T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

# PROJE BAŞLIĞI

Pulmoner yüksek tansiyon hastalığının patolojisinde hiyalüronan molekülünün rolünü hayvan modeli üzerinde incelenmesi

**Proje No**: TDA-2013-4370

Proje Türü: Dış Kaynaklı Projeler İçin Acil İhtiyaç Projesi

## SONUÇ RAPORU

**Proje Yürütücüsü:**
Adı Soyadı: **Doç. Dr. Metin AYTEKİN**
Birimi/Bölümü: Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D.

Araştırmacıların Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

**Doç. Dr. Nihat KALAY**, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji A.D
**Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR**, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D
**Prof. Dr. Halit CANATAN**, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D

Aralık 2014
KAYSERİ

**Teşekkür:** Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel ve Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından TDA-2013-4370 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Bize bu imkanı sunan Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü ve BAP birimine teşekkür ederiz.

Sunulan proje şuan itibariyle bir sözlü sunuma dönüştürülmüştür.

**İÇİNDEKİLER**


| | Sayfa No |
|---|---|
| ÖZET | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM | 7 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 8 |
| 4. BULGULAR | 11 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 20 |
| 6. KAYNAKLAR | 21 |

# ÖZET:


İdiyopatik Pulmoner Arteriyal Hipertansiyon (IPAH) kardiyopulmoner fonksiyonlarda bozulmaya sebep olun, sağ ventriküler yetersizlikten dolayı erken ölüm ile sonuçlanan progresif bir hastalıktır. IPAH'un patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Hastalığın patobiyolojik özellikleri arasında anormal hücre proliferasyonu, inflamasyon ve vasküler yenilenme vardır.

Hücreler Arası Matriks (HAM) hücre proliferasyonu ve migrasyonunda önemli rolleri olduğu biliniyor. Hiyalüronan (HA) HAM'in temel komponentlerinden birisi olan bir glikosaminogilikan'dır. HA, hiyalüronan sentaz enzimleri (HAS) tarafından üretilirken hiyalüronidaz (Hyal) enzimleri tarafından degrade edilen büyük bir polisakkarittir. Bilinen üç farklı HAS (HAS1, HAS2 ve HAS3) ve iki farklı Hyal (Hyal1, Hayl2) enzimi akciğerde eksprese edilir. HA akciğer hasarlarında, inflamasyon ve yeniden yapılanmaya cevap vermede kritik roller oynadığı bilinmektedir. Düz kas hücreleri (DKH) zararlı maddeler ile uyarılması veya endoplazmik retikulum stresi nedeniyle HA ve HA kablolarını üretirler. İdiyopatik PAH'lu (IPAH) hastalardan elde edilen pulmoner arter düz kas hücreler (PADKH)'nin devamlı olarak yüksek seviyelerde HA ürettiklerini ve IPAH hastalarının normal bireylere göre kanlarında yüksek seviyelerde HA bulunduğu daha önceki çalışmalarında proje ekibi tarafından gösterilmiştir. Aynı zamanda, HA miktarlarındaki, modifikasyonundaki ve fragmentasyonlarındaki anormalliklerin anormal DKH proliferasyon, inflamasyon ve vasküler yenilenmeye neden olduğuna dair çalışmalarımız da bulunmaktadır. Projemizde sunduğumuz monokrotalin pulmoner yüksek tansiyon deneysel hayvan modellerindeki ön çalışma verilerimiz anormal HA miktarlarını göstermekte. Buna göre, hipotez olarak HA miktarındaki, modifikasyonundaki ve fragmentasyonundaki anormalliklerin PAH'daki anormal DKH proliferasyonu, inflamasyon ve vasküler yenilenmeye sebep olan önemli bir düzenleyici olduğunu düşünmekteyiz.

IPAH'lu insanlardaki HA hakkındaki yayınlanmış verilerimiz ve PAH hayvan modellilerindeki HA üretimi hakkındaki primer gözlemlerimiz temel alınarak hazırlanan "**Pulmoner yüksek tansiyon hastalığının patolojisinde hiyalüronan molekülünün rolünü hayvan modeli üzerinde incelenmesi**" başlıklı projenin deneysel merkezini PAH hayvan modelindeki pulmoner vaskülerdeki hiyalüronan sentez, modifikasyon ve fragmantasyon oluşturmakla birlikte HA üretimindeki artışın mekanizmasının incelenmesi ve PADKH proliferasyon, inflamasyon ve vasküler yenilenme HA'nın regüle eden rollerini PAH deneysel hayvan modelinde değerlendirmek proje amaçları arasında yer almaktadır.

Bunu yapmak için 2 yol ile yaklaşım sergiledik. Birinci yaklaşımda PAH deneysel hayvan modeli oluşturma. Monokrotolin PAH modelindeki rat akciğerleri PAH için karekteristik olan pleksogenik lezyonları oluşturmuyorlar. Bu sebeple İnsan PAH akciğerlerine daha çok benzeyen ratlarda PAH hiopksi Sugen-5416 deneysel hayvan modelini kullanmayı hedefliyoruz. ***Projenin birinci amacı PAH hipoksi Sugen-5416 rat modeli oluşturmak ve plazma HA seviyelerini belirlemesidir***. ***Projenin ikinci yaklaşımında ise PAH'daki yüksek HA seviyesinin kaynağı ve hastalığın farklı evrelerindeki mekanizmasını incelemek olacak ve buna göre PAH hayvan modelinde HA seviyelerinin hücresel kaynaklarının ve mekanizmasının belirlenecek***.

PAH deneysel hayvan modelinden ve kontrol ratlardan elde edeceğimiz akciğer dokularından PADKH, pulmoner arter endotel hücresi (PAEH) ve bronkiyal düz kas hücreleri (BRDKH) izole edilerek bu hücrelerdeki HA seviyeleri belirlenecek. PAH'deki yüksek seviyelerde HA üretilmesinin mekanizmasını anlamak için PAH rat modeli olan hayvanları kontroller ile karşılaştırarak bu hayvanlardan elde edilecek PADKH, PAEH, BRDKH'lerinde HAS1, HAS2 ve HAS3, aynı zamanda Hyal1 ve Hyal2 mRNA ve protein ekspresyonları değerlendirilecek. Bununla birlikte, PAH'lu rat ve kontrollerden elde edilecek akciğerlerden diğer PAEH, BRDKH ve PADKH'lerindeki HA üretim miktarları karşılaştırılarak spontane olarak bu hastalıkta üretilen HA'nın kaynağının PADKH'leri için özgün olup olmadığı belirlenecek. Yine ikinci amacımızın alt amacı olarak PAH hastalığının erken evrelerindeki hücreler arası matriksin incelenmesi yer alacak. Literatürdeki insan akciğer dokusu üzerinde yapılmış olan çalışmalarda insan akciğeri ya hasta öldükten sonra yada hastalığın son evresi transplantasyon dan sonra elde edildiği için bu çalışmalar hastalığın erken evreleri hakkında bir bilgi vermiyor. PAH hastalığı ve HA üretimi arasındaki ilişkiyi anlamak için PAH'lu hayvanlar üzerinde bu hastalığın farklı evrelerinde HA ölçümleri yapılarak hastalığın gelişmesindeki rolü belirlenmeye çalışılacak. Bu amaçlar için 2 grup rat çalışılacak, normoksi ve Sugen-5416'lı hipoksi. Hastalığın farklı erken ve şiddetli evrelerini çalışmak için 3.5, 6, 8, ve 12. haftalarda dokular elde edilecek. Hastalığın erken dönemlerinde HAM komponentlerinin durumu ve hastalığın gelişmesindeki rolü hakkında bize bilgi verecek.

PAH hastalığının patogenezlerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmaları bulunan proje yürütücüsü ve ekibi projede belirtilen konularda yetkin olup yeterli bilgi ve beceri birikimine sahiptirler. Bu projeden elde edilen verilerin önemli dergilerde yayımlanabilmesi, dünyadaki diğer araştırmacılarında kullanabileceği sonuçlar üretmesine olanak sağlayacaktır. Ülkemizde PAH hayvan modeli oluşturmak bir ilk olacağı gibi yine projede çalışacak ekiple birlikte ülkemiz PAH patobiyolojisini aydınlatma adına yüksek lisans öğrencileri eğitilerek araştırma yapacak insan gücüne ve alt yapısına katkı sağlanmış olacaktır.

## ABSTRACT:

Idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) is a progressive disease that leads to deterioration in cardiopulmonary function and premature death from right ventricular failure. The pathogenesis of IPAH is poorly understood. The pathobiologic features of the disease are aberrant cell proliferation, inflammation and vascular remodeling. Extracellular matrices (ECMs) serve an important role in cell proliferation and migration. A major component of most ECMs is the glycosaminoglycan hyaluronan (HA). The HA is a large polysaccharide produced by hyaluronan synthases (HASs) and degraded by hyaluronidases (Hyals). All three known HASs (HAS1, HAS2, and HAS3) and the two known Hyals (Hyal1 and Hyal2) are expressed in the lungs. HA is known to play critical roles in lung injury response, inflammation, and remodeling. Smooth muscle cells (SMCs) can produce HA cables upon stimulation with a noxious agent or due to endoplasmic reticulum stress. We have recently reported the novel finding that PASMCs from IPAH lungs spontaneously produce high levels of HA, and IPAH patients have higher than normal levels of circulating HA in their blood. We also have evidence that abnormalities in HA levels, modification, and fragmentation give rise to abnormal SMC proliferation, inflammation, and vascular remodeling. We now also have preliminary data suggesting similar deregulation of HA in several animal models of PAH. We hypothesize that abnormalities in HA levels, modification, and fragmentation result in major regulatory switches causing abnormal SMC proliferation, inflammation, and vascular remodeling in IPAH.

Based on our published data on HA in human IPAH and our preliminary observations about HA in animal models of PAH, the experimental focus of this proposal, titled "I**nvestigations of the role of hyaluronan in the pathology of pulmonary artery hypertension in an animal model**", is the synthesis, modification, and fragmentation of hyaluronan in the pulmonary vasculature and the investigation of the mechanisms behind increased HA production. We also aim to investigate the regulatory role of HA on PASMC proliferation, inflammation, and remodeling in PAH animal model.

Two approaches were designed to assess our study's aims. The first approach is to establish an experimental PAH animal model. The PAH monocrotaline rat model does not develop plexogenic lesions, which are characteristic of PAH. Therefore, we plan to establish the hypoxia Sugan-5416 rat model, which is much more similar to the human IPAH lung. Our first goal is to establish the PAH hypoxia Sugen-5416 rat model and determine the levels of HA. The second approach is to determine the cellular source(s) and mechanism(s) of HA production during different stages of the disease in an established PAH animal model. The primary PASMCs, pulmonary artery endothelial cells (PAECs), and pulmonary bronchial smooth muscle cells (BrSMCs) will be isolated from the lungs of PAH animals and controls. HA levels in these cells will be measured to determine whether the increased HA production is unique to PASMCs. mRNA levels and protein expression levels of HASs (HAS1, HAS2 and HAS3) and Hyals (Hyal1 and Hyal2) will be determined in PASMCs, PAECs, and BrSMCs obtained from PAH rats and controls to understand the mechanism behind the high levels of HA during PAH. The sub aim of the second approach is to evaluate the HA components present in the early stage of PAH. In studies of the human lungs in the literature, the human lungs were obtained either after transplantation or after the patient's death; therefore, these studies do not provide any information about the early stage of the disease. In our study, HA measurements will be performed on the PAH animals during different stages of the disease to better understand the role of HA in the disease's development. Two groups of rats will be studied, normoxic and hypoxic SU-5416 rats. Tissues will be obtained at different stages of PAH (3.5, 6, 8, and 12 weeks) in order to study mild, as well as, more severe forms of the disease. These experiments will provide information on the development of the disease and the situations of levels ECMs components during the early disease stage.

