



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN TORASİK AORTUNDA ENDOTELİN-1 (ET-1) İLE
İNDÜKLENEN ENDOTEL DİSFONKSİYONUNDA
POLİ (ADP-RİBOZ) POLİMERAZ (PARP) YOLAĞININ ROLÜNÜN
FONKSİYONEL VE YAPISAL OLARAK İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Bedriniam YILMAZ

Antalya, 2012



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN TORASİK AORTUNDA ENDOTELİN-1 (ET-1) İLE
İNDÜKLENEN ENDOTEL DİSFONKSİYONUNDA
POLİ (ADP-RİBOZ) POLİMERAZ (PARP) YOLAĞININ ROLÜNÜN
FONKSİYONEL VE YAPISAL OLARAK İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Bedriniam YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Arda TAŞATARGİL

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir ”

Antalya, 2012

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 2010.04.0103.012 Proje No ile desteklemiştir.**

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan Danışman Hocam **Sayın Prof.Dr. Arda TAŞATARGİL**'e,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkân ve desteği sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız **Sayın Prof.Dr. Mehmet F. İSBİR**'e,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek, her zaman destek olan Anabilim Dalımızın kurucusu emekli öğretim üyesi **Sayın Prof.Dr. Gülay ŞADAN**'a ve Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyeleri **Sayın Prof.Dr. A.Çağlar ÖĞÜTMAN**, **Sayın Prof.Dr. S. Sadi ÖZDEM**, **Sayın Prof.Dr. Coşkun USTA**, **Sayın Doç.Dr. Nuray ERİN**, **Sayın Yrd.Doç.Dr. Cahit NACİTARHAN**, **Sayın Yrd.Doç.Dr. Gül ÖZBEY** ve **Sayın Yrd.Doç.Dr. Edibe MİNARECİ**, **Uz.Dr. Selvinaz TAŞATARGİL** ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Histopatolojik incelemeleri yapan **Sayın Doç.Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ**'ye, **Arş.Gör. Pınar ŞAHİN** ve **Arş.Gör. Nazlı Ece GÜNGÖR**'e,

Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yardımları ile her zaman yanımda olan **Vet. Hek. Doğa BESNE**'ye, **Sağ. Tek. İbrahim ÇALIŞKAN**'a ve diğer tüm çalışanlarına,

Proje kapsamında yaptığım tezime verdikleri destekten dolayı Akdeniz Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Farmakoloji Laboratuvar çalışmalarında gerektiği zaman anında fiziksel desteği sağlamış olan Akdeniz Üniversitesi tüm çalışanlarına,

Tez basım aşamasındaki desteklerinden dolayı İnsan Kaynakları Departmanı Şefi **Sayın A. Hakan GENÇ**'e,

Tez süresince manevi desteklerini aldığım arkadaşlarıma **Selma ATEŞ**'e, **Betül AKMAN**'a, **Kardelen SEVİM**'e, **Nermin AKDENİZ**'e ve **Ezgi İKİZ**'e

Son olarak, maddi ve manevi desteğini her zaman sonsuz sevgisiyle bana armağan eden Sevgili Annem **Atiye YILMAZ**'a ve Sevgili Babam **Mecit YILMAZ**'a ve varlıklarıyla ilham aldığım tüm aile fertlerine,

En içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, istemeden de olsa kullanmak zorunda kaldığım deney hayvanları için kabul görmüş kurallar çerçevesinde titizlikle çalışmalarımı sürdürdüğümü ve bu konudaki derin üzüntülerimi ifade etmek isterim.

Hayat, sevgi ile çalışarak birlikte güzel başarılarla imza atmaktır...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Damar Endoteli	3
2.2. Endotelin- 1 Hakkında Genel Bilgi	4
2.2.1. Endotelinler	4
2.2.2. Endotelinlerin üretim bölgeleri	5
2.2.3. Endotelin reseptör fonksiyonu	6
2.2.4. Plazma ve doku endotelin-1 düzeyleri	8
2.2.5. Endotelinlerin klirensi	9
2.2.6. Hücre içi olaylar ve sinyal iletimi	10
2.2.7. Endotelin sentezi ve düzenlenmesi	11
2.2.8. ET sentez yolağının bileşenleri	12
2.2.9. Endotelinlerin damarlardaki etkileri	14
2.2.10. Arterler üzerine ikili etkiler	15
2.2.11. Damar tonusunun sürdürülmesinde ET-1'in fizyolojik rolü	15
2.2.12. Hücre büyümesi ve inflamasyon	16
2.2.13. Kardiyak etkileri	16
2.3. Endojen ET Sistemi, Endotel Disfonksiyonu ve Ateroskleroz Gelişimi	16
2.3.1. Endotel disfonksiyonunda Endotelin- 1'in rolü	18
2.3.2. ET-1 NO üretimini azaltabilir: Kaveola'nın rolü	18
2.3.3. NO ve artmış oksidatif stres ile etkileşim	19
2.3.4. Anjiyotensin II ile etkileşim	21
2.4. Endotel Fonksiyonu Üzerine ET Reseptör Antagonistlerinin Etkileri	22
2.5. Klinik Patolojik Durumlarda Görülen Endotel Disfonksiyonunda ET-1'in Rolü	24
2.5.1. Ateroskleroz	25
2.5.2. Endotelin ve esansiyel hipertansiyon	25
2.5.3. İskemik sendromlar	27
2.5.4. Kronik kalp yetmezliği (KKY)	28
2.5.5. Pulmoner hipertansiyon	29
2.5.6. Diabet	30
2.6. PARP Enzim Ailesi Hakkında Bilgi ve PARP'ın Rolü	31
2.6.1. Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)	31
2.6.2. PARP-1	32
2.6.3. Poli (ADP-Riboz) Metabolizması	33
2.6.4. PARP-1 ve DNA Onarımı	35

2.7. Endotel Disfonksiyonu Patojenezinde PARP Aktivasyonun Rolü	37
2.8. Endotel Disfonksiyonu, Ateroskleroz, Kalp Yetmezliği, Damar Remodeling ve Anjiyogenezde PARP-1 Aktivasyonunun Rolü	38
2.9. PARP İnhibitörleri ve Klinik Kullanım Potansiyelleri Hakkında Bilgi	39
2.9.1. PARP inhibitörleri	39
2.9.1.1. Klasik PARP inhibitörleri	39
2.9.1.2. Yeni PARP inhibitörleri	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Deneysel Model	41
3.2. Protokol	42
3.3. İmmünohistokimya Metod	42
3.4. Western Blot Metodu	43
3.5. İlaçlar	44
3.6. İstatistiksel Analizler	44
4. BULGULAR	45
4.1. Sıçan Torasik Arterlerinin Vasküler Reaktivitesi Üzerine ET-1 İnkübasyonunun Etkileri	45
4.2. Sıçan Torasik Arterlerinde ET-1'in Vasküler Reaktivitede Neden Olduğu Değişikliklere PEG-SOD +Apocynin veya PJ34 İnkübasyonunun Etkileri	50
4.3. Kontrol, ET-1, ET1+PEG-SOD, ET-1+Apocynin, ET-1+PJ34 ve PJ34 Gruplarından Elde Edilen Torasik Aort Halkalarında PARP-1 ve PAR Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi	51
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	58
7. ÖZET	59
8. ABSTRACT	60
9. KAYNAKLAR	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3-AB	3- amino benamid
5-AIQ	5-Hidroksiizokinolinon
a.a.	Amino asid
Ach	Asetilkolin
AGEs; AGE'ler,	İleri glikozilasyon ürünleri
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
AP-1	Aktivatör protein-1
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenin trifosfat
BH ₄	Tetrahidrobiopterin; eNOS'un kofaktörü
Big ET	İri endotelin-1
BQ123	Seçici ET _A reseptör antagonisti
BQ788	Seçici ET _B reseptör antagonisti
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
cav-1	Kaveolin-1
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CO ₂	Karbondioksit
DBD	N-terminal iki çinko parmak DNA-bağlanma alanı
DEVD	PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyal motifi
DHIQ	5-hidroksidihidroizokinolinon
DM	Diabet
DNA	Deoksiribonükleik asid
DPQ	3,4-Dihidro-5-[4-1(1-piperidinil)butoksil]-1(2H)-isokinolinon
DOCA	Deoksikortikosteron asetat
EC ₅₀	Maksimal yanıtın (E _{max}) %50'sini oluşturan agonist konsantrasyonu
ECE; EDE	Endotelin-dönüştürücü enzim
EDRF	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
E _{max}	Maksimal yanıt
eNOS	Endotelyal nitrik oksid sentaz
ET	Endotelin

ET-1	Endotelin-1
ET-2	Endotelin-2
ET-3	Endotelin-3
ET _A	Endotelin A reseptörü
ET _B	Endotelin B reseptörü
Fe	Fenilefrin
gp91phox	NAPDH oksidazın hız belirleyici altünitesi
GPI-6150	Benzopirano[4,3,2-de] isokinolinonlar
H1	Bağlayıcı histon
ICAM-1	Hücreler arası adezyon molekül-1
IL-1	İnterleukin-1
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
J-10419	İkili ETA/ETB reseptör antagonisti
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum hidrojen fosfat
KKY	Kronik kalp yetmezliği
L-arg	L-arginin
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MHCII	Majör doku uyuşumu kompleksi sınıf II
mRNA	Haberci ribonükleik asid
μM	Mikromolar
NaCl	Sodyum klorür
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B transkripsiyon faktörü
NO	Nitrik oksid
O ₂	Oksijen
ONOO ₂	Peroksinitrid; güçlü bir BH ₄ oksidantı
p22phox	NADPH oksidaz altünitesi
PAH	Pulmoner arteryal hipertansiyon
PAR	Poli ADP Riboz; PARP enziminin aktivasyon ürünü
PARG	Poli (ADP-Riboz) glikohidrolaz

PARP-1	Poli(ADP-Riboz) polimeraz (PARP)-1
PARP (PARS)	Poli(ADP- Riboz) polimeraz, (Poli (ADP-Riboz) sentetaz)
PD 155080	Seçici ET _A -reseptör antagonisti
pD2	Duyarlılık; maksimal yanıtın (Emax) %50'sini oluşturan agonist konsantrasyonunun negatif logaritması
PEG-SOD	Polietilen glikol-süperoksid dismutaz; serbest radikal süpürücü bir ajan
PI ₃ -kinaz	Fosfo inozitol 3- kinaz
PJ34	N-6-Okso-5,6-dihidrofenanthridin-2-yl-N, N-dimetilamino asetamid hidroklorür; güçlü ve suda çözünebilen bir PARP inhibitörü
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
Prepro ET-1	Preproendotelin-1
ROC	Reseptör- bağımlı kalsiyum kanalı
ROCK	Rho-Rho-kinaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Standart hata
SHR	Spontan hipertansif sıçan
SİN-1	3-morfolinosidnonimin; NO donörü
SK&F96365	Seçici olmayan bir katyon kanal inhibitörü
SNP	Sodyum nitroprussid
SOCC	Depo-bağımlı kalsiyum kanalı
SOD	Süperoksid dismutaz
STZ	Streptozotosin
T2DM	Tip 2 diabet
TGFb	Transforme edici büyüme faktörü-b
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
tPA	Doku plazminojen faktörü
U73122	PLC inhibitörü
UCP-1	Uncoupling protein-1
VOCC	Voltaj-bağımlı kalsiyum kanalları
vWF	von Willebrand faktörü
WKY	Wistar-Kyoto sıçanı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Endotelinlerin yapısı	4
2.2. Endotelin-1 sentezini düzenleyen faktörler ve ET-1 sentez yolağı	5
2.3. ET-1'in vasküler etkileri	7
2.4. ET sentezi ve düzenlenmesi	12
2.5. Endotelin yolağının bileşenleri	13
2.6. Arter duvarının sağlıklı koşullarda (sağ) ve endotel disfonksiyonunda (sol) şematik şekli	17
2.7. Endotel hücrelerinde ET-1 ile oluşan eNOS'un kenetsizlenme mekanizmaları	21
2.8. ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonunda olası mekanizmalar	21
2.9. Damar duvarında Endotelin-1 (ET-1)'in etkileri	23
2.10. Preklinik ve klinik çalışmalarda endotelin sisteminin rol oynadığı gösterilen Patofizyolojik Durumlar ve hastalıklar	24
2.11. Kardiyovasküler hastalıklarda endotel disfonksiyonunun gelişiminde ET-1'in rolü	31
2.12. İnsan PARP-1'inin yapısal ve fonksiyonel organizasyonu	33
2.13. Bazı PARP enzimlerinin yapısının karşılaştırılması	34
2.14. DNA-hasarı ile indüklenen PARP aktivasyonu: Yaşam veya ölüm için bir sinyal mi?	35
2.15. DNA hasarının şiddeti hücrenin kaderini belirler: Yaşam, apoptoz veya nekroz	35
2.16. PJ34[N-(6-Okso-5,6-dihydrofenanthridin-2-yl)-(N,N-dimetilamino)asetamid hidroklorür]'ün kimyasal yapısı	40

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Kontrol grubu sıçan torasik aortunun asetilkolin (ACh) trasesi	45
4.2. ET-1 grubu sıçan torasik aortunun asetilkolin (ACh) trasesi	45
4.3. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında asetilkolin (ACh) konsantrasyon yanıt eğrileri	46
4.4. Kontrol grubu sıçan torasik aortunun sodyum nitroprussid (SNP) trasesi	47
4.5. ET-1 grubu sıçan torasik aortunun sodyum nitroprussid (SNP) trasesi	47
4.6. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında sodyum nitroprussid (SNP) konsantrasyon yanıt eğrileri	47
4.7. Kontrol grubu sıçan torasik aortu KCl trasesi	48
4.8. ET-1 grubu torasik aortu KCl trasesi	48
4.9. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında KCl konsantrasyon yanıt eğrileri	49
4.10. Kontrol grubu sıçan torasik aortunun fenilefrin (Fe) trasesi	49
4.11. ET-1 grubu sıçan torasik aortunun fenilefrin (Fe) trasesi	49
4.12. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında fenilefrin (Fe) konsantrasyon yanıt eğrileri	50
4.13. Kontrol (a), ET-1 (b), ET-1+PEG-SOD+Apocynin (c), ET-1+PJ34 (d), PJ34 (e) ve negatif kontrol (f) gruplarından elde edilen torasik aort halkalarında PAR ekspresyonunun immünohistokimya ile değerlendirilmesi	52
4.14. Kontrol (a), ET-1 (b), ET-1+PEG-SOD+Apocynin (c), ET-1+PJ34 (d), PJ34 (e) ve negatif kontrol (f) gruplarından elde edilen torasik aort halkalarında PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimya ile değerlendirilmesi	52
4.15. Kontrol, ET-1, ET-1+PEG-SOD+Apocynin ve ET-1+PJ34 gruplarından elde edilen torasik aort halkalarında PAR ve PARP-1 ekspresyonunun Western blot ile değerlendirilmesi	53

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. ET reseptörlerinin sınıflandırılması	6
4.1. ACh ile oluşan gevşeme yanıtlarının pD_2 ve E_{max} değerleri	46
4.2. SNP ile oluşan gevşeme yanıtlarının pD_2 ve E_{max} değerleri	48
4.3. Fe ile oluşan kasılma yanıtlarının pD_2 ve E_{max} değerleri	50

1. GİRİŞ

Endotel hücrelerinden sentezlenen ve güçlü bir vazokonstriktör aminoasid peptid olan endotelin-1 (ET-1), birçok damar hastalığının gelişiminde patolojik bir rol oynamaktadır (1,2). Gerçekten de; ateroskleroz, diabet ve hipertansiyon gibi farklı patofizyolojik koşullarda plazma ET-1 düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Sıçanlarda deoksikortikosteron asetat (DOCA)-tuz veya anjiotensin II infüzyonu ile oluşturulan deneysel hipertansiyon modellerinde de ET-1 düzeylerinin yüksek olduğu ve bunun endotel disfonksiyonu gelişimi ile ilişkisi bilinmektedir (1-5). Elde edilen kanıtlar, ET-1'in ET_A/ET_B reseptör aktivasyonu aracılığıyla, damarlarda süperoksid anyon gibi reaktif oksijen türlerini arttırdığına ve bunun endotel disfonksiyonu ile sonuçlandığına işaret etmektedir (6).

Diabetik sıçanlarından aort halkalarının endotel-bağımlı gevşetici ajanlara verdiği yanıt kontroller ile karşılaştırıldığında belirgin olarak zayıflamaktadır (7,8). Gelişen endotel disfonksiyonunun, diabetik vaskülopati patogenezinde anahtar bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Diabetik sıçanların aortunda süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi azalmış olup, oksijen kaynaklı serbest radikaller endotel hasarı gelişimine katkıda bulunmaktadır (9-11). Damarlarda hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS)'nin temel kaynağı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz adlı enzimatik bir komplekstir (12). Endotel disfonksiyonu gelişen diabetik hayvanlarda plazma ET-1 düzeyleri yüksek bulunmuştur (3-5). Yapılan çalışmalar, ET-1'in NADPH oksidaz aktivasyonu ile ROS'ni arttırdığını bildirmektedir (13,14). ET-1 ve oksidatif stresin endotel disfonksiyonu gelişiminde ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezindeki önemli rolü değerlendirildiğinde, ET-1 aracılı endotel disfonksiyonu gelişiminin mekanizmasının araştırılması önem kazanmaktadır. Her ne kadar, ET-1 aracılı oksidatif stresin arttığı bilinse de, oksidatif stresin aktive ettiği endotel disfonksiyonuna aracılık eden mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır.

Poli (ADP-Riboz) sentetaz (PARS) adıyla da bilinen poli (ADP-Riboz) polimeraz (PARP), ökaryotik hücrelerde bulunan ve birçok düzenleyici fonksiyona aracılık eden önemli bir enzimdir (15,16). PARP; histonları da içeren birçok hedef proteinin glutamik asid rezidülerinde uzun ADP-riboz polimerleri oluşturmak için nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'i nikotinamid ve ADP-riboza parçalamaktadır (16). Poli (ADP-

Ribozilasyon olarak adlandırılan bu süreç deoksiribonükleik asid (DNA) onarımı, gen transkripsiyonu, hücre ölümü, kromatin fonksiyonu ve gen stabilitesi gibi birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Günümüze kadar, yaklaşık 18 üyesi saptanan bu enzim ailesinde özellikle PARP-1 ve PARP-2 DNA kırıkları ile uyarılan proteinler olduğundan, DNA hasarının onarım sürecinde önemli fonksiyonlar üstlenmektedir (17). Çeşitli durumlarda oksijen ve nitrojen kaynaklı radikallerin indüklediği DNA tekli zincir kırıkları PARP enzim aktivitesinde artışa neden olmakta ve bunun sonucu olarak nükleer proteinlerde ADP-riboz miktarı artarken hücre içi düzeylerinde önemli ölçüde azalma meydana gelmektedir (16). NAD^+ mitokondriyal solunum zincirinde bir elektron taşıyıcısı olarak görev yaptığı için, NAD^+ düzeyindeki bu azalma sonucunda hücre içi ATP düzeyleri de hızla düşmektedir. Bu olaylar sonucu, glikoliz hızının ve mitokondriyal solunumun yavaşlaması hücresel fonksiyon bozuklukları ve ölümle (apoptoz, nekroz) sonuçlanmaktadır (18,19). Bu nedenle, PARP yolağının aşırı aktivasyonunun miyokard infarktüsü, iskemi-reperfüzyon, kalp yetmezliği, endotoksik şok, hiperhomosisteinemi ve diabetes gibi oksidatif stresin arttığı çeşitli patolojik koşullarda endotel disfonksiyonu ve doku hasarının gelişimi açısından önemli bir mekanizmayı sunduğu kabul edilmektedir (15,16, 20-26).

Endotel fonksiyonlarının korunması ateroskleroz, hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalığı olan kişilerin kan basıncının kontrolünde ve vasküler komplikasyonların önlenmesinde çok önemli bir yaklaşımı sunmaktadır. Birçok kardiyovasküler hastalıkta artan ET-1 düzeylerinin neden olduğu oksidatif stres endotel fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Oksidatif stres PARP yolağının ana tetikleyicisi olduğundan, ET-1 ile indüklenen endotel disfonksiyonu gelişiminde oksidatif strese bağlı bu yolağın aktivitesinin artması önemli bir rol oynuyor olabilir. Eğer böyleyse, PARP inhibitörü ajanlarla bu yolağın baskılanması ateroskleroz, hipertansiyon ve diabetes patogenezinde önemli rol oynadığı bilinen ve hipertansiyonda zararlı bir faktör olan ET-1 aracılı endotel disfonksiyonunun gelişimini önleyebilir ve böylece önemli bir koruyucu mekanizmayı sunabilir.

Bu çalışmanın amacı; sıçan torasik aortunda ET-1 aracılı endotel disfonksiyonu gelişiminde PARP yolağının olası rolünün araştırılmasıdır. Ayrıca, PARP inhibitörü ajanlarla bu yolağın inhibe edilmesinin ET-1 aracılı endotel fonksiyonunu önleme potansiyeli de bu çalışmada değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Damar Endoteli

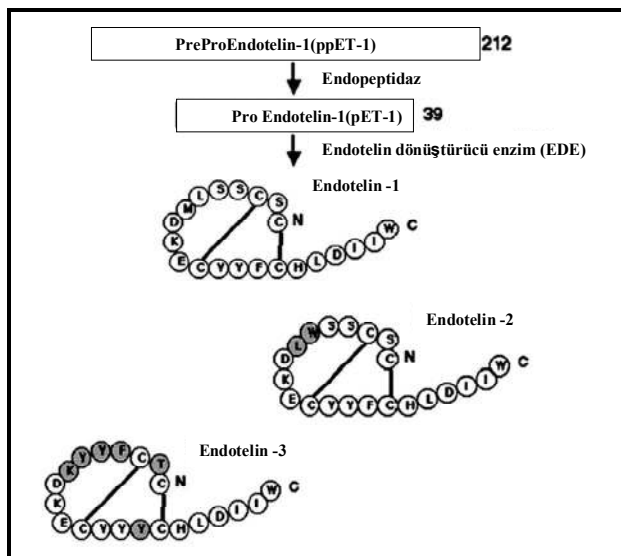
Endotel, damar duvarı ile kan akımı arasında yer alan fonksiyonel bir bariyer olarak tanımlanmaktadır (14). Endotel; hemostaz, damar geçirgenliği ve kan basıncı gibi kardiyovasküler birçok temel fonksiyonu kontrol etmektedir. 1980 yılındaki araştırmalarda ortaya çıkan endotel'in vazodilatasyon yeteneği damar biyolojisinde önemli bir gelişmeye yol açmıştır. Endotel; çok sayıda biyolojik aktif madde üreterek damar fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Endotel hücreleri hem vazokonstriktör hem de vazodilatör maddeler üretebilir. Endotel kaynaklı gevşetici faktörler temel olarak nitrik oksid (NO), prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktördür. 1980 yılında, prostaglandin olmayan endotel bağımlı vazodilatör bir faktör bulunmuş ve daha sonra, endotel kaynaklı gevşetici bu faktörün (EDRF)'nün NO olduğu saptanmıştır (27). NO özellikle inflamasyonu, damar düz kas hücre proliferasyonunu, trombosit adezyonunu ve doku plazminojen faktör (tPA) salınımını baskılar (14). Endotel hücreleri ayrıca, prostaglandin endoperoksidler ve anjiyotensin II ve endotelin-1 (ET-1) peptid gibi vazokonstriktör maddeleri üretir (28). 1985 yılında, damar endotelinin uzun süreli vazokonstriksiyonunu sağlayan ve endotel-kaynaklı gevşetici faktör (EDRF)'ü dengeleyen vazokonstriktör bir madde oluşturduğu gösterilmiştir. Bu uzun etkili maddenin bir peptid olduğu saptanmış, bu madde izole edilmiş, 1988 yılında endotel hücre kültürlerinden dizilimi yapılmış ve 'endotelin' adı verilmiştir (29). Her biri 21 amino asid içeren üç endotelin isopeptid (endotelin-1, endotelin-2 ve endotelin-3) tanımlanmıştır (30). Bunlardan ET-1 en güçlü vazokonstriktördür ve damar sisteminde eksprese edilen baskın bir izoformudur (28). Güçlü bir vazokonstriktör olan ET-1'in inotropik ve mitojenik özellikleri vardır, tuz ve su dengesini etkiler ve renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini ve sempatik sinir sistemini uyarır. Endotelin genellikle damar tonusunu ve kan basıncını arttırıcı etki gösterir. Damar endotel fonksiyon bozukluğu (disfonksiyonu) kardiyovasküler hastalıkların gelişiminin erken bir bulgusudur ve ateroskleroz ve hipertansiyonlu hastalardaki klinik olaylar ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle, endotel disfonksiyonu gelişiminin mekanizmaları ile ilişkili bilgiler ve endotel disfonksiyonunu önlemeye yönelik farmakolojik stratejiler bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için büyük önem

taşımaktadır. Endotel disfonksiyonunda ET-1'in rolüne ilişkin prelinik ve klinik kanıtlar olmasına karşın, bunun altında yatan mekanizmalar son zamanlarda araştırılmaya başlanmıştır (14). Bu nedenle, endotelin aracılı endotel disfonksiyonunun mekanizmasının araştırılması esansiyel hipertansiyon, kronik kalp yetmezliği ve kronik böbrek yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde önemli bilgiler sağlayabilir.

2.2. Endotelin- 1 Hakkında Genel Bilgi

2.2.1. Endotelinler

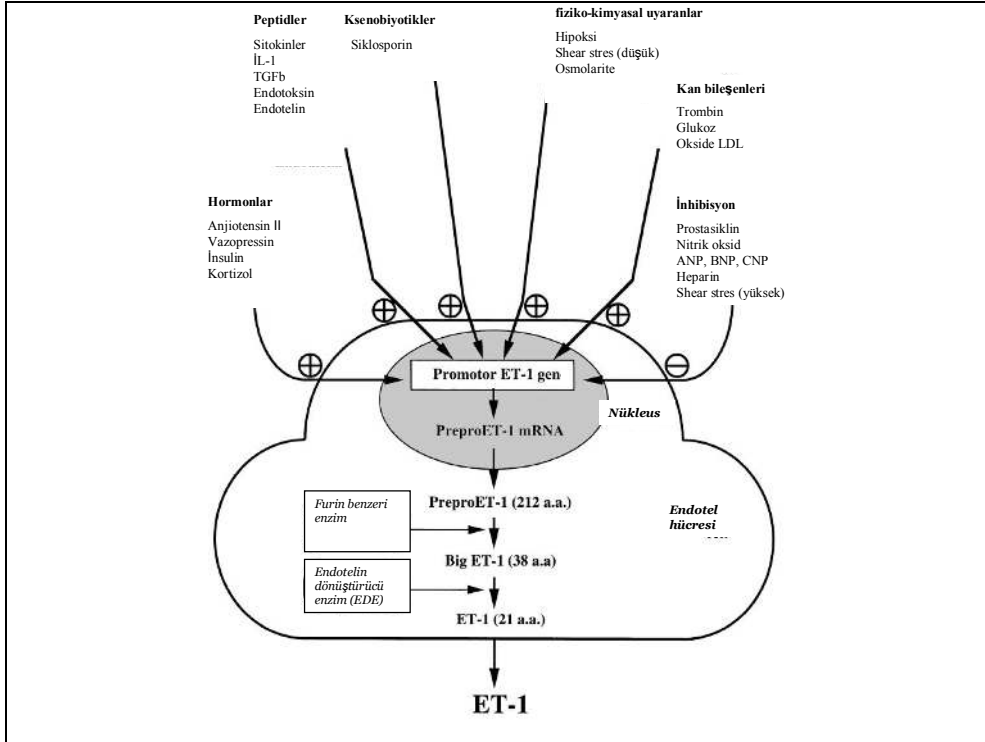
Endotelin (ET) diğer memeli peptidleri ile dizi benzerlikleri göstermeyen ve 21 aminoasit içeren isopeptid ailesinin bir üyesidir (31). ET-1 hidrofobik bir karboksil terminal ucu ve ucunda 2 sistein köprüsü olan N terminal ucu içeren 21 aminoasitlik bir peptid olup endotelin peptid ailesinin temel üyesidir (Şekil 2.1) (31). ET-1'in keşfinden kısa bir süre sonra ET-2 ve ET-3 olarak adlandırılan ve sırasıyla yapısal olarak 2 ve 6 farklı aminoasidi içeren peptidler saptanmıştır. Endotelinlerin; endotelin-1 (ET-1), endotelin-2 (ET-2) ve endotelin-3 (ET-3) olarak adlandırılan 3 izoformu dışında dördüncü bir izoformu, aslında orijinal olarak farede vazomotor intestinal kasıcı peptid olarak tanımlanan türe özgü bir insan ET-2 analogudur (33). ET-1 damar endotelinde üretilen baskın izoformdur. ET-2, insan meme tümör büyümesi ve invazyonu ile ilişkili iken; beyinde bol miktarda bulunan ET-3 ve vazomotor intestinal kasıcı peptid/ET-2, nöronal endotelinler olarak adlandırılabilir (34).



Şekil 2.1. Endotelinlerin yapısı.

2.2.2. Endotelinlerin üretim bölgeleri

ET-1; endotel ve düz kas hücreleri, hava yolu epitel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, kardiyak miyositler, beyin hücreleri ve pankreatik adacık hücreleri tarafından üretilir (35). ET-1, aynı zamanda böbrek, arka hipofiz lobu ve merkezi sinir sistemi tarafından üretilirse de (36), ET-1'in üretiminin en önemli bölgesi endotel hücreleridir (14). ET-1 üretimi, hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini arttıran endotel kaynaklı NO, nitrovazodilatörler, natriüretik peptidler, heparin ve prostaglandinleri içeren çeşitli uyarılar ile inhibe edilir (Şekil 2.2) (28). Buna zıt olarak, adrenalin, anjiotensin II, vazopressin, kortizol gibi hormonlar, sitokinler, hipoksi gibi fizikokimyasal uyarılar ve trombin, glukoz ve okside olmuş LDL gibi kan komponentleri ise ET-1 üretimini uyarıcı yönde etki göstermektedir.



Şekil 2.2. Endotelin-1 sentezini düzenleyen faktörler ve ET-1 sentez yolağı.

Diğer bir endotelin peptid olan ET-2'nin sınırlı miktarı endotel hücreleri, kalp ve böbreklerde üretilmektedir (37). Ayrıca, ET-2 ovaryumda ve intestinal epitel hücreleri tarafından eksprese edilir (32). Endotelin ailesinden ET-2'nin akciğerlerin alveolarizasyonu, ısı regülasyonu, yumurtlama, intestinal epitel hücre homeostazı ve bununla birlikte olası inflamatuvar barsak hastalığını regüle ettiğini gösterilmiştir.

ET-3'ün ise endotelde değil, seçici olarak endokrin, gastrointestinal ve merkezi sinir sisteminde eksprese edildiği görünmektedir (32,36). ET-3 endotel hücrelerinde, beyin nöronlarında, renal tübüler epitel hücrelerinde ve intestinal epitel hücrelerinde bulunur ve NO ve prostasiklin gibi vazodilatörlerin salınımına aracılık eder (38).

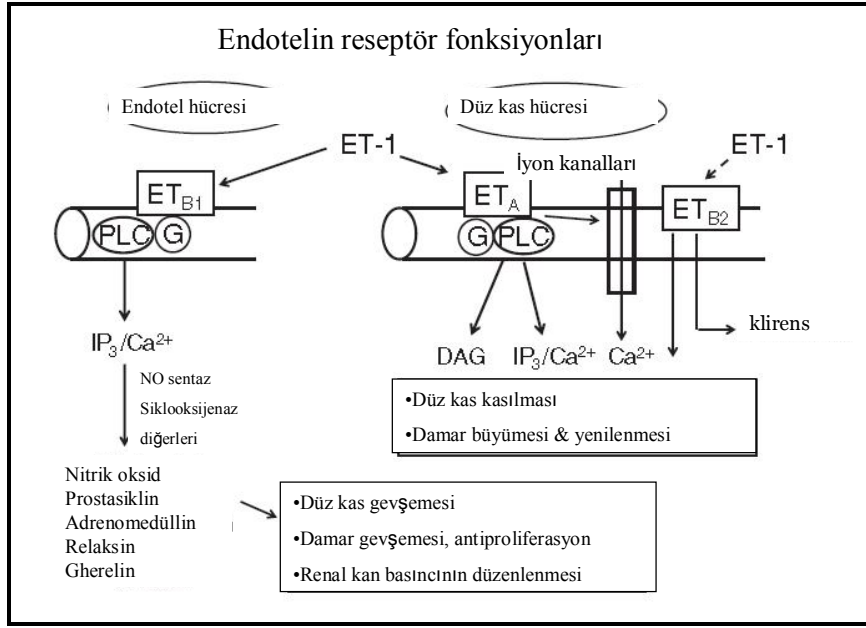
2.2.3. Endotelin reseptör fonksiyonu

1990 yılında, ET'ler için spesifik afiniteye sahip 2 reseptör keşfedilmiştir: ET_A ve ET_B reseptörü (Tablo 2.1) (28). Her iki reseptör önemli derecede sekans benzerliği ile G-proteinine bağlı heptaheliks yapıda transmembran proteinleridir (39).

Tablo 2.1. ET reseptörlerinin sınıflandırılması.

Reseptör	ET _A	ET _{A/B}	ET _B
Potens	ET ₁ > ET ₂ >> ET ₃		ET ₁ = ET ₂ = ET ₃
Affinite	ET ₁ ~ 10 ⁻⁹ mol/l ET ₃ ~ 10 ⁻⁶ mol/l		ET ₁ ~ 10 ⁻⁹ mol/l ET ₃ ~ 10 ⁻⁶ mol/l
Doku	damar düz kası	endotel	damar düz kası
Damar tipi	konduit ve rezistans damarlar	tüm damarlar	resistans ve kapitan damarlar
Etki	konstriksiyon	dilatasyon	konstriksiyon
Agonistler	yok	endotelin-1	endotelin-3, sarafatoksin 6c
Prototip agonistler	BQ-123	TAKO44, Bosentan	BQ-788

Memeli dokularında klonlanan ve karakterize edilen ET_A ve ET_B reseptörleri, endotelinlerin 3 izoformunun değişik etkilerini açıklamaktadır (Şekil 2.3) (40). ET_A reseptörü endotel hücrelerinden çok, aort, kalp ve böbreklerde ve seçici olarak damar düz kas hücrelerinde eksprese edildiği görülmektedir. ET_A reseptörü tercihen ET-1 ile aktive edilir (34,35). ET-1, temel olarak ET_A reseptörleri aracılığı ile kardiyovasküler ve solunum fonksiyonlarını kontrol eder (41). Kardiyovasküler sistem içinde ET_A reseptörü, çoğunlukla ET-1'in miyokardiyal hücre proliferasyonu ve damar kasıcı etkilerine aracılık eder. ET_B reseptörü ET-1 ile ve ET-3 ile eşit şekilde aktive edilir. ET_B reseptörü mRNA'sı en fazla endotel hücre kültürlerinde eksprese edilir (42). Bu endotel hücre ET_B reseptörlerinin aktivasyonu NO ve prostaglandinleri içeren damar gevşetici maddelerinin üretimine yol açar. ET_B reseptörü ise miyokard ve damar dokusunun proliferasyonunun önlenmesi, renal natriürez ve özellikle indirekt vazodilatasyon gibi büyük ölçüde zıt etkiler gösterir (31). ET_B reseptörü mRNA'sının, vazokonstriksiyona aracılık eden damar düz kaslarda da bulunduğu gösterilmiştir (43).



Şekil 2.3. ET-1'in vasküler etkileri.

Tüm bu etkilerin “endotele ait” ET_B reseptör (ET_{B1}) aracılı olup olmadığına bakılmaksızın, en azından sıçanlarda ve insanlarda, bu reseptörün önemli homeostatik rolü olduğu vurgulanmaktadır (32). Başka bir ET_B benzeri reseptör alt-tipi olan ET_{B2} 'nin keşfi ve ET_{B2} 'nin tavşan venöz düz kasları üzerinde ve sıçan renal ve mezenterik arteriyal düz kaslarında vazokonstriksiyon ile bağlantılı olması ile ET_{B2} reseptörlerinin normal bölgesel vazokonstriksiyona katıldığı ileri sürülmüştür. Son zamanlarda; ET_{B1} ve ET_{B2} 'nin sırasıyla endokarda ait endotelde ve kardiyomiyositlerde bulunduğu ve kontraktilite üzerine zıt etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Ancak, arteriyal düz kas hücreleri üzerinde lokalize olan ET_B reseptörlerinin damarlarda kasıcı etki göstermediği ve ET-1'in klirensinde oldukça önem taşıdığı da bilinmektedir (44). ET_A reseptörü temel vazokonstriktör ve büyüme destekleyici reseptör olarak kabul edilirken, ET_B reseptörü hücre büyümesini ve damar sistemde vazokonstriksiyonu inhibe eder ve “temizleme (klirens) reseptörü” gibi diğer fonksiyonlarının da olduğu kabul edilmektedir. ET_B reseptör aracılı bu klirens mekanizması özellikle dolaşımdaki ET-1'in ~ %80'inin temizlendiği akciğerlerde önemlidir. ET_A reseptörü ET-1 ve ET-2'ye subnanomolar affinite gösterirken, ET-3'e ise 100 kat daha düşük affinite gösterir (38). ET_B , tüm endotelin peptidleri için eşit subnanomolar affiniteye sahiptir.

Sağlıklı bireylerde, böbrek damar sistemi ET-1 ile indüklenen vazokonstriksiyona son derece duyarlıdır; ancak vazokonstriktör ET_B reseptörleri vazokonstriksiyona katılmaz, çünkü ET-1'in tüm renal etkileri ET_A reseptör antagonisti ile önlenmektedir (45). Bu nedenle, ET_B-reseptörü ile oluşan vazokonstriksiyon normal koşullarda anlamlı fark yaratmaz ve değeri olasılıkla önemsizdir (32). Ancak, ET_B reseptörlerinin giderek artan düzeyde eksprese edildiği ateroskleroz ve esansiyel hipertansiyon gibi bazı hastalık süreçlerinde daha fazla önem kazanacağı ileri sürülmüştür (45). Kardiyorenal hastalarda potansiyel olarak var olan ET_B reseptörlerinin artmış vazokonstriktör etkileri, ET_B reseptör-aracılı vazodilatasyondan daha baskın hale gelmektedir (32).

Reseptörlerin tanımlanmasından sonra oral olarak aktif, peptid olmayan ET reseptör antagonisti bosentan (Ro 47-0203) keşfedilmiştir (46). Bosentan; düşük ve orta nanomolar aralıktaki affinitesi ile hem ET_A hem de ET_B reseptörleri için kompetitif (yarışmalı) bir antagonisttir. Aynı zamanda, birçok in vitro, in vivo ve klinik çalışmada, çeşitli kimyasal yapı ve alt-tip seçiciliğine sahip ET reseptör antagonistlerinin ET ile indüklenen çeşitli etkileri inhibe edebildiği gösterilmiştir (47, 48). Prototipi siklik pentapeptid BQ-123 olmak üzere peptid ve nonpeptid yapıda güçlü ET_A antagonistleri sentezlenmiştir (49). BQ-788 ise; ET_B reseptörünün seçici bir peptid antagonistidir (32, 48).

2.2.4. Plazma ve doku endotelin-1 düzeyleri

ET-1; insan plazmasında bulunan sürekli olarak üretilen ve atılan normal bir peptiddir (40). Sağlıklı bireylerde konsantrasyonu oldukça düşük olup, birçok çalışmada ortalama 0.3 pg/ml'den daha az bir değer ile 3 pg/ml (0.15- 1.5 pg/ml) arasında değiştiği bulunmuştur (40,51). Bu konsantrasyonlar sıçan koroner dolaşımında vazokonstriksiyona neden olabilecek 10 pg/ml değerlerinin altındadır (52). Genellikle, düz kas hücresi çevresindeki peptid düzeyinin, düz kas hücresine doğru salınımından dolayı damar lümeni içindeki düzeyden çok daha yüksek olduğu varsayılır. Sağlam damar yatağında ET-1'in bazal sekresyonunun damar lümeninde interstisyel transüdaya göre 5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Önemli olarak, ET-1 konsantrasyonunun transüdaya 1pg/ml düzeyini asla aşmamış olması oldukça önemli olup, bu değer koroner vazokonstriktör aralığının altında olduğu açıktır (32). ET reseptör antagonistlerinin varlığında koronerde ve interstisyel sıvıda direkt ET-1 ölçümleri ile birlikte koroner perfüzyon basınç analizleri yapıldığında; endojen kardiyak ET-1'in aktif bir şekilde düşük koroner tonusta

rol oynadığı ve bunu olasılıkla luminal salınan peptidler aracılı endotel otoreseptörlerinin stimülasyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Diğer taraftan, kronik ET-1 oluşumu, yeni oluşan ET-1 moleküllerinin endotel hücrelerine bağlanma kapasitesinden fazlaysa, vazokonstriktör etki vazodilatör etkiden daha baskın olacak ve böylece vazodilatasyondan çok vazokonstriksiyon ile sonuçlanacaktır (53). Bununla uyumlu olarak, pulmoner dolaşım örneğinde olduğu gibi, ET-1 plazma düzeyinin artması sıklıkla arterial basınç değişimi ile ilişkilendirilmektedir.

2.2.5. Endotelinlerin klirensi

ET-1'in kan basıncı üzerine etkisi 60 dakika boyunca sürmesine karşın, ET-1 intravenöz bolus enjeksiyonu sonrası yaklaşık 1 dakikalık biyolojik yarılanma ömrü ile hızla dolaşımdan temizlenir (14). ET-1'in klirensinin önemli bir kısmı reseptör bağlanması ve daha sonra internalizasyon yoluyla gerçekleşmektedir. Endotelin reseptörlerinin ET_B alt tipi blokajı (ET_A alttipleri ile değil) ET-1 ve ET-3 plazma konsantrasyonunu artırır. ET_B reseptörlerinin blokajı ile 15 dakika içinde dolaşımdaki ET-1'in düzeyi artar, ancak iri ET-1'in konsantrasyonu etkilenmez (40). Bu sonuç; ET-1 düzeyinde oluşan artışın ET-1'in doğrudan de novo yolu ile üretimini sonucu değil, ET-1'in reseptörlerden ayrılması aracılı oluştuğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, endopeptidaz ile (özellikle nötral endopeptidazları ile) endotelinlerin enzimatik yıkımı da oluşmaktadır.

Çeşitli mekanizmalar ET-1'in yıkılımı ve inaktivasyonu ve dolaşımdan verimli bir şekilde temizlenmesi için bir uyum içinde davranır. Bu süreçler öncelikle akciğerlerde olmak üzere böbrek, karaciğer ve kalp gibi diğer organlarda gerçekleşir. İlk olarak 1994 yılında Fukuroda ve arkadaşları tarafından ET'nin dolaşımdan temizlenmesinde (klirensi) ET_B reseptörlerinin önemli rolü olduğu saptanmış ve bu reseptörlerin doku ET-1 düzeylerini vazodilatör aralığa yakın düşük konsantrasyonunda tutmayı sağladığı anlaşılmıştır (52). Seçici ET_A-reseptör antagonisti olan PD 155080 varlığında kalp perfüze edildiğinde koroner sıvıda ve intertisyel sıvı (transüda)'da ET-1 düzeyinin etkilenmediği, oysa oldukça seçici ET_B reseptör antagonisti olan BQ788 varlığında ET-1 konsantrasyonunun kararlı bir şekilde arttığı saptanmıştır (32). Bu veriler BQ788 varlığında üretim ve intrakardiyak temizlenme arasındaki dengenin azalmış temizlenme yönünde değiştiği anlamına gelmektedir. ET_B reseptörlerinin blokajı intertisyel ET-1'in 20 kattan daha fazla artmasına ve koroner perfüzyon basıncında eşzamanlı bir artışa

neden olmaktadır. ET-1'in artışı sonucu oluşan bu etkinin de düz kas ET_A reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı olabileceği olasıdır. Bu nedenle, bozulmuş ET-1'in atılımı öncelikle vazokonstriksiyon gibi lokal etkilerin artmasına yol açar. Benzer bir etki insan olmayan primatlarda da gözlenmiş olup, ET_B reseptör blokajı ET-1 plazma düzeyinde 20 kattan daha fazla bir artışa ve ET_A reseptörleri aracılığı ile kalıcı hipertansiyon gelişimine neden olmuştur.

2.2.6. Hücre içi olaylar ve sinyal iletimi

ET-1'in ET_A ve ET_B reseptörlerine bağlanması G-proteinine bağlı fosfolipaz C (PLC)'nin aktivasyonuna yol açar (28). Bu da fosfatidil inositolün hidrolizine ve sitozolik inositol trifosfat ve membrana bağlı diaçilgliserol oluşumuna neden olur. İnositol trifosfat intrasellüler depolardan salınımı aracılığı ile hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ($[Ca^{2+}]_i$) hızlı bir şekilde artmasına neden olur. $[Ca^{2+}]_i$ 'de daha uzun süreli bir artış membran Ca^{2+} kanallarının açılması aracılığıyla oluşur. Diaçilgliserol, protein kinaz C'yi aktive eder ve bu durum $[Ca^{2+}]_i$ 'i değişikliklerine kontraktıl aparatın duyarlılığını artırır. Diaçilgliserol nükleer sinyal mekanizmalarını aktive ederek hücre fonksiyon ve büyümenin uzun süre düzenlenmesi üzerine etki gösterir ve sodyum-hidrojen iyonu değişim pompası üzerine doğrudan etkileri ile de hücre içi pH'ını arttırır. Ayrıca, in vitro ve in vivo çalışmalar ET-1'in membrandaki K^+ kanallarını kapadığına dair kanıtları sunmaktadır. Bu kanalların kapanması hücreden K^+ 'nın dışarı akışını (efflux) önler, böylece membranın depolarizasyonu ve düz kas kasılması gerçekleşir. Ayrıca, ET-1 fosfolipaz A₂'yi aktive ederek prostasiklin ve tromboksan A₂'nin üretimini artırır.

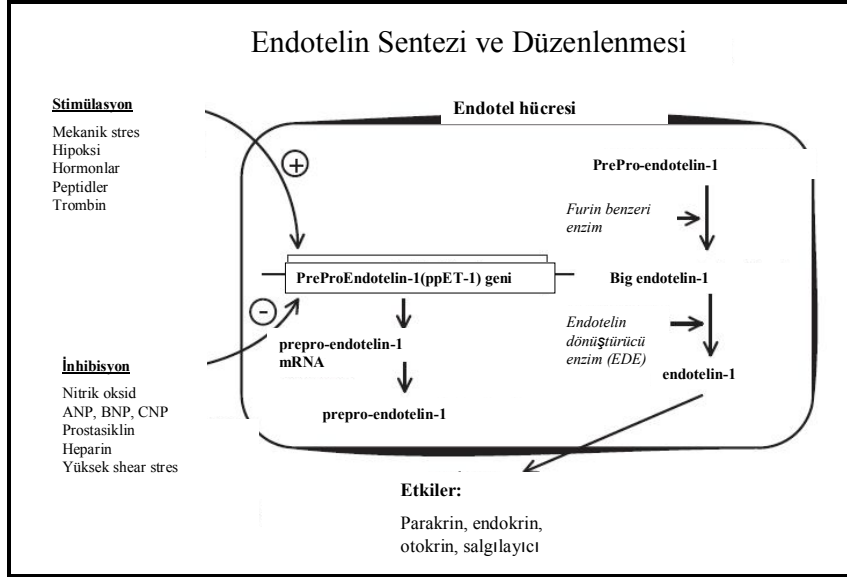
ET ile indüklenen intrasellüler yanıtının ayrıntılı mekanizması henüz net değildir (55). ET; ET_A reseptör aracılığı düz kas kontraksiyonuna neden olur. ET-1 önce geçici bir intrasellüler serbest Ca^{+2} iyonu değişimine neden olur, daha sonra bunu uzun süre (örneğin 30-60 dakika) sürekli bir intrasellüler serbest Ca^{+2} artışı izleyerek uzun süreli kasılma gerçekleşir. Geçici artışı, intrasellüler Ca^{+2} depolarından fosfolipaz C aracılığı salınan Ca^{+2} temsil eder. Uzun süreli artış, ekstrasellüler alandan gelen Ca^{+2} 'dan kaynaklanır. ET araştırmalarının başlangıç aşamasında, sürekli fazdaki Ca^{+2} geçişinin özel olarak ET_A reseptör aracılığı voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ancak, bu etkiler ET-1'in göreceli olarak nispeten yüksek konsantrasyonunda gözlenmiştir. ET-1'in fizyolojik konsantrasyonları varlığında Ca^{+2}

giriş, seçici olmayan katyon kanalları aktivasyonu ve depo-bağımlı Ca^{+2} kanalları (store-operated calcium channel; SOCC) aktivasyonu aracılıdır. Sıçan aortundan izole edilen düz kas hücreleri ET-1'in düşük bir konsantrasyonu ile uyarıldığında sadece sürekli faz gözlenmiştir. Sıçan aortunda sürekli faz Ca^{+2} iyonlarının extrasellüler ortamdan uzaklaştırılması ile ortadan kalkmıştır. Nifedipin ve PLC inhibitörü U73122'nin bu faz üzerine etkisi yoktur. Aksine, seçici olmayan bir katyon kanal inhibitörü olan SK&F96365, ET-1 ile indüklenen Ca^{+2} girişini ve kasılmayı inhibe etmiştir ve bu da SK&F96365'e seçici olmayan bir katyon kanalının ET-1 ile indüklenen kasılmayla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, sodyum nitroprussid (SNP) ve 3-morfolinosidnonimin (SİN-1) gibi NO donörleri de ET-1 ile indüklenen intrasellüler serbest Ca^{+2} artışını inhibe eder. NO ve ET-1 aynı seçici olmayan katyon kanalı üzerinde hareket eder. Ayrıca, son zamanlarda ET-1'in; G_{12} veya G_{13} 'nun doğrudan aktivasyonu aracılı Rho–Rho-kinaz (ROCK) sistemini aktive ederek düz kasın kontraktıl kısımlarının sensitizasyonu aracılığıyla kasılmayı arttırdığı bildirilmiştir. Kasıcı etkilerin yanı sıra ET-1 çoğu ET_A reseptörleri aracılığı ile endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve astrositleri de içeren çeşitli hücre tiplerinin büyümesini destekler. Aksine, ET_B reseptörlerinin hücrelerin apoptotik mekanizmasında rol oynadığı düşünülmüştür, ancak hücre boyutunda (subsellüler, hücre içi mekanizması) bilinenler çok azdır.

2.2.7. Endotelin sentezi ve düzenlenmesi

ET üretimi gen düzeyinde regüle edilmektedir ve endotelin ailesinin her bir üyesi olgun izoform için belirli bir prekürsörü kodlayan ayrı bir gen tarafından üretilir (28). Endotelin ekspresyonu; düşük akım stresi, hipoksi, anjiotensin II, büyüme faktörleri ve diğer sitokinleri içeren çok sayıdaki fiziksel ve kimyasal faktör ile uyarılmaktadır (Şekil 2.4) (28). Uyarıcı etkiler genellikle hücrel Ca^{+2} mobilizasyonunu gerektirir. Bunun aksine, ET mRNA ekspresyonu; NO, natriüretik peptidler, prostasiklin, heparin ve kan akımı artışı ile inhibe edilmektedir. Kan akımı artışı; endotel hücrelerinin akım stres reseptörlerinin aktive edilmesi ile doğrudan NO salınımında artışa yol açar (32,40). Kısa süreli uyarıya yanıt olarak, ET-1 hızlıca salgılanabilir, bu da peptidin de novo sentezinden çok kısmen endotel hücrelerinde depolandığını işaret etmektedir (55). Pek çok uyarıcı faktör, fosfolipaz C/protein kinaz C veya p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz yollarının aktivasyonu aracılığıyla hareket eder. İnhibitör uyarılar ise, siklik

guanozin monofosfat (sGMP) aracılı fosfoinozitol metabolizmasının inhibisyonu yoluyla etkisini gösterir (32,45,50,55). Aktif ET-1 salınımı; gen transkripsiyonu ve/veya ECE aktivitesinin düzenlenmesi ile kontrol edilmektedir ve peptid daha sonra hücreye spesifik yerel ve hormon benzeri bir dizi etki oluşturmaktadır (Şekil 2.4) (40).



Şekil 2.4. ET sentezi ve düzenlenmesi.

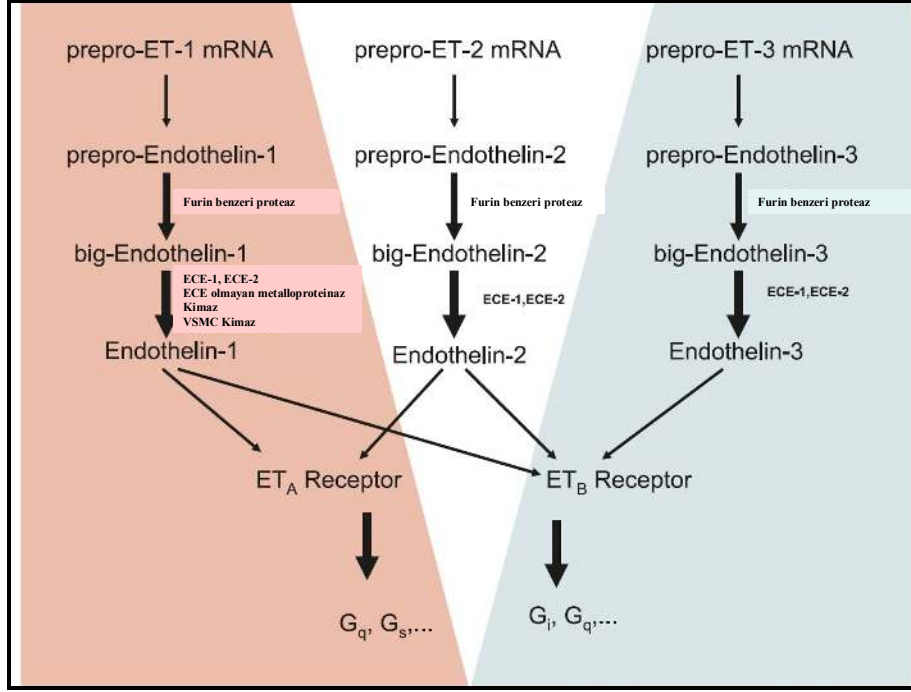
2.2.8. ET sentez yolağının bileşenleri

İnsan ET-1 geninin ilk ürünü bir 212 amino asidlik peptid olan preproendotelin-1 (prepro-ET-1)'dir (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5) (40). Bu peptid; subtilisin ailesine sahip bir fûrin-benzeri enzim ile big (iri) ET-1'e dönüştürülür (32,40). İkinci bir adımda, endotelin-dönüştürücü enzim (ECE, EDE) iri ET-1 (~40 aminoasid içerir)'i bölerek olgun ET-1 peptidinin salınmasını sağlar (31,51).

