

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

PAR1 ANTAGONİSTİ VORAPAKSAR VE
PARMODULİN-2'NİN İNSAN SOL İNTERNAL
MAMMARIAN ARTER ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* KARŞILAŞTIRILMASI

Zinnet Şevval AKSOYALP

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

PAR1 ANTAGONİSTİ VORAPAKSAR VE
PARMODULİN-2’NİN İNSAN SOL İNTERNAL
MAMMARIAN ARTER ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* KARŞILAŞTIRILMASI

Zinnet Şevval AKSOYALP

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3270 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 06 Aralık 2019

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gül ÖZBEY
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kürşat DERİCİ
Kırıkkale Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün saflalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Zinnet Şevval AKSOYALP

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman destek olan, değerli bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlanarak kendisinden çok Şey öğrendiğim tez danıŐmanım Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN'a, tez çalıŐmama sağladıkları destek ve yardımları için Akdeniz Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ozan ERBASAN ve çalışma arkadaşlarına ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Elektron Mikroskop Görüntü Analiz Ünitesi çalıŐanları Dr. Öğr. Üyesi Hakan ER ve Arife DEMİRTOP'a,

Doktora eğitimim boyunca kendilerinden öğrendiğim değerli bilgiler ve kazandığım tecrübeler için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. CoŐkun USTA ve Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM ve Dr. Öğr. Üyesi Devrim DEMİR DORA baŐta olmak üzere tüm hocalarıma ve her konuda yanımda olup, her zaman yol gösteren AyŐe BARUTÇUGİL ve Dilara NEMUTLU SAMUR, lisans eğitimimden bu yana motivasyon ve destek kaynağım AyŐe Gül GÖNEN ve Melike Nur AKBAŞ, doktora eğitimime baŐlamamda vesile olan ve desteğini eksik etmeyen Rana Nagihan AKDER, deneysel yöntemler hakkında kendilerinden pek çok Şey öğrendiğim Esra AKCABAĐ ve Esra NİZAM, benden önce aynı yollardan geçerek bana yol açan Hatice Aslı BEDEL baŐta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Doktora eğitimimi destekleyen İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi'ndeki değerli hocalarıma, doktora programı süresince 2211-Yurt İçi Lisans Üstü Burs kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK'a, tez çalışmam için maddi olarak destekte bulunan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve her sorunumuzu büyük bir özveriyle dinleyip, bizlere her zaman yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalıŐanlarına ve

Hayatım boyunca bana her türlü imkanı ve desteği sağlayan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim ailem Muhammet Doğan, Türkan ve Őeyda AKSOYALP'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Antiplatelet ilaç olarak hedeflenen proteazla aktive olan reseptör 1 plateletlerin yanında damar endotel ve düz kas hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Daha önce proteazla aktive olan reseptör 1'in ortosterik antagonisti olan vorapaksar ve bias agonisti olan parmodulin-2'nin endotel tabakası üzerindeki etkileri hücre kültüründe değerlendirilmiş ve vorapaksarın endotel hasarına yol açtığı ileri sürülmüştür. Bu tez çalışmasının amacı ise vorapaksar ve parmodulin-2'nin insan sol internal mammarian arter yanıtları üzerindeki etkilerinin *in vitro* olarak karşılaştırılmasıdır.

Yöntem: Endoteli sağlam dokular vorapaksar/parmodulin-2 ile inkübe edilerek endotel bağımlı gevşeme yanıtına bakılmıştır. Ardından vorapaksar/parmodulin-2 inkübasyonuna ek olarak sırasıyla L-NAME, L-arginin, indometazin, karibdotoksin-apamin ve protein C aktivatörü varlığında endotel bağımlı gevşeme yanıtı araştırılmıştır. Vorapaksar/parmodulin-2'nin endotel bağımsız gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi sodyum nitruoprussit ile değerlendirilmiştir. Vorapaksar/parmodulin-2'nin endotel tabakası üzerindeki etkisi transmisyon elektron mikrokobu kullanılarak görüntülenmiştir.

Bulgular: Vorapaksarın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde endotel fonksiyonunda bozulmaya yol açtığı ve bu bozulmayı büyük oranda nitrik oksit ve endotel türevi hiperpolarizan faktör bağımlı gevşeme mekanizmaları üzerinden oluşturduğu bulunmuştur. Protein C aktivatörü varlığında vorapaksarın endotel fonksiyonu üzerindeki etkisi önlenmiştir. Her iki molekül de endotel bağımsız gevşeme yanıtlarını bozmamıştır. Vorapaksarın endotel tabakası üzerindeki etkisi transmisyon elektron mikrokobu ile elde edilen görüntüler ile desteklenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak parmodulin-2 proteazla aktive olan reseptör 1'in koruyucu yollarını bozmadan bu reseptörü inhibe ettiği için kardiyovasküler hastalıklarda vorapaksara göre daha iyi bir seçenek olabilir.

Anahtar Kelimeler: Proteaz ile aktive olan reseptör 1, vorapaksar, parmodulin-2, endotel hasarı, bias agonist.

ABSTRACT

Objective: The protease-activated receptor 1, an antiplatelet drug target, is expressed in vascular endothelial and smooth muscle cells as well as expressed in platelets. The effects of vorapaxar, the orthosteric protease-activated receptor 1 inhibitor and parmodulin-2, the bias agonist of protease-activated receptor 1, on the endothelial layer were evaluated in cell culture and vorapaxar has been suggested to cause endothelial damage. The aim of this thesis is to compare the effects of vorapaxar and parmodulin-2 on human left internal mammary artery responses *in vitro*.

Method: Endothelial layer intact tissues were incubated with vorapaxar/parmodulin-2 to determine endothelium-dependent relaxation response. Subsequently, endothelium-dependent relaxation response in the presence of L-NAME, L-arginine, indomethacin, caribdotoxin-apamine and protein C activator was investigated in addition to vorapaxar/parmodulin-2 incubation. The effect of vorapaxar/parmodulin-2 on endothelium-independent relaxation response was evaluated with sodium nitruoprusite. The effect of vorapaxar/parmodulin-2 on the endothelial layer was imaged using a transmission electron microscope.

Results: Vorapaxar has been found to cause statistically significant endothelial dysfunction and is mainly caused by disrupting nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor dependent relaxation mechanisms. In the presence of protein C activator, the effect of vorapaxar on endothelial function was prevented. Both molecules did not disrupt endothelium-independent relaxation responses. The effect of vorapaxar on the endothelial layer was supported by the images obtained by transmission electron microscope.

Conclusion: As a result, parmodulin-2 may be a better option in cardiovascular diseases than vorapaxar because it inhibits protease-activated receptor 1 without disturbing the protective pathways of this receptor.

Key words: Protease activated receptor 1, vorapaxar, parmodulin-2, endothelial damage, biased agonist.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Vasküler Endotel Tabakası	3
2.2. Endotel Tabakasının Vasküler Tonusu Düzenleme Mekanizmaları	5
2.2.1. Nitrik Oksit	5
2.2.2. Prostaglandinler ve Tromboksan A ₂	8
2.2.3. Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör	9
2.2.4. Endotelin-1	11
2.2.5. Diğer Mediyatörler	12
2.2.6. Endotel Disfonksiyonu	13
2.3. Antiplatelet Tedaviler ve Etki Mekanizmaları	14

2.3.1.	Siklooksijenaz-1 Enziminin Bloke Edilmesi	15
2.3.2.	P2Y ₁₂ Reseptörünün İnhibe Edilmesi	16
2.3.3.	Siklik Adenozin Monofosfat Seviyesinin Arttırılması	16
2.3.4.	Glikoprotein IIb/IIIa Reseptörünün İnhibe Edilmesi	17
2.3.5.	Proteaz ile Aktive Olan Reseptör 1'in İnhibe Edilmesi	17
2.4.	Proteaz ile Aktive Olan Reseptörler, Etki Mekanizması ve Sinyal İletimi	17
2.5.	Proteaz ile Aktive Olan Reseptörlerin Vasküler Sistemdeki Rollerini	22
2.5.1.	Plateletler	23
2.5.2.	Vasküler Endotel Hücreleri	24
2.5.3.	Düz Kas Hücreleri ve Kardiyomiyositler	27
2.5.4.	Vasküler Tonusun Düzenlenmesinde Proteaz ile Aktive Olan Reseptörler	29
2.6.	Proteaz ile Aktive Olan Reseptör 1'in Terapötik Önemi	31
2.6.1.	Kardiyovasküler Hastalıklar	31
2.6.2.	Kanser	33
2.6.3.	İnflamatuvar Hastalıklar	34
2.6.4.	Nöronal Hastalıklar	34

2.6.5.	Sepsis	35
2.6.6.	İnme	36
2.6.7.	Yara İyileşmesi	36
2.7.	Proteaz ile Aktive Olan Reseptör 1'in Farmakolojik Olarak Düzenlenmesi	36
2.7.1.	Proteazlar	38
2.7.2.	Peptid Temelli Yaklaşımlar	39
2.7.3.	Bloklayıcı Antikorlar	42
2.7.4.	Küçük Moleküllü İnhibitörler	42
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	55
3.1.	Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Krebs Solüsyonu	55
3.2.	Deneylerde Kullanılan Cihazlar	56
3.3.	İzole Organ Banyosu Deneyleri	57
3.3.1.	İnsan Sol İnternal Mammarian Arter Halkalarının Hazırlanması	57
3.3.2.	Submaksimal Gerilimin Belirlenmesi	58
3.3.3.	PAR1 Agonisti Olan TFLLR-NH ₂ 'nin Vasküler Tonus Üzerindeki Etkisi	58
3.3.4.	PAR1 Antagonisti Olan Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkileri	58

3.3.5.	Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkilerinin Altında Yatan Mekanizmalar	59
3.3.6.	Vorapaksar/Parmodulin-2 ile Yapılan Farklı İnkübasyon Sürelerinin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkileri	60
3.3.7.	Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Bağımsız Gevşeme Yanıtı Üzerindeki Etkileri	60
3.3.8.	Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Ligand ve Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları Üzerindeki Etkileri	60
3.3.9.	Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkilerinde Protein C'nin Rolü	61
3.4.	Transmisyon Elektron Mikroskobu Deneyleleri	61
3.5.	Veri Analizi ve İstatistik	62
4.	BULGULAR	63
4.1.	Çalışmada kullanılan LIMA halkaları için submaksimal gerilim 2 gram olarak belirlenmiştir	63
4.2.	PAR1 Agonisti Olan TFLLR-NH ₂ LIMA Halkalarında Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Meydana Getirmiştir	64
4.3.	Vorapaksar İnkübasyonu Sonrası Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Azalmıştır	64
4.4.	Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Değişmemiştir	65

4.5.	Vorapaksar İnkübasyonu Sonrası NO ve EDHF Aracılı Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Azalmıştır	66
4.6.	Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Elde Edilen Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtının NO ve EDHF Aracılı Olduğu Saptanmıştır	69
4.7.	İnkübasyon Süresi Vorapaksar/Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Elde Edilen Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtına Etki Etmemiştir	71
4.8.	Vorapaksar/Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Endotel Bağımsız Gevşeme Yanıtı Değişmemiştir	73
4.9.	Vorapaksar ve Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Ligand ve Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanallarının Etkisi Değişmemiştir	74
4.10.	Protein C Aktivatörü Varlığında Vorapaksar Endotel Hasarına Yol Açmamıştır	76
4.11.	Vorapaksar İnkübasyonunun Endotel Hasarına Yol Açtığı Sonucu Transmisyon Elektron Mikroskobu Görüntüleri ile Desteklenmiştir	77
5.	TARTIŞMA	81
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	87
	KAYNAKLAR	88
	EKLER	116
	Ek-1: Etik Kurul Onay Belgesi	
	ÖZGEÇMİŞ	117

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1.	PAR'ları aktive ve inaktive eden proteazlar.	18
Tablo 2. 2.	PAR1'i hedefleyen moleküller ve etki bölgeleri.	38



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.	Vasküler yapının illüstrasyonu.	3
Şekil 2. 2.	İnsan internal mammarian arter endotel hücresinin transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüsü.	4
Şekil 2. 3.	Endotelyal nitrik oksit üretimi ve vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etkisi.	7
Şekil 2. 4.	Prostasiklin ve tromboksan A ₂ 'nin etki mekanizmaları.	9
Şekil 2. 5.	Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörün etki mekanizması.	10
Şekil 2. 6.	Endotelin-1'in damar endotel ve düz kas hücresi üzerindeki etkisi.	12
Şekil 2. 7.	Endotel disfonksiyonunun mekanizmaları.	13
Şekil 2. 8.	Platelet aktivasyon mekanizmaları.	15
Şekil 2. 9.	Antiplatelet ilaçların etki mekanizmaları.	16
Şekil 2. 10.	PAR1 aktivasyon mekanizması.	20
Şekil 2. 11.	Sağlam arter ve vasküler lezyonlu arterde PAR1'in rolü.	25
Şekil 2. 12.	PAR1 antagonistlerinin etki mekanizmaları.	37
Şekil 2. 13.	Vorapaksarın kimyasal yapısı.	46
Şekil 2. 14.	Parmodulin-2 (ML161)'nin kimyasal yapısı.	52
Şekil 3. 1.	İzole organ banyosu sistemi.	56

Şekil 3. 2.	Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM).	56
Şekil 3. 3.	İnsan LIMA dokusunun hazırlanışı.	57
Şekil 4. 1.	Farklı gerilimler altında 50 mM KCl ile submaksimal gerilimin belirlenmesi.	63
Şekil 4. 2.	Kümülatif TFLLR-NH ₂ uygulamasının vazoreaktivite üzerindeki etkisi.	64
Şekil 4. 3.	Vorapaksar inkübasyonunun endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi.	65
Şekil 4. 4.	Parmodulin-2 inkübasyonunun endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi.	66
Şekil 4. 5.	Vorapaksar ve ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının karşılaştırıldığı grafik.	66
Şekil 4. 6.	Endotel bağımlı gevşeme yanıtını inhibe eden moleküllerin vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.	68
Şekil 4. 7.	L-arginin inkübasyonun vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.	68
Şekil 4. 8.	Endotel aracılı gevşeme yanıtını inhibe eden moleküllerin ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.	70
Şekil 4. 9.	L-arginin inkübasyonun ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.	70

Şekil 4. 10.	Vorapaksar ile yapılan farklı inkübasyon sürelerinin endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerine etkisi.	71
Şekil 4. 11.	ML161 ile yapılan farklı inkübasyon sürelerinin endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerine etkisi.	72
Şekil 4. 12.	Vorapaksar inkübasyonunun endotel bağımsız gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi.	73
Şekil 4. 13.	ML161 inkübasyonunun endotel bağımsız gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi.	74
Şekil 4. 14.	Vorapaksar inkübasyonu öncesinde ve sonrasında CaCl_2 ile elde edilen kasılma yanıtı.	74
Şekil 4. 15.	Vorapaksar inkübasyonu öncesinde ve sonrasında BaCl_2 ile elde edilen kasılma yanıtı.	75
Şekil 4. 16.	ML161 inkübasyonu öncesinde ve sonrasında CaCl_2 ile elde edilen kasılma yanıtı.	75
Şekil 4. 17.	ML161 inkübasyonu öncesinde ve sonrasında BaCl_2 ile elde edilen kasılma yanıtı.	76
Şekil 4. 18.	Protein C aktivatörü ve/veya vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtı.	77
Şekil 4. 19.	Vorapaksar/ML161/Protein C inkübasyonu uygulanan LIMA halkalarının TEM görüntüsü.	78

SİMGELER ve KISALTMALAR

AC	:	Adenilaz siklaz
ACh	:	Asetilkolin
ADMA	:	Asimetrik dimetilarginin
ADP	:	Adenozin difosfat
APC	:	Aktive protein C
ATP	:	Adenozin-5'-trifosfat
BH₄	:	Tetrahidrobiyopterin
Ca⁺²	:	Kalsiyum
cAMP	:	Siklik adenozin-3'-5'-monofosfat
cGMP	:	Siklik guanozin-3'-5'-monofosfat
COX	:	Siklooksijenaz
Da	:	Dalton

DAG	: Diaçilgliserol
EC50	: Maksimum etkinin %50'sini meydana getiren ilaç konsantrasyonu
ECE	: Endotelin dönüştürücü enzim
EDHF	: Endotel türevi hiperpolarizan faktör
EDRF	: Endotel türevi gevşetici faktör
EET	: Epoksieikosatrienoik asit
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
Emax	: İlacın meydana getirdiği maksimum terapötik etki
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ET-1	: Endotelin-1
ETA	: Endotelin A reseptörü
ETB	: Endotelin B reseptörü
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi

GDP	:	Guanozindifosfat
GPKR	:	G-protein kenetli reseptörler
GTP	:	Guanozin-5'-trifosfat
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
H₂S	:	Hidrojen sülfid
HIV	:	İnsan immun yetmezlik virüsü
IC₅₀	:	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
IP	:	Prostasiklin reseptörü
IP₃	:	İnositol trifosfat
K⁺	:	Potasyum
K_{Ca}	:	Kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalları
Kir	:	İçe doğrultucu potasyum kanalları

LANCELOT-ACS : Akut Koroner Sendromda Trombinin Hücresel Etkilerinin Antagonize Edilmesi-“Lessons from ANtagonizing the CELLular effects Of Thrombin- Acute Coronary Syndromes”

LANCELOT-CAD : Koroner Arter Hastalığında Trombinin Hücresel Etkilerinin Antagonize Edilmesi-“Lessons from ANtagonizing the CELLular effects Of Thrombin- Coronary Artery Disease”

LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein

LIMA : Sol internal mammarian arter

L-NAME : NG-nitro-Larginin metil ester

L-NMMA : NG-monometil-L-arginin

MAPK : Mitojenle aktive protein kinaz

MI : Miyokard infarktüsü

MLCK : Miyozin hafif zincir kinaz

MMP1 : Matriks metalloproteinaz-1

NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
NOX	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz
NSTE-ACS	:	ST Elevasyonu Olmayan Akut Koroner Sendrom-“Non-ST-segment Elevation Acute Coronary Syndromes”
NSTE-MI	:	ST Elevasyonu Olmayan Miyokard İnfarktüsü-“Non-ST-segment Elevation Myocardial Infarction”
O₂⁻	:	Süperoksit anyonu
ODQ	:	1H-[1,2,4]oksadiazol[4,3-a]kinoksalin-1-on
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
PAR	:	Proteaz ile aktive olan reseptör
PAR1-AP	:	Proteaz ile aktive olan reseptör1 aktive edici peptid
PCI	:	Perkütan koroner girişim

pD₂	:	EC50 değerinin eksi logaritması, ilacın potensi
PG	:	Prostaglandin
PGH₂	:	Prostaglandin H ₂
PGI₂	:	Prostasiklin
PIP₂	:	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PKA	:	Protein kinaz A
PKC	:	Protein kinaz C
PKG	:	Protein kinaz G
PLA₂	:	Fosfolipaz A ₂
PLC	:	Fosfolipaz C
rAPC	:	Rekombinant aktive protein C
sGC	:	Soluble guanilaz siklaz
SOCa⁺²	:	Depo kontrollü kalsiyum kanalı

- TEM** : Transmisyon elektron mikroskobu
- TP** : Tromboksan/prostanoid reseptörü
- TRA 2°P-TIMI 50** : Aterotrombotik İskemik Olayların İkincil Önlenmesinde Trombin Reseptör Antagonisti-“Thrombin Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events–Thrombolysis In Myocardial Infarction 50”
- TRACER** : Akut Koroner Sendromda Klinik Olayların Azaltılması için Trombin Reseptör Antagonisti-“Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in acute coronary syndrome”
- TRAP** : Trombin reseptör agonisti peptid
- TRA-PCI** : Perküten Koroner Girişimde Kardiyovasküler Olayların Azaltılması için Trombin Reseptör Antagonisti-“Thrombin Receptor Antagonist in Percutaneous Coronary Intervention”
- TxA₂** : Tromboksan A₂
- VASP** : Vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein
- vWF** : Von Willebrand faktör

1. GİRİŞ

Proteaz ile aktive olan reseptör (PAR) ailesi G-protein kenetli reseptörlerdir (GPKR) ve PAR1, PAR2, PAR3 ve PAR4 olmak üzere 4 üyeden oluşmaktadır (Coughlin, 2000). PAR'lar endotel hücreleri, plateletler, monositler, T lenfositler ve düz kas hücreleri de dahil olmak üzere çok sayıda hücre üzerinde eksprese edilmektedir (Hollenberg ve Compton, 2002). PAR1 aktivasyonu sonucu ligand bağımlı olarak farklı downstream yollar aktive olmaktadır ve bu durum bias (taraf)lı sinyalizasyon olarak tanımlanmaktadır (Kenakin ve Christopoulos, 2013). PAR1 bias sinyalizasyonu özellikle endotel hücrelerinde önemlidir. Trombin ya da metalloproteinazlar tarafından PAR1 aktivasyonu endotel bariyer fonksiyonunda bozulma ve apoptoz ile sonuçlanırken (Knezevic ve ark., 2009; Tressel ve ark., 2011), aktive protein C (APC) tarafından PAR1 aktivasyonu ise endotel bariyer fonksiyonu kaybı ve apoptoza karşı koruma sağlamaktadır (Riewald ve ark., 2002; Mosnier ve ark., 2007; J. S. Bae ve Rezaie, 2008).

PAR1; başlangıçta plateletlerin trombin ile aktivasyonundan sorumlu reseptörü olarak tanımlanmış olması nedeniyle ve miyokard infarktüsü (MI) ve inme üzerindeki öneminden dolayı antiplatelet hedef olarak araştırılmıştır. Ardından PAR1'in ligand bağlanma bölgesi ile etkili bir şekilde yarışan birkaç küçük molekülle antagonist molekül geliştirilmiştir (S. Chackalamannil ve ark., 2008; M. Kogushi, Matsuoka, Kuramochi ve ark., 2011). En iyi karakterize edilmiş PAR1 antagonisti; yüksek riskli hastalarda trombotik kardiyovasküler olayların önlenmesi için 2014 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmış olan vorapaksardır. Vorapaksar; PAR1 üzerinde bulunan gizli ligand bağlanma bölgesi ile etkileşime giren ve PAR1'den gelen tüm downstream sinyalleri inhibe eden klasik bir ortosterik antagonisttir. Ortosterik antagonistlerin PAR1'e sıkı bağlanması nedeniyle meydana gelen inhibisyon kolayca tersine çevrilememektedir. Vorapaksar kullanımı iskemik olay ve kardiyovasküler ölümlerde azalma ile ilişkilendirilmiştir (Morrow ve ark., 2012) olsa da vorapaksar kullanımı sırasında kanama riskinde artış bildirilmiştir

(Magnani ve ark., 2015) ve bunun plateletlerin dışındaki hücrelerde özellikle endotel hücrelerindeki global PAR1 inhibisyonuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Ramachandran, 2012). Vorapaksar ve ikinci bir ortosterik PAR1 antagonisti olan atopaksarı değerlendiren klinik araştırmaların meta-analizleri bu antagonistlerin kanama riski ile ilişkisini doğrulamıştır (Capodanno ve ark., 2012; M. Lee ve ark., 2012).

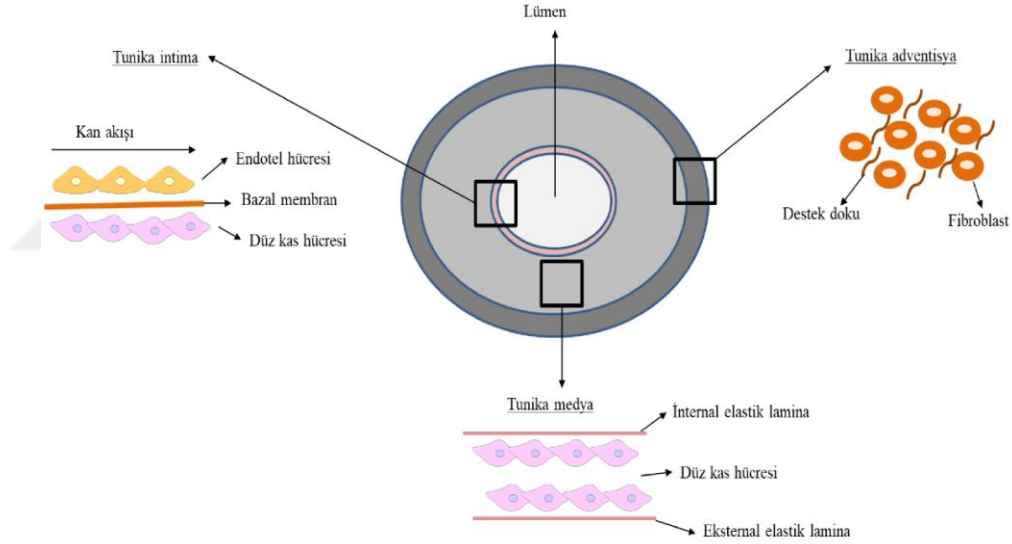
PAR1'in hedeflenmesinde yan etkileri önlemek için PAR1'in sitoplazmik yüzünü hedefleyen küçük molekülü parmodulinler geliştirilmiştir (Aisiku ve ark., 2015). Ortosterik PAR1 antagonistlerine göre parmodulinlerin potensinin daha düşük olduğu ve reversibl antagonizma gösterdiği belirlenmiştir. Parmodulinlerin selektivitesi tam olarak tanımlanmamıştır ancak en selektif parmodulinin parmodulin-2 olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Dockendorff ve ark., 2012; Aisiku ve ark., 2015). Bu çalışmalar GPKR'lerin sitozolik yüzeyini hedefleyen, fonksiyonel olarak selektif olan bu bileşiklerin ortosterik antagonistlere alternatif olabileceğini göstermektedir. PAR1 antagonisti olan parmodulin-2 ve vorapaksarın endotel hücrelerinde proinflamatuvar sinyal yollarını bloke ettiğini, parmodulin-2'nin APC aracılı sitoproteksiyonu koruduğunu ancak vorapaksarın bu yolağı da bloke ettiğini öne süren hücre kültürü çalışması vardır. Bu çalışmada uzun süreli vorapaksar inkübasyonunun endotel hasarını indüklediği öne sürülmüştür (Aisiku ve ark., 2015).

Antiplatelet olarak etkili vorapaksar ve parmodulin-2'nin endotel hasarı üzerindeki etkilerine dair hücre kültürü çalışması olmasına karşın damarın fizyolojik yanıtlarına ve damar endoteli üzerindeki etkisine dair bilgi literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada klinik olarak kullanılan PAR1 antagonisti vorapaksar ve yeni bir PAR1 antagonisti olan parmodulin-2'nin damar endoteli üzerindeki etkilerinin insan sol internal mammarian arter (LIMA) üzerinde *in vitro* olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Endotel Tabakası

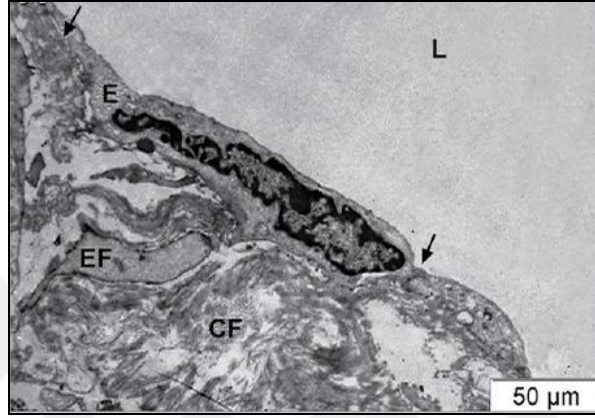
Büyük kan damarları tunika intima, medya ve adventisya olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır. Tunika intima tabakasında tek sıra hücreler halinde endotel hücreleri bulunmaktadır ve bu hücreler bazal membran (internal elastik lamina) ile bitişiktir. Tunika medya tabakasında internal ve eksternal elastik lamina ile sınırlı halde vasküler düz kas hücreleri bulunmaktadır. Tunika adventisya tabakası ise fibroblastların yer aldığı damar duvarının dış kısmını oluşturmaktadır (Şekil 2.1) (Ahmed ve Warren, 2018).



Şekil 2. 1. Vasküler yapının illüstrasyonu. Vasküler yapı tunika intima, medya ve adventisya olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır. Endotel tabakası vasküler yapının iç lümeninde yani tunika interna tabakasında bulunan tek sıra halindeki hücrelerdir ve bazal membran ile bitişiktir. Vasküler düz kas hücreleri ise internal ve eksternal elastik lamina ile sınırlıdır. Düz kas tabakasının altında ise fibroblastların yer aldığı adventisiya tabakası bulunmaktadır. Bu şekil Ahmed ve Warren'ın 2018 yılı yayınından uyarlanmıştır (Ahmed ve Warren, 2018).

Endotel terimi ilk kez 1865 yılında İsviçreli anatomist Wilhelm His tarafından vücut boşluklarının iç kısmını kaplayan hücreleri epitel hücrelerden ayırmak için kullanılmıştır (Aird, 2007). Endotel hücrelerinin belirgin özelliği pinositotik veziküllere sahip olmasıdır. Endotel hücrelerini çevre hücrelerden ayıran özelleşmiş, ince ekstraselüler

matriks protein tabakası ise bazal membran olarak adlandırılmıştır (Davis ve Senger, 2008). Endotel hücreleri arasında; doku bütünlüğünde görev alan adherens bağlantılar, bariyer fonksiyonu gören sıkı bağlantılar (tight junction) ve hücre-hücre iletişinden sorumlu geçit bağlantıları (gap junction) yer almaktadır (Şekil 2.2) (Wallez ve Huber, 2008).



Şekil 2. 2. İnsan internal mammarian arter endotel hücresinin transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüsü. Sağlam endotel hücreleri düzgün bir yüzey sahiptir. Endotel hücreleri bazal lamina ile bitişik halindedir ve hücreler arası bağlantıları ve bazal lamina oklarla gösterilmiştir. Bu görüntü Onan ve arkadaşlarının 2014 yılı yayınından alınmıştır (Onan ve ark., 2014).

Endotel tabakası; kan ve altındaki dokular arasındaki permeabiliteyi düzenleyerek vasküler bariyer yapısını oluşturan ve pıhtılaşma proteinleri, sitokinler, hemodinamik kuvvetler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli uyarılara cevap veren dinamik ve heterojen bir yapıdır. Endotel tabakası subendotelyal alana bağışıklık hücrelerinin adezyonunu ve monositlerin infiltrasyonunu önleyerek aterosklerotik plakların gelişimini de engellemektedir (Lau ve Baldus, 2006). Endotel hücrelerinin aktivasyonu konak savunması ve onarımında önemlidir, ancak sepsisten (Aird, 2003) ateroskleroza (Libby ve ark., 2006) kadar değişen çeşitli hastalıkların patogenezinde de katkıda bulunabilir. Vasküler endotel hücreleri inflamasyonu da düzenlemektedir (Marti ve ark., 2012).

Endotel hücreleri kan basıncı ve kan akışındaki değişiklikleri algılayabilmekte ve bu değişikliklere yanıt olarak endotel hücrelerinden vasküler düz kas tonusunu etkileyen çeşitli vazoaaktif maddeleri salınmaktadır. Endotel; endotel bağımlı gevşetici faktörler

[Nitrik oksit (NO/EDRF), prostasiklin (PGI₂), endotel türevi hiperpolarizan faktör (EDHF), natriüretik peptidler] ve endotel bağımlı kasıcı faktörlerin [endotelin-1(ET-1), tromboksan A₂ (TxA₂) ve süperoksit (O₂⁻)] sentezlenmesi ve salınması yoluyla vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Shimokawa, 2014; Vanhoutte ve ark., 2017). Ayrıca endotel hücreleri antitrombotik (NO ve PGI₂) ve protrombotik [von Willebrand faktör (vWF) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)] etkiye sahip molekülleri üretmektedir (Félétou, 2011). Normal koşullar altında endotel tabakası antitrombotik faktörlerin yüksek ekspresyonu ve protrombotik faktörlerin ise düşük ekspresyonu ile pıhtılaşmayı önlemektedir.

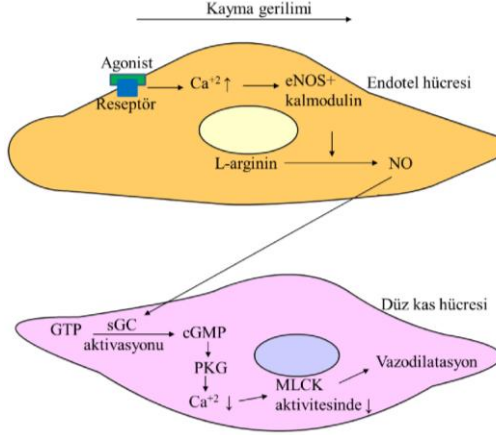
2.2. Endotel Tabakasının Vasküler Tonusu Düzenleme Mekanizmaları

2.2.1. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO); endotel bağımlı bir vazodilatördür ve yaklaşık 40 yıl önce Furchgott ve Zawadzki tarafından tanımlanmıştır (Furchgott ve Zawadzki, 1980). NO'nun kan damarlarının bazal vazodilatör tonusunun korunmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Vallance ve ark., 1989). L-argininin NO sentaz (NOS) enzimi ile L-sitrüline dönüşümü sırasında NO üretilmektedir (Palmer ve ark., 1988). NOS'un 3 izoformu vardır. Nöronal izoform (nNOS, NOS1); sinaptik nörotransmitter salınımını düzenleyen bir nöronal haberci olarak etki eden NO'yu üretmektedir (Prast ve Philippu, 2001). İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS2) izoformu; sadece inflamatuvar mediatörlere ve makrofajları aktive eden diğer zararlı uyarıcılara maruz kalan hücrelerde eksprese edildiği öne sürülmüştür (Michel ve Feron, 1997). iNOS endotel hücrelerinde de bulunmaktadır ve septik şok durumunda meydana gelen kontrolsüz vazodilatasyondan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Bassenge, 1996). Endotelial NOS (eNOS, NOS3) izoformu ise damarlarda NO üretmektedir (Lamas ve ark., 1992). Bazal vazodilatasyonun sürdürülmesinde NO salınımının önemli rolü olduğu bilinmektedir (Vane ve ark., 1990; Busse ve Fleming, 1996). Bu izoformlar orijinal olarak buldukları hücreler temel alınarak sınıflandırılmıştır, ancak bu izoformların kardiyak miyositler (Balligand ve ark.,

1995), iskelet kası, plateletler ve hipokampus (Arnal ve ark., 1999) gibi diğer hücrelerde de eksprese edildiği bilinmektedir.

Vazodilatasyon büyük ölçüde eNOS aktivitesine bağlıdır. İnaktif eNOS; kaveola adı verilen hücre zarındaki küçük kılıflarda bulunan kaveolin proteinine bağlı haldedir (Bucci ve ark., 2000). Hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) seviyelerinin arttığı durumlarda eNOS kaveolinden ayrılmakta ve aktive hale gelmektedir (Bucci ve ark., 2000). Bradikinin, asetilkolin (ACh), adenosine-5'-trifosfat (ATP), adenosin difosfat (ADP), P maddesi ve trombin gibi NO agonistleri endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını uyararak eNOS'un kaveolinden ayrılmasını tetikleyebilmektedir (Şekil 2.3) (S. W. Bae ve ark., 2003; Moncada ve Higgs, 2006). Hücre içi Ca^{+2} depoları tükendiği zaman membran reseptörlerine sinyal gönderilmekte ve hücre dışı Ca^{+2} 'un hücreye girmesine izin veren Ca^{+2} kanalları açılmaktadır. Ca^{+2} regülasyonunun bu süreci depo kontrollü (store-operated/SOCA²) Ca^{+2} girişi veya kapasitatif Ca^{+2} girişi olarak bilinmektedir (Putney, 1986). Ca^{+2} hücre sitoplazmasındaki kalmodulin proteinine bağlanmakta daha sonra eNOS'un bağlanmasına izin veren yapısal değişikliklere uğramaktadır (Fleming ve Busse, 1999). Böylece aktive olan eNOS ile L-argininden NO üretilmektedir (Şekil 2.3) (Palmer ve ark., 1988). Sentezlenen NO endotel hücreleri boyunca bitişik olan düz kas hücrelerine geçmekte ve soluble guanilil siklaz (sGC) enzimine bağlanarak bu enzimi aktive hale getirmektedir (Ignarro ve ark., 1986). Aktive olan sGC; guanozin-5'-trifosfatın (GTP) siklik guanozin-3'-5'-monofosfata (cGMP) dönüşümünü arttırmaktadır, bu da düz kas gerilimini azaltmaktadır (Jones ve ark., 1999). Ayrıca cGMP düz kas hücresinde bulunan sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını azaltmakta (Collins ve ark., 1986) ve Ca^{+2} 'nın sarkoplazmik retikuluma girişine yardımcı olmaktadır (Cornwell ve ark., 1991). Sonuç olarak düz kas hücrelerinde gevşeme yanıtı meydana gelmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Endotelial nitrik oksit üretimi ve vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etkisi. ACh, bradikinin, ATP, ADP ve P maddesi gibi agonistler endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerini aktive ettiği zaman endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya Ca^{+2} salınımını artırarak eNOS aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive eNOS L-argininden NO üretimine neden olmaktadır. Üretilen NO düz kas hücresine geçmekte ve soluble guanilaz enzimini (sGC) aktive ederek cGMP seviyesini arttırmaktadır. Böylece hücre içi Ca^{+2} miktarı azalmakta ve miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) aktivitesini azaltarak damar düz kasında gevşeme yanıtına yol açmaktadır. Bu şekil Sandoo ve arkadaşlarının 2010 yılı yayınından uyarlanmıştır (Sandoo ve ark., 2010).

