 5: 344-350.
8. Cobellis L, De Falco M, Mastrogiacomo A, Giraldi D, Dattilo D, Scaffa C. Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Histol Histopathol* 2007; 22: 1-8.
9. Habata Y, Fujii R, Fujino M, Fukusumi S, Hinuma S, Hosoya M, Kawamata Y, Kitada C, Kurokawa T, Murosaki S, Nishizawa N, Onda H, Tatemoto K. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1452: 25-35.

10. Wang G, Anini Y, Englander EW, Greeley GH, Hellmich MR, Mochizuki T, Qi X, Wang HQ, Wei W. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 2004; 145: 1342-8.
11. O'Carroll AM, Lolait SJ, Palkovits M, Selby TL. 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: 72-80.
12. Bennett JP, Vickery BH. Rats and Mice. Hafez ESE, editor. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Philadelphia, Lea and Febiger; 1970: 299–315.
13. Bennett JP, Vickery BH. Rats and Mice. Hafez ESE, editor. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Philadelphia, Lea and Febiger; 1970: 299–315.
14. Lohmiller JJ, Swing SP. *Reproduction and Breeding*. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. *The Laboratory Rat*. Burlington: Elsevier Academic Press 2006; 148-159.
15. Fox RR, Laird CW. Sexual cycles. Hafez ESE, editor. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Philadelphia: Lea & Febiger 1970; 107–122.
16. www.biologycorner.com Homepage. Rat Urogenital System. Access Date: 10.11.2010. Available from: [http://www.biologycorner.com/worksheets/rat\\_urogenital.html](http://www.biologycorner.com/worksheets/rat_urogenital.html).
17. Richardson V. *Diseases of Small Domestic Rodents*. UK, Blackwell Publishing, Second Edition, 2003: 221-226.
18. Maeda KI, Ohkura S, Tsukamura H. Physiology of reproduction. In: Krinke GJ, editor. *The Laboratory Rat*, New York: Academic Press, 2000:145–176.
19. Kohn DF, Clifford CB. *Biology and diseases of rats*. Anderson LC, Leow FM, Quimby FW, editors. *Laboratory Animal Medicine*, San Diego: Academic Press, 2002: 121–165.

20. Smith MS, Freeman ME, Neili JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin, and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrin* 1975; 96: 219–226.
21. Baker DEJ. Reproduction and breeding. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH editors. *The Laboratory Rat*, Volume 1, New York: Academic Press 1979; 6: 153–168.
22. Gibori G, Khan I, Warshaw MI, McLean MP, Puryear TK, Nelson S, et al. Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function. *Recent Prog Horm Res* 1988; 44: 377–429.
23. Kaufmann P, Burton G. Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*, 2d ed., New York: Raven Press 1994; 5: 441–484.
24. Morishige WK, Pepe GJ, Rothchild I. Serum Luteinizing Hormone, Prolactin and Progesterone Levels During Pregnancy in the Rat. *Endocrinology* 1973; 5: 1527-1530.
25. Waynforth HB. Changes In The Volume Of Rat Corpus Luteum During Pregnancy And After Surgical Interference With The Uterus And Placenta. *Acta Endocrinologica* 1971; 2: 296-302.
26. Samuel CS, Butkus A, Coghlan JP, Bateman JF. The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: The influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. *Endocrin* 1996; 137: 3884–3890.
27. Higuchi T, Honda K, Negoro H. Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol* 1986; 110: 251–256.
28. Niggeschulze A, Kast A. Maternal age, reproduction, and chromosomal aberrations in Wistar derived rats. *Lab Anim* 1994; 28: 55–62.
29. Woodside C, Jans JE. Role of the nutritional status of the litter and length and frequency of mother litter contact bouts in prolonging lactational diestrus in rats. *Horm Behav* 1995; 29: 154–176.
30. Fowler JA, Whittam JT, Taylor Berne AE, Matthew L. Levy Reviewed *Physiology*. 2008: 122-128.

31. Kawarabayashi T, Tsukamoto T, Shojo H, Nakamura S, Sugimori H. 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: 77-84.
32. Snyder SW, Rigby SL, Adams HR Evidence for decidual modulation of contractile function in the pregnant rat uterus. *Life Sci* 1994; 55: 399-411.
33. Shmygol A, Gullam J, Blanks A, Thornton S. Multiple mechanisms involved in oxytocin-induced modulation of myometrial contractility. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 827-832.
34. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta* 1994; 15: 341-353.
35. Lye SJ, Freitag CL. Local and systemic control of myometrial contractile activity during labour in the sheep. *J Reprod Fertil* 1994; 90: 483-492.
36. Ou CW, Chen ZQ, Qi S, Lye SJ. Increased expression of the rat myometrial oxytocin receptor messenger ribonucleic acid during labor requires both mechanical and hormonal signals. *Biol Reprod* 1998; 59: 1055-1061.
37. White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, Moore LG. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocr Rev* 1995; 16: 739-751.
38. Waldo GL, Boyer JL, Morris AJ, Harden TK. Purification of an AIF4-and G-protein beta gamma-subunit-regulated phospholipase C-activating protein. *J Biol Chem* 1991; 266: 14217-14225.
39. Word RA, Casey ML, Kamm KE, Stull JT. Effects of cGMP on  $[Ca^{+2}]_i$ , myosin light chain phosphorylation, and contraction in human myometrium. *Am J Physiol* 1991; 260: 8617.
40. 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.

41. Shmygol 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: 803-811.
42. Monga M, Andres RL, Sanborn BM, Weisbrodt NW. Cocaine acutely increases rat myometrial contractile activity by mechanisms other than potentiation of adrenergic pathways. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 15026.
43. Monir-Bishty E, Kupittayanant S, Pierce SJ, Shmygol A, Wray S. The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium. *BJOG* 2003; 110: 1050-1056.
44. Chien EK, Phillippe M, Saunders T. The mechanisms underlying Bay K 8644-stimulated phasic myometrial contractions. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3: 106-112.
45. Collins PL, Idriss E, Kulp TM, Moore JJ. Human fetal membranes inhibit calcium L-channel activated uterine contractions. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1173-1179.
46. 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: 993-999.
47. Parkington HC, Coleman HA. Ionic mechanisms underlying action potentials in myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988; 15: 657-665.
48. Blanks AM, Astle S, Bru-Mercier G, Shmygol A, Thornton S, Zhao ZH. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. *J Physiol* 2007; 581: 915-926.
49. Matthew A, Shmygol A, Wray S. Ca<sup>2+</sup> entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res* 2004; 37: 617-624.
50. Mironneau J. Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. *J Physiol* 1973; 233: 127-141.
51. Ohya Y, Sperelakis N. Modulation of single slow (L-type) calcium channels by intracellular ATP in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1989; 414: 257-264.

52. 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: 785-792.
53. 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: 241-249.
54. 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: 112-114.
55. Parkington HC, Coleman HA. Excitability in uterine smooth muscle. *Front Horm Res* 2001; 27: 179-200.
56. Monga M, Andres RL, Sanborn BM, Weisbrodt NW. Cocaine acutely increases rat myometrial contractile activity by mechanisms other than potentiation of adrenergic pathways. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1502-1506.
57. 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: 215-223.
58. Young RC, Zhang P. The mechanism of propagation of intracellular calcium waves in cultured human uterine myocytes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 84: 1228-1234.
59. Shmygol A, Wray S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. *Cell Calcium* 2004; 35: 501-508.
60. Bolton TB, Gordienko DV. Confocal imaging of calcium release events in single smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1998; 164: 567-575.
61. Blaustein MP, Church PJ, Golovina VA, Juhaszova M, Stanley EF. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Acad Sci* 2002; 976: 356-366.

62. Miriel V. Local and cellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J physiol* 1999; 518: 815-24.
63. Takeda M, Nelson DJ, Soliven B. Calcium signaling in cultured rat oligodendrocytes. *Glia* 1995; 14: 225-236.
64. Burdyga T, Noble K, Wray S. In situ calcium signaling: no calcium sparks detected in rat myometrium. *Acad Sci* 2007; 1101: 85-96.
65. Noble K, Wray S, Zhang J. Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *J Physiol* 2006; 570: 29-35.
66. Daniel EE, Kwan CY, Schilling WP, Van Breemen C. Regulation of vascular tone: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 551-557.
67. Duquette RA, Burdyga T, Mobasheri A, Pope M, Shmygol A, Vaillant C, Wray S. Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? *Biol Reprod* 2005; 72: 276-83.
68. Buhimschi C, Boyle MB, Saade GR, Garfield RE. 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: 811-822.
69. Doret M, Bukowski R, Garfield RE, Longo M, Maul H, Maner WL, Saade GR. Uterine electromyography characteristics for early diagnosis of mifepristone-induced preterm labor. *Obstet Gynecol* 2005; 105: 822-830.
70. Tabb TN, Garfield RE. Molecular biology of uterine contractility. *Clin Obstet Gynecol* 1992; 35: 494-504.
71. Miller SM, Daniel EE, Garfield RE. Improved propagation in myometrium associated with gap junctions during parturition. *Am J Physiol* 1989; 256: 130-141.
72. Burdyga FV, Babich LF, Kosterin SA, Taran TT. The calcium pump in the sarcolemma controls smooth muscle relaxation. *Biofizika* 1994; 39: 365-371.

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: 253-261.
74. Offermans S. Mammalian G Proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 2005; 85: 1159- 1204.
75. Berthet J, Rall TW, Sutherland EW. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem* 1957; 224: 463-475.
76. Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 1958; 232: 1077-1091.
77. Birnbaumer L, Rodbell M. Adenylyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J Biol Chem* 1969; 244: 3477-3482.
78. Orly J, Schramm M. Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylyl cyclase from another cell by cell fusion. *Proc Natl Acad Sci* 1976; 73: 4410-4414.
79. Shorr RGL, Lefkowitz RJ, Caron MG. Purification of the  $\beta$ -adrenergic receptor. Identification of the hormone-binding subunit. *J Biol Chem* 1981; 256: 5820-5826.
80. Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HMJ. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylate nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 1971; 246: 1877-1882.
81. Pfeuffer T, Helmreich EJM. Activation of pigeon erythrocyte membrane adenylyl cyclase by guanylate nucleotide analogues and separation of nucleotide-binding protein. *J Biol Chem* 1975; 250: 867-876.
82. Ross EM, Gilman AG. Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* 1977; 252: 6966-6969.
83. Gilman AG, Ross EM. Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* 1994; 269: 6966-6969.
84. Vaughan M. Signaling by heterotrimeric G proteins minireview Series. *J Biol Chem* 1998; 273: 667-668.

85. Patel TB. Single transmembrane spanning heterotrimeric G Protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 371-385.
86. Schlessinger J, Ulrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992 9; 3: 383-391.
87. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225.
88. Kolakowski LF Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 1994; 2: 1-7.
89. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 2000; 21: 90-113.
90. Landry Y, Gies JP. Heterotrimeric G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling, a base for drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 2002; 2: 361-372.
91. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci* 1992; 7: 383-387.
92. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; 252: 802-808.
93. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 79- 94.
94. Stryer L. Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* 1986; 9: 87-119.
95. Meng J, Casey PJ. Signaling through Gz. *Handbook of cell signaling*, edited by Bradshaw RA and Dennis EA. Boston, MA: Academic, 2004:601-604.
96. Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN Jr. G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* 2004; 64: 153-187.
97. Gilbertson TA, Damak S, Margolskee RF. The molecular physiology of taste transduction. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 519-527.
98. 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: 18707-18712.

99. Waldo GL, Morris AJ, Klapper DG, Harden TK. Receptor- and G-protein regulated 150-kDa avian phospholipase C: inhibition of enzyme activity by isoenzyme-specific antisera and nonidentity with mammalian phospholipase C isoenzymes established by immunoreactivity and peptide sequence. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 480-489.
100. Dhanasekaran N, Dermott JM. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* 1996; 8: 235-245.
101. Plonk SG, Park SK, Exton JH. The alpha-subunit of the heterotrimeric G protein G13 activates a phospholipase D isozyme by a pathway requiring Rho family GTPases. *J Biol Chem* 1998; 273: 4823-4826.
102. Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.2° A crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP $\gamma$ S. *Nature* 1993; 366: 654-663.
103. Tooze J, Branden C. Introduction to protein structure. Garland Publishing 1999; 13: 251-281.
104. Hamm HE, Gilchrist A. Heterotrimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 1996; 8: 189-196.
105. Theresa M, Vera C, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 765-81.
106. Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.0° A crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 1996; 379: 311-319.
107. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the  $\alpha$  subunit of heterotrimeric G protein. *Nature* 1994; 369: 621-628.
108. Denker BM, Boutin PM, Neer EJ. Interactions between the amino- and carboxyl-terminal regions of G $\alpha$  subunits: analysis of mutated G $\alpha$ o/G $\alpha$ i2 chimeras. *Biochemistry* 1995; 34: 5544-5553.
109. Koelle MR. A new family of G protein regulators-the RGS proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 143-147.
110. Hollinger S, Hepler JR. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 527-559.

111. Bushfield M, Murphy GJ, Lavan BE, Parker PJ, Hruby VJ, Milligan G, Houslay MD. Hormonal regulation of Gi2 $\alpha$ -subunit phosphorylation in intact hepatocytes. *Biochem J* 1990; 86: 24-76.
112. Chen CA, Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* 2001; 20: 1643-1652.
113. Fields TA, Casey PJ. Phosphorylation of Gz $\alpha$  by protein kinase C blocks interaction with the  $\beta\gamma$  complex. *J Biol Chem* 1995; 270: 23119-23125.
114. Glick JL, Meigs TE, Miron A, Casey PJ. RGSZ1, a Gzselective regulator of G protein signaling whose action is sensitive to the phosphorylation state of Gz $\alpha$ . *J Biol Chem* 1998; 273:26008-26013.
115. Moyers JS, Linder ME, Shannon JD, Parsons SJ. Identification of the in vitro phosphorylation sites on Gs $\alpha$  mediated by pp60c-src. *Biochem J* 1995; 305: 411-417.
116. Kozasa T, Gilman AG. Protein kinase C phosphorylates G12 $\alpha$  and inhibits its interaction with G $\beta\gamma$ . *J Biol Chem* 1996; 271: 12562-12567.
117. Wieland T, Nurnberg B, Ulibarri I, Kaldenberg-Stasch S, Schultz G, Jacobs KH. Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine nucleotide-binding regulatory protein  $\beta$ - subunits. Characterization of the phosphorylated amino acid. *J Biol Chem* 1993; 268: 18111-18118.
118. Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. *Science* 1995; 268: 221-225.
119. Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem* 1995; 270: 503-506.
120. Zang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 241-269.
121. Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein- linked signaling. *Physiol Rev* 1999; 79: 1373-1430.
122. Boyer JL, Graber SG, Waldo GL, Harden TK, Garrison JC. Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein  $\alpha$ - and  $\beta\gamma$ -subunits. *J Biol Chem* 1994; 269: 2814-2819.

123. Fields TA, Casey PJ. Signaling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G proteins. *Biochem J.* 1997; 321: 561-571.
124. Serventi IM, Moss J, Vaughan M. Enhancement of cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation by guanine nucleotide-binding proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 175: 4367.
125. Murayama T, Ui M. Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem* 1983; 258: 3319-26.
126. Nakamura T, Nogimori K. Islet-activating protein, pertussis toxin: a specific uncoupler of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase 1984; *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17: 145-151.
127. Wettschureck N, Offermans S. Mammalian G Proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 2005; 85: 1159- 1204.
128. Taussig R, Gilman AG. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 1995; 270: 1-4.
129. Iyengar, R. Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 1993; 7: 768- 775.
130. Taussig R, Iniguez-Lluhi JA, Gilman AG. Inhibition of adenylyl cyclase by *G<sub>iα</sub>*. *Science* 1993; 261: 218-221.
131. Taussig R, Quarmby LM, Gilman AG. Regulation of purified type I and type II adenylyl cyclases by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *J Biol Chem* 1993; 268: 9-12.
132. Offermans S, Simon MI. Organization of transmembrane signaling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv* 1996; 27: 177-198.
133. Rhee SG, Choi KD. Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1992; 26: 35-61.
134. Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 1992; 267: 12393-12396.

135. Camps M, Carozzi A, Schee A, Parker P, Gierschik P. Isoenzyme-selective stimulation of phospholipase C- $\beta$ 2 by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 1992; 360: 684-686.
136. Hamm HE. Molecular interactions between the photoreceptor G protein and rhodopsin. *Cell Mol Neurobiol* 1991; 11: 563-578.
137. Dennis EA. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 1-2.
138. Jelsema C L, Axelrod J. Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the  $\beta\gamma$  subunits of transducin and its inhibition by the  $\alpha$  subunit. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 3623-3627.
139. Brown AM, Birnbaumer L. Direct G protein gating of ion channels. *Am J Physiol* 1988; 254:401-410.
140. Clapham DE. Direct G protein activation of ion channels? *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 441-464.
141. Clapham DE. Arachidonic acid and its metabolites in the regulation of G protein-gated K<sup>+</sup> channels in atrial myocytes. *Biochem. Pharmacol* 1990; 39: 813-815.
142. Yang J, Tsien RW. Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 1993; 10: 127-136.
143. Marchetti C, Robello M. Guanosine-5'-O- (3-thiotriphosphate) modifies kinetics of voltage-dependent calcium current in chick sensory neurons. *Biophys J* 1989; 56: 1267-1272.
144. Taussig R, Sanchez S, Rifo M, Gilman AG, Belardetti F. Inhibition of the omega-conotoxin-sensitive calcium current by distinct G proteins. *Neuron* 1992; 8: 799-809.
145. Schubert B, Vandongen AM, Kirsch GE, Brown AM.  $\beta$  adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G protein pathways. *Science* 1989; 245: 516-519.
146. Ling BN, Kemendy AE, Kokko KE, Hinton CF, Marunkaka Y, Eaton DC. Regulation of the amiloride-block-able sodium channel from epithelial tissue. *Mol Cell Biochem* 1990; 99: 141-150.

147. Fargon F, McNaughton PA, Sepulveda FV. Possible involvement of GTP-binding proteins in the deactivation of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in enterocytes isolated from guinea-pig small intestine. *Plügers Arch* 1990; 417: 240-242.
148. Sadjá R, Alagem N, Reuveny E. Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* 2003; 39: 9-12.
149. Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002; 18: 145-151.
150. Landry Y, Gies JP. Heterotrimeric G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling, a base for drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 2002; 2: 361-372.
151. 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: 18707-12.
152. Duc-Goiran P, Bourgeois C, Ferré F, Mignot TM, Robert B, Tanguy G. Identification and expression of Go1 and Go2 alpha-subunit transcripts in human myometrium in relation to pregnancy. *Biol Reprod* 1999; 60: 1528-1535.
153. Europe-Finner GN, López Bernal A, Phaneuf S, Watson SP. Identification and expression of G-proteins in human myometrium: up-regulation of G alpha s in pregnancy. *Endocrinology* 1993; 132: 2484-2490.
154. O'Dowd BF, Chan A, George SR, Heiber M, Heng HH, Kennedy JL, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993; 136: 355–360.
155. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma 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: 21061–2107.
156. Kawamata Y, Fujii R, Fujino M, Fukusumi S, Habata Y, Hinuma S. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1538: 162-171.

157. Habata Y, Fujii R, Fujino M, Fukusumi S, Hinuma S, Hosoya M. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys. Acta* 1999; 1452: 25-35.
158. Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 198-211.
159. Medhurst AD, Davis RP, Ellis C, Jennings CA, Robbins MJ, Winborn KY. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003; 84: 1162-1172.
160. Tatemoto K, Kumaki I, Kumano K, Takayama K, Zhang W, Zou MX. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001; 99: 87-92.
161. Lee DK, Cheng R, George SR, Nguyen T, O'Dowd BF, Saldivia VR. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 2005; 146: 231–236.
162. Falcão-Pires I, Vasconcelos M, Magalhaes J, Bras-Silva C, Leite-Moreira A. Distinct contractile effects of apelin in intact hearts and isolated papillary muscles. *Eur J Heart Failure* 2005; 4: 48-49.
163. Beltowski J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* 2006; 12: 112-119.
164. Vickers C, Baronas E, Dick L, Gavin J, Godbout K, Hales P, Hsieh F, Kaushik V, Parsons T, Tang J. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277: 14838–14843.
165. Foldes GF, Horkay I, Szokodi O, Vuolteenaho M, Ilves KA, Lindstedt, M, Mayranpaa, B, Sarman, L, Seres, R, Skoumal, Z, Lako-Futo, R, deChatel, H, Ruskoaho, M, Toth. 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.
166. Sarah L, Maguire J, Pitkin J, Tom I Apelin Receptor Nomenclature, Distribution, Pharmacology, and Function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 331–342.

167. O'Carroll AM, Lolait SJ, Palkovits M, Selby TL 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: 72-80.
168. Devic E, Audigier Y, Bodin S, Knibiehler B, Rizzoti K. 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.
169. Edinger AL, Choe W, Faulds D, Hoffman TL, Kolson DL, Lee B, Mitrovic B, Sharron M, Yi Y, Zhou Y. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for foldes ghuman immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1998; 72: 7934–7940.
170. Medhurst AD, Davis RP, Ellis C, Jennings CA, Robbins MJ, Winborn KY. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003; 84: 1162-1172.
171. 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; 131: 127.
172. O'Carroll AM, Lolait SJ, Palkovits M, Selby TL. 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: 72-80.
173. De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 2000; 72: 400–407.
174. Katugampola SD, Davenport AP, Maguire JJ, Matthewson SR. ( (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: 1255-1260.
175. Matsumoto M, Akiho H, Hidaka K, Okada M, Tada S, Yamaguchi T. 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.

176. Chen MM, Ashley EA, Deng DX, Tsalenko A, Deng A, Tabibiazar R. Novel role for the potent endogenousinotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 2003; 108: 1432–1439.
177. Katugampola SD, Davenport AP, Kuc RE, Maguire JJ. 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: 171-175.
178. 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: 233-240.
179. Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept* 2004; 118: 119-125.
180. Yamaoka K, Hirama M, Inoue M, Kondo C, Kinoshita E, Miyazaki K, Miyoshi H, Seyama I. Synthetic ciguatoxins selectively activate Nav1.8-derived chimeric sodium channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 7597-605.
181. Li F, Li L, Qin X, Pan W, Feng F, Chen F, Zhu B. Apelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation: the regulation of cyclin D1. *Front Biosci* 2008; 13: 3786-3792.
182. Liu C, Su T, Li F, Li L, Qin X, Pan W. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys* 2010; 42: 396-402.
183. Xie H, Tang SY, Cui RR, Huang J, Ren XH, Yuan LQ, Lu Y, Yang M, Zhou HD, Wu XP, Luo XH, Liao EY. Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regul Pept* 2006; 134: 118-125.
184. Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S. 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.

185. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 2003; 353: 1–4.
186. O'Shea M, Hansen MJ, Tatemoto K, Morris MJ. Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci* 2003; 6: 163–167.
187. Higuchi K, Chiba S, Gotoh K, Kakuma T, Katsuragi I, Masaki T. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 2007; 148: 2690-2697.
188. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne' C. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764-1771.
189. Castan-Laurell I, Vitkova M, Daviaud D, Dray C, Kova'cikova' M, Kovacova Z, Hejnova J, Stich V, Valet P. 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.
190. 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.
191. Castan-Laurell I, Vitkova M, Daviaud D, Dray C, Kova'cikova' M, Kovacova Z, 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.
192. Lambin S, Caluwaerts S, van Bree R, Vercruyssen L, Vergote I, Verhaeghe J. Adipose tissue in offspring of Lepr (db/+) mice: early-life environment genotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: 262-271.
193. Kunduzova O, Alet N, Delesque-Touchard N, Millet L, Castan-Laurell I, Muller C. Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J* 2008; 22: 4146–4153.
194. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Bule'on M, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8: 437–445.

195. Erdem G, Dogru T, Tasci I, Sonmez A, Tapan S. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116: 289–292.
196. Zhang Z, Yu B. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J* 2009; 122: 2360–2365.
197. Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang M, Yang H, Li K. 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.
198. Atluri P, Morine KJ, Liao GP. Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression. *Cell Mol Biol Lett* 2007; 12: 127–38.
199. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 2004; 110: 187–193.
200. Jia YX, Pan CS, Zhang J. Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Regul Pept* 2006; 133:147–154.
201. Ashley EA, Powers J, Chen M. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 73–82.
202. Szokodi I, Foldes G, Ilves M, Tavi P, Tokola H, Voutilainen-Myllyla S. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002; 91: 434-440.
203. Dai T, Ramirez-Correa G, Gao WD. Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur J Pharmacol* 2006; 553: 222–228.
204. Farkasfalvi K, Stagg MA, Coppen SR. Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 889–895.
205. Wang C, Du JF, Wu F, Wang HC. 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: 2540-2546.

206. 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: 171–175.
207. El Messari S, Iturrioz X, Fassot C, De Mota N, Roesch D, Llorens-Cortes C. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J Neurochem* 2004; 90: 1290-301.
208. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S. 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.
209. Iturrioz X, El Messari S, De Mota N, Fassot C, Alvear-Perez R, Maigret B, Llorens-Cortes C. Functional dissociation between apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2007; 100: 704-708.
210. Kagiya S, Fukuhara M, Matsumura K, Lin Y, Fujii K, Lida M. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul Pept* 2005; 125: 55-59.
211. Mitra A, Katovich MJ, Mecca A, Rowland NE. Effects of central and peripheral injections of apelin on fluid intake and cardiovascular parameters in rats. *Physiol Behav* 2006; 89: 221–225.
212. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001; 77: 1085-96.
213. 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: 1263-1276.
214. 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; 101:1-5.

215. Foldes GF, Horkay I, Szokodi O, Vuolteenaho M, Ilves KA. 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.
216. Kleinz MJ, Baxter GF. Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase. *Regul Pept* 2008; 146: 271-277.
217. Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, Lim SY, Wynne AM, Smith CC. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2007; 102: 518-528.
218. Zeng XJ, Zhang LK, Wang HX, Lu LQ, Ma LQ, Tang CS. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides* 2009; 30: 1144-1152.
219. Sheikh AY, Chun HJ, Glassford AJ, Kundu RK, Kutschka I, Ardigo D. 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: 88-98.
220. Chandrasekaran B, Dar O, McDonagh T. The role of apelin in cardiovascular function and heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008; 10: 725-732.
221. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 355-360.
222. Miettinen KH, Magga J, Vuolteenaho O, Vanninen EJ, Punnonen KR, Ylitalo K. Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy. *Regul Pept* 2007; 140: 178-184.
223. De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 2000; 72: 400-407.
224. Reaux A, Gallatz K, Llorens-Cortes C, Palkovits M. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 2002; 113: 653-662.

225. 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: 1046–1049.
226. Reaux-Le Goazigo A, Morinville A, Burlet A, Llorens-Cortes C, Beaudet A. Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2004; 145: 4392–4400.
227. 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.
228. Reaux-Le Goazigo A, Alvear-Perez R, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Llorens-Cortes C, Zizzari P. 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: 7-15.
229. Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L. 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.
230. Rucker J, Berson JF, Collman RG, Doms R, Doranz BJ, et al. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 1997; 71: 8999-9007.
231. Edinger AL, Choe W, Faulds D, Hoffman TL, Kolson DL, Lee B, et al. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for foldes ghuman immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1998; 72: 7934–7940.
232. Zhang Y, Barklis E, Love Z, Qian H. Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol* 1998; 72: 17829.
233. Cayabyab M, Hinuma S, Farzan M, Choe H, Fukusumi S, Kitada C, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 2000; 74: 972-976.

234. Min-Xu Z, Hui-Yu L, Yuji H, Kazuhiko T. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *Maebashi* 2000; 371-851.
235. Puffer BA, Baribaud F, Coughlan CM, David J, Doms RW, Horuk R, et al. Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology* 2000; 276: 435-444.
236. Horiuchi Y, Fujii T, Kamimura Y, Kawashima K. The endogenous, immunologically active peptide apelin inhibits lymphocytic cholinergic activity during immunological responses. *J Neuroimmunol* 2003; 144: 46–52.
237. Susaki E, Wang G, Cao G, Wang HQ, Englander EW, Greeley GH. Apelin cells in the rat stomach. *Regul Pept* 2005; 129: 37–41.
238. Wang G, Kundu R, Han S, Qi X, Englander EW, Quertermous T, Greeley GH. Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul Pept* 2009; 158: 32–39.
239. Lambrecht NW, Yakubov I, Zer C, Sachs G. Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion. *Physiol Genomics* 2006; 25: 153–165.
240. Goetze JP, Rehfeld JF, Carlsen J. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease. *Regul Pept* 2006; 133: 134-138.
241. Andersen CU, Markvardsen LH, Hilberg O, Simonsen U. Pulmonary apelin levels and effects in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Respiratory Medicine* 2009; 103: 1663-1671.
242. Llorens-Cortès C, Beaudet A. Apelin, a neuropeptide that counteracts vasopressin secretion. *Med Sci* 2005; 21: 741-746.
243. Xie H, Yuan LQ, Luo XH, Huang J, Cui RR, Guo LJ, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis* 2007; 12: 247-254.
244. Schilffarth S, Antoni B, Schams D, Meyer HH, Berisha B. The expression of apelin and its receptor APJ during different physiological stages in the bovine ovary. *Int J Biol Sci* 2009; 5: 344-350.

245. Shimizu T, Kosaka N, Murayama C, Tetsuka M, Miyamoto A. 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: 28-37
246. Shirasuna K, Shimizu T, Sayama K, Asahi T, Sasaki M, Berisha B, et al Expression and localization of apelin and its receptor APJ in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F2 $\alpha$ -induced luteolysis. *Reproduction* 2008; 135: 519-525.
247. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 395-400.
248. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1991; 145: 201-227.
249. Cobellis L, De Falco M, Mastrogiacomo A, Giraldi D, Dattilo D, Scaffa C. Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Histol Histopathol* 2007; 22: 1-8.
250. Liao YM, Qiao FY, *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. Expression of Apelin in placentas of patients with hypertensive disorders complicating pregnancy. *Jun* 2007; 42: 382-385.
251. Van Mieghem T, Van Bree R, Van Herck E, Pijnenborg R, Deprest J, Verhaeghe J. Maternal Apelin Physiology during Rat Pregnancy: The Role of the Placenta. *Placenta* 2010; 31: 725-730.
252. Malamitsi-Puchner A, Gourgiotis D, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, Briana DD. Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term. *Acta Paediatr* 2007; 96: 1751-1754.
253. Habata Y, Fujii R, Fujino M, Fukusumi S, Hinuma S, Hosoya M, Kawamata Y, Kitada C, Kurokawa T, Murosaki S, Nishizawa N, Onda H, Tatemoto K. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys* 1999; Act 1452: 25-35.

254. De Falco M, Artigiano F, Cavallotti I, De Luca A, De Luca B, De Luca L, et al. Apelin expression in normal human tissues. *In Vivo* 2002; 16: 333–336.
255. Kawamata Y, Tokuji S, Yorimitsu H, Osuka A. Palladium-catalyzed  $\beta$ -selective direct arylation of porphyrins. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 38: 8867-8870.
256. Bai B, Tang J, Liu H, Chen J, Li Y, Song W. 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: 311-318.
257. Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 539-545.
258. Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, Knibiehler B, Audigier Y. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev* 2002; 110: 183-186.
259. 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: 235-246.
260. Sorli SC, Audigier Y, Knibiehler B, Masri B, Van den Berghe L Therapeutic potential of interfering with apelin signalling. *Drug Discov Today* 2006; 11: 1100-1106.
261. 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.
262. Adebisi A, Adaikan PG, Prasad RN. Effect of benzyl isothiocyanate on spontaneous and induced force of rat uterine contraction. *Pharmacol Res* 2004; 49: 415-422.
263. Shmigol AV, Eisner D, Wray S. Simultaneous measurements of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in rat uterine smooth muscle cells. *J Physiol* 2001; 531:707.
264. Cook JL, Zaragoza DB, Sung DH, Olson DM. Expression of myometrial activation and stimulation genes in a mouse model of preterm labour: Myometrial activation, stimulation, and preterm labour. *Endocrinol* 2000; 141: 1718–1728.

265. Telejko B, Kuzmicki M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Szamatowicz J, Nikolajuk A, Zonenberg A, et al. Plasma apelin levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 176-183.
266. Kourtis A, Gkiomisi A, Mouzaki M, Makedou K, Anastasilakis AD, Toulis KA, et, al. Apelin levels in normal pregnancy. *Clin Endocrinol Ox.* 2011; 3: 367-371
267. Sculcove J, Choe W, Albright A, Jaffer S, Hesselgesser J, Lavi E, et, al. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol* 2000; 1: 61-69.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2001 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yükseköğrenimime başladım ve 2007 yılında bu fakülteden mezun oldum. Aynı yıl Bingöl Kaleönü Sağlık Ocağı'na hekim olarak atandım. Burada 2 yıl görev yaptım. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.