Endotelin prekürsörleri olgun aktif formu oluşturmak için 2 proteaz ile işlenir (32,38). 212 rezidülü preproendotelinler fûrin benzeri endopeptidazlar ile biyolojik olarak aktif olmayan ara ürünler oluşturmak için dibazik bölgelerinden kesilir ve yaklaşık 37-41 aminoasidlik peptidler iri endotelinler ya da proendotelinler olarak adlandırılır (Şekil 2.5) (32).

İri ET-1'den olgun ET-1 oluşumuna neprilizin süper ailesinden bir membran bağlı çinko metalloproteaz ailesi aracılık eder ve bu proteazlar endotelin-dönüştürücü enzim olarak adlandırılır. Son deneysel kanıtlar karboksipeptidaz A (katepsin A)'nın ECE

ürünü olan ET-1'lerin degradasyonunda çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (32,56).



Şekil 2.5. Endotelin yolağının bileşenleri.

Fonksiyonel olarak farklı roller ve doku dağılımlarına sahip olan ECE ailesi ECE-1a ve ECE-1b olarak ikiye ayrılır (28). ECE-1a, endotel hücreleri gibi 'üretici' hücrelerinin golgi aygıtında eksprese edilir ve bu tür hücrelerde ET-1 oluşumu için iri ET-1'in hücre içi işlenmesinden sorumlu olduğu görülmektedir. ECE-1b, damar düz kas hücreleri gibi 'yanıt veren' hücrelerde eksprese edilir ve bu bölgede iri ET-1 bölünmesi için çalışır. ECE'nin bir ikinci biçimi olarak ECE-2 klonlanmış ve karakterize edilmiştir (28, 57). Membrana bağlı olan ECE-1'e benzer olan ECE-2, fosforamidon ile inhibe edilir ve iri ET-1 için seçicilik göstermektedir. Ancak, ECE-2 sadece asidik pH'ta (5.5) aktiftir ve hücre yüzeyinde eksprese edilmez (28). Böylece, ECE-2 asidik ortamlarda endojen olarak sentezlenmiş olan iri ET-1'in dönüşümünden sorumlu hücre içi bir enzim olarak hareket edebilir. ECE-1 ve ECE-2, iri ET-1 için göreceli seçicidir; iri ET-2 ve iri ET-3'ün bölünmesinde çok az bir aktiviteye sahiptir.

2.2.9. Endotelinlerin damarlardaki etkileri

Çok güçlü vazokonstriktör etkisi açısından bakıldığında, pek çok araştırmacı kardiyovasküler hastalıklarda ET'leri aşılması güç spazmojenler olarak görmektedir (32). ET-1'in damarlarda yıllar boyunca gittikçe artan sayıdaki etkileri (örneğin büyüme hızlandırıcı etkileri ile hiperplazi ve ateroskleroza yol açması gibi) tanımlanırken, damar fonksiyonlardaki düzenleyici önemli fizyolojik etkileri ya görmezden gelinmiş ya da önem sırası daha gerilerde kalmıştır. Sağlıklı insanlarda ET-1 ortalama arteriyel kan basıncını artırır, kalp hızını, kalp debisini azaltır ve akciğer, böbrek, splanknik, miyokard ve iskelet kası damarlarında güçlü ve uzun süreli vazokonstriksiyona neden olur (28). Bu bulgular, endojen ET-1'in sağlıklı insanlarda damar tonusunun sürdürülmesinde fizyolojik bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Çeşitli çalışmalar, bazı hastalıklarda ET-1'e olan damar reaktivitesinin belirgin olarak değiştiğini ortaya koymuştur.

ET reseptör stimülasyonuna damar duyarlılığının artışı, ateroskleroz ve hipertansiyonlu hastalarda gösterilmiştir. Cardillo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hipertansif bireylerde önkol intra-arteryal ET-1 infüzyonu ile oluşan vazokonstriktör yanıtın normotansif bireylere göre artmış olduğu bulunmuştur (54). Bu yanıtın hem ET_A hem de ET_B reseptörlerinin aktivasyonu aracılığı ile olduğu saptanmıştır. ET_A reseptör blokajı sonrasında obez hipertansif hastalarda obez olmayan hipertansif hastalara göre daha çok dilatasyon saptanmıştır. Obez hipertansifler obez olmayan hipertansiflere göre daha uzun süren bir ET_A reseptör blokajı gösterir. Buna ek olarak, hipertansiflerde BQ123 uygulaması sonrası hiperkolesterolemi veya sigara içen gruba göre daha güçlü bir vazodilatasyon yanıtı oluşmuştur (28, 55). Tüm bu gözlemler ET-1 ile oluşan damar tonus artışın kardiyovasküler hastalıklar için diğer risk faktörleri ile ilişkili olarak hipertansiyonda daha belirgin olarak görüldüğünü göstermektedir. Endojen ET-1 oluşumu ve aktivitesi ateroskleroz olan hastalarda da değerlendirilmiştir. Brakiyal arter içi iri ET-1 uygulaması aterosklerozlu hastalarda benzer yaşlı kontrollere göre ön kol vazokonstriksiyonunda daha belirgin bir artışla sonuçlanmıştır (51). Bu etkiye, aterosklerozlu hastalarda artmış ECE aktivitesinin göstergesi olan radyal arter aterosklerotik plaklarda ECE immünoreaktivitesinin varlığı gibi ET-1'in oluşumunda artış eşlik etmiştir. Tip 2 diabeti olan hastalarda da endojen ET-1 ile oluşan vazokonstriktör aktivitede artış olduğu görülmektedir. Böylece, BQ123 uygulanması tip-II diabetli hastalardaki önkol kan akışında anlamlı bir artış ile sonuçlanmış, oysa benzer yaşlı kontrollerde böyle bir etki saptanmamıştır (28).

ET-1 diğerk kasıcı ajanlara oranla 10 kat daha yüksek bir potansiyele sahiptir ve arterlerde kasılmaya yol açar (40). ET-3'te en belirgin olmakla birlikte, her üç endotelinde kasılma öncesi geçici endotel-bağımlı bir vazodilatasyona neden olur (57). Dirençli arterler ve venler ET-1'in etkilerine özellikle duyarlıdır. Hayvanlarda, koroner damar ve böbrek yatakları sistemik ET-1'in vazokonstriktör etkilerine en duyarlı damarlardır (40,58). ET-1'e yanıt olarak gelişen vazokonstriksiyonun başlangıçta sadece damar düz kas hücresi ET_A reseptörleri aracılığı ile ortaya çıktığı düşünülmüştür. Endotel hücresi ET_B reseptörlerinin endotel-kaynaklı gevşetici maddelerin oluşumu aracılığı ile vazodilatasyona aracılık ettiği bilinmektedir (Şekil 2.3) (28). Bununla birlikte, daha güncel kanıtlar ET_B reseptörlerinin aynı zamanda vazokonstriksiyona da aracılık ettiğini göstermiştir (Şekil 2.3). ET_B reseptör agonistlerinin vazokonstriksiyon yanıtı değişkendir ve damar tipi ve damar büyüklüğüne bağlı olduğu görülmektedir (40, 59). Damar yatakları arasında gözlenen bu farklılıklar konstriktör (ET_A ve ET_B) ve dilatör (ET_B) reseptörlerdeki farklılıklar ile ilişkili olabilir.

2.2.10. Arterler üzerine ikili etkiler

Sağlam dolaşıma uygulanan ekzojen ET-1 bifazik bir yanıtı uyarır, ilk olarak arter basıncında geçici bir azalma oluşur. Bunu uzun süren bir hipertansif fazın izlediği birçok kanıt ile gösterilmiştir (32). Bu ikili pattern fare ve insanları da içeren tüm hayvanlarda gözlenmiştir (32,60). ET-1 yanıtının azalma ile seyreden fazının, sağlam ET_B reseptör sinyali aracılı normal endotel fonksiyonu ile ilişkili olduğu, aksine vazokonstriksiyon ve bunun sonucu oluşan hipertansif fazın ise ET_A reseptörleri aracılığı ile ortaya çıktığı bilinmektedir (32,61). ET'lerin, düşük konsantrasyonlardaki vazodilatör etkileri yüksek konsantrasyonda gözlenen kuvvetli vazokonstriktör etkileri nedeniyle hep göz ardı edilmiştir ve bu açıdan ET'ler katekolaminlere benzerlik göstermektedir (32).

2.2.11. Damar tonusunun sürdürülmesinde ET-1'in fizyolojik rolü

Bazal damar tonus ve kan basıncının sürdürülmesi için ET-1'in endojen üretiminin fizyolojik önemi ile ilgili birçok tartışma olmuştur (28). Özetle, ET-1'in endojen üretimi damar tonus ve kan basıncının kontrolünde fizyolojik bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, endojen ET-1'in genel kardiyovasküler etkisi ET_A aracılı ve ET_B aracılı etkiler arasındaki dengeye bağlı olarak değişir. Damar düz kas ET_A reseptörlerinin aktivasyonu damar kasılmasına yol açar ve kan basıncını yükseltme eğilimindedir. Endotel ve böbrek

ET_B reseptörlerinin aktivasyonu vazodilatasyonu ve natriürezi sağlar ve kan basıncını azaltma eğilimindedir. ET-1'in endojen üretiminin kardiyovasküler etkileri ET_A ve ET_B reseptörlerinin sayısındaki veya fonksiyonundaki değişikliklerin olduğu kardiyovasküler hastalıklarda değişebilir.

2.2.12. Hücre büyümesi ve inflamasyon

ET-1 damar düz kas hücreleri, kardiyak miyositler ve glomerül mezangiyal hücreleri için güçlü bir mitojendir (28). Endotelinler aynı zamanda, makrofajları aktive eden sitokinlerin monositlerden üretiminin güçlü uyarıcılarıdır. Bu sitokinler tümör nekroz faktörü, interlökinler (1, 6 ve 8) ve granülosit- makrofaj koloni uyarıcı faktördür (28,62).

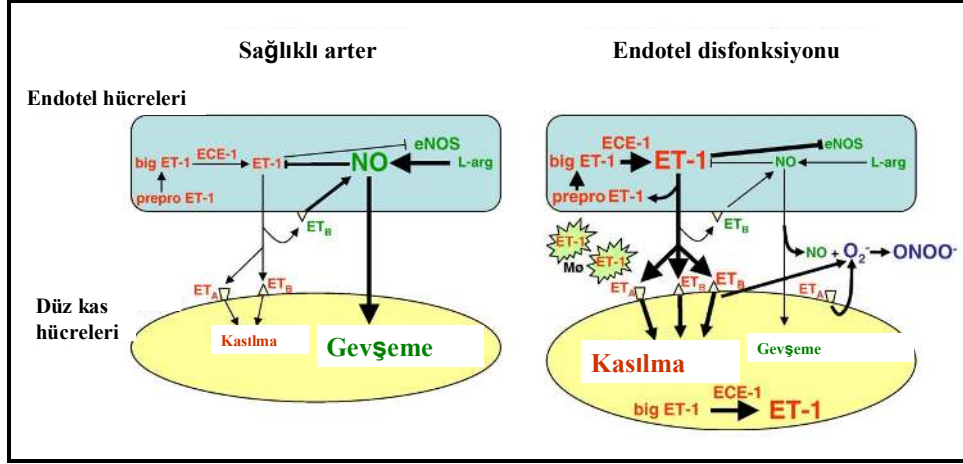
2.2.13. Kardiyak etkiler

ET-1, in vitro olarak güçlü pozitif kronotropik ve inotropik etkilere sahiptir (28). ET-1 koroner damarların da güçlü bir kasıcıdır ve bu da miyokard iskemisine ve ölümcül ventriküler aritmiye neden olmaktadır. İn vivo olarak, ET-1 düşük dozlarda pozitif inotropik olmasına rağmen yüksek dozlarda olasılıkla yüksek bir ard-yük ve koroner vazokonstriksiyona bağlı miyokard iskemisi nedeniyle kalp debisinin düşmesine neden olur. İnsanlarda, ET-1'in sistemik dozu olasılıkla baroreseptör-aracılı kalp hızını azaltarak kardiyak output'u azaltır.

2.3. Endojen ET Sistemi, Endotel Disfonksiyonu ve Ateroskleroz Gelişimi

Endotel disfonksiyonu; damar reaktivitesinin bozulması olarak tanımlanmıştır (14). Damar endotel disfonksiyonu kardiyovasküler hastalıkların gelişiminin erken bir bulgusudur ve ateroskleroz ve hipertansiyonlu hastalardaki klinik olaylar ile yakından ilişkilidir. Hipertansiyon, koroner kalp hastalığı, dislipidemi ve tip I ve tip II diabetes gibi birçok kardiyovasküler ve metabolik bozukluklarda endotel disfonksiyonu gelişmektedir. Hipertansiyon örneğinde olduğu gibi birçok kardiyovasküler hastalığın klinik bulguları öncesinde ve aterosklerozda da plak gelişimi sonrasında anormal vazokonstriksiyon ile ortaya çıkan endotel disfonksiyonu görülmektedir (32). Bu nedenle, endotel disfonksiyonu gelişiminin mekanizmaları ile ilişkin bilgiler ve endotel disfonksiyonuna yönelik farmakolojik stratejiler büyük önem taşımaktadır.

Klasik olarak, endotel disfonksiyonu NO'da bir azalma ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.6) (51).



Şekil 2.6. Arter duvarının sağlıklı koşullarda (sağ) ve endotel disfonksiyonunda (sol) şematik şekli.

Endotel disfonksiyonunda NO'da gözlenen bu azalmanın çeşitli nedenleri olabilir (14). Bunlar arasında, ET-1'deki bir artışın NO'da azalmaya neden olup olmadığının belirlenmesi önemlidir. ET-1; damar düz kasının endotel kaynaklı güçlü bir kasıcı faktörü olması yanısıra NO biyoyararlanımını azaltarak endotel disfonksiyonuna neden olabilir. Gerçekten de son veriler, preproendotelin-1 geninin aşırı ekspresyonunun hedeflendiği transgenik fare (endothelium-restricted ET-1 overexpression) damar endotelinde ET-1'in aşırı ekspresyonunun endotel disfonksiyonuna ve NO'da azalmaya yol açtığına işaret etmektedir (14,63,64). Ayrıca, prelinik ve klinik veriler patolojik durumlarda selektif ET_A ve ET_A + ET_B reseptör antagonistlerinin NO biyoyararlanımını ve endotel fonksiyonunu düzelttiğini göstermiştir (65,66,67). Değişik endojen ve ekzojen faktörler ile endotel hücrelerinden ET-1 üretiminin artışı endotel disfonksiyonu oluşumunda anahtar rol oynar.

Endotel disfonksiyonu genellikle düşük bir biyoyararlanım durumunu ifade eder ve sonuç olarak NO, prostasiklin veya endotel-kaynaklı hiperpolarize edici faktör gibi endotel kaynaklı gevşetici faktörlerin vazodilatör etkisinde bozulma söz konusudur (51,63). Endotel disfonksiyonu sırasında saptanan önemli bir ek değişiklik de potent vazokonstriktör ve proinflatuvar bir peptid olan ET-1 üretiminin artması ve biyolojik aktivitesinin güçlenmesidir.

2.3.1. Endotel disfonksiyonunda Endotelin- 1'in rolü

Endotel disfonksiyonunda ET-1'in rolüne ilişkin prelinik ve klinik kanıtlar olmasına karşın, bunun altında yatan mekanizmalar son zamanlarda araştırılmaya başlanmıştır (14). Endotel fonksiyonu ve NO biyoyararlanımı üzerine ET-1 ve ET reseptör antagonistlerinin etkisinin birkaç olası mekanizması olabilir.

ET-1; NO'nun biyoyararlanımını ya NO üretimini (kaveolin-1-aracılı eNOS aktivitesinin inhibisyonu aracılığıyla) azaltarak ya da NO yıkılımını (oksijen radikallerinin oluşumu ile) arttırarak azaltabilir (14,32,40). ET-1 endotel hücrelerinde NO üretimini bozar ve endotelial NO sentazın ekspresyonunu baskılar (32,68). Ayrıca, iskemi ve reperfüzyona maruz bırakılan kalplerdeki endotelial NO sentazın ekspresyonunu bosenanın arttırdığı bulunmuştur (69). Böylece, ET-1 endotelial NO sentazın aktivitesi ve ekspresyonunu etkileyerek NO biyoyararlanımını azaltabilir. ET-1 ile NO arasındaki başka bir bağlantı da ROS ve NO'nun peroksinitrid oluşumuna neden olarak NO biyoaktivitesini azaltmasıdır (Şekil 2.7) (14). Reaktif oksijen türleri, açık bir şekilde NO ile etkileşerek ve aynı zamanda da prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör aracılığı ile diğer endotel bağımlı vazodilatör yolları inhibe edebilir.

2.3.2. ET-1 NO üretimini azaltabilir: Kaveola'nın rolü

Endotelial NO sentaz (eNOS) aktivitesi ve NO salınımı, posttranslasyonel kontrol mekanizmaları ve protein-protein etkileşimi ile (özellikle kaveolin-1 ile eNOS'un etkileşimi) düzenlenebilir (Şekil 2.8) (14). Kaveolin-1 kaveolanın temel protein örtüsüdür ve eNOS aktivitesi için negatif düzenleyici anahtar protein gibi görünmektedir. Patolojik durumlarda ET-1, kaveolin-1 ekspresyonunun up-regülasyonuna, bu da eNOS aktivitesinin inhibisyonuna yol açar. İnsan safen ven endotel hücre kültüründe ET-1 eNOS'un kaveolin-1'e bağlanmasını arttırarak NO üretimini bozar. Hem ET_A ve hem de ET_B reseptörlerinin blokajı, ET-1 varlığında eNOS'un aktif sitoplazmik formunda kalmasına neden olur ve NO üretimini korur. İlginç olarak, ET_B reseptörleri endotel hücrelerinde kaveola düzeyinde de mevcuttur ve kaveolin-1 ET_B reseptörü ile birlikte bir kompleks oluşturur. ET-1 stimülasyonunun ET_B reseptörü ve kaveolin-1 arasındaki ilişkinin azalmasına ve eNOS ve kaveolin-1 arasında etkileşimde ise bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (32). ET-1, ET_B reseptörüne bağlanarak kaveolin-1'i ET_B reseptörü ile yaptığı kompleksten ayırabilir, ET_B sinyalini

yeniden aktive edebilir, kaveolin-1 ekspresyonunu arttırabilir ve eNOS'un inaktivasyonuna yol açabilir (14).

2.3.3. NO ve artmış oksidatif stres ile etkileşim

İn vivo olarak, preproendotelin-1 geninin aşırı ekspresyonunun hedeflendiği transgenik fare endotelinde, ET-1 aşırı ekspresyonunun endotel disfonksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (14,51). Endotelyal ET-1 aşırı üretimi rezistans damarlarda endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıyla ve damar reaktif oksijen türlerinin üretiminde artma ile ilişkilidir (14). Düz kas hücrelerinde yerleşik ET_B ve ET_A reseptörleri yanısıra endotelde de ET_B reseptörleri bulunmaktadır. Hem ET_B hem de ET_A reseptörleri ROS'nin üretimini arttırabilir. ET-1, in vitro fare aortunda süperoksid üretimini artırır ve bu durum seçici ET_A reseptör antagonisti BQ123 ile inhibe edilebilir (28,70). ET-1 ayrıca hipertansif sıçanlarda NADPH oksidaz kaynaklı süperoksid oluşumunu uyarır ve bu etki ET_A reseptör blokajı ile inhibe edilebilir. ET-1'in; NADPH oksidazın hız belirleyici altünitesi olan gp91phox ekspresyonunu ve insan endotel hücrelerinde ET_B reseptörleri aracılığı süperoksid oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (28,71).

ET-1'in süperoksid üretimi üzerinde uyarıcı etkisi NADPH oksidaz altünitesi p22phox üzerinden ortaya çıkabilir (28,72). Süperoksid stimülasyonu ET-1'in fonksiyonel etkileri ile ilişkilidir, çünkü ET-1 aracılı süperoksid üretiminin, hem kontrol hem de diabetik sıçanların aortunda PI3-kinaz aktivitesi ve p22phox ekspresyonu aracılı bir mekanizma ile endotel bağımlı gevşemeyi bozduğu gösterilmiştir. Ayrıca, diabetik sıçanlarda ikili ET_A/ET_B reseptör antagonisti olan J-10419 ile kronik tedavi asetilkolin aracılı endotel-bağımlı vazodilatasyonunu düzeltir, süperoksid oluşumunu azaltır ve p22phox ekspresyonunu azaltır (28). ET-1 aracılı endotel disfonksiyonun vitamin C ile düzeltilebilmesi de, oksidatif stresdeki artışın olası rolünü desteklemektedir (28,72). Dahası, vitamin C'nin izole düz kas hücrelerinde ET-1'in indüklediği reaktif oksijen türlerinin oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (28,73). Ayrıca, koroner vazokonstriksiyon üzerine ET-1'in etkileri, eNOS-kofaktörü tetrahidrobiopterin (BH4)'in biyoyararlanımının azalması durumunda daha fazla belirgin olabilir (28,74). Son veriler, sıçan aortunda ET-1 aracılı süperoksid üretimi ve vazokonstriksiyonunun NADPH oksidaz aktivasyonu ve kenetlenmemiş NOS aracılı olduğunu göstermektedir (28,75). Kenetlenmemiş NOS'nın anlamı; BH4 eksikliği durumunda NOS'un NO'nun yerine süperoksid oluşturmaktır. ET-1, sıçan hipertansiyon modelinde ET_A aracılı NADPH

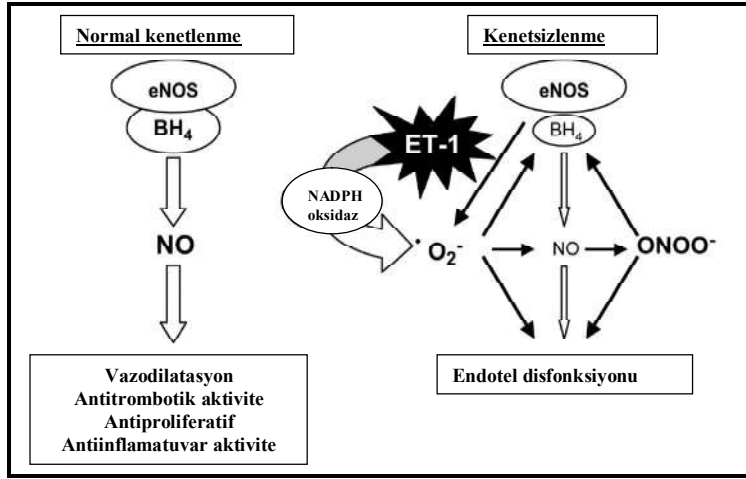
oksidaz yolağı aracılı BH₄ eksikliğini hızlandırarak endotel-bağımlı vazodilatasyonunun bozulmasına neden olabilir (28,76). Bu veriler, damar duvarındaki ET-1 ile oluşan oksidatif stres artışının, endotel disfonksiyonu ve ateroskleroza yol açan önemli bir faktör olduğunu düşündürmektedir. ET-1'in ayrıca insanlardaki artmış oksidatif stresle ve endotel disfonksiyonuyla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. ET-1 süperoksid oluşumunu uyararak diabetli hastalarda insan venöz bypass damarlarında endotel bağımlı vazodilatasyonu bozar (28,77). Tümü birlikte ele alındığında, bu bulgular ET-1'in reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresi arttırabildiğini düşündürmektedir.

eNOS ile enzimatik bir kompleks oluşturan ve eNOS'un kofaktörü olan BH₄; ROS için olası bir hedef gibi görünmektedir ve BH₄'ün oksidasyonu eNOS fonksiyonunun bozulmasına ve kenetsizlenmeye neden olabilir (28). Bunun bir sonucu olarak, eNOS'un kendisi ROS için bir kaynaktır. Özellikle superoksid anyonu NO ile reaksiyona girerek güçlü bir BH₄ oksidanı olan peroksinitrid (ONOO₂)'ı oluşturur. Böylece, BH₄ tüketimi, eNOS'u ROS üretimi için temel bir kaynak haline getirerek endotel disfonksiyonuna yol açar. Bu durumlarda eNOS'un inhibisyonu, serbest radikal üretimini önlemektedir. Endoteli sağlam aortaya BH₄ eklenmesi (endotel erozyonu olan aortada etkisi yoktur) eNOS kenetsizlenmesini ortadan kaldırır ve bu da ET-1 ile oluşan ROS artışını inhibe eder (Şekil 2.7) (14). Sonuç olarak, ET-1 BH₄ biyoyararlanımını azaltır ve böylece ROS artışı ile endotel disfonksiyonuna yol açar.

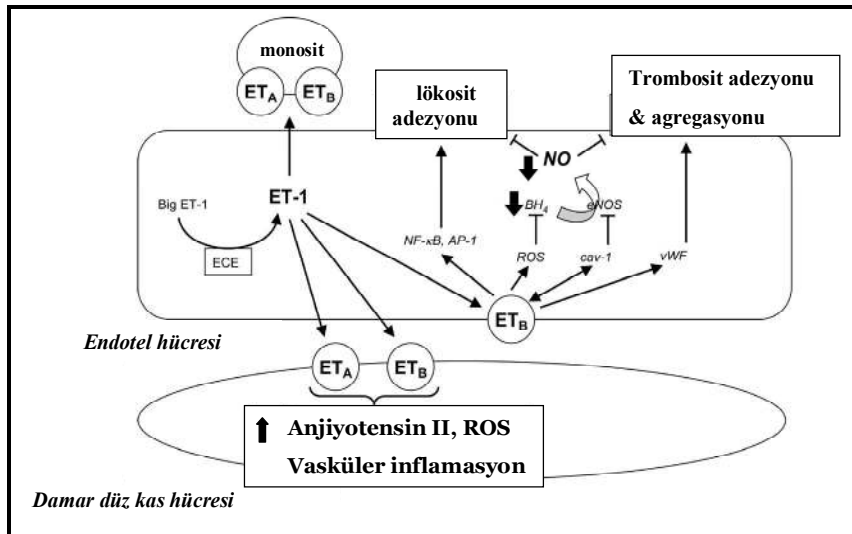
Endojen ET-1'in oksijen radikalleri aracılığıyla endotel disfonksiyonuna neden olduğu görüşü BH₄ düzeylerinde azalma, endotel disfonksiyonu, ROS üretiminde artma ve damarlarda ET-1 aşırı ekspresyonunun olduğu ET-1 bağımlı hipertansiyon modeli olan DOCA-tuz uygulanmış sıçan veya fare modelinde yapılan araştırmalarla da doğrulanmıştır (14). Bu hayvanlarda damar BH₄ düzeyleri damarda ROS'un temel kaynağı olan NADPH oksidaz aktivitesinin inhibisyonu ile veya ET reseptör antagonistleri ile düzeltilebilir. Sonuç olarak, ET-1 NADPH oksidaz aktivitesini arttırarak ROS üretiminin artışına neden olmakta, BH₄ biyoyararlanımını azaltmakta ve eNOS'un kenetsizlenmesi aracılığıyla endotel disfonksiyonuna yol açmaktadır (Şekil 2.7) (14).

2.3.4. Anjiyotensin II ile etkileşim

ET-1 damarda özellikle anjiyotensin II ile oluşan endotel disfonksiyonu olmak üzere, anjiyotensin II aracılı etkilere de aracılık edebilir (Şekil 2.8) (14). ROS üretiminin güçlü uyarıcı olan anjiyotensin II'nin, in vivo olarak endotel ve damar düz kas hücrelerinde ET-1 üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Sıçanlarda anjiyotensin II'nin infüzyonu, hipertansiyonun gelişimine yol açar. Bu da ET_A ve ET_A / ET_B reseptör blokerleri ile önlenabilir. ET-1'in bu aktivasyonu AT₁ reseptör blokeri olan losartan ile ve ROS süpürücü ajanlarla bloke edilebilir. Bu sonuç anjiyotensin II ile oluşan ET-1 aktivasyonunun ROS aracılı olduğunu düşündürmektedir. Böylece losartan anjiyotensin II ile oluşan ET-1 üretimini ve endotel disfonksiyonunu önler.



Şekil 2.7. Endotel hücrelerinde ET-1 ile oluşan eNOS'un kenetsizlenme mekanizmaları.



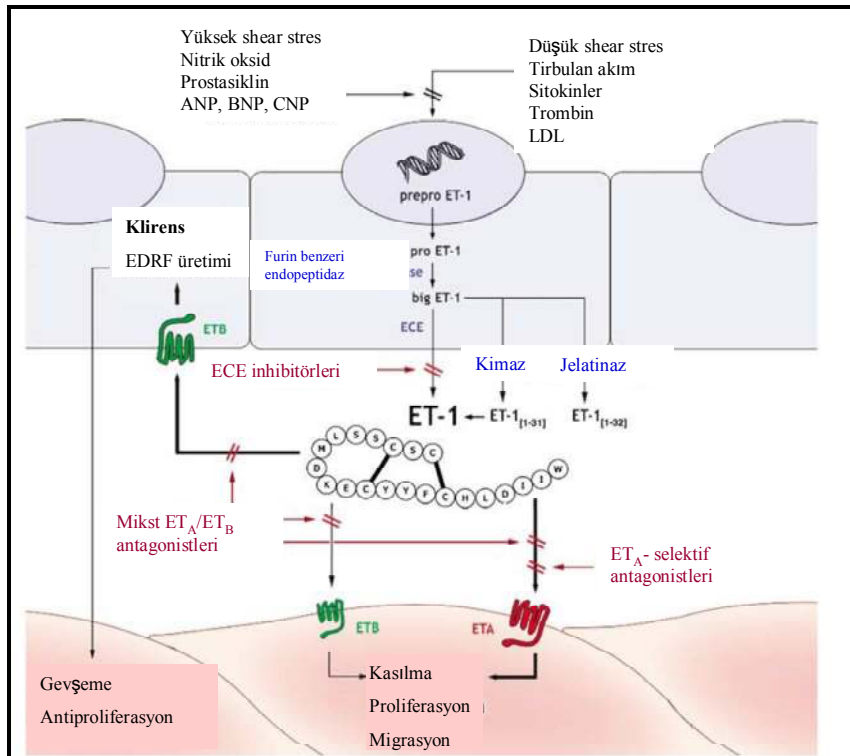
Şekil 2.8. ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonunda olası mekanizmalar.

2.4. Endotel Fonksiyonu Üzerine ET Reseptör Antagonistlerinin Etkileri

ET-1 ve NO gibi endotel kaynaklı maddeler arasında önemli bir etkileşim vardır (28). NO salınımı üzerine ET-1'in ET_B reseptörü aracılığı uyarıcı etkisi yanısıra, NO'nun olasılıkla süperoksid inhibisyonu yolu ile ET-1'in üretimini inhibe ettiği bilinmektedir. İnsanlardaki in vivo deneyler sonucunda, endojen ET-1 aktivitesindeki artış ve NO üretimindeki bozulma arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (14). Sağlıklı insanlara ET-1 uygulanması endotel- bağımlı dilatasyonu bozmaktadır (31,78). Bunun tersine, ET reseptör antagonistlerinin uygulanmasının ateroskleroz ve hipertansiyon gibi endotel fonksiyonunun bozulduğu patolojik durumlarında endotel fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. İzole edilmiş insan ven ve arterlerinde, ET reseptör blokajı asetilkoline olan bozulmuş gevşeme yanıtını düzeltmektedir (14). ET reseptör blokerleri ile endotel fonksiyonda oluşan bu düzelme, NO üretimindeki ve eNOS aktivitesinde artış ile ilişkilidir (28,79). Değişik hayvan modellerinde ve insanlarda hem selektif ET_A hem de ET_{A/B} reseptör antagonistlerinin endotel disfonksiyonunu tersine çevirdiği bulunmuştur (14). Düz kas hücrelerindeki ET_A reseptör blokajı oksidatif strese azalmaya ve antiinflamatuvar aktiviteye neden olur. Bu durum endotel hücreleri ile medya tabakası arasındaki zararlı etkileşimlerin azalması ile sonuçlanabilir.

Stres durumları altında endotel üzerinde bulunan ET_A reseptörleri eksprese olabilir. Yüksek düzeyde glukoz maruziyetinin HUVEC'te ET_A reseptör ekspresyonunu aktive ettiği ve bunun endotel hücrelerindeki geçirgenlik artışından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu gözlemler çeşitli deneysel modellerde ve insanlarda doğrulanmıştır. Endotel disfonksiyonu, iskemik bir atağı izleyen reperfüzyon sırasında da erken gelişen bir özelliktir (28). İskemi-reperfüzyon hasarı en azından kısmen endotel kaynaklı NO üretiminin bozulması ile ilişkilidir. Deneysel hayvan modellerinde, ET reseptör antagonistlerinin iskemi sonrası infarkt boyutunu azaltması ve endotel bağımlı vazodilatasyonu artırması ile miyokard iskemi-reperfüzyon hasarını düzelttiği göstermiştir (44). ET-1 aracılı iskemi-reperfüzyon hasarı mikrodamar disfonksiyon ile ilişkilidir ve ET reseptör antagonistleri yeniden akışın sağlanmasında yararlı olabilir ve insanlarda iskemi-reperfüzyon sonrası gelişen endotel disfonksiyonundan korur. Pulmoner arteriyal hipertansiyon (PAH)'lu hastalarda ET_{A/B} reseptör antagonisti bosentan ile ET_A/ET_B reseptörlerinin blokajı, ekshale edilen NO düzeyini tamamen normalize etmekte ve bu da bozulmuş eNOS fonksiyonunun düzeldiğini telkin

etmektedir (14). Sağlıklı gönüllülerde gözlenebilen ET_B bağımlı vazodilatasyon, ateroskleroz ve tip II diabet gibi patolojik durumlarda kaybolmaktadır ve hatta ET_B bağımlı vazokonstriksiyona bile dönüşebilir. Bu durum esansiyel hipertansiyon ve insülin direncinde de görülmüştür. ET_A selektif reseptör blokajı ile karşılaştırıldığında her iki reseptörün inhibisyonunun daha fazla önkol damar dilatasyonuna neden olduğu bulunmuştur. İnsülin direnci olan bireylerde ET_A/ET_B (selektif olmayan ET_A reseptörlerin blokajı) reseptörlerinin birlikte bloke edilmesi selektif reseptör blokajının aksine endotel bağımlı vazodilatasyonu düzeltmektedir. Bu gözlemler patolojik durumlarda ET_A/ET_B reseptör ekspresyonunda gözlenen dramatik değişimi yansıtmaktadır. Hipertansiyonun çeşitli deneysel modellerinde ET_B reseptörlerinin endotel düzeyinde down regüle olduğu ve media tabakasında ise up-regüle olduğu prelinik verilerle gösterilmiştir (14,28,79). Ekspresyon patternindeki bu değişiklik patolojik durumlarda gözlenen ET_B reseptör-aracılı vazokonstriksiyonu destekleyebilir (Şekil 2.9) (36). Prelinik ve klinik veriler hiperkolesterolemik domuz aort endotel hücrelerinde ve insülin direnci olan hastalarda ikili ET_A/ET_B reseptör blokajının selektif ET_A reseptör blokajına göre, NO biyoyararlanımını ve/veya endotel bağımlı vazodilatasyonu daha fazla düzelttiğini göstermiştir (14).

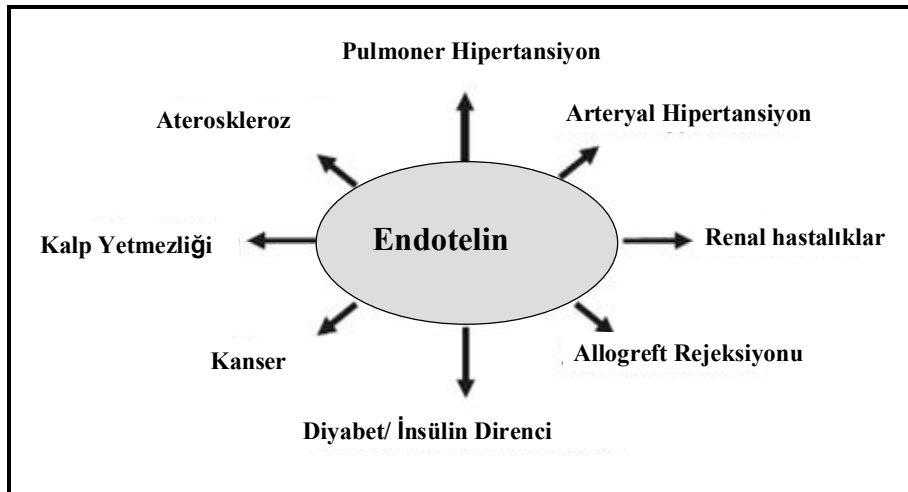


Şekil 2.9. Damar duvarında Endotelin -1 (ET-1)'in etkileri.

2.5. Klinik Patolojik Durumlarda Görülen Endotel Disfonksiyonunda ET-1'in Rolü

Birçok kardiyovasküler hastalığın patojenezinde ET-1 erken dönemde rol oynamaktadır (14). Preproendotelin-1 geninin aşırı ekspresyonunun hedeflendiği transgenik fare damar endotelinde ET-1'in aşırı ekspresyonu, endotel bağımlı gevşemede bozulmaya yol açar (51). Bu nedenle, kardiyovasküler hastalıklarda ET-1 endotel disfonksiyonunun temel anahtarı gibi görünmektedir (32,40).

ET'nin bulunmasının ardından öncelikle ET-1'in kardiyovasküler sistemdeki rolü ve ET sisteminin patofizyolojik önemi 1997 ve 2001 yılları arasında düzenlenen konferanslarda tartışılmış ve kardiyovasküler patofizyoloji sisteminde öncelikli olarak ET'nin rolü üzerine yoğunlaşmıştır (55). Bu konferanslarda toplanan veriler ET'nin kronik kalp yetmezliği, iskemik kalp hastalıkları, hipertansiyon, ateroskleroz, pulmoner hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği ve subaraknoid kanama sonrası serebral damar spazmı gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda kritik rol oynadığını düşündürmektedir (Şekil 2.10) (32). Bu hastalıklarda, dolaşımdaki ET-1 düzeyi birçok durumda yüksektir. Bu nedenle ET inhibitörlerinin terapötik olarak yararının olabileceği hastalıklar araştırılmıştır. Bu hastalıklar arasında; kronik kalp yetmezliği, esansiyel hipertansiyon ve pulmoner hipertansiyon ET inhibitörlerinin uygulaması için kapsamlı olarak incelenmiştir.



Şekil 2.10. Preklinik ve klinik çalışmalarda endotelin sisteminin rol oynadığı gösterilen patofizyolojik durumlar ve hastalıklar.

2.5.1. Ateroskleroz

Fizyolojik laminar (çizgisel) akım stresi endotel hücrelerini anormal aktivasyona karşı korumada önemlidir (14). Uzun süreli düşük veya osilatuvan (türbülant) akım stresi gibi spesifik hemodinamik durumlar fare karotis arterinde plak oluşumu ve plak hassasiyeti gözlemlenebilir. Hem düşük, hem de osilatuvan akım stresi ET-1 ekspresyonunda artışa neden olurken, eNOS ekspresyonu azalır. Prepro ET-1 mRNA, insan aterosklerotik koroner plaklarındaki endotel hücrelerinde, miyofibroblastlarda ve köpük makrofajlarda yaygındır. Aterosklerozlu hastalarda ET plazma konsantrasyonları yükselmiştir. Ayrıca, aterosklerotik insan kan damarlarında ET-1 mRNA ekspresyonunun ve immün boyamanın arttığı gösterilmiştir (40). Dolaşımdaki ve dokudaki ET-1 immünoaktivitesi insan aterosklerotik hastalığın şiddeti ile korelasyon göstermektedir. En yüksek ET plazma konsantrasyonuna sahip hastalarda etkilenen damarlar oldukça çok sayıdadır (80). ET-1 ekspresyonundaki artış aterosklerozun tüm evrelerinde temel olan damar inflamasyona yol açabilir (32). ET-1'in büyümeyi artırıcı özellikleri aterosklerozun gelişmesinde katkıda bulunabilir (81). Birlikte ele alındığında bu veriler, ET-1'in endotel aktivasyonu aracılığıyla aterosklerozun gelişmesinde rol oynadığını telkin etmektedir.

Aterosklerozda endotel disfonksiyonu gelişimine neden olan ET-1'in rolü, hiperlipidemi ve spontan ateroskleroz modeli olan apoE-eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (14). Bu farelerde plak oluşumu, endotel disfonksiyonu ve NO-aracılı gevşemenin azalması ile ilişkilidir. Hem endotel fonksiyonunun bozulması hem de aterosklerozun gelişimi bir ET_A reseptör blokerinin veya ET_A/ET_B reseptör blokerinin uygulanması ile önlenir.

2.5.2. Endotelin ve esansiyel hipertansiyon

ET-1 aracılı damar tonus artışı, sempatik sinir sistemi ve renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin aktive edilmesi ve mitogenez artışı; hipertansiyon ve komplikasyonlarının patogeneğinde ET-1'in önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (28). Spontan hipertansif sıçanlarda, ET-spesifik antikorlar kan basıncını yaklaşık olarak %10 azaltır; bu durum, endojen ET-1'in periferik direnç üzerinden arteriyel basıncı arttırmak için yaklaşık potansiyelini göstermektedir. Bazı çalışmalarda hipertansiyonlu hayvan modellerinde ET-1 plazma konsantrasyonları yüksek bulunmamıştır. Ancak, spontan hipertansif (SHR) sıçan dokularında ET-1'in mezenterik damarlardaki lokal

üretimi normotansif kontrol Wistar-Kyoto sıçan (WKY) dokularından daha fazla görülmektedir (82). Benzer şekilde, esansiyel hipertansiyonlu hastalarda da ET-1 plazma düzeyi genellikle normaldir, ancak hipertansiyonda damar duvarında lokal ET-1 düzeyi artmaktadır (83). Pek çok çalışmada ET-1 kronik arteriyal hipertansiyon gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (40). Normotensif kontroller ile karşılaştırıldığında, hipertansif hayvan ve hastalarda ET-1 plazma düzeyinin çoğunlukla daha yüksek olduğu ve ET-1'e olan damar reaktivitenin çoğu kez artmış olduğu bulunmuştur. Ancak, aykırı modeller arasındaki sonuçlar oldukça farklıdır ve ET-1 plazma düzeyi genellikle normal aralığın yalnızca 1.5-2 katı üst limitine ulaşır ve hatta birçok durumda kontrol düzeyinden daha düşüktür (84). Diğer yandan, WKY sıçanlar ve SHR'lerin her iki conduit arterinde (renal arter ve aort) ve SHR'in mezenterik arterinde yapılan hayvan çalışmalarında bu damarların ET-1'in etkilerine daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (85). Ancak, diğer bazı araştırmacılar SHR, DOCA-tuz sıçan hipertansif hayvanların aort ve mezenterik arterlerinde ET-1 duyarlılığının azaldığını bildirmiştir (85,86). ET-1'e duyarlılığın azalmasının, ET-1'in lokal üretimi veya kan basıncının artmasına sekonder olarak endotelin reseptörlerinin down-regülasyonu ile ilişkili olması olasıdır (87). ET-1'e yanıtındaki değişikliklerin bir kısmının, ET-1'in farklı damarlarda farklı düzeylerde lokal üretimine, bir kısmının da farklı damar yataklarında ET_A ve ET_B reseptör alt tiplerinin relatif oranlarının farklı olmasıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (55,88). Özet olarak, hipertansiyonda ET-1 duyarlılığını inceleyen çalışmaların sonuçları dirençli damarlarda duyarlılığın azalmış olduğunu, kapasitans ve conduit kanal damarlarda (özellikle venler ve renal arterlerde) ise duyarlılığın arttığını düşündürmektedir.

Birkaç hipertansiyon tipinde ET-1'in ortalama arter basıncını arttırması ile ilişkili bir fikir birliği vardır (32). Bunlara tuza duyarlı hipertansiyon (örneğin; tuz-duyarlı Dahl sıçanları) modeli de dahildir, çünkü seçici ET_A veya ET_A/ET_B reseptör antagonistleri yüksek tuz diyeti ile indüklenen hipertansiyon sonrası ya kan basıncı artışını azaltır ya da ortalama arter basıncını kısmi olarak tersine çevirir. Benzer şekilde, Afrika kökenli Amerikalılar gibi bazı etnik gruplar tuz-duyarlı hipertansiyona daha yaygındır. Bu bireylerde plazma ET-1'in düzeyinde bir artış olması ile birlikte akut stres faktörlerine olan cevabın artması, bir mediyatör olarak ET-1'in rolünü düşündürmektedir (40,89). Ekzojen ET-1 verilerek hipertansif yapılan sıçanlar, oksidatif strese artışla birlikte böbrek fonksiyonunda değişiklik belirtileri göstermiş ve bir membran-geçirgen süperoksid mimetik olan tempol ile bu stres azalmış ya da tamamen kaybolmuştur. Bu

durum ET'nin kronik artışı ile indüklenen hipertansiyon oluşumunda ROS'un rol oynayabileceğine işaret etmiştir. ET-1 aracılı ET_A reseptör aktivasyonu kronik olarak uterin perfüzyon basıncı azalmış gebe sıçanlarda veya pre-eklamptik kadınlarda gözlenen hipertansiyonda da önemli bir rol oynar (90). Bu nedenle, ET reseptör antagonistleri bu durumlarda etkin ajanlar olabilir, fakat onun antihipertansif etkinliğine karşın ET reseptör blokajının teratojenik potansiyeli endişe yaratmaktadır. Günümüzde, bosentan pulmoner arter hipertansiyonu olan hastalarda etkinliği belgelenen tek lisanslı ET reseptör blokeridir (40).

2.5.3. İskemik sendromlar

Hayvanlarda ve insanlarda miyokardiyal iskemi ve/veya reperfüzyon sırasında ET-1'in oluşumunun ve salınımının yanı sıra ET reseptör ekspresyonunun arttığına dair önemli ölçüde kanıtlar vardır (40,91). Sürekli olarak oluşan ET-1'in pro-iskemik etkilerinin olup olmadığı halen belirsizdir (40). Birçok çalışmada bu peptidin aşırı yüksek konsantrasyonunun kullanılmasından dolayı ekzojen ET'ler belirleyici olamamıştır. Diğer yandan, ET-1'in etkisini bloke etmek için farmakolojik araçlar kullanarak da çalışmalar yapılmıştır (örneğin; antikorlar, ECE inhibitörleri ve reseptör antagonistleri). Bu araştırmaların çoğunluğu, infarkt boyutunda azalma, koroner akım reperfüzyonunda iyileşme ile sonuçlanmıştır ve bu da kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarı ile ET-1 arasındaki ilişkinin kanıtı olarak sunulmuştur. Tümü birlikte ele alındığında, bu çalışmalar endojen ET-1'in bu spesifik deneysel koşullar altında iskemi/reperfüzyon hasarına katkı sağladığına işaret etmektedir.

ET reseptör antagonistlerinin iskemi/reperfüzyon gelişiminde hücrel koruyucu etkileri kısmen bilinmektedir. İskemide ET-1, hücre nekrozuna ve kalpte L-argininin kaybına neden olur. Buna zıt olarak, iskeminin başlangıcından önce ET-1 uygulanmasının kardiyoprotektif olduğu da pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Uygulanan deneysel koşullara ve protokollere bağlı olarak, peptidin iskemiden önce uygulanması durumunda ön-koşullanma-benzeri kardiyoprotektif bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bu etkinin ET_A aracılığı ile olduğu doğrulanması halinde, bu reseptör alt tipinin yeni önemli bir fonksiyonu ileri sürülebilir. Ekzojen ET-1 ET_A reseptör aracılı PKC aktivasyonu ve mitokondriyal tip ATP-duyarlı K kanallarının aktivasyonu ile infarkta karşı ön koşullanmanın kardiyoprotektif etkisini taklit eder. Buna ek olarak, ET_B agonisti olan sarafotoxin-6c'nin iskemik dönemden önce anestezi altındaki sıçanlara

intravenöz uygulanması sonrasında miyokard infarkt boyutunun yeterli miktarda azaltılması ve iskemik aritmileri baskılanması, ET_B reseptörlerinin de miyokard infarkt büyüklüğünde azalmada önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir (40,92).

2.5.4. Kronik kalp yetmezliği (KKY)

Özellikle hipertansiyon ve koroner arter hastalıklarının neden olduğu kalp yetmezliği (KKY) yüksek mortalite ile seyreden bir durumdur (32). Kalpte endotelin sistemi hem kardiyak fizyolojiye hem de fizyopatolojiye katkı sağlar ve ET-1 ve ET_A reseptörü endotelin sisteminin baskın sinyal bileşenleridir (40,93). Sağlıklı kalpte endotelinler inotropi, kronotropi ve aritmogenez yanı sıra kardiyak miyositlerin kontraktıl fonksiyonlarına katkıda bulunur (31). Klinisyenler geleneksel bir hemodinamik bir hastalık olarak KKY'yi tedavi ederken uzun süreli nörohormonal aktivasyonun önemli ölçüde hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğunu bugün yaygın olarak kabul etmektedir. ET-1 diğer nörohormonların (örneğin; norepinefrin, angiotensin II) salgılanmasını uyarır ve onların etkilerini artırır, bu nörohormonal aktivasyonun kalp üzerindeki uzun süreli etkileri olabilir ve patolojinin daha da kötüye gitmesine neden olabilir. Kronik kalp yetmezliğinde azalmış kardiyak fonksiyonları dengelemek için, hastalığın nedenlerine karşın ET sistemi upregüle olabilir (44). Ancak, ET sisteminin sürekli aktivasyonu aritmi ve kardiyak hipertrofiyi uyararak, kalp fonksiyonunun bozulmasına neden olabilir. ET'ler kardiyak inotropik durumu etkiler, aritmojenik olabilir ve ekstrasellüler matriks birikimine neden olur, böylece miyokard yetmezliğini şiddetlendirir (32). Kalp yetmezliğinde ET-1 düzeyinin artmasına dolaşım ve kalp katkıda bulunur, ancak peptidin ana kaynağı akciğerlerdir. İnsan kalbi ile yapılan ilk çalışmalarda, kalp yetmezliğinde ET reseptörlerinin ya değişmediği ya da azaldığı ileri sürülmüştür (55). Ancak, son çalışmalarda insan kalp yetmezliğinde ET_A reseptörlerinin up-regüle olduğu, buna karşın ET_B reseptörlerinin eşzamanlı olarak azaldığı gösterilmiştir (40, 94). Bu bulguların fonksiyonel önemi kesin olarak bilinmemektedir, ancak kalp boyunca ekstre edilen plazma ET-1 düzeyinin yüksek olduğu bilinmektedir ve bu şiddetli KKY'li hastalarda en azından kalbi desteklemek için yardımcı olabilir (32).

ET'nin zararlı etkilerini azaltmak için gelecekte bu hastalıkların tedavisinde ET inhibitörlerinin kullanımı düşünülmektedir (41). ET araştırmalarının ilk başlarında, kalp yetmezliğinde artan ET-1'in potansiyel zararlı etkisinin direkt olarak ET reseptörlerinin

blokajı yolu ile giderilmesinin önemli bir terapötik hedef olduğu anlaşılmıştır (32). ET_A reseptörlerinin aşırı aktivasyonu kardiyomiyositlerin üzerinde miyokard hipertrofisine yol açar ve kronik inotropik stimülasyon nedeniyle kontraktıl rezervin tükenmesine ve ventriküler aritmilere neden olur. Yapılan klinik bir çalışmada, seçici olmayan ET_A ve ET_B reseptör antagonisti bosentanın KKY olan hastalarda yararlı hemodinamik etkileri gösterilmiştir (55). Kronik ciddi KKY hastalarında akut veya kısa süreli (14 gün) bosentan uygulaması pulmoner arter basıncı, sağ atrial basıncı ve pulmoner arter wedge basıncında azalmaya; kardiyak indeks ve kalp hızının da artmasına neden olmuştur (32, 95). Ayrıca, başka bir klinik çalışmada, ikili ET reseptör antagonisti tezosentanın intravenöz uygulaması, akut dekompanse kalp yetmezliği olan hastalarda hemodinamikleri hızlı ve etkin bir şekilde iyileştirmiştir. Bir ET_B reseptör antagonistinin KKY tedavisinde yararlı olup olmadığı sorusu ise henüz yanıtlanamamıştır (55).

2.5.5. Pulmoner hipertansiyon

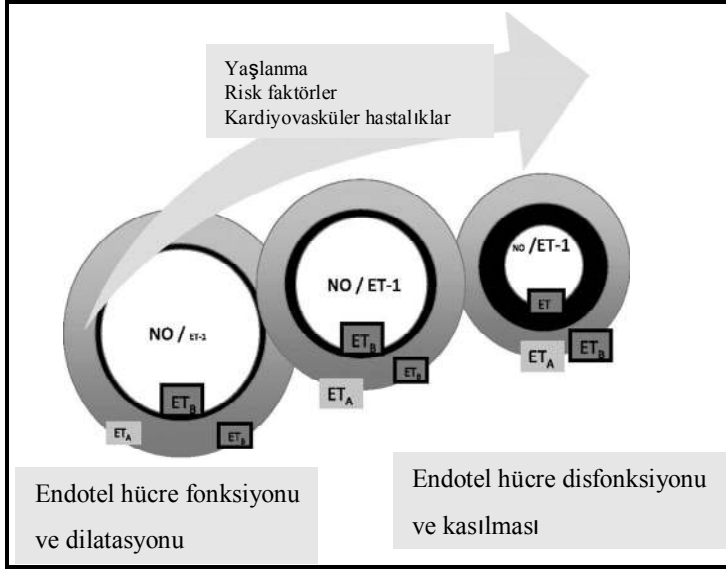
Hem kalp hem de akciğerler ET-1'in ve peptidlerinin önemli kaynağıdır (41). Normal pulmoner basınçlı kişilerden farklı olarak, pulmoner hipertansiyonlu hastalarda pulmoner arteriyal plazma ET-1 düzeyi venöz plazma düzeyine göre daha fazladır ve bu durum ya pulmoner ET-1 üretiminde artışı veya ET-1'in azalmış akciğer klirensini düşündürmektedir (32,38). İdiopatik pulmoner arteriyal hipertansiyon (PAH)'nda özellikle damar lezyon bölgesinde endotel hücrelerinde ET-1 mRNA ve protein ekspresyonu artmıştır ve bu da pulmoner damar direnç artışı ile korelasyon göstermektedir (14). Pulmoner vasküler dolaşımda ET-1, ET_A -bağımlı vazokonstriksiyonu uyarır ve belki de daha önemlisi güçlü bir büyüme hızlandırıcı faktör gibi davranarak pulmoner arter damar düz kas hücre proliferasyonunu etkiler (32,96). ET-1'in PAH'nda bir anahtar mediyatör olduğu ET-1 reseptör antagonistlerinin terapötik etkileri ile kanıtlanmıştır (14,41). Hem seçici ET_A -reseptör blokajı hem de bosentan ile seçici olmayan ET reseptör blokajının pulmoner arter basıncını düşürdüğü, sağ ventrikül hipertrofisini azalttığı ve pulmoner arterlerin yeniden modellenmesini sağladığı deneysel birçok çalışmada gösterilmiştir. (41,93). Aksine, seçici ET_B antagonistleri pulmoner hipertansiyonlu köpeklere uygulandığında pulmoner damar direnç ve basıncı arttırmıştır (32,38). Bu da selektif ET_A -reseptör antagonistlerinin pulmoner hipertansiyon tedavisinde avantajlı olabileceğini göstermektedir.

Pulmoner hipertansiyonda ET-1 ve ET_A reseptör ekspresyonu akciğer dokusunda artmıştır (55). BQ123 monokrotalin ile indüklenen pulmoner hipertansiyonlu sıçanlarda gözlenen patolojik durumları (pulmoner hipertansiyon ve sağ ventrikül hipertrofisi) spesifik olarak düzeltmiştir (55,91,97). Benzer şekilde, pulmoner hipertansiyonlu insanlarda, bosentan pulmoner arteriyal basıncında ve egzersiz kapasitesindeki patolojik artışı spesifik olarak azaltmıştır (55,98). Buna uygun olarak, bosentan Food and Drug Administration (FDA) tarafından 2001 yılında terapötik bir ilaç olarak onaylanmıştır. Bir yıllık bir izlem çalışması sonucu pulmoner hipertansiyon tedavisi için bosentanın güvenli ve yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (55,99).

2.5.6. Diabet

Hem insülin hem de glukoz ET-1 salınımında rol oynamaktadır. İnsülin endotel hücrelerinde ET-1 üretimini aktive eder ve hiperglisemi, ileri glikozilasyon ürünleri (AGEs: AGE'ler)'nin oluşumuna yol açar (14). AGE'lerin artışı doğrudan transkripsiyon faktör NF-kB'nin aktivasyonu ile endotel hücrelerinden ET-1 üretimini uyarır. Hem tip I diabet hem de insülin direnci olan hastalarda plazma ET-1 düzeyleri artmıştır. AGE'lerinin endotel disfonksiyonu ve damar inflamasyonu tetiklediği bilinmektedir. AGE oluşumunun inhibitörü olan aminoguanidin, tip I diabet modeli olan streptozosinli sıçanlarda NO üretimi ve damar gevşemesi üzerine düzeltici etkilere sahiptir. Aynı hayvan modelinde, ET reseptör blokerleri de NO aracılı damar gevşemesini düzeltir. Bu nedenle, sadece insülin düzeyindeki artış değil, aynı zamanda AGE düzeylerinin de artışı endotel hücrelerinde ET sisteminin aktivasyonuna neden olur ve böylece endotel disfonksiyonun gelişmesine ve sürdürülmesine katkıda bulunur.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalardan elde edilen güçlü kanıtlar endotel disfonksiyonunda ET-1'in önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Şekil 2.11) (63). Koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve hipertansiyonlu hastalarda ve damar cerrahisine giden hastalardaki kardiyovasküler olayların belirleyicisi endotel disfonksiyonu olduğundan, endotel disfonksiyonunun düzeltilmesi çok önemli bir terapötik hedeftir (14). ET-1'in neden olduğu endotel disfonksiyonuna aracılık eden moleküler mekanizmaların anlaşılması, endotel disfonksiyonu ile ilişkili çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik yaklaşım sunabilir.



Şekil 2.11. Kardiyovasküler hastalıklarda endotel disfonksiyonunun gelişiminde ET-1'in rolü.

2.6. PARP Enzim Ailesi Hakkında Bilgi ve PARP'ın Rolü

2.6.1. Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) 1963 yılında Chambon ve grubu tarafından keşfedilmiştir (100). PARP; oksidatif stres, iyonize radyasyon ve sitotoksik ajanlar ile oluşan DNA zinciri kırıklarının tespiti ve tamirinde rol oynayan, bol miktarda bulunan çok işlevli nükleer bir proteindir (101). PARP, DNA genomik bütünlüğünün sürdürülmesi, transkripsiyonel düzeyde çeşitli proteinlerin ekspresyonunun düzenlenmesi, nekroz ve apoptoz yoluyla ölüm, hücresel kopyalama ve farklılaşmanın düzenlenmesi, telomer faaliyetinin düzenlenmesi ve ubikuitin ekleme yoluyla protein degradasyonu gibi birçok hücresel süreçten sorumludur.

PARP süper ailesinin 18 üyesi bulunmaktadır: DNA-bağımlı PARP (PARP-1 ve PARP-2), Tankirazlar (tankiraz-1 ve tankiraz-2 ve tankiraz-3), CCH-tipi PARP (PARP-12, PARP-13, Ti-PARP) ve makro PARPlar (PARP-9/BAL1, PARP-14/BAL2, ve PARP-15/BAL3) ve diğer PARPlar (PARP-3, PARP-4/vPARP, PARP-10, PARP-6, PARP-8, PARP-11 ve PARP-16) (102).

PARP ailesi üyeleri, etkin bir bölge katalizör alanına sahiptir (101). PARP-1 işaretlenmiş DNA'ya bağlanan ve DNA hasarına karşı korumaya aracılık eden yüksek derecede korunmuş bir enzimdir. DNA kırıkları üzerine bağlandığında aktifleşen PARP-1 NAD^+ 'ı nikotinamid ve ADP-riboz parçalarına ayırır ve ADP-riboz parçalarını bir dizi nükleer akseptör protein ve PARP-1'in kendisinin glutamik asid kalıntıları üzerine ekler. DNA bir dereceye kadar hasarlı olduğunda, PARP-1 DNA onarım sürecine katılır ve hücre hayatta kalır. Buna karşın, yaygın DNA hasarı durumunda, PARP-1'in aşırı aktivasyonu NAD^+ ve ATP düzeylerinde bir düşüşe neden olur, bu da hücre işlev bozukluğu ve ölüme yol açar (103). Bu nedenle de PARP'ın aşırı aktivasyonu felç, miyokard infarktüsü, nörolojik dejeneratif bozukluklar, diabetes ve pek çok başka inflamatuvar bozuklukları içeren çok sayıdaki hastalığın oluşumunda rol oynamaktadır (101).

PARP inhibisyonunun sağaltıcı yararının mantığı iki dizi gözlemden ileri gelmektedir. İlk olarak, PARP aktivasyonu, mitokondriyal işlev bozukluğu, hücresel yetmezlik ve hücrede NAD^+ ve ATP'nin tükenmesine yol açan, enerji tüketen hücresel süreçlere katkıda bulunur. Bu süreç, sonunda hücre ölümü ile sonuçlanabilir (104,105). İkinci olarak PARP inflamatuvar sinyal transdüksiyon süreçlerinde rol oynamakta ve transkripsiyon düzeyinde çeşitli proteinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (101). Uyarılabilir NO sentaz (iNOS), hücreler arası adezyon molekül-1 (ICAM-1), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve majör doku uyuşumu kompleksi sınıf II (MHCII) gibi inflamatuvar mediyatör üretiminin düzenlenmesi özel bir önem taşımaktadır. PARP aktivasyonunun hem oksidan ile uyarılan hücre disfonksiyonunda hem de proinflamatuvar sinyal transdüksiyon sürecinde rol oynamaktadır. Bu nedenle PARP enzimi ilaç geliştirme için çekici bir hedef haline gelmiştir.

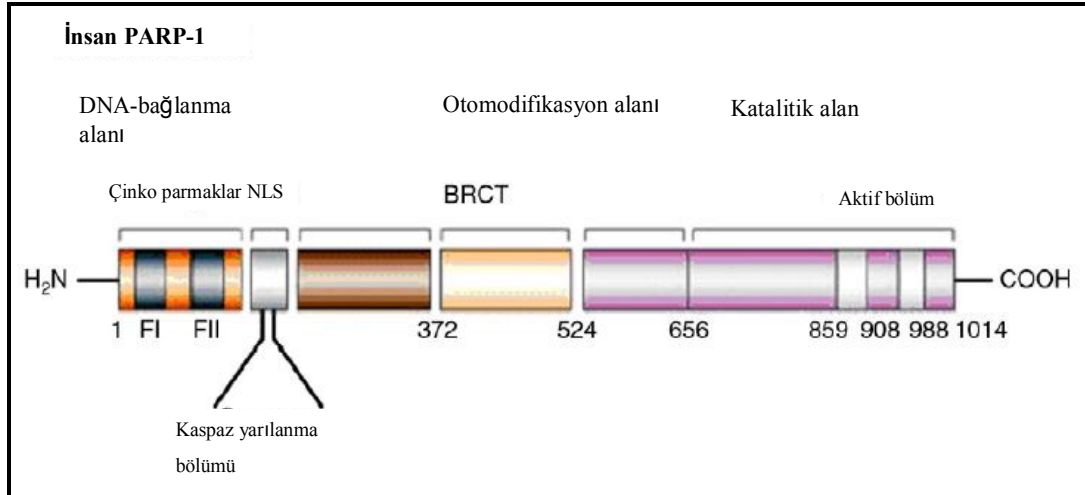
2.6.2. PARP-1

Poli(ADP-riboz)transferaz ve poli(ADP-riboz)sentaz olarak da bilinen Poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1, EC 2.4.2.30), PARP ailesinin ilk bulunan ve en çok incelenen üyesidir (Şekil 2.12) (101). PARP-1; bir N-terminal iki çinko parmak DNA-bağlanma alanı (DBD), bir nükleer lokalizasyon sinyali, bir merkez otomodifikasyon alanı ve bir C-terminali katalizör alanı içeren, yüksek düzeyde korunan yapısal ve işlevsel organizasyona sahip bir 116 kDa proteindir (101,106-109). PARP-1'in DBD'ı iki çinko parmağı yoluyla, tek veya çift sarmallı kırıklarına yüksek affinite ile bağlanır.

DNA çift sarmallı kırıklar ile PARP-1 aktivasyonunda birinci çinko parmağı büyük öneme sahipken, tek sarmallı kırıklar ile PARP-1 aktivasyonunda ikinci çinko parmağı önemlidir (101). PARP-1'in enzimatik aktivitesinin hedefleri arasında in vivo temel hedef olan PARP'nin kendisi, çekirdek histonlar, bağlayıcı histon (H1) ve PARP ile etkileşime giren bir dizi transkripsiyonel faktörler bulunmaktadır (101,110). İlginç biçimde, son yapılan araştırmalar PARP-1 aktivasyonunun, çeşitli kinazlar, östrojen, tiroid hormonları, D vitamininin aktif formları, poliaminler, pürinler ve kafein metabolitlerini içeren; değişik endojen ve eksojen faktörler ile modüle edilebileceğine dair kanıtlar sağlanmıştır (101).

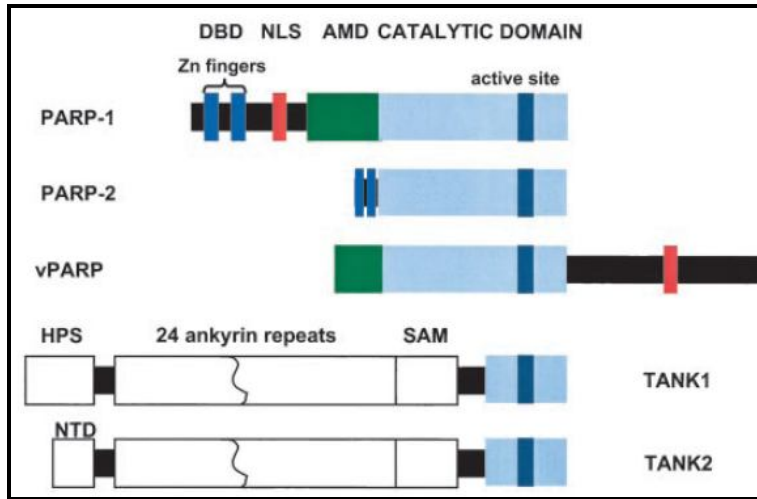
2.6.3. Poli (ADP-Riboz) metabolizması

PARP-1 üç temel etki alanını içeren bir 116-kDa proteinidir: Bunlar; iki çinko parmağı içeren N-terminal DNA bağlayıcı etki alanı, otomodifikasyon etki alanı ve C-terminal katalitik etki alanıdır (Şekil 2.13) (17). PARP-1 otomodifikasyon alanı daha çok tek sarmallı kırıklar ile uyarılır (101, 112). PARP-1'in bazal enzimatik etkinliği çok düşüktür, ancak, hasar görmüş DNA, hasar görmemiş bazı DNA yapıları ve nükleozomlar dahil olmak üzere; çeşitli allosterik aktivatörlerin varlığında çarpıcı bir biçimde uyarılmaktadır (101).



Şekil 2.12. İnsan PARP-1'inin yapısal ve fonksiyonel organizasyonu.

(1) N-terminal DNA bağlayıcı bölge (FI ve FII iki çinko parmak motifi içerir), (2) Nükleer lokalizasyon sinyali, (3) santral otomodifikasyon alanı (BRCT protein-protein etkileşim motifi içerir), ve (4) C-terminal katalitik bölge (aktif alan).



Şekil 2.13. Bazı PARP enzimlerinin yapısının karşılaştırılması.

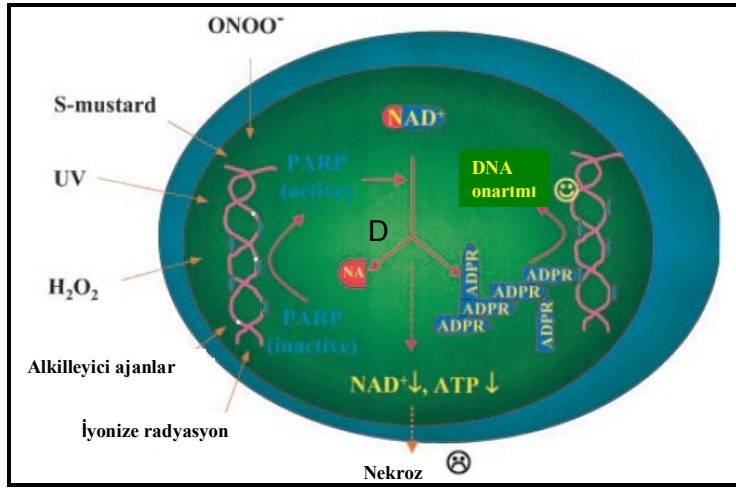
DBD, DNA bağlanma alanı; AMD, otomodifikasyon alanı; Catalytic domain, katalitik alan; active site, aktif bölge; Zn fingers, çinko parmaklar

PARP-1 hem tek ve hem de çift zincirli DNA kırıklarına bağlanarak bir DNA hasar sensörü ve sinyal molekülü olarak işlev görür (17,113). Özellikle doğrudan ikinci çinko-parmak etki alanı ile hasarlı DNA'ya bağlanır, PARP-1 homodimerleri oluşur ve NAD'ın nikotinamid ve ADP-riboza bölünmesini katalize eder ve sonra ikincisini, dallı nükleik asid benzeri polimerler poli (ADP-riboz) sentezlemek için nükleer akseptör proteinlere kovalent bağlanarak kullanır (17,113,114). Yüksek negatif yük nedeniyle, kovalent bağlı ADP-riboz polimeri hedef proteinlerin fonksiyonunu önemli ölçüde etkiler (17). Poli-ADP-ribozilasyonu dinamik bir süreçtir, polimerin in vivo yarı ömrü kısa (1 dak) kısadır. PARP-1 DNA onarımında ve genomik bütünlüğünün korunmasında rolü olduğu düşünülmektedir. PARP ile katalizlenen kovalent poli (ADP-ribozilasyon), poli (ADP-riboz) polimerleri; histon, XRCC1, p53 ve DNA polimeraz gibi proteinlerde spesifik (ADP-riboz)lara bağlı motiflere nonkovalent olarak bağlanabilir ve böylece onların işlevini değiştirebilir. PARP-1 aynı zamanda transkripsiyonel düzeyde çeşitli proteinlerin ekspresyonunu da düzenlemektedir. PARP-1 ile indüklenebilir NO sentaz (iNOS) ve hücrelerarası adezyon molekülü 1 (ICAM-1) gibi inflamatuvar mediyatörlerin üretiminin düzenlenmesi özel bir önem taşımaktadır. NF- κ B, bu proteinlerin düzenlenmesinde önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve PARP'ın NF- κ B -aracılı transkripsiyonunda bir koaktivatör gibi hareket ettiği gösterilmiştir. PARP-1 replikasyonu ve farklılaşmayı düzenler (116,117). PARP-1-aracılı hücre ölümü, olasılıkla hücre ölümünün en az istenilen formu olan nekroz şeklinde oluşur (118-121).

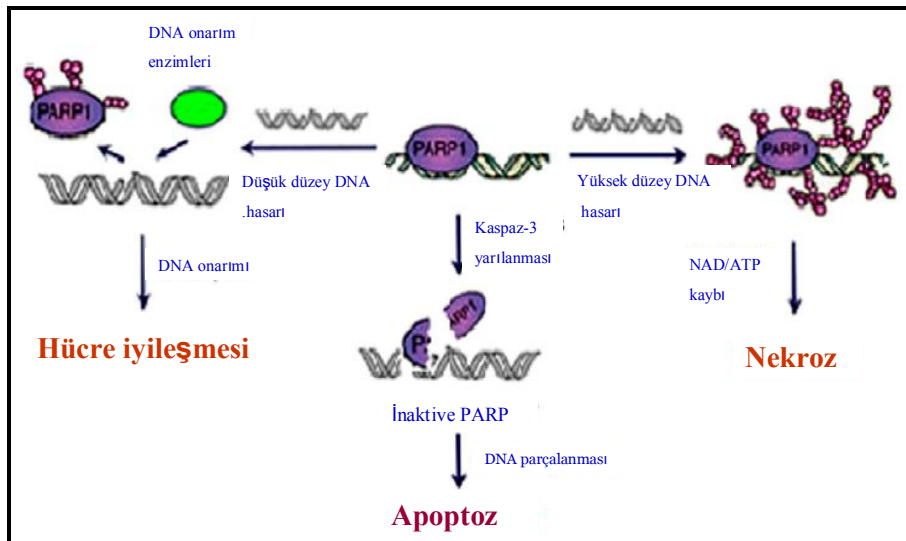
Nekrotik hücre ölümü sırasında hücre içeriği doku içine salınır, proteaz ve diğer salınan faktörler ile potansiyel zararlı saldırılara komşu hücreler maruz kalır. Hafif genotoksik hasar PARP aktivasyonuna yol açar, bu da DNA tamirini ve hücre sağkalımını kolaylaştırmaktadır (122). Şiddetli DNA hasarı, bununla birlikte, PARP'ın aşırı aktivasyonuna yol açar, bu da NAD^+ ve ATP tükenmesine yol açar ve bunun sonucu olarak nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanır (Şekil 2.14) (17).

2.6.4. PARP-1 ve DNA onarımı

PARP-1'in, DNA'nın onarımında rolü olabileceği varsayımı enzimin DNA'ya bağlı bir protein olarak saptanması ile ortaya konmuştur (101). PARP-1, düşük düzeyde DNA hasarında bir sağ kalım faktörü olarak görev almaktadır (Şekil 2.15) (101).



Şekil 2.14. DNA-hasarı ile indüklenen PARP aktivasyonu: Yaşam veya ölüm için bir sinyal mi?



Şekil 2.15. DNA hasarının şiddeti hücrenin kaderini belirler: Yaşam, apoptoz veya nekroz.

PARP-1 düşük düzey DNA hasarının varlığında, bir sağkalım faktörü olarak; yaygın aşırı DNA hasarı durumunda ise hücre ölümünü destekler şekilde hareket etmektedir (101). PARP-1 hücre ölümünde iki temel yol oynar: apoptoz ve nekroz (17). Bu süreç genotoksik uyarıların süresi ve şiddeti yanı sıra hücre tipine bağlı olarak nekroz veya apoptoz aracılığıyla hücre ölümüne neden olabilen bir süreçtir. Apoptozun temel özelliklerinden bir tanesi, hücre yapısının bozulmasında ATP'ye olan bağımlılığıdır (123). Apoptoz ılımlı uyarı ile tetiklenirken, nekroz ciddi hasar ile tetiklenmektedir (124).

NAD⁺ katabolize edici bir enzim olan PARP, apoptoz ile nekroz arasında moleküler bir anahtar olarak iş görür (101). Apoptozun son aşaması; kaspaz 3, 6 ve 7'nin hücre proteinleri sindirdiği ve apoptotik cisimciklerin oluşumu üzerinden hücreyi parçaladığı; yaygın geri dönüşümsüz aşamadır. İlginç olarak, apoptoz aşaması sırasında, kaspaz 3 ve kaspaz 7 tüm PARP (parçalanmamış PARP, full length PARP)'ın nükleer lokalizasyon sinyal motifi olan DEVD (Asp-Glu-Val-Asp)'i tanır ve onu iki fragmana ~p89 ve ~p24'e ayırır (bölünmüş PARP, cleaved PARP). Bu bölgedeki bölünme DNA bağlanma alanını katalitik alanından ayırır ve tüm PARP'ı etkisiz hale getirir (110, 125, 126). Bölünen fragmanlar PARP aktivitesinin baskılanmasına katkıda bulunur. Bölünmüş PARP, PARP aktivasyonunun önlenmesini amaçlar ve bu nedenle apoptozun bazı ATP'ye bağımlı basamaklarında hücre enerjiyi korumayı hedefler (126). Bu yol hücreleri; hücre ölümünün nekroz yoluyla ortaya çıktığı, bitişik hücrelere risk oluşturan daha da ağır bir hücre ölümü biçimi olan başka bir metabolik yolun patolojik sonuçlarından korumayı amaçlamaktadır (101). Bu kavrama göre, bölünmüş PARP'ın hedefi sonraki DNA fragmentasyonu ile PARP aktivasyonunun önlemesidir (17). Yu ve arkadaşlarının araştırmaları PARP-1'in AIF (apoptoz indükleyici faktör) ile kaspaz-bağımsız apoptotik hücre ölümünde de rol oynayabileceğini göstermektedir (101, 127). AIF mitokondride bulunan proapoptotik bir flavoproteindir (101). PARP-1 aktivasyonu AIF'in mitokondriden DNA parçalanmasına neden olan çekirdeğe translokasyonunu tetikler ve apoptotik hücre ölümüne yol açar. PARP-1, apoptoz ile karşılaştırıldığında hücre ölümünün daha şiddetli bir biçimini temsil eden nekrotik hücre ölümü ile de ilişkilidir. Hücre ölümünün tarzı, DNA-zararlı uyarıların şiddeti ile belirlenir. Reaktif oksijen türleriyle (peroksinitrid, hidroksil ve süperoksit serbest radikaller gibi) oluşan geniş çaplı DNA hasarı PARP'ın aşırı aktivasyonuna neden olur, böylece hücre NAD⁺ depolarının tükenmesine yol açar ve NAD⁺ düzeyindeki düşüş

oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimini inhibe eder ve nekrotik hücre ölümüne yol açar (17). Nekrozda PARP aktivasyonunun rolü; büyük çoğunlukla nekrotik hücre ölümü ile karakterize edilen felç, miyokard infarktüsü ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi hastalık modellerinde PARP-1'in inhibisyonu veya yokluğunun önemli koruma sağladığının gösterilmesi ile kanıtlanmıştır. Nekroz sırasında PARP'ın aşırı aktivasyonu hücrenin NAD^+ ve ATP depolarını tüketir. Ayrıca PARP aşırı aktivasyonu ile indüklenen nekrozda, NAD katabolizmasının bir yan ürünü olarak oluşan, H^+ iyonları ile hücre içi asidifikasyonun rolü olabileceği düşünülmektedir. Genel olarak, etkin olarak çoğalan hücrelerde PARP aşırı aktivasyonunun nekroz aracılığı ile hücre ölümüne yol açtığı; kopyalanmayan hücrelerin ise aşırı PARP aktivasyonu sonucu apoptozun daha düzenli hücre ölümü mekanizmasına tabii oldukları bildirilmiştir (128-131).

2.7. Endotel Disfonksiyonu Patojenezinde PARP Aktivasyonun Rolü

Endotel disfonksiyonunun gelişiminde PARP yolağının katkısı 1997 yılında sıçan endotoksik şok modeli kullanılarak öne sürülmüştür (132). Bu modelde, NADPH oksidazı içeren çeşitli süperoksid oluşum kaynaklarının aktivasyonu yanı sıra iNOS'un up-regülasyonu ile birlikte damar endotelinin çevresinde şiddetli oksidatif ve nitrozatif stres olduğu bilinmektedir. Endotoksik şoka maruz kalan sıçanlardan alınan damar halkalarında, endotel bağımlı gevşeme yanıtı bozulmakta ve bu değişiklikler PARP'ın 3-aminobenzamid (3-AB) ile farmakolojik inhibisyonu ile önlenmektedir. İn vitro çalışmalarda da, peroksinitride maruz kalan damar halkalarında asetilkolinle endotel-bağımlı gevşeme yanıtının azaldığı ve bu endotel disfonksiyonunun 3-AB ile düzeldiği gösterilmiştir. Bu bulgular, oksidatif veya nitrozatif olarak hasarlanmış endotel hücrelerinin metabolik baskılanmasına karşı PARP inhibisyonunun koruyucu olduğunu gösteren daha önceki in vitro veriler ile uyumludur. Bu bulgular ayrıca homosistein (çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda bir model) veya yüksek glukoz konsantrasyonlarını (diabetik damar komplikasyonlarda bir model) içeren ve oksidatif stres ile seyreden çeşitli patofizyolojik durumlarda yapılan endotel hücre çalışmaları ile de uyumludur (133,134).

2.8. Endotel Disfonksiyonu, Ateroskleroz, Kalp Yetmezliği, Damar Remodeling ve Anjiyogenezde PARP-1 Aktivasyonunun Rolü

Diabet, hipertansiyon, kalp yetmezliği ve ateroskleroz ile ilişkili endotel disfonksiyonunda damar endotel çevresinde reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin lokal oluşumunun rolü olduğu görüşü giderek artan kanıtlarla desteklemektedir (134,135). Oksidatif stres endotel ve damar düz kas hücrelerinde, damar prostasiklin sentaz ve apoptoz ve/veya PARP-bağımlı hücre ölümünü kapsayan çeşitli mekanizmalar aracılığı ile damar disfonksiyonuna katkıda bulunabilir (135). Gerçekten de, PARP aktivasyonunun hem deneysel modellerde ve hem de hastalarda dolaşımsal şok, miyokard iskemi reperfüzyon hasarı, kalp yetmezliği, hipertansiyon, diabet ve kardiyovasküler yaşlanma ile ilişkili damar disfonksiyonunda rol oynadığı görülmektedir ve bu patolojik durumlarda PARP'nin farmakolojik inhibisyonu endotel-bağımlı gevşemeleri düzeltir (134).