NO üretim mekanizması hücre içi depolardan ve hücre dışından sitoplazmaya geçen Ca^{+2} seviyesine bağlıdır. Ca^{+2} seviyesindeki azalma Ca^{+2} -kalmodulin kompleksinin eNOS'dan ayrılmasına neden olmakta ve eNOS kaveoline bağlanarak inaktive hale geçmektedir (Fleming ve Busse, 1999).

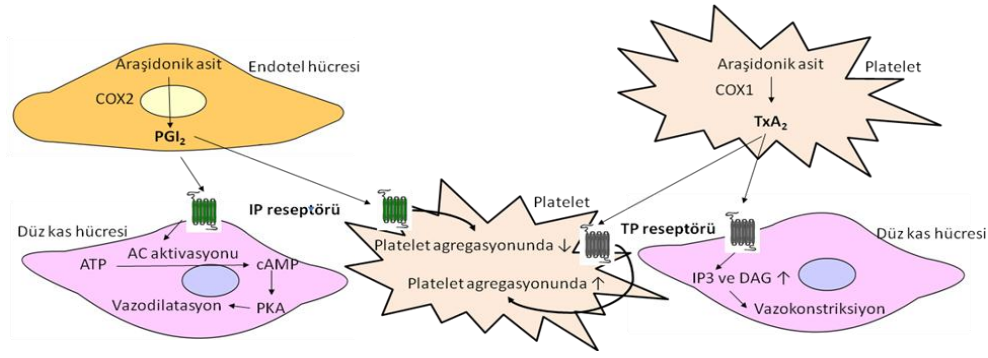
Kayma gerilimi damarda artmış kan akışından kaynaklanmaktadır ve protein kinaz B (PKB=Akt) ile (Boo ve ark., 2002) eNOS fosforilasyonunu başlatmaktadır. Böylece kayma gerilimi eNOS fosforilasyonu yoluyla NO üretimini arttırabilmektedir (Tran ve ark., 2000). Kayma gerilimi ayrıca endotelde bulunan Ca^{+2} ile aktive olan K^{+} (K_{Ca}) kanallarını aktive etmekte ve hücreden K^{+} çıkışına ve hücreye Ca^{+2} girişine neden olmaktadır (Moens ve ark., 2005) (Şekil 2.3). Ca^{+2} ve eNOS fosforilasyonunun NO üretimine katkısı kayma geriliminin süresine bağlıdır. Örneğin kısa süreli kayma geriliminde hücre içi Ca^{+2} salınımı artarken (Kuchan ve Frangos, 1994), daha uzun süreli (> 30 dakika) kayma gerilimi sonucu hücre içi Ca^{+2} depoları tükenebilmektedir. Hücre içi Ca^{+2} depoları tükendiğinde NO üretimi eNOS fosforilasyonuna bağlıdır (Pittner ve ark., 2005). eNOS'un fosforilasyonu; protein kinaz A (PKA) (S. W. Bae ve

ark., 2003) ve cGMP protein kinaza bağımlı II (Butt ve ark., 2000) gibi protein kinazlar (Michel ve Feron, 1997) ile gerçekleşmektedir.

Yukarda bahsedilen mekanizmalar sürekli olarak aktiftir ve bazal vazodilatör tonusu korumak için NO üretmektedir. NG monometil-L-arginin (LNMMMA) kullanılarak NO aktivitesinin inhibe edilmesi sonucu kan basıncında doz bağımlı bir artış bulunmuş ve NO uygulanması ile bu yanıt tersine çevrilmiştir (Rees ve ark., 1989). Bu bulgular NO'nun istirahat vazodilatör tonusun korunmasındaki önemini vurgulamaktadır. NO yokluğunda da damarlarda gevşeme yanıtı oluşturulabilmektedir. Endotelin hasarlanmasından sonra gliseril trinitrat uygulanması vazodilatasyona yol açmaktadır (Vallance ve ark., 1989). NO'nun plateletlerdeki antiagregan etkisi ve endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde vazodilatör etkisi sGC aktivasyonu ve cGMP oluşumu ile meydana gelmektedir.

2.2.2. Prostaglandinler ve Tromboksan A₂

Siklooksijenaz 1 (COX-1) ve 2 (COX-2) ile araşidonik asitten sentezlenen PGI₂ ve TxA₂ vasküler fonksiyonu düzenlemektedir (Bunting ve ark., 1983). Endotel hücrelerinde araşidonik asit COX-2 ile prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüşmekte ve prostaglandin sentaz ile PGI₂ üretilmektedir. PGI₂; baskın olarak endotel hücrelerinde sentezlenmekte ve yaralanma bölgelerinde lokal etki oluşturmaktadır. PGI₂'lerin çoğu lümeninden salınmakta ve burada antiplatelet olarak etki yapmaktadır. PGI₂; hem plateletlerde hem de vasküler düz kas hücrelerinde bulunan prostaglandin reseptörlerine (IP) bağlanmaktadır (McAdam ve ark., 1999). Düz kas hücrelerindeki IP reseptörüne PGI₂ bağlanması sonucu adenilaz siklaz (AC) aktive olmakta ve siklik adenozin-3'-5'-monofosfat (cAMP) sentezini indüklemektedir (Şekil 2.4). cAMP düz kasın NO ile aynı şekilde gevşemesini sağlayan PKA'yı aktive etmektedir (Fetalvero ve ark., 2007). NO bloke edildiği zaman kalan dilatasyon artmış PGI₂ sentezine bağlanmıştır (Beverelli ve ark., 1997), PGI₂'nin NO azaldığı durumlarda kompanze edici bir rol oynadığını düşünülmektedir.



Şekil 2. 4. Prostaglandin ve tromboksan A_2 'nin etki mekanizmaları. Endotel hücrelerinde COX-2 enzimi ile arachidonic asitten PGI_2 üretilmektedir. PGI_2 düz kas hücresi üzerinde bulunan IP reseptörüne bağlanarak adenilaz siklazı (AC) aktive etmekte ve cAMP seviyesini arttırmaktadır. Böylece vazodilatasyona yol açmaktadır. PGI_2 plateletler üzerinde bulunan IP reseptörüne bağlandığı zaman platelet agregasyonunu azaltmaktadır. Plateletlerde COX-1 enzimi ile arachidonic asitten üretilen TxA_2 düz kas hücresi üzerinde bulunan TP reseptörüne bağlanmakta ve inositol trifosfat (IP_3) ve diacylglycerol (DAG) seviyesini artırarak vazokonstriksiyona neden olmaktadır. TxA_2 plateletlerde bulunan TP reseptörüne bağlandığı zaman ise platelet agregasyonunu arttırmaktadır.

PGI_2 'nin aksine TxA_2 platelet agregasyonuna ve vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Plateletlerde arachidonic asit COX-1 ile PGH_2 'ye dönüşmekte ve tromboksan sentaz ile TxA_2 sentezlenmektedir (Bunting ve ark., 1983). TxA_2 ; plateletlerde bulunan tromboksan/prostanoid reseptörü (TP) ile platelet agregasyonuna neden olmaktadır (FitzGerald, 1991). TP reseptörü aynı zamanda düz kas hücrelerinde de bulunmakta ve vazokonstriksiyona yol açmaktadır (Şekil 2.4) (Alexander ve Griendling, 1996).

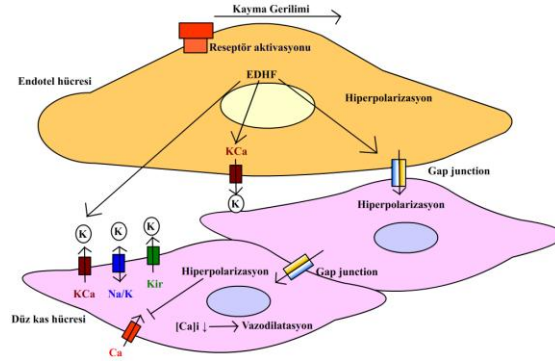
PGI_2 ve TxA_2 aktivitesindeki denge sağlıklı damarda homeostazın korunmasına yardımcı olmaktadır. Bu dengenin önemi selektif COX-2 inhibitörleri kullanıldığı zaman belirgin hale gelmektedir. Selektif COX-2 inhibitörleri TxA_2 'nin üretimini etkilemeksizin PGI_2 üretimini azaltmaktadır. Bu nedenle selektif COX-2 inhibitörleri; vazokonstriksiyon ve platelet agregasyonuna neden olmakta ve kardiyak olay riskini arttırmaktadır (Marwali ve Mehta, 2006).

2.2.3. Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör

Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) henüz tanımlanamayan bir vazodilatör maddedir ve hücrenin membran potansiyelini daha negatif hale getirerek düz kasları hiperpolarize etmektedir (Feletou ve Vanhoutte, 1988). İzole koroner arterlerinde NOS

inhibitörü olan arginin analogları ve COX inhibitörü olan indometazin varlığında da hiperpolarizasyon meydana geldiği görülünce NO, PGI₂ ve EDHF'nin insan koroner arterinin gevşemesinde ayrı ayrı rolü olduğu öne sürülmüştür (De Meyer ve Herman, 1997).

EDHF'nin özelliği bilinmemektedir ama farklı biyolojik mekanizmaları kapsamaktadır (Şekil 2.5). Hiperpolarizasyona neden olan birkaç yolak vardır. Ca⁺² ile aktive olan K⁺ kanallarının (K_{Ca}) açılması ile endotel hücrelerinde meydana gelen hiperpolarizasyon geçit bağlantıları (gap junctions) ile düz kas hücrelerine iletilmekte ve düz kas hücrelerinde endotel bağımlı hiperpolarizasyon oluşturmaktadır (Feletou ve Vanhoutte, 2006). Ayrıca düz kas hücrelerinde bulunan K_{Ca}, içe doğrultucu potasyum kanalları (K_{ir}) ve Na⁺/K⁺ pompasını aktive ederek direkt olarak düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona neden olmaktadır. Düz kas hücrelerinin membran potansiyelindeki bu değişim voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarının kapanmasına yol açmakta ve böylece hücre içi Ca⁺² seviyesini azaltarak gevşemeye neden olmaktadır (Edwards ve Weston, 2004).

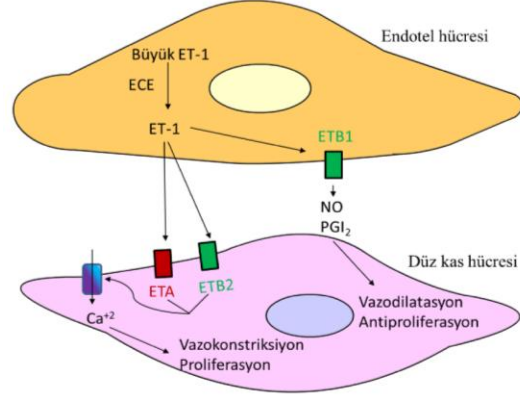


Şekil 2. 5. Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörün etki mekanizması. EDHF; endotel ve düz kas hücrelerindeki Ca⁺² ile aktive olan K⁺ kanallarını (K_{Ca}) aktive ederek endotel hücrelerinden K⁺ çıkışına ve hiperpolarizasyona neden olmaktadır. Endotel hücrelerinde meydana gelen hiperpolarizasyon; geçit bağlantıları (gap junctionlar) ile düz kas hücrelerine iletilmektedir. Ayrıca düz kas hücrelerinde bulunan K_{Ca}, içe doğrultucu potasyum kanalları (K_{ir}) ve Na⁺/K⁺ pompasını aktive etmektedir. Böylece düz kasta meydana gelen hiperpolarizasyon voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarını kapanmasına yol açarak hücre içi Ca⁺² ([Ca⁺²]_i) seviyesini azaltmakta ve vazodilatör yanıt oluşturmaktadır. Bu şekil Ozkor ve Quyyumi'nin 2011 yılı yayınından uyarlanmıştır (Ozkor ve Quyyumi, 2011).

Bulgulara EDHF'nin bazı kan damarlarında sitokrom P450 aracılı araşidonik asit metabolitleri ve lipoksijenaz türevleri veya hidrojen peroksit (H_2O_2) olduğu öne sürülmüştür (Feletou ve Vanhoutte, 2006). Araşidonik asit metabolizmasının ürünü olan epoksieikosatrienoik asitler (EET) endotel hücrelerinde sentezlenmelerine karşın düz kas hücrelerinden K^+ akışını artırarak, hiperpolarizasyon ve gevşemeye yol açmaktadır (Quilley ve McGiff, 2000). Bununla birlikte EET aktivitesinin inhibe edildiği damarlarda hiperpolarizasyonun hala devam ettiği görülmüştür (Petersson ve ark., 1997).

2.2.4. Endotelin-1

Endotelin (ET); ET-1, ET-2 ve ET-3 olmak üzere üç izoforma sahiptir (Alonso ve Radomski, 2003). Bilinen 3 ET'den sadece ET-1 endotel hücreleri tarafından üretilmektedir. ET-1; 21 amino asitten oluşan bir peptiddir ve potent vazokonstriktör olarak aktivite göstermektedir (Levin, 1995; Masaki, 1995). 41 amino asitten oluşan büyük ET-1'den endotelin dönüştürücü enzim (ECE) ile ET-1 sentezlenmektedir. ET-1 üretiminin interlökinler ve tümör nekroz faktör ile arttığı ve NO ve PGI_2 ile azaldığı gösterilmiştir (Alonso ve Radomski, 2003). ET-1 reseptörleri hem düz kas hücrelerinde (ETA ve ET-B2) hem de endotel hücrelerinde (ET-B1) tanımlanmıştır (Bacon ve ark., 1995). ET-1'in vazokonstriktör etkisine büyük oranda düz kas hücrelerinde bulunan ET-A reseptörü aracılık etmektedir. ET-1; ETA veya ET-B2 reseptörlerine bağlandığında düz kas hücresindeki Ca^{+2} kanalları açılmakta ve hücre içine Ca^{+2} girmektedir. Bu TxA_2 'ye benzer şekilde vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Endotel üzerindeki ET-B1 reseptörlerinin aktivasyonu ise NO ve PGI_2 salınımını indükleyerek vazodilatasyona yol açmaktadır (Şekil 2.6) (Cardillo ve ark., 2000). Endotel disfonksiyonunda endotel hücrelerindeki ET-B1 reseptörleri downregüle olurken, düz kas hücrelerinde ET-B2 reseptörleri upregüle olmakta ve böylece vazokonstriksiyon yanıtı artmaktadır (Bohm ve ark., 2002).



Şekil 2. 6. Endotelin-1'in damar endotel ve düz kas hücresi üzerindeki etkisi. Endotel hücresinde üretilen ET-1; damar düz kasında bulunan ETA ve ETB2 reseptörlerine bağlanarak Ca^{+2} kanalını aktive etmekte ve hücre içi Ca^{+2} düzeyini artırmaktadır. Böylece damar düz kasında vazokonstriksiyona yol açmaktadır. ET-1; endotel hücresinde bulunan ETB1 reseptörüne bağlandığında ise NO ve PGI_2 salınımına yol açmakta, böylece damar düz kasında vazodilatasyona neden olmaktadır. Bu şekil Barst'ın 2007 yılı yayınından uyarlanmıştır (Barst, 2007).

2.2.5. Diğer Mediyatörler

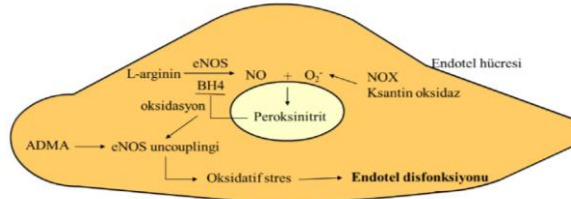
Süperoksit anyonunun (O_2^-) vasküler tonusun önemli bir düzenleyicisi olduğu öne sürülmektedir (Busse ve Fleming, 1996; Katusic, 1996). Bu serbest radikalın kaynağı endotel veya inflamatuvar hücreler olabilmektedir. Süperoksit radikali ve NO etkileşimi sonucu peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelmekte ve böylece NO konsantrasyonu azalmaktadır. Peroksinitrit ayrıca düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna ve endotel hasarına neden olmaktadır. Artmış süperoksit üretimi PGI_2 sentezini inhibe etmekte, TxA_2 sentezini ise etkilememektedir (Katusic, 1996).

Hidrojen sülfid (H_2S) ise NO ve karbonmonoksitten sonra üçüncü endotel türevi vazodilatör gaz olarak tanımlanmıştır (G. Yang ve ark., 2008) ve NO ile birlikte etki oluşturduğu öne sürülmüştür (Cortese-Krott ve ark., 2015; Yuan ve ark., 2015). L-sisteinden sistatyonin γ -liyaz enzimi ile damarlarda üretilen H_2S 'in kan basıncını ve hücrel metabolizmayı düzenlediği, anjiyogenezi arttırdığı, iyon kanallarını düzenlediği ve fibrözisi ve inflamasyonu azalttığı bilinmektedir (R. Wang, 2012).

2.2.6. Endotel Disfonksiyonu

Endotel disfonksiyonu ilk kez 1990'da hipertansif insanların ön kol damarlarında tanımlanmıştır ve esansiyel hipertansiyonu olan hastalarda endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmuş olduğu saptanmıştır (Panza ve ark., 1990). Endotel disfonksiyonu antitrombotik faktörlerin üretiminde azalmanın ve vazokonstriktör ve protrombotik faktörlerin üretiminde artışın eşlik ettiği kronik inflamatuvar bir süreçtir. Sonuç olarak vasküler tonusun bozulmasına ve kardiyovasküler olay riskinde artışa yol açmaktadır. Sigara kullanımı, yaşlanma, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, hiperglisemi ve aterosklerotik hastalık öyküsü gibi kardiyovasküler risk faktörleri endotel disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir.

Endotel disfonksiyonu temel olarak endotel kaynaklı gevşetici faktörlerin üretiminin ve etkisinin azalmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü bunlar yalnızca vasküler tonusu değil, plateletlerin ve immün hücrelerin aktivitesini ve endotele yapışmasını da etkilemektedir (Pries ve Kuebler, 2006; Karbach ve ark., 2014; Steven ve ark., 2015). Endotel disfonksiyonunun gelişiminde monomer haldeki eNOS'un (eNOS uncouplingi) süperoksit üretmesi ve NO'yu inaktif etmesi, NO biyoyararlanımında azalma, sGC desensitizasyonu, PGI₂ sentazın inaktivasyonu ve ET-1'in aktivasyonu rol oynamaktadır (Forstermann ve Munzel, 2006). NO miktarında azalmaya yol açan endojen eNOS inhibitörü; asimetrik dimetilarginininin (ADMA) de endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Şekil 2.7) (Boger ve ark., 1998).



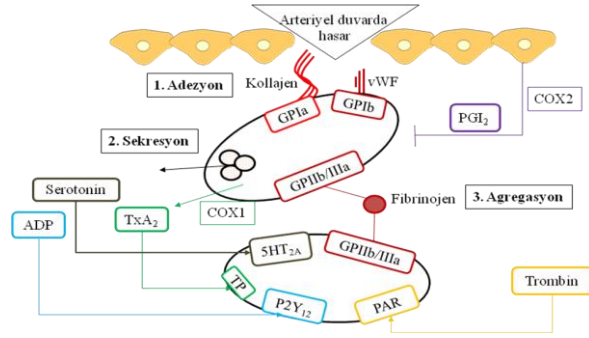
Şekil 2. 7. Endotel disfonksiyonunun mekanizmaları. Tetrahidrobiopterin (BH₄) kofaktörü varlığında eNOS ile L-argininden NO üretilmektedir. NAPH oksidaz (NOX) aktivitesi, ksantin oksidaz ve mitokondri solunum zinciri gibi kaynaklardan ise süperoksit anyonu (O₂⁻) üretilmektedir. NO ve O₂⁻ peroksinitrit oluşturarak BH₄ oksidasyonuna yol açmaktadır. BH₄'ün azalması ve ADMA; eNOS uncouplingine neden olmaktadır. Uncoupling haldeki eNOS; NO üretimini azaltarak ve oksidatif strese yol açarak endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Bu şekil Huynh ve Heo'nun 2019 yılı yayımından uyarlanmıştır (Huynh ve Heo, 2019).

Endotel disfonksiyonunun kardiyovasküler hastalıkların başlamasında ilk faktör olabileceği öne sürülmektedir (Vanhoutte ve ark., 2017). Bu nedenle endotel disfonksiyonunun ateroskleroz, hipertansiyon ve diyabet hastalığının patolojisinde yer aldığı öne sürülmüştür.

2.3. Antiplatelet Tedaviler ve Etki Mekanizmaları

Platelet temelli hemostazın aktivasyonu; arteriyel yatakta aterotrombotik olayların gelişiminde anahtar faktördür. Koagülasyonun aktivasyonu ise venöz sistemde ve kalp odacıklarındaki trombotik ve tromboembolik olaylara neden olmaktadır. Bununla birlikte agregasyon ve koagülasyon mekanizmaları iç içe geçmiş haldedir. Örneğin koagülasyon kaskadının anahtar enzimi olan trombin (faktör IIa) PAR'ları uyararak plateletleri aktive etmektedir (Bultas, 2013).

Normal koşullar altında sağlam kan damarlarında platelet aktivasyonu veya koagülasyon meydana gelmemektedir. Kan damarı hasarlandıktan sonra plateletlerin subendotelial yüzeyde bulunan kollajen ve von Willebrand faktöre (vWF) adezyonu trombüs oluşumunu başlatmaktadır. Adezyon sonrası kollajen ve vWF plateletlerin yüzeyindeki glikoprotein reseptörlerine bağlanarak plateletleri aktive etmektedir. Aktive plateletlerden salınan ADP reseptörleri P2Y₁ ve P2Y₁₂'yi, serotonin reseptörü 5HT_{2A}'yı, TxA₂ reseptörü TP'yi ve trombin reseptörü PAR'ı uyararak platelet aktivasyonunu tetiklemekte ve trombüs oluşumuna yol açmaktadır (Clemetson, 2012). Böylece hücre içi Ca⁺² düzeyi artmakta ve spesifik sinyal yolları aktive olmaktadır (Thomas ve Storey, 2015). Aktif glikoprotein IIb/IIIa reseptörü (GP IIb/IIIa) platelet agregasyonunda merkezi role sahiptir. Plateletlerde meydana gelen konformasyonel değişiklik sonucu fibrinojen plateletler üzerinde bulunan GP IIb/IIIa reseptörüne bağlanmakta ve böylece plateletlerin çapraz bağlanmasına ve trombüs stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.8) (Clemetson, 2012). P2Y₁₂ reseptörü, PAR1 ve TP'nin aktivasyonu AC'yi inhibe ederek cAMP miktarını azaltmakta ve platelet agregasyonuna neden olmaktadır (Bultas, 2013).

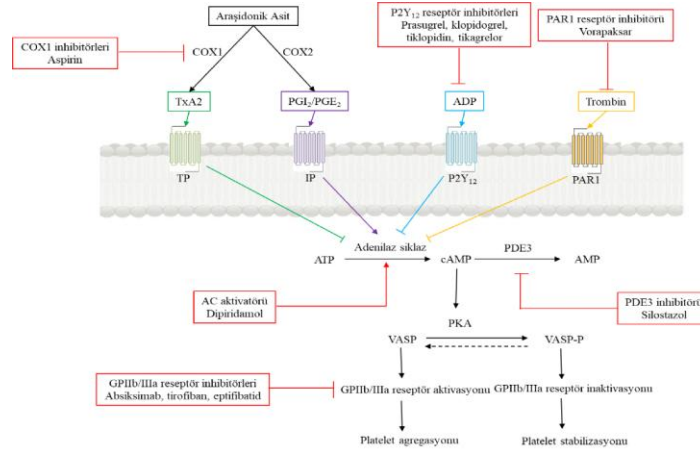


Şekil 2. 8. Platelet aktivasyon mekanizmaları. Arteriyel duvarda hasar sonucu kollajen ve von Willebrand faktör (vWF) reseptörlerine bağlanarak platelet adezyonuna ve aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive olan plateletlerden ADP, serotonin, trombin ve TxA₂ salınmakta ve böylece platelet agregasyonuna neden olmaktadır. Plateletlerin aktivasyonu GPIIb/IIIa reseptöründe konformasyonel değişikliğe yol açarak fibrinojenin bağlanmasına ve sonuç olarak agregasyona ve trombüs oluşumuna yol açmaktadır.

Endotel hasarı bölgesinde istenmeyen platelet aktivasyonu; aterotromboz ve son organ hasarı ile sonuçlanmakta (Gremmel ve ark., 2016) ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde trombozis önemli bir rol oynamaktadır. Antiplatelet tedaviler advers kardiyovasküler olayların sekonder profilaksisinde kritik role sahiptir. Piyasada bulunan antiplatelet ilaçlar; TxA₂ oluşumunu engelleyerek, P2Y₁₂ reseptörünü inhibe ederek, cAMP seviyesini arttırarak, GPIIb/IIIa reseptörünü inhibe ederek veya PAR1'i antagonize ederek etki etmektedir.

2.3.1. Siklooksijenaz-1 Enziminin Bloke Edilmesi

Antiplatelet amaçla COX-1 enziminin bloke edilmesi yaygın olarak ve uzun zamandır kullanılan bir seçenektir. Araşidonik asitten plateletlerde TxA₂ üretilirken, endotel hücrelerinde PGI₂ üretilmektedir. COX-1 aracılığı ile üretilen TxA₂ platelet agregasyonunu ve vazokonstriksiyonu indüklerken, COX-2 aracılığı ile üretilen PGI₂ platelet agregasyonunu ve vazokonstriksiyonu inhibe etmektedir (Majerus, 1983). Düşük doz (75-350 mg/gün) aspirin, plateletlerde araşidonik asitten TxA₂'nin üretilmesi için gerekli olan COX-1 enzimini irreversible olarak bloke etmektedir. Bu blokajı enzimin katalitik bölgesinde serin asetilasyonu ile sağlamaktadır (Şekil 2.9) (Bultas, 2013).



Şekil 2.9. Antiplatelet ilaçların etki mekanizmaları. Antiplatelet etkide adenilaz siklaz (AC) enziminin aktivasyonu ile cAMP üretiminin artışı kritik öneme sahiptir. Artan cAMP ile aktive olan PKA vazodilatör ile uyarılan fosfoproteini (VASP) fosforile (VASP-P) etmektedir. Böylece GP IIB/IIIa reseptörü inaktive olmakta ve platelet stabilizasyonu ile sonuçlanmaktadır. TP, P2Y12 ve PAR1 reseptörlerinin aktivasyonu AC enzimini inhibe etmektedir. Bu reseptörleri inhibe eden ilaçlar AC enzimini inhibisyonunu engelleyerek antiplatelet etki sağlamaktadır. Ayrıca AC enzim aktivatörü ilaçlar ve cAMP parçalanmasında rol oynayan fosfodiesteraz enzim-3(PDE3)'ü inhibe eden ilaçlar da cAMP seviyesini artırarak antiplatelet etki göstermektedir. GPIIb/IIIa reseptörünün inhibe eden ilaçlar ise platelet agregasyonunu engelleyerek antiplatelet olarak etki etmektedir. Bu şekil Bultas'ın 2013 yılı yayınından uyarlanmıştır (Bultas, 2013).

2.3.2. P2Y₁₂ Reseptörünün İnhibe Edilmesi

Platelerde ADP'nin bağlandığı pürinerjik bir reseptör olan P2Y₁₂ platelet agregasyonuna neden olmaktadır. P2Y₁₂ reseptörünün inhibe edilmesi vazodilatör ile uyarılan fosfoproteini (VASP) azaltarak, fosforile edilmiş VASP formunu (VASP-P) artırmakta ve böylece platelet stabilizasyonunu sağlamaktadır. P2Y₁₂ reseptör blokerleri (tienopiridinler) reversibl ve irreversibl etkili olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Tikagrelor ve cangrelor reversibl olarak etki ederken, prasugrel, klopidogrel, and tiklopidin ise reseptörü irreversibl olarak inhibe etmektedir (Şekil 2.9) (Bultas, 2013).

2.3.3. Siklik Adenozin Monofosfat Seviyesinin Arttırılması

cAMP seviyesi ya sentezi arttırılarak ya da degradasyonu inhibe edilerek arttırılabilir. Dipiridamol; adenozinin hücre içine alınmasını inhibe ederek plazma adenozin miktarını arttırmakta ve böylece adenozin plateletler üzerindeki reseptörüne bağlanmaktadır. Adenozin reseptör aktivasyonu sonucu AC enzimi aktive olmakta ve cAMP miktarı artmaktadır. Silostazol ise PDE3'ü inhibe ederek cAMP degradasyonunu inhibe

etmektedir. Artan cAMP düzeyi PKA aktivasyonu ile VASP fosforilasyonunu arttırmakta ve böylece antiplatelet etki oluşturmaktadır (Şekil 2.9) (Bultas, 2013).

2.3.4. Glikoprotein IIb/IIIa Reseptörünün İnhibe Edilmesi

Fibrinojen veya vWF gibi proteinler ile plateletlerde bulunan GPIIb/IIIa reseptörünün aktivasyonu sonrasında plateletler arasında fibrinojen-fibrin köprülerinin oluşması ile agregasyon meydana gelmektedir. GPIIb/IIIa reseptörünü inhibe eden ilaçlar böylece primer hemostazın son basamağını inhibe etmektedir. Reseptöre karşı geliştirilen antikor absiksimab ve proteinlerin reseptöre bağlandığı yeri işgal eden eptifibatid ve tirofiban GPIIb/IIIa reseptör inhibitörü antiplatelet ilaçlardır (Şekil 2.9) (Bultas, 2013).

2.3.5. Proteaz ile Aktive Olan Reseptör1'in İnhibe Edilmesi

PAR1'in ana ligandı olan trombin primer ve sekonder hemostaz arasında bağlantı görevi görmektedir. PAR1 reseptörü AC inhibisyonu, platelet hücresi içine Ca^{+2} girişi ve ADP salınımı ile platelet degranülasyonu gibi etkilere sahip olması nedeniyle karmaşık bir reseptördür (Falkner ve ark., 2011). Vorapaksar miyokard infarktüsü (MI) ve periferik arter hastalığı olan hastalarda trombotik kardiyovasküler olayların azaltılması için onaylı ilk PAR1 antagonistidir (Şekil 2.9) (Magnani ve ark., 2015).

2.4. Proteaz ile Aktive Olan Reseptörler, Etki Mekanizması ve Sinyal İletimi

Proteazla aktive olan reseptörler (PAR); proteazların hücrel etkilerine aracılık eden heptaheliks GPCR'ler olup, önemli ilaç hedefleridir (Hamilton ve Trejo, 2017). Endotel hücreleri, plateletler, monositler, T lenfositler ve düz kas hücreleri de dahil olmak üzere çok sayıda hücre üzerinde ekspres edilen (Hollenberg ve Compton, 2002) PAR'lar vasküler fizyoloji, gelişim, tromboz, inflamasyon, nöronal hasar ve kanser progresyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir (Cirino ve ark., 1996; Boire ve ark., 2005; Coughlin, 2005; Hamill ve ark., 2009).

Memeli genomunda dört tane PAR kodlanmıştır ve bu PAR'lar PAR1, PAR2, PAR3 ve PAR4 olarak adlandırılmıştır (Coughlin, 2000). İlk olarak 1991 yılında ekspresyon klonlama stratejisi kullanılarak PAR1 bulunmuş ve çeşitli proteazlar tarafından aktive

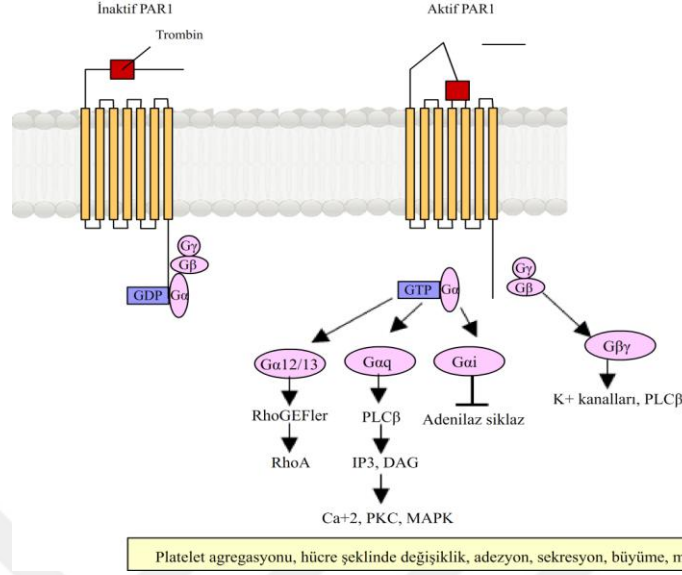
edilen GPKR ailesinin prototipik bir üyesi olarak tanımlanmıştır (Vu, Hung ve ark., 1991). Ayrıca Vu ve arkadaşları tarafından PAR1'in trombin substratı olduğu saptanmıştır (Vu, Hung ve ark., 1991). Daha sonra PAR2 tanımlanmış ve trombine duyarsız olduğu tripsin (Nystedt ve ark., 1994) ve pıhtılaşma faktörü Xa gibi diğer serin proteazlara ise duyarlı olduğu bulunmuştur (Fox ve ark., 1997). Ardından trombin tarafından aktive edilen PAR3 (Ishihara ve ark., 1997) ve tripsin ve trombin tarafından aktive edilen PAR4 (Xu ve ark., 1998; Kahn ve ark., 1999) klonlanmıştır.

Trombin dışında faktör Xa, plazmin, kallikreinler, APC, matriks metalloproteinaz-1 (MMP1), nötrofil elastaz ve nötrofil proteinaz-3 gibi diğer proteazların da PAR'ları böldüğü ve aktive ettiği gösterilmiştir (Riewald ve ark., 2002; Boire ve ark., 2005; Mihara ve ark., 2013). PAR aktivasyonunun fizyolojik düzenleyicisi olarak görev yapan bu proteazlar; doku ve hücre tipine göre değişiklik göstermektedir (Hamilton ve Trejo, 2017). PAR'ları aktivasyon bölgesinden parçalayan herhangi bir proteaz bir agonist olarak görev yapabilir, ancak bazı proteazların PAR'ları etkisiz hale getirdiği bilinmektedir (Hollenberg ve Compton, 2002). Tablo 2.1'de her bir PAR üyesini aktive ve inaktive eden proteazlar özetlenmiştir. Bazı proteazlar aynı reseptör için hem aktive edici hem de inaktive edici özelliğe sahiptir. Örneğin plazmin ve tripsin PAR1'i hem aktive hem de inaktive edebilmektedir.

Tablo 2. 1. PAR'ları aktive ve inaktive eden proteazlar. Bu tablo Hirano'nun 2007 yılı yayınından alınmıştır (Hirano, 2007).

	Aktive eden proteazlar	İnaktive eden proteazlar
PAR1	Trombin, plazmin, VIIa, Xa, APC, tripsin, triptaz, katepsin G, granzim A, MMP, gingipain-R	Plazmin, tripsin, katepsin G, proteinaz 3, elastaz, kimotripsin
PAR2	VIIa, Xa, APC, tripsin, triptaz, proteinaz 3, akrosin	Plazmin, katepsin G, proteinaz 3, elastaz
PAR3	Trombin	Katepsin G, elastaz
PAR4	Trombin, plazmin, tripsin, katepsin G, Gingipain-R	

PAR ailesi üyeleri yedi transmembran helikse (TMI-TMVII) ve üç intraselüler (il1, il2 ve il3) ve üç ekstrasellüler (el1, el2 ve el3) kıvrıma sahip tüm GPKRlerin temel yapısal özellikleri paylaşmaktadır (Bockaert ve Pin, 1999) ancak eşsiz bir proteolitik aktivasyon mekanizmasına sahiptir (Macfarlane ve ark., 2001; Hollenberg ve Compton, 2002). Çoğu GPKR çözünür, küçük hidrofilik moleküllerin veya peptidlerin reseptörün ekstrasellüler tarafındaki derin bağlayıcı ceplerle birleşmesiyle reversibl olarak aktive olurken (Wettschureck ve Offermanns, 2005); PARlar endojen proteazlar ile ekstrasellüler N terminal domaininin spesifik bölgesinden bölünmekte (Macfarlane ve ark., 2001; Hollenberg ve Compton, 2002) ve ortaya çıkan yeni N-terminal bölge bağlı bir ligand olarak işlev görmektedir. Bu bağlı ligand transmembran sinyali tetiklemek için intramoleküler bir etkileşim yoluyla reseptörün ekstrasellüler kısmına bağlanmaktadır (Şekil 2.10) (Vu, Wheaton ve ark., 1991). Meydana gelen intramoleküler aktivasyon aynı kökenden gelen G proteinleri ve β -arrestin ile iletilen bir konformasyonel değişikliğe neden olmakta (Soh ve Trejo, 2011; Canto ve ark., 2012) ve sinyalizasyonu tetiklemektedir (Vu, Hung ve ark., 1991; C. Zhang, Srinivasan ve ark., 2012). Reseptör aktive olduktan sonra fosforilasyon bağımlı mekanizmalar ile PAR'lar hızla internalize edilip ve lizozomda degrade olmaktadır (Barnes ve ark., 2004). PAR'ların hücre yüzeyinde yeniden oluşması için *de novo* sentezi veya hücre içi depolardan taşınması gerekmektedir (O'Brien ve ark., 2001).



Şekil 2. 10. PAR1 aktivasyon mekanizması. Trombin PAR1'in ekstrasellüler N terminaline bağlanıp, bölmekte ve ortaya çıkan bağlı ligand (kırmızı) reseptörün ikinci ekstrasellüler kısmına bağlanmaktadır. Reseptörde meydana gelen konformasyonel değişiklikler reseptör ile G protein etkileşimini kolaylaştırmakta ve intraselüler sinyalizasyona yol açmaktadır. α ve $\beta\gamma$ altünitelere sahip G proteinler aracılığıyla transmembran sinyalizasyonu tetiklemektedir. PAR1 seçici değildir ve G proteinlerinin birçok farklı tipiyle ($G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ ve $G_{\alpha 12/13}$) etkileşime girmektedir. Bu şekil Soh ve arkadaşlarının 2010 yılı yayınından uyarlanmıştır (Soh ve ark., 2010).

Trombin veya tripsin gibi serin proteazlar PAR1, PAR3 ve PAR4'ün ekstrasellüler N terminalindeki spesifik tanıma bölgesinden kesme yeteneğine sahiptir. İkinci bir etkileşim trombinin anyon bağlayıcı kısmı ile PAR1 ve PAR3'ün N-terminal domainindeki asidik bir hirudin benzeri sekans arasında gerçekleşmektedir (Vu, Wheaton ve ark., 1991). PAR4 ise ikinci bağlama bölgesinden yoksundur ve trombin için düşük bir afinite göstermektedir (Ishihara ve ark., 1997). Diğer PAR'lara benzer şekilde, tripsin benzeri proteazlar PAR2'nin N terminalindeki farklı bölgeleri tanıyıp, bölmekte ve böylece ortaya çıkan bağlı ligand ile PAR2 aktive olmaktadır (Nystedt ve ark., 1994).

PAR'lar bias agonizma göstermektedir. Bias agonizma veya fonksiyonel seçicilik; farklı ligandların GPKR'lerde farklı sinyal yanıtlarına yol açması durumudur. Farklı proteazların PAR'ları farklı bölgelerinden böldüğü ve ortaya çıkan bağlı peptid ligandların farklı heterotrimerik G protein alt tiplerinin veya β -arrestinlerin

sinyalizasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. PAR'ların aktivasyonu fosfolipaz C (PLC) β , protein kinaz C (PKC), Ca^{+2} salınımı, MAPK ve potasyum (K^{+}) kanallarını içeren bir G-protein kenetli sinyal yolağını uyarılmaktadır (Coughlin, 2000; Ossovskaya ve Bunnett, 2004). PAR sinyal yolları çeşitli hücre tiplerinde farklı olmakla birlikte PAR1 aracılı sinyal kaskadının başlangıç aşaması bilinmektedir. PAR1 seçici değildir ve G proteinlerinin birçok farklı tipiyle ($G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ ve $G_{\alpha 12/13}$) etkileşime girmektedir (Şekil 2.10) (Soh ve ark., 2010). PAR1 aracılı $G_{\alpha q}$ aktivasyonu sonucu guanozindifosfat (GDP)–guanozintrifosfat (GTP) değişimi; PLC izoformlarını aktive etmektedir. Aktive PLC; fosfatidilinositol 4,5-bisfosfattan (PIP2) inositol trifosfat (IP_3) ve diaçilgliserol (DAG) meydana getirmektedir. IP_3 ; IP_3 reseptörüne bağlanarak hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımına ve birçok downstream sinyal proteinlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. DAG ise; PKC izoformlarını uyarılmaktadır. PAR1 aracılı $G_{\alpha 12/13}$ aktivasyonu; Rho-Rho kinaz yolağının ve miyozin hafif zincirinin downstream aktivasyonu ile RhoGEF'i uyarılmaktadır. PAR1 aracılı $G_{\alpha i}$ aktivasyonu AC'yi inhibe etmektedir (Flaumenhaft ve De Ceunynck, 2017). PAR1 yollarının aktivasyonu farklı hücre tiplerinde farklı sonuçlara yol açmaktadır. Genel olarak PAR1 aktivasyonu hücre büyümesini, adezyonu ve granül salınımını uyarılmakta ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.10) (Flaumenhaft ve De Ceunynck, 2017).

PAR1'in proteolitik uyarılmaya bağlı olarak karşıt sinyal yollarını uyarabilme yeteneği sayesinde trombin aracılı aktivasyonu; plateletlerde agregasyon, granül salınımı, adezyon proteinlerinin aktivasyonu ve şekil değişimi ile sonuçlanmakta; endotelde ise ekzositozu, adezyon proteinlerinin ekspresyonunu, bariyer fonksiyonunun kaybını, transkripsiyonel aktivasyonu ve anjiyogenez uyarılmaktadır. Trombin aracılı PAR1'in aktivasyonu sonucu nöronlar, düz kas hücreleri, immün hücreler, epitel hücreleri ve fibroblastlarda önemli fenotipik değişiklikler meydana gelmektedir (Flaumenhaft ve De Ceunynck, 2017). Bu bulgular PAR aktivasyonu ile indüklenen sinyal yollarını seçici olarak aktive eden veya bloke eden bias ligandların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

2.5. Proteaz ile Aktive Olan Reseptörlerin Vasküler Sistemdeki Rollerini

Vasküler sistemde PARlar; plateletler, lökositlerin çoğu, vasküler endotel ve düz kas hücreleri, kardiyomyositler, kardiyak fibroblastlar ve kalp ve kan damarlarını innerve eden sinirlerde eksprese edilmektedir (Vu, Hung ve ark., 1991; A. J. Connolly ve ark., 1996; Bono ve ark., 1997; Ishihara ve ark., 1997; D'Andrea ve ark., 1998; Dery ve ark., 1998; Molino ve ark., 1998; Coughlin, 2000; Barnes ve ark., 2004). İnsan arter ve venlerinin platelet, endotel ve düz kas hücrelerinde PAR1 tespit edilmiştir (Nelken ve ark., 1992; Z. Yang ve ark., 1997). PAR1 ekspresyonu esas olarak damarların endotel tabakasında ve daha az oranda vasküler düz kasında bulunmakta ve vazomotor etkiler ortaya çıkarmaktadır (Nelken ve ark., 1992). Platelet PAR1 aktivasyonu platelet agregasyonuna; endotel PAR1 aktivasyonu vazodilatasyona; vasküler düz kasta PAR1 aktivasyonu ise vazokonstriksiyona neden olmaktadır (Coughlin, 2002).

Trombin; proinflamatuvar, proaterojenik, mitojenik ve profibrotik etkiler göstererek endotel ve vasküler düz kas ile önemli etkileşimlere girmekte (Coughlin, 2005; Gailani ve Renne, 2007) ve insanda en etkili trombin reseptörü olan PAR1 ile etki etmektedir (Leger ve ark., 2006). Patolojik trombozdaki rolünün yanı sıra trombin; aterogenezis, inflamasyon ve vasküler mitogenez, restenoz ve neovaskülarizasyon da dahil olmak üzere yaralanma durumundaki vasküler yanıtta önemli bir mediatördür (Coughlin, 2005). Knockout hayvan modellerinde sentetik PAR1 agonistleri ile yapılan çalışmalar sayesinde trombinin prokoagülan etkilerinden bağımsız olarak vasküler rolleri daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılmıştır. PAR1 aktive edici peptid (PAR1-AP) ile koagülasyon kaskadının karışık ve potansiyel olarak zararlı etkileri olmaksızın trombinin hücrel etkileri araştırılmıştır (Gudmundsdottir ve ark., 2008). Bir PAR1-AP olan SFLLRN-NH₂; reseptörü proteolitik olarak bölmeksizin doğrudan PAR1'i aktive etmekte ve damarlarda PAR1 ve trombinin hücrel etkilerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Scarborough ve ark., 1992).

2.5.1. Plateletler

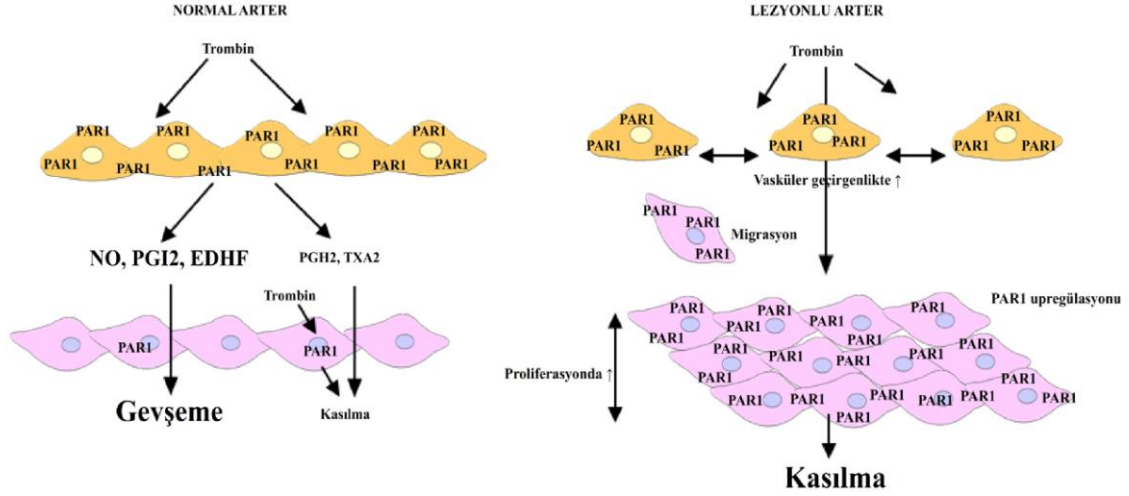
Plateletler; arteriyel trombüsün ana hücresele bileşenidir. Plateletlerin vasküler hasar bölgesine ilk lokalizasyonu için gerekli olan vWF, kollajen ve fibrinojen reseptörleri gibi birçok adhezyon reseptörü platelet yüzeyinde eksprese edilmektedir. Plateletler lokal olarak oluşan veya salınan ADP, TxA₂ ve trombin gibi mediyatör ile aktive olmaktadır. PAR aktivasyonunun hemostazdaki fizyolojik rolü platelet ve endotel hücrelerinin aktivasyonu ile bağlantılıdır. Trombin ile plateletlerin aktivasyonu plateletlerin şekil değiştirilmesi ve α -granüllerin serbest kalmasına neden olurken; trombin ile endotel hücrelerin aktivasyonu vWF ekzositozuna ve lökosit ekstravazasyonunu arttıran endotel bariyer fonksiyonunda azalmaya yol açmaktadır (Hollenberg ve Compton, 2002; Martorell ve ark., 2008).

PAR'ların türe özgü bir şekilde farklı hücre tiplerinde farklı olarak eksprese edildiği ve trombin ile indüklenen platelet aktivasyonunun farklı mekanizmaları da olabileceği öne sürülmektedir. Trombin insanlarda PAR1 ve PAR4 aracılığıyla plateletleri aktive etmektedir. PAR1'in trombine afinitesi yüksek, PAR4'ün ise trombine afinitesi düşüktür. İnsan plateletlerinin aksine fare plateletlerinde PAR1'in eksprese edilmediği, PAR3 ve PAR4'ün ise eksprese edildiği öne sürülmüştür (Kahn ve ark., 1998). Kobay plateletlerinde ise PAR 1-3 eksprese edilmektedir (Andrade-Gordon ve ark., 2001). İnsan olmayan primatların platelet hücrelerinde de insanlardaki gibi PAR1 ve PAR4 eksprese edilmektedir (Derian ve ark., 2003) ve bu nedenle PAR'lar üzerindeki prelinik çalışmaların çoğu insan olmayan primat modellerinde gerçekleştirilmiştir. Maymunlarda farmakolojik olarak PAR1 blokajı; PAR-eksik farelerde gözlemlenene benzer şekilde trombüs oluşumunu ve vasküler tıkanmayı azaltmıştır (Cook ve ark., 1995; Derian ve ark., 2003; M. Chintala ve ark., 2010). Bu çalışmalarda PAR1'in insanlarda tromboza karşı etkili bir ilaç hedefi olabileceği öne sürülmüş ve antiplatelet olarak etkili PAR antagonistlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. MI veya periferik arter hastalığı olan hastalarda trombotik komplikasyonların önlenmesi için onaylı ilk oral PAR1 antagonisti olan vorapaksar 2014 yılında piyasaya çıkmıştır.

2.5.2. Vasküler Endotel Hücreleri

PAR ailesinin 4 üyesi de arteriyel ve venöz endotel hücrelerde eksprese edilmektedir (Nelken ve ark., 1992; Mirza ve ark., 1996; Schmidt ve ark., 1998; Kataoka ve ark., 2003). Plateletlerde eksprese olan PAR'lara benzer olarak endotelial PAR'lar da ekstrasellüler proteazların reseptörü olarak görev yapmakta ve trombin ve faktör VIIa ve Xa gibi proteazlar ile bölünmesinin ardından sinyalizasyonu tetiklemektedir (Camerer ve ark., 2000; Riewald ve Ruf, 2001). Endotelial trombin reseptörlerinin aktivasyonu; Ca^{+2} mobilizasyonuna ve adezyon moleküllerinin sekresyonuna neden olmakta (Hattori ve ark., 1989; Garcia ve ark., 1993) ve endotel hücresindeki vWF dolaşımdaki plateletlerin kan damarı duvarına bağlanmasını sağlamaktadır (Andre ve ark., 2000). Bu nedenle vasküler endotel hücrelerindeki PAR1 trombüsü vasküler hasar bölgesinde sınırlandırmaktadır. Koagülasyon faktörü olan faktör Xa endoteldeki PAR1 ve PAR2'yi aktive etmektedir. Doku faktörü (TF)/Faktör VIIa ise PAR2'yi ve daha az düzeyde PAR1'i aktive etmektedir (Camerer ve ark., 2000; Riewald ve Ruf, 2001; Camerer ve ark., 2002; Rao ve Pendurthi, 2005).

PAR1 endotel hücrelerinde kan damarı tipine bağlı olarak endotel bağımlı gevşemeye veya endotel bağımlı kasılmaya katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.11) (Coughlin, 2000; Hirano ve Kanaide, 2003; Moser ve Patterson, 2003; Steinberg, 2005). Endotel hücre kültüründe PAR1 aktivasyonu PGI_2 ve NO üretimini uyarılmış ve hücre küçülmesine neden olmuştur (Hollenberg ve ark., 1993; D. D. Ku ve Dai, 1997b; Sen ve ark., 2011). NO; PAR aracılı endotel bağımlı vazorelaksasyonda önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Hamilton ve ark., 1998; Mizuno ve ark., 1998; Hirano ve Kanaide, 2003; Steinberg, 2005).



Şekil 2. 11. Sağlam arter ve vasküler lezyonlu arterde PAR1'in rolü. Trombin normal arterde hem endotel bağımlı gevşemeyi hem de arter tipine bağlı olarak endotel bağımlı veya direkt olarak düz kasta kasılmayı indüklemektedir. Endotel hücrelerinde PAR1 proinflatuar genlerin ekspresyonunda değişikliğe neden olmaktadır. Vasküler lezyon durumunda düz kasta PAR1 ekspresyonu upregüle olmaktadır. Böylece trombinin düz kastaki kasılma, migrasyon, proliferasyon, hipertrofi ve ekstraselüler matris üretimi gibi etkileri baskın hale gelmekte, vasküler tonus, medial kalınlık ve neointimal dönüşüm artmaktadır. Endotelial PAR1 ile vasküler permeabilitedeki artış vasküler lezyon patofizyolojisine katkıda bulunmaktadır. Bu şekil Hirano'nun 2007 yılı yayınından uyarlanmıştır (Hirano, 2007).

PAR1 aktivasyonu sıçan (Muramatsu ve ark., 1992; Hollenberg ve ark., 1993), tavşan (Komuro ve ark., 1997), kobay (Muramatsu ve ark., 1992), domuz (Tsfamariam, 1994b; Hamilton ve Cocks, 2000), köpek (Tsfamariam, 1994a), maymun ve insanlardan (Hamilton ve ark., 1998; Hamilton ve ark., 2001) elde edilen arter örneklerinde endotel bağımlı-NO aracılı gevşemeye neden olmuştur. Sıçan (Antonaccio ve ark., 1993; Hollenberg ve ark., 1993), kobay (Muramatsu ve ark., 1992), ve köpeklerden (Tsfamariam, 1994a) alınan örneklerde endotelin uzaklaştırılması PAR1 aracılı direkt düz kas kasılması ile sonuçlanmıştır. PAR1 aktivasyonu sağlam insan koroner arterlerinde kasılma yanıtı oluşturmamışken; endotel hasarlı arterlerde ise kasılma yanıtı oluşturmuştur (David D Ku ve Dai, 1997a). Ateromu olmayan arterlerin endotelinde PAR1 ekspresyonunun sınırlı olduğu gözlemlenmiştir ama ateromu olan arterlerin endotel ve düz kasında anlamlı düzeyde PAR1 ekspresyonu tespit edilmiştir (Nelken ve ark., 1992). Vazodilatör prostaglandinlerin insan vasküler düz kas hücre kültüründe PAR1 ekspresyonunu downregüle ettiğini gösteren çalışmalar vardır (Pape ve ark., 2008; Rosenkranz ve ark., 2009). Sonuç olarak PAR1 aktivasyonu normal

şartlarda endotel bağımlı-NO aracılı vazodilatasyona neden olmakta, ateroskleroz durumunda ve olası diğer proinflamatuvar durumlarda ise PAR1'in düz kasta upregülasyonu sonucu vazokonstriksiyon meydana gelmekte ve restenotik olaylara da katkıda bulunabilmektedir.

Endotelyal PAR1 akut inflamatuvar yanıtlar ve damar onarımında da yer almaktadır. Plateletlerde G12/13-bağımlı şekil değişikliğine benzer olarak trombin ile PAR1 aktivasyonu; endotel hücrelerde Rho-bağımlı hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine neden olmakta ve hücre kasılması ve yuvarlanmasını indüklemektedir (Garcia ve ark., 1995; Vouret-Craviari ve ark., 2002). Akut PAR1 aktivasyonu endotel hücre kasılması nedeniyle hücre-hücre teması bozmakta, vasküler permeabilitede artışa ve ödeme neden olmaktadır (Vergnolle ve ark., 1999; de Garavilla ve ark., 2001). Bu da kandaki molekül ve hücrelerin endotelin altına geçişini ve TF ve kollajen maruziyetini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca endotelyal PAR1 aktivasyonu proinflamatuvar sitokinlerin salınımına (Johnson ve ark., 1998; Chung ve ark., 2010) ve lökosit adezyon moleküllerinin artmış yüzey ekspresyonuna (Fu ve ark., 2005) neden olmaktadır. Bu nedenle akut vasküler inflamasyonda PAR1'in rolü dikkat çekmektedir.

Endotel hücre kültüründe trombinin birçok genin ekspresyonunu upregüle ya da downregüle ettiği gösterilmiştir (Minami ve ark., 2004; McLaughlin ve ark., 2005). Anjiyogenez, hücre büyümesi, hemostazda yer alan faktörlerin, sitokin, kemokin ve hücre adezyonun moleküllerinin trombin ile upregüle olduğu gösterilmiştir (Minami ve ark., 2004). Gen ekspresyonundaki bu değişiklikler endotel hücrelerinin proinflamatuvar fenotipe dönüşümü ile ilişkili olabilir. Endotel hücre kültüründe gözlenen böyle bir fenotip dönüşümü vasküler lezyon gelişiminin erken evresinde önemli bir rol oynayabilir. Ayrıca trombin ile vasküler geçirgenlik ve anjiyogenezdeki artış (Maragoudakis ve Tsopanoglou, 2000; van Nieuw Amerongen ve ark., 2000) vasküler lezyon patofizyolojisine de katkıda bulunabilir.

PAR2 de endotel hücrelerinde endotel bağımlı gevşeme ve anjiyogenez; düz kas hücrelerinde ise kasılma, hücre göçü, proliferasyon, hipertrofi ve ekstrasellüler matriks

üretimine aracılık etmektedir (Coughlin, 2000; Hollenberg ve Compton, 2002; Hirano ve Kanaide, 2003; Steinberg, 2005). PAR3; PAR4 aktivasyonu için bir kofaktör olarak işlev görmekte ve bu nedenle direkt hücre içi sinyalleri ortaya çıkarmadığı düşünülmektedir (Coughlin, 2000; Nakanishi-Matsui ve ark., 2000). PAR4'ün endotel hücrelerinde NO üretimini (Momota ve ark., 2006) ve endotel bağımlı gevşemeyi indüklediği (Hollenberg ve ark., 2004) öne sürülmüştür ancak düz kas hücrelerindeki rolü bilinmemektedir.

2.5.3. Düz Kas Hücreleri ve Kardiyomiyositler

İnsan vasküler düz kas hücrelerinde PAR1, PAR3 ve PAR4 eksprese edilmektedir. Ancak *in vivo* olarak vasküler düz kas hücrelerinde mitogenez, farklılaşma ve neointimal oluşum ve restenoza yol açan matriks sentezinde yer alan ana izoform PAR1'dir (Andrade-Gordon ve ark., 2001). Vasküler düz kas hücre kültüründe trombin PAR1 aktivasyonu aracılığı ile proliferasyonu (McNamara ve ark., 1996), kontraksiyonu (Chieng-Yane ve ark., 2011), hipertrofiyi (Chieng-Yane ve ark., 2011), ekstrasellüler matriks üretimini (Ivey ve Little, 2008) ve sitokinlerin (Kranzhofer ve ark., 1996) ve mitojenik büyüme faktörlerinin (Rauch ve ark., 2007) salınımını uyarmaktadır.

Sıçan veya babunlarda balon anjiyoplastisi sonrası meydana gelen vasküler lezyonlarda ve insanlarda meydana gelen ilerlemiş aterosklerotik lezyonlarda PAR1 ve PAR2'nin upregüle olduğu bildirilmiştir (Nelken ve ark., 1992; Wilcox ve ark., 1994; Damiano, D'Andrea ve ark., 1999). Sıçan ve babun arterlerinde balon-katater hasarı hızlı bir şekilde ve anlamlı olarak medial düz kas hücrelerinde PAR1 ekspresyonunu arttırmıştır (Wilcox ve ark., 1994). Ayrıca angiotensin II ile indüklenen hipertansiyonlu sıçanların aort düz kasında PAR1 mRNA seviyelerinin yaklaşık 10 kat arttığı rapor edilmiştir (Capers ve ark., 1997). Bu artmış PAR1 ekspresyonu *in vitro* olarak endoteli hasarlanmış sıçan aort halkalarında trombin ile indüklenen kasılmaya katkı sağlamıştır (Capers ve ark., 1997) ve bu değişikliğin en azından kısmen anjiyotensin II'nin hipertansif etkilerinde vasküler düz kasta PAR1 ekspresyonunun sorumlu olduğu öne sürülmüştür. Yapısal endotel PAR1 aktivasyonu en azından farelerin vaskülogenezisinde önemli rollere sahip olduğu

da gösterilmiştir. PAR1'i eksik olan embriyoların yarısında kan damarı oluşumunun bozulması sonucu gelişimde anormallikler meydana gelmiştir (A. J. Connolly ve ark., 1996) ve endotel hücrelerinde PAR1 ekspresyonunun sağlanması ile bu durum düzelmiştir (C. T. Griffin ve ark., 2001).

Normal insan izole koroner arter halkalarında PAR1 uyarısının endotel bağımlı gevşemeyi indüklerken, kasılma oluşturmadığı rapor edilmiştir (David D Ku ve Dai, 1997a). Bu endotel bağımlı gevşeme aterosklerotik lezyonun şiddeti arttıkça azalmıştır. Duvar kalınlaşması ile ilişkili ileri lezyonlarda gevşeme yanıtı kaybolmuştur ve kasılma yanıtı baskın hale gelmiştir (David D Ku ve Dai, 1997a). İnsan aterosklerotik arterlerinin endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde aşırı PAR1 ekspresyonu rapor edilmiştir (Nelken ve ark., 1992). PAR1'in aktivasyonu düz kas hücresi ve fibroblastlarda mitojenik yanıtları tetiklemektedir (McNamara ve ark., 1993). Antikor ile PAR1'in bloke edilmesi katater ile indüklenen restenoz hasarı modelinde intimal hiperplaziyi %50 azaltmıştır (Takada ve ark., 1998).

Aterosklerotik plaklar sitokin eksprese ve sekrete eden makrofajlar gibi inflamatuvar hücreler de içermekte ve makrofajlar MMP'ları üretmektedir (Morgan ve ark., 2004). MMP-1; PAR1 agonisti olarak tanımlanmıştır (Boire ve ark., 2005). İnce fibröz çepere sahip stabil olmayan plakların MMP-1 düzeyinin stabil çeper yapısına sahip kalın plaklardan 8 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Morgan ve ark., 2004). Sonuç olarak MMP-1'in downstreamindeki PAR1'in hedeflenmesi aterosklerotik hastalıklarda plak rüptürünün kontrolü veya azaltılmasında etkili olabilir.

Sonuç olarak kasılma, göç, proliferasyon, hipertrofi ve ekstrasellüler matriks üretimi gibi düz kas üzerindeki PAR1'in etkileri vasküler lezyonlarda baskındır; aktivasyonu sonucu vasküler tonusta bir artışa ve vasküler lezyonların gelişimine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.11). PAR'ların özellikle PAR1 ve PAR2'nin, vasküler lezyonların düz kas hücrelerinde upregüle olduğu, oysa normal arterlerin düz kas hücrelerinde ekspresyonlarının sınırlı olduğu bildirilmiştir (Hirano ve ark., 2005). Bu nedenle

PAR'ların özellikle trombus oluşumu ile ilişkili vasküler lezyonlar gibi patolojik koşullar altında daha önemli bir rol oynadığı düşünülebilir.

Kardiyomiyositler ise fonksiyonel olarak PAR1 ve PAR2 içermektedir. Bir çalışmada PAR1 ve PAR2'nin uyarılması kardiyomiyositlerde hipertrofiye yol açmıştır (Sabri ve ark., 2000). Kardiyak hücrelerde trombin ile PAR1'in aktivasyonu kardiyak hücre kontraktilitesinde artışa ve Ca^{+2} seviyelerini artırarak ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β)'nin uyarılmasıyla hipertrofi ve fibrozisin indüklenmesine neden olmuştur (Sabri ve ark., 2000; Sabri ve ark., 2002). Böylece trombinin PAR1 aktivasyonu ile kalbin patolojik olarak yeniden şekillenmesinde rolü olabileceği öne sürülmüştür. İzole kardiyomiyositlerde aşırı PAR1 ekspresyonu kardiyak hipertrofiyi indüklemiş ve MI hayvan modelinde PAR1'in knockdown edilmesi kardiyak hipertrofiyi azaltmıştır (Pawlinski ve ark., 2007). Doğrudan trombin inhibitörleri veya PAR1 antagonisti kullanılarak reseptör aracılığıyla PAR1 inhibisyonun kardiyak fibroblastta fibrozisi zayıflattığı gösterilmiştir (Sonin ve ark., 2013). Sonuç olarak kardiyomiyositlerdeki PAR1 ve PAR2'nin hedeflenmesi trombin ve TF/VIIa/Xa gibi proteazların arttığı MI durumunda inflamatuvar ve doku onarım yanıtlarının modülasyonunda olası terapötik bir seçenek olabilir.

2.5.4. Vasküler Tonusun Düzenlenmesinde Proteaz ile Aktive Olan Reseptörler

Trombin ve tripsin normal arterlerde canlı türünün ve kan damarlarının tipine bağlı olarak endotel bağımlı vazorelaksasyonu (Muramatsu ve ark., 1992; D. D. Ku ve Zaleski, 1993; Tesfamariam, 1994b; David D Ku ve Dai, 1997a; Mizuno ve ark., 1998), endotel bağımlı kasılmayı (Derkach ve ark., 2000) veya doğrudan düz kas kasılmasını (D. D. Ku ve Zaleski, 1993; David D Ku ve Dai, 1997a) indüklediği bildirilmiştir. Sağlıklı domuz ve insan koroner arterlerinde PAR1'in aktivasyonu düz kas üzerinde endotel bağımlı gevşemeye neden olmuştur (Mizuno ve ark., 1998, 2000). Sağlıklı domuz interlobal renal arterinde trombinin vasküler tonusta ilk olarak endotel bağımlı gevşeme ve ardından endotel bağımlı bir kasılmadan oluşturan bifazik bir yanıtı açtığı gösterilmiştir (Derkach ve ark., 2000). Sağlıklı kobay aortaları, tavşan aortaları ve

köpek koroner arterlerinde trombinin doğrudan düz kasta kasılmaya yol açtığı bildirilmiştir (Muramatsu ve ark., 1992; D. D. Ku ve Zaleski, 1993; Godin ve ark., 1995; David D Ku ve Dai, 1997a). Sonuç olarak normal arterlerde endotel hücrelerinin PAR'ların vasküler etkilerine aracılık eden primer hücreler olduğu düşünülmektedir (Soifer ve ark., 1994). Öte yandan, PAR1 ve PAR2'nin normal arterlerin düz kas hücrelerinde fonksiyonel ekspresyonunun sınırlı olduğu öne sürülmüştür (Nelken ve ark., 1992; Wilcox ve ark., 1994).

İzole damar preparatlarına trombin uygulanması hem vazodilatör hem de vazokonstriktör yanıtları indüklemektedir. Trombin veya PAR1-AP ile sağlam koroner arterlerinin uyarılması vazorelaksasyona neden olmuştur (D. D. Ku ve Zaleski, 1993; David D Ku ve Dai, 1997a). Ancak köpek koroner arterlerinin intimal endotel tabakasının mekanik olarak hasarlanması PAR1-AP'lerin gevşetici etkisini tamamen ortadan kaldırmıştır ve kasılmayı indüklemiştir. Aynı şekilde minimal intimal proliferasyona sahip insan koroner arterlerine SFLLRN-NH₂ uygulanması endotel bağımlı gevşeme ile sonuçlanmıştır ve bu gevşeme yanıtı endotelin hasarlanması ile bloke olmuştur. Endoteli sağlam koroner arterlerin eNOS inhibitörleri NG-monometil-L-arginin (L-NMMA) veya NG-nitro-Larginin metil ester (L-NAME) ile inkübasyonu endotel bağımlı gevşeme yanıtını azaltmış ve kasılma yanıtı meydana getirmiştir. Böylece sağlam arter endotel hücrelerinde PAR1'in uyarılması NO aracılı vasküler düz kas hücrelerinin parakrin gevşemesinde rol oynayabilir. Tersine ciddi aterosklerotik lezyonları olan insan koroner arterlerinde PAR1'in uyarılması ile gevşeme yanıtı elde edilememiştir ve bazı vakalarda anlamlı kasılmaya neden olmuştur (David D Ku ve Dai, 1997a). Sonuç olarak PAR1 yanıtları endotelin sağlam veya aterosklerotik lezyonlu olup olmamasına göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Fare ve sıçanlarda yapılmış çalışmalarda PAR2 agonisti peptidlerin intravenöz uygulanması kalp hızında değişiklik meydana getirmeden arteriyel vazodilatasyon oluşturarak anlamlı hipotansiyona neden olduğu gösterilmiştir (Cheung ve ark., 1998; Damiano, Cheung ve ark., 1999). Fare aort halkalarında PAR4 agonisti AYPGKF

peptidi ile PAR4'ün selektif olarak uyarılması PAR1 ile elde edilen yanıtla göre daha az vazorelaksasyon yanıtı meydana getirmiştir (Kataoka ve ark., 2003). Hayvanlarda endotelial PAR4'ün vasküler tonusu düzenlemede önemli bir rol oynayıp oynamadığı halen belirsizdir.

Sistemik PAR1 agonisti uygulamasına verilen yanıt ise daha karmaşıktır (Cheung ve ark., 1998; Damiano, D'Andrea ve ark., 1999). Sistemik PAR1 agonisti başlangıçta arteriyel basınçta ve kalp hızında azalmaya ve ardından hipertansiyona yol açmıştır. selektif PAR2 aktivasyonu ise selektif PAR1 aktivasyonuna göre daha fazla hipotansif yanıt meydana getirmiştir. Gen knockout deneylerde PAR agonistlerinin oluşturduğu kardiyovasküler yanıtlarda PAR1 ve PAR2'nin etkilerinin farklı olduğu ortaya koyulmuştur (Damiano, Cheung ve ark., 1999). Yabanıl tip ile karşılaştırıldığında PAR2 knockout grupta sistemik PAR1 aktivasyonu şiddetli hipotansif ve bradikardi yanıtı oluşturmuştur. Böylece PAR2'nin PAR1'in oluşturduğu vazoreaktif yanıtları azaltabileceği öne sürülmüştür.

2.6. Proteaz ile Aktive Olan Reseptör1'in Terapötik Önemi

2.6.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

Trombüs oluşumunun kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde ve patofizyolojisinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. PAR'lar koagülasyon-fibrinoliz sistemi ve damar duvarı arasındaki etkileşimlere aracılık eden önemli reseptörlerden birisidir. Ayrıca PAR ekspresyonunun ateroskleroz gibi vasküler lezyonlarda upregüle olduğu (Nelken ve ark., 1992; Wilcox ve ark., 1994), PAR1 knockout farelerde ise proliferatif vasküler lezyon gelişimine karşı korunma sağlandığı tespit edilmiştir (Cheung ve ark., 1999).

Trombinin fonksiyonel inhibisyonunun infarktüs boyutunu azalttığı gösterilmiş ve PAR1'in miyokardiyal iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında yer aldığı saptanmıştır (Chong ve ark., 2003). PAR1 knockout farelerde yapılan böbrek I/R modelinde PAR1 eksikliğinin böbrek yetmezliğine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Sevastos ve ark., 2007). Yapılan bir başka çalışmada PAR1 antagonisti olan SCH79797'nin iskemi

öncesinde veya iskemi sırasında verildiğinde miyokardiyal I/R hasarına bağlı miyokard hasarı ve disfonksiyonunu azalttığı ve bu kardiyoprotektif etkilerin PAR1 inhibisyonu ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Strande ve ark., 2007). PAR1^{-/-} farelerde I/R hasarı sonrası kardiyak remodelingin daha az olduğu bulunmuştur (Pawlinski ve ark., 2007; Antoniak ve ark., 2011; Antoniak ve ark., 2014). Anjiyotensin II infüzyon modeli uygulanan PAR1^{-/-} farelerde perivasküler fibroz ve kalp yetmezliği daha az görülmüştür (Antoniak ve ark., 2017). İsopterenol veya anjiyotensin II infüzyonu ile oluşturulan kardiyak remodeling ve I/R hasarı ile indüklenen kardiyak disfonksiyonda PAR1 aktivasyonunun rolü olduğu gösterilmiştir (Pawlinski ve ark., 2007; Jaffre ve ark., 2012; Antoniak ve ark., 2017). Kardiyotoksik etkileri olan doksorubisinin kardiyotoksik etkilerinin PAR1 inhibitörü vorapaksar ile azaltılabileceği öne sürülmüştür. Farelere doksorubisin enjeksiyonundan sonra vorapaksar uygulamasının kalp fonksiyonunu PAR1^{-/-} farelerde görülen seviyelere yükselttiği gösterilmiştir (Antoniak ve ark., 2018).

Vasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için PAR ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar önemlidir. Hücre yüzeyinde PAR1 ekspresyonunun seviyesini düzenleyen Rac1 protein aktivasyonunun statinler ile inhibe olduğu bulunmuş ve statinler PAR1'in yüzey ekspresyonunu ve trombin ile indüklenen sitozolik Ca⁺² artışını önlemiştir (Yufu ve ark., 2005). Statinler potansiyel olarak vasküler lezyonlarda PAR1 upregülasyonunu önleyebilir. Bir hipertansiyon modelinde anjiyotensin II'nin PAR1 regülasyonunda kritik bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Capers ve ark., 1997), böylece PAR1'in hedeflenmesinde anjiyotensin II reseptör antagonistlerinin terapötik bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Serbest radikal süpürücülerin ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz inhibitörlerinin PAR1'in upregülasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş, oksidatif stresin PAR1 upregülasyonunda rol oynadığı saptanmıştır (Nguyen ve ark., 2001). Reseptör upregülasyonu vasküler lezyonların gelişiminde ve vasküler hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir basamaktır. Bu nedenle reseptör upregülasyon mekanizmasının aydınlatılması vasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir. Sonuç olarak vasküler hastalıkların

önlenmesi ve tedavisi için PAR'ların vasküler etkilerini inhibe etmek ya da vasküler lezyonlarda PAR'ların upregülasyonunu önlemek yeni terapötik hedefler olabilir.

2.6.2. Kanser

PAR1 onkogen olarak tanımlanmıştır (Whitehead ve ark., 1995). PAR1'in farmakolojik inhibisyonu ya da genetik olarak silinmesi, hücre kültüründe çeşitli kanser türlerinin çoğalmasını bloke etmiş ve farelerde akciğer kanseri (Cisowski ve ark., 2011), melanoma (Silini ve ark., 2010), kolon kanseri (Adams ve ark., 2015) ve pankreas kanseri (Queiroz ve ark., 2014) de dahil olmak üzere birçok tümör tipinin progresyonunu engellemiştir.

PAR1 en çok meme kanserinde araştırılmıştır. PAR1'in MMP veya trombin aracılığıyla aktivasyonu meme kanseri progresyonunu tetiklemiş (Boire ve ark., 2005), PAR1'in farmakolojik inhibisyonu ya da genetik olarak silinmesi ise meme kanseri hücresinin canlılığı bozmuştur (E. Yang ve ark., 2009). Bir başka çalışmada trombin-PAR1 yolu MMP'lerin salgılanmasını artırarak tümör hücrelerinin invazyonunu tetiklemiştir (Radjabi ve ark., 2008). Ayrıca PAR1; melanoma hücre kemokinezini ve metastazı uyardığı öne sürülmüştür (Shi ve ark., 2004; Villares ve ark., 2011). Bu hücrelerde PAR1'in silinmesi *in vivo* olarak tümör büyümesini ve metastazını azaltmıştır (Melnikova ve ark., 2009).

Bir meme kanseri ksenograft modelinde tek başına antikanser bir ilaç olan dosetaksel kıyasla dosetaksel ile PAR1 antagonisti olan P1pal-7 infüzyonundan sonra kanser progresyonu belirgin şekilde azalmıştır. Tek başına P1pal-7 ile metastazlar inhibe olmuştur (E. Yang ve ark., 2009). Yüksek dereceli infiltrate duktal meme karsinomalı hastalarda selektif olarak PAR1'in aşırı eksprese edildiği görülmüştür (Hernandez ve ark., 2009). Benzer şekilde PAR1 ekspresyonu insan epidermal büyüme faktör reseptörü-2 (HER2) negatif meme karsinomalı hastalarda sağkalım ile negatif korelasyon göstermiştir (Gonda ve ark., 2015). Sonuç olarak kanser araştırmalarında PAR1 umut verici yeni bir ilaç hedefi olabilir.

2.6.3. İnflamatuvar Hastalıklar

Trombinin tromboz ve ateroskleroz ile ilişkili inflamatuvar süreçlerdeki rolü göz önüne alındığında (McNamara ve ark., 1996; Libby, 1998), endotel ve düz kas hücrelerindeki PAR1 aktivasyonunun proinflamatuvar etkilere sahip olması şaşırtıcı değildir (Cirino ve ark., 1996). Örneğin trombin vasküler hasar bölgesinde toplanmakta ve büyük ölçüde endoteldeki PAR1 aracılığı ile endotel hücresinde kasılma ile ödeme neden olmakta (Malik ve Fenton, 1992), inflamatuvar hücre adezyonunu ve infiltrasyonunu tetiklemektedir (Rahman ve ark., 1999). Endotel bariyerin bozulması ve ardından inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu vasküler inflamatuvar yanıtın başlatılmasında önemli süreçlerdir. Bu erken inflamatuvar süreçlere ek olarak PAR1 ekspresyonu neointimal düz kas hücrelerinde gözlemlenmekte ve aterosklerozda (Stoop ve ark., 2000), hipertansiyonda (Capers ve ark., 1997) ve balon-kateter hasarı sonrasında (Wilcox ve ark., 1994) medial düz kasta anlamlı olarak artmıştır. Endotelin bozulması nedeniyle düz kas hücresinde artmış PAR1 ekspresyonu; biriken trombinin mitojenik ve kasılma etkisini arttırmaktadır (Capers ve ark., 1997). Domuz koroner arterinde hirudin ile PAR1 inhibisyonunun balon-kateter hasarı sonrası neointimal oluşumu azaltması bu çalışmaları desteklemiştir (Gallo ve ark., 1998). PAR1 knockout farelerde vasküler hasar ile indüklenen neointimal oluşum da bozulmuştur (Cheung ve ark., 1999). Ayrıca PAR1 inhibisyonu alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı olan hayvanlarda karaciğer inflamasyonunu azaltmıştır (Kassel ve ark., 2011). PAR1'in inflamasyondaki rolü göz önüne alınıp, antiinflamatuvar ilaç olarak PAR1 antagonistlerinin faydalı olup olmayacağına dair daha fazla araştırma yapılmalıdır.

2.6.4. Nöronal Hastalıklar

Beyinde 4 PAR altipinin de bulunduğu gösterilmiş (Striggow ve ark., 2001; H. Wang ve ark., 2002) ve immunohistokimyasal sonuçlara göre PAR-1 en çok hipokampüste bulunmuştur (Striggow ve ark., 2001). Son çalışmalarda sinir sistemindeki trombin ve PAR'ların nöroproteksiyon ve nörodejenerasyon dengesinin sağlanmasında önemli role sahip olduğu öne sürülmüştür ve PARlar birçok nörodejeneratif hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Rohatgi ve ark., 2004).

PAR parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Dopaminerjik hücre ölümü parkinson hastalığının altında yatan mekanizmalardan biridir. Yapılan bir çalışmada sıçanların substantia nigrasında yer alan dopaminerjik hücrelerin ölümünde trombin ile mikroglia aktivasyonunun yer aldığı rapor edilmiştir (Carreno-Muller ve ark., 2003; Choi ve ark., 2003). Ayrıca trombin ve PAR1'in insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile ilişkili nörodejenerasyonda yer aldığı öne sürülmüştür (Boven ve ark., 2003). HIV'li hastalarda meydana gelen beyin enfeksiyonu durumunda astrositlerde trombin ve PAR1'in mesajcı RNA (mRNA) ve protein seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Boven ve ark., 2003). HIV enfeksiyonu boyunca PAR1 aktivasyonu ve upregülasyonunun; beyin inflamasyonu ve nöronal hasara katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Boven ve ark., 2003). Nöronal hastalıkların patogeneğinde yer aldığı öne sürülen PAR1 yeni bir ilaç hedefi olabilir.

2.6.5. Sepsis

Aktive protein C (APC); upstream kofaktörleri olan faktör Va ve VIIIa'yı parçalayarak koagülasyon aktivitesini azaltmaktadır. Rekombinant aktive protein C (rAPC); başlangıçta antikoagülan özelliklerine dayanarak inflamatuvar ve koagülasyon yanıtları ile karakterize şiddetli sepsis tedavisinde onaylanmıştır ve PAR1 aracılı sitoproteksiyonu uyardığı gösterilen ilk moleküldür (Bernard ve ark., 2001). Daha sonra ise PAR1'in sitoproteksiyonu uyarıcı fonksiyonu saptanmıştır (Riewald ve ark., 2002). Ancak daha sonra etkinlik problemi nedeniyle rAPC piyasadan çekilmiş ve antikoagülan aktivitesi olmayan APC mutantlarıyla yapılan çalışmalar daha yaygın hale gelmiştir. rAPC'nin PAR1'e bağlı olmayan antikoagülan etkilere sahip olması nedeniyle araştırmacılar; PAR1 aracılığıyla sinyal verme yeteneğini koruyan fakat önemsiz antikoagülan aktiviteye sahip yeni APC mutantları geliştirmiştir. Hem APC hem de bu yeni mutantlar bir dizi durumda sitoproteksiyon sağlamak için PAR1 aracılığı ile etki etmektedir (J. H. Griffin ve ark., 2015).

2.6.6. İnme

Nöronal hücrelerde PAR1 sitoprotektif sinyalinin uyarılması ile nöronal ölüm modellerinde fayda sağlandığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (Cheng ve ark., 2003; Domotor ve ark., 2003). Kemirgenlerde yapılan bir çalışmada APC PAR1'e bağımlı bir şekilde beyin kanamalarına karşı koruma sağlamıştır (Cheng ve ark., 2006). Antikoagülan aktivitesi olmayan ve yalnızca PAR1 aracılı sitoprotektif sinyali uyararak etki eden bir APC mutanıtı (3K3A-APC) prelinik iskemik inme modellerinde nöroproteksiyon sağlamış (J. H. Griffin ve ark., 2016) ve klinik aşamaya geçmiştir (Lyden ve ark., 2019).

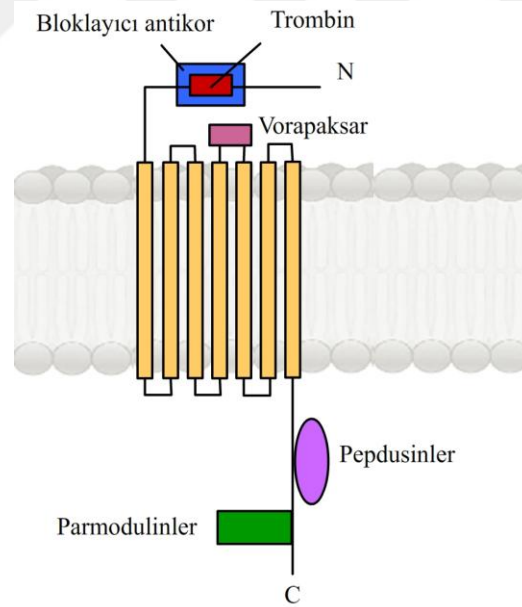
2.6.7. Yara İyileşmesi

PAR1'in keratinositlerde bulunduğu ve yara iyileşmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. İnsanlardaki kronik deri ülserlerinde APC'nin etkili olduğunu öne süren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Whitmont ve ark., 2015; Wijewardena ve ark., 2016). Diyabeti ve iyileşmeyen ülseri olan 12 hasta 20 hafta boyunca topikal APC veya salin uygulaması için randomize edilmiş ve APC ile tedavi edilen grupta yara boyutunda ve inflamasyonda azalma, vasküler proliferasyonda artış gösterilmiştir (Whitmont ve ark., 2015). Topikal APC'nin yara iyileşmesindeki etkililiğini doğrulamak için daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.7. Proteaz ile Aktive Olan Reseptör 1'in Farmakolojik Olarak Düzenlenmesi

PAR1'in *in vivo* fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedilmesine karşın PAR1'i hedef alan selektif ortosterik veya allosterik farmakolojik modülatörlerin geliştirilmesi zor olmuştur. PAR1'in aktivasyon mekanizmasının farklı oluşu PAR1'i hedefleyen ilaçların geliştirilmesinde çeşitli zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Ligand bağlama bölgesini hedefleyen çözünür moleküller bağılı ligandı bloke etmek zorundadır. PAR1'in proteazlar (rekombinant APC, aka drotrecogin-alfa gibi) ile modüle edilmesi; PAR1'i hedefleyen tüm proteazların alternatif substratlara sahip olması ve dolayısıyla hedef dışı etkiler oluşturması nedeniyle karmaşıktır (Flaumenhaft ve De Ceunynck, 2017).

Farklı türlerde PAR1'in doku dağılımının farklı olması da PAR1'i hedefleyen ilaçların geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Özellikle fare gibi primat olmayan türlerin plateletlerinde PAR3 ve PAR4 eksprese edildiği, PAR1'in ise eksprese edilmediği görülmüş (Kahn ve ark., 1998), ancak bu türlerin diğer dokularında PAR1 ekspresyonu saptanmıştır (T. M. Connolly ve ark., 1994). PAR1 ve PAR4'ü plateletlerinde eksprese eden türler arasında insanlar, maymunlar ve kobaylar bulunmaktadır (Derian ve ark., 1995). Türler arasındaki bu farklılıklar PAR1 antagonistlerinin geliştirilmesinde kemirgen çalışmalarının kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu sınırlamalara karşın ilaç geliştirme araştırmalarında PAR1 sinyalizasyonu araştırılmış ve PAR1'i hedefleyen birçok molekül tanımlanmıştır (Flaumenhaft ve De Ceunynck, 2017). Bu kısımda PAR1 aktivitesini modüle etmek için kullanılan terapötik proteazlar, peptid temelli yaklaşımlar, bloklayıcı antikorlar ve küçük moleküllü antagonislere yer verilmiştir (Şekil 2.12 ve Tablo 2.2).



Şekil 2.12. PAR1 antagonistlerinin etki mekanizmaları. PAR1 antagonisti olan bloklayıcı antikorlar trombin bağlayıcı bölgeye veya trombinin bölüdüğü bölgeye karşı geliştirilmiştir ve N terminalin proteolitik olarak bölünmesini bloke etmektedir. Küçük moleküllü antagonistler (vorapaksar, atopaksar) ve peptidomimetikler yeni N terminalin ikinci ekstrasellüler kıvrıma bağlanmasını bloke etmektedir. Pepdusinler ve parmodyulinler ise reseptörün intraselüler bölgesini hedeflemekte ve belli G protein sinyal yollarını inhibe etmektedir.

Tablo 2. 2. PAR1'i hedefleyen moleküller ve etki bölgeleri.

Proteazlar	Peptid Temelli Yaklaşımlar	Bloklayıcı Antikorlar	Küçük Moleküllü Antagonistler
3K3A APC (Bölünme bölgesi)	RWJ-58259 (Ligand bağlanma bölgesi)	IgG 9600 (Bölünme bölgesi)	Vorapaksar (Ligand bağlanma bölgesi)
5A-APC (Bölünme bölgesi)	BMS-200261 (Ligand bağlanma bölgesi)		Atopaksar (Ligand bağlanma bölgesi)
APC-K193E (Bölünme bölgesi)	P1pal-7 (PZ-128) (İntraselüler kıvrım)		SCH79797 (Ligand bağlanma bölgesi)
APC-L38D (Bölünme bölgesi)	P1pal-10S (İntraselüler kıvrım)		F16618 (Bilinmiyor)
APC-L38D/N329Q (Bölünme bölgesi)	P1pal-12 (İntraselüler kıvrım)		FR-171113 (Bilinmiyor)
APC-D36A/L38D/A39V (Bölünme bölgesi)	P1pal-12S (İntraselüler kıvrım)		Parmodulin 1 (JF5) (Sitozolik bölge)
	P1pal-13 (İntraselüler kıvrım)		Parmodulin 2 (ML161) (Sitozolik bölge)

2.7.1. Proteazlar

rAPC (drotrekogin alfa); şiddetli sepsis tedavisi için 2001'de FDA onayı almıştır (Bernard ve ark., 2001). APC'nin başlangıçta tek başına antikoagülan aktivitesi nedeniyle sepsis hastalarına fayda sağladığı düşünülse de, daha sonra APC'nin PAR1'e bağımlı bir şekilde endotelde sitoprotektif sinyalizasyonu aktive ettiği öne sürmüştür (Riewald ve ark., 2002). APC ile PAR1'in bölünmesinin hücre kültürü ve *in vivo* hastalık modellerinde koruyucu olduğu bulunmuştur (J. H. Griffin ve ark., 2015). Ancak ciddi sepsis durumunda drotrekogin-alfa'nın etkililiği hakkında sorunlar olması sebebiyle EMA; Eli Lilly'nin PROWESS çalışmasının bulgularını yeniden elde etmesini istemiştir. Bu ikinci çalışma (PROWESS-SHOCK) (Ranieri ve ark., 2012) herhangi bir fayda sağlamamıştır ve drotrekogin-alfa 2011'de piyasadandan çekilmiştir.

Araştırmacılar preklinik modellerde sitoproteksiyona seçici APC varyantlarını üretmiştir. Bu sinyalizasyona seçici APC varyantları sınırlı antikoagölan aktiviteye sahip olacak şekilde oluşturulmuştur. Böylece elde edilen non-antikoagölan APC formları *in vitro* PAR1 aracılı sitoprotektif sinyali uyararak kemirgen sepsis ve iskemik inme modellerinde yararlı etkiler meydana getirmiştir (Andreou ve ark., 2015; Gleeson ve ark., 2015; J. H. Griffin ve ark., 2015). Sitoproteksiyona seçici varyantların APC'nin antikoagölan fonksiyonuyla ilişkili kanama problemlerini önlediği göz önüne alındığında bu varyantlar klinik uygulamalar için umut verici moleküllerdir. 3K3A-APC klinik araştırmaları devam eden tek varyanttır. 3K3A-APC varyantının faz I klinik çalışmasında sağlıklı bireylere yüksek doz bolus enjeksiyon şeklinde uygulanması güvenli bulunmuştur (Lyden ve ark., 2013). İskemik inme geçiren hastalardaki güvenilirlik ve etkililiği değerlendirmek için yürütölen bir Faz II çalışmada (NCT02222714) ise 3K3A-APC için maksimum tolere edilebilen doz 540 µg/kg olarak belirlenmiştir (Lyden ve ark., 2019).

2.7.2. Peptid Temelli Yaklaşımlar

İlk PAR antagonistleri büyük ölçüde sentez kolaylığı ve her bir reseptör için bağlı ligand sekansının spesifikliği nedeniyle peptid bazlı moleküller olmuştur. Antitrombotik olarak kullanımı nedeniyle PAR1 antagonistleri daha fazla sayıda geliştirilmiştir. PAR1 antagonistlerini geliştirmeye yönelik ilk stratejilerde bağlı ligand dizisini temel alan peptidlerin ve peptidomimetiklerin tasarımına odaklanılmıştır. PAR1'in doğal sekansı olan SFLLRN-NH₂'nin yan zincirlerinde spesifik modifikasyonlar yapılmış ve yüksek afiniteli bir peptid serisi elde edilmiştir. *İn vitro* olarak PAR1 aracılı platelet agregasyonunu inhibe eden öncü bileşikler Bristol-Myers Squibb tarafından geliştirilen bir NH₂-açıl tetrapeptid olan BMS-200261 (Bernatowicz ve ark., 1996) ve Johnson Pharmaceuticals tarafından üretilen indazol türevi bir peptid olan RWJ-58259'dur (Andrade-Gordon ve ark., 1999).

SFLLR-NH₂'yi temel alan BMS-200261 en güçlü peptiddir ve PAR1-AP'nin indüklediği platelet agregasyonunu 20 nM IC₅₀ ile inhibe etmiştir (Bernatowicz ve ark.,

1996). BMS-200261 ayrıca PAR2'ye göre PAR1 için yüksek seçicilik göstermektedir (O'Brien ve ark., 2000). Ayrıca BMS-200261 tedavisinin orta serebral arter iskemik inme modelinde koruyucu olduğu gösterilmiştir (Hamill ve ark., 2009). Bu antagonistlerin yarışmalı oluşu ve reseptörün bağlı ligandının sahip olduğu güçlü stearik avantaj nedeniyle BMS 200261'in; trombin ile indüklenen hücresel yanıtlar üzerindeki etkilerinin zayıf olduğu saptanmıştır.

RWJ-56110 ise PAR1-AP ile indüklenen platelet agregasyonu 0,16 μ M IC50 ile inhibe etmiştir (Andrade-Gordon ve ark., 1999). RWJ-56110'un fare miyofibroblastlarında PAR1 için oldukça seçici olduğu, insan PAR1'inde trombin ile indüklenen Ca^{+2} yanıtlarını tamamen inhibe ettiği, ancak PAR2 veya PAR4 ile bu etkinin oluşmadığı gösterilmiştir (Andrade-Gordon ve ark., 1999; Maryanoff ve ark., 2003).

Bir başka PAR1 antagonisti olan RWJ-58259 de PAR1'e karşı yüksek seçiciliktir (H. C. Zhang ve ark., 2001). Bir balon anjiyoplasti sıçan modelinde sıçan karotid arterinin adventisya tabakasına RWJ-58259 uygulaması restenotik lezyon boyutunu azaltmıştır (Andrade-Gordon ve ark., 2001). Kobaylara *in vivo* olarak RWJ-8259 (0,3 mg/kg, intravenöz) uygulaması sonrasında izole plateletlerde trombin ile indüklenen agregasyonun inhibe olduğu görülmüştür (H. C. Zhang ve ark., 2001). Başka bir çalışmada karotid arter hasarı yapılan maymunlara RWJ-58259 (3 mg/kg intravenöz yükleme dozu ve ardından 0,123 mg idame dozu ile) uygulaması vasküler hasar bölgelerinde trombüs oluşumunu önemli ölçüde inhibe etmiştir ancak kobaylara uygulanması herhangi bir etkiye yol açmamıştır (Derian ve ark., 2003). Bu peptidomimetiklerin pek çok hayvan modelinde test edilmesine karşın bu modellerde sınırlı etkinlik göstermesinden dolayı klinik araştırmaya geçememiştir.

Peptid bazlı potansi yüksek PAR1 antagonistlerini tanımlamak için aynı kökenden G proteinleri ile etkileşen ve PAR1'in intraselüler kıvrımlarını hedefleyen ve hücreye penetre olabilen pepdusinler elde edilmiştir (Covic, Misra ve ark., 2002). Pepdusinler reseptör ve heterotrimerik G protein arasındaki etkileşimi engelleyerek etki ettiği öne sürülen benzersiz bir GPKR antagonisti sınıfıdır (Şekil 2.12) (Covic, Gresser ve ark.,

2002). Pepdusinler intraselüler kıvrımdaki bir bölgeye karşılık gelen bir peptid sekansından veya G protein etkileşimine aracılık eden hedef GPKR'nin C terminalinden oluşmaktadır. G proteinler GPKR'lerin üçüncü intraselüler kıvrımı ile etkileşime girmektedir (Gilman, 1987). Pepdusinler PAR1'in üçüncü intraselüler kıvrımına benzer bir peptid dizisi içermektedir. Bu kısa peptid dizisi lipit çift tabakadan oluşan hücre membranına taşınmayı ve bağlanmayı kolaylaştırmak için bir N-terminal hidrofobik palmitata konjuge edilmiştir. Böylece bu peptidler hücre zarına yerleşmekte ve GPKR'lerin etkileşime giren bölgelerini taklit etmektedir. Pepdusinler hücre içindeki serbest G proteinleri için yarışıp, onları bağlayarak sekestre etmektedir. Böylece GPKR aktivasyonunun downstream sinyalinin önlenmektedir (Covic, Gresser ve ark., 2002).

Peptid dizilerinin kesilmesi sonucu; dizinin uzunluğu ve pepdusin aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. Daha uzun olan pepdusinler (P1pal-19; P1pal-13), platelet agregasyonunda agonist aktivite sergilerken, daha kısa pepdusinler (P1pal-7; P1pal-12) antagonist aktivite göstermiştir (O'Callaghan ve ark., 2012). Ayrıca insan plateletlerinde P1pal-12'nin, PAR1-AP ile indüklenen agregasyonu inhibe ettiği, ancak PAR4-AP, U46619, ADP, kollajen veya ristosetin dahil diğer agonistler tarafından indüklenen agregasyonu inhibe etmediği gösterilmiştir (Covic, Misra ve ark., 2002).

Çalışmalar PAR1 pepdusinlerin sadece *in vitro* değil, aynı zamanda sepsis (Kaneider ve ark., 2007), akciğer kanseri (Cisowski ve ark., 2011) ve tromboz (P. Zhang, Gruber ve ark., 2012) hayvan modellerinde GPKR aktivitesinin etkili modulatorleri olduğu gösterilmiştir. Kobay ve babun arteriyel tromboz modelinde bir pepdusin olan PZ-128 ile PAR1'in inhibisyonunun; kanama üzerinde herhangi bir etki oluşturmadan PAR1 aracılı platelet agregasyonunu ve arteriyel trombozu hızlı ve etkili bir şekilde ve reversibl olarak baskıladığı görülmüştür (P. Zhang, Gruber ve ark., 2012). PZ-128'in PAR1'in üçüncü intraselüler kıvrımını taklit ederek hücre içi PAR1-G protein arayüzünü hedeflediği ve PAR1 aracılı insan platelet aktivasyonunu seçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (P. Zhang, Gruber ve ark., 2012).

Spesifiklik konusundaki endişeye rağmen (Quoyer ve ark., 2013), anti-PAR1 pepdusin PZ-128 koroner arter hastalığı olan hastalarda sınırlı bir Faz I çalışmada değerlendirilmiştir (Gurbel ve ark., 2016). Koroner arter hastalığının klinik bulguları veya risk faktörlerine sahip 31 hastaya PZ-128 uygulandığı ilk insan çalışmasında (Gurbel ve ark., 2016) PZ-128'in SFLLRN-NH₂ ile indüklenen platelet agregasyonunu doz bağımlı ve reversibl olarak inhibe ettiği saptanmıştır (Gurbel ve ark., 2016). PZ-128; klinik çalışmalarda değerlendirilen ilk pepdusin olmasına rağmen kısa yarılanma ömrüne sahip olması (1,3-1,8 saat), oral biyoyararlanımının olmaması ve sürekli infüzyon gerektirmesi nedeniyle PZ-128'in sadece hastane ortamında uygulanması önerilmiştir. Ayrıca yüksek doz PZ-128; allerjik reaksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (Gurbel ve ark., 2016). Acil olmayan perkütan koroner girişim geçiren yaklaşık 600 hastada PZ-128 için Faz II (NCT02561000) güvenlik çalışmaları planlanmaktadır.

2.7.3. Bloklayıcı Antikorlar

PAR bloke edici antikorlar ile PAR1 ve PAR4'ün insan plateletleri üzerindeki etkileri incelenmiştir (Kahn ve ark., 1999). Bu tavşan poliklonal antikorları trombinin PAR1'i böldüğü bölgeye yani trombin bağlayıcı bölgeye karşılık gelen antijenler kullanılarak üretilmiştir. Böylece bu antikorlar trombin ile yarışarak reseptör bölünmesini engellemektedir (Şekil 2.12). Yüksek konsantrasyonlarda anti-PAR1 ve anti-PAR4 antikorunun trombin ile indüklenen platelet aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kahn ve ark., 1999). Özellikle peptid yapılı olan trombin bağlayıcı bölge ile immunize edilen tavşanlardan üretilmiş IgG 9600'ün insan plateletlerinde trombin ile indüklenen agregasyonu (IC₅₀=20 µg/ml) ve sekresyonu (IC₅₀=8 µg/ml) inhibe ettiği, ADP, kollajen veya PAR1-AP ile indüklenen platelet aktivasyonuna ise etki etmediği gösterilmiştir (Cook ve ark., 1995). Bu yaklaşım trombozu inhibe etmek için trombin/PAR1 etkileşimini bozan ilk *in vivo* kanıtı sağlamıştır.

2.7.4. Küçük Moleküllü İnhibitörler

Peptidomimetik antagonistler ve bloke edici antikorlar PAR biyolojisinin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır. Ancak bu moleküllerin *in vivo* olarak önemli farmakokinetik ve

farmakodinamik sınırlamaları olması nedeniyle daha sonra küçük molekül antagonistler geliştirilmiştir. Peptid olmayan, selektif ve potensi yüksek PAR1 antagonistlerini geliştirmek için PAR aktive edici peptidlerin modifikasyonu ile rasyonel tasarımlar yapılmış ve kimyasal kütüphaneleri taranmıştır. Böylece SCH79797 (Ahn ve ark., 1999), FR171113 (Kato ve ark., 1999), F16618 (Perez ve ark., 2009), E5555 (atopaksar) (M Kogushi ve ark., 2003), SCH530348 (vorapaksar) (S. Chackalamannil ve ark., 2008) ve parmodulinler (Dockendorff ve ark., 2012) dahil olmak üzere birçok küçük molekülle antagonist elde edilmiştir (Tablo 2). FR171113 en eski küçük molekülle PAR1 antagonistlerinden birisidir (Kato ve ark., 1999). FR171113; insan plateletlerinin PAR1-AP ve trombin ile indüklenen agregasyonu sırasıyla 0,15 μ M ve 0,29 μ M IC50 değerleriyle inhibe etmektedir. FR171113'ün, trombinin proteolitik aktivitesini doğrudan inhibe ettiği de gösterilmiştir (Kato ve ark., 1999). Kobaya FR171113 (0,1-3,2 mg/kg, subkutan) uygulaması koagülasyonu etkilemeden *ex vivo* platelet agregasyonunu ve *in vivo* arteriyel trombozu doz bağımlı şekilde inhibe etmiştir (Kato ve ark., 2003). İlacın trombin aktivitesi üzerindeki sınırlı etkilerinin antitrombotik etkilerine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür.

Vorapaksar ve atopaksar yüksek oral biyoyararlanım, potens ve seçicilik açısından dikkat çekici olan ve klinik araştırmaları yapılmış küçük molekülle PAR1 antagonsitlerindendir. Vorapaksar ve atopaksar PAR1'in bağlı ligand bölümüne reversibl olarak bağlanan kompetitif antagonistlerdir (Şekil 2.12). Klasik kompetitif antagonistler olarak işlev görmek için bu antagonistler endojen reseptör-bağlı ligand aktivasyon mekanizması ile yarışmaktadır (Hamilton ve Trejo, 2017). Önceden E5555 olarak bilinen atopaksar, 609 Dalton (Da) moleküler ağırlığına sahip bir bisiklik amidin türevidir. Atopaksar SFLLRN-NH₂'nin PAR1'e bağlanmasını ve platelet agregasyonunu inhibe etmiştir (M. Kogushi, Matsuoka, Kawata ve ark., 2011). Kobay tromboz modelinde *in vivo* atopaksar uygulaması antitrombotik aktivite göstermiş ve cilt kanama zamanını önemli ölçüde etkilemeden trombotik olarak damarın tıkanma süresini yaklaşık 2 kat uzatmıştır (M. Kogushi, Matsuoka, Kawata ve ark., 2011). Bir tavşan hemoraji modelinde de atopaksarın antagonist etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Kai ve ark.,

2007). Atopaksarın umut verici *in vivo* etkinliğe sahip olması nedeniyle akut koroner sendromlu (LANCELOT-ACS) ve kronik koroner arter hastalığı (LANCELOT-CAD) olan hastalarda klinik denemeleri yapılmıştır (Goto, Ogawa ve ark., 2010; O'Donoghue ve ark., 2011). Ancak faz II güvenlik çalışmalarında yüksek doz atopaksar alan hastalarda önemli hedef dışı etkilere ve yan etkilere işaret eden karaciğer enzim düzeylerinin arttığı, majör kanama olay oranının arttığı, QT aralığının uzadığı ve taşiaritmiye yol açtığı gösterilmiştir (O'Donoghue ve ark., 2011; Wiviott ve ark., 2011). Atopaksar kullanımı sonucu bu önemli yan etkilerin görülmesi sebebiyle atopaksar Faz III aşamasına geçememiştir. Resmi olarak SCH530348 olarak bilinen vorapaksar da reversibl, kompetitif, küçük moleküllü bir PAR1 antagonistidir. Vorapaksar doğal olarak oluşan alkaloid himbasinin sentetik bir trisiklik 3-fenilpiridin analogudur ve molekül ağırlığı 591 Da'dır (Şekil 2.12) (S. Chackalamannil ve ark., 2008). Fonksiyonel olarak vorapaksar; insanlarda trombin ve PAR1-AP tarafından indüklenen platelet agregasyonunu inhibe etmektedir. Atopaksar ile yapılan Faz II klinik çalışmasındaki bulguların aksine uzun süreli vorapaksar kullanımı karaciğer fonksiyonunda herhangi bir anormallik ile ilişkilendirilmemiştir (Becker ve ark., 2009; Ghosal ve ark., 2011). Vorapaksar MI veya periferik arter hastalığı olan hastalarda trombotik komplikasyonların önlenmesi için onaylanmış ilk oral PAR1 antagonistidir. Deneysel olarak kullanılan vorapaksar öncüllerinin her ikisi de belirgin seçiciliği olan güçlü PAR1 antagonistleri SCH79797 ve SCH203099'dur (Ahn ve ark., 1999; Ahn ve ark., 2000; S. Chackalamannil ve ark., 2001). SCH79797 üstün spesifitesi nedeniyle deneysel kullanım için tercih edilmiş (Ahn ve ark., 2000) ve en yaygın kullanılan deneysel PAR1 antagonistlerinden biri haline gelmiştir. Ancak bu antagonistlerin atopaksar ve vorapaksara göre düşük etkililik ve seçiciliğe sahip olduğu saptanmıştır (H. Lee ve Hamilton, 2013).

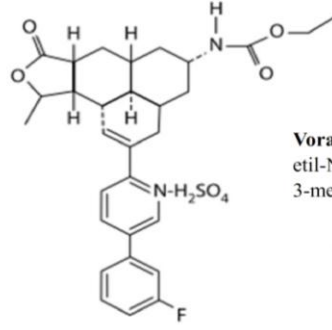
PAR1 antagonistlerinin bir başka sınıfı ise PAR1'in bias G proteini kenetlenmesini hedefleyen ve küçük moleküllü antagonist olan parmodulinlerdir (Dowal ve ark., 2011; Aisiku ve ark., 2015). Parmodulinler; pepdusinlere benzer şekilde PAR1'in hücre içi yüzüne bağlanmakta ve hücre dışı trombin bölünmesi veya ligand bağlanması

olaylarından ziyade aktive edilmiş reseptör-G protein kenetlenmesini engellemektedir (Şekil 2.12). Vorapaksar gibi ortosterik antagonistler esas olarak PAR1'e bağlandığında hem zararlı hem de sitoprotektif downstream yolları etkilemektedir. Parmodulinler (JF5 ve ML161) ise endotel hücrelerinde APC-koruyucu sinyalizasyona müdahale etmeden PAR1 aracılı platelet ve endotelial aktivasyonu bloke etmektedir (Aisiku ve ark., 2015). Burada bu tez çalışmasında da araştırma konusu olan küