

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA  
PROJE KESİN RAPORU  
EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC  
RESEARCH PROJECT REPORT

**PROJE NO: 05-TIP-029**

**SİROLİMUS'UN DAMAR ENDOTEL  
FONKSİYONLARI VE SERUM KOLESTROL,  
TRİGİSERİD VE HOMOSİSTEİN  
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**PROJE YÖNETİCİSİ**

Doç. Dr. Cenk CAN

**ARAŞTIRMACILAR**

Yrd. Doç. Dr. Ayşe EROL

Uzm. Öğr. Dr. Ayşe PARLAR

**Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD**

Faculty of Medicine

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology

**Bornova-İZMİR**

**2009**

## ÖNSÖZ

Günümüzde organ transplantasyonu sonrası özellikle kalp nakli uygulanan hastalarda mortalitede artışa neden olan en önemli komplikasyonlardan bir tanesi koroner damar hastalıkları ve transplantasyon sonrası gelişen damar fonksiyonu bozukluklarıdır. Bu patolojilere yol açan olaylar arasında organ nakli sonrasında gelişen endotel disfonksiyonu nedeniyle endotelden nitrik oksit salıverilmesinde oluşan düzensizlikler yer almaktadır. Solid organ transplantasyonlarından sonra tek başına ya da diğer immüsupresanlarla kombinasyon halinde rutin kullanıma giren Sirolimus'un güçlü antitümör, antiproliferatif ve immüsupressif özellikleri bulunmaktadır. Organ nakli yapılan hayvan modellerinde allogreft reddinin önlenmesinde diğer immüsupresif tedavilerden farklı olarak son organ toksisitesi oluşturmadığı gözlenen bu immüsupresif ilacın endotel disfonksiyonuna neden olup olmadığı ya da nitrik oksit homeostazını nasıl etkilediği henüz açıklık kazanmamıştır.

Çalışmamızda sirolimusun damar endotel fonksiyonları üzerinde in vivo ve in vitro etkilerinin yanı sıra koroner vasküler hastalık açısından risk faktörleri arasında yer alan serum homosistein, kolesterol ve trigliserid düzeylerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Projemize verdiği destekten dolayı Ege Üniversitesi Araştırma Fonu'na ve Bayındır Hastanesi'ne teşekkür ederiz.

## İçindekiler

Şekil Dizini .....	II
Çizelge Dizini .....	III
Kısaltma ve Semboller Dizini .....	IV
Öz .....	V
Abstract .....	VI
1. Giriş .....	1
2. Literatür Özeti .....	2
2.1. Endotel .....	2
2.2. Endotel Hücre Disfonksiyonu .....	6
2.3. Sirolimus .....	17
2.4. Homosistein .....	24
2.5. Hiperlipidemi .....	26
2.6. Nitrik oksit .....	28
3. Materyal ve Yöntem .....	31
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması .....	31
3.2. İzole Damar Yanıtları Protokolü .....	32
3.3. Endotel Hücrelerinin Üretilmesi ve Çalışma Protokolü .....	32
3.4. Total Nitrit Düzeyi Ölçümü .....	33
3.5. Protein Ekstraksiyonu, Elektroforezi ve Western Blot Deneyleri .....	34
3.6. Serum Homosistein, Kolesterol ve Trigliserid Düzeyi Ölçümleri .....	36
3.7. Sirolimus Serum Düzeyi Ölçümleri .....	36
3.8. Kimyasal Maddeler .....	36
3.9. İstatistiksel Analiz .....	37
4. Bulgular .....	37
4.1. Damar Yanıtları .....	37
4.2. Total Nitrit düzeyleri .....	45
4.3. iNOS Protein Ekspresyonu .....	45
4.4. Serum Homosistein, Kolesterol, Trigliserid ve Sirolimus Düzeyleri .....	47
5. Tartışma, Sonuç ve Öneriler .....	48
6. Teşekkür .....	53
7. Kaynaklar .....	53

## Şekil Dizini

Şekil 1. Sağlıklı Endotel'in Fonksiyonları .....	5
Şekil 2. Endotel Disfonksiyonu Nedenleri ve Sonuçları .....	9
Şekil 3. Restenoz Gelişiminde Öne Sürülen Mekanizma .....	13
Şekil 4. Nitrik Oksid ve Düz Kas Gevşemesi .....	29
Şekil 5. Endotelsiz Aort Preparatlarında Elde Edilen Fenilefrin Konsantrasyon- Yanıt Eğrileri .....	41
Şekil 6. Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen Fenilefrin Konsantrasyon- Yanıt Eğrileri .....	42
Şekil 7. Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen Asetilkolin Konsantrasyon- Yanıt Eğrileri .....	42
Şekil 8. Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen Sodyum Nitroprusit Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri .....	43
Şekil 9. Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen L-Arjinin Konsantrasyon- Yanıt Eğrileri .....	43
Şekil 10. Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen A23187 Konsantrasyon- Yanıt Eğrileri .....	44
Şekil 11. Sirolimus'un (10 ng/ml) iNOS Protein Ekspresyonuna Etkisi .....	46

## Çizelge Dizini

Çizelge 1. Grupların Endotelsiz Aort Preparatlarında Fenilefrin ile Elde Edilen $E_{max}$ ve $pD_2$ Değerleri .....	38
Çizelge 2. Grupların Endotelli Aort Preparatlarında Fenilefrin ile Elde Edilen $E_{max}$ ve $pD_2$ Değerleri .....	39
Çizelge 3. Endotelsiz Aort Preparatlarında Tek Doz KCl (120 mM) ile Elde Edilen Maksimum Kasılma Yanıtları .....	39
Çizelge 4. L-NAME Kontraksiyon Yanıtları .....	40
Çizelge 5. Gruplarda Değişik Ajanlarla Elde Edilen Gevşeme Yanıtlarının $pD_2$ Değerleri .....	41
Çizelge 6. Flasklardan elde edilen süpernatantlarda total nitrit düzeyleri .....	45
Çizelge 7. Grupların Serum Homosistein, Kolesterol ve Trigliserid Düzeyleri .....	47

### **Kısaltma ve Semboller Dizini**

- ADMA: Asimetrik dimetilarjinin
- ADP: Adenozin 5'-difosfat
- BH<sub>4</sub>: Tetrahidrobioplerin
- cGMP: Siklik guanozin 3'-monofosfat
- CsA: Siklosporin A
- EDCF: Endotel kaynaklı kasıcı faktör
- EDRF: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
- EPH: Endotel progenitor hücreler
- FK 506: Takrolimus
- FKBPs: FK 506 bağlayıcı proteinler
- ICAM-1: Hücre içi adezyon molekülü 1
- L-NAME: *N*<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester
- L-NMMA: N-Monometil-L-arjinin
- L-NNA: N-Nitro-L-arjinin
- MCP-1: Monosit kemoatraktif protein-1
- mTOR: Rapamisin'in memelideki hedefi
- NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
- NO: Nitrik oksit
- NOS: Nitrik oksit sentaz
- eNOS: Endoteliyal nitrik oksid sentaz
- iNOS: İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
- nNOS: Nöronal nitrik oksid sentaz
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Süperoksit anyonu
- PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
- SAM: S-adenozilmetiyonin
- sGC: Soluble guanilat siklaz
- SOD: Süperoksit dismutaz
- tFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü
- tPA: Doku plazminojen aktivatörü
- uPA: Ürokinaz

## ÖZ

Çalışmada immunsupresif bir ajan olan sirolimusun sıçan torasik aortunda ve koroner endotel hücre kültüründe endotel hücre fonksiyonu üzerinde nitrik oksid (NO) senteziyle ilişkili etkileri ve serum homosistein, kolesterol ve trigliserid düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Sıçanlara 14 gün süre ile 1.5 mg/kg/gün dozunda sirolimus uygulandı ve organ banyosuna asılan torasik aort halkalarında kasılma ve gevşeme yanıtları değerlendirildi.

L-arjinin gevşeme yanıtları kontrol grubuna göre artarken, kalsiyum iyonoforu (A23187) yüksek konsantrasyonlarında artış izlendi. Potasyum klorür ve L-NAME ile elde edilen kasılma ve asetilkolin, sodyum nitroprusit ile elde edilen gevşeme yanıtlarında ise bir değişiklik gözlenmedi. Sirolimus endotelli/endotelsiz preparatlarda fenilefrin ile elde edilen kasılma yanıtlarında azalmaya neden oldu.

Sıçan kalplerinden elde edilen koroner endotel hücreleri *in vitro* ortamda terapötik konsantrasyonda sirolimus (10nM) ile inkübe edildi ve süpernatantlarda NO salıverilmesinin göstergesi olarak nitrit düzeyleri ölçüldü. Sirolimus indüklenebilir (interlökin-1 $\beta$ ) nitrit salıverilmesini azaltırken bazal ve uyarılmış (A23187) nitrit düzeylerini değiştirmedii. İndüklenebilir NOS (iNOS) enzimi için yapılan Western blot analizinde sirolimus ile inkübe edilen koroner endotel hücrelerinde iNOS protein ekspresyonunun azaldığı saptandı.

Sirolimus serum kolesterol düzeyini artırırken, trigliserid ve homosistein düzeyleri gruplar arasında farklılık göstermedi.

Bulgularımız sirolimusun organ nakli sonrası terapötik konsantrasyonlarda NO aracılıklı endotel fonksiyonunu bozmadığını ve adrenerjik reseptörlerle olası bir etkileşim sonucu vazodilatör yanıtları artırdığını göstermektedir. Öte yandan, ilaç koroner hastalıkların gelişiminde rol oynayan kolesterol düzeylerini artırmaktadır.

**Anahtar Kelime:** Sirolimus, Vasküler Fonksiyon, Nitrik Oksit, Torasik Aort, Sıçan

## ABSTRACT

We investigated the potential effects of the immunosuppressive agent sirolimus on endothelial function with respect to nitric oxide (NO) synthesis in rat thoracic aorta *in vivo* and in rat coronary endothelial cells *in vitro*.

Wistar rats were injected with rapamycin (1.5 mg/kg/d, i.p) for 14 days. After sacrifice, thoracic aortas were suspended in organ chambers and were evaluated in terms of relaxant and contractile vascular responses.

Sirolimus administration resulted in increased relaxant responses to L-arginine and to the higher concentrations of calcium ionophore A23187 in the aortas; however, KCl, acetylcholine, sodium nitroprusside, and  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester responses remained unchanged. In addition, phenylephrine-induced contractions significantly decreased in the aortas regardless of the presence of functional endothelium.

In the *in vitro* series of experiments, isolated rat coronary endothelial cells were incubated with therapeutic concentrations of sirolimus (10 nM). Nitrite accumulation in the supernatants revealed that sirolimus decreased NO release induced by interleukin-1 $\beta$ ; but it did not affect basal or stimulated (A23187) nitrite levels. Western blot analysis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) demonstrated that sirolimus decreased iNOS protein expression in coronary endothelial cells.

Sirolimus administration caused significant increases in serum cholesterol levels whereas serum tryglicerid and homocysteine remained unchanged .

These data suggest that sirolimus in posttransplant therapeutic concentrations not only preserve vascular endothelial function mediated by NO synthesis, but possibly interacts *in vivo* with adrenergic receptors in favor of vasodilatory mechanisms. However, it results in hypercholesterolaemia in favor of increased risk of coronary heart disease.

**Keywords:** Sirolimus, Vascular Function, Nitric Oxide, Thoracic Aorta, Rat.



## 1. Giriş

Transplantasyon sonrası immünosupresif tedavinin düzenlenmesi ameliyat sonrası izlemde en önemli faktördür. İmmun sistemdeki aşırı baskılanma ilaca bağlı özel yan etkilerin oluşma riskini arttırabileceği gibi aynı zamanda fırsatçı enfeksiyonlar veya malignensi gibi “immünotoksik” etkilerinde ortaya çıkmasına neden olabilir. İmmun sistemdeki baskılanmanın yetersiz düzeyde olması ise “red reaksiyonu” ve organ kaybı ile sonuçlanabilmektedir.

Günümüzde organ transplantasyonu sonrası özellikle kalp nakli uygulanan hastalarda mortalitede artışa neden olan en önemli komplikasyonlardan bir tanesi koroner damar hastalıkları ve transplantasyon sonrası gelişen damar fonksiyonu bozukluklarıdır. Bu konuda suçlanan faktörler arasında organ nakli sonrası oluşan endotel disfonksiyonu nedeniyle endotelden nitrik oksit (NO) salıverilmesinde oluşan düzensizlikler yer almaktadır (1).

Sirolimus (Rapamisin), doğal kaynaklardan yeni anti-mikrobiyal ajanların keşfedilmesi programı sırasında Rapa Nui’den toplanan toprak örnekleri arasından izole edilen bir streptomices olan *Streptomyces hygroscopius*’dan üretilen bir makrosiklik antibiyotiktir ve güçlü antitumor, antiproliferatif ve immünosupresif özellikleri mevcuttur (2, 3).

Sirolimus, günümüzde solid organ transplantasyonlarından sonra tek başına yada diğer immünosupresanlarla kombinasyon halinde rutin kullanıma girmiştir. Organ nakli yapılan hayvan modellerinde allogreft reddinin önlenmesinde diğer immünosupresif tedavilerden farklı olarak son organ toksisitesi oluşturmaması, diğer immünosupresanlar ile toksisiteyi arttırmadan sinerjistik etki göstermesi ve belirgin etki gücü klinik kullanımda bu ilaç üzerine olan ilgiyi arttırmıştır (4).

Sirolimusun endotel disfonksiyonuna neden olup olmadığı ya da NO homeostazını bozup bozmadığı açık olarak belirgin değildir. Bugüne kadar sirolimusun endotel hücreleri üzerine etkileri konusunda farklı görüşler ortaya atılmıştır. Togni ve ark., (2005) sirolimusun endotele bağımlı gevşeme yanıtlarını azalttığını öne sürmüşlerdir (5). Bunun aksine Ramzy ve ark., (2006) sirolimusun endotele bağımlı ve bağımsız

gevşeme yanıtlarını etkilemediğini bildirmişlerdir (6). Bu çelişkili bulgular sonucunda sirolimusun endotel hücreleri üzerindeki etkilerin açıklanması önem kazanmaktadır.

Sirolimus yan etkisi olarak görülen hiperlipidemi doza bağımlıdır ve ilacın kesilmesinden sonra hızlı bir şekilde geri döner. Sirolimus alan hastalarda plazma lipidlerinde görülen değişikliklerin nedenleri henüz aydınlatılamamıştır. Arter duvarında oksidasyona duyarlı mekanizmaların aktivasyonu, hücre içi sinyal yollarının modülasyonu, düşük dansiteli lipoprotein artmış oksidasyonu, NO salıverilmesinin bozulması damar duvarı tarafından kontrol edilen tüm fonksiyonları bozabilir ve ateroskleroz gelişimine katkıda bulunabilir (7).

Öte yandan, organ transplantasyonu uygulanan hastalarda homosistein düzeylerinde oluşan yüksekliğin ateroskleroz ve koroner arter hastalığı oluşumu açısından bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (8). Serum homosistein düzeyleri organ transplantasyonu sonrası arttığından (9) immünsupresif tedavinin homosistein düzeyleri üzerindeki etkisi önemlidir. Sirolimusun serum homosistein düzeyleri üzerine olan etkisine yönelik bugüne kadar bir araştırma yapılmamıştır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda günümüzde organ nakli sonrası sık kullanılan bir ajan olan sirolimusun damar endotel fonksiyonları üzerindeki etkilerinin ve serum homosistein, kolesterol ve trigliserid düzeylerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **2. Literatür Özeti**

### *2.1. Endotel*

#### *2.1.1. Endotel Hücre ve Genel Özellikleri*

Endotel, damar duvarı ve damar lümeni arasındaki sinyal bütünlüğünü sağlayarak damar yatağının homeostazını kontrol eden en geniş otokrin, parakrin ve endokrin bir organ sistemidir. Yaklaşık olarak 700 m<sup>2</sup> lik bir alanı kaplamaktadır ve 1.5 kg ağırlığındadır. Yapısal olarak endotel tüm kan damarlarını döşeyen tek katlı uzamış hücrelerden oluşan ve makromoleküllerin difüzyonunu engelleyen yarı geçirgen bir membrandır (10).

Fizyolojik durumlar altında, nitrik oksit, prostasiklin ve endotelin gibi farklı faktörler ile normal damar tonusunun ayarlanması, inflamasyon, lipid metabolizması, damarın

gelişimi ve şekillendirilmesi, trombogenez, trombosit aktivasyonu ve monosit regulasyonu gibi olayları içeren birçok fonksiyonda rol oynamaktadır (11).

Endotel hücreleri, mekanik ve metabolik bakımdan stratejik şekilde yerleşmiştir, damar duvarını dolaşımdan ve kan içeriğinden ayırt etmektedir (12). Damar yatağı, damar duvarı ve adventisyal vazo vazorumaya kadar uzanmaktadır. Adventisyal vazo vazorumaya da aktif damar içi mikrodolaşım olmaktadır ve burası da endotel ile dōşelidir. Bu nedenle endotel fonksiyonu kavramı, damar duvar fonksiyonunu ve adventisyayı içermektedir (13).

Damar duvarı ve endotel mekanik ve kimyasal uyaranlara cevap olarak devamlı bir hasar-tamir işleyişi içerisindedir. Endotel hücreleri 10-15 µm genişliğinde, 20-25 µm uzunluğunda, uzamış çekirdekleri ile damarın uzun eksenini boyunca sıralanmış poligonal hücrelerdir. Bu hücrelerin yüzeylerinin bazen mikrovillus bazen de kıvrım boyutunda uzantılı olması fonksiyon yüzeyini arttırmaktadır. Bu hücreler birbirlerine 2 şekilde bağlanmışlardır:

\*Sıkı bağlantı birimleri (Tight junction)

\*Birleştirici bağlantı birimleri veya aralıklı bağlantı birimleri (Gap junction)

Sıkı bağlantı birimleri, permeabilite kontrolünü üstlenirken, birleştirici bağlantı birimleri hücreler arası iki yönlü etkileşmeyi sağlar.

Endotel hücrelerinde yenilenme yavaştır, nadiren bölünme görülür. Bu hücrelerin kan ve dokuya bakan yüzeyleri de birbirinden farklıdır. Kanla temas eden yüzey proteoglikan tabaka ile kaplıdır ve bu tabaka antitrombotik etki oluşturur. Bu tabaka heparan sülfat, dermatan sülfat ve heparin içerir (14).

### *2.1.2. Endotel kaynaklı kasıcı ve gevşetici biyoaktif maddeler*

Endotel hücreleri vazoaktif ajanlar, büyüme faktörleri, ve büyüme inhibitörleri sentezler ve salgırlar. Büyüme faktörleri arasında, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) sayılabilir. Endotel hücreleri düz kas ve fibroblast hücrelerinden farklı olarak tek tabakalı ürerler ve kontakt inhibisyonları vardır. Endotel büyüme hızını etkileyen iki faktör hücre yoğunluğu ve hücreler arası temastır.

Endotel kan ve dokular arasında seçici bir baraj oluşturur. Gaz geçirgenliği oldukça fazla olan bu katmanın sıvı geçirgenliği azdır. Endotel hücreleri salgıladıkları mediyatörler ile koagülasyonu, fibrinolizi, damar tonusunu, dolayısı ile kan akışını ve kan basıncını etkileyip çeşitli fizyolojik ve patolojik mekanizmalarda rol oynayan son derece aktif hücrelerdir. Endotel hücreleri zar özellikleri ile kan hücrelerinin damar duvarına yapışmasına engel olan non-trombojenik bir yüzey yaratarak tromboz oluşumuna doğal bir engel oluştururlar.

Endotel hücreleri ayrıca kuvvetli bir trombosit antiagreganı ve vazodilatör olan prostasiklini (PGI<sub>2</sub>) sentezler ve salgırlar. Endotel hücrelerinin trombosit agregasyonunu önleyici diğer bir özelliği ise aktif trombositler tarafından salınan adenozin 5'-difosfat (ADP) ve serotoninini plazmadan efektif olarak uzaklaştırabilmeleridir (15).

Damar sisteminin temel korunma yöntemlerinden birisi olan pıhtı oluşması endotel hücreleri ile sağlanırken bu işlemin kontrol altında tutulması da önemlidir ve bu kontrol mekanizmasında endotel hücrelerinin önemli görevleri vardır. Endotel hücresi yüzeyinde bulunan heparin tabakası, antitrombin III için kofaktör görevi görür. Antitrombin III, trombin ve aktif IX, X, XII faktörleri inaktive ederek koagülasyonu kontrol altına alır. Koagülasyon inhibitörü olan protein C'nin trombin tarafından aktivasyonu endotel yüzeyinde bulunan trombomodülin adlı bir faktör ile hızlandırılır.