İnsan aterosklerotik plaklarında oksidatif DNA hasarının ve DNA onarım enzimlerinin (örneğin, PARP-1) düzeyleri yüksek bulunmuştur. Yüksek yağlı diyet ile beslenen aterosklerozun bir ApoE fare modelinde, PARP inhibisyonu endotel fonksiyonunu düzeltir, aterosklerotik plak boyutunu azaltır ve plak stabilitesinin faktörlerini destekler (136). PARP'nin aşırı aktivasyonu miyokard reperfüzyon hasarı, kalp transplantasyonu, kalp yetmezliği, inme, dolaşım şoku ve diabet mellitus ile ilişkili otoimmün β -hücre yıkılımını içeren oksidatif ve nitrozatif stres ile ilişkili değişik patolojik durumlarda doku hasarının önemli bir mekanizmasını temsil eder (134). Dolaşımsal şok, hipertansiyon, ateroskleroz, pre-eklampsi ve yaşlanma gibi durumlarda endotel disfonksiyonunun değişik formlarında, PARP aktivasyonunun ve çeşitli PARP inhibitörlerinin yararlı etkisi gösterilmiştir. Ayrıca, son kanıtlar ile PARP aktivasyonunun diabetin çeşitli deneysel modellerinde ve ayrıca insanlarda endotel disfonksiyonunun gelişimine önemli olarak katkı sağladığı gösterilmiştir. Ek olarak, PARP aktivasyonunun, diabetik nefropati, nöropati ve retinopatide patogenetik bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Sıçanlar ve / veya farelerde ileri yaş ya da hipertansiyon ile ilişkili gelişen kronik kalp yetmezliği, ROS oluşumunu ve nitrozatif stresi artırır. Bu hayvanlarda aynı zamanda hem kardiyomiyositlerde ve hem de endotel hücrelerinde poli(ADP ribozil)asyonun arttığı bildirilmiştir (134,137,138). Bu hayvanların hastalık modellerinde PARP'nin farmakolojik inhibisyonu miyokard hipertrofisini azaltır ve

endotel fonksiyonunu iyileştirir (134). PARP-1ın genetik silinmesi veya farmakolojik inhibisyonu aortik bantlama veya anjiyotensin II infüzyonu ile indüklenen kardiyovasküler disfonksiyona karşı korumaktadır. Önemli olarak, tip 2 diabetes öncesi ve diabetes hastalarında damar nitrotilozin ve PAR içeriği artmıştır ve bu da bozulmuş endotel fonksiyonunun bir göstergesidir (139).

2.9. PARP İnhibitörleri ve Klinik Kullanım Potansiyelleri Hakkında Bilgi

2.9.1. PARP inhibitörleri

PARP inhibitörlerinin çoğu kompetitif enzim inhibitörleri gibi hareket eder ve NAD^+ ın, enzimin katalitik alanına bağlanmasını bloke eder (101,140). Bununla birlikte, ek olarak etkisi onun DNA'ya bağlanmaları ile ilişkili olabilir ve böylece PARP ile DNA sarmallı kırıklarının tanınmasının önlenmesi ve bunun sonucu olarak PARP aktivasyonunun önlenmesi ile ilişkili olabilir. Sınırlı hücre alımı, hücreyel direnç ve özgül olmayan etkilere sahip olan klasik PARP inhibitörleri enzimi çok düşük potens ile inhibe eder. Bununla birlikte, daha yeni olan PARP inhibitörleri; bu potens ve özgüllüğü arttıran aromatik bir laktam veya imid eklenmiş, aromatik bir halkaya bağlanmış karboksamid veya karbamoil guruptan oluşturulması nedeni ile çok daha fazla güçlü ve özgüldürler (101).

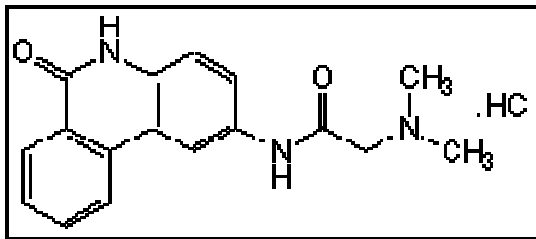
2.9.1.1. Klasik PARP inhibitörleri

Nikotinamid ve onun 5-metil türevlerinin, PARP'ın kompetitif inhibitörleri oldukları 30 yıl önce ispatlanmıştır (101). Benamid, pirazinamid ve süstitüe benamidler, özellikle de 3-aminobenamid (3-AB) ve 3-metoksibenamid gibi yapısal olarak benzer bileşikler de PARP'ın inhibisyonunu gerçekleştirmektedir (140, 141). Bu bileşikler aynı zamanda in vitro çeşitli proinflatuvar sinyal transdüksiyon yolaklarının ve aracılarının upregölasyonunu bloke edebilmektedir. Benamidler makro moleküler konsantrasyonda PARP-1, mono (ADP-riboz) transferaz ve NAD^+ glikohidrolazı selektif olarak bloke eder. 3-AB inflamasyon, felç ve diabetes gibi deneysel şok modellerinde de koruma sağlamıştır (17).

2.9.1.2. Yeni PARP inhibitörleri

Dihidroizokinolinonlar ve izokinolinonlar 3-AB'den daha güçlü inhibitörlerdir (101). Beřinci konuma hidroksil gurubu eklenmesi ile 5-hidroksidihidroizokinolinon

(DHIQ) ve 5-hidroksiizokinolinon'un etkisi pekiştirilmiştir (142,143). 5-Hidroksiizokinolinon'un (5-AIQ) in vitro olarak kalbi koruyucu etkiler sağladığı bildirilmiştir. 5-AIQ'nun miyokard infarktüsü ve şok sıçan modellerinde yararlı olduğu kanıtlanmıştır (144). Aynı sınıftan başka bir örnek olan 3,4-Dihidro-5-[4-1 (1-piperidinil)butoksil]-1(2H)-isokinolinon (DPQ), in vivo felç modellerinde sinir koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Tetrasiklik laktamlar ile ilişkili bir sınıfına ait Benzopirano[4,3,2-de] isokinolinonlar olan GPI-6150'nin felç, sinirsel dejenerasyon, diabetes ve çeşitli inflamatuvar durumların deneysel modellerinde anlamlı koruma sağladığı bildirilmiştir. Benzimidazoller, indoller ve ilişkili bileşikler PARP önleyici etki gösterir (101). 2-(4-Hidroksifenil) benzimidazol-4-karboksamid türevleri, NU-1064, NU-1085, ve NU-1025 güçlü PARP inhibitörleri olup antikanser ilaçların sitotoksik etkilerinin gücünü artırır. Diğer bir güçlü ve suda çözünebilir PARP inhibitörü olan PJ34 (N-6-Okso-5,6-dihidrofenanthridin-2-yl-N, N-dimetilamino asetamid hidroklorür) (Şekil 2.16) (145); yaklaşık olarak 40 nM'lik bir EC_{50} 'de oksidanların sitotoksik konsantrasyonlarına maruz bırakılan izole edilmiş fare timositlerinin yaşama yeteneğini arttırdığı birçok yayın ile gösterilmiştir. PJ34; Poli (ADP-riboz) polimerazın güçlü bir inhibitörü (PARP; $EC_{50} = 20$ nM) olarak hareket eden hücre-geçirgen, suda çözünür bir fenanthridinon türevidir ve prototipi PARP inhibitörü 3-aminobenzamid ($EC_{50} = 200\mu M$)'e göre potent, suda çözünür bir poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörüdür (146). PJ34'ün, 3-AB ($EC_{50} = 200\mu M$)'e göre yaklaşık 10.000 kat daha potent olduğu gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (1 μM - 10 mM) bir antioksidan olarak hareket etmez. Bu bileşik, uyarılmış makrofajlardaki doza bağımlı proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretiminin supresyonunu da indüklemektedir (147). 3-30 mg/kg/günlük bir doz aralığındaki in vivo modellerde, hücresel nekrozu azalttığı ve felç, miyokard infarktüsü, diabetes ve artrit işlevsel sonuçlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (148).



Şekil 2.16. PJ34 [N-(6-Okso-5,6-dihidrofenanthridin-2-yl)- (N, N-dimetilamino) asetamid hidroklorür]'ün kimyasal yapısı (Ampirik Formül $C_{17}H_{17}N_3O_2 \cdot HCl \cdot xH_2O$).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deneyisel Model

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Komitesi Antalya, Türkiye, tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda 250-300 gr ağırlığında toplam 60 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar ketamin ve ksilazin anestezisi altında dekapite edilerek torasik aortları çıkarılmış, etraf dokulardan dikkatle temizlendikten ve arter halkaları 2-3 mm uzunluğunda kesildikten sonra elde edilen aort halkaları kullanılarak aşağıdaki deney grupları oluşturulmuştur (her grup için 10 aort halkası kullanılmıştır). Tüm gruplar 120 U/ml penisilin ve 120 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco'nun modifiye eagle medium (DMEM) solüsyonunda 37°C'de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir.

1. **Kontrol grubu:** Sadece taşıyıcı (deionize su) inkübasyonu yapılan torasik aort halkaları
2. **ET-1 grubu:** ET-1 (10^{-3} M, 18 saat) inkübasyonu yapılan torasik aort halkaları
3. **ET-1 + antioksidan tedavi grubu:** Aynı konsantrasyonda ET-1 ve hücre içi süperoksid anyon süpürücü PEG-SOD (polietilen glikol-süperoksid dismutaz) (41 U/ml) + NADPH oksidaz inhibitörü Apocynin (300 µM) inkübasyonu yapılan torasik aort halkaları
4. **ET-1 + PARP inhibitör grubu:** Aynı konsantrasyonda ET-1 ve güçlü, suda çözünen bir PARP inhibitörü olan PJ34(3×10^{-6} M) inkübasyonu yapılan torasik aort halkaları
5. **Sadece PARP inhibitörü grubu:** Sadece güçlü, suda çözünen bir PARP inhibitörü olan PJ34(3×10^{-6} M) inkübasyonu yapılan torasik aort halkaları.

18 saatlik inkübasyon süresi sonrası tüm arter halkaları damar lümeni zedelenmeden dikkatlice iki paslanmaz çelik klipten geçirilerek taze Krebs solüsyonu (mM: NaCl 118, KCl 5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 ve glikoz 11.2) ile dolu 20 ml'lik organ banyosunda pH 7.4 olacak şekilde %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlanması sağlanarak 37°C'de dinlenmeye alınmıştır. İzometrik gerilim; bir bilgisayar-tabanlı veri toplama sistemine (TDA 97, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) bağlı bir izometrik kuvvet dönüştürücü (FDT10-A, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) ile sürekli

ölçülmüştür. Torasik arter halkalarına 1.5 g optimal bir dinlenme gerginliği uygulanmış ve dokular 90 dakika süre boyunca dengelemeye bırakılmıştır.

3.2. Protokol

Deneylerin ilk kısmında, Fe (10^{-6} M) ile kasılmış endoteli sağlam torasik arter halkalarının ACh (endotel bağımlı, ACh, 10^{-9} - 10^{-5} M) ve sodyum nitroprussid (SNP, endotelden bağımsız, 10^{-10} - 10^{-5} M) ile gevşeme yanıtları üzerinde ET-1 (10^{-3} M, 18 saat) inkübasyonunun etkisi araştırılmıştır. Deneylerin ikinci kısmında, ET-1 ile vasküler reaktivitede oluşan etkide, oksidatif stres ve PARP yolağının aktivasyonunun olası rolünü araştırmak için, dokular ya ET-1 ile tek başına ya da PEG-SOD + Apocynin veya PARP inhibitörü (PJ34, 3×10^{-6} M) ile birlikte 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonlardan sonra, ACh ve SNP için konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrarlanmıştır. Diğer bir grup deneyde ise, 80 mM KCl veya Fe (10^{-10} - $10^{-4.5}$ M) ile sıçan torasik arterinde indüklenen kasılma yanıtı üzerine ET-1 inkübasyonunun etkileri araştırılmıştır. ET-1 inkübasyonu sonrası kasıcı ajanlara artmış vazoreaktivite yanıtında oksidatif stres ve PARP yolağı aktivasyonunun olası rolünü araştırmak için, dokular ya tek başına endotelin-1 ya da PEG-SOD + Apocynin veya PJ34 ile birlikte 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra aynı protokol tekrarlanmıştır. Tek başına PJ34'ün damar reaktivitesine etkisini dışlamak için kontrol grubu damarlara tek başına PJ34 18 saat süreyle inkübe edilmiş ve tüm kasılma ve gevşeme yanıtları tekrar kaydedilmiştir. Bu çalışmada kullanılan PJ34, PEG-SOD, Apocynin ve ET-1'in dozları literatürde önceki çalışmalarda kullanılan ilaç dozları ile uyumludur.

3.3. İmmünohistokimya Metod

Tüm gruplardan elde edilen dokular, %10 formalin içinde immersiyon ile fikse edilerek parafin gömme için hazırlanmıştır. Parafine gömülü doku örnekleri 5µ kalınlığında olacak şekilde kesilerek SuperFrost Plus slaytlar üzerine yerleştirilmiştir (Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, USA). Poli (ADP-riboz) (PAR) ve PARP-1 immuno boyama için, kesitler ksilen içinde deparafize edildikten sonra alkol ile dereceli olarak rehidrate edilmiştir. Antijeni geri almak için, slaytlar 10 mmol/L sitrat tampon maddesi (pH 6.0) içine yerleştirilmiş ve iki kez mikrodalgada 5 dakika bırakılmıştır. Doku kesitleri endojen peroksidaz aktivitesi için %3'lük H_2O_2 içeren metanol ile 10

dakika süreyle ve nonspesifik bağlanma için Ultra V Blok (Labvision) ile oda sıcaklığında 7 dakika süreyle bloke edilmiştir. Fare monoklonal PAR (Anti-PAR Mab (10H), Alexis) ve tavşan poliklonal PARP-1 (Ab 6079, Abcam) primer antikorları, sırasıyla ml başına 2 µg protein (1:500 seyreltme) ve 6 µg protein (1:300 seyreltme) halinde uygulanarak 2 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Kesitler, fosfat-tamponlu salin (PBS) içinde yıkanmış, biyotinlenmiş anti-fare IgG ve anti tavşan IgG (3 mg/ml; Vector) serumu ile 1:500 dilüsyonda oda sıcaklığında 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir. PBS ile birkaç kez durulamadan sonra, antijen-antikor kompleksi Universal LSAB kiti ile birlikte bir avidin-biotin horseradish peroksidaz kompleksi kullanılarak saptanmıştır (Dako, Glostrup, Danimarka). Diaminobenzidin (3,3-diaminobenzidin tetrahydrochlorid dihidrat; Sigma) kromojen olarak kullanılmış ve kesitler cam slaytlar üzerinde Permount ile monte edildikten sonra ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Fotoğraflar bir Axiophot mikroskobu (Zeiss, Oberkochen, Germany) ile alınmıştır.

3.4. Western Blot Metodu

Dokular tartıldıktan sonra proteaz inhibitör kokteyli (Boehringer, Mannheim, Almanya) ile desteklenmiş homojenasyon tampon maddesine (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, %2.5 SDS, 1 mM fenilmetilsulfonilfluorid ve 1mg/ml löpeptin) yerleştirilmiştir. Homojenizasyon ve sonikasyon işlemi sonrasında, örnekler 10 dakika süreyle 10.000x g'de santrifüje edilmiştir. Süpernatantlar toplanmış, protein konsantrasyonları standart BCA yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve her kuyu başına 100 g protein olacak şekilde uygulanmıştır. Elektroforez öncesi, örnekler 95°C sıcaklıkta 5 dakika ısıtılmıştır. Örnekler daha sonra, standart koşullar altında SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutulmuş ve 0.2 mol/L glisin, 25 mM Tris ve %20 metanol içeren bir tampon içinde PVDF membran üzerine gece boyunca aktarılmıştır. Membranlar %5 yağsız kuru süt ile 1 saat bloke edildikten sonra immünohistokimya için kullanılan PARP-1 tavşan antiserumu (0.5 g/ml) ve PAR fare antiserumu (3 g/ml) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Yıkamadan sonra, membranlar 1:5000 sulandırılmış anti-tavşan anti-fare IgG horseradish peroksidaz konjugatı ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Kemilüminesans bazlı SuperSignal CL HRP substrat sistemi kullanılarak immun işaretleme görüntülenmiştir ve membranlar hyperfilme aktarılmıştır. Proteinlerin eşit yükleme yapıldığını doğrulamak için standart olarak jellere beta-aktin yüklenmiştir.

3.5. İlaçlar

Asetilkolin klorür, endotelin-1, L-fenilefrin hidroklorür, sodyum nitroprussid, PEG-SOD, Apocynin ve PJ34 kullanılmıştır. Tüm ilaçlar ve Krebs solüsyonu için gerekli kimyasallar Sigma Chemical (St.Louis, MO., ABD)'den satın alınmıştır. Bütün deneyler boyunca ilaçlar günlük olarak taze hazırlanmış ve kullanımdan önce distile su içerisinde çözülmüştür.

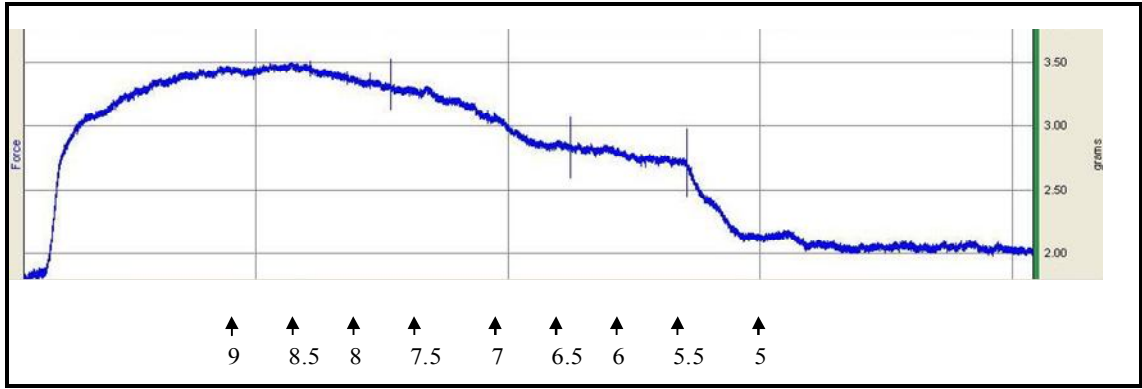
3.6. İstatistiksel Analizler

- Tüm değerler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde ifade edilmiştir. ACh veya SNP yanıtları Fe ile oluşan kasılma yanıtına göre % gevşeme yanıtı olarak ifade edilmiştir. Fe ile oluşan kasılma yanıtları 80 mM KCl yanıtlarının yüzdesi olarak verilmiştir. Maksimal yanıtın (E_{max}) %50'sini oluşturan agonist konsantrasyonu EC_{50} olarak belirlenmiştir. Bu değerler logaritmik konsantrasyon-yanıt eğrilerinin doğrusal kısımlarının regresyon analizi ile belirlenmiştir. Duyarlılık pD_2 ($-\log EC_{50}$) olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki fark, uygunluğuna göre tek yönlü ANOVA veya Student's t-testi ile analiz edilmiştir. Tüm ANOVA testleri sonrasında post-hoc olarak Benforroni testi yapılmıştır. P değeri 0.05 'den düşük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

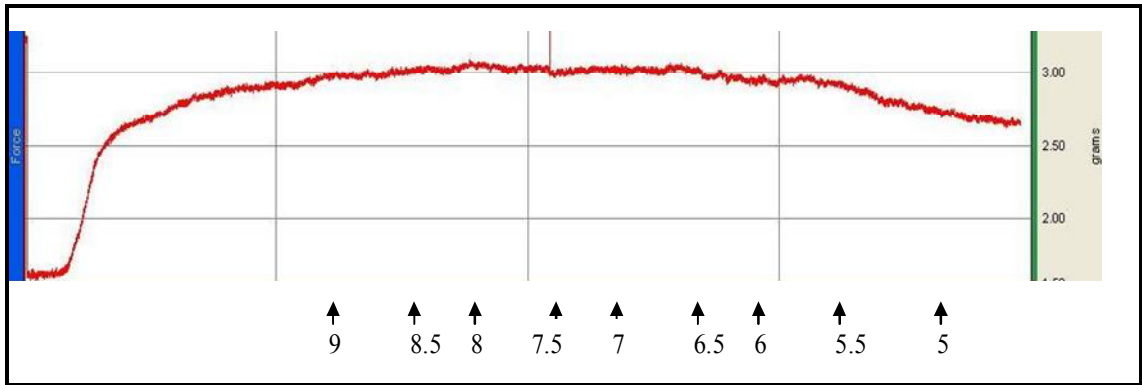
4.1. Sıçan Torasik Arterlerinin Vasküler Reaktivitesi Üzerine ET-1 İnkübasyonunun Etkileri

10^{-6} fenilefrin ile kasılan kontrol torasik aort halkalarında ACh konsantrasyon bağımlı bir gevşeme yanıtı oluşturmıştır. Kontrol halkalarında ACh ile oluşan gevşeme trasesi Şekil 4.1’de görülmektedir.



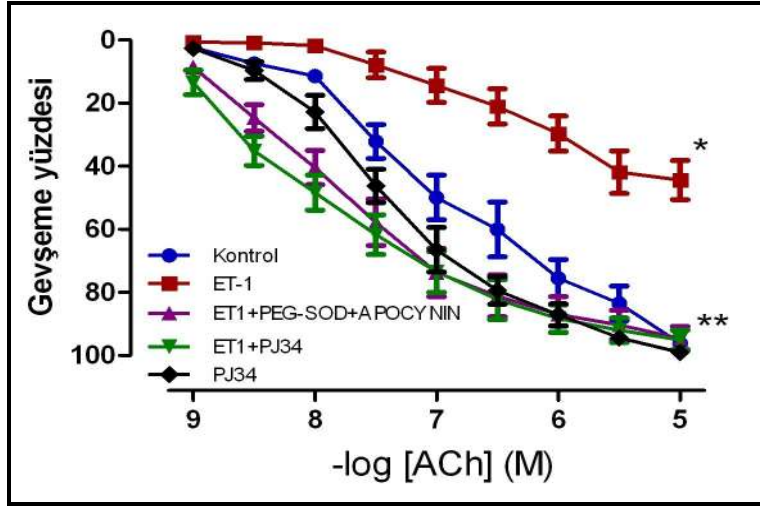
Şekil 4.1. Kontrol grubu sıçan torasik aortunun aort halkalarının asetilkolin (ACh) trasesi.

ET-1 inkübasyonundan sonra endotel bağımlı vazodilatör bir ajan olan ACh’e gevşeme yanıtının anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.2) ($P<0.05$). ET-1 inkübasyonu sonrası ACh ile oluşan gevşeme trasesi Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4.2. ET-1 grubu sıçan torasik aortunun asetilkolin (ACh) trasesi.

Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında asetilkolin (ACh) konsantrasyon yanıt eğrileri Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında asetilkolin (ACh) konsantrasyon yanıt eğrileri. * $p < 0.05$ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı, ** $p < 0.05$ ET-1’e göre istatistiksel olarak anlamlı. ET-1, endotelin-1; PEG-SOD, polietilen glikol-superoksit dizmutaz; PJ34, PARP-1 inhibitörü.

ET-1 inkübasyonundan sonra ACh ile oluşan maksimum gevşeme yanıtı $E_{\max}$ % 96.29 ± 1.93 ’dan 44.50 ± 6.22 ’a düşmüştür (Tablo 4.1). Ayrıca, torasik arter halkalarının ACh’e duyarlılığı (pD_2) ET-1 inkübasyonu sonrasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermiştir ($P < 0.05$).

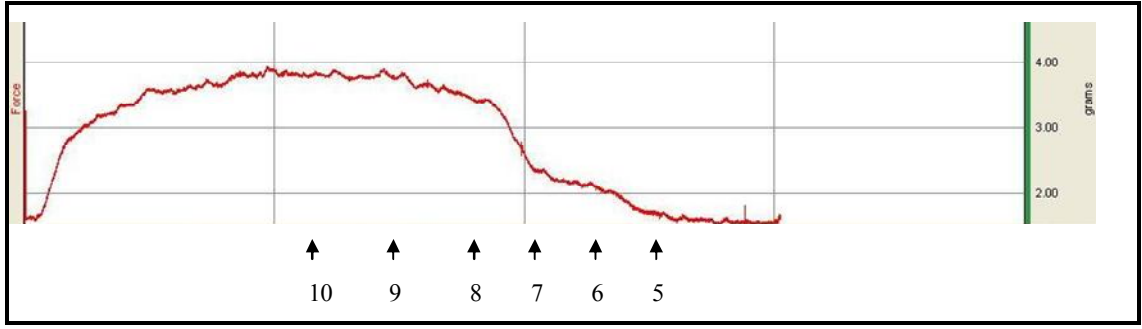
Tablo 4.1. ACh ile oluşan gevşeme yanıtlarının pD_2 ve $E_{\max}$ değerleri.

	pD_2	$E_{\max}$
Kontrol	7.02 ± 0.10	96.29 ± 1.93
ET-1	$6.42 \pm 0.19^*$	$44.50 \pm 6.22^*$
ET1+ PEG-SOD+Apocynin	$7.73 \pm 0.12^{**}$	$94.67 \pm 3.77^{**}$
ET1+PJ34	$7.80 \pm 0.13^{**}$	$95.10 \pm 3.05^{**}$
PJ34	$7.41 \pm 0.08^*$	99.10 ± 0.90

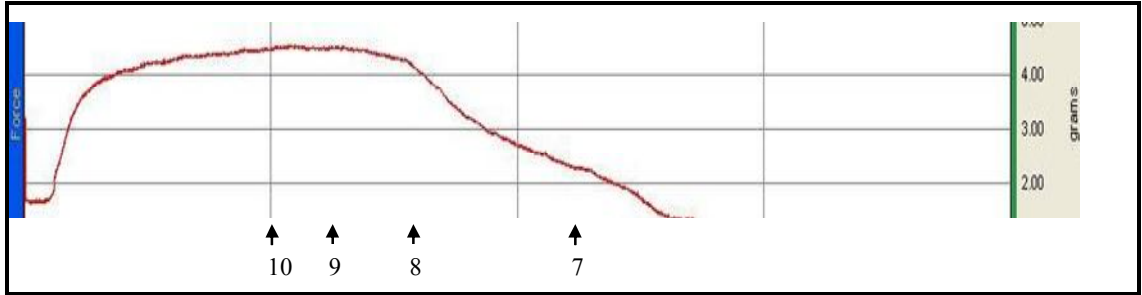
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. $n = 10$,

* $p < 0.05$ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı, ** $p < 0.05$ ET-1’e göre istatistiksel olarak anlamlı, ET-1, endotelin-1; PEG-SOD, polietilen glikol-superoksit dizmutaz; PJ34, PARP-1 inhibitörü.

Kontrol ve ET-1 inkübasyonu yapılan sıçanlarda torasik aortun SNP’ye yanıtı Şekil 4.4 ve 4.5’te görülmektedir.

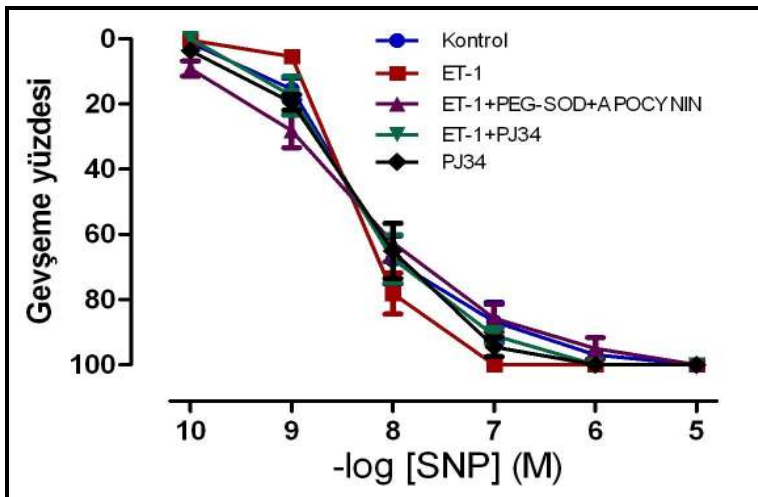


Şekil 4.4. Kontrol grubu sıçan torasik aortunun sodyum nitroprussid (SNP) trasesi.



Şekil 4.5. ET-1 grubu sıçan torasik aortunun sodyum nitroprussid (SNP) trasesi.

ET-1 inkübasyonu sonrası, endotel-bağımsız bir vazodilatör ajan olan SNP'ye gevşeme yanıtında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.6) ($P > 0.05$). Ayrıca, torasik arter halkalarının SNP'ye duyarlılığı (pD_2) ET-1 inkübasyonu sonrasında önemli bir değişiklik göstermemiştir (Tablo 4.2) ($P > 0.05$).



Şekil 4.6. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında sodyum nitroprussid (SNP) konsantrasyon yanıt eğrileri.

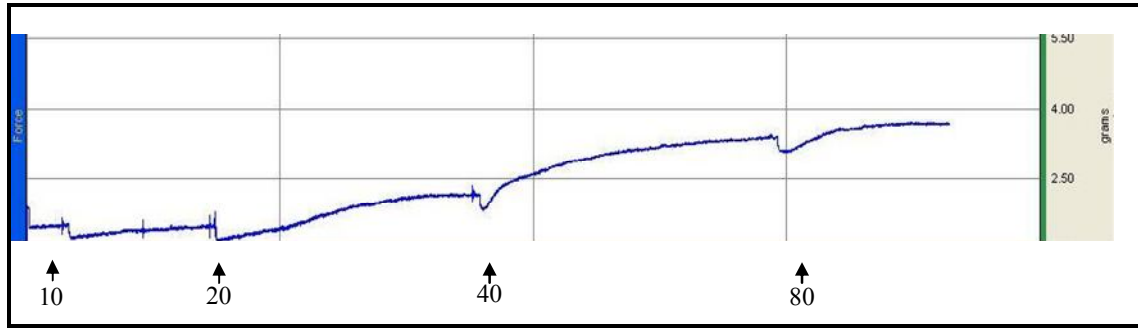
ET-1, endotelin-1; PEG-SOD, polietilen glikol-superoksit dizmutaz; PJ34, PARP-1 inhibitörü.

Tablo 4.2. SNP ile oluşan gevşeme yanıtlarının pD_2 ve E_{max} değerleri.

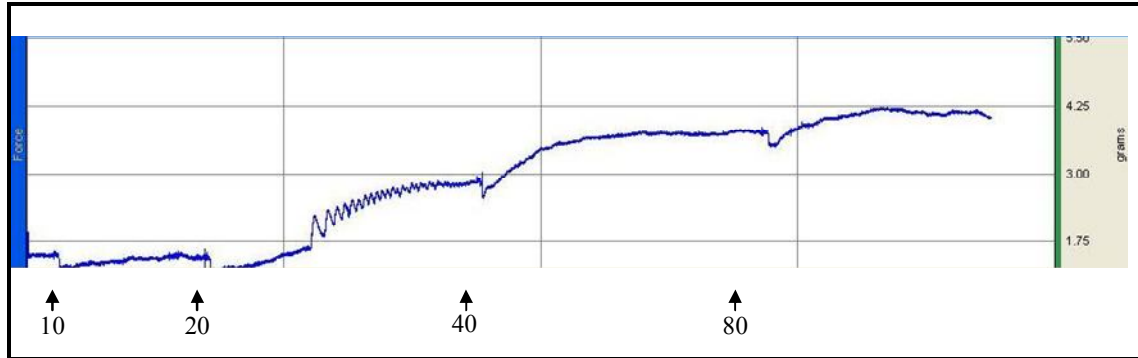
	pD_2	E_{max}
Kontrol	8.35 ± 0.11	100.00 ± 0.00
ET-1	8.30 ± 0.06	100.00 ± 0.00

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. n = 10. ET-1, Endotelin-1.

Diğer taraftan, Kontrol ve ET-1 inkübasyonu yapılan sıçanlarda torasik aortun KCl'ye yanıtı Şekil 4.7 ve 4.8'de görülmektedir.

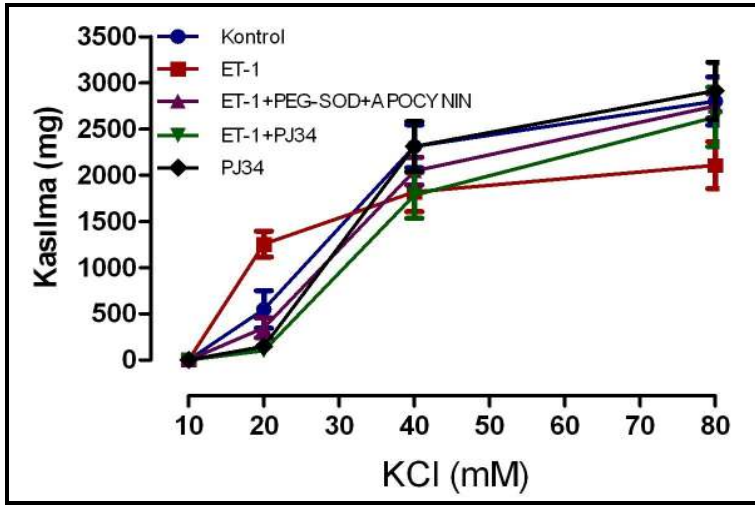


Şekil 4.7. Kontrol grubu sıçan torasik aortu KCl trasesi.



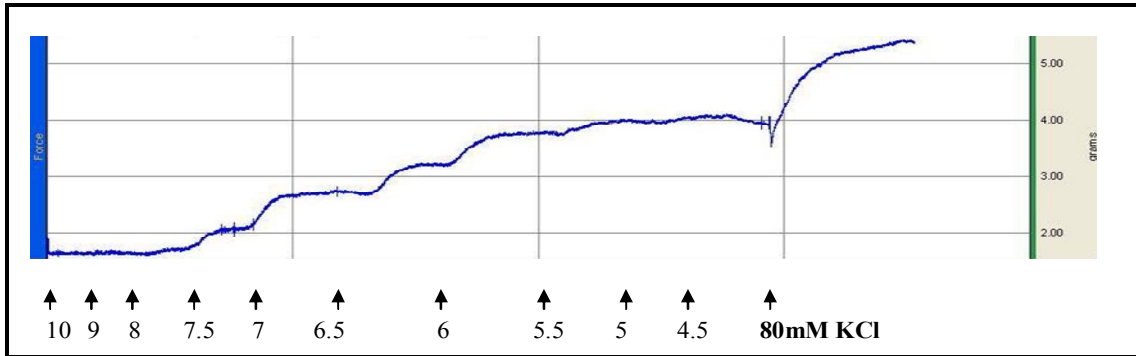
Şekil 4.8. ET-1 grubu torasik aortu KCl trasesi.

80 mM KCl ile oluşan kasılma yanıtlarının ET-1 ile inkübasyon yapılan damarlarda kontrollere göre anlamlı olarak farklı olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.9) ($p > 0.05$).

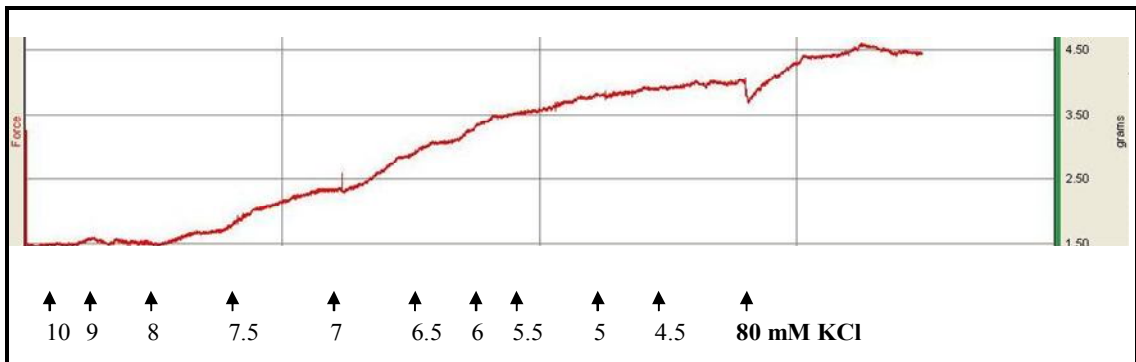


Şekil 4.9. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında KCl konsantrasyon yanıt eğrileri. ET-1, endotelin-1; PEG-SOD, polietilen glikol-superoksit dizmutaz; PJ34, PARP-1 inhibitörü.

Kontrol ve ET-1 inkübasyonu yapılan sıçanlarda torasik aortun fenilefrine yanıtı Şekil 4.10 ve 4.11’de görülmektedir.

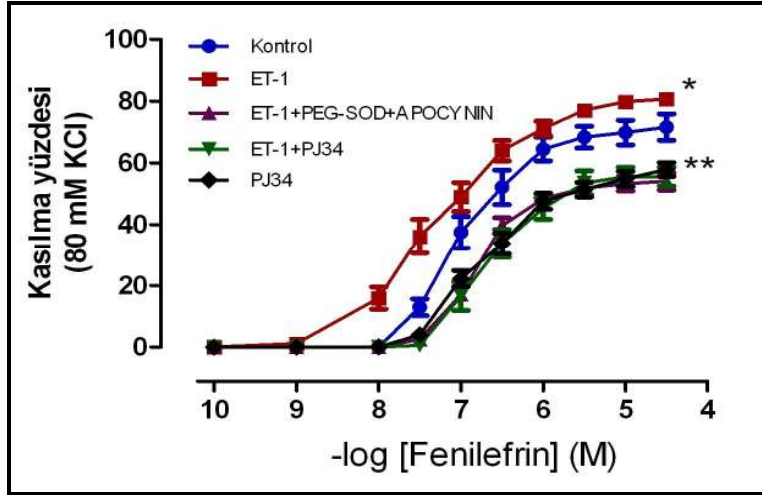


Şekil 4.10. Kontrol grubu sıçan torasik aortunun fenilefrin (Fe) trasesi.



Şekil 4.11. ET-1 grubu sıçan torasik aortunun fenilefrin (Fe) trasesi.

Torasik halkaların ET-1 inkübasyonu sonrası fenilefrin konsantrasyon-yanıt eğrisinin sola doğru kaymış olduğu ve maksimum kontraktıl yanıtının artmış olduğu görülmüştür (Şekil 4.12), (Tablo 4.3) ($P<0.05$).



Şekil 4.12. Tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında fenilefrin (Fe) konsantrasyon yanıt eğrileri. * $p<0.05$ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı, ** $p<0.05$ ET-1'e göre istatistiksel olarak anlamlı. ET-1, endotelin-1; PEG-SOD, polietilen glikol-superoksit dizmutaz; PJ34, PARP-1 inhibitörü.

Tablo 4.3. Fe ile oluşan kasılma yanıtlarının pD_2 ve E_{max} değerleri.

	pD_2	E_{max}
Kontrol	6.99 ± 0.07	71.63 ± 4.27
ET-1	$7.9 \pm 0.08^*$	$80.70 \pm 1.60^*$
ET1+ PEG-SOD+Apocynin	$6.79 \pm 0.04^{**}$	$54.11 \pm 2.81^{**}$
ET1+PJ34	$6.66 \pm 0.07^{**}$	$55.60 \pm 3.05^{**}$
PJ34	$6.73 \pm 0.06^*$	$57.90 \pm 2.28^*$

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. $n = 10$, * $p<0.05$ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı, ** $p<0.05$ ET-1'e göre istatistiksel olarak anlamlı. ET-1, endotelin-1; PEG-SOD, polietilen glikol-superoksit dizmutaz; PJ34, PARP-1 inhibitörü.

4.2. Sıçan Torasik Arterlerinde ET-1'in Vasküler Reaktivitede Neden Olduğu Değişikliklere PEG-SOD +Apocynin veya PJ34 İnkübasyonunun Etkileri

ACh ile indüklenen gevşeme yanıtı üzerine ET-1'in inhibitör etkisi hem PEG-SOD + Apocynin varlığında anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.3 ve Tablo 4.1) (Kontrol grubu için E_{max} 96.29 ± 1.93 , ET-1 grubu için 44.50 ± 6.22 ve ET-1+PEG-SOD+Apocynin grubu için E_{max} 94.67 ± 3.77 , $P<0.05$). Benzer şekilde, PJ34 inkübasyonundan 18 saat sonra da torasik halkalarının endotel fonksiyonu ve ACh ile

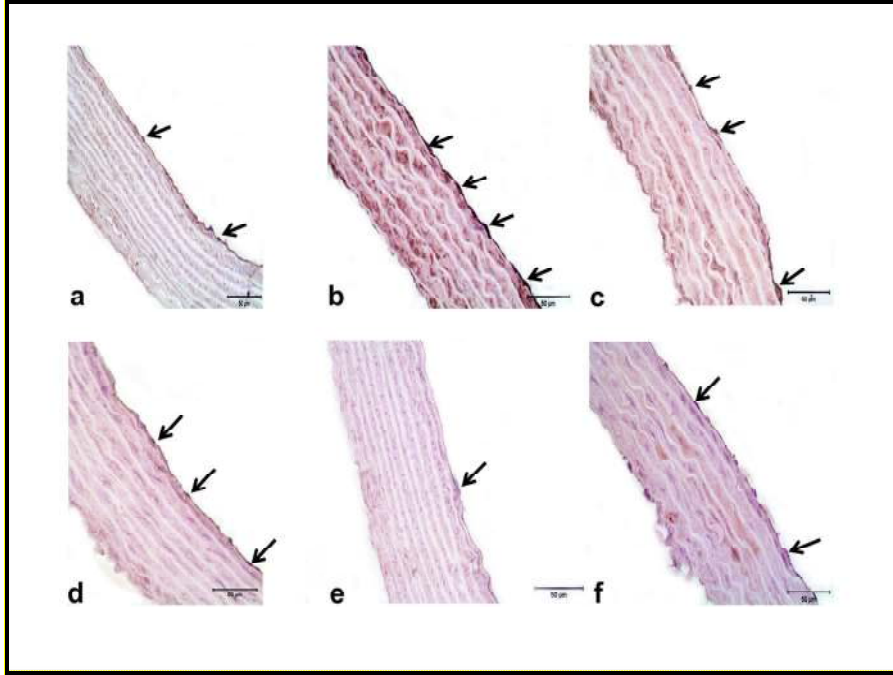
oluşan maksimum gevşeme yanıtı anlamlı bir şekilde korunmuştur (Kontrol grubu için E_{max} 96.29 ± 1.93 , ET-1 grubu için 44.50 ± 6.22 ve ET1+ PJ34 grubu için E_{max} 95.10 ± 3.09 , $P < 0.05$) (Tablo 4.1).

Ayrıca, ET-1 varlığında fenilefrin ile indüklenen kasılma yanıtlarında gözlenen potansiyalizasyon, PEG-SOD + Apocynin ya da PJ34 varlığında kısmen inhibe edilmiştir (Şekil 4.12) (Tablo 4.3) ($P < 0.05$).

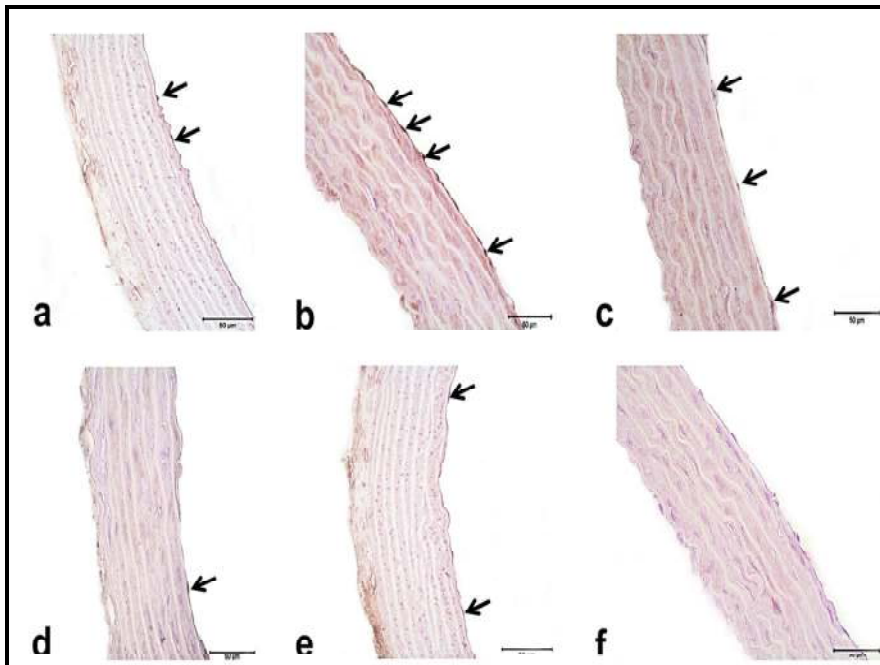
ET-1 inkübe edilen torasik arterlerde PJ34 inkübasyonu ile vasküler reaktivite üzerine oluşan olumlu etki, PEG-SOD + Apocynin ile oluşan yanıtlara benzer bulunmuştur. Diğer yandan SNP ve KCl ile oluşan yanıtlar açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.9).

4.3. Kontrol, ET-1, ET1+PEG-SOD+Apocynin, ET-1+PJ34 ve PJ34 gruplarından elde edilen torasik aort halkalarında PARP-1 ve PAR ekspresyonlarının değerlendirilmesi

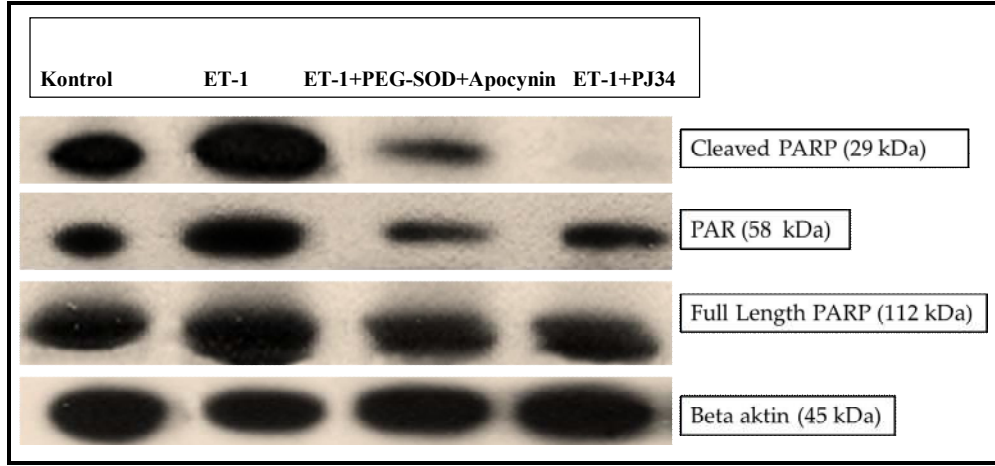
Kontrol sıçanlarının torasik aortunda PAR ve PARP-1'in endotel tabakasında çok düşük düzeylerde eksprese edildiği görülmektedir (Şekil 4.13.a ve Şekil 4.14.a). ET-1 inkübasyonu endotel tabakasında hem PARP-1 hem de PAR ekspresyonunda belirgin bir artışa neden olmaktadır (Şekil 4.13.b ve Şekil 4.14.b). İmmunohistokimyasal olarak ET-1 ile PARP-1 ve PAR ekspresyonunda gözlenen bu artış, PEG-SOD+Apocynin yanısıra PARP yolağının güçlü bir inhibitörü olan PJ34 ile sıçan torasik aort halkalarının inkübasyonu sonucu baskılamıştır (Şekil 4.13.c, Şekil 4.13.d, Şekil 4.14.c, Şekil 4.14.d). PJ34'ün kontrol dokularına tek başına inkübe edilmesi PAR ve PARP-1 ekspresyonlarında değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.13.e ve Şekil 4.14.e). ET-1'in PARP-1 ekspresyonu üzerine etkisi Western blot analizi sonuçlarıyla da desteklenmiştir (Şekil 4.15). İmmünohistokimya ile elde edilen bu sonuçlara ek olarak, Western blot analizleri de torasik aort dokusunun hem PEG-SOD ve apocynin ile hem de PJ34 ile inkübe edilmesinin, ET-1 ile PARP-1 ve PAR ekspresyonlarında gözlenen artışı belirgin olarak azalttığını göstermiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.13. Kontrol (a), ET-1 (b), ET-1+PEG-SOD+Apocynin (c), ET-1+PJ34 (d), PJ34 (e) ve negatif kontrol (f) gruplarından elde edilen torasik aort halkalarında PAR ekspresyonunun immünohistokimya ile değerlendirilmesi.



Şekil 4.14. Kontrol (a), ET-1 (b), ET-1+PEG-SOD+Apocynin (c), ET-1+PJ34 (d), PJ34 (e) ve negatif kontrol (f) gruplarından elde edilen torasik aort halkalarında PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimya ile değerlendirilmesi.



Şekil 4.15. Kontrol, ET-1, ET-1+PEG-SOD+Apocynin ve ET-1+PJ34 gruplarından elde edilen torasik aort halkalarında PAR ve PARP-1 ekspresyonunun Western blot ile değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

Endotel; hücre büyümesi, inflamasyon ve tromboz/hemostazın düzenlenmesine katılır ve çok sayıda biyolojik aktif maddeleri üreterek damar fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (51). Damar endoteli damar fonksiyonunun düzenleyicisi olup; damar tonusu, hemostaz, inflamatuvar hücrelerin toplanması ve aktivitesi, trombozu, damar geçirgenliğini ve sıvı dengesini modüle edebilen mediatörleri salgılayarak kardiyovasküler homeostaza anlamlı bir şekilde katkıda bulunur (14,28,149). Endotel disfonksiyonu, bozulmuş damar reaktivitesi olarak tanımlanır. Endotel disfonksiyonu; arteriyel hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, koroner kalp hastalığı, dislipidemi, periferik damar hastalığı ve tip I ve tip II diabetes gibi pek çok kardiyovasküler ve metabolik bozuklukta tanımlanmıştır (14,28,32,50,51). Koroner arter hastalığından periferik arter hastalığına ve inmeden hipertansiyona ve varikoz venlere kadar birçok kardiyovasküler hastalıkta endotel disfonksiyonun gelişiminde ET-1'in anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir. Her ne kadar bu hastalıkların gelişiminde endotel disfonksiyonunun ve ET-1'in rolü belirlense de, ET-1 aracılı gelişen endotel disfonksiyonuna aracılık eden olası mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma, sıçanlarda ET-1 uygulanması ile oluşan endotel disfonksiyonu üzerine PARP inhibisyonunun etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bugüne kadar, ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonuna aracılık eden birçok faktör öne sürülmüştür ancak, ET-1'in endotel bağımlı dilatör ajanlara verilen yanıtı baskılayıcı etkisinin PARP yolağının aşırı aktivasyonu ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışma ile sıçan torasik aortunda ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonunun bir mekanizması olarak PARP yolağının rolü olabileceği ilk kez gösterilmiştir.

İn vitro organ banyosu deneylerinde, sıçan torasik aortunda endotel bağımlı bir gevşetici ajan olan ACh konsantrasyon bağımlı bir gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Torasik aort halkalarının 18 saat boyunca ET-1 ile inkübe edilmesi endotel-bağımlı vazodilatör bir ajan olan ACh'e vasküler yanıtın önemli ölçüde baskılanmasına neden olmuştur. Diğer yandan, endotelden-bağımsız bir gevşetici ajan olan SNP ile oluşan gevşeme yanıtının aort halkalarının ET-1 ile inkübasyonu sonucu anlamlı olarak değişmediği gözlenmiştir. Bu sonuç, ET-1 ile damar gevşeme yanıtında gözlenen bozulmanın endotel fonksiyonlarının bozulması sonucu ortaya çıktığına işaret

etmektedir. Bu çalışmada ET-1'in gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi yanı sıra, kasılma yanıtları üzerine etkisi de değerlendirilmiştir. ET-1 inkübasyonu KCl ile oluşan kasılma yanıtını etkilemezken, fenilefrin ile oluşan kasılma yanıtını istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar ET-1'in NADPH oksidaz aktivasyonu ile reaktif oksijen türlerini arttırdığını bildirmektedir (13,14). ET-1; ROS ve NO aracılı peroksinitrid oluşumuna neden olarak NO biyoaktivitesini azaltmaktadır (14). Ayrıca, sıçan aortunda ET-1 aracılı süperoksid üretiminin NADPH oksidaz aktivasyonu ve kenetlenmemiş NOS aracılı olduğu bildirilmiştir (14,75). Bu nedenle, bu çalışmada da ET-1 inkübasyonu sonucu damar fonksiyonlarında gözlenen bozulma NADPH oksidaz aracılı serbest oksijen radikallerinde artışla ilişkili görülmektedir. Gerçekten de, ET-1 uygulaması sonrası aort halkalarında gözlenen endotel disfonksiyonu, in vitro olarak 18 saat süreyle bir serbest radikal süpürücü ajan olan PEG-SOD ve NADPH oksidaz inhibitörü apocynin inkübasyonu sonucu anlamlı olarak önlenmiştir. ET-1 inkübasyonu sonucu aort halkalarının fenilefrin yanıtlarında gözlenen artış da PEG-SOD ve apocynin inkübasyonu sonrası kontrollere benzer düzeylere gelmiştir. Bu sonuçlar, ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonun gelişiminde NADPH oksidaz aracılı oksidatif stresin rolünü desteklemektedir.

ET-1 ile oluşan oksidatif stres sonrası endotel disfonksiyonuna çeşitli mekanizmalar aracılık ediyor olabilir. Bunlardan biri; vücutta artan oksidatif strese bağlı aktive olduğu bilinen PARP yolağıdır. Bu yolağa göre, ET-1 uygulanması ile süperoksid anyonları, hidrojen peroksid ve peroksinitrid gibi çeşitli oksidan türlerinin üretimi tetiklenir (101,125,126,135). Oksidatif stres ile birlikte süperoksid anyonları, hidrojen peroksid ve peroksinitrid oluşumunda gözlenen belirgin artış DNA tekli zincir kırıklarının endojen indükleyicileridir ve bu da PARP aktivasyonuna neden olmaktadır. DNA kırılmasının sinyallerine bağlı bir DNA hasar sensörü olarak işlev gören ve baz eksizyon onarımına katılan PARP-1 ökaryotlarda yüksek derecede korunmuş bir enzimdir (134,135). PARP DNA'nın onarım sürecinde rol oynar ancak, substrat olarak NAD^{+} 'i kullanır ve daha sonra, hücre NAD^{+} depolarını yenilemek için ATP'yi kullanır. Bu durum, hücre içi NAD^{+} ve ATP havuzlarının hızla tükenmesi ile hücresel disfonksiyona, apoptoza ve nekroza yol açar. Bu nedenle, ET-1 uygulanması sırasında damar endotelinde PARP yolağının aşırı aktivasyonu NAD^{+} ve ATP havuzlarının tükenmesi sonucu hücresel enerji metabolizmasının bozulmasına yol açabilir. Bu yolağın

aktive edilmesi ile endotel hücrelerinde PARP aktivasyonu hücresel düzeyde endotel fonksiyonunun bozulmasına neden olur ve ACh gibi endotel bağımlı gevşetici bir agonist ile endotel hücrelerinde NO üretme yeteneğinin azalmasına yol açar (17,101). Bu açıklamalar doğrultusunda, ET-1 uygulanması sırasında endotel bağımlı vazodilatör ajanlara yanıtta azalma ile gösterilen damar hiporeaktivitesinin, güçlü bir PARP inhibitörü ajan olan PJ34 inkübasyonu inhibisyonu ile önlenmesi olasıdır. PJ34 inkübasyonu sonucu ET-1 aracılı PARP'ın aşırı aktivasyonunun önlenmesi hücresel enerji durumunun düzeltilmesi ile endotel fonksiyonlarını koruyabilir. Gerçekten de, bu çalışmanın bulguları PJ34 uygulamasının ET-1'in sıçan torasik aort halkalarında ACh aracılı gevşeme yanıtını üzerine azaltıcı etkisini, en azından kısmen, önlediğini göstermiştir. ET-1 uygulaması sonrası aort halkalarında gözlenen endotel disfonksiyonu, in vitro olarak 18 saat süreyle güçlü ve suda çözünen bir PARP inhibitörü olan PJ34 inkübasyonu sonucu anlamlı olarak önlenmiştir. Benzer şekilde, PJ34 ile damar halkalarının 18 saat süre ile inkübasyonu fenilefrin ile oluşan kasılma yanıtlarında ET-1'in neden olduğu artışı da büyük ölçüde önlemiştir. Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonunda oksidatif stres sonrası PARP yolağı aktivasyonunun rolü olabileceği ileri sürülebilir. Fonksiyonel olarak yapılan çalışmalarımızın bu sonuçlarını desteklemek üzere tüm gruplardan elde edilen torasik aort halkalarında immunohistokimyasal araştırmalar ve Western blot analizleri yapılmış ve bu dokularda PARP-1 ve PAR (PARP enziminin aktivasyon ürünü) lokalizasyonları ve ekspresyonları değerlendirilmiştir. Yapılan immunohistokimyasal çalışmalar sonucu, ET-1 uygulanan sıçanlardan elde edilen torasik aort halkalarının endotelinde PAR ve PARP-1 immünoreaktivitesinin artmış olduğu görülmüştür. ET-1 inkübasyonu yapılan aort halkalarının PARP-1 ve PAR enzim ekspresyon patterni birbiri ile benzer bulunmuştur. Immunohistokimyasal çalışmalara ek olarak, Western blot analizlerinin sonuçları da ET-1 uygulanan damarlarda hem PARP-1, hem cleaved-PARP, hem de PAR ekspresyonun arttığını göstermektedir. PARP-1 aşırı aktive olduğunda hücrede enerji tüketici süreçleri aktive ettiğinden, hücre kendini korumak için nekroz yolağından apoptotik sürece geçmeyi ve böylece de ATP'yi korumayı hedeflemektedir. Bunun için, apoptotik süreçte aktive olan kaspazlar aracılığı ile PARP-1'i parçalamakta ve böylece full-length PARP'ı cleaved-PARP denilen 29 kDA'luk ve 89 kDA'luk iki PARP kısmına ayırmaktadır. ET-1 uygulanan damarlarda Western blot

analizi sonucu cleaved-PARP ekspresyonunda gözlenen artış, bu damarlarda apoptotik sürecin aktif şekilde devam ettiğini desteklemektedir.

Güçlü bir PARP inhibitörü olan PJ34'ün uygulanması, endotel hücrelerinde bu proteinlerde ET-1 ile indüklenen artmış ekspresyonu önlenmede etkili olmuştur. Aort halkalarının ET-1 ile 18 saat süreyle inkübe edilmesi sonucu PAR düzeylerinde gözlenen upregülasyon, ET-1 ile birlikte PJ34 inkübasyonu yapıldığında anlamlı olarak azalmıştır. Sadece ET-1 uygulanan aort halkaları ile karşılaştırıldığında, ET-1 ile birlikte PJ34 inkübasyonunun PAR ekspresyonunu normalize ettiği saptanmıştır. Kontrol damarları ile karşılaştırıldığında, sadece PJ34 uygulanmasının PAR ekspresyon düzeylerine önemli bir etkisi olmamıştır. Benzer şekilde, aort halkalarının ET-1 ile 18 saat süreyle inkübe edilmesi sonucu PARP-1 protein düzeylerinde gözlenen upregülasyon, ET-1 ile birlikte PJ34 inkübasyonu sonucu anlamlı olarak azalmaktadır. Tek başına PJ34 uygulanması PARP-1 ekspresyon düzeylerine anlamlı bir etki oluşturmamıştır. PJ34 inkübasyonu ile PAR ve PARP-1 ekspresyonunda gözlenen bu inhibitör etki endotel disfonksiyonunun düzelmesi ile de paralellik göstermiştir. Birlikte ele alındığında, bu çalışmada elde edilen sonuçlar, ET-1'in PARP yolağının aşırı aktivasyonu aracılığı ile endotel fonksiyon bozukluğuna neden olabileceğini ve PARP inhibitörlerinin uygulanmasının endotel bağımlı vazodilatör ajanlara vasküler reaktiviteyi düzelebileceğini göstermekte ve ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonunu önlediğine işaret etmektedir. Ancak, bu koruyucu etkiden sorumlu olan tüm mekanizmaları açıklamak için daha kapsamlı çalışmalara da gereksinim vardır.

6. SONUÇLAR

Sonuç olarak, bu çalışma ET-1 uygulanması sonrası endotelde PARP'ın aktive olduğunu ve ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonunda PARP yolağının rolü olabileceğini direkt olarak gösteren ilk çalışmadır. Çalışmamızda sunulan bu sonuçlar, bir PARP inhibitörünün uygulanması ile ET-1'in neden olduğu endotel disfonksiyonun kısmen önlenebildiğini göstermektedir. Bu sonuçlar temelinde, ET-1 ile oluşan endotel disfonksiyonunun önlenmesinde PARP yolağının inhibisyonunun yeni ve ümit veren bir tedavi yaklaşımı olabileceği ileri sürülebilir.

7. ÖZET

SIÇAN TORASİK AORTUNDA ENDOTELİN-1 (ET-1) İLE İNDÜKLENEN ENDOTEL DİSFONKSİYONUNDA POLİ(ADP-RİBOZ) POLİMERAZ (PARP) YOLAĞININ ROLÜNÜN FONKSİYONEL VE YAPISAL OLARAK İNCELENMESİ

Bu çalışmada, sıçan torasik aortunda endotelin-1 (ET-1) ile indüklenen endotel disfonksiyonunda Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) yolağının rolünün fonksiyonel ve yapısal olarak araştırılması amaçlanmıştır. Vasküler reaktiviteyi değerlendirmek amacıyla izometrik gerilim çalışmaları yapılmış ve fenilefrin ve potasyum klorür ile kasılma yanıtları yanı sıra asetilkolin ve sodyum nitroprussid ile gevşeme yanıtları kaydedilmiştir. Torasik arter halkalarının ET-1 (10^{-3} M, 18 saat) ile inkübasyonu sonrası endotel bağımlı bir vazodilatör olan asetilkolin yanıtında anlamlı bir inhibisyon saptanırken, endotel bağımsız bir vazodilatör ajan olan sodyum nitroprussid ile indüklenen gevşeme yanıtı anlamlı olarak değişmemiştir. Ayrıca, ET-1 inkübasyonu sonrası torasik arter halkalarında fenilefrin ile indüklenen kasılma yanıtları artmıştır. Endotelin-1'in oluşturduğu bu etkilerin mekanizmasını araştırmak için, halkalar ET-1 ile tek başına ya da antioksidan enzim polietilen glikol-süperoksid dismutaz (PEG-SOD, hücre içi geçirgen süperoksid anyon süpürücü, 41 U/ml) ve NADPH oksidaz inhibitörü Apocynin (300 μ M) ile birlikte veya poli (ADP-riboz) polimeraz inhibitörü PJ34 (3×10^{-6} M) ile 18 saat boyunca inkübe edilmiş ve kasıcı ve gevşetici ajanlara verilen yanıtlar tekrarlanmıştır. Bu çalışma, hem PEG-SOD + Apocynin hem de PJ34 inkübasyonunun ET-1 ile indüklenen endotel disfonksiyonunun gelişimini anlamlı bir şekilde önlediğini açıkça göstermektedir. Ayrıca, ET-1'in fenilefrin ile indüklenen kasılma yanıtlarını arttırıcı etkisi PEG-SOD + Apocynin ya da PJ34 inkübasyonu sonrası inhibe olmuştur. Çalışmamızın sonuçları, ET-1'in torasik arter vasküler reaktivitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olduğunu ve bu değişikliklerin tümünün torasik arter endotelinde oksidatif stres aracılı DNA hasarı ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) yolağının aktivasyonu sonucu ortaya çıkabileceğini telkin etmektedir.

Anahtar kelimeler: Endotel disfonksiyonu, endotelin-1 (ET-1), Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP).

8. ABSTRACT

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL INVESTIGATION OF THE ROLE OF POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP) PATHWAY ON ENDOTHELIN-1 (ET-1)-INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN RAT THORACIC AORTA

The aim of this study was to investigate whether activation of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) contributes to the development of endothelin-1 (ET-1)-induced endothelial dysfunction. In order to evaluate vascular reactivity, isometric tension studies were performed in response to vasodilator agents, acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP), and constrictor agents, potassium chloride (KCl) and phenylephrine (Phe). The results of this study demonstrated that incubation of thoracic artery rings with ET-1 (10^{-3} M, 18 h) resulted in significant inhibition of response to ACh (an endothelium-dependent vasodilator) while SNP (an endothelium-independent vasodilator)-induced relaxation was not changed significantly. Moreover, the contractile response to Phe significantly increased in arteries that were incubated with ET-1, compared with controls. To investigate mechanisms of ET-1 action, additional sets of experiments involving rings incubation with ET-1 alone or with addition of polyethylene glycol-superoxide dismutase (PEG-SOD, a cell permeable superoxide radical scavenger, 41 U/ml) plus apocynin (a NADPH oxidase inhibitor, 300 μ M), and PJ34 (an inhibitor of polyADP-ribose polymerase, 3×10^{-6} M) for 18 hours, and both relaxant and constrictor responses were evaluated again. The findings of our study clearly show that all these co-treatments significantly prevented the development of endothelial dysfunction induced by ET-1. Furthermore, the effect of ET-1 on Phe-induced contraction was significantly inhibited by the concomitant incubation with either PEG-SOD plus apocynin, or PJ34. The results of this study suggest that ET-1 causes a significant alteration in vascular reactivity of thoracic artery, and this alteration seems to be via oxidative stress in thoracic artery endothelium with subsequent DNA damage and activation of PARP pathway.

Key words: Endothelial dysfunction, endothelin-1 (ET-1), poly(ADP-ribose) polymerase (PARP).

9. KAYNAKLAR

1. Goto K, Hama H, Kasuya Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol* 1996; 72: 261–90.
2. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 391–415.
3. Makino A, Kamata K. Elevated plasma endothelin-1 level in streptozotocin- induced diabetic rats and responsiveness of the mesenteric arterial bed to endothelin-1. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 1065–72.
4. Makino A, Kamata K. Time-course changes in plasma endothelin-1 and its effects on the mesenteric arterial bed in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 2000; 2: 47–55.
5. Makino A, Oda S, Kamata K. Mechanisms underlying increased release of endothelin-1 from aorta in diabetic rats. *Peptides* 2001; 22: 639–45.
6. Katsuo Kamata, Noriyasu Kanie, Takayuki Matsumoto, and Tsuneo Kobayashi. Endothelin-1-Induced Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation in Aortas Isolated from Controls and Diabetic Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44(suppl 1): 186–90.
7. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 963–74.
8. Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1986; 132: 75–8.
9. Kamata K, Kobayashi T. Changes in superoxide dismutase mRNA expression by streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 583–9.
10. Kobayashi T, Kamata K. Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats. *Atherosclerosis* 2001; 155: 313–20.
11. Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Mechanisms underlying the chronic pravastatin treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent aortic relaxation seen in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 231–8.
12. Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology* 2006; 21: 269–80.
13. Romero M, Jim'enez R, S'anchez M, L'opez-Sep'ulveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, et al. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 2009; 202: 58–67.
14. Iglarz M, Clozel M. Mechanisms of ET-1-induced Endothelial Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50: 621–8.

15. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Virag L, Mabley JG, Hasko G, Szabo C. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *JPET* 2002; 300: 862-7.
16. Pacher P, Liaudet L, Mabley JG, Komjati K, Szabo C. Pharmacologic inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase may represent a novel therapeutic approach in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1006-16.
17. Virag L, Szabo C. The therapeutic potential polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.
18. Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intracellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 1998; 83: 85-94.
19. Thiernemann C, Bowes J, Myint FP, Vane JR. Inhibition of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl acad Sci USA* 1997; 94: 679-83.
20. Szabo G, Bahrle S, Stumpf N, Sonnenberg K, Szabo EE, Pacher P, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition reduces reperfusion injury after heart transplantation. *Circ Res* 2002; 90: 100-6.
21. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabo E, Szabo C. The role of poly (ADP-ribose) polymerase in the development of cardiovascular dysfunction in diabetes mellitus. *Diabetes* 2002; 51: 514-21.
22. Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly(ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 1997; 100: 723-35.
23. Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, et al. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozotocin. *Nat Med* 1999; 5: 314-9.
24. Tasatargil A, Dalaklioglu S, Sadan G. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents homocysteine-induced endothelial dysfunction in the isolated rat aorta. *Pharmacology* 2004; 72: 99-105.1
25. Pacher P, Mabley JG, Soriano FG, Liaudet L, Komjati K, Szabo C. Endothelial dysfunction in aging animals: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Br J Pharmacol* 2002; 135:1347-50.
26. Di Paola R, Genovese T, Caputi AP, Threadgill M, Thiernemann C, Cuzzocrea S. Beneficial effects of 5-aminoisoquinolinone, a novel, potent, water-soluble, inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2004; 492: 203-10.
27. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.

28. William G, Webb H, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *Journal of Hypertension* 1998; 16: 1081–98.
29. Yanagisawa M, Kurihawa H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411–5.
30. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2863–67.
31. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 374–8.
32. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2008; 86: 485–98.
33. Bloch K, Hong DCC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat ednothelin 2. *Genomics* 1991; 10: 236–42.
34. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 74–80.
35. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102: 2434–40.
36. Kirkby NS, Hadoke PWF, Bagnall AJ, Webb DJ. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house?. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153: 1105–1119
37. Plumpton C, Champeney R, Ashby MJ, Kuc RE, Davenport AP. Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 (suppl 8): 26–8.
38. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 851–76.
39. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo HSN. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730–2.
40. Brunner F, Bra's-Silva C, Cerdeira AS, AdelinoLeite-Moreira F. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis *Pharmacology Therapeutics* 2006; 111: 508–31.
41. Barton M, Kiowski W. The therapeutic potential of endothelin receptor Antagonists in cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2001; 2: 84–9121.
42. Kuwaki T, Ling G, Onodera M, Ishii T, Nakamura A, Ju K, et al. Endothelin in the central control of cardiovascular and respiratory functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 989–94.

43. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, et al. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 248–55.
44. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 1995; 92: 357–63.
45. Honore' JC, Fecteau MH, Brochu I, Labonte' J, Bkaily G, D'Orle'ans-Juste P. Concomitant antagonism of endothelial and vascular smooth muscle cell-ETB receptors for endothelin induces hypertension in the hamster. *Am J Physiol* 2005; 289: 1258–64.
46. Clozel M, Breu V, Burri K, Cassal JM, Fischli W, Gray GA, et al. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 1993; 365: 759–61.
47. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet* 1999; 353: 133–8.
48. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4892–6.
49. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci* 1992; 50: 247–55.
50. Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 732–5.
51. Böhm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 2007; 76: 8–18.
52. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1461–5.
53. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81: 1510–5.
54. Cardillo C, Kilcoyne CM, Wacławiw M, Cannon RO, Panza JA. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 753–8.
55. Masaki T. Historical review: Intracellular signaling system of ET in vascular function. *Endothelin, TRENDS in Pharmacological Sciences* 2004; 25: 4.
56. Seyrantepe V, Hinek A, Junzheng P, Fedjaev M, Ernest S, Kadota Y, et al. Enzymatic activity of lysosomal carboxypeptidase (cathepsin) A is required for proper elastic fiber formation and inactivation of endothelin-1. *Circulation* 2008; 117: 1973–81.

57. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic Ph optimum. *J Biol Chem* 1995; 270: 15262–8.
58. Baydoun, AR, Pers S, Cirino G, Woodward B. Effects of endothelin-1 on the rat isolated heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: 193– 196.
59. D’Orle’ans-Juste P, Labonte’ J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honore’ JC. Function of endothelin B receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther* 2002; 95: 221–38.
60. Davenport AP, Maguire JJ. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ETA receptors in humans? *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 9–11.
61. Masaki, T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 235–55.
62. Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, McMillen MA. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Crit Care Med* 1997; 25: 958–64.
63. Nguyen A, Thorin-Trescases N, Thorin E.. Working under pressure: coronary arteries and the endothelin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: 1188-1194.
64. Amiri F, Viridis A, Mario Neves F, Iglarz M. Endothelium-Restricted Overexpression of Human Endothelin-1 Causes Vascular Remodeling and Endothelial Dysfunction. *Circulation* 2004; 110: 2233-40.
65. Battistini B, D’Orle’ans-Juste P, Sirois P. Endothelins—circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 1993; 68: 600–28.
66. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension* 2000; 35: 1237–41.
67. Böhm F, Johansson BL, Hedin U, Alving K, Pernow J. Enhanced vasoconstrictor effect of big endothelin-1 in patients with atherosclerosis: relation to conversion to endothelin-1. *Atherosclerosis* 2002; 160: 215–22.
68. Ramzy D, Rao V, Tumati LC, Xu N, Sheshgiri R, Miriuka S, et al. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation* 2006; 114: I319–26.
69. Gonon AT, Erbas D, Broijersen A, Valen G, Pernow J. Nitric oxide mediates protective effect of endothelin receptor antagonism during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: 1767–74.
70. Galle J, Lehmann-Bodem C, Hubner U, Heinloth A, Wanner C. CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O₍₂₎₍₋₎ formation. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 339–46.
71. Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 713–7.

72. Böhm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis* 2007; 190: 408–15.
73. Wedgwood S, Dettman RW, Black SM. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: 1058–67.
74. Verma S, Dumont AS, Maitland A. Tetrahydrobiopterin attenuates cholesterol induced coronary hyperreactivity to endothelin. *Heart* 2001; 86: 706–8.
75. Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1058–64.
76. Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, Fink GD, Hesslinger C, Kapatos G, et al. Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension. *Circulation* 2003; 108: 1238–45.
77. Ergul A, Johansen JS, Stromhaug C, Harris AK, Hutchinson J, Tawfik A, et al. Vascular dysfunction of venous bypass conduits is mediated by reactive oxygen species in diabetes: role of endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 70–7.
78. Kamata K, Kanie N, Matsumoto T, Kobayashi T. Endothelin-1-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in aortas isolated from controls and diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 186–90.
79. Gray GA. Signal transduction mechanisms of the endothelins. In: Gray GA, Webb DJ (editors): *Molecular biology and pharmacology of the endothelins*. Austin: RG Landes 1995; 95–114.
80. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease *Journal of Hypertension* 1998; 16: 1081–98.
81. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 997–1001.
82. Miyamori I, Takeda Y, Yoneda T, Takeda R. Endothelin release from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 408–10.
83. Barton M, Shaw S, Duscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo – role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 861–5.
84. Tomobe Y, Miyauchi T, Saito A, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, et al. Effects of endothelin on the renal artery from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Eur J Pharmacol* 1988; 152: 373–4.

85. Dohi Y, Lüscher TF. Endothelin-1 in hypertensive resistance arteries: intraluminal and extraluminal dysfunction. *Hypertension* 1991; 18: 543–9.
86. Deng LY, Schiffrin EL. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA–salt hypertensive rats. *Am J Physiol* 1992; 262: 1782–7.
87. Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate–salt hypertensive rats but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993; 21: 294–300.
88. Krum H. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *New Engl J Med* 1998; 338: 784–90.
89. Nakov R. Darsentan: an effective endothelin A receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15: 583–9.
90. Battistini B, D’Orléans-Juste P, Sirois P. Endothelins-circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 1993; 68: 600–28.
91. Brunner F, Wolkart G, Haleen S. Defective intracellular calcium handling in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy: protective effect of long-term endothelin-A receptor blockade with 2-benzo[1,3]-dioxol-5-yl-3-benzyl-4-(4-methoxy-phenyl)-4-oxobut-2-enoate-sodium (PD 155080). *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 442–9.
92. Crockett RR, Gray GA, Kane KA, Wainwright CL. Sarafotoxin 6c (S6c) reduces infarct size and preserves mRNA for the ETB receptor in the ischemic/reperfused myocardium of anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 148–54.
93. Kirchengast M, Luz M. Endothelin receptor antagonists—Clinical realities and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 182–91.
94. Asano K, Bohlmeier TJ, Westcott JY, Zisman LS, Kinugawa K, Good M, et al. Altered expression of endothelin receptors in failing human ventricles. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 833–46.
95. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, et al. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995; 346: 732–6.
96. Rubin LJ, Hoeper MM, Klepetko W, Galie N, Lang IM, Simonneau G. Current and future management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from diagnosis to treatment responses. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 601–7.
97. Channick RN. Effect of dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension. *Lancet* 2001; 358: 1119–23.
98. Rubin LJ. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *New Engl J Med* 2002; 346: 896–903.
99. Sitbon O. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest* 2003; 124: 247–54.

100. Chambon P, Weille JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1963; 11: 39–43.
101. Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascular Pharmacology* 2010; 53: 77-87.
102. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004; 26: 882–93.
103. Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson EL, Jacobson MK. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 920–6.
104. Heller B, Wang ZQ, Wagner EF, Radons J, Burkle A, Fehsel K. Inactivation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 11176–80.
105. Virág L, Salzman AL, Szabó C. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol* 1998; 161: 3753–9.
106. Kurosaki T, Ushiro H, Mitsuuchi Y, Suzuki S, Matsuda M, Matsuda Y, et al. Primary structure of human poly(ADP-ribose) synthetase as deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem* 1987; 262: 15990–7.
107. Kraus W, Lis J. PARP goes transcription. *Cell* 2003; 113: 677–83.
108. Kim MY, Zhang T, Kraus W.L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: PAR-laying NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev* 2005; 19: 1951–67.
109. Virág L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 209–14.
110. Oei SL, Shi Y. Transcription factor Yin Yang 1 stimulates poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 450–4.
111. Szabo C, Pacher P, Swanson RA. Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 626–30.
112. Pal P, Szabo C. Role of Poly(ADP-ribose)polymerase 1(PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev* 2007; 25: 235–60.
113. de Murcia G, Menissier de Murcia J. (Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 172–6.
114. Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, et al. Structure and function of Poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 1994; 138: 15–24.
115. Oliver FJ, Menissier de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase- 1 deficient mice. *Eur Mol Biol Organ J* 1999; 18: 4446–54.
116. Burkle A. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* 2001; 23: 795–806.
117. Smith S. The world according to PARP. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 174–9.

118. Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, de Murcia G. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 4753–7.
119. Docherty JC, Kuzio B, Silvester JA, Bowes J, Thiernemann C. An inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase activity reduces contractile dysfunction and preserves high energy phosphate levels during reperfusion of the ischaemic rat heart. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1518–24.
120. Virag L, Scott GS, Cuzzocrea S, Marmer D, Salzman AL, Szabo C Peroxynitrite-Induced Thymocyte Apoptosis: the Role of Caspases and Poly (ADPRibose) Synthetase (PARS) Activation. *Immunology* 1998; 94: 345–55.
121. Althaus FR, Hofferer L, Kleczkowska HE, Malanga M, Naegeli H, Panzeter. Histone shuttle driven by the automodification cycle of poly(ADPRibose) polymerase. *Environ Mol Mutagen* 1993; 22: 278–82.
122. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 40974–80.
123. Hergartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770–6.
124. Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 2001; 32: 1029–38.
125. Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: PAR-laying NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev* 2005; 19: 1951–67.
126. Virág L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 209–14.
127. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff J. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297: 259–63.
128. Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1147: 233–41.
129. Wang Y, Dawson V, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* 2009; 218 (2): 193–202.
130. Matthias A, Michael OH. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging. *Aging* 2009; 1: 458–68.
131. Pacher P, Szabó C. (Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Activation in the Pathogenesis of Diabetic Complications: Endothelial Dysfunction, as a Common Underlying Theme. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1568–80.
132. Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 1997; 100: 723–35.
133. Garcia Soriano F, Virág L, Jagtap P, Szabó É, Mabley JG, Liaudet L et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADPRibose) polymerase activation. *Nat Med* 2001; 7: 108–13.

134. Pacher P, Szabó C. Role of Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in Cardiovascular Diseases: The Therapeutic Potential of PARP Inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev* 2007; 25(3): 235–60.
135. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315–424.
136. Oumouna-Benachour K, Hans CP, Suzuki Y, Naura A, Datta R, Belmadani S, et al. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition reduces atherosclerotic plaque size and promotes factors of plaque stability in apolipoprotein e-deficient mice. Effects on macrophage recruitment, nuclear factor- κ B nuclear translocation, and foam cell death. *Circulation* 2007; 115(18): 2442–50.
137. Booz GW. PARP inhibitors and heart failure—Translational medicine caught in the act. *Congest Heart Fail* 2007; 13: 105–12.
138. Murad F. Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 619–34.
139. Szabo C, Zanchi A, Komjati K, Pacher P, Krolewski AS, Quist WC, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase is activated in subjects at risk of developing type 2 diabetes and is associated with impaired vascular reactivity. *Circulation* 2002; 106: 2680–6.
140. Cusi C. New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and their potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Patents* 2002; 12: 1047–71.
141. Watson CY, Whish WJ, Threadgill MD. Synthesis of 3-substituted benzamides and 5-substituted isoquinolin-1(2H)-ones and preliminary evaluation as inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Bio Org Med Chem* 1998; 6: 721–34.
142. Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K. Specific inhibitors of poly (ADPribose) synthetase and mono (ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* 1992; 267: 1569–75.
143. Suto MJ, Turner WR, Werbel LM, Sebolt JS. Dihydroisoquinolinones; the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Dev* 1991; 6: 107–17.
144. Wayman N, McDonald MC, Thompson AS, Threadgill MD, Thiernemann C. 5-Aminoisoquinolinone, a potent inhibitor of poly(adenosine 5'-diphosphate ribose) polymerase, reduces myocardial infarct size. *Eur J Pharmacol* 2001; 430: 93–100.
145. Haddad M, Rhinn H, Bloquel C, Coqueran B, Szabó C, Plotkine M. Antiinflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 23–30.
146. Jagtap P, Soriano FG, Virág L, Liaudet L, Mabley JG, Szabó É, et al. Novel phenanthridinone inhibitors of poly(adenosine 5'-diphosphateribose) synthetase: Potent cytoprotective and antishock agents. *Crit Care Med* 2002; 30: 1071–82.
147. Scott GS, Kean RB, Mikheeva T, Fabis MJ, Mabley JG, Szabó C. The therapeutic effects of PJ34 N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N dimethylacetamide HCl, a selective inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, in experimental allergic encephalomyelitis are associated with immunomodulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 1053–61.

148. Jagtap P, Soriano FG, Virag L, Liaudet L, Mabley J, Szabo E, et al. Novel phenanthridinone inhibitors of poly-(ADPribose) synthetase: potent cytoprotective and anti-shock agents. *Crit Care Med* 2002; 30: 1071–82.
149. Tasatargil A, Tekcan M, Celik-Ozenci C, Gungor NE, Dalkiran B. Aldosterone-induced endothelial dysfunction of rat aorta: role of poly(ADP-ribose) activation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2009; 10: 127-38.
150. Soriano FG, Virag L, Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med* 2001; 79: 437-48.