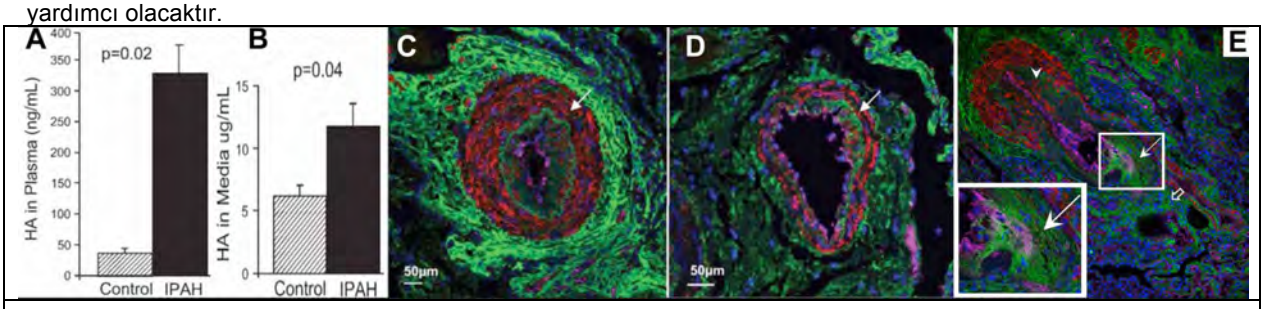
The principal investigator of the project, who had performed previous studies on PAH, and the rest of the team have sufficient knowledge and ability to achieve the aims mentioned in this proposal. The data obtained from the project could be published in a high impact journal and will provide information which could be used to produce results in other investigations around the world. This will be the first study to establish a PAH animal model in our country, and the project will contribute to the education of young scientist on the pathobiology of PAH.

# GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

İdiyopatik pulmoner arter hipertansiyon (IPAH) kardiyo pulmoner fonksiyonlarda bozulmaya sebep olup sağ ventriküler yetersizlikten dolayı erken ölüm ile sonuçlanan progresif bir hastalıktır. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de hem morbiliteye hem de mortaliteye sebep olmaktadır. IPAH'un patogenezleri hakkında literatürdeki bilgiler çok yetersizdir. Hastalığın patobiyolojik özellikleri arasına anormal hücre proliferasyonu, inflamasyon ve vasküler yenilenme vardır. Hastalığın tedavisi için bazı ilaçlar geliştirilmeye çalışılsa bile hiç birisi hastalığı tedavi edemiyor fakat sadece yaşam süresini bir miktar uzatmayı sağlıyor. Akciğer nakli bu hastaların kaçınılmaz sonu olmakla beraber ülkemizde akciğer nakli gerçekleşmediği için PAH'lu hastaların çoğunluğu bu imkandan da yararlanamayıp hastalık kısa sürede ölümle sonuçlanıyor. Bu sebeple hastalığın patogenizi aydınlatacak yeni yaklaşımlara ve yeni tedavi metotlarına gereksinim vardır. Çalışmamızdaki dizayn edilen amaçlarımız bu yönüyle hastalığın patobiyolojisine yeni bir yaklaşım getirecektir.

Hücreler Arası Matriks (HAM) hücre proliferasyonu ve migrasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca akciğer hastalıklarında HAM komponentlerinin farklı görevleri olduğuna dair bir çok çalışma mevcuttur. HAM'in temel komponentlerinden birisi glikosaminogilikan olan hiyalüronan (HA) molekülüdür. HA, hiyalüronan sentaz (HAS) enzimleri tarafından üretilirken hiyalüronidaz (Hyal) enzimleri tarafından yıkıma uğratılır. Bilinen üç farklı HAS ve iki farklı Hyal enzimi akciğerde ekspres edilir. HA akciğer hasarlarında, inflamasyon ve yeniden yapılanmaya cevap vermede kritik roller oynadığı bilinmektedir. Düz kas hücreleri (DKH) zararlı maddeler ile uyarılması veya endoplazmik retikulum stresi nedeniyle HA ve HA kablolarını üretirler. Bizler yeni bir bilgi olarak IPAH'lu hastalardan elde edilen pulmoner arter düz kas hücrelerinin (PADKH) devamlı olarak yüksek seviyelerde HA ürettiklerini ve IPAH hastalarının normal bireylere göre kanlarında yüksek seviyelerde HA bulunduğunu rapor ettik (Şekil 2). Aynı zamanda, HA miktarlarındaki, modifikasyonundaki ve fragmentasyonlarındaki anormalliklerin anormal DKH proliferansyon, inflamasyon ve vasküler yenilenmeye neden olduğuna dair verilerimiz mevcut.

Çalışmamızdaki amaçlarımızda bu yönüyle yeni bir yaklaşımla elde edilecek sonuçlar PAH patobiyolojisindeki akciğer mikro çevresi ve matriksin önemli rollerine ışık tutacak ve tedavi için potansiyel hedeflerin belirlenmesine yardımcı olacaktır.



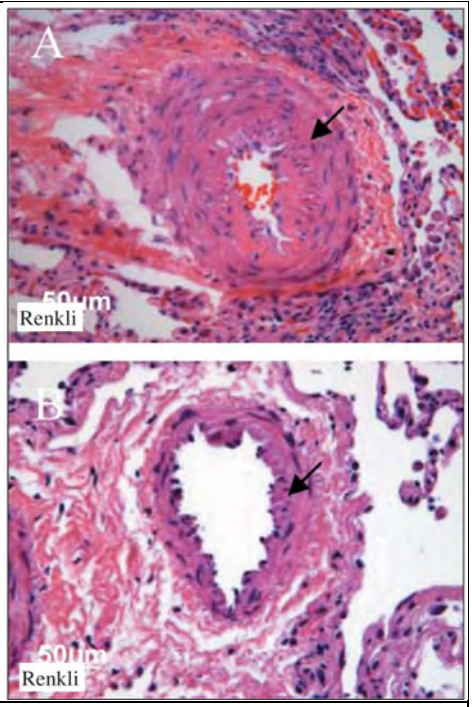

**Şekil 2: IPAH'de artan hiyalüronan seviyeleri.** IPAH hastalarındaki plazma HA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı miktarda artış gösterir (A) ve IPAH PADKH süpernatantları da kontrollere göre daha fazla miktarda HA bulunuyor (B). Transplant sonrası elde edilen insan akciğeri IPAH arteriolleri etrafında (C) kontrollere (D) göre çok daha yoğun HA birikmesi gösteriyor. En yoğun HA boyaması ise pleksogenik lezyonda bulunuyor (E, ok işareti). DKH'leri kırmızı, endotel hücreler menekşe, hiyalüronan yeşil ve hücre çekirdekleri mavi renge boyanmıştır (1).

IPAH'lu insanlardaki HA hakkındaki yayınlanmış verilerimiz ve PAH hayvan modellilerindeki HA hakkındaki primer gözlemlerimiz temel alınarak bu projemizin deneysel odağı PAH hayvan modelindeki pulmoner vasküler deki hiyalüronan sentezi, modifikasyonu ve fragmentasyonu hakkında bilgi verecektir. Spesifik amaçlar HA üretimindeki artışın mekanizmasını ve PADKH, PAEH proliferasyonu, inflamasyon ve vasküler yenilenme üzerinde HA'nın regüle eden rollerini PAH hayvan modelinde değerlendirmek için tasarlanmıştır. Bu sayede elimizde hiç bilgi olmayan hastalığın erken evrelerindeki matriks durumu hakkında da veri sahibi olacağız.

Bunu yapmak için 2 yol ile yaklaşım sergiledik. Birinci yaklaşımda insan PAH hastalığına en yakın model olan PAH hipoksi-Sugen-5416 hayvan modelini oluşturmak ve bu modelde HA üretimini belirlemek. İkincisi ise üretilen bu HA'nın mekanizması, hücresel kaynağı ve seviyeleri belirlenecek. Bu amaçlar için 2 grup rat çalışılacak, 1) normoksi ve 2) Sugen-5416'lı hipoksi. Hastalığın farklı evreleri ve şiddetli evresini çalışmak için 3.5, 6, 8, ve 12. haftalarda dokular elde edilecek.

Yukarıdaki belirttiğimiz konu ve amaçlarla hiyalüronan molekülünün PAH hastalığının oluşmasında ve ilerlemesinde nasıl bir rol aldığını yine PAH hayvan modeli üzerinde çalışılması araştırmanın kapsamını oluşturacaktır.

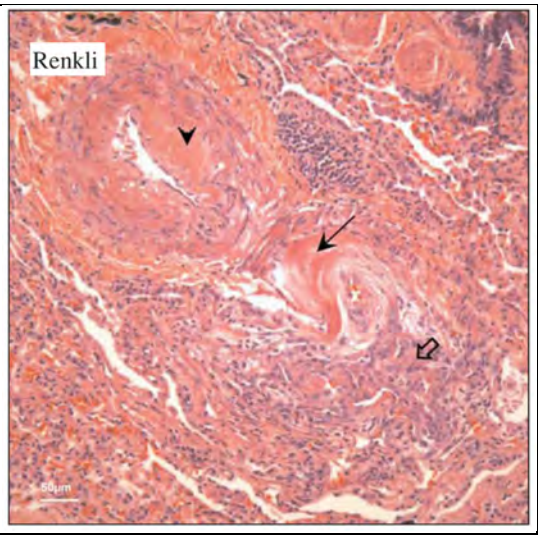
## GENEL BİLGİLER




**Şekil 3:** A idiyopatik PAH'lı hasta, B ise sağlıklı kontrol. HE boyaması kontrolün arteri ile karşılaştırıldığında (Resim B'deki ok işareti) idiyopatik PAH'lı arterde (Resim A'daki ok işareti) düz kas hücrelerinde hipertrofi ve hiperplaziye neden olduğu görülmektedir (1).

**Problemin önemi:** İdiopatik pulmoner arteriyal hipertansiyon (IPAH) kardiyo pulmoner fonksiyonlarda bozulmaya sebep olup sağ ventriküler yetersizlikten dolayı erken ölüm ile sonuçlanan progresif bir hastalıktır (2-5). Akciğer prekılcal arterlerindeki kas, endotelyal ve fibroblast hipertrofisi ve aynı zamanda hücre dışı matriksindeki artış ile karakterize edilir (şekil 3) Daha ileri safhalarında pleksojenik oluşumlar ve tromboz ortaya çıkar (şekil 4) (6, 7). IPAH ortalama pulmoner arter basıncının 25 mmHg'dan daha yüksek olması ile tanımlanır (3, 8, 9). Bazı süreçlerin IPAH akciğerlerin görülen pulmoner arter daralması, genetik predispozisyon, vazokontraksiyon, hücresel proliferasyon, in situ trombozis, inflamasyon, ve karakteristik pleksogenik lezyonlar için vasküler yenilenmesine sebep olduğuna inanılıyor (4, 10-13). Anormal pulmoner arter düz kas hücre (PADKH) proliferasyonu IPAH hastalığının patolojisinde majör bir role sahiptir fakat IPAH PADKH'lerindeki bu proliferasyonu tetikleyen sebeplerin mekanizması hala bilinmemektedir. Hücreler arası matriks (HAM) hücre proliferasyonu ve migrasyonununda önemli rollere sahiptirler ve matriks komponentleri arasındaki bütünlük ve denge akciğerdeki hasarlara karşı cevapta ve normal akciğer fonksiyonunda temel teşkil eder. Artan HAM devir daimi doku hasarlarının belirtecidir. Astım, anfizem, pulmoner fibrozis ve IPAH gibi farklı akciğer hastalıkları anormal HAM'in devir daimi ile ilişkilidirler (12).

**Sınıflandırılması:** Pulmoner hipertansiyonun etyolojisinde akciğer, kalp ve sistemik kökenli farklı hastalıklar ya da nedeni belli olmayan sebepler etkili olabilmektedir. 2003 yılında İtalya'nın Venedik şehrinde yapılan kongrede alınan kararla bir sınıflandırma yapılmıştır (14). Bu yapılan sınıflandırmaya göre pulmoner hipertansiyon beş gruba ayrılır: Grup 1; PAH, grup 2; pulmoner ven hipertansiyonu, grup 3; akciğer hastalıkları veya hipoksemi ile ilişkili olan pulmoner hipertansiyon, grup 4; kronik trombotik veya embolik hastalıklardan kaynaklanan pulmoner hipertansiyon, grup 5; muhtelif çeşitli hastalıklardan kaynaklananlar (Tablo 1) (15).




**Şekil 4:** PAH'lı insan akciğerinde yapılan HE boyaması plekzogenik lezyonun tipik bir örneğini gösteriyor (ok başı). Çevresinde yarık şeklinde vasküler bir yer açan elastik arteryel segmentleri (beyaz ok) ve aynı zamanda yeni kollajen oluşumu göze çarpıyor (siyah ok) (1).

**Epidemiyolojisi:** Pulmoner hipertansiyon çok nadir görülen bir hastalıktır. Endüstriyelleşmiş ülkelerde milyonda 1-2 olguya rastlanılabileceği tahmin edilmektedir (16, 17). Pulmoner hipertansiyon hastalığının ortalama hayatta kalma süresi 2.8 yıl olarak belirlenmiş ve ortalama 36.4 yaşlarında görülen PAH'ın 1.7/1.0 oranında kadınlarda daha sıklıkla görüldüğü saptanmıştır (16). Bu genel dağılımın ırklara göre de değişmediği görülmüştür (16, 18). Fransa'da yapılan bir çalışmada 674 pulmoner yüksek tansiyon tanısı konulmuş hasta bir yıl süre zarfı için takibe alındığında; bu hastaların %19'unun yaş ortalaması 52 olan idiyopatik pulmoner hipertansiyona sahip oldukları belirlenmiştir (18). Bu hastalığın vazokonstrüksiyon, hücre çoğalması, in situ tromboz, inflamasyon, vasküler yenilenme ve akciğer matriksindeki anormalliklere bağlı olarak ilerleyici bir şekilde akciğer arterlerinin daralmasıyla gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Şekil 3) (4, 11, 12).

**Pulmoner arteryel hipertansiyon genleri:**
İlk kez 1954 yılında familyal pulmoner arteryel hipertansiyon (FPAH) Dresdale tarafından tanımlandı. İnsidansı düşük olan bu hastalığın bazı bilim insanlarınca düşük penetransından kaynaklandığı düşünülüyordu (19). 1997 yılında araştırmacılar familyal primer pulmoner hipertansiyon için bir geni kromozom 2q31-32 lokasyonunda buldular (20, 21). Ardından kemik morfogenetik proteinleri reseptörünü [Bone (kemik) morfogenetik protein reseptörü tip 2 (BMPR2)] şifreleyen gendeki bulunan mutasyonlar, genetik PAH'ın ana sebebi olarak tanımlandı (22). Bu mutasyonlar ayrıca FPAH'lı hastaların %70'inde, sporadik olan idiyopatik PAH'lı hastaların %26'sında ve fenfluramin kullanımı ile ilişkili PAH'lı hastaların %9'unda tespit edilmiştir (22-24). Apopitoz ve

proliferasyon ile ilişkili olan BMPR2, TGF-β ailesinin bir üyesidir (24, 25). Fakat halen BMPR2 sinyalindeki azalmanın nasıl PAH'a sebep olduğu tam olarak aydınlatılmış değildir.

**Tablo 1. İtalya'nın Venedik şehrinde 2003 yılında yapılan kongrede alınan karar ile pulmoner hipertansiyonun Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırması*.**

| Sınıflandırma |
|---|
| **Grup 1. Pulmoner arteryel hipertansiyon (PAH)** |
| • İdiyopatik PAH |
| • Ailesel/familyal PAH |
| • İlişkili/associated PAH |
| - Bağ doku hastalığı |
| - Konjenital sistemik |
| - Portal hipertansiyon |
| - HIV infeksiyonu |
| - İlaç ve toksinler |
| - Diğer (tiroid bozuklukları, glukojen depolama hastalığı, Gaucher hastalığı, kalıtsal hemorajik telanjiektazi, hemoglobinopatiler, miyeloproliferatif bozukluklar, splenektomi) |
| • Önemli ven ve kapiller bağlanması ile alakalı |
| - Pulmoner veno-oklüziv hastalığı |
| - Pulmoner kapiller hemanjiyomatozis |
| • Yenidoğanların persistan pulmoner hipertansiyonu |
| **Grup 2. Sol kalp rahatsızlığı ile ilgili PH** |
| • Sol arteryel ve ventriküler kalp hastalığı |
| • Sol valvüler kalp hastalığı |
| **Grup 3. Akciğer hastalıkları ve hipoksi ile ilişkili PAH** |
| • Kronik obstrüktif pulmoner hastalık |
| • İnterstisyel akciğer hastalığı |
| • Uyku ve teneffüs bozukluğu |
| • Alveoler hipoventilasyon bozukluğu |
| • Kronik yüksekliğe maruz |
| • Gelişimsel bozukluklar |
| **Grup 4. Kronik tromboembolik ve/veya embolik hastalıklarla ilişkili PAH** |
| • Proksimal pulmoner arteylerin tromboembolik obstrüksiyonu |
| • Distal pulmoner arterlerin tromboembolik obstrüksiyonu |
| • Tromboembolik olmayan pulmoner embolizm (tümör, parazitler, yabancı maddeler kaynaklı) |
| **Grup 5. Muhtelif** |
| • Sarkoidoz, histiyosikloz X, lenfanjiyomatöz, pulmoner damarların kompresyonu (adenopatik tümör, fibroz mediastiniz) |

* 13 nci'lu kaynaktan alınmıştır.
HIV: İnsan immünyetmezlik virüsü.

(26)

**Pulmoner arteryel hipertansiyon tanisinda kullanilan belirteçler:**
Kan testleri PAH'lı hastalarda tarama ve tedavi süresince kontrollerde kullanılmaktadır. Bu parametrelerin PAH'lı hastaların plazma ve serumlarında yüksek olanlarından bazıları; endotelin-1, nitrik oksit, cGMP, serotonin, D-dimer, willebrand faktör, prostasiklin, natriüretik peptid (BNP), atriyal natriüretik peptid, ürik asit ve troponin T'dir (5, 27-36). PAH'lı hastaların akciğer arter duvarlarında endotelin- 1'in aşırı eksprese edilmesi bu hastalıktaki en önemli anormalliklerden biridir. Yirmi bir aminoasitli endotelin-1 peptidi vazokonstrüksiyona sebep olmakta ve bu proteinin bağlandığı reseptörlere bağlanabilen sentetik antagonistlerin hastalığın iyileşmesinde rolü olduğu bildirilmektedir (29, 37, 38). Pulmoner arterlerdeki ekspresyonun yanında kan dolaşımında da endotelin-1 seviyeleri, PAH'lı hastalarda yüksek bulunmuştur (4). Dolaşımda bulunan endotelin-1'in hastalık şiddeti ve prognozu ile korelasyon içinde olduğu belirlenmiştir (4, 29). Endotelin-1 fizyolojik ve patolojik etkilerini daha çok vasküler düz kas hücrelerinde bulunan ETA ve endotel hücrelerinde ve ayrıca vasküler kas hücrelerinde g.rünen ETB reseptörleriyle düzenler (39). Yukarıda da bahsettiğimiz gibi nitrik oksit, PAH hastalığında önemli role sahiptir. Gerek hastaların kan dolaşımlarında gerekse dışarıya verdikleri havada nitrik oksit seviyelerinin kontrollere göre çok düşük olduğu tespit edilmiştir (5, 39). Endotel hücrelerinden eNOS enzimi sayesinde üretilen nitrik oksit, düz kas hücrelerinde cGMP oluşmasını sağlar ve cGMP de kas hücrelerini gevşetir. Dolayısıyla düşük plazma nitrik oksit seviyesi hem endotel hücrelerine ait bozukluklarda, hem de PAH hastalığı için önemli bir belirteçtir. Trombositlerde saklanan ve endotellerde itrah edilen serotoninin plazmada aktif bir şekilde tespit edilmesi ya trombosit aktivasyonunun ya da endotel klerensinin bozukluğunun bir belirtecidir ((40). Diğer belirteçlerden de bahsedilirse; BNP'nin çeşitli PAH'larda yükseldiği belirlenmiştir (41-43). Bunun yanında kalp kası hücrelerindeki hasarlar için spesifik bir belirteç olan troponin de sağ veya sol karıncık hasarlarında yükseldiği bildirilmiştir (36). Pulmoner akciğer hastalığı için hem tanı hem de tedavi sürecinde hastalık hakkında bilgi sağlamamızı sağlayacak potansiyel belirteçlerin bulunması için çalışmalar sürerken yakın zamanda hiyalüronan molekülünün de PAH'ın patolojisinde önemli bir role sahip olabileceği tahmin edilmektedir.

**Hiyalüronan:** İnsan vücudu için hem yapısal hem de fizyolojik olarak birçok fonksiyona sahip olan hiyalüronan ilk defa 1934 yılında tanımlanmıştır. Hiyalüronan hücre dışı matriksin ana bileşenlerinden glukozaminoglikanların bir alt sınıfıdır. Üç adet izoformu bulunan hiyalüronidize sentaz enzimleri (HAS1, HAS2, HAS3) tarafından sentez edilen hiyalüronan, hiyalürodaz enzimi tarafından katabolize edilir (44). Hiyalüronanın farklı molekül ağırlıklarının farklı görevlerde yer aldığı tahmin edilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı hiyalüronanın çeşitli sitogenleri stimüle ettiği; yüksek moleküle sahip olanların ise tam tersi bir şekilde antiinflamasyon etkisine sahip olduğu ve doku onarımına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (45-49). Yüksek molekül ağırlıklı hiyalüronanın HAS1 ve HAS2 enzimleri; düşük molekül ağırlıkta olanın ise HAS3 enzimi tarafından sentez edildiği bilinmektedir (44).
Son zamanlarda hiyalüronan molekülü üzerine yapılan çalışmalar, önceleri sanıldığı gibi sadece basit bir hücre dışı matriks bileşeni olmadığını; aynı zamanda birçok hastalığın patolojisinde rolü olabileceğini göstermiştir. Hiyalüronan ve fragmentlerinin birçok hücre içi reaksiyonu ve fizyolojik olayı etkilediği belirlenmiştir (50). Bunlar arasında hücre göçü ile proliferasyonu, inflamasyona yanıt ve anjiyogenez gibi organizma için gerekli birçok olay bulunmakta ve hiyalüronanın insan vücudunda çok önemli rolü olduğu düşünülmektedir (51).
Akciğerdeki astım, amfizem, pulmoner fibrozis gibi hastalıklarda hasarlanma sonrasında hiyalüronanın da bileşeni olduğu ekstraselüler matriks miktarının artması, hiyalüronanın bu hastalıkların patolojisinde önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir (52). Araştırma grubumuzun yayınlaığı bir çalışmada idiyopatik PAH'lı hastaların plazma hiyalüronan seviyelerinin kontrol grubuna göre çok yüksek olduğu tespit edildi (1). Aynı bilgiyi destekler mahiyette başka bir grup da hiyalüronan artışını gösterdi (53). Bu iki çalışmada elde edilen sonuçlar hiyalüronan miktarının PAH'lı hastalarda önemli miktarda yüksek çıkmasının hastalığın patolojisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Molekül ağırlığının değişmesine bağlı olarak değişik tiplerdeki hiyalüronanın farklı rollerinin bulunması, hiyalüronanın yüksek seviyelerinin damarlaşmayı stimüle ederken aşırı hiyalüronan üretiminin damarlaşmayı inhibe etmesi bu molekülün ne kadar kompleks bir yapıya sahip olabileceğini göstermektedir (54-56). Halen hiyalüronan molekülü artışı ve PAH rahatsızlığı arasında tam bir ilişki kurulamamakla birlikte; hastalığa ait patolojik mekanizmalarını aydınlatan daha birçok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

**Akciğer matriks ve HA:**
Matriks komponentlerinin organ yapılanmasındaki önemli görevleri yanında çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyonların düzenlenmesi ile ilişkilidirler. Örneğin HA yıkımı sonucu oluşan ürünler çeşitli genleri, sitokinleri,

büyüme faktörlerini, sinyal transdüksiyon molekülleri ve adezyon moleküllerini indükleyebilirler (57). Akciğerde proteoglikanlar, elastin ve kollajenler gibi çeşitli HAM komponentleri bulunur. Proteogilikanlar bir veya daha fazla gilikozaminogilikan zincirlerinin (GAG) bağlandığı bir kor protein taşırlar. HA, heparin sülfat, dermatan sülfat ve kontroitin sülfat akciğerdeki GAG'lardandır (58). HA iki şeker ünitesinin tekrarlanmasından (beta-D-N-acetil glukoamin ve beta-D-glukuronat) oluşan büyük bir polisakkarittir. Sinoviyal sıvı, dermis ve vitreus'da bulunan perisellüler ve ekstrasellülerin parçasıdır (59). Yukarıda belirttiğimiz üç farklı versiyonu olan HAS1, HAS2 ve HAS3 enzimleri HA'ye glukuronik asit ve N-asetilglıkozamin ekleyerek uzatırlar ki bu şekilde polisakkarit olarak hücre membranından ekstrasellüler alana geçerler (44, 60). HAS3 enzimi tarafından üretilen HA düşük moleküler ağırlığı (DMA) olan HA'dır, HAS1 ve HAS3 tarafından sentez edilen HA ise yüksek molekül ağırlığındaki (YMA) HA'dır. HA molekül ağırlığına göre farklı işlevler gördüğü bilinmektedir (13, 61). Örneğin DMA-HA sellüler proliferasyonu tetiklerken YMA-HA tam tersi olarak sellüler proliferasyonu engelleyebiliyor (44). HAS ekspresyonu hücre tipine göre spesifiktir. Sikloheksimid tedavisi, endoplazmik stres, ikili-sarmallı RNA gibi protein sentezini inhibe eden tüm proteinler HA üretimini tetiklerler (62). HA sentezi aynı zamanda düz kas hücrelerinin virüs veya virüs mimikrisi yapan sentetik ikili-sarmal RNA polinosinik asit (Pol:I:C) ile muamele edilmesiyle de artar (62, 63). HA ekstrasellüler matrikste çok fazla miktarda bulunurken aynı zamanda sellüler proliferasyona katkıda bulunur ve kendi primer reseptörü CD44 dahil olmak üzere bir çok hücre yüzey reseptörleri ile interaksiyonlata katılır. HA'nın sellüler proliferasyona katılması prolifere olan hücrelerin ihtiyacı olan hücre adezyon etkileşimlerine katılan CD44 ile ilişkisinde dolayı olduğu düşünülmektedir. CD44'ün HA'na bağlanması anjiyogenezi, proliferasyonu ve migrasyonu uyarır (64-67). HA degredasyon ürünlerinin CD44 etkileşiminden bağımsız olarak inflamasyon özelliklerine sahip olabileceğine dair veriler mevcuttur (57). Bu sebepten, HA akciğerin hasarlara karşı cevabında ve vasküler yenilenme ve sellüler proliferasyon ve migrasyon gibi IPAH hastalığı ile ilişkisi olan patolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. **Bizim elimizdeki verilerimiz IPAH'de bulunan yüksek seviyelerdeki HA miktarlarının hastalığın patobiyolojisinde önemli bir role sahip olduğunu gösteriyor.** IPAH'deki matriks anormalliklerini tanımlamak PAH hastalığını daha iyi anlamamıza yardım edecek ve hastalık sürecini durdurmak veya tersine çevirmek için yani anlayışlar sağlayabilir.

**IPAH'de hiyalüronanın rolü:**
Akciğer ekstrasellüler matriksinde proteogilikanlar, elastinler ve kollajenler gibi bir kaç farklı komponentler vardır. IPAH hastalarının kanlarında yüksek seviyede HA tespit etmiş ve bu yüksek seviyedeki HA'nın kaynağı olarak ta PADKH'lerinin ve pleksogenik lezyonların olabileceğini rapor etmiştik (Şekil 2). Vasküler düz kas hücreleri ve endotel hücrelerin anormal proliferasyonu IPAH hastalığının patolojisinde büyük bir rol oynar ve IPAH hastalarının akciğerlerinde görünen karakteristik pleksogenik lezyonlarıdan sorumludurlar. Günümüzde kullanılan IPAH tedavileri spesifik pulmoner vazodilatörlerine dayanırken, etkileri çok limitlidir çünkü direk olarak vasküler yenilenme ve hücre proliferasyonuna hedef almazlar. IPAH hastalığının gelecekteki tedavisi bu hastalıktaki vasküler yenilenme ve hücre proliferasyonuna hedef alabilme kabiliyetimize bağlıdır. Akciğer matriksi IPAH'deki bu patolojik süreçlerin evriminin bir parçası olarak rol oynarlar. IPAH'deki belirlenecek matriks anormallikleri hastalığın patolojisini anlamamızda bize yardım edecek ve hastalık sürecini durdurup tersine çevirecek efordumuzunda büyük rol oynayabilir.

**Bu bulgular hep birlikte ele alındığında PAH'deki vasküler yenilenme ve PADKH proliferasyonunda HA'nın önemli role sahip olabileceğini gösteriyor. Teklif ettiğimiz çalışmamızın bulguları PAH hastalığının patobiyolojisinde akciğer mikroçevre ve matriksin önemli rolü ve tedavi için potansiyel hedefleri belirleme üzerinde ışık tutacaktır.**

## BULGULAR

TÜBİTAK ve Erciyes Üniversitesi BAP biriminin kabul ettiği projemizde anormal hiyalüronan (HA) miktarı ve fragmentasyonunun pulmoner arteryel hipertansiyon (PAH) hastalığı sıçan (rat) modelinde anormal düz kas hücre bozuklukları, inflamasyon ve vasküler yenilenme için temel düzenleyici olduğunu hipotezimizi öne sürmüştük. Bu hipotezimizi aşağıdaki amaçlar ışığında gerçekleştirmeyi planladık ki dönem içindeki projeyle ilgili bilimsel gelişmeleri de yine bu sıraya göre aşağıda rapor edildi.

İş zaman çizelgemizin bir senelik planına bakıldığında (Tablo 1) ilk 6 ayın Malzemelerin temini ve hayvan modeli oluşturulması olarak gösterilmiştir.

**Tablo 1:** İlk bir yıl için iş zaman çizelgesi

| İş Paketi Ad/Tanım | AYLAR | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1. Malzemelerin temini ve hayvan modeli oluşturulması | X | X | X | X | X | X | | | | | | |
| 2. Ara Rapor I | | | | | | X | | | | | | |
| 3. Oluşan PAH hayvan modeli ve kontrol rat akciğer ve kan örneklerinin incelenmesi | | | | | | | X | X | X | X | X | |
| 3.1 Western blot | | | | | | | X | X | X | X | X | |
| 3.2 RTQ-RT PCR | | | | | | | X | X | X | X | X | |
| 3.3 FACE analizi | | | | | | | X | X | X | X | X | X |
| 3.4 İmmüno floresan boyama | | | | | | | X | X | X | X | X | |
| 3.5 ELISA | | | | | | | X | X | X | X | X | |
| 4. Ara Rapor II | | | | | | | | | | | | X |

Gerek teçhizat ve gerekse sarf malzemeler temin edilmiş ve alınan hipoksi pleksicam kafesler kullanılarak Sprague Dawley ratlar projenin yöntem kısmında belirtildiği şekilde PAH hastalık modeli oluşturulmuştur. Alınan Mikro kateter kan basınç sistemi ile de pulmoner basınçları kayıt edilmiştir.

Hem iş zaman çizelgesinde hem de projemizde belirttiğimiz İLK maçımız olan **AMAÇ 1: PAH rat modeli oluşturmak ve plazma HA seviyelerini belirlemesi.** Başarıyla gerçekleştirilmiştir şöyle ki:

Projede belirtildiği gibi grup 1'deki ratlar odadaki hava ile havalandırılırken (normoksi), grup 2'deki ratlara deri altından 20mg/kg olacak şekilde Sugen-5416 maddesi verildikten sonra %10'luk $O_2$ ile 3,5 hafta pleksicam kafeslerde beslendiler (Tablo 2). Projenin bu kısmı çok önemliydi çünkü eğer PAH hipoksi Sugen-5416 rat modeli oluşmazsa projede belirttiğimiz gibi diğer Monocrotoline rat modeline yönlendirmemiz gerekecekti.

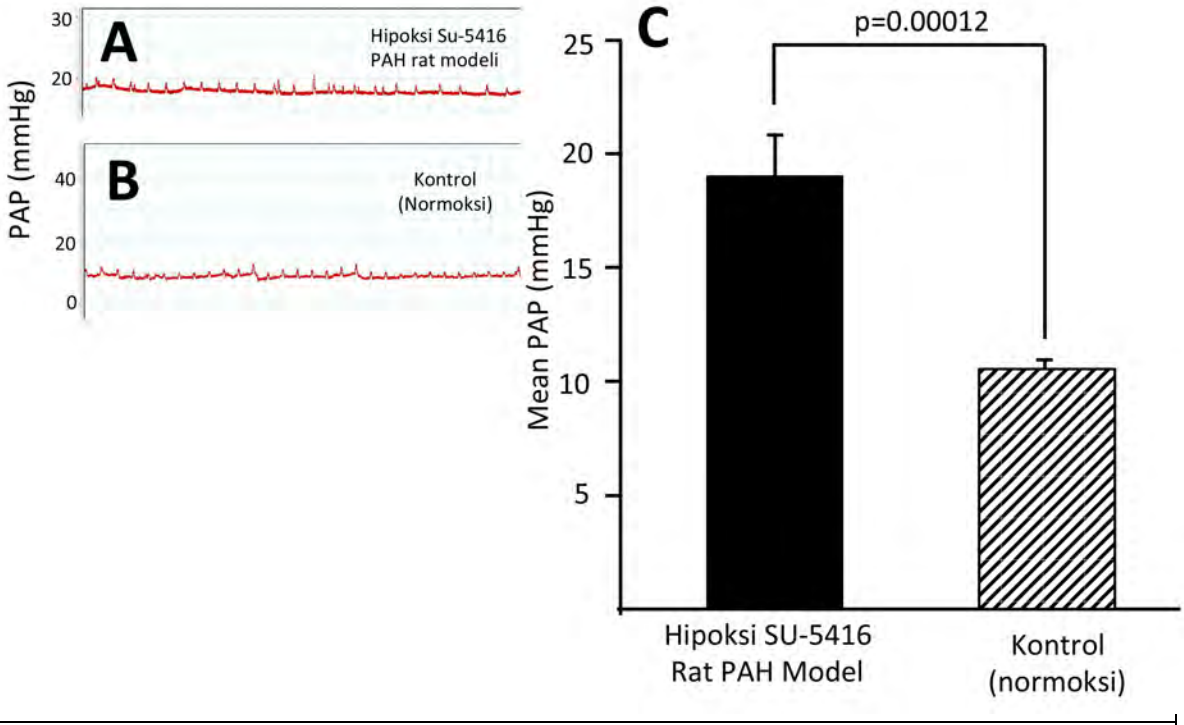
**Tablo 2:** Çalışma gurupları

| Grup | Uygulanan materyal | SU-5416 Uygulanacak miktar | Rat sayısı |
|---|---|---|---|
| 1 | Kontrol grubu (normoksi) | - | 12 |
| 2 | PAH modeli (Hipoksi 3,5 hafta) | 20 mg/kg | 12 |

Sisteme yüklediğimiz videodan da göreceğiniz gibi her iki grubun pulmoner basınçları ölçüldü. Ölçüm yapmak için anestezi altındaki ratların jugular ven damarından kateter sokularak kalbim sağ karıncığından pulmoner arterlere geçildi. Pulmoner arter basınçları (PAP) Powerlab cihazı ile kayıt edildi. Beklendiği üzere pulmoner arter basınçları PAH hipoksi SU-5416 rat modelinde kontrollere göre çok daha yüksek bulundu **[Pulmoner arter basıncı (PAP) mmHg, mean±SD PAH 19.03 ± 1.77 , kontrol 10.58 ± 0.40 p=0.00012]** (Şekil 1). Bu farkın bulunması PAH rat modeli oluşturmada başarımızı göstermektedir. Sadece bu farkla değil aşağıdaki patoloji sonuçlarından da anlaşılacağı gibi projenin bu kısmı başarıyla tamamlanmıştır.

Oluşturduğumuz hayvan modelinin gerçekten istediğimiz gibi çalışıp çalışmadığını anlamak için projedeki iş

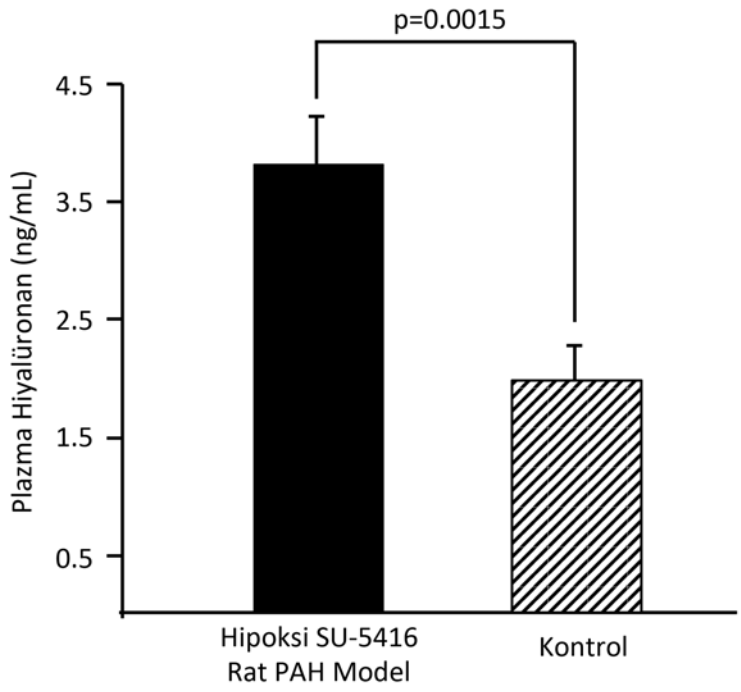
zaman paketinde belirtildiği gibi (Tablo 1) oluşan rat modeli ile kontroller arasındaki hiyalüronan üretiminin seviyesinin ölçülmesi aşağıdaki teknikler vasıtasıyla belirlendi. Bu tekniklerde kullanılmak üzere rat akciğerleri 3 kısma ayrıldı ve birinci kısım parafin bloklama için kullanıldı, ikinci kısım trizol içerisinde homojenize edilerek mRNA izolasyonu için saklandı, üçüncü kısım ise direkt dondurularak protein çalışmaları için saklandı.




**Şekil 1:** Oluşturulan hipoksi sugen-5416 PAH rat modeli ve normoksi altındaki kontrol ratlarda pulmoner arter kan basınçları (PAP) ölçüldü. Jugular venden girilen mikro kateter yardımıyla Power lab cihazı kullanılarak hem hipoksi sugen-5416 pah rat modelinde (A), hem de normoksi ortamdaki kontrollerde (B) PAP basınçları kayıt edildi. Her gruptan 12 denekten elde edilen ortalama PAP basınçları ise bar grafiğinde gösterilmektedir (C).

**ELİSA:**

Oluşturulan PAH hipoksi Sugen-5416 rat modeli ve normoksi altındaki kontrol ratların kanları EDTA'lı tüplere alındıktan sonra 1500 rpm'de 15 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Plazmaları ayrılan kanlar ELİSA deneyi yapılana kadar -80$^0$C'de saklandı. Plazma HA ölçümleri ticari olarak satın alınan ELİSA kitleri (katalog no: DY3614; R&D Systems) yardımıyla gerçekleştirildi. Üretici firmanın protokolüne göre deney gerçekleştirildi. ELİSA sonuçlarına göre hipoksi SU-5416 PAH rat modeli olan hayvanların kanında kontrollere göre istatistiksel olarak çok daha fazla miktarda HA belirlendi **[HA ng/mL, mean±SD PAH 3.8 ± 0.41 , kontrol 1.96 ± 0.31 p<0.0015]** (Şekil 2).




**Şekil 2:** Hipoksi Sugen-5416 PAH rat modelinden elde edilen plazma hiyalüronan seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı miktarda artış gösteriyor (her bir grup için n=12 )

**İmmüno floresan boyama:**

Oluşturulan hipoksi Sugen-5416 PAH rat modeli ve kontrollerden elde edilen akciğerler histolojide doku kasetleri içinde parafin bloklara gömüldü. Dokulardan 5 um'lik kesitler, polilizinli lamlara alındı.

Her bir boyama için ikişer lam seçilir. Biri boyanın negatif kontrolü (sadece sekonder antikor ile inkübe edildi) diğeri ise hem primer hem de sekonder antikor ile inkübe edildi.

Öncelikle Lamları parafinden arındırılmak üzere deparafinizasyona tabii tutuldu.

Deparafinizasyon Metodu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Xylene1 : 3 dk

Xylene2 : 3 dk

Xylene 1:1 %100 etilalkol : 3 dk

% 100 etilalkol1 : 3dk

%100 etilalkol2: 3 dk

% 95 etilalkol : 3dk

% 70 etilalkol : 3 dk

% 50 etilalkol : 3 dk

$dH_2O$ : 15 dk

Daha sonra % 2 FBS in Hank's bufer (HBSS) (50ml) içerisinde 30 dk bloke edildi.

Primer Antikor olarak Hiyalüronan bindign protein (1:100) oranında %2 FBS içeren HBSS buffer ile seyreltilerek çevrelenen doku üzerine damlalar halinde yaklaşık 200-300 ul yalnızca pozitif dokulara kondu.

Negatif boyama için dokulara yalnızca %2 FBS içeren HBSS kondu.

16 Saat +4 $^0$C buzdolabında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra her bir lam HBSS ve %2 FBS içeren HBSS ile 5 dakika yıkanır.

Sekonder antikor (1:1000) oranında %2 FBS içeren HBSS ile seyreltilir. Kırmızı için Alexa 568, yeşil renk için ise Alex 488 antikorlarını kullandık. Pozitif ve negatif olan tüm lamlara 200-300 ul kadar doku üzerine birer damla

sekonder antikorlar ilave edildi.

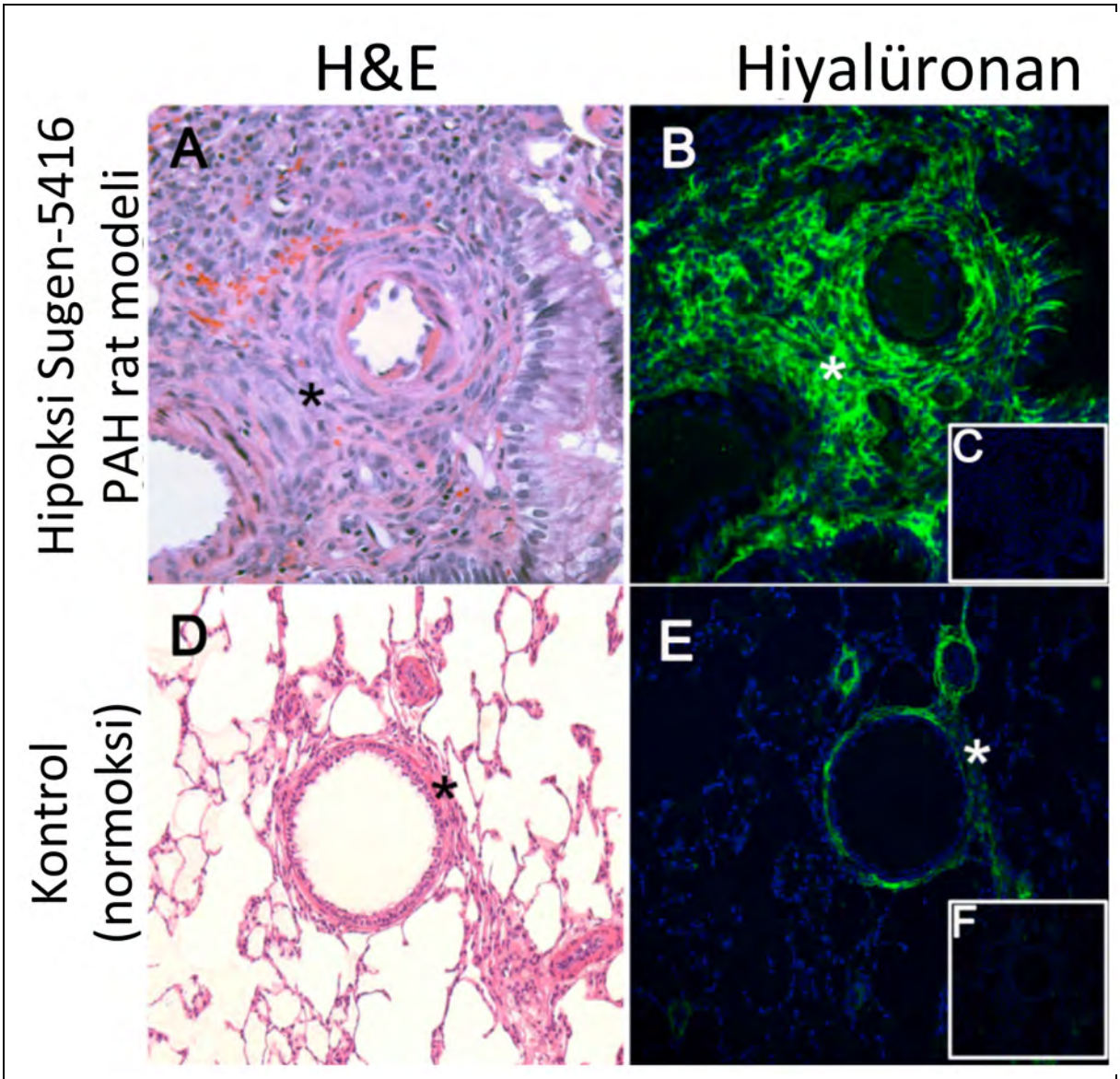
45 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra tekrar HBSS ve %2 FBS içeren HBSS ile 5 dakika yıkandı ve bir damla DAPİ boyası damlatılarak çekirdekler de mavi renk olması sağlandı.

Floresan mikroskop altında görüntüler elde edildi. Bu çalışmada elimizdeki tüm ratlar için yapılmış ve bir çok görüntü elde edilmiştir.

Bu görüntüşer incelendiğinde öncelikle PAH rat modelindeki pulmoner arterlerde kalınlaşma ve pulmoner düz kas hücrelerindeki proliferasyon dikkat çekmiştir (Şekill 3A). Normoksi altındaki ratların akciğerleri incelendiğinde pulmoner arterlerinde bu şekilde bir kalınlaşma ve proliferasyon gözlenmedi (Şekil 3D).

Hiyalüronan binding protein ile yeşil renge boyanan hiyalüronan molekülü ise özellikle PAH rat modelinden elde edilen akciğerlerin pulmoner arter bölgesinde yoğunlaştığı tespit edildi (Şekil 3B). Bu yoğunlaşma özellikle kalınlaşmanın ve düz kas hücre proliferasyonunun olduğu bölgede daha fazla idi. Fakat normoksi akciğerlerin arterlerinde her ne kadar hiyalüronan boyanması olsa da PAH rat modelindeki kadar yoğun bir boyama gözlenmedi.



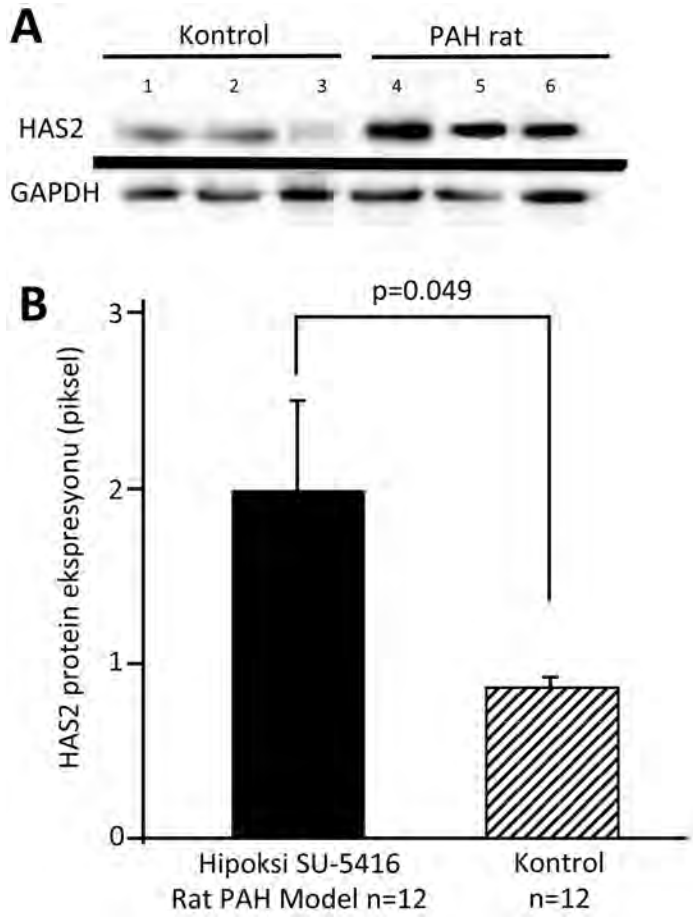

**Şekil 3:** Hipoksi Sugen-5416 PAH rat modeli ve kontrol ratların akciğer dokuları 5 um'lik kesitler alındı ve Hemotoxin and Eosin (H&E) boyaması hipoksi Sugen-5416 PAH ratlarda damarlarda kalınlaşmanın olduğunu

(A, * işareti pulmoner arteri gösteriyor) buna karşı kontrollerde damar kalınlaşması gözlenmiyor (D). Hiyalüronan ile boyandığında PAH rat modelinde özellikle kalınlaşan bölgelerde aşırı hiyalüronan birikmesi gözlemlenirken (B) kontrollerde hiyalüronan miktarı çok azdı (E). Şekil C ve F ise sadece sekonder antikor ile boyanarak negatif kontrol olarak gösterilmektedir. Bu çalışmada elimizdeki tüm ratlar için yapılmış ve bir çok görüntü elde edilmiştir.

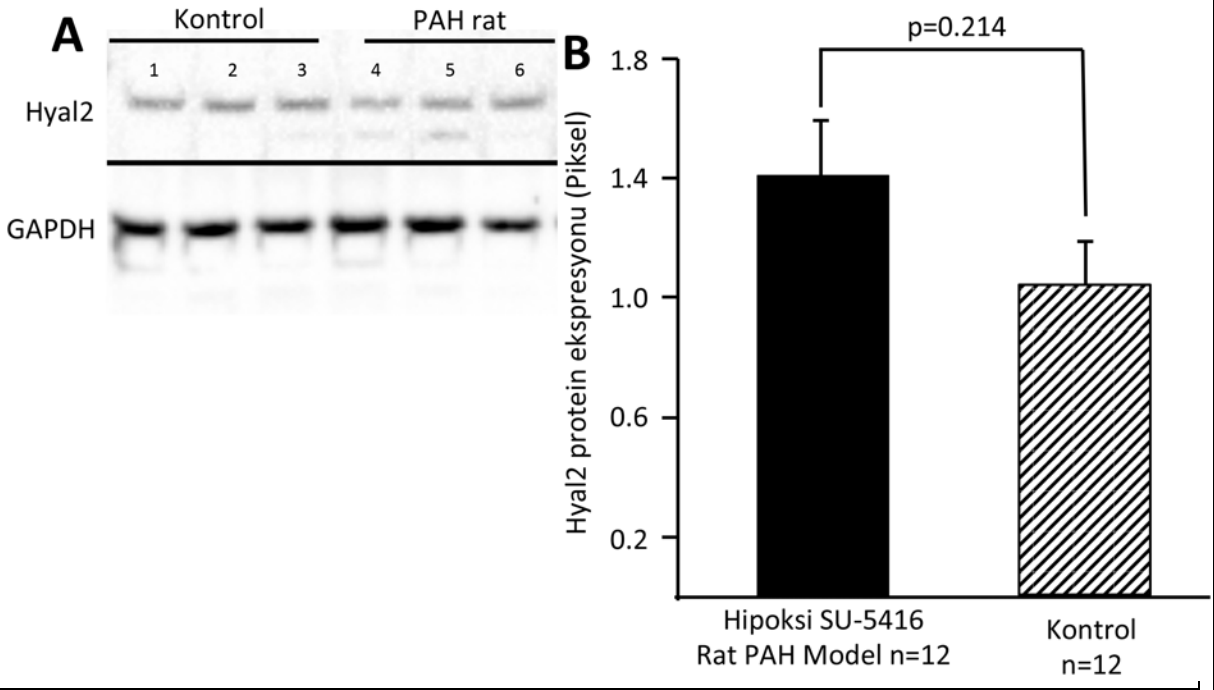
**Western blot:**

Ratlardan akciğer dokuları direkt -80$^0$C'de dondurulmuştu. Bu dondurulan akciğerlerden protein lizatları hazırlandı. Thermo Scientific firmasından temin edilen Lysis Buffer içerisine Proteaz inhibitor kokteyli [Sigma-P2714] ile fosfotaz inhibitör kokteyli eklendi. Bu şekilde hazır hale gelen tampon solüsyonu içerisine akciğer dokusu eklenerek buz üzerinde olacak şekilde homojenize edildi. Homojenize sonrasında 30 dk 4$^0$C'de ve 13.000 rpm de santrifüj yapıldı. Süpernatantlar saklanarak Bradford yöntemi ile protein miktarları tespit edildi. Protein miktarlarına göre her bir örnekten 80ug protein yüklenecek şekilde numuneler hazırlandı ve %10'lu SDS PAGE jel de yürütüldü. PVDF membrana transferden sonra Primer antikorlar olarak hyaluronan synthase 1, 2 ve 3 (HAS1, 2, ve 3) ile hyaluronidaz 1 ve 2 (Hyal1 ve Hyal2) kullanıldı.

HAS1 ve HAS3 protein ekspresyonları hem kontrol hem de hipoksi Sugen-5416 PAH ratlarda belirlenmezken HAS2 protein ekspresyonu hipoksi Sugen-5416 PAH ratlarda kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulundu **[HAS2 protein ekspresyonu, mean±SD: PAH 2.0 ± 0.5, kontrol 0.86 ± 0.07 p=0.0493] (Şekil 4).** Buna karşılık hyal2 protein ekspresyonu her iki grupta da aynı idi. **[Hyal2 protein ekspresyonu, mean±SD: PAH 1.41 ± 0.18, kontrol 1.05 ± 0.14 p=0.214] (Şekil 5).** Bu sonuçlar bize PAH rat modelinin akciğerindeki hiyalüronan birikmesinin HAS2 enziminin fazla çalışmasından kaynaklandığını göstermektedir.




**Şekil 4:** hipoksi Sugen-5416 PAH rat modelinden ve kontrollerden elde edilen akciğer doku örnekleri kullanılarak HAS2 protein seviyelerinin tayini için western blot tekniği uygulandı. hipoksi Sugen-5416 PAH ratlarda HAS2 protein ekspresyonunun kontrollere göre anlamlı derecede fazla olduğu tespit edildi (A). Western blot analizi GAPDH house keeping proteinine karşı antikor kullanılarak HAS2 ekspresyonu normalize edilmiştir. Şekillerdeki bandların yoğunlukları image J programı yardımıyla ölçülüp elde edilen rakamlar bar grafiği şekline getirilmiştir (B).



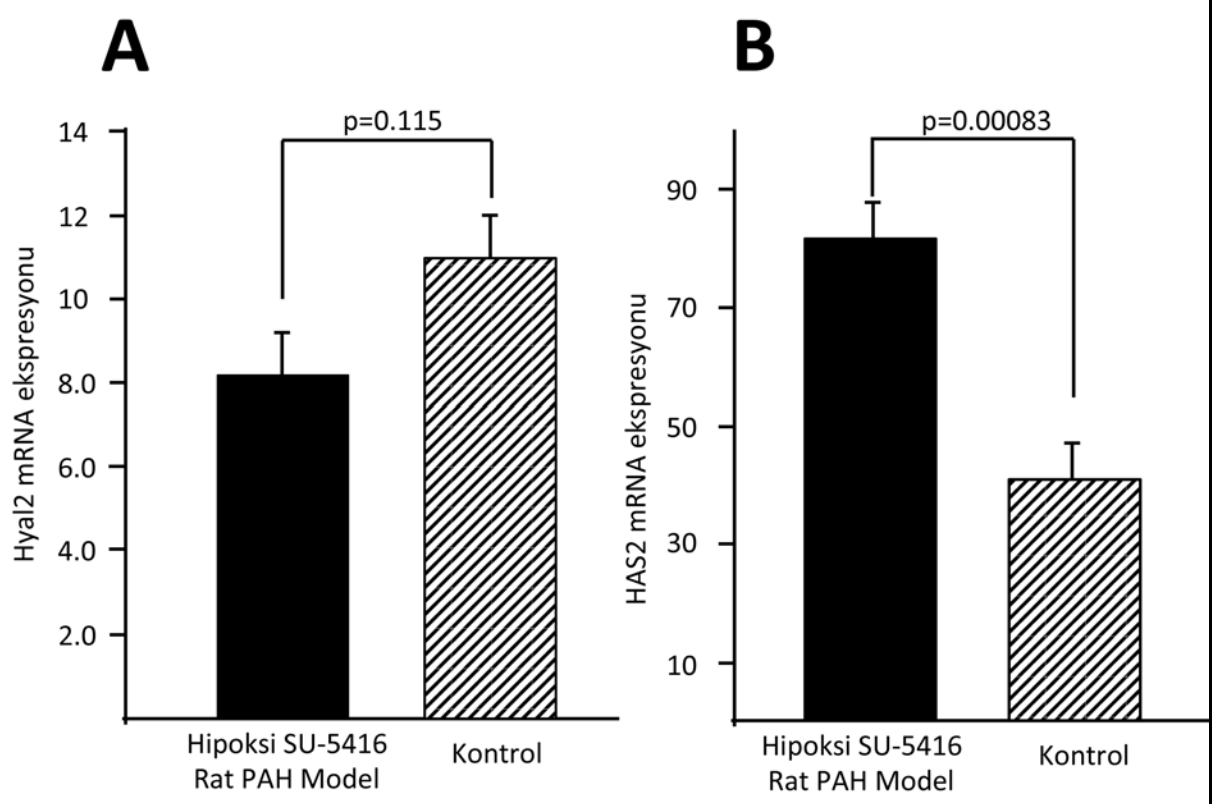

**Şekil 5:** hipoksi Sugen-5416 PAH rat modelinden ve kontrollerden elde edilen akciğer doku örnekleri kullanılarak Hyal2 protein seviyelerinin tayini için western blot tekniği uygulandı. hipoksi Sugen-5416 PAH ratlarda Hyal2 protein ekspresyonunun kontrollerle aynı olduğu tespit edildi (A). Western blot analizi GAPDH house keeping proteinine karşı antikor kullanılarak Hyal2 ekspresyonu normalize edilmiştir. Şekillerdeki bandların yoğunlukları image J programı yardımıyla ölçülüp elde edilen rakamlar bar grafiği şekline getirilmiştir (B).

**RTQ-RT-PCR:**

Ratlardan elde edilen akciğer dokuları direkt TRİZOL içerisine alınarak homojenize edilmiş ve deney gününe kadar -80$^0$C'de dondurulmuştu. TRIZOL'un protokolüne göre mRNA izolasyonu gerçekleştirildi. Laboratuvarımızda bulunan Thermo Scientific uDrop Plate ile mRNA konsantrasyonları belirlendi ve projemizde detaylı belirttiğimiz cDNA sentezini gerçekleştirdik.

SYBR green teknolojisi kullanılarak ROCHE 480 Realtime cihazından örneklerimiz yürütüldü ve ct değerleri elde edildi. Elde edilen ct değerleri excel programına aktarılarak ΔΔct hesaplaması yapılarak gen ekspresyonları hesaplandı.

Realtime PCR sonucuna göre hipoksi Sugen-5416 PAH rat modeli ile kontroller arasında Hyal2 ekspresyonunda çok farklılık görülmezken **[Hyal2 mRNA ekspresyonu, mean±SD: PAH 10.9 ± 0.92, kontrol 8.2 ± 1.32 p=0.115] (Şekil 6A ).** HAS2 mRNA ekspresyonu hipoksi Sugen-5416 PAH rat modelinde kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur **[HAS2 mRNA ekspresyonu, mean±SD: PAH 82.3 ± 6.29, kontrol 41.3 ± 6.02 p=0.00083] (Şekil 6B).** Her iki grupta da HAS1 ve 3 ile Hyal1 ekspresyonları yoktu. Bu sonuçlar bize akciğerde biriken hiyalüronan moleküllerinin kaynağının HAS2 geni olduğunu göstermektedir.




**Şekil 6:** SYBR green teknoloji kullanılarak yapılan Real Time RT-PCR ile HAS1,2,3 ve Hyal1,2 genlerinin mRNA ekspresyonları ölçüldü. HAS1,3 ve Hyal1 mRNA ekspresyonuna her iki grupta da rastlanmazken hyal2 ekspresyonu her iki grupta da vardı fakat anlamlı bir fark gözlenmedi (A). Buna karşın HAS2 mRNA ekspresyonu da her iki grupta vardı ve hipoksi Sugen-5416 PAH rat modelinde kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlemlendi (B).

İş zaman çizelgemizin 1 Nisan 2014 - 1 Ekim 2014 tarihleri arası 6 aylık iş zaman çizelgesine bakıldığında (Tablo 1) primer hücre izolasyonu için hayvan modeli oluşturma ve hücre izolasyonu gösterilmiştir. Aynı zamanda bir önceki dönemde başlattığımız FACE deneyi sonuçları elde edilmiştir.

**Tablo 1:** 1 Nisan 2014- 1 Ekim 2014 tarihleri arası 6 aylık iş zaman çizelgesi

| İş Paketi Ad/Tanım | AYLAR | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| 5. Primer hücre izolasyonu için tekrar hayvan modeli oluşturma | X | X | X | X | | |
| 6. Oluşturulan PAH hayvan modeli ve kontrol akciğerlerinden primer hücrelerin izolasyonu ve saklanması | | X | X | X | X | |
| 7. Ara Rapor II | | | | | | X |

Sprague Dawley ratlar projenin yöntem kısmında belirtildiği şekilde ve aynı zamanda birinci raporda da gösterildiği şekliyle PAH hastalık modeli tekrar oluşturulmuştur. Alınan Mikro kateter kan basınç sistemi ile de pulmoner basınçları kayıt edilmiştir. Bu işlemi ratlarda nasıl yaptığımızın görülmesi açısından laboratuvarımızda çektiğimiz kısa bir video da sisteme birinci raporda yüklenmişti.

Hem iş zaman çizelgesinde hem de projemizde belirttiğimiz ilk amaçımız olan PAH rat modeli oluşturmak ve plazma HA seviyelerini belirlemesi başarıyla gerçekleştirildi ve birinci raporda ayrıntısıyla anlatıldı.

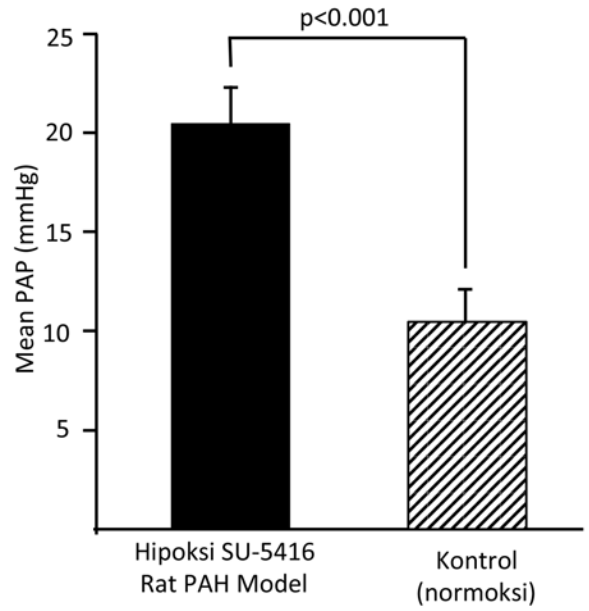
Birinci dönemde yaptığımız şekilde Hipoksi Sugen-5416 PAH rat modeli tekrar oluşturuldu. Projede belirtildiği gibi grup 1'deki ratlar odadaki hava ile havalandırılırken (normoksi) grup 2'deki ratlara deri altından 20mg/kg olacak

şekilde Sugen-5416 maddesi verildikten sonra %10'luk $O_2$ ile 3,5 hafta pleksicam kafeslerde beslendiler (Tablo 2).

**Tablo 2:** Çalışma gurupları

| Grup | Uygulanan materyal | SU-5416 Uygulanacak miktar | Rat sayısı |
|---|---|---|---|
| 1 | Kontrol grubu (normoksi) | - | 12 |
| 2 | PAH modeli (Hipoksi 3,5 hafta) | 20 mg/kg | 10 |

Her iki grubun pulmoner basınçları ölçüldü ve beklendiği üzere pulmoner arter basınçları PAH hipoksi SU-5416 rat modelinde kontrollere göre çok daha fazlaydı [Pulmoner arter basıncı (PAP) mmHg, mean±SD PAH 20,57±1,69, kontrol 10,6±1,57 p<0.001] (Şekil 1). Bu farkın bulunması PAH rat modeli oluşturmada başarımızı göstermektedir. Birinci raporda gösterilen doku boyamaları burada yapılmadı çünkü akciğerler direkt primer hücre izolasyonu için kullanıldı. 12 rat ile başlanmasına karşın nedeni belli olmayan bir sebepten dolayı PAH rat grubundan iki hayvan deneyin ilk gününde ölmüştür ve bu sebeple 10 hayvan ile deneye devam edildi ki zaten 12 hayvan almamızın sebebi bu gibi ölümler göz önünde bulundurularak alınmıştı. Sonuç itibariyle istatistiksel olarak herhangi bir sorun yaşanmamıştır.

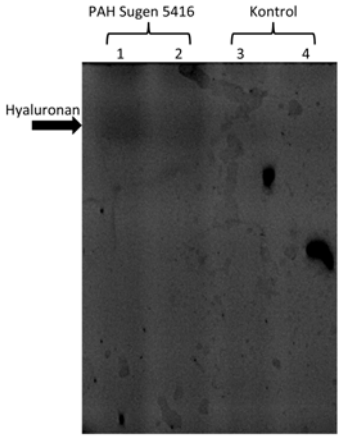



Oluşturulan hipoksi sugen-5416 PAH rat modeli ve normoksi altındaki kontrol ratlarda pulmoner arter kan basınçları (PAP) ölçüldü. Jugular venden girilen mikro kateter yardımıyla Power lab cihazı kullanılarak hem hipoksi sugen-5416 pah rat modelinde hem de normoksi ortamdaki kontrollerde PAP basınçları kayıt edildi. Hipoksi Sugen-5416 grubundan 10 denek ve kontrol grubundan 12 denekten elde edilen ortalama PAP basınçları ise bar grafiğinde gösterilmektedir.

Ratlardan gerekli hücreler izole edildi ve edilmeye devam ediliyor. Akciğerlerden elde edilecek elastik pulmoner arterler izole edildi ve endoteller için uygun medyada 1mg/ml kollajenaz II ve 0,6 U/ml dispaz II 1 saat $37^0$C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucu materyal steril 40-um naylon filtreden geçirildi ve %2 fetal calf serum ile yıkandı. Endotel hücreleri alındıktan sonra aynı damarlarda kalan düz kas hücrelerini ayırmak için M199 medyum içerisinde magnetik kolanlara aktarıldı. 24 saat sonra medyum 50 ml konik tüplere transfer edildi ve yeniden manyetik kolan içerisine yerleştirildi. Petrilere alınan hücreler 24 saat inkübe edildiler ve medyumu değiştirildi. Bu işlen iki hafta boyunca haftada 2 kez uygulandı. Bronkiyal DKH'leri içinde bronşlardan alınan parçalar aynı şekilde muamele edilerek düz kas hücreleri elde edildi. Hücrelerin büyümeleri yavaş olduğundan hala bir kısmının çoğalması için bekleniyor. 100% yoğunluğa erişen hücreler 10%'luk DMSO içeren FBS içerisinde sıvı nitrojende saklanıyor. Bu hücreler bir sonraki dönemde kullanılmak için saklanıyor. Bir sonraki dönemde bu hücreler kullanılarak HAS1, 2, 3 ve Hyal1, 2 protein ve mRNA seviyeleri tespit edilecek ve yine hücreler immünofloresan boyamalarla hiyalüronan seviyeleri tespit edilirken aynı zamanda hücrelerin beslendiği süpernatantlardan da ELİSA yöntemiyle hücrelerin ürettiği hiyalüronan miktarları ölçülecek.

**FACE analizi: Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis assay (FACE)**

Hiyalüronan miktarlarını belirlemek için kullanılan bu metotta önce akciğer dokularıdan proteinaz K enzimi ile proteinler parçalandı. Proteinaz K (125ug/ml) pH7'de 100mM amonyum asetat içerisinde çözüldü ve dokular bu çözelti içeresinde homojenizat kullanarak parçalandı. Bu şekilde 2 saat $60^0$C derecede her 30 dakikada bir karıştırılarak inkübe edildikten sonra iki saat sonunda tekrar proteinaz K (125ug/ml) eklenerek aynı şekilde 2 saat daha inkübe edildi. Karışım 1.5 ml mikro-santrifüj tüplerine aktarıldı ve vakum santrifüj ile yaklaşık 250 ul olana kadar santrifüj edildi. Bir mililitre -$20^0$C derecedeki %100'lük alkol eklendi, vortekslendi ve 16 saat -$20^0$C'de inkübe edildi. Daha sonra numuneler 14,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve çökelti 1ml -$20^0$C'deki %75'lik alkol eklenerek yıkandı. Numuneler yine 14,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atılarak çökelti oda sıcaklığında kurutuldu. İnkübasyon sonrasında 0,1M pH7 amonyum asetat numunelere eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında beklendi. Numuneler 5 dakika kaynayan suya yerleştirilerek kalan proteinaz K'lar yıkıldı. Bu aşamadan sonra kontroitinaz ve hiyalüronidaz kesim başlatıldı. Buna göre 0,6ul %1 glasial asetik asit her bir numuneye enzimatik reaksiyonun pH5-6 yapmak için eklendi. Hiyalüronidaz ve kontroitinaz ABC 1:1 oranında karıştırıldı. 3,2ul bu enzim karışımından her bir numuneye eklendi ve $37^0$C'de 3 saat inkübe edildi. Aynı proteinaz K'de olduğu gibi kaynayan su banyosunda 5 dakika bekletilerek enzimler inaktif hale getirildi. 160ul -$20^0$C'deki %100 alkol her bir numuneye eklendi ve numuneler 16 saat -$80^0$C'de bekletildi. Daha sonra 14,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant HA ve kondroitin sülfattan kalan disakkarit ürünleri taşır. Süpernatantlar mikro santrifüj tüplerinde vakum santrifüj kullanılarak buharlaştırıldı. 12,5mM 2-aminokridon (AMAC), %7,5 glasial asetik asit ve 0,5M siyanoborohidrit karışımı tüm numunelere eklendi ve karanlık ortamda $37^0$C'de 16 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra elektroforeze geçildi ve numuneler %80 gliserol ile karıştırıldılar ve mono koşturma tamponu ile mono kompozisyon jelinde koşturuldular (300V, $4^0$C, 1 saat). Koşturma sonunda jel soğuk ortamda tutularak 365nm dalga boyundaki UV altında görüntüsü elde edildi.




Hipoksi Sugen 5416 PAH modeli ve kontrol ratlardan elde edilen akciğer dokularındaki hiyalüronan miktarlarını ölçmek için İngilizce dilinde orijinali "**Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis assay**" olarak bilinen FACE deneyi yapıldı. Buna gore Hiyalüronan molekülünün yoğunluğu hipoksi Sugen-5416 PAH rat modelinden elde edilen akciğerlerde kontrollerden elde edilen akciğerlerle kıyaslandığında çok daha fazla yoğun olduğu tespit edildi.

Hiyalüronan molekülü glukozaminoglikan olduğu için ancak FACE metodu ile görüntü elde edinilmektedir. Şekil 1'de de görüleceği gibi hiyalüronan molekülü hipoksi Sugen 5416 PAH rat modelinden elde edilen akciğerlerde kontrol akciğerlerine kıyasla çok daha yoğun bulunmaktadır. Bu deney aynı zamanda bir önceki dönemde aldığımız western ve immünofulerans sonuçlarını da desteklemektedir.

**İstatistik:**

Tüm istatistik analizleri JUMP JMP versiyon: 5.0.1.2 programı ile gerçekleştirilecektir. Devamlı değişkenler bağımsız iki-tailed t test ile karşılaştırılacaklardır. P ≤0.05 anlamlı farklılık olarak göz önünde bulundurulacaktır.

**Destekleyen Diğer Kuruluşlarla İlgili Sorunlar Varsa Ayrıntıları ve Çözüm Önerileri**

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Oksijen Vakum ünitesi alt yapı olarak bize bir senedir Azot gaz dolumunu gerçekleştirmiştir. Son aylarda Başhekimin emriyle Azot tüplerini diğer Anabilim Dallarına verdikleri halde bizim anabilim dalına veremeyeceklerini beyan ettiler. Bu aksaklığın çözülmesi için Anabilim Dalı başkanlı, Dekanlık bilgilendirilmiş fakat henüz sonuç alınabilmiş değildir. Azot gazları üniversitenin alt yapısı olarak düşünüldüğü için ayrı bir bütçe ayrılmamıştır ve projenin bu zamana kadar kısmına kadar da planlandığı gibi bu alt yapı kullanılmıştır. Fakat Yönetimin bu tutumunu anlamakta zorlanıyoruz. Bu durumu çözmek için gerekli yazışmalar başlatılmış ve bu yanlış anlaşılmanın giderileceğini ümit ediyoruz. Başarısız olunma durumunda TÜBİTAK haberdar edilecektir.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu Proje Dış Kaynaklı Destek projesi olup TÜBİTAK'tan aldığımız proje bütçesinin yüzde 10'u kadar destek BAP'tan temin edilmiştir. Proje TÜBİTAK Projesinin bir parçası olduğundan TÜBİTAK projesi tamamlandıktan sonra tartışma ve Sonuç kısmı yazılacaktır. Bu döneme kadar olan sonuçlar yukarıda sunulmuş ve proje bu zamana kadar İş zaman paketlerine uygun şekilde başarıyla yürütülmüştür.

**Dönem İçinde Proje Kapsamında Yapılan veya hazırlanan Yayımlar ve Toplantılarda Sunulan Bildiriler**

| Sıra | Çıktı türü | Yazarlar | Başlık | Yayın yeri | Durumu* |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | Sözlü Sunum | Pınar Altın, Muazzez Derya, Gamze Karadaş, Mehmet Fatih Sönmez, Nihat Kalay, Metin Aytekin | EKSTRASELÜLER MATRİKSİN PULMONER HİPERTANSİYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN HAYVAN MODELİNDE ARAŞTIRILMASI | 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2014 | Yayınlandı. Sözlü sunum olarak kabul edildi ve sunuldu. Ayrıca özeti kitapçıkta basıldı. |

## KAYNAKLAR


1. Aytekin M, Comhair SA, de la Motte C, Bandyopadhyay SK, Farver CF, Hascall VC, et al. (High levels of hyaluronan in idiopathic pulmonary arterial hypertension). **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2008 Nov;295(5):L789-99.
2. Farber HW, Loscalzo J. (Pulmonary arterial hypertension). **N Engl J Med**. 2004 Oct 14;351(16):1655-65.
3. Ghamra ZW, Dweik RA. (Primary pulmonary hypertension: an overview of epidemiology and pathogenesis). **Cleve Clin J Med**. 2003 Apr;70 Suppl 1:S2-8.
4. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. (Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension). **J Am Coll Cardiol**. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):13S-24S.
5. Kaneko FT, Arroliga AC, Dweik RA, Comhair SA, Laskowski D, Oppedisano R, et al. (Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension). **Am J Respir Crit Care Med**. 1998 Sep;158(3):917-23.
6. Palevsky HI, Schloo BL, Pietra GG, Weber KT, Janicki JS, Rubin E, et al. (Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents). **Circulation**. 1989 Nov;80(5):1207-21.
7. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, et al. (Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry). **Circulation**. 1989 Nov;80(5):1198-206.
8. (The International Primary Pulmonary Hypertension Study (IPPHS)). **Chest**. 1994 Feb;105(2 Suppl):37S-41S.
9. Rubin LJ. (Primary pulmonary hypertension). **N Engl J Med**. 1997 Jan 9;336(2):111-7.
10. Aldred MA, Vijayakrishnan J, James V, Soubrier F, Gomez-Sanchez MA, Martensson G, et al. (BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension). **Human mutation**. 2006 Feb;27(2):212-3.
11. De Marco T. (Pulmonary arterial hypertension and women). **Cardiol Rev**. 2006 Nov-Dec;14(6):312-8.
12. McLaughlin VV, McGoon MD. (Pulmonary arterial hypertension). **Circulation**. 2006 Sep 26;114(13):1417-31.
13. Aytekin M, Aulak KS, Haserodt S, Chakravarti R, Cody J, Minai OA, et al. (Abnormal platelet aggregation in idiopathic pulmonary arterial hypertension: role of nitric oxide). **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2012 Mar 15;302(6):L512-20.
14. Hyduk A, Croft JB, C. A, Zheng K, Zheng ZJ, Mensah GA. (Pulmonary Hypertension Surveillance - United States, 1980--2002). **Mortality and Morbidity Weekly Report (MMWR) Surveillance Summaries**. 2005 November 11, 2005;54 (SS05):1-28.
15. Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, et al. (Clinical classification of pulmonary hypertension). **J Am Coll Cardiol**. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):5S-12S.
16. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. (Primary pulmonary hypertension. A national prospective study). **Ann Intern Med**. 1987 Aug;107(2):216-23.
17. Taichman DB, Mandel J. (Epidemiology of pulmonary arterial hypertension). **Clin Chest Med**. 2007 Mar;28(1):1-22, vii.
18. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, et al. (Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry). **Am J Respir Crit Care Med**. 2006 May 1;173(9):1023-30.

19. Dresdale DT, Michtom RJ, Schultz M. (Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance). **Bull N Y Acad Med**. 1954 Mar;30(3):195-207.
20. Morse JH, Jones AC, Barst RJ, Hodge SE, Wilhelmsen KC, Nygaard TG. (Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus (PPH1) to chromosome 2q31-q32). **Circulation**. 1997 Jun 17;95(12):2603-6.
21. Nichols WC, Koller DL, Slovis B, Foroud T, Terry VH, Arnold ND, et al. (Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32). **Nat Genet**. 1997 Mar;15(3):277-80.
22. Newman JH, Trembath RC, Morse JA, Grunig E, Loyd JE, Adnot S, et al. (Genetic basis of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future directions). **J Am Coll Cardiol**. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):33S-9S.
23. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, et al. (Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family). **J Med Genet**. 2000 Oct;37(10):741-5.
24. Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, et al. (Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium). **Nat Genet**. 2000 Sep;26(1):81-4.
25. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, et al. (Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene). **Am J Hum Genet**. 2000 Sep;67(3):737-44.
26. Aytekin M, Caylak E. ([Hyaluronan and the importance of hyaluronan in diagnosis and treatment]). **Tuberk Toraks**. 2009;57(3):356-64.
27. Bogdan M, Humbert M, Francoual J, Claise C, Duroux P, Simonneau G, et al. (Urinary cGMP concentrations in severe primary pulmonary hypertension). **Thorax**. 1998 Dec;53(12):1059-62.
28. Friedman R, Mears JG, Barst RJ. (Continuous infusion of prostacyclin normalizes plasma markers of endothelial cell injury and platelet aggregation in primary pulmonary hypertension). **Circulation**. 1997 Nov 4;96(9):2782-4.
29. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. (Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension). **N Engl J Med**. 1993 Jun 17;328(24):1732-9.
30. Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, et al. (Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension). **Am J Med**. 1995 Sep;99(3):249-54.
31. Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N, et al. (Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension). **Am J Respir Crit Care Med**. 1999 Aug;160(2):487-92.
32. Ozkan M, Dweik RA, Laskowski D, Arroliga AC, Erzurum SC. (High levels of nitric oxide in individuals with pulmonary hypertension receiving epoprostenol therapy). **Lung**. 2001;179(4):233-43.
33. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, et al. (Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension). **Chest**. 2001 Nov;120(5):1562-9.
34. Shitrit D, Bendayan D, Bar-Gil-Shitrit A, Huerta M, Rudensky B, Fink G, et al. (Significance of a plasma D-dimer test in patients with primary pulmonary hypertension). **Chest**. 2002 Nov;122(5):1674-8.
35. Shitrit D, Bendayan D, Rudensky B, Izbicki G, Huerta M, Fink G, et al. (Elevation of ELISA d-dimer levels in patients with primary pulmonary hypertension). **Respiration**. 2002;69(4):327-9.

36. Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, Fijalkowska A, Sikora J, Florczyk M, et al. (Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension). **Circulation**. 2003 Aug 19;108(7):844-8.
37. Barst RJ, Langleben D, Frost A, Horn EM, Oudiz R, Shapiro S, et al. (Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension). **Am J Respir Crit Care Med**. 2004 Feb 15;169(4):441-7.
38. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al. (Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension). **N Engl J Med**. 2002 Mar 21;346(12):896-903.
39. Clozel M, Gray GA, Breu V, Loffler BM, Osterwalder R. (The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo). **Biochem Biophys Res Commun**. 1992 Jul 31;186(2):867-73.
40. Kereveur A, Callebert J, Humbert M, Herve P, Simonneau G, Launay JM, et al. (High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension. Effect of long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy). **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2000 Oct;20(10):2233-9.
41. Nagaya N, Ando M, Oya H, Ohkita Y, Kyotani S, Sakamaki F, et al. (Plasma brain natriuretic peptide as a noninvasive marker for efficacy of pulmonary thromboendarterectomy). **Ann Thorac Surg**. 2002 Jul;74(1):180-4; discussion 4.
42. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Kyotani S, Satoh T, Nakanishi N, et al. (Secretion patterns of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide in patients with or without pulmonary hypertension complicating atrial septal defect). **Am Heart J**. 1998 Aug;136(2):297-301.
43. Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, Ding I, Neurohr C, Vogeser M, et al. (Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension). **J Am Coll Cardiol**. 2004 Mar 3;43(5):764-70.
44. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. (Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties). **J Biol Chem**. 1999 Aug 27;274(35):25085-92.
45. Maier LA. (Clinical approach to chronic beryllium disease and other nonpneumoconiotic interstitial lung diseases). **J Thorac Imaging**. 2002 Oct;17(4):273-84.
46. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, et al. (Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44). **J Clin Invest**. 1996 Nov 15;98(10):2403-13.
47. Hill AT, Bayley DL, Campbell EJ, Hill SL, Stockley RA. (Airways inflammation in chronic bronchitis: the effects of smoking and alpha1-antitrypsin deficiency). **Eur Respir J**. 2000 May;15(5):886-90.
48. Moreland LW. (Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action). **Arthritis Res Ther**. 2003;5(2):54-67.
49. Noble PW, Jiang D. (Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: the role of innate immunity). **Proc Am Thorac Soc**. 2006 Jul;3(5):401-4.
50. Voelcker V, Gebhardt C, Averbeck M, Saalbach A, Wolf V, Weih F, et al. (Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4). **Exp Dermatol**. 2008 Feb;17(2):100-7.
51. Chen WY, Abatangelo G. (Functions of hyaluronan in wound repair). **Wound Repair Regen**. 1999 Mar-Apr;7(2):79-89.
52. Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, et al. (Resolution of lung inflammation by CD44). **Science**. 2002 Apr 5;296(5565):155-8.
53. Papakonstantinou E, Kouri FM, Karakiulakis G, Klagas I, Eickelberg O. (Increased hyaluronic acid content in idiopathic pulmonary arterial hypertension). **Eur Respir J**. 2008 Dec;32(6):1504-12.
54. Rahmanian M, Pertoft H, Kanda S, Christofferson R, Claesson-Welsh L, Heldin P. (Hyaluronan oligosaccharides induce tube formation of a brain endothelial cell line in vitro). **Exp Cell Res**. 1997 Nov 25;237(1):223-30.

55. Montesano R, Kumar S, Orci L, Pepper MS. (Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro). **Lab Invest**. 1996 Aug;75(2):249-62.
56. Itano N, Sawai T, Atsumi F, Miyaishi O, Taniguchi S, Kannagi R, et al. (Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation). **J Biol Chem**. 2004 Apr 30;279(18):18679-87.
57. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. (Hyaluronan fragments: an information-rich system). **Eur J Cell Biol**. 2006 Aug;85(8):699-715.
58. Quinn DAaHGG. Hyaluronan in Acute Lung injury: Apringer Berlin Heidelberg; 2006 Tuesday, August 08, 2006. 10 p.
59. Armstrong SE, Bell DR. (Measurement of high-molecular-weight hyaluronan in solid tissue using agarose gel electrophoresis). **Anal Biochem**. 2002 Sep 15;308(2):255-64.
60. Philipson LH, Schwartz NB. (Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendroglioma cells). **J Biol Chem**. 1984 Apr 25;259(8):5017-23.
61. Aytekin M, Dweik RA. (Low-molecular-mass of hyaluronan was detected in PASMCs from the patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension). **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2011 Jan;300(1):L148.
62. Hascall VC, Majors AK, De La Motte CA, Evanko SP, Wang A, Drazba JA, et al. (Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?). **Biochim Biophys Acta**. 2004 Jul 6;1673(1-2):3-12.
63. de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. (Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function). **Am J Pathol**. 2003 Jul;163(1):121-33.
64. Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P. (Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis). **Biochem J**. 1986 Oct 15;239(2):445-50.
65. Deudon E, Berrou E, Breton M, Picard J. (Growth-related production of proteoglycans and hyaluronic acid in synchronous arterial smooth muscle cells). **Int J Biochem**. 1992 Mar;24(3):465-70.
66. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. (Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells). **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 1999 Apr;19(4):1004-13.
67. Laurent TC, Fraser JR. (Hyaluronan). **Faseb J**. 1992 Apr;6(7):2397-404.