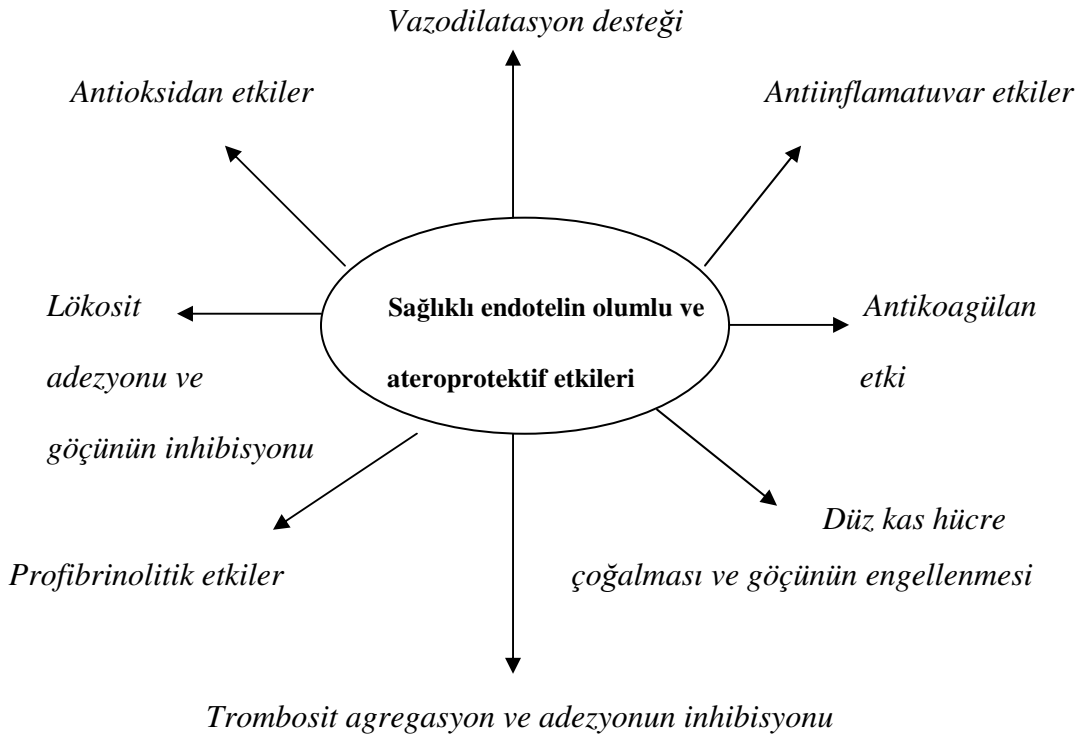
Endotel hücrelerinin önemli rol oynadığı diğer bir sistem fibrinolitik sistemdir. Fibrinolizde fibrinin parçalanmasını sağlayan plasmin, kanda inaktif şekli olan plazminojen halinde bulunur. Bu enzimin aktif olan plazmine dönüşümünü sağlayan, doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinazdır (uPA). Bunlar endotel hücrelerinde sentezlenmektedir. Yine endotel hücre yüzeylerinde bulunan plazminojen, ürokinaz ve tPA bağlanma bölgeleri, plazminojenin plazmine dönüşmesini kolaylaştırdıkları gibi oluşan plazminin etkisinin lokal olmasını ve dolaşımdaki plazmin inhibitörlerinden korunmasını sağlarlar.

Endotel hücreleri lümenal yüzeylerinde bulunan enzimler ile plazmadaki potent bir vazodilatör olan bradikininini hidroliz ederek inaktive ederler. Aynı sistem anjiotensin I'i kuvvetli bir vazokonstriktör olan anjiotensin II'ye çevirir. Endotel hücrelerinin diğer bir fonksiyonu aktif transport ile içeri aldıkları serotoninini inaktive etmeleridir. Ayrıca

potent bir vazodilatör ve trombosit antiagreganı olan adenzini, adenin nükleotidlerine veya inozine çevirirler.

Endotel hücreleri vasküler düz kasların tonüsünü ve trombosit fonksiyonlarını salgıladıkları prostasiklin, endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF), endotel kaynaklı kasıcı faktör (EDCF) ve endotelin ile kontrol ederler. Bradikinin, histamin, asetilkolin (ACh) gibi vazodilatör maddeler etkilerini EDRF salgılatarak gösterirler. Nitrik oksit olarak da adlandırılan bu faktör aynı zamanda trombosit agregasyon ve adezyon inhibitörüdür.

Endotelden salgılanan baskın vazodilatör olan nitrik oksit, trombosit toplanması ve düz kas hücrelerinin çoğalmasında inhibe eder. Baskın vazokonstriktörler olan endotelin-1, anjiotensin-II ve tromboksan ise trombosit agregasyonuna ve düz kas hücrelerinin çoğalmasına katkıda bulunurlar (16).



**Şekil 1.** Sağlıklı Endotel'in Fonksiyonları (12).

### *2.1.3. Endotel fonksiyonunun değerlendirilmesi*

Endotel fonksiyonu sıklıkla farmakolojik veya mekanik uyarılara vazodilatör cevabın değerlendirilmesi ile saptanmaktadır (11). Çok sayıda endotele bağlı agonistler bulunmaktadır, bunların arasında asetilkolin, serotonin, bradikinin, trombin ve P maddesi sayılabilir. Endotel fonksiyonu endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) iki yoldan stimüle ederek test edilebilir. Birincisi endotel üzerinde kan akımı artırılarak oluşturulabilir. Artmış kan akımı (shear stres) endoteli mekanik olarak uyarır. Buna cevap akım ile ilişkili vazodilatasyondur. İkinci olarak endoteldeki reseptörleri stimüle eden kimyasal maddeler infuze edilebilir. Bunlardan en sık kullanılanı asetilkolindir (17).

In vitro ortamda endotel fonksiyonu asetilkolinin değişik konsantrasyonlarına vasküler halka gerilim cevabı ölçülerek değerlendirilmektedir. Asetilkoline normal koroner arter cevabı vazodilatasyon şeklindedir. Endotel disfonksiyonu varlığında vazokonstriksiyon gözlenir. Arteriyal kan akımının arttığı durumlarda, endotel NO ve diğer vazodilatörlerin salgılanması ile cevap verir (18). Anormal cevap ise azalmış vazodilatasyon veya bazen vazokonstriksiyon ile karakterizedir.

## *2.2. Endotel hücre disfonksiyonu*

### *2.2.1. Etiyoloji ve patofizyoloji*

Endotel disfonksiyonu terimi, endotelin azalmış anti-koagulan özellikleri veya damarın yeniden şekillendirilmesinin düzenlenmesinde bozukluk gibi çeşitli patolojik durumlar söz konusu olduğunda kullanılmaktadır. Fakat sıklıkla endotel disfonksiyonu koroner ve periferik dolaşımda endotele bağımlı vazodilatasyon kapasitesinin azalması nedeniyle asetilkoline karşı azalmış yanıtı göstermektedir.

Normal koşullar altında endotelin ana rolü NO üretimi ile vazodilatasyonu kolaylaştırmak ve trombositlerin adezyonunu inhibe etmektir. Damar gevşemesi endotel tarafından üretilen ve düz kas hücreleri üzerine etkili NO ile ilişkili olduğu için endotel disfonksiyonu tipik olarak endotel kaynaklı NO'nun azalmış üretimine ya da artan katabolizmasına bağlanmaktadır. NO üretiminin azalması endotel disfonksiyonundaki temel faktördür. Bu durum vazokonstriksiyon ve trombosit adezyonuna neden olmaktadır.

Oksitativ stres endotel disfonksiyonu patogenezinde önemli bir katkıda bulunmaktadır. Endojen anti-oksidan sistemler tarafından yeteri kadar temizlenemeyen reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması (süperoksit ve diğer serbest radikaller) NO'nun lokal üretimini azaltabilir ya da NO'dan peroksinitrit oluşturarak biyoyararlanımını azaltabilir. Serbest radikallerin oluşumu, sigara içimi, vazoaktif bileşikler (anjiyotensin 2 ve endotelin) ve lipidler (okside düşük dansiteli lipoprotein) gibi faktörlere bağlıdır. Damar hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumu için muhtemel kaynakların varlığı tanımlanmıştır ve bunların tümü NO biyoyararlanımının azalmasından sorumlu olabilir. Bu enzim sistemleri arasında ksantin oksidaz, NADH/NADPH oksidaz, lipooksijenaz ve siklooksijenaz sistemleri bulunmaktadır.

Bu mekanizmaya ek olarak reaktif oksijen türleri endotel disfonksiyonuna, endotelyal eNOS ekspresyonunu değiştirerek de katkıda bulunabilmektedir. eNOS'un enzimatik aktivitesinin bütünlüğünün korunması endotele yeterli miktarda NO sağlanması için gereklidir. İn vitro çalışmalarda beklenmedik bir şekilde reaktif oksijen türlerinin eNOS protein seviyelerinde yükselmeye neden olduğunu gösterilmiştir ve bu durum lokal NO eksikliği sonucu ikincil bir reaksiyon olarak enzim aktivitesinin artması ile açıklanmıştır (10,19).

Endotel disfonksiyonuna katkıda bulunan diğer bir faktör, NOS'ın kaveoline bağlanması sonucu enzimin inaktivasyonuna neden olan mekanizmadır. Kaveolin, hücre membranındaki yağdan zengin bölgenin bir bileşimidir. Bu yapılar statin kullanımı ile azalır, sonuçta kaveolin azalır serbest NOS ve buna bağlı olarak NO artar.

Kemik iliği kaynaklı endotel kök hücreleri ve endotel progenitor hücreler (EPH) damar zedelenmesinin tamirine katkıda bulunurlar ve doku hasarının yeniden şekillendirilmesinde rol oynarlar. Endotel hücreleri bitişik kan damarlarında bulunan ya da kemik iliği kaynaklı dolaşan EPH'lerden orijin alabilir. Damar hasarının EPH'ler ile onarılması, hasar tarafındaki endotel fonksiyonunun normal hale getirilmesi ile ilişkilidir. Endotel disfonksiyonu varlığında, damar zedelenmesinin onarımı azalmış olabilir. Endotel disfonksiyonunun derecesi, EPH sayısı ile ilişkili olabilir. Damar endotel disfonksiyonu ile ilişkili olan bir diğer olası mekanizma damar onarımı için gerekli olan EPH'lerin göreceli eksikliğidir. Azalmış NO aktivitesinin varlığında, bu hücrelerin fonksiyonu ve zedelenme sonrası damarın onarımına olan katkıları

azalmaktadır. Endotel disfonksiyonu ile ilişkili bir durum olan tip 2 diabette EPH'lerin doku tamirine katkıları azalmaktayken, endotel fonksiyonunu iyileştirdikleri bilinen statinlerin kullanımı sırasında EPH'lerin hasarlı bölgeye hareketi ve fonksiyonu artmaktadır (10).

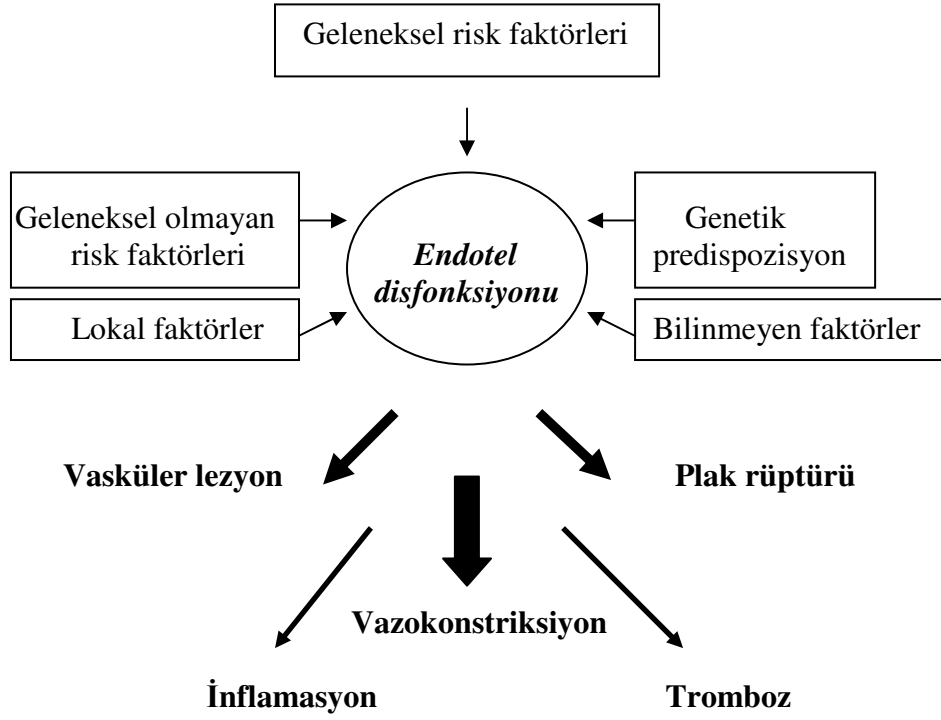
Endotel disfonksiyonu NO gibi vazodilatörlerin biyoyararlanımında azalmanın yanısıra endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin miktarında artma ile karakterizedir. Bu dengesizlik sonucu endotele bağlı vazodilatasyonda bozukluk oluşur ki bu durum endotel disfonksiyonu için karakteristiktir. Öte yandan, endotel disfonksiyonu, proinflamatuvar, proliferatif ve prokoagülan özellikler ile karakterize bir "endotel aktivasyonu" durumu da sergiler.

Endotel disfonksiyonu ile ilişkili olan risk faktörleri arasında hiperlipidemi, hipertansiyon, diabet ve sigara içimi yer almaktadır ve tüm bu faktörler reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ya da artmış oksidatif stres ile ilişkilidir. Tüm bu faktörler hücrel hasarın gelişmesine katkıda bulunurlar. Bu yüzden artmış oksidatif stres endotel disfonksiyonu patogenezinde rol oynayan major mekanizma olarak düşünülmektedir ve endotel üzerindeki risk faktörlerinin ortak patolojik mekanizmasını oluşturmaktadır. Endotel disfonksiyonu oluşma riski, risk faktörlerinin sayısı ile doğru orantılı bir şekilde yükselmektedir (12).

### *2.2.2. Endotel disfonksiyonu ve kardiovasküler olaylar*

Endotel disfonksiyonunun varlığı kardiyovasküler patolojilerin görülme olasılığını arttırmaktadır. Koroner endotel disfonksiyonu NO'in azalmış biyoyararlanımı ile karakterizedir ve bu durum myokardial iskemi ile ilişkili olabilir. Anjiyografi ile normal koroner arterler saptanan hastalarda koroner mikrovasküler endotel disfonksiyonu ile anjina pectoris arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bonetti ve ark. (2003), koroner endotel disfonksiyonunun, miyokard perfüzyon bozukluklarına neden olarak miyokard iskemisine yol açtığını göstermişlerdir. Bunlara bağlı olarak miyokard iskemisinin epikardiyal arterler veya koroner mikrodamarlardaki endotel disfonksiyonu sonucu oluştuğu söylenebilir (12).





**Şekil 2.** Endotel disfonksiyonu nedenleri ve sonuçları (12).

Endotel disfonksiyonu unstabil anjina ve myokard infarktüsü gibi akut koroner sendromların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Plak rüptürüne yol açan tehlikeli bir süreç olan plak destabilizasyonu plak içindeki hücrelerin ve çeşitli proinflamatuvar mediyatörlerin etkileşimi sonucu oluşmaktadır. Endotel disfonksiyonu da artmış oksidatif stres ile ilişkilidir ve bu durum inflamatuvar süreçler için önemli bir uyarandır. NO plak parçalanmasını arttıran inflamatuvar mediyatörleri ve adezyon moleküllerini azaltabilir, bu nedenle disfonksiyonel bir endotel azalmış anti-inflamatuvar etkiye bağlı olarak plağın destabilizasyon olasılığını arttırmaktadır.

Endotel disfonksiyonu ile ilişkili olan vazokonstriksiyon koroner plakların fiziksel olarak parçalanmasını tetiklemektedir. Bunun yanı sıra endotel disfonksiyonunun karakteristiği olarak güçlü bir vazokonstriktör olan endotelin-1'in salınımı fokal vazokonstriksiyona ve miyokardial iskemiye neden olmaktadır. Endotel disfonksiyonu vazo vasorumları da içerecek şekilde vasküler mikro dolaşımı da etkilemektedir (10).

Sağlıklı endotel NO ve prostasiklin gibi antiagregan, heparin ve protein C/S gibi anti-koagulan ve doku plazminojen aktivatörü gibi fibrinolitik özellikleri ile anti-trombotik bir özellik göstermektedir. Endotel disfonksiyonu varlığında endotelin bu özelliklerinin azalması ve prokoagülatör mediyatörler salgılama potansiyalinin artışı trombojenik bir ortam yaratılmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra trombosit kaynaklı mediyatörler endotel disfonksiyonu varlığında vazokonstriksiyonu indüklemektedirler. Bu uyarana vazokonstriksiyon cevabı endotelin-1 tarafından arttırılmaktadır ve bu mediyatörün plazma düzeyleri erken ve ilerlemiş ateroskleroza bulunan hastalarda artmaktadır.

Ateroskleroz bir çok faktöre bağlı gelişen bir hastalıktır. Bu süreçteki başlangıç adımını endotel disfonksiyonu olarak tanımlanan endotel hasarı oluşturmaktadır. Endotel disfonksiyonu gevşetici ve kasıcı faktörler arasında, anti- ve pro- koagulan mediyatörler arasında, ve büyümeyi inhibe edici ve çoğaltıcı faktörler arasındaki dengesizlik ile karakterizedir. Normal koşullar altında endotel stres oluşturan etkenlere karşı prostasiklin ve NO gibi vazodilatör bileşikler salgılayarak cevap verir. NO, eNOS aracılığı ile L-arjininden oluşur. NO düz kas hücreleri içerisine difüze olur ve burada guanilat siklazı uyarır. Bunu takip eden süreçte siklik guanilat-monofosfatın hücre içi konsantrasyonu artar, bu da hücre içi kalsiyumunda azalma ve düz kas hücrelerinde gevşeme ile sonuçlanır.

Endotelin bütünlüğü bozulduğunda, endotelin özellikle düşük dansiteli lipoprotein (LDL) olmak üzere aterojenik lipid partiküllerine geçirgenliği artar ve lipid partikülleri damar duvarında toplanırlar. Bu lipid partikülleride çoğunlukla oksidasyon olmak üzere metabolik bir sürece girerler. Gerek bu durum gerekse endotel fonksiyonundaki hasar sonucu hücre içi adezyon molekülü 1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve monosit kemotaktik protein-1 gibi kemotaktik proteinlerin üretimi uyarılır. Sonuçta inflamatuvar hücrelerin, monositlerin ve T hücrelerinin göç etmesi uyarılır ve monositler damar duvarında makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar ise lipidi fagosite eder ve köpük hücrelerini oluştururlar. Bu durum klinikte yağlı çizgilenme olarak bilinmektedir ve aterosklerotik sürecin başlangıcını oluşturmaktadır. Okside LDL, monositler ve T hücreleri için kemotaktik özellik göstererek ve makrofajların mobilitesini bozarak aterosklerozun ilerlemesini hızlandırır. Öte yandan okside LDL immünojendir ve antikor üretimini ve immün komplekslerin oluşumunu indükler ki bu durum LDL'nin makrofajlar tarafından

fagositozunu hızlandırır. Endotel prokoagülan özellik gösterir ve vazoaktif moleküller, sitokinler ve büyüme faktörleri oluşturur. Damar düz kas hücrelerinin göçü ve çoğalması bu büyüme faktörleri ile uyarılır. Süreç devam ettikçe arter duvarı kalınlaşır. Başlangıçta arter duvarı 'remodelling' olarak adlandırılan fenomen ile lümen daralmasını aşamalı bir genişleme ile kompanse edebilir. Daha sonra artmış sayıda makrofajlar ve lenfositler lezyona girerek çoğalırlar ve bu hücrelerin aktivasyonu hidrolitik enzimlerin, sitokinlerin, kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımına neden olur. Sonunda fokal nekroz ve fibrozise bağlı olarak normal damar duvar yapısı bozulur.

Endotel hücreleri lokal homeostazı ve trombolizi düzenler, vazoaktif bileşikler üretir ve düz kas hücrelerini dolaşımdaki büyümeye-yardımcı faktörlerin etkisinden koruyan geçirgen olmayan bir bariyer oluştururlar. Bazal membranın birçok parçasını üretirler ve fibroblast büyüme faktörü, platelet-kaynaklı büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ , heparin ve düz kas hücre çoğalmasında önemli olan birçok büyüme-inhibitörü faktörlerini sentezlerler (20). Endotel hücreleri konfluent bir şekilde tek sıra olduklarında replikasyonu durdururlar. Endotel disfonksiyonu sonucu hücre kontakt inhibisyonunun bozulması distal ve proksimal travmatize olmayan kısımlarda hızlı endotel hücre çoğalması ile sonuçlanır. Düz kas hücreleri endotelizasyonu bozulan damar segmentine doğru çoğalarak göç ederler ve burada neointimal doku oluşumuna neden olacak şekilde çoğalmaya ve ekstraselüler matriks proteinlerini salgılamaya devam ederler.

Balon anjioplastisi ve stent takılması sonrası oluşan stent içi restenoz gelişiminde endotel hücreleri önemli bir rol oynamaktadır ve endotel bütünlüğünün bozulması bu sürecin oluşumuna katkıda bulunan başlıca olaydır. Stent takıldıktan sonra stent entegrasyonunun 3 fazı tanımlanmıştır (21). Akut fazda (< 6 hafta), damar lümeni ile arter duvarı arasındaki sınır ince, çok katlı trombüs tarafından oluşturulur ve implantasyon alanında endotel hücreleri bulunmamaktadır. Entegrasyon devam ederken, artmış sayıda düz kas hücreleri ve ekstraselüler matriks miktarı saptanabilir. Orta fazda (6-12 hafta), neointima ekstraselüler matriksten ve artmış sayıda düz kas hücrelerinden oluşmaktadır. Artan sayıda endotel hücreleri stent neointimasının luminal yüzeyinde bulunurlar. Kronik fazda ise (3 ay), ilk olarak tam bir re-endotelizasyon dikkat çeker. Matriks yapıları artarken, düz kas hücrelerin sayısı azalmıştır.

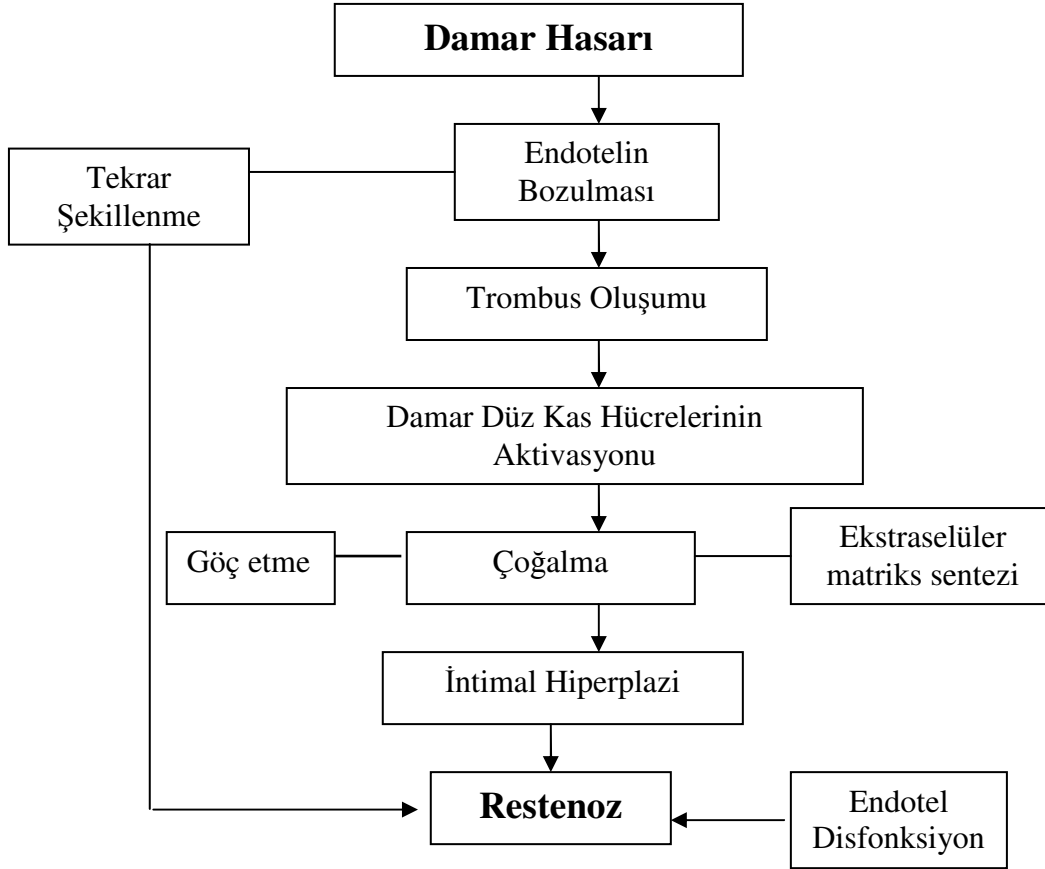
Endotel yüzeyinin küçük bir kısmında bozulma olduğunda çok az bir oranda intimal hiperplazi gözlenmesine rağmen (22), büyük alanlar bozulduğunda önemli bir oranda intimada kalınlaşma meydana gelir (23). Trombus oluşumu ile birlikte olan fokal fibrin depozisyonu genellikle stent implantasyonu sonrası ilk 3 günde gözlenir ve arter duvarındaki hasarın derinliği ve genişliği ile orantılıdır. İnflamasyon neointimal hiperplazide primer bir rol oynamaktadır. İnflamasyon damar yaralanmasına eşlik eder ve büyüme faktörlerini ve sitokinleri salan trombosit ve lökositleri etkiler. Bu da düz kas hücrelerinde aktivasyonu başlatır.

Endotel fonksiyonu klasik risk faktörleri olarak bilinen hipertansiyon, hiperlipidemi, diabetes mellitus, sigara içimi, renal yetmezlik ve hiperhomosistinemi gibi faktörler tarafından etkilenmektedir. Hipertansiyon 'shear stress'i artırarak endotel fonksiyonunu bozar. Hipertansiyon sonucu eNOS, siklooksijenaz-2 ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi vazoprotektif maddelerin up-regülasyonunu sağlayan normal akımı bozulur. Kardiyovasküler risk faktörleri süperoksit gibi toksik radikallerin oluşumunu indüklerler. Süperoksit peroksinitrit oluşumu ile nitrik oksidi inaktive eder. Peroksinitrit güçlü bir oksidan maddedir ve lipid peroksidasyonu oluşturma yeteneğindedir.

Homosistein asimetrik dimetilarjinin (ADMA) akümüasyonu ile endotel disfonksiyonunu indükleyebilir. ADMA NO prekürsörü L-arjininin analogudur ve NOS enzimini inhibe eder. İndirgenmiş homosistein damar fonksiyonu bakımından homosisteinin en zararlı formunu oluşturmaktadır (8, 9).

### *2.2.3. Endotel disfonksiyonu ve Transplantasyon*

Endotel hücrelerinin transplant sürecinin başarısında ya da başarısızlığında hayati bir önemi bulunmaktadır. Bu sürecin kendisi bir inflamatuvar kaskadı tetikleyerek endotel hasarına yol açan olaylara neden olmaktadır. Bunun yanı sıra bir çok immünespresif ajan da bu sürece katkıda bulunmaktadır. Glukokortikoidler ve kalsinörin inhibitörü siklosporin ve takrolimus endotel disfonksiyonunu indüklerken, antiproliferatif ajanlar ise endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü yavaşlatarak greft vaskülopatisine karşı korunmaya yardımcı olurlar (24).



**Şekil 3.** Restenoz gelişiminde öne sürülen mekanizma (23).

Transplantasyon sürecinde beyin ölümü, organı koruma girişimleri, cerrahi travma, iskemi-reperfüzyon, verici antijenlerine karşı gelişen alloimmün yanıtlar, sitomegalovirus enfeksiyonu, immünsupresif tedavinin toksisitesi, hiperlipidemi ve glukoz intoleransı gibi faktörler endotel disfonksiyonuna neden olabilir (4). Bu disfonksiyonun sonucu olarak endotel adezyon molekülü ve kemokin ekspresyonu artar, vasküler büyüme faktörleri ve trombojenik moleküller eksprese olur ve immün hücreler grefti istila ederler. Mikrodolaşımın bütünlüğü ve yeterli doku oksijenizasyonu organ fonksiyonu için gerekli önkoşuldur ve özellikle organ nakli sonrası organ disfonksiyonu bulunan hastalarda önem taşır. Organ disfonksiyonu gelişiminde mikrodolaşımın düz kas hücreleri, lökositler, eritrositler ve endoteli içeren hücresel komponentlerinin hemen hemen tamamı bu süreçte yer almaktadır. Nötrofillerin jeneralize aktivasyonu ve sekestrasyonu ile birlikte olan abartılı mediyatör salınımı yaygın mikrovasküler hasara ve bunu takip eden endotel hasarına katkıda bulunabilir (25).

Böbrek nakli son dönem böbrek hastalığı olanların çoğunluğunda tercih edilen tedavi şeklidir ve üremi sonucu oluşan bir çok patofizyolojik durum transplantasyon sonrası iyileşme göstermektedir. Yine de, nakil sonrası endotel disfonksiyonu gelişebilir veya varolan disfonksiyon devam edebilir. Bu kısmen kullanılan immüsupresif ajanlara kısmen de transplant sonrası belli bir süre devam eden üremiye bağlıdır. Bugüne kadar böbrek nakli sonrası endotel disfonksiyonu hakkında kesin bulgular yeteri kadar değerlendirilememesine rağmen, son dönemdeki çalışmalar böbrek nakli sonrası endotel disfonksiyonun anlamlı bir şekilde bozulduğunu göstermiştir. Bu durum ya immüsupresyon amacıyla kullanılan ilaçların oluşturduğu etkiye ya da transplantasyon sonrası dönemde devam eden ve endotel disfonksiyonuna neden olan kronik üremiye bağlıdır (26).

Kalp transplantasyonu sonrası gelişen akut transplant reddinin önlenmesi ve tedavisi konusunda önemli gelişmeler olmasına karşın çoğu nakil kronik red sürecine girmektedir. Verici organı ile immün cevap oluşturan hücreler arasında ilk biyolojik bağlantı allogreft endotel hücreleridir. Kronik red sürecinde alıcı dendritik hücreleri endotel hücrelerine yapışırlar, allogreft dokuyu istila ederler, yabancı antijenleri yakalarlar, lenfoid damarlara ve sekonder lenfoid organlara göçerler ve sonuçta alıcının T-hücrelerine alloantijenleri sunarlar. Sadece uyarılmış T hücreleri antijenleri bulabilmek için perifere göç etmektedirler. Nakledilmiş organı istila eden aktif T-hücreleri endotelyal/subendotelyal bölgede devam eden immün aktivasyona katkıda bulunurlar.

Epikardiyal ve mikrovasküler endotel disfonksiyonu klinik olarak asetilkolin, P maddesi, soğuk-basınç testi ve dinamik egzersiz gibi endotele bağımlı uyarılara karşı anormal damar yanıtları ile saptanabilir. Asetilkoline cevap olarak azalmış vazodilatasyon veya paradoksik vazokonstriksiyon oluşur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aortik allogreftin damar duvarında eksprese olmaktadır. iNOS reddedilen greftlerde yapısal değişikliklerin gelişimini önlemektedir. L-argininin kısıtlı olmadığı durumlarda iNOS aracılığı ile NO oluşmaktadır ve bu durumda iNOS inflamasyonu ve aterogenezi baskılamaktadır. Ancak, L-argininin yeterli olmadığı durumlarda iNOS süperoksit iyonunun oluşmasına neden olmakta, bu da lokal oksidatif stresi ve inflamatuvar süreci arttırmaktadır. İnsan kardiyak allogreftinde mikrovasküler endotel disfonksiyonu endomiyokardial iNOS'un mRNA ekspresyonunun artması ile ilişkilidir.

Endotel hasarı ve onarım mekanizmaları kardiyak allogreft vaskülopatisinde başlıca patolojik rolü oynamaktadır. Gerek immünitete bağlı özellikler (kronik red) gerekse immüniteden bağımsız faktörler (metabolik değişiklikler, CMV enfeksiyonu) allogreft endotel disfonksiyonuna katkıda bulunmaktadır ve bu duruma kısmen eNOS yolağındaki düzensizlik neden olmaktadır. Sonuç olarak endotel disfonksiyonu kronik allogreft reddinin başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunur (27).

#### *2.2.4. Endotel disfonksiyonu ve immünsupresyon*

Transplantasyon sonrası red reaksiyonunun önlenmesinde günümüzde kullanılan immünosupresif ajanlar arasında kortikosteroidler, lenfosit proliferasyon inhibitörleri (azotipirin ve mikofenolat mofetil), kalsinörin inhibitörleri (siklosporin ve takrolimus), proliferasyon inhibitörleri (sirolimus, everolimus), T lenfositlerine karşı (antitimosit globulin) veya T-hücre reseptörü CD3'e karşı mono veya poliklonal antikolar, IL-2 reseptörü CD25 alfa zinciri antikoları (daklizumab ve basiliximab) yer almaktadır. Son zamanlarda romatoid artritte kullanılan leflunomid, FK 778 (meflunomid; leflunomidin aktif metaboliti), everolimus ve FTY 720 gibi ajanlar da tedaviye girmiştir. Bu ajanların hipertansiyon, hiperlipoproteinemi ve hiperglisemi gibi endotel hücre disfonksiyonuna neden olan yan etkilerinin yanı sıra endotel hücreleri üzerinde spesifik direkt etkileri de saptanmıştır (28).

Kalsinörin inhibitörleri immünsupresyonun sağlanmasında şu anda kullanılan en güçlü ajanlardır. Vazokonstriksiyon oluşturmak üzere anjiotensin II gibi vazodilatör metabolitler ile etkileşime girerler ve doza bağımlı bir şekilde endoteldeki oksidatif stresi artırırlar. Kalsinörin inhibitörleri TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 ve IL-2 gibi sitokinlerin salınımını ve ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltmaktadır. Takrolimus IL-10 salınımını artırırken, siklosporin matriks metalloproteinaz-2 ve -9 salınımını inhibe etmektedir. Siklosporin tedavisi NO düzenlenmesini değiştirerek, vazodilatör cevapta bozulmaya neden olmaktadır (29).

NO'in bozulmuş homeostazisi mRNA'daki veya eNOS ekspresyonundaki azalmanın sonucu olabilir. Çeşitli araştırmacılar siklosporin tedavisinden sonra eNOS mRNA ekspresyonunun azaldığını ortaya koymuştur. Bu nedenle azalmış NO üretiminin eNOS protein sentezindeki azalmaya ya da serbest radikal üretiminde

artmaya kayışa bağlı olduğu öne sürülebilir. Siklosporinin serbest radikal oluşumuna neden olduğuna dair kanıtlarda bulunmaktadır. Bu serbest radikallerin oluşumu, direkt endotel hasarı ve vazomotor fonksiyonda bozulma ile sonuçlanabilir (30).

Oflaz ve ark. (2003), siklosporinin endotel disfonksiyonunu takrolimusa oranla daha fazla bir oranda bozduğunu bildirmişlerdir (31). Wilasrusmee ve ark. (2003), mikrovasküler kapillerde prostaglandin I<sub>2</sub> ve endotelin-1 salınımını üzerine yaptıkları çalışmada siklosporinin *in vitro* kapillerin yapısını bozduğunu ve kapiller endotelin-1 salınımında artışa yol açtığını, takrolimusun ise bu etkilere neden olmadığını göstermiştir (32).

Glukokortikoidler endotel hücreleri ve damar düz kas hücreleri üzerine etki ederek vasküler reaktiviteyi düzenlerler. Metilprednizolon endotel hücrelerinden NO ve ET-1 salınımını arttırırken, deksametazon IL-1, MMP-1, -3, -9 sekresyonunu azaltmakta ve metalloproteinaz-1'in doku inhibitörünün salınımını azaltmaktadır (30).

Kalsinörin inhibitörleri ve glukokortikoidlerin tersine mikofenolat mofetil gibi proliferasyon inhibitörlerinin endotel aktivitesi üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Endotelden NO üretimini arttırmakta ve endotel hücrelerinin çoğalmasını, göç etmesini ve anjiogenezi azaltmaktadır. Diğer bir proliferasyon inhibitörü olan sirolimusun kalp transplantasyonu yapılan hastalarda kardiyak allogreft vaskülopatisini azalttığı gösterilmiştir. Everolimus da akut reddi ve kardiyak allogreft vaskülopatisini azaltmaktadır (30).

Eisen ve ark. (2003) transplantasyon başlangıcında sirolimusa başlanmasının akut red epizodlarını 6. ayda yaklaşık olarak % 40 oranında azalttığını ve ikinci yılın sonunda koroner arter lümen genişliğinin korunduğunu bildirmişlerdir. Sirolimus aynı zamanda damar düz kas hücrelerindeki içecek şekilde hemopotetik ve nonhemopotetik hücrelerin büyüme faktörü ile uyarılan çoğalmalarını da inhibe etmektedir. Çeşitli çalışmalar sirolimusun hem anti-proliferatif etkisinin bulunduğunu hemde transplant vaskülopatisinin gelişimine karşı koruyucu etkisinin bulunduğunu ortaya koymuştur(33).

Öte yandan, sirolimusun endotel hücrelerinden vazoaktif maddelerin salınımı üzerine olan etkisi tartışmalıdır. Bu ilacın PG I<sub>2</sub> ve ET-1 düzeylerini arttırdığı ilk olarak tavşan endotel hücrelerinde tanımlanmıştır (34). Sirolimus insan mikrovasküler endotel



hücrelerinde ET-1 seviyelerinde kuvvetli bir artışa neden olurken, NO üretimini ılımlı bir düzeyde artırmıştır (35).

Endotel disfonksiyonu kronik allogreft reddinin başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Allogreftte normal endotel fonksiyonunu korumaya yönelik stratejiler transplant vaskülopatisinin başlamasını ve gelişimini yavaşlatmada yararlı olacaktır (30).

### 2.3. Sirolimus

#### 2.3.1. Sentez ve etki mekanizması

Sirolimus, doğal kaynaklardan yeni anti-mikrobiyal ajanların keşfedilmesi programı sırasında Rapa Nui'den toplanan toprak örnekleri arasından izole edilen bir streptomiçes olan *Streptomyces hygroscopicus*'dan üretilen bir makrosiklik antibiyotiktir. Aktif kısmı streptomiçesin miçel kısmından elde edilmiş ve saflaştırılma işlemi sonrası elde edilen kristalin maddesinin güçlü antifungal aktivitesi olduğu bulunmuştur (2,3). Sirolimus güçlü anti-kandida aktivitesine sahip bir antifungal ajan olarak izole edilmesine karşın, bu özelliğine eşit derecede güçlü antitümör, antiproliferatif ve immünosupresif özellikleri de mevcuttur (4,36). Bunun yanı sıra kemirgen modellerinde adjuvan ile indüklenen artrite ve deneysel alerjik ensefalomyelite karşı koruyucu özelliği gözlenmiştir (37). Organ nakli yapılan hayvan modellerinde allogreft reddinin önlenmesinde diğer immünosupresif tedavilerden farklı olarak organ toksisitesinin yokluğu, diğer immünosupresanlar ile birlikte kullanıldığında toksisiteyi arttırmadan sinerjistik etki göstermesi ve fark edilir gücü klinik kullanımda bu ilaç üzerine olan ilgiyi arttırmıştır (4).

Sirolimus beyaz kristal yapısında katı bir maddedir ve erime noktası 183-185 derece arasındadır. Yapısal olarak lipofilik makrosiklik laktondur ve çoğu organik çözücüde çözünebilir, ancak suda neredeyse hiç çözünmez (36,37).

Etki mekanizması :

#### 1. İmmünofilinler ile etkileşim:

Sirolimusun etki mekanizması, makrosiklik immünosupresif ajanlar sınıfındaki ilaçlara benzer. Bu ajanların hücresel aktivitesi immünofilinler olarak adlandırılan özel

sitozolik bağlanma proteinlerine bağlanabilmelerine bağlıdır. Siklosporin A (CsA) ve FK 506 (Takrolimus) bu bileşik sınıfının diğer üyeleridir. Siklik bir peptid olan CsA siklofilin ile bir kompleks oluştururken, sirolimus ve ona yapısal olarak benzeyen immünosupresif FK 506, FK 506 bağlayıcı proteinler (FKBPs) olarak adlandırılan immünofilinler ile etkileşirler. Bu ajanlar immünosupresif etkilerini hücre içi bağlayıcı proteinler olan immünofilinlerin doğasında var olan peptidil prolil sis-trans izomeraz aktivitesinin inhibisyonu aracılığı ile göstermektedirler (39,40). İlaçların kendi immünofilinlerine bağlanması peptidil prolil izomeraz aktivitesini inhibe eder. Hem sirolimus hem de FK 506, FKBP'lerin izomeraz aktivitesini inhibe ederler; fakat etkilerini gösterebilmeleri için izomeraz aktivitesinin inhibisyonu yeterli değildir. Sirolimus ve FK 506'nın çok sayıdaki analogu izomeraz aktivitesini bloke eder ancak immünosupresif etki göstermezler. Sonuç olarak ilaç-immünofilin kompleksinin oluşumu immünosupresif aktivite için zorunlu olmasına rağmen izomeraz aktivitesinin inhibisyonu rastlantısal ve gerekli değildir (38,41). İlaç-immünofilin etkileşmesi diğer spesifik hücre içi hedeflerin aktivitesini düzenleyen bir immünosupresif kompleksin oluşumu ile sonuçlanır. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda FKBP ailesinin birçok üyesi aydınlatılmasına rağmen, biyokimyasal ve genetik çalışmalar sirolimusun immünosupresif etkisi için en ilgili bağlanma proteininin FKBP12 olduğunu öne sürmektedir (42). Sirolimus biyolojik olarak aktif hale gelebilmek için FKBP12'ye bağlanır (43).

## 2. Sirolimus-FKBP12 kompleksinin memeli hedefi

FK506 ve CyA'nın kendi immünofilinleri ile yaptığı kompleks, erken T hücre aktivasyonu için gerekli olan  $Ca^{+}$ /kalmmodulin – bağımlı serin/treonin fosfataz kalsinörünü inhibe eder. Kalsinörünün FK506 ve CyA tarafından inhibisyonu sitokinlerin ve T hücrelerinin erken aktivasyonunu bloke eder. Sirolimus:FKBP kompleksinin hedefi (rapamisin'in memelideki hedefi:mTOR) kalsinöründen farklıdır. Sirolimus:FKBP kompleksinin hücre içi hedefi için yapılan araştırmalar sonucunda, rapamisin'in hedefi (TOR) olarak adlandırılan hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli bir düzenleyici keşfedilmiştir (44,45). Memeli TOR'u (mTOR), 289-kD'luk bir proteindir. Sirolimus:FKBP kompleksi direkt olarak mTOR'a bağlanır ve fonksiyonunu bloke eder. mTOR inhibisyonu T hücrelerinde (44), osteosarkom hücrelerinde (46), myojenik hücre

dizilerinde (47) ve düz kas hücrelerinde (48) hücre siklusunun G<sub>1</sub>'den S fazına ilerlemesini önleyen IL-2 ile yönetilen sinyal transdüksiyon yollarını bloke eder .

Sirolimusun hedefleri TOR 1 ve TOR 2 proteinleridir (49). Sirolimus mayalarda hem TOR1 hemde TOR 2'yi inhibe ederek G<sub>1</sub>'den S fazına geçişi durdurur (50).

mTOR fonksiyonunun sirolimus tarafından yönlendirilen inhibisyonu hücre siklusunun düzenlenmesinde kritik rol oynayan çok sayıdaki biyokimyasal olayı etkilemektedir.

### 3. Sirolimusun biyokimyasal hedefleri:

FKBP:RAPA:mTOR kompleksi p70<sup>S6k</sup>,nın ve onun nükleer izoformu p85<sup>S6k</sup>,nın mitojen ile indüklenen aktivasyonunu inhibe etmektedir (50).

Sonuçta, sirolimus çeşitli sinyal transdüksiyon yollarını inhibe ve bloke ederek hücre siklusunun G<sub>1</sub> fazından S fazına ilerlemesini engellemektedir. Günümüze kadar elde edilen bulgular göstermektedir ki tüm bu etkiler TOR'un büyüme faktörü ile indüklenen aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Sirolimus tarafından etkilenen olaylar zincirindeki ilk basamağın mTOR tarafından birden fazla fosfataz ya da kinazların fosforilasyon sonucu aktivasyonları olduğu düşünülmektedir (51).

mTOR p70 ribozomal S6 kinazı (S6K1) aktive etmektedir. Aktivasyon sonrası S6K1, 40 S ribozomal altünitesinin S6 proteinini fosforile eder. S6'nın aktivasyonu, protein sentezi için gerekli olan elongasyon faktörü eEF-2 veya ribozomal proteinleri içeren mRNA transkriptlerinin translasyonunu artırır. Bu protein sentezinde mTOR aktivasyonu ile sağlanan artış sirolimus tarafından bloke edilmektedir (51).

Yine, S6K1 aktivasyonu sonucu cAMP ile indüklenen geç gen transkripsiyonu ve nükleer hücre antijeninin proliferasyonu sirolimus tarafından inhibe edilmektedir. Sirolimusun hücre düzeyindeki etkilerinden birisi de, T hücrelerinde CD28 ile yönetilen IL-2 transkripsiyonunun güçlendirilmiş upregulasyonunu etkilemesidir.

Protein translasyonuna neden olan ve mTOR tarafından etkilenen diğer bir biyokimyasal olay eIF-4E bağlayıcı proteinin (4E-BPI) fosforilasyonudur. mTOR tarafından 4E-BPI'in fosforilasyonu, hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli olan bazı özel mRNA'ların translasyonuna yardım etmektedir. Bu olaylar sirolimusun mTOR aktivasyonunu inhibe etmesi ile bloke olmaktadır (51).

Protein translasyonu üzerindeki etkilerine ilave olarak, sirolimus, cdc-2 ve siklin A gibi hücre-siklus proteinlerinin sentezinde de azalmaya neden olmaktadır (48).

Sirolimus bilinen en güçlü anti-kandida bileşiklerinden biridir. *In vitro* çalışmalarda Candidaya karşı, nistatin ve amfoterisin B'ye oranla daha düşük minimum inhibitör konsantrasyona (MİK) sahip olduğu gözlenmiştir (3). Sirolimusun anti-fungal aktivitesinin ortaya çıkması için sirolimus:FKBP kompleksinin oluşumu gereklidir (4).

Anti-kandida etkisine ilaveten, sirolimus aynı zamanda sırasıyla lenfoid, santral sinir sistemi, hepatik, melanositik, osteoblastik, renal, transforme hücre dizilerinin çoğalmasını ve aynı zamanda T ve B hücrelerin çoğalmasını da inhibe eder (52). Sirolimus sadece lenfositik lösemi P388'e karşı sınırdaki aktif olarak bulunmasına karşın, B16 melanokarsinoma, EM ependimoblastoma, CD8F1 meme ve Kolon 38 tümörlerine karşı çok etkilidir (53).

Sirolimusun immünosupresif etkileri T ve B hücre aktivitesi üzerine olan inhibitör etkileri aracılığıyla gerçekleşmektedir. İlaç mitojenler, alloantijenler, forbol esterleri ve kalsiyum iyonofor, lenfokinler, ve monoklonal antikolar ile (ör: CD3 ve CD 28) hücresele reseptörlerin çapraz bağlantıları ile indüklenen kemirgen, domuz ve insan T lenfosit proliferasyonunu inhibe etmektedir (39).

Bu sonuçlar,  $Ca^{2+}$  a bağımlı yolları kullanarak T hücre stimülasyonunu bloke eden siklosporin A ve takrolimusun aksine sirolimusun  $Ca^{2+}$  a bağımlı veya bağımsız sinyal transdüksiyon yolları ile proliferasyonu inhibe ettiğini göstermektedir. Sirolimus hücre-siklus ilerlemesini orta-geç G1 fazında bloke eder. T hücrelerinin IL-2 ile indüklenen proliferasyonunu bloke eder (43). İlacın etkileri sadece T hücrelerinin IL-2 veya IL-4 ile yönetilen proliferasyonu ile kısıtlı değildir, aynı zamanda IL-12, IL-7, ve IL-15 ile yönlendirilen aktive T hücrelerinin proliferasyonunu da inhibe eder (54,55,56).

Sirolimus aynı zamanda kalsiyumdan bağımsız bir yol ile lipopolisakkarid ile indüklenen B hücre proliferasyonunu da inhibe etmektedir. Hücre siklusunun orta-G1 fazında stafilokokkus aureus ve CD40L ile stimüle edilen, normal insan B lenfositlerinin IL-2'ye bağımlı ve bağımsız proliferasyonunu da inhibe eder. Ayrıca IL-2 veya IL-6'ya bağılı olarak antikor-üreten hücrelere farklılaşmayı engelleyerek IgA, IgM ve Ig G üretimini azaltır. Aynı zamanda immünglobulin M, G, A üretimini de

azaltır. Kalp transplantasyonu yapılan sıçanlarda, sitotoksik IgG2c-blokan antikorların üretimini azaltmaktadır (45).

Sirolimusun B hücrelerinin farklılaşması ve çoğalması üzerindeki inhibitör etkileri ile antikor üretimi üzerine olan etkileri onun güçlü immüno-regulator etkisine katkıda bulunmaktadır. Kalp transplantasyonu yapılan sıçanlarda sirolimusun sitotoksik IgG2c blokan antikorların üretimini bloke ederken nonsitotoksik antikorların üretimini etkilemediği bildirilmiştir. Sirolimusun aktivitesi sadece immün sistem hücreleriyle kısıtlı değildir. Non-lenfoid tümör hücrelerinin çoğalmasını temel fibroblast büyüme faktörü ile (b-FGF) veya platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ile uyarılan düz kas hücrelerinin çoğalmasını etkilediği gösterilmiştir. Aynı zamanda hepatositlerin ve fibroblastların çoğalmasını da inhibe etmektedir (53).

Sirolimus non-immün hücrelerin büyüme faktörü ile yönetilen çoğalmasında inhibe etmektedir. Sığır aortunda ve insan endotel hücrelerinde temel fibroblast büyüme faktörü (tFGF) ile indüklenen çoğalmayıda engellemektedir. Diğer bir etkisi tFGF ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDBF) ile indüklenen düz kas hücre çoğalmasını inhibe etmesidir (49,50).

### *2.3.2. Endikasyonları ve yan etkileri*

Sirolimus günümüzde solid organ transplantasyonlarından sonra tek başına ya da diğer immüno-supresanlarla kombinasyon halinde rutin kullanıma girmiştir. Böbrek bozukluğu olan hastalarda kalsinörin inhibitörleri olan siklosporin ve takrolimusa iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Kalp naklinde de etkili bir immüno-supresif olarak gözükmektedir (57).

Anjioplasti sonrası balon hasarına bağlı olarak arter duvarlarında düz kas hücrelerinde çoğalma ve göçe bağlı olarak intimal kalınlaşma meydana gelir, sirolimusun bu süreç üzerindeki etkileri sıçan modelinde balon-katater hasarı ile indüklenen restenozis modelinde araştırılmıştır. 13 gün boyunca 1.5 mg/kg dozunda uygulanan sirolimus %65 oranında intimal kalınlığı azaltmıştır (58). Yakın zamandaki klinik araştırmalar sirolimus ile kaplı stentlerden lokal olarak salınan sirolimusun etkili bir şekilde anjioplasti geçiren hastalarda neointimal proliferasyonu bloke ettiğini göstermiştir (59).

Sirolimusun yan etkileri arasında hematolojik (trombositopeni, lökopeni, anemi), biyokimyasal (hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi, hiperglisemi), metabolik (hipokalemi, hipofosfatemi) yan etkiler ve hipertansiyon, ağız ülserleri, artralji, bozulmuş yara iyileşmesi ve tremor bulunmaktadır. Sirolimus nefrotoksik, nörotoksik ve diabetojenik etkiler göstermemektedir. Tümör hücrelerinin ve immün hücrelerin çoğalmasını inhibe eder. Fibroblast ve düz kas hücre çoğalması üzerine olan inhibitör aktivitesi kronik red süreci içerisinde oluşan tipik damar değişikliklerinin önlenmesinde rol oynamaktadır. Siklosporin ve takrolimus greft arteriopatisi üzerinde böyle bir etki oluşturmadığı için böyle bir etkinin sirolimus için ortaya konulması önemlidir. Sirolimus Epstein-Barr virus ile transforme olan B hücrelerinin çoğalmasını da inhibe etmektedir (60).

İn vitro siklosporin ile sinerjistik etkileri vardır. Artmış lipid düzeyleri sadece kardiovasküler hastalıklar ile ilişkili değildir aynı zamanda kronik red reaksiyonunun başlamasına da katkıda bulunmaktadır.

İlacın yan etkisi olarak görülen hiperlipidemi doza bağımlıdır ve ilaç kesilmesinden sonra hızlı bir şekilde geri döner. Sirolimus alan hastalarda plazma lipidlerinde görülen değişikliklerin nedenleri henüz aydınlatılamamıştır. Bu hastalarda VLDL, IDL ve LDL fraksiyonları ve bunlara eşlik eden apoproteinler yükselmektedir. Bu lipoproteinlerin katabolizmasının azaldığı gösterilmiştir. Sirolimus serbest yağ asidi havuzunu genişletmektedir ve trigliseridlerin karaciğerde üretimini ve VLDL'nin salgılanması arttırmaktadır. Sirolimus hormona-duyarlı lipazın etkisini arttırabilir, ve lipoprotein lipazı inhibe edebilir. Böbrek nakli yapılan hastalarda sirolimusun plazma lipid düzeyleri üzerine olan yan etkilerinin kısmen insülin sinyal yolundaki bozukluklara bağlı olabileceği belirtilmiştir. Bu kişilerde adipoz dokudan yağ salınımı ve karaciğer yağ sentezini düzenleyen lipoprotein lipaz dengesi arasında bozukluk olabilir (61).

Uzun dönemde hedef kan konsantrasyonu 4-12 ng/ml dir (62), farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalarda, sirolimusun 5-60 ng/mL arasındaki tam kan konsantrasyonlarının tavşan, köpek, domuz ve sıçanlarda herhangi bir anlamlı yan etki oluşturmaksızın homogreft sağkalımını desteklediği görülmüştür (63).

### 2.3.3. Sirolimus ve endotel fonksiyonu

Endotel disfonksiyonu hem aterosklerotik hastalığın ilerlemesi hem de gelecekteki kardiyovasküler olaylar ile ilişkilidir. Sirolimusun endotel disfonksiyonuna neden olup olmadığı ya da NO homeostazisini bozup bozmadığı açık olarak belirgin değildir. Bu nedenle ilacın endotel hücreleri üzerindeki etkileri önemlidir. Bugüne kadar sirolimusun endotel hücreleri üzerine etkileri bakımından farklı görüşler ortaya atılmıştır.

İlacın antiproliferatif, antimigratuvar ve anti-inflamatuvar özellikleri akut reddi, kalp nakli sonrası arteriopatiyi ve stent içi restenozu önlemede pay sahibidir. Sirolimus salan stent takılan hastalarda yapılan çalışmada 1 yıllık takip sonucu sirolimusun immünesupresif etkilerine rağmen re-endotelizasyonu bozmadığı bildirilmiştir (64).

Sirolimus, kardiyak allogreft vaskülopatisinde ilerlemeyi yavaşlatmaktadır. Akut red oranını yaklaşık %40 oranında azaltır ve koroner arter lümeninin yaklaşık 2 yıl boyunca kapanmasını engeller (65,66). Yapılan çalışmalarda sıçan aort halkalarında doza bağımlı bir şekilde vazomotor gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir (67,68).

Sirolimus plazma ET-1 düzeylerini azaltmaktadır. Normal damar fonksiyonu NO ve ET-1 arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Sirolimusun endotel hücreleri üzerindeki etkileri açık olmamakla birlikte NO biyoyararlanımını arttırarak ve oksidatif hasarı azaltarak endotel fonksiyonunu iyileştirebilir

Çeşitli çalışmalarda sirolimusun anti-proliferatif etkisinin ve transplant vaskülopatisi gelişmesine yönelik koruyucu etkisinin olduğu belirtilmiştir. Corbin ve ark.(1994), doza bağımlı olarak sirolimusun aort damar halkalarında vazodilatasyon yaptığını göstermişlerdir (69).

Sadece balon anjioplasti ile kıyaslandığında, sirolimus salan koroner stentlerin implantasyonu, oluşan komplikasyonları ve restenoz riskini azaltmaktadır. Fakat stent içi daralma perkutan tedavinin başarısını uzun dönemde etkileyen önemli bir klinik problemdir. Stent içi daralmanın en önemli nedeni düz kas hücrelerinin fazla miktarda toplanması sonucu oluşan neointimal hiperplazidir. Sirolimus salan stentlerin kullanımı stent içi daralmanın önlenmesinde umut vaat etmektedir (70).

Sirolimus endotele bağımlı gevşemeyi arttırmaktadır ve vazodilatör etkisi olan ilk güçlü immünesupresif ajandır (71). Endotel hücreleri üzerinde gevşemeyi arttırıcı

etkilerinin bulunduğunu gösteren bulguların yanısıra (6,71,74) endotel disfonksiyonuna neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (5,72,73).

Sirolimusun endotel disfonksiyonu oluşturması altında yatan mekanizma direkt toksik etkisine bağlı olarak gecikmiş damar iyileşmesi ve azalmış büyüme olabilir. Aynı zamanda bu ilaç endotel hücrelerinin yapışma karakterini negatif olarak etkilemektedir. Endotel hücreleride birbirlerine değmeye bağımlı hücreler olduklarından yavaş bir şekilde rejenere olmaktadırlar. Sirolimusun anti-anjiojenik etkisi bulunmaktadır. Vasküler endotelyal büyüme faktörünü azaltmakta ve bunun sonucunda damar endotel hücrelerinin cevabını inhibe etmektedir. Bu da endotelyal iyileşmeyi geciktirebilir (5,72,73) .

## *2.4. Homosistein*

### *2.4.1. Homosistein metabolizması*

Homosistein yüksek oranda reaktif, sülfidril içeren bir amino asittir ve metiyonin metabolizmasında oluşan bir ara üründür. Metiyoninden, hücrel metilasyonun major donörü olan S-adenozilmetiyonin (SAM) oluşur. SAM daha sonra S-adenozilhomosisteine, hücrel metilasyon için bir metil grubu verdikten sonra da homosisteine dönüşür. Homosisteinin daha sonraki metabolizması hücrelerde ve kanda homosistein düzeyini azaltmak üzere iki şekilde gerçekleşir; sisteine trans-sülfürasyon vitamin B6'ya bağımlı sistatyonin- $\beta$ -sentaz ile katalizlenir, betainden veya metilentetrahidrofolattan bir metil grubu alınarak metiyonine remetilasyon metiyonin sentaz veya metilentetrahidrofolat redüktaz ile katalizlenir. Remetilasyon için vitamin B12 ve folik asid önemli ko-enzimlerdir. Homosistein metabolizması ile etkileşen birçok faktör bu aminoasidin plazma konsantrasyonunu tayin eder. Bu faktörler arasında genetik anormallikler, beslenme defektleri, renal yetersizlik, yaş ve cinsiyet sayılabilir ve bu faktörlerin tümü yükselmiş homosistein düzeyleri ile ilişkilidir. Yine trans-sülfürasyon ve remetilasyon yollarında rol oynayan enzimlerdeki genetik defektler ve kofaktörlerdeki (folik asit, Vitamin B6 ve Vitamin B12) diyete bağlı eksiklikler homosistein klirensini bozarak plazma homosistein düzeylerini yükseltirler (75).



#### 2.4.2. Hiperhomosisteinemi ve endotel hücre fonksiyonu

Bugüne kadar homosisteinin oluşturduğu vasküler patolojiyi açıklamak için 4 major biyokimyasal mekanizma ileri sürülmüştür (76,77):

1. Reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna neden olan oto-oksidasyon
2. Biyolojik transmetilasyonun güçlü bir inhibitörü olan S-adenozilmetiyonini oluşturan hipometilasyon
3. Nitrik oksite bağlanarak nitrozilasyon
4. Homosisteini protein ile birleştirerek protein homosisteinilasyonu

Hiperhomosisteinemi, kardiovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörüdür. Plazma homosistein düzeylerinin düşürülmesinin, endotel disfonksiyonunu iyileştireceği bilinmektedir (75). Sağlıklı bireylerde homosistein düzeyleri 5-10  $\mu\text{M}$  arasındadır. Ciddi hiperhomosisteinemi'nin bir nedeni homosisteini sistatyonine dönüştüren, sistatyonin- $\beta$ -sentaz enziminin eksikliğidir. Ciddi hiperhomosisteinemisi olan hastalar genellikle, nörolojik anormallikler veya erken aterosklerozis ile başvururlar ve 30'lu yaşlar civarında bu kişilerde serebral tromboz veya myokard infarktüsü gelişir (78).

Homosisteinin oluşturduğu patolojinin mekanizmaları (79,80):

1. Çeşitli hayvan modellerinde, hiperhomosisteinemi ateroskleroz gelişiminde erken bir olay olan bozulmuş endotel fonksiyonunu indüklemiştir. Bu durum antioksidan enzim glutatyon peroksidaz inhibisyonuna bağlı superoksit oluşumu nedeniyle nitrik oksitin oksidatif inaktivasyonuna bağlıdır. Hiperhomosisteinemi, protein kinaz C aktivasyonu ile eNOS aktivitesini ve endotel fonksiyonunu bozmaktadır
2. Suprafizyolojik düzeydeki homosistein seviyeleri babunlarda endotel üzerinde direkt toksik etkiye sahiptir, kültüre endotel hücrelerde ise apoptozise neden olur
3. Homosistein damar düz kas hücre çoğalmasını uyarır.
4. İnsanlarda hiperhomosisteinemide görülen arteriyal ve venöz trombozlardan trombosit oluşumunda meydana gelen aktivasyonu sorumlu olabilir.
5. Homosistein, insan monositlerinde ve endotel hücrelerde monosit kemoatraktif protein-1 (MCP-1) ve IL-8 in ekspresyonu ve sekresyonunu artırır. MCP-1,

aterosklerotik lezyon gelişiminde önemli bir evre olan endotele monosit bağlanmasını ve bunların endotel altı boşluğa geçişini arttırır.

6. Hiperhomosisteinemi, kolesterol ve trigliseridlerin artmış hepatic biyosentezine ve uptake ine neden olur.

Hiperhomosisteinemi hipometilasyon ile, karaciğer lipid metabolizmasını değiştirerek makrofajlar içine LDL alınımını arttırır. Damar duvarında kolesterol ve trigliserid toplanmasına neden olarak ateroskleroz gelişimine yardımcı olur. Hiperhomosisteinemi plasma total kolesterol düzeyini arttırmakta ve HDL-kolesterolü azaltmaktadır (75).

## 2.5. Hiperlipidemi

### 2.5.1. Kolesterol düzeyleri ve endotel hücre fonksiyonu

Geleneksel koroner risk faktörleri arasında yüksek homosistein seviyeleri yanı sıra, ileri yaş, erkek cinsiyet, hiperkolesterolemi, sigara içme, hipertansiyon, diabetes mellitus, yüksek yağlı diet, inaktivite ve erken koroner kalp hastalığına ait aile öyküsü sayılabilir (81). Lipidlerin endotele uptake'inde ve çökmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu mekanizmada LDL-reseptörleri ve lipoprotein lipaz görev yapmaktadır.

Sirolimusun önemli yan etkilerinden bir tanesini oluşturan hiperkolesterolemi sık karşılaşılan klinik, metabolik ve genetik bir bozukluktur ve damar duvarının yapısal ve fonksiyonel hasarının gelişmesine katkıda bulunur. Bu zararlı etkilerin altında yatan, lokal inflamatuvar cevabın oluşması ve sitokin ile büyüme faktörlerinin salınmasıdır. Arter duvarında oksidasyona duyarlı mekanizmaların aktivasyonu, hücre içi sinyal yollarının modülasyonu, düşük dansiteli lipoprotein artmış oksidasyonu, NO salınmasında azalma damar duvarı tarafından kontrol edilen tüm fonksiyonları bozabilir ve ateroskleroz gelişimine katkıda bulunabilir (82).

Hiperkolesterolemi ve endotel disfonksiyonu arasındaki ilişki:

- Hiperkolesterolemi endotel adezyon moleküllerinin ekspresyonunu, trombosit toplanması ve adezyonunu arttırır ve vazokonstriksiyona neden olur.

- Vasküler inflamasyonu artırır ve metalloproteinazlarda artış ile kollajen plağının bozulmasına neden olur, bu da plak insitabilitesine yol açar.
- Süperoksit radikallerinin üretimini artırır, süperoksit ve diğer serbest oksijen radikalleri NO ile hızlı bir şekilde birleşerek onu deaktive eder.
- L-arginin ile substrat düzeyinde yarışan, dolaşan bir amino asit olan asimetrik dimetilarjinin (ADMA) düzeylerinde artışa neden olur.
- Gen ekspresyonunu ve protein kinaz C'yi artırarak endotelin-1 üretiminde artışa yol açar.
- Trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve transforme edici büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerine yanıt olarak salıverilen endoteline karşı koroner arterlerin vazokonstriktör yanıtını artırır.
- NOS' un membran inhibitör proteini olan kaveolini arttırarak bu enzimin aktivitesini azaltır.

#### 2.5.2. Trigliserid düzeyleri ve endotel hücre fonksiyonu

Sirolimusun diğer bir yan etkisi de hipertrigliseridemidir. Hipertrigliseridemi endotel disfonksiyonuna oksidatif stres oluşturarak neden olmaktadır. Bu süreç içerisinde NO' i inaktive eden süperoksit anyonunun aşırı oluşumu yer almaktadır. NO ve süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) peroksinitrit oluşturmak üzere reaksiyona girerler, peroksinitrit güçlü, uzun ömürlü bir oksidan maddedir. Sitotoksik peroksinitrit anyonu proteinlerdeki sülfidril gruplarını okside eder, lipid peroksidasyonunu başlatır ve birçok transdüksiyon yolunu etkileyen amino asitleri (ör:tirozin) nitratlar. Deneysel ateroskleroz modellerinde VLDL'nin nitrozilasyonu görülmüştür bu da artmış peroksinitrit oluşumunun bozulan lipid metabolizması ile ilişkili olabileceğini gösterir (84, 85). Peroksinitrit güçlü bir oksidandır, VLDL oksidasyonu, antioksidan savunmanın zayıflaması ve enzim inaktivasyonuna neden olur. Bunun yanı sıra endotel hücreler üzerinde direkt sitotoksik etki göstermektedir (84).

## 2.6. Nitrik oksit (NO)

Atmosferde kirletici bir gaz olarak bilinen nitrik oksit'in memeli hücrelerinde sentezinin gösterilmesi, çeşitli biyolojik olaylar hakkında önemli bulgular sağlamıştır.

'Endotel kaynaklı gevşetici faktör' olarak bilinen NO suda az çözünen bir gazdır. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür. NO'in yarı ömrü 3-5 sn'dir. NO metabolize olmayan bir bileşiktir. Hormon özelliği taşımaz, çünkü oksihemoglobin ile reaksiyona girer ve hızlı bir şekilde nitrata dönüşür. Etkinliği vücuttan uzaklaştırılma veya yıkılma süresine bağlıdır (85,86).

NO yapısal bir enzim olan nitrik oksit sentaz aracılığı ile sentezlenir. NOS L-arginin'i substrat olarak kullanır. Bunun yanı sıra nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kalmodulin ve dört kofaktör [hem, flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>)] gereklidir. Reaksiyon sırasında iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomu, arjinin substratına girerek, NO ve sitrülini oluşturmaktadır(85).

Nitrik oksit sentazın hücre ve organlardaki yerleşimi, Ca<sup>++</sup> uyarısına duyarlılığı ve klonlanan genlere göre saptanmış 3 ayrı izoformu vardır.

- i) Nöronlarda bulunan nöronal NOS (nNOS)
- ii) Damar endotelinde bulunan endotelial NOS (eNOS)
- iii) Makrofajlar, nötrofiller, hepatositler ve kardiyak miyositler gibi pek çok farklı hücrede bulunan indüklenebilir NOS (iNOS).

Bu izoformlardan endotelial ve nöronal formlar (konstitütif) (cNOS), diğeri ise uyarılabilir (indüklenebilir) (iNOS) niteliktedir.

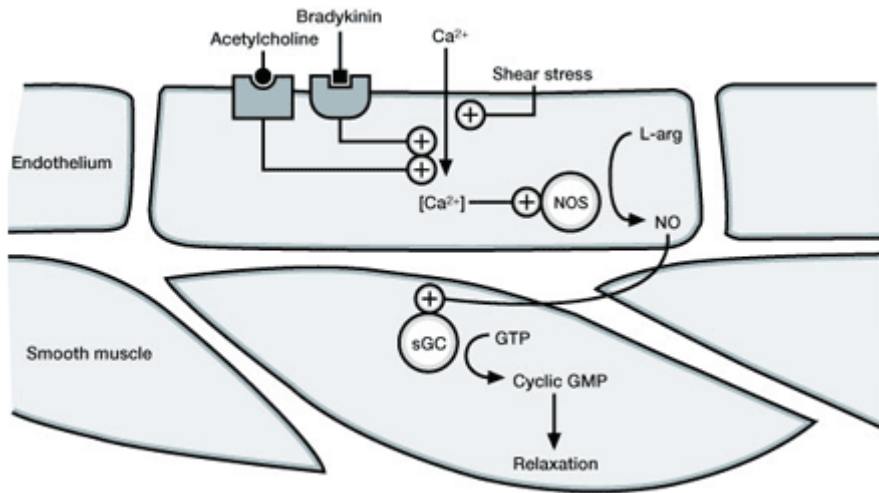
Beyin NOS'u , serebellum, hipokampus ve olfaktör loblardaki spesifik nöronlar dahil SSS'de ve gastrointestinal sistem, pelvik organlar ve trakea innervasyonu dahil non-adrenerjik non-kolinerjik sinirlerde bulunmaktadır. Vasküler NOS, endotelin yanı sıra trombositler ve renal mezengial hücrelerde de bulunmaktadır (87).

cNOS kalsiyum/kalmodulin tarafından denetlenirken, iNOS fizyolojik sınırlar içerisinde Ca<sup>++</sup>'a bağımlı değildir. Bunun nedeni kalmoduline çok sıkı bağlanmış olmasıdır (85).

NO oldukça reaktif bir moleküldür. Havada ise düşük konsantrasyonlarda stabildir. Akciğerlerde lokal olarak meydana geldiğinden dolayı küçük bir miktar NO inaktivasyondan kurtulabilir ve dışarıya atılan havada tespit edilebilir. Diğer bölgelerde, iyonlar ve hemoglobin gibi makromoleküller ile reaksiyona girerek ya inaktif hale gelir ya da NO taşıyıcı ara ürünler oluşur ve sentez edildiği bölgeden uzak yerlerde etki göstermesi sağlanır (7).

NO'nin makromoleküller ile reaksiyona girmesi hücre hasarına yol açabilir. Bu, organizmanın savunma reaksiyonları, ve bazı patolojik durumlar sırasında oluşan büyük miktarlardaki NO'nin oluşturduğu bir kısım etkileri açıklayabilir. NO, nitrit iyonuna ( $\text{NO}_2^-$ ) okside olur ve sonra 20 dk içerisinde tüm kanda nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüşür. NO membranlardan serbest bir şekilde geçebilir ve difüzyon vasıtasıyla lokal etkilerinin çoğunu gösterir. Sistein ve/veya sülfür içeren bileşikler gibi bazı taşıma mekanizmaları ile sentez edildiği yerden daha uzak bölgelerde de etki gösterebilir.

Hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  düzeylerinin artmasıyla birlikte endotel hücrelerinde oluşan NO, komşu düz kas hücrelerinde bulunan soluble guanilat siklazın (sGC) hem komponentine bağlanır. Nitrozilasyon sonrası hem demiri porfirinin yapısından çıkar. Bu değişiklik sonrası guanilat siklazın katalitik bölgesi aktive olur. Siklik guanozin 3'-monofosfat (cGMP) yapımı artar ve vasorelaksasyon oluşur ( Şekil 4 ) .(88).



**Şekil 4.** Nitrik oksit ve düz kas gevşemesi (88).

NO aynı zamanda adenozin 5'-difosfat (ADP) ribozil transferaz enzimini de aktive eder. Tiol bileşikleri ile reaksiyona girerek S-nitrozotiol (RS-NO) bileşiklerini oluşturur. Bu reaksiyon, albumin gibi serum proteinlerinde bulunan reaktif sülfidrillerle meydana gelebilir. Bu ürünler, NO'nun uzun dönem depolanmasını gösterirler (7).

Endoteldeki L-arginin/NO yolağı periferik damar direncini ve sistemik kan basıncını etkileyen bir fizyolojik vazodilatör mekanizmadır. cGMP hücre çoğalmasını inhibe eder, bazal endotel NO sentezi ateroskleroz'a karşı korur ve anjiogenezi etkiler. Nötrofil ve monositlerde oluşan NO ile, bu oluşumu sağlayan uyarıların neden olduğu süperoksit anyonu reaksiyona girer ve vücuda giren organizmaları öldüren sitotoksik peroksinitrit anyonu oluşur (7).

NO oluşumu bazı L-arginin analogları tarafından inhibe edilmektedir. N-Monometil-L-arginin (L-NMMA) NO'nun endotel hücrelerinden salınmasını bloke eder ve izole damar preparatlarında nitrovazodilatörlere yanıtı değiştirmeden endotele bağlı gevşemeleri inhibe eder. N-Nitro-L-arginin (L-NNA) L-NMMA'dan daha güçlüdür. L-NNA'nın metil esteri olan L-NAME ise L-NNA'ya göre sıvılarda daha iyi çözünür ve bu yüzden araştırmalar da yeğlenmektedir.

### *2.6.1. Nitrik oksit ve endotel fonksiyonu*

Nitrik oksit devamlı bir şekilde endotel tarafından sentezlenir. Bu madde, damar gevşemesi, lokal hücre büyümesinin düzenlenmesi, kanda dolaşan plateletler ve diğer hücrelerden oluşabilecek hasarlardan damarı korumak gibi çeşitli roller üstlenerek vasküler homeostazisin devamını sağlamaktadır (89). NO güçlü bir vazodilatör ve trombosit toplanmasının inhibitörüdür. Bu nedenle endojen nitratın vazospazmı ve trombus oluşumunu engellemede önemli bir koruyucu rolü vardır. NO'nun çok sayıdaki patofizyolojik etkileri göz önünde tutulduğunda, anormallikler birçok farklı mekanizma ile oluşabilir (90):

1. Arter duvarında NO oluşturma yeteneğindeki agonistler veya fizyolojik stimulus ile etkileşen reseptörlerde bozulma;
2. L-argininin azalmış konsantrasyonları ya da bozulmuş kullanımı;

3. Hem indüklenabilir hem de endotelial nitrik oksit sentazın aktivitesi yada konsantrasyonunda azalma;
4. Hasarlanmış endotelden NO salınımının azalması;
5. Endotelden damar düz kas hücrelerine NO difüzyonunun zayıflaması ve NO'in vazodilatör etkilerinin azalması;
6. Serbest radikal oluşumunun artışı ile NO'in degradasyonunda artış;
7. NO'in guanilat siklaz ile azalmış etkileşimi ve c-GMP üretiminin kısıtlanması

### 3. Materyel ve Yöntem

Proje çerçevesinde gerçekleştirilen çalışmanın protokolü Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay Tarihi: 15.07.2005, Sayı No: 2005-28) ve deney hayvanlarıyla ilgili tüm girişimler US National Institutes of Health tarafından yayınlanan "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH Yayınları no: 85-23, 1996 revizyonu) kılavuzluğunda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda 200-250 gr. arası erkek albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar  $21 \pm 3^\circ$  C oda ısısında 12/12 gece periyodunda kalacak şekilde gruplar halinde kafeslere yerleştirildi. Hayvanlara sınırlama yapılmadan standart sıçan yemi ve musluk suyu (*ad libitum*) verildi.

Sıçanlar 10'ar hayvandan oluşan 3 gruba ayrıldı.

- 1) Kontrol: 14 gün süre ile serum fizyolojik (i.p.) uygulandı.
- 2) Çözücü : 14 gün süre ile sirolimus çözücüsü etanol (i.p.) uygulandı.
- 3) Sirolimus: 14 gün süre ile 1.5 mg/kg sirolimus(i.p.) (6) uygulandı.

14 gün sonunda sıçanların torasik aortları derin eter anestezisi altında  $4^\circ$  C Krebs Henseleit solüsyonu içerisine çıkarıldı. Endoteli hasarlamadan yağ ve destek dokusundan temizlenen aort preparatları 2-3 mm.'lik halkalara ayrılarak vasküler reaktivite deneyleri için kullanıldı.

### 3.2. İzole Damar Yanıtları Protokolü

Endotelsiz halkalarda uygulanacak çalışmalar için damar lümeni içerisinde ince bir penset geçirilerek düz kas hasarlanmadan endotel ortadan kaldırıldı. Ardından endotelli ve endotelsiz halkalar 37 ° C'de Krebs Henseleit solüsyonu içeren 30 ml.lik organ banyolarına 2 gr istirahat gerilimi altında asıldı. 60-90 dk.lık adaptasyon döneminin ardından endotelli halkalarda submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile prekontraksiyonun ardından asetilkolin ( $10^{-9}$  - $3 \times 10^{-5}$  M) ve kalsiyum iyonofor (A23187) ( $10^{-9}$  - $3 \times 10^{-6}$  M) gibi endotel aracılı gevşetici ajanların, nitrik oksit prekürsörü L-arjinin'in ( $10^{-7}$  - $3 \times 10^{-4}$  M) ve endotel aracısız düz kas gevşetici bir ajan olan sodyum nitroprusit'in (SNP) ( $10^{-10}$  - $3 \times 10^{-6}$  M) oluşturduğu gevşeme yanıtları saptandı.

Yine, endotelli preparatlarda bazal NO salıverilmesinin değerlendirilmesi amacı ile tek doz fenilefrin ( $EC_{50}$ ) ile kasılan preparatlarda kasılmanın plato fazına ulaşmasından sonra tek doz L-NAME (100  $\mu$ M) verilerek elde edilen ek kasılmalar saptanıp fenilefrin ile elde edilen değere orantılandı. Endotelsiz preparatlarda ise kümülatif olarak uygulanan fenilefrin ( $10^{-9}$  - $3 \times 10^{-5}$  M) ve maksimum depolarizan konsantrasyonda (120 mM) uygulanan potasyum klorür (KCl) ile elde edilen kasıcı yanıtlar saptandı. Kümülatif fenilefrin yanıtları endotelli preparatlarda da elde edildi. Oluşan gerilim değişiklikleri izometrik güç ileticisi ile (BIOPAC MP35 COMMAT İletişim Ltd., Ankara) bilgisayar ortamında kaydedildi ve aynı program aracılığı ile analizi yapıldı. Tüm ajanların  $E_{max}$  ve  $pD_2$  değerleri Graph Pad ve Polywin 95 ver 1.0 programı aracılığı ile saptandı.

### 3.3. Endotel Hücrelerinin Üretilmesi ve Çalışma Protokolü

Koroner mikrovasküler endotel hücrelerinin izolasyonu ve kültüre edilmesinde daha önce tanımlanmış yöntem kullanıldı (91). Çalışmalarda 10-12 adet erkek albino sıçan kullanıldı. Eter anestezisi altında toraksları açılan sıçanların kalpleri çıkarılıp hızlı bir şekilde aorttan kanüle edildi. Ardından kalpler Langendorff perfüzyon sistemine asıldı ve retrograd olarak yaklaşık 10ml/dak hızda sabit akımla ve karbojenle (%95 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub>) gazlandırılan 37 °C'teki Krebs solüsyonuyla perfüze edildi. Daha sonra bir perfüzyon pompası aracılığıyla kalpten çıkan koroner effluentin tekrar kalbe resirküle edilmesi sağlandı ve perfüzyon ortamına % 0.04 (w/v) kollajenaz (Type II) ve 0.25 $\mu$ M Ca<sup>++</sup> eklendi.



30 dakikalık enzimatik sindirimden sonra kalpler Langendorff setinden çıkarılarak ventriküller ince bir makas yardımıyla küçük parçalara kesildi. Ventrikül parçaları, %1 (w/v) sığır serum albumini içeren resirkülasyon sıvısında 10 dakika süre ile 37 C° de karbojen ile gazlandırılarak inkübe edildi. Doku homojenatı miyozit ve bağ dokusu hücrelerinin uzaklaştırılması amacı ile 150g'de 3 dakika süre ile santrifüje edildikten sonra üstteki süpernatant ayrıldı. Hücre süspansiyonu miyositler çöktürüldükten sonra elde edilen süpernatant ile birlikte %1 sığır serum albumini, % 0.01 tripsin (Type I:250) ve 0.05mM Ca<sup>2+</sup> içeren ortamda 15 dakika 37°C'ta karbojenle gazlandırılarak inkübe edildi ve ardından 1200 g'de 10 dakika süre ile santrifüje edilerek endotel hücreleri çöktürüldü.

Ca<sup>2+</sup> ile aktive edilen hücreler daha sonra %10 (v/v) fetal sığır serumu, %10 (v/v) yenidoğan sığır serumu, L-glutamin (0.4 mM), benzilpenisilin (250 U/ml), streptomisin (250µg/ml), amfoterisin B (12.5 µg/ml) ve gentamisin (50 µg/ml) ile zenginleştirilmiş, pH'ı 7.4 olan Medium 199 ile süspansiyon haline getirilip 75 cm<sup>2</sup> lik hücre kültür flasklarına ekildi ve büyüyen hücrelerin ortamı iki günde bir değiştirilerek üremeleri izlendi. Hücrelerin flaskın zeminini tamamen kaplaması ve kaldırım taşı manzarasını alması (yani konfluent olması) yaklaşık 7-10 gün sürdü. Çalışmada ikinci ve üçüncü pasajlamadan sonra konfluent hale gelen hücreler kullanıldı.

Çalışmanın yapılacağı gün flasklar steril serum fizyolojik ile 2 kez yıkandı. Flasklara kültür ortamı ile aynı konsantrasyondaki antibiyotikleri içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kondu. İlaç grubuna 10 nM final konsantrasyonda olacak şekilde sirolimus eklenerek 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun tamamlanmasına 1 saat kala kalsiyum iyonofor (A23187, 1 µM) flasklara eklenerek uyarılmış NO salıverilmesi değerlendirildi. İndüklenebilir NO salınımı ise grupların interlökin-1β (IL-1β, 10 ng/ml ) ile 24 saatlik inkübasyonu sonunda değerlendirildi. Aynı işlemler kontrol grubu ile sirolimus çözücüsünün (etanol) kullanıldığı grupta tekrar edildi. Flasklardan alınan süpernatantlar total nitrit tayini için kullanılırken ekstrakte edilen protein örnekleri ile Western blot çalışıldı.

### *3.4 Total Nitrit Düzeyi Ölçümü*

NO'in stabil metabolitleri olan nitrit ve nitrat düzeylerinin ölçümü NO salıverilmesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Flasklarda bazal ve

uyarılmış NO salıverilmesini değerlendirmek için toplanan süpernatantlarda nitrit düzeyleri Griess reaksiyonu kullanılarak ölçüldü.

Nitrat düzeylerinin ölçümünde nitratın nitrat redüktaz enzimi aracılığıyla nitrit'e indirgenme reaksiyonundan yararlandı. Bu amaçla süpernatantlar sodyum fosfat tamponu içinde 1 U/ml konsantrasyonda nitrat redüktaz ile birlikte kofaktör olarak FAD (0.02 mM) ve NADPH (0.5 mM) ile 90 dakika karanlıkta inkübe edildi. Sonra örneklere eşit hacimde Griess tamponu eklendi. Karışım 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra oluşan absorbans 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Okunan absorbansların lineer regresyonla analizi yapıp buna karşılık gelen nitrit konsantrasyonları hesaplandı ve ortama salıverilen nitrit miktarı her kültür flaskındaki protein miktarına normalize edilerek belirtildi. Standart olarak DMEM içinde artan konsantrasyonlarda sodyum nitrat, kör olarak ise DMEM kullanıldı.

### *3.5. Protein Ekstraksiyonu, Elektroforezi ve Western Blot Deneyleri*

#### *3.5.1. Flasklarda Total Protein Tayini*

Total protein ekstraksiyonu için hücreler kaynamakta olan 250 µl protein lizis tamponu [% 0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS) 10 mM Tris içinde (pH 7.4)] ile muamele edildi ve bir hücre parçalayıcısı yardımıyla parçalanmış hücrelerin zeminden ayrılması sağlandı. Lizis tamponu içinde eriyik hale gelen hücre parçaları 100°C'ta 5 dakika bekletildikten sonra kalan DNA segmentlerinin parçalanması için ucunda 26 G iğne bulunan enjektörden birkaç kez geçirildi ve 20 dakika 4°C de 14000 rpm' de santrifüje edildikten sonra protein ölçümü gerçekleştirildi. Örneklerdeki protein miktarının tayini için Lowry yöntemi kullanıldı (92). Protein lizis tamponu içinde artan konsantrasyonlarda çözülerek hazırlanan sığır serum albümini standart olarak kullanıldı. Örnekler ve standartlar oda ısısında önce alkali bakır çözeltilinde 10 dakika, sonra folin-HCl çözeltilinde 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 750 nm dalga boyunda okundu ve örneklerdeki protein miktarının saptanmasında lineer regresyon analizinden yararlandı.

### 3.5.2. Protein Elektrofözezi

Protein elektrofözezi poliakrilamid jel kullanılarak dikey elektroföze tankında gerçekleştirildi (Hoeffler™ SE 260, Amersham Biosciences). Elektroföze kuyucuklara 40 µg protein yüklenerek % 8’lik ayırıcı jelde yürütüldü. Protein örnekleri 4x Laemmeli tamponla (Tris baz pH 6.8, 0.25 M; % 40 gliserol; % 8 sodyum dodesil sülfat (SDS); % 20 β-merkaptöetanol; % 0.01 bromofenol mavisi) 3:1 oranında karıştırıldı ve 100°C’ta 5 dak. kaynatıldı. Yürütölen proteinlerin moleköl ağırlığının belirlenebilmesi için her jelde bir yuvaya mutlaka “protein marker” da (Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range; BIO-RAD) yüklendi. Ayrıca iNOS için jel yürütölürken pozitif kontrol olarak 5 µg IFNg/LPS ile uyarılmış fare makrofaj hücre lizati da (BD Transduction Laboratories™, ABD) paralel olarak bir yuvaya yüklendi. Elektroföze işlemleri 4°C’ta, elektroföze tamponu (Tris baz, 25 mM; glisin, 190 mM; % 0.1 SDS) içinde yığıcı (stacking) jel boyunca 150 V, bantlar ayırıcı (separating) jele dayandıktan sonra 200 V akımla gerçekleştirildi (Electrophoresis Power Supply EPS 3001, Amersham Biosciences).

### 3.5.3. Western Blotting

Poliakrilamid jelde yürütölen proteinler 4°C’ta transfer tamponu içinde ve transfer tankında (Hoeffler™ TE 22, Amersham Biosciences) 300 mAmp elektrik akımıyla 4 saat içinde nitroselölöz membrana transfer edildi.

Transfer tamamlandıktan sonra membranlar TBST tampon (Tris baz, 20 mM; NaCl, 137 mM; % 0.1 Tween 20) içinde yıkandı ve TBST tampon içinde % 5 yağsız süt tozu (Marvel™, İngiltere) içeren bloklama tamponu içinde, 1 saat oda sıcaklığında bloklandı. Tekrarlayan TBST tamponu yıkamalarından sonra membranlar bloklama tamponu içinde hazırlanan primer antikorla 4°C’ta bir gece (16-18 saat) (iNOS, rabbit poliklonal IgG, 1:1000; β-aktin, mouse monoklonal IgG, 1:10000) ve daha sonra sekonder antikorlarla (iNOS antirabbit 1:5000; β-aktin antimouse 1:10000) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

TBST tamponla yıkanan membranlar elektrokemiluminisans solüsyonuyla (ECL Plus™ Western Blotting Reagents, Amersham Biosciences) kaplandı ve 6 dk. reaksiyon

için beklendi. ECL solüsyonu döküldü ve membranlar karanlık odada fotoğraf filmi (CL-X Posure™ Film, Pierce) ile karşı karşıya getirildi. Banyo sonrası kuruyan filmler tarayıcıdan geçirildi (Image Scanner, UMAX Model: UTA 1100), bir yazılım aracılığıyla (LabScan™ Version 5.0) bilgisayar ekranına yansıtıldı ve bantların densitometrik analizi başka bir yazılım aracılığıyla (ImageQuant™ TL v2005, Amersham Biosciences) gerçekleştirildi. Elektroforez sırasında eşit miktarda protein yüklenmesine rağmen normalizasyonu sağlamak için iNOS bantlarının yoğunluğu referans protein olan  $\beta$ -aktin ile elde edilen bant yoğunluğuna bölündü.

### 3.6. Serum homosistein, kolesterol ve trigliserid düzeyi ölçümleri

Gruplardaki sıçanlardan alınan kan örnekleri bekletilmeden 10 dk. süre ile 1000x g'de santrifüj edildi ve serum total homosistein düzeyleri Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) yöntemi ile (*IMX Homocysteine Assay, Abbott Diagnostics*) kolesterol ve trigliserid düzeyleri ise Cloned Enzyme Donor Immune Assay (CEDIA) yöntemi ile (*Hitachi 912 Automatic Analyzer*) yöntemi ile ölçüldü.

### 3.7. Sirolimus Serum Düzeyi Ölçümleri

Sıçanlardan alınan kan örneklerinde serum sirolimus düzeyleri Cloned Enzyme Donor Immune Assay (CEDIA) yöntemi ile (*Hitachi 912 Automatic Analyzer*) yöntemi ile ölçüldü.

### 3.8. Kimyasal Maddeler

Sirolimus, LC Laboratories'den (Woburn, MA, USA) alındı. Vasküler reaktivite deneylerinde kullanılan fenilefrin, KCl, asetilkolin, L-arjinin sodyum nitroprusid, L-NAME, A23187 ve Krebs Henseleit solüsyonunun içeriğindeki kimyasal maddeler ile protein ekstraksiyonu, elektroforezi, transferi ve Western blotting deneylerinde kullanılan solüsyonlarda bulunan tüm kimyasallar, iNOS ve  $\beta$ -aktin primer antikorları ile antimouse ve antirabbit IgG sekonder antikorlar, Griess reaksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler Sigma Chemical Co. (ABD) veya Merck Chemicals Ltd.'ten (Almanya) temin edildi. Medium 199, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, yenidoğan sığır serumu, fetal sığır serumu, L-glutamin, penisilin-streptomisin, amfoterisin, gentamisin, tripsin-EDTA, PBS (fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik)

tablet Biochrom AG (Almanya) ve nitrat redüktaz Roche Laboratories (Almanya) firmalarından alınmıştır.

### 3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen sonuçların tümü ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Gruplardan elde edilen total nitrit düzeyleri, serum homosistein, kolesterol, trigliserid düzeyleri ve izole organ banyosunda gerçekleştirilen fonksiyonel deneylerde saptanan  $E_{max}$ ,  $pD_2$  değerleri ve KCl kasılma yanıtlarında gruplar arasında anlamlı farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ile araştırıldı. ANOVA ile anlamlılık saptanan durumlarda iki grup arası farklılık Bonferonni Testi ile değerlendirildi. Fonksiyonel deneylerde kullanılan kasıcı ve gevşetici ajanlar ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinde gruplar arasındaki farklılıklar ise tekrarlayan veriler için varyans analizi (*ANOVA for repeated measures*) ile araştırıldı. Western blot deneylerinde her bir gruptaki n sayısı çok düşük olduğundan (n=3-4) elde edilen bantlar açısından gruplararası farkın anlamlılığını ölçmede nonparametrik Kruskal Wallis testi kullanıldı, bu testte anlamlılık saptandığında *posthoc* analize Mann Whitney U testi ile devam edildi.  $p<0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. Bulgular

### 4.1. Damar Yanıtları

#### 4.1.1. Kasılma Yanıtları

Endotelsiz aort preparatlarının fenilefrin ile elde edilen kasılma yanıtları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sirolimus uygulanan grupta kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir şekilde azaldığı izlendi. Çözücü verilen grupta kontrol grubu ile bir fark gözlenmedi, fakat yine sirolimus uygulanan grupta kasılma yanıtlarının çözücü grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir şekilde azaldığı izlendi (Şekil 5). Grupların  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri karşılaştırıldığında kontrol  $pD_2$  değerleri ile çözücü  $pD_2$  değerleri arasında anlamlı farklılıklar saptanmaz iken,  $E_{maks}$  değerlerinin sirolimus grubunda anlamlı ( $p=0.005$ ) bir oranda azalmış olduğu bulundu. Çözücü grubu ve kontrol grubu  $pD_2$  ve  $E_{maks}$  değerleri arasında bir fark

gözlenmedi, ama sirolimus uygulanan gruptaki  $E_{maks}$  değerleri çözücü grubundakine oranla anlamlı ( $p<0.005$ ) bir şekilde azalmıştı (Çizelge 1).

Endoteli sağlam preparatlarda elde edilen yanıtlar değerlendirildiğinde de benzer olarak sirolimus grubunda kasılma yanıtlarının kontrol grubuna ( $p<0.05$ ) ve çözücü grubuna ( $p<0.05$ ) oranla göre anlamlı oranda azaldığı bulundu. (Şekil 6). Çözücü verilen grupta ise kontrol grubu ile anlamlı bir fark gözlenmedi. Grupların  $pD_2$  ve  $E_{maks}$  değerleri karşılaştırıldığında,  $pD_2$ 'ler arasında anlamlı farklılıklar saptanmaz iken, sirolimus uygulanan grubun  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubu ( $p<0.05$ ) ve çözücü grubu ( $p<0.005$ ) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir oranda azalmıştı (Çizelge 2). Kontrol grubundaki endotelli damarlar, endotelsiz damarlar ile kıyaslandığında daha düşük kasılma yanıtı gösterdiler ( $p<0.05$ ). Sirolimus grubunda ise endotelli ve endotelsiz damarlar arasında kasılma yanıtları bakımından bir fark bulunmadı.

**Çizelge 1.** Grupların Endotelsiz Aort Preparatlarında Fenilefrin ile Elde Edilen  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  Değerleri.

<b>Fenilefrin (Endotelsiz)</b>	<b><math>pD_2</math></b>	<b><math>E_{maks}</math></b>
Kontrol	$7.57 \pm 0.10$	$2082.01 \pm 171.78$
Sirolimus	$7.50 \pm 0.16$	$1377.25 \pm 106.11^{a,b}$
Çözücü	$7.62 \pm 0.12$	$2182.37 \pm 181.15$

<sup>a</sup>:  $p<0.05$  (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

<sup>b</sup>:  $p<0.005$  (Çözücü grubu ile karşılaştırıldığında)

**Çizelge 2.** Grupların Endotelli Aort Preparatlarında Fenilefrin ile Elde Edilen  $E_{max}$  ve  $pD_2$  Değerleri.

<b>Fenilefrin (Endotelli)</b>	<b><math>pD_2</math></b>	<b><math>E_{max}</math></b>
Kontrol	$7.59 \pm 0.14$	$1749.87 \pm 114.85$
Sirolimus	$7.56 \pm 0.17$	$1283.12 \pm 67.69^{a,b}$
Çözücü	$7.42 \pm 0.13$	$1851.37 \pm 98,18$

<sup>a</sup>:  $p < 0.05$  (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

<sup>b</sup>:  $p < 0.005$  (Çözücü grubu ile karşılaştırıldığında)

Tek doz KCl (120 mM) depolarizasyonu ile elde edilen kontraktıl yanıtlar karşılaştırıldığında  $E_{max}$  değerlerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği izlendi (Çizelge 3).

**Çizelge 3.** Endotelsiz Aort Preparatlarında Tek Doz KCl (120 mM) ile Elde Edilen Maksimum Kasılma Yanıtları.

<b>KCl</b>	<b><math>E_{max}</math></b>
<b>Kontrol</b>	$1346.00 \pm 132.79$
<b>Sirolimus</b>	$1272.87 \pm 152.59$
<b>Çözücü</b>	$1407.28 \pm 47.61$

Submaksimal konsantrasyonda  $EC_{50}$  değerinde fenilefrin ile kasılan endotelli preparatlarda kasılmanın plato fazına ulaşmasından sonra tek doz L-NAME (100  $\mu$ M) verilerek elde edilen ek kasılmanın fenilefrin ile elde edilen değere orantılanması ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde sirolimus grubunda ve çözücü grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmadı (Çizelge 4).

**Çizelge 4.** L-NAME Kontraksiyon Yanıtları

L-NAME	(% fenilefrin)
Kontrol	180.20±50.20
Sirolimus	165.63±32.53
Çözücü	160.52±56.80

#### 4.1.2. Gevşeme Yanıtları

Sirolimus uygulanan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kümülatif konsantrasyonlarda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarının değişmediği saptandı (Şekil 7). Çözücü alan grupta da kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmadı. Grupların pD<sub>2</sub> değerleri arasında ise anlamlı bir fark izlenmedi (Çizelge 5).

Sodyum nitroprusit ile elde edilen yanıtlar incelendiğinde gruplararasıda gerek doz-konsantrasyon eğrileri, gerek ise pD<sub>2</sub> değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 8, Çizelge 5).

L-arjinin'in kümülatif konsantrasyonları verilerek elde edilen doz yanıt eğrileri karşılaştırıldığında, kontrol ve çözücü grupları arasında bir farklılık gözlenmezken, sirolimus uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.01) bir şekilde gevşeme yanıtlarında artış saptandı (Şekil 9). Yine, sirolimus grubundaki cevaplar çözücü grubu ile kıyaslandığında gevşeme yanıtlarında anlamlı (p<0.05) bir artış saptandı (Şekil 9). pD<sub>2</sub> değerleri karşılaştırıldığında ise, sirolimus grubu ile gerek kontrol grubu (p<0.05), gerek ise çözücü grubu (p<0.05) arasında anlamlı farklılıklar bulundu (Çizelge 5).

Uyarılmış NO sentezini değerlendirmek amacı ile A23187 ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri karşılaştırıldığında sirolimus uygulanan grupta yanıtların son 2 doz dışında kontrol grubuna göre değişmediği görüldü. 10<sup>-6</sup> ve 3x10<sup>-6</sup> konsantrasyonlarında ise sirolimus uygulanan grupta gevşeme yanıtlarının kontrole göre arttığı izlendi (p<0.05) (Şekil 10). Yine, çözücü uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı farklılık saptanmadı, ancak benzer olarak 10<sup>-6</sup> ve 3x10<sup>-6</sup> konsantrasyonlarında gevşeme yanıtları kontrole göre arttı (p<0.05) (Şekil 10). Grupların pD<sub>2</sub> değerleri arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı (Çizelge 5).

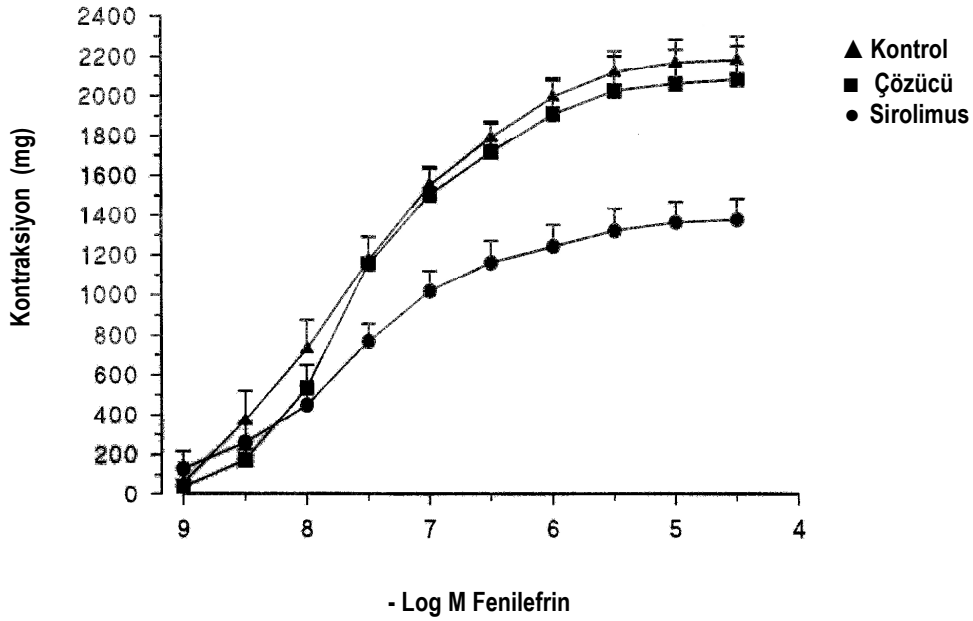


**Çizelge 5.** Gruplarda Değişik Ajanlarla Elde Edilen Gevşeme Yanıtlarının  $pD_2$  Değerleri.

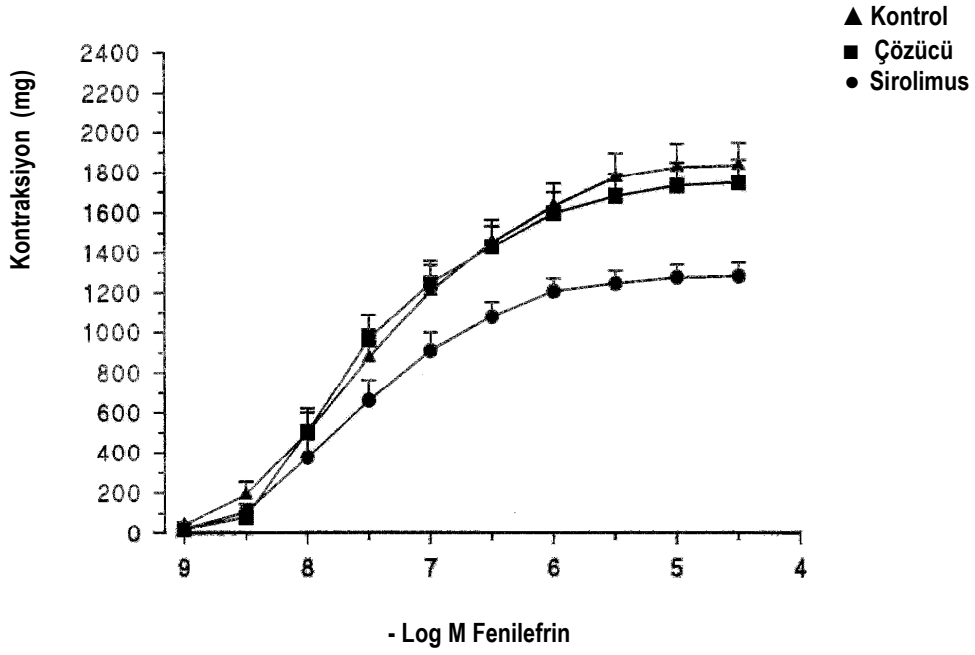
	Asetilkolin	L-arjinin	A-23187	SNP
<b>Kontrol</b>	7.42 ± 0.12	6.26 ± 0.24	6.16 ± 0.62	6.97 ± 0.14
<b>Sirolimus</b>	7.16 ± 0.10	7.37 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	5.74 ± 0.17	7.42 ± 0.21
<b>Çözücü</b>	7.45 ± 0.15	6.33 ± 0.24	5.27 ± 1.02	7.21 ± 0.17

<sup>a</sup>:  $p < 0.05$  (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

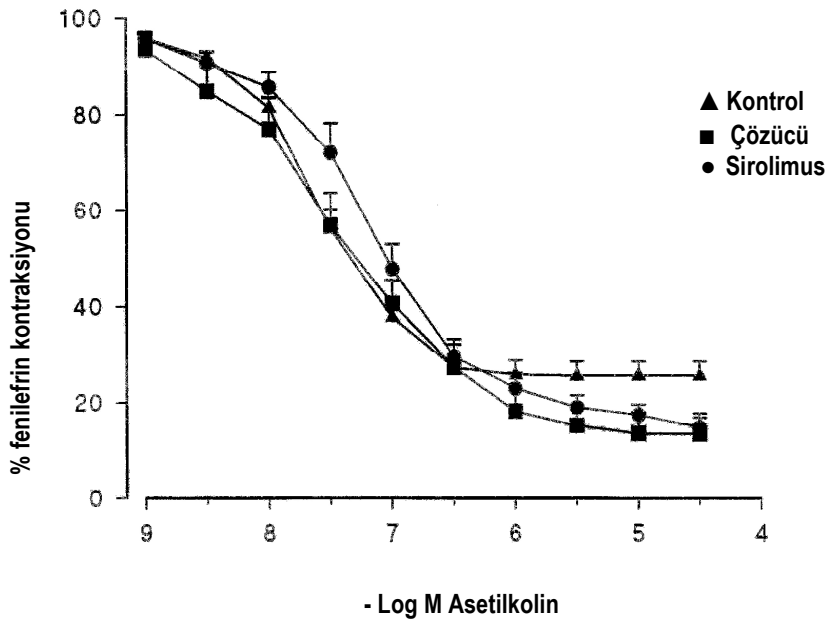
<sup>b</sup>:  $p < 0.05$  (Çözücü grubu ile karşılaştırıldığında)



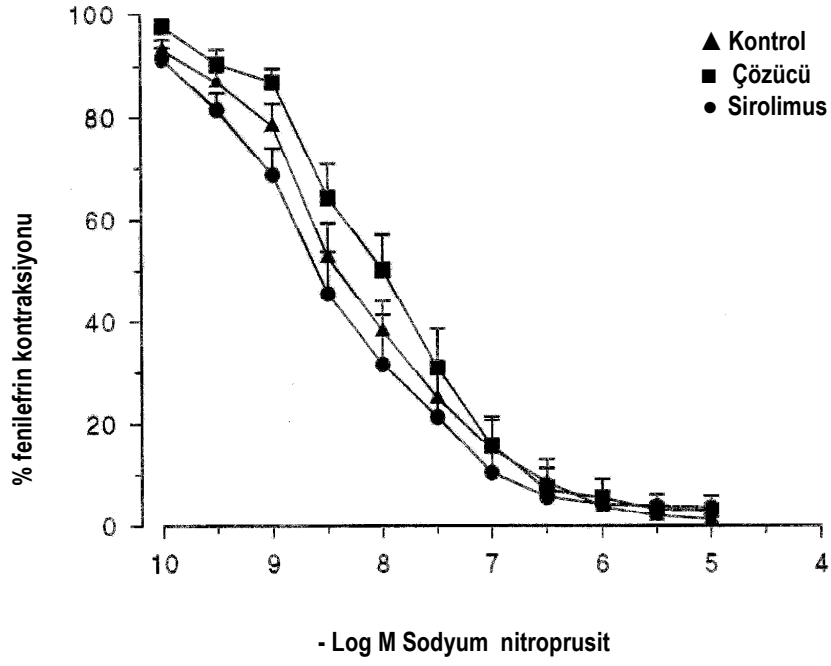
**Şekil 5.** Endotelsiz Aort Preparatlarında Elde Edilen Fenilefrin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri.



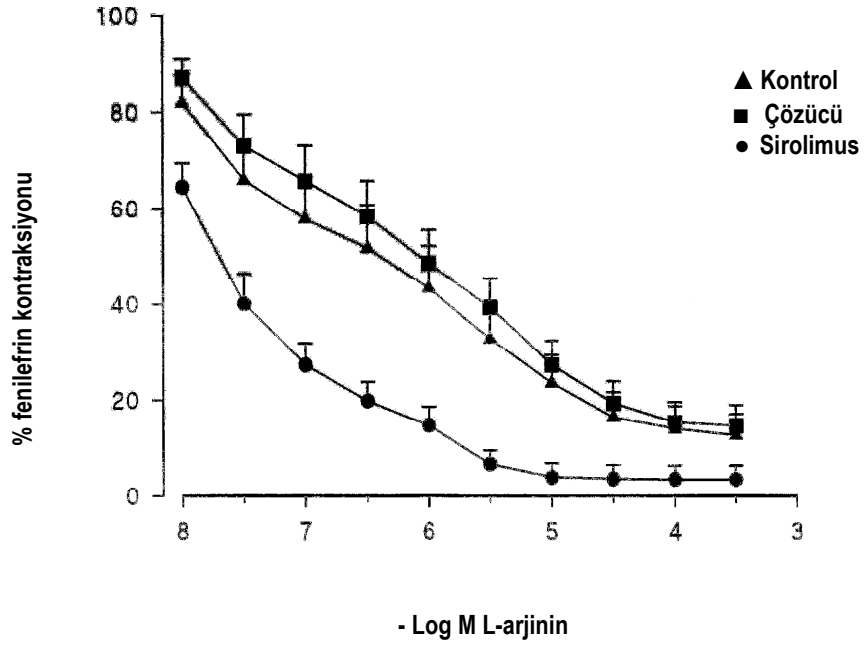
**Şekil 6.** Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen Fenilefrin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri.



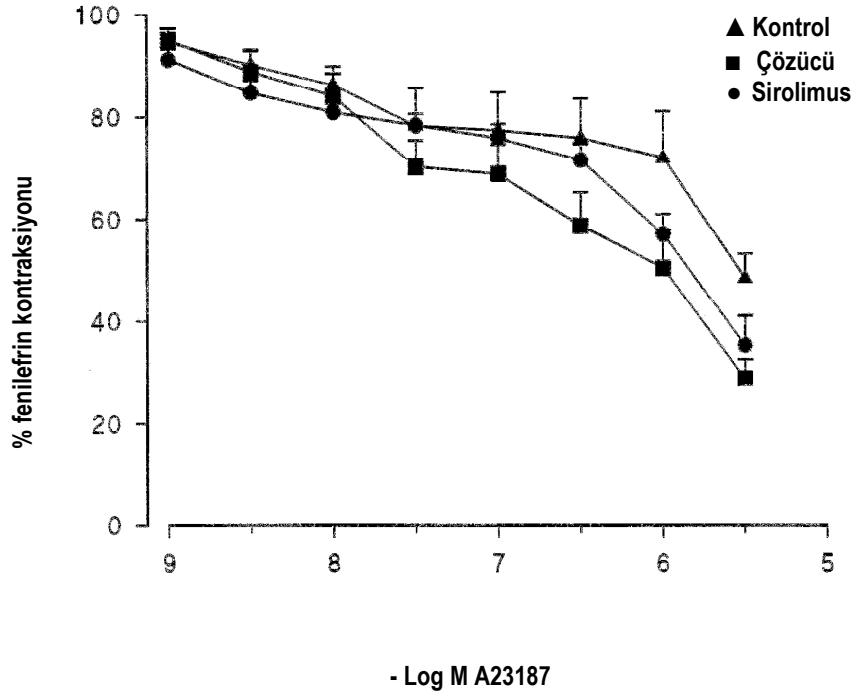
**Şekil 7.** Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen Asetilkolin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri.



**Şekil 8.** Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen Sodyum Nitroprusit Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri.



**Şekil 9.** Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen L-Arjinin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri.



**Şekil 10.** Endotelli Aort Preparatlarında Elde Edilen A23187 Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri.

#### 4.2. Total Nitrit düzeyleri

Koroner endotel hücre kültürlerinden elde edilen süpernatantlarda total nitrit düzeyleri çizelge 6'da gösterilmiştir. Sirolimus IL-1 $\beta$  tarafından indüklenen flasklarda nitrit düzeylerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma oluşturmuştur ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 6.** Flasklardan Elde Edilen Süpernatantlarda Total Nitrit Düzeyleri.

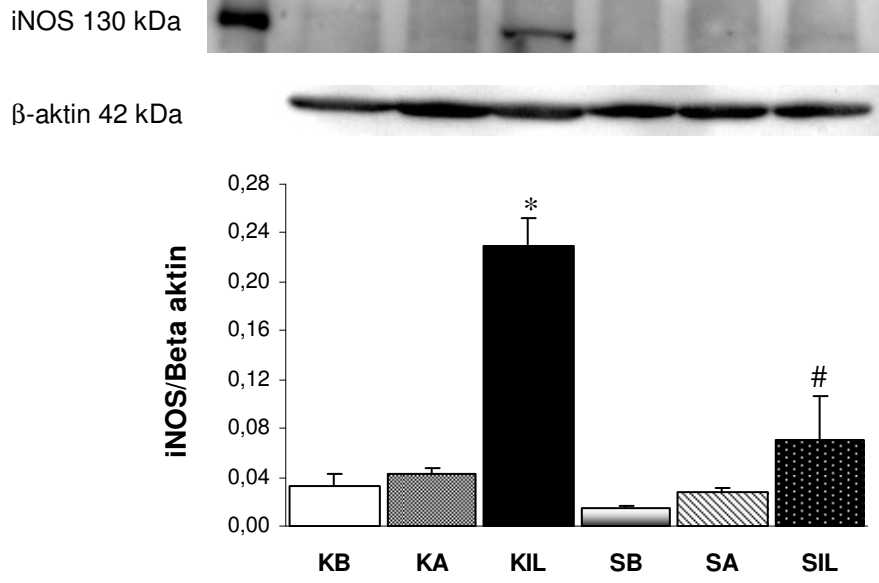
	Nitrit ( $\mu\text{M}$ / mg protein )		
	Bazal	A23187	IL -1 $\beta$
Kontrol	179.24 $\pm$ 28.97	290.72 $\pm$ 40.97 <sup>a</sup>	382.26 $\pm$ 25.81 <sup>a</sup>
Sirolimus (10 nM)	245.97 $\pm$ 15.30	259.00 $\pm$ 48.79	268.36 $\pm$ 15.79 <sup>b</sup>
Vehicle	176.34 $\pm$ 25.35	234.76 $\pm$ 16.72	319.30 $\pm$ 30.78

<sup>a</sup>:  $p<0.05$  (Kontrol grubunun bazal değeri ile karşılaştırıldığında)

<sup>b</sup>:  $p<0.05$  (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

#### 4.3. iNOS Protein Ekspresyonu

Western blot deneylerinde hücre izolatlarında IL-1 $\beta$ - ile stimüle edilen hücrelerde iNOS ekspresyonunun kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı ( $p<0.05$ ) görüldü. Sirolimus uygulanan hücrelerde ise iNOS protein ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ) (Şekil 11).



**Şekil 11.** Kontrol Grubu İle Sirolimus İnkübasyonu (10 nM) Yapılan Flasklarda İnos Protein Ekspresyonu. **KB:** Kontrol bazal; **KA:** Kontrol A23187; **KIL:** Kontrol Interleukin-1 $\beta$ ; **SB:** Sirolimus bazal; **SA:** Sirolimus A23187; **SIL:** Sirolimus Interleukin-1 $\beta$ . \*  $p < 0.05$ , kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; #  $p < 0.05$ , Interleukin-1 $\beta$  ile indüklenmiş kontrol grubuyla karşılaştırıldığında;  $n = 4$ .

#### 4.4. Serum Homosistein, Kolesterol, Triglisericid ve Sirolimus Düzeyleri

Grupların serum homosistein, triglisericid ve kolesterol düzeyleri karşılaştırıldığında, homosistein ve triglisericid düzeyleri bakımından bir fark gözlenmedi, fakat sirolimus uygulanan grupta kolesterol düzeyi kontrol ve çözücü grubuna oranla anlamlı bir artış gösterdi (Çizelge 6).

14 gün süreyle sirolimus uygulanan gruptan alınan serum örneklerinde sirolimus düzeyleri ortalaması  $7.41 \pm 3.28$  ng/ml'dir.

**Çizelge 6.** Grupların Serum Homosistein, Kolesterol ve Triglisericid Düzeyleri.

	<b>Serum Homosistein Düzeyleri</b>	<b>Serum Kolesterol Düzeyleri</b>	<b>Serum Triglisericid Düzeyleri</b>
<b>Kontrol</b>	$14.74 \pm 1.76$	$61.05 \pm 4.71$	$97.88 \pm 8.40$
<b>Sirolimus</b>	$13.04 \pm 1.54$	$93.02 \pm 4.85^{a,b}$	$100.50 \pm 13.69$
<b>Çözücü</b>	$12.65 \pm 0.73$	$64.77 \pm 3.83$	$94.74 \pm 13.37$

<sup>a</sup>:  $p < 0.05$  (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

<sup>b</sup>:  $p < 0.05$  (Çözücü grubu ile karşılaştırıldığında)

## 5. Tartışma, Sonuç ve Öneriler

Sirolimus güçlü immüsupresif özelliklere sahip bir ilaç ve aynı zamanda antifungal antibiyotik ve antitümöral ajandır. Özellikle kalp transplantasyonu sonrası tercih edilmesi endotel fonksiyonu üzerine olan etkilerini gündeme getirmiştir. Bugüne kadar yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda sirolimusun endotel hücreleri üzerine oluşturduğu etkiler kesin olarak açıklanamamıştır. Transplantasyon sonrası kardiyovasküler hastalıklar ana ölüm nedenlerinin başında geldiği için sirolimusun kardiyovasküler sistem üzerinde oluşturacağı etkiler önem taşımaktadır.

Çalışmamızda sıçan aort preparatları ile gerçekleştirilen organ banyosu çalışmalarında sirolimusun L-arjinin ile ve son 2 dozda A23187 ile indüklenen gevşeme yanıtlarını anlamlı bir şekilde artırdığı, buna karşın KCl, asetilkolin ve sodyum nitroprusit yanıtlarını etkilemediği gözlemlendi. Sirolimus uygulanan grupta fenilefrin yanıtlarının ise hem endotelli hem de endotelsiz halkalarda kontrol grubuna göre anlamlı bir oranda azaldığı bulundu.

Sıçan torasik aort preparatlarında endotelsiz halkalarda ilk olarak maksimum depolarizan konsantrasyonda KCl ile indüklenen kontraksiyonlar ölçüldü ve gruplar arasında fark bulunmadı. Damar düz kasının  $K^+$  depolarizasyonu ile oluşan kontraktıl yanıtı, membran depolarizasyonu sonucu voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanallarının açılmasına bağlıdır. Kanal açılması ile hücre içine  $Ca^{2+}$  girişi gerçekleşir, bu da kontraktıl proteinleri aktive eder. Kalsiyum girişi,  $IP_3$ 'e duyarlı olmayan bir mekanizma ile hücre içerisine kalsiyum salıverilmesini tetikler (74). Çalışmamızda sirolimus uygulanan grupta KCl yanıtları kontrol grubuna göre bir farklılık göstermedi. Bu sonuç sirolimusun voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden içeriye  $Ca^{2+}$  girişini etkilemediğini, dolayısı ile ilacın terapötik konsantrasyonlarda damar yapısının bütünlüğü üzerinde toksik bir etki oluşturmadığını göstermektedir (93).

Damar düz kasının NO aracılıklı endotelden bağımsız vazodilatör fonksiyon açısından araştırılması amacıyla bir NO donörü olan SNP ile elde edilen vazodilatör yanıtlar çalışıldı. SNP direkt etkili bir düz kas gevşeticisidir ve dokuda katalizlenen bir indirgenme reaksiyonu ile NO açığa çıkarır. Oluşan NO direkt olarak damar düz kas guanilat siklazın sitozolik fraksiyonunu aktive eder. Sonuçta endojen vazodilatör cGMP'de intraselüler artış yapar ve vazodilatasyon ortaya çıkar. Çalışmamızda



sirolimus uygulanan gruptaki yanıtların kontrolden farklı bulunmaması damar düz kasında cGMP'ye bağımlı mekanizmaların sirolimus tarafından etkilenmediğini göstermektedir (6).

Endotelli aort preparatlarında fenilefrin yanıtları çözücü ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında sirolimus uygulanan grupta anlamlı olarak azalmış bulundu. Fenilefrin  $\alpha_1$  reseptör agonistidir.  $Ca^{+2}$  kanalları yolu ile hücre dışı kalsiyumun girişini aktive eder ve bir inozitol-1,4,5- trifosfat (IP<sub>3</sub>) duyarlı mekanizma ile hücre içi kalsiyum salıverilmesini uyarır (94). Sıçan torasik aortunda endotelin hasarlanması alfa adrenerjik agonistlerle indüklenen kontraksiyonları güçlendirir ve bu kontraksiyonlar spontan salıverilen NO tarafından antagonize edilir (95). Bu nedenle söz konusu bulgu ilk bakışta damarlarda spontan NO salıverilmesinin sirolimus tarafından artırıldığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak, sirolimus uygulanmış sıçanlarda fenilefrin yanıtlarının endotelsiz preparatlarda da azalmış bulunması bu etkide NO veya benzeri endotel kaynaklı gevşetici faktörlerin dışında farklı mekanizmaların rol oynadığını düşündürmektedir. Nitekim, çalışmada endotelial NO sentez inhibitörü L-NAME ile elde edilen kontraktıl yanıtların gruplar arasında farklılık göstermemiş olması da bu varsayımı desteklemektedir. Sirolimusun gerek endotelli gerekse endotelsiz halkalarda fenilefrin ile oluşan kasılma yanıtlarını kontrol grubuna göre azaltması  $\alpha_1$  reseptörleri üzerinde olası bir inhibitör etkisi ile ilişkili olabilir. İlacın selektif olarak p70<sup>S6K</sup> aktivitesini inhibe ettiği ve p70<sup>S6K</sup> aktivitesinin inhibisyonunun  $\alpha_1$  reseptörlerinin blokajına kısmen katkıda bulunabileceği bir varsayım olarak öne sürülmüştür (96).

Çalışmamızda endotel aracılıklı gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi amacıyla ACh ve A23187 ile indüklenen yanıtlar değerlendirildi. ACh ile elde edilen yanıtlar gruplar arasında farklılık göstermezken A23187 yanıtlarının sirolimus uygulanan grupta arttığı görüldü. ACh indirekt etkisi ile vazodilatasyon oluşturmaktadır. Muskarinik reseptöre bağlanarak eNOS tarafından sentezlenen NO'nun salıverilmesine neden olur. Hızla damar hücresine geçen NO, guanilat siklazı aktive ederek cGMP'yi artırır ve gevşeme oluşur. Çalışmamızda elde edilen veriler sirolimusun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ACh ile indüklenen gevşeme yanıtlarını değiştirmediğini, yani endotele-bağımlı vazodilatasyonu etkilemediğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar daha önceki bazı araştırmacıların sonuçları ile örtüşmektedir. Ramzy ve ark. (2006), bizim çalışmamıza benzer şekilde 1.5 kg/mg dozunda 14 gün boyunca uyguladıkları

sirolimusun endotele-bağımlı ve endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını değiştirmedini bulmuşlardır (6). Yine, bir başka çalışmada sıçanlara 28 gün süre ile 2 mg/kg sirolimus uygulaması sonucu benzer sonuçlar elde edilmiştir (97).

A23187 asetil kolinden farklı olarak reseptör bağımsız bir mekanizma ile intraselüler  $Ca^{+}$  düzeyini arttırarak eNOS aktivasyonuna ve bunun sonucunda NO sentezinin artışına yol açar. Çalışmamızda kalsiyum iyonofor ile indüklenen gevşeme yanıtlarında ilk 6 dozda kontrol grubu ile sirolimus grubu arasında ve çözücü grubu arasında bir farklılık gözlenmemiş, ancak son 2 dozda hem sirolimus uygulanan grupta hem de çözücü uygulanan grupta kontrol grubuna oranla gevşeme yanıtlarının arttığı saptanmıştır. Asetilkolin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında bir farklılık oluşmaması ve kalsiyum iyonofor ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında ise sadece son iki dozda artış olması, sirolimusun yüksek kalsiyum konsantrasyonlarında artmış eNOS aktivitesi sonucu NO sentezinde artışa neden olarak vazodilatasyona neden olduğunu düşündürmektedir. Ne var ki, A23187 ile indüklenen gevşeme yanıtlarının çözücü grubunda da artmış olması bu etkinin tek başına sirolimus tarafından oluşturulduğu varsayımını desteklememektedir.

L-Arginin NO prekürsörüdür. L-Argininin eNOS tarafından L-sitrüline dönüştürülmesi sırasında NO oluşur. Çalışmamızda L-Arginin ile indüklenen gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna oranla sirolimus grubunda arttığı gösterildi. Bu sonuç  $Ca^{+}$  a bağımlı eNOS fonksiyonunun sirolimus tarafından arttırıldığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, Naoum ve arkadaşları (2004), sirolimusun eNOS sentezini arttırdığını bulmuşlardır (98). Sirolimus uygulanan sıçanlarda söz konusu yanıtların çözücü grubundakilerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunması çözücünün eNOS aktivitesi üzerinde olası bir uyarıcı etkisinin olabileceği varsayımını zayıflatmaktadır.

Sirolimus'un organ nakli sonrası red reaksiyonunu önlemek amacıyla sistemik olarak kullanımının yanısıra son yıllarda koroner ilaçlı arter stendlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanması bu ajanın koroner arterler üzerindeki lokal etkilerinin de araştırılmasını gündeme getirmiştir. Koroner stend uygulanan hastalarda sirolimus'un endotel fonksiyonu üzerinde zararlı etkiler oluşturduğu bulunmuştur (99,100,101). Buna karşın, organ nakli sonrası terapötik konsantrasyonlarda sistemik ilaç uygulamasının

koroner arter endotel fonksiyonu üzerindeki etkileri araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda sıçan koroner endotel hücre kültürlerinde NO etkilerini araştırdık. Bu amaçla NO'in stabil metabolitleri olan nitrat ve nitrit düzeylerinin ölçümleri gerçekleştirildi. Sirolimus'un organ nakli sonrası red reaksiyonunu önlediği kanıtlanmış terapötik konsantrasyonlarda (10 nM) sıçan koroner endotel hücre kültürlerinden elde edilen süpernatantlarda bazal veya A23187 ile uyarılmış nitrit birikimini değiştirmediği, buna karşın IL-1 $\beta$ - ile indüklenen nitrit düzeylerini azalttığı saptandı. İndüklenebilir NOS (iNOS) aracılıklı NO sentezini indirekt olarak ortaya koyan bu bulgu üzerine sirolimus'un söz konusu enzim ekspresyonunu azalttığı varsayımını araştırmak amacıyla gerçekleştirdiğimiz Western blotting çalışmalarında hücre kültürlerinde iNOS ekspresyonunun immunsupresif ajan tarafından anlamlı olarak baskılandığını gözlemledik.

Sirolimus uygulamasının en önemli yan etkilerinden bir tanesi serum lipid düzeylerinde oluşturduğu yükselmedir. Yine, hiperlipideminin de NO düzeylerinde azalmaya neden olarak endotel hücre disfonksiyonuna neden olduğu bilinmektedir (102). Öte yandan, son yıllarda yapılan çalışmalarda transplantasyon uygulanan hastalarda serum homosistein düzeylerinin yükseldiği de gösterilmiştir (9). Homosistein düzeylerindeki artışın ateroskleroz ve koroner arter hastalığı oluşumunu açısından önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda yapılan serum kolesterol, trigliserid ve homosistein düzeyleri sonucunda sadece serum kolesterol düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükseldiği saptandı. Hiperkolesterolemi sirolimus tedavisinin sık gözlenen bir yan etkisidir, Morrisett ve arkadaşları (2003) sirolimusun plazma lipidleri üzerindeki yan etkisinin insülin-sinyal yollarındaki değişikliklerden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir (61). Bu yollardaki değişiklikler adipoz dokudan lipid salınımı ile karaciğerdeki lipid sentezini düzenleyen lipoprotein lipaz arasındaki dengeyi bozmaktadır. Sirolimusun plazma homosistein düzeyleri üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermek bakımından sonuçlarımız bir ilk oluşturmaktadır.

Çeşitli çalışmalarda sirolimusun anti-proliferatif etkisi ve posttransplant vaskülopati gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Corbin ve arkadaşları (1994) doza bağımlı olarak sirolimusun aort damar halkalarında vazodilatasyon yaptığını göstermişlerdir (69). Bu bulgunun aksine Jeanmart ve arkadaşları (2002) sirolimusun

siklosporinle karşılaştırıldığında endotel aracılıklı gevşeme yanıtlarında daha fazla bozulmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (72). Ancak, her iki çalışmada da damarların sirolimusa kısa bir süre maruz kalması ilacın *in vivo* etkilerini ortaya koymak açısından yeterli değildir. Jeanmart'ın çalışmasında çözücünün endotel disfonksiyonuna neden olabileceği öne sürülmüştür. Diğer bir çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi sirolimus 14 gün boyunca 1.5 mg/kg dozunda uygulanmış ve sirolimusun endotele bağımlı yada bağımsız gevşemelerde bir bozukluk oluşturmadığı ve siklosporine oranla daha az oksidatif hasar oluşturduğu gözlenmiştir. Bunun sonucunda, sirolimus'un NO biyoyararlanımını arttırarak endotel ve düz kas fonksiyonunu düzeltebileceği sonucuna varılmıştır (6).

Sirolimusun vazomotor tonus üzerindeki etkilerini araştıran yayınların sayısı kısıtlı olmakla birlikte bir çalışmada izole aort halkalarında ilacın endotele bağımlı mekanizmalar üzerinden vazokonstriktör yanıtları azalttığı gösterilmiştir (72 ).

Sirolimusa kronik maruziyet indirekt olarak endotel disfonksiyonuna neden olarak arter çapını azaltabilir. *In vitro* domuz modelinde izole koroner arterlerin sirolimus ile 4 saatlik inkübasyonu endotele bağımlı gevşemelerde bozulmaya neden olmuştur. İnsanlarda ise sirolimus salan stentler endotele bağımlı vazodilatasyonu bozmuştur (5,73). Bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde edilenlerle birlikte değerlendirildiğinde farklı türlerde ve farklı çalışma düzeneklerinde ilacın etkilerinin değişebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda sıçan torasik aortu ve koroner arter endotel hücre kültürlerinde sirolimusun organ nakli sonrası immunsupresif olarak uygulandığında etkili olduğu kabul edilen terapötik konsantrasyonlarda uygulandığında NO- aracılıklı damar endotel fonksiyonu üzerinde zararlı etkiler oluşturmadığı, öte yandan adrenerjik reseptörler üzerindeki olası etkisiyle vazodilatör etki oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca uygulamanın serum kolesterol düzeylerinde ılımlı bir artış oluşturduğu, koroner hastalıkların gelişiminde rol oynayan homosistein düzeylerinde ise anlamlı değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir.

Sirolimusun endotel üzerinde oluşturacağı etkiler çalışılan doku, uygulanan ilaç dozu, çalışmanın *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda yapılması gibi faktörlere bağlı olarak çok farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgular bu konuda yapılan

önceki çalışmalara ek katkı sağlamaktadır. Klinik açıdan önemli olan diğer bir bulgu çalışmada uygulanan sirolimus dozunun, terapötik sınırlar içerisinde yer alan kan düzeyleri oluşturmaktadır. Bu durum çalışmamızdaki bulguların klinik kullanıma uyarlanabilirliği açısından önemli olabilir.

## 6. Teşekkür

Projenin yürütüldüğü Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nda diyabetik deney hayvanlarının bakım ve temizliğinde gösterdikleri titizlikten ötürü emekli personel Hasan Sayan'a ve Yüksel Özmen'e; tüm deney hayvanlarının takibi, tedavisinin gerçekleştirilmesinde ve diğer laboratuvar çalışmalarındaki kusursuz teknik desteklerinden ötürü emekli sağlık teknikerimiz Semra Kahraman ve Uzm. Biyolog Fatma Gül Çelenk'e; moleküler deneylerin yürütülmesi sırasında protein ekstraksiyonu ve western blotting deneylerinde ilgili teknikler konusundaki deneyimi ile yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sibel Göksel Ülker'e teşekkürü borç biliriz.

## 7. Kaynaklar

1. Segovia J, Gomez-Bueno M, Alonso-Pulpon L. Treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation. *Expert Opin Pharmacother.* 2006;7 (17): 2369-2383.
2. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin, a new fungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle: *J Antibiot.* 1975; 28:721-726.
3. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin, a new fungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot.* 1975;28:727-732.
4. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.* 2003; 35: 7S-14S.
5. Togni M, Windecker S, Cocchia R, Wenaweser P, Cook S, Billinger M, Meier B, and Hess OM. Sirolimus-eluting stents associated with paradoxical coronary vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:231-236.

6. Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Miriuka S, Delgado D and Ross HJ. Role of Endothelin-1 and Nitric Oxide Bioavailability in Transplant-Related Vascular Injury: Comparative Effects of Rapamycin and Cyclosporine. *Circulation*. 2006;114;214-219.
7. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Nitric oxide. Pharmacology 3. edition (Editors: Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M.), New York, Churchill Livingstone, 1995, 203-213.
8. Malinow MR. Homocysteine and arterial occlusive diseases. *J Int Med*. 1994; 236:603-617.
9. Ambrosi, Garcon D, Riberi A, Habib G, Barlatier A, Kreirmann B, Rolland PH, Bouvenot G, Luccioni R, Metras D. Association of mild hyperhomocysteinemia with cardiac graft vascular disease. *Atherosclerosis*. 1998; 138; 348-350.
10. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial Function. *Circulation*. 2005; 111:363-368.
11. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
12. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 168-175.
13. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR Jr, Richardson DM, Ritman EL, Lerman A. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res*. 2001; 51; 762-766.
14. Gordon JL, Pearson JD. Biology of vascular endothelium. In: Homeostasis and Thrombosis (Ed) Bloom AL., Thomas DP., Edinburg Churchill Living Stone p. 303-308, 1987.
15. Lütcher TF. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: potential role in coronary artery disease. *Eur Heart J*. 1999; 10: 847-857.
16. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-1295.
17. Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentino F. Restoring the dysfunctional endothelium. *Curr Pharm Des*. 2007;13(10):1053-1068.
18. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:325-333.

19. Napoli C, de Nigris F, Palinsky W. Multiple rol of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 2001;82: 674-682.
20. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic-guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1774-1777.
21. Grewe PH, Deneke T, Holt SK, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Scanning electron microscopic analysis of vessel wall reactions after coronary stenting. *Z Kardiol* 2000; 89:21-27.
22. Shirotani M, Yui Y, Kawai C. Restenosis after coronary angioplasty: pathogenesis of neointimal thickening initiated by endothelial loss. *Endothelium* 1993; 1: 5-22.
23. Bjokerud S, Bonjers G. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury:part 5. Tissue response after introduction of a large superficial transverse injury. *Atherosclerosis* 1973; 18,235-255.
24. Nickel T, Schlichting C L, Weis M. Drugs Modulating Endothelial Function after Transplantation. *Transplantation.* 2006; 82,41-46.
25. Hoffmann JN, Fertmann JM, Jauch KW. Microcirculatory disorders in sepsis and transplantation: therapy with natural coagulatory inhibitors antithrombin and activated protein C. *Curr Opin Crit Care.* 2006 12(5):426-430.
26. Oflaz H, Turkmen A, Turgut F, Pamukcu B, Umman S, Ucar A, Akyol Y, Uzun S, Kazancioglu R, Kurt R, Sever MS. Changes in endothelial function before and after renal transplantation. *Transpl Int.* 2006,19(4):333-337.
27. Kofler S, Petrakopoulou P, Nickel T, Weis M. Cardiac allograft endothelial dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006 (62) 13:79-82.
28. Weis M, Von Scheidt W. Cardiac allograft vasculopathy A review. *Circulation* 1997; 96: 2069-2077.
29. Iurlaro M, Vacca A, Minischetti M, Ribatti D, Pellegrino A, Sardanelli A, Giacchetta F, Dommacco F. Antiangiogenesis by cyclosporine. *Exp Hematol* 1998;26:1215-1222.
30. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol.* 2006;21: 301-316.

31. Oflaz H, Turkmen A, Kazancioglu R, Kayacan M, Bunyak B, Genchallac H, Erol B, Mercanoglu F, Umman S, Sever M. The effect of calcineurin inhibitors on endothelial function in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2003;17:212-216.
32. Wilasrusmee C, Da Silva M, Siddiqui J, Bruch D, Kittur S, Wilasrusmee S, Kittur DS. Role of endothelin-1 in microvascular dysfunction caused by cyclosporin A. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 584-591.
33. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppeler HA, Starling RC, Sorensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhardt P. RAD B253 Study Group . Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003; 349: 829-830.
34. Yatscoff RW, Fryer J, Thliveris JA. Comparison of the effect of rapamycin and FK506 on release of prostacyclin and endothelin in vitro. *Clin Biochem* 1993; 26: 409-414.
35. Trapp A, Weis M. The impact of immunosuppression on endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 81-87.
36. Mehrabi A, Fonouni H, Kashfi A, Schmied BM, Morath Ch, Sadeghi M, Schemmer P, Encke J, Sauer P, Zeier M, Weitz J, Büchler MW, Schmidt J. The role and value of sirolimus administration in kidney and liver transplantation. *Clin Transplant*. 2006; 17: 30-43
37. Paiva NL, Demain AL, Roberts MF. Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *J Nat Prod*. 1991; 54: 167-177.
38. McAlpine JB, Swanson SJ, Jackson M, Whittern DN. Revised NMR assignments for rapamycin. *J Antibiot* . 1991;44: 688-690.
39. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol*. 1990; 44: 251-258.
40. Kay JE, Kromwel L, Doe SE, Denyer M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferations by rapamycin. *Immunology*. 1991;72(4):544-549.



41. Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Stepkowski S, Chou TC. Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Transplantation* 1991;51:232-239.
42. Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol* 1993;154:7-15.
43. Li X, Zheng XX, Li XC, Zand M, Strom TB. Combined costimulation blockade plus rapamycin but not cyclosporine produces permanent engraftment. *Transplantation* 1998; 66:1387-1388.
44. Brown EJ., Albers MW., Shin TB., Ichikawa K., Keith CT., Lane WS., Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994;369:756-758.
45. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; 78: 35-43.
46. Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Raska K Jr. Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cells. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 508-512.
47. Ferrareso M, Tian L, Ghobrial R, Stepkowski SM, Kahan BD. Rapamycin inhibits production of cytotoxic but not noncytotoxic antibodies and preferentially activates T helper 2 cells that mediate long-term survival of heart allografts in rats. *J Immunol* 1994; 153:3307-3318.
48. Flanagan WM, Crabtree GR. Rapamycin inhibits p34cdc2 expression and arrests T lymphocyte proliferation at the G1/S transition. *Ann NY Acad Sci* 1993; 696: 31-37.
49. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor beta-stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. *Transplant Proc* 1991; 23: 2833-2836.

50. Marx S, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995;76: 412-417.
51. Sehgal S. Rapamune<sup>®</sup>: Mechanism of Action Immunosuppressive Effect Results From Blockade of Signal Transduction and Inhibition of Cell Cycle Progression. *Clin Biochem*. 2006; 39(5): 484-489.
52. Molnar-Kimber KL, Rhoad A, Warner L, Chen H, Sehgal SN. Comparison of effects of sirolimus on cytokine dependent and cytokine independent proliferation. *Inflamm Res*. 1995;44 (Suppl 2): S189-190.
53. Douros J, Suffness M. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev* 1981; 8: 63-87.
54. Bertagnolli MM, Yang L, Hermann SH. Evidence that rapamycin inhibits interleukin-12-induced proliferation of activated T lymphocytes. *Transplantation* 1994;58:1091-1096.
55. Almawi WY, Assi JW, Chudzik DM. Opposing effects of rapamycin and cyclosporin A on activation-induced Ca(2+) release. *Eur J Pharmacol*. 1999; 381(1): 51-56.
56. Strehlau J, Maslinski W, Chae D, Pavlakis M, Ehrich JH, Strom TB. *Transplant Proc* 1998; 30:2389-2391.
57. M. Fernandez-Valls, Gonzales-Vilchez F, de Prada JA, Ruano J, Ruisanchez C, Martin-Duran R. Sirolimus as an Alternative to Anticalcineurin Therapy in Heart Transplantation: Experience of a Single Center. *Transplant Proc*. 2005; 37, 4021-4023.
58. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris ME. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplant Proc* 1993; 25:770-771.
59. Sousa JE, Costa MA, Alexandre CA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma, Van Langenhove G, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* 2001;104:2007-2011.

60. Merkel S, Mogilevskaja N, Mengel M. Side Effects of Sirolimus. *Transplant Proc.* 2006;38:714-715.
61. Morrisett JD, Abdel-Fattah G, Kahan BD. Sirolimus changes lipid concentrations and lipoprotein metabolism in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2003; 35(Suppl), 143S.
62. Stenton SB, Partovi N, Ensom MH. Rapamycin: the evidence for clinical pharmacokinetic monitoring. *Clin. Pharmacokinet.* 2005; 44: 769-786.
63. Fryer J, Yatscoff RW, Pascoe EA, Thliveris J. The relationship of blood concentrations of rapamycin and cyclosporine to suppression of allograft rejection in a rabbit heterotopic heart transplant model. *Transplantation* 1993;55:340-5.
64. Morrice K. A randomised comparison of a sirolimus-eluting stent with a standart stent for coronary revascularisation. *New Engl J Med.* 2002; 346 (23): 1773-1780.
65. Javier AF, Bata-Csorgo Z, Ellis CN, Kang S, Voorhees JJ, Cooper KD. Rapamycin (sirolimus) inhibits proliferating cell nuclear antigen expression and blocks cell cycle in the G1 phase in human keratinocyte stem cells. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2094-2099.
66. Beretta L, Gindras A, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 1996;15: 658-664.
67. Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4441-4445.
68. Elleso MM, Azrolan N, Sehgal SN. Protective effect of the immunosuppressant sirolimus against aortic atherosclerosis in apo-E deficient mice. *Am J Transplant* 2003; 3: 562-569.
69. Corbin F, Blaise GA, Parent M, Chen H, Daloz PM. Effect of rapamycin on rat aortic ring vasomotion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;24:813-817.
70. Marks AR. Sirolimus for the prevention of in-stent restenosis in a coronary artery. *N Eng J Med.* 2003; 349:1307-1309

71. Milliard S, Silva A, Blaise G, Chen H, Xu D, Qi S, Daloz P. Rapamycin's Effect on Vasomotion in the Rat. *Transplant Proc.* 1998; 30: 1036-1038.
72. Jeanmart H, Malo O, Carrier M, Nickner C, Desjardins N, Perrault LP. Comparative study of cyclosporine and tacrolimus vs newer immunosuppressants mycophenolate mofetil and rapamycin on coronary endothelial function. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21:990–998.
73. Kiyooki M. Severe Endothelial Dysfunction After Sirolimus-Eluting Stent Implantation *Circulation.* 2006;113: 850-851.
73. Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM, Lemos PA, McFadden EP, Sianos G, Ligthart JM, van Essen D, de Feyter PJ, Serruys PW. Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *European Heart Journal* 2006; 27:166-170.
74. Ghatta S, Tunstall RR, Kareem S, Rahman M, O'Rourke ST. Sirolimus Causes relaxation of Human Vascular Smooth Muscle: A Novel Action of Sirolimus Mediated via ATP-Sensitive Potassium Channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 320:1204-1208.
75. Lee ME, Wang H. Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 1999; 9:49-54.
76. Welch G.N. Homocysteine, oxidative stress, and vascular disease. *Hosp Pract.* 1997;32,81-82.
77. Jakubowski H. Protein N-homocysteinylolation: implications for atherosclerosis. *Biomed Pharmacother* 2001;55,443-447.
78. Mudd S. Disorders of trans-sulfuration. (in) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (7th ed) 1995;1279-1327, McGraw-Hill.
79. Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med.* 2002;7: 227-239.
80. Harker HA, Harlan JM, Ross R. Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced endothelial injury and arteriosclerosis in baboons. *Circ Res.* 1983; 53: 731-739.
81. Sandeep T, Apar K, Archana T, Keki K. Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. *Int J Cardiol.* 2003;88:1-9.

82. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR Jr, Richardson DM, Ritman EL, Lerman A. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res.* 2001; 51; 762-766.
83. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271: C1424-C1437.
84. Moriel P, Abdalla DS. Nitrotyrosine bound to beta-VLDL-apoproteins: a biomarker of peroxynitrite formation in experimental atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 232:332-335.
85. Bayındır O. Nitrik Oksit'in patolojik olaylardaki rolü (Editör: Koşay S.), İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi. 1996, 7-25.
86. Palmer R.M.J. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch. Surg.* 1993;128:396-401.
87. Kiechle F.L. Malinski T. Nitric Oxide: Biochemistry, pathophysiology and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993;100:567-575.
88. Paemer RMJ. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch. Surg.* 1993;128: 396-401.
89. Cannon RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998; 44:1809-1819.
90. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001; 5: 88-97.
91. Piper HM, Spahr R, Mertens S, Krytzfeldt A, Watanabe H: Microvascular endothelial cells from the heart. In: Piper HM, editor, *Cell culture techniques in heart and vessel research*, Berlin: Springer, 1990, pp.158.
92. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265, 1951.
93. Ghatta S, Tunstall RR, Kareem S, Rahman M, O'Rourke ST. Sirolimus Causes Relaxation of Human Vascular Smooth Muscle: A Novel Action of Sirolimus Mediated via ATP-Sensitive Potassium Channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 320(3):1204-1208

94. Bigaud M, Julou-Schaeffer G, Parrat JR, Stoclet JC. Endotoxin induced impairment of vascular smooth muscle contractions elicited by different mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 1990; 190: 185-192.
95. Egleme C, Godfraind T, Miller RC: Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of endothelial cells. *Br J Pharmacol* 81:16, 1984.
96. Boluyt MO, Zheng JS, Younes A, et al: Rapamycin inhibits  $\alpha_1$  -Adrenergic Receptor-Stimulated Cardiac Myocyte Hypertrophy but Not Activation of Hypertrophy-Associated Genes. *Circ Res* 81:176, 1997.
97. Schrepfer S, Deuse T, Sultan KR, et al: Inhibition of Restonosis Development after Mechanical Injury: A New Field of Application for Malononitrilamides? *Cardiology* 108:128, 2007.
98. Naoum JJ, Zhang S, Woodside KJ, Song W, Guo Q, Belalcazar LM, Hunter GC. Aortic eNOS expression and phosphorylation in Apo-E knockout mice: differing effects of rapamycin and simvastatin. *Surgery* 2004;136(2):323-328.
99. Togni M, Windecker S, Cocchia R, et al: Rapamycin-eluting stents associated with paradoxical coronary vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 46:231, 2005.
100. Muhlestein JB. Endothelial Dysfunction Associated With Drug-Eluting Stents. What, Where, When and How. *J Am Coll Cardiol* 51:2139, 2008.
101. Barilli A, Visigalli R, Sala R, et al: In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovasc Res* 78:563, 2008.
102. Davis ME, Harrison DG. Cracking down on caveolin: role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in modulating endothelial cell nitric oxide production. *Circulation* 2001;103(1):2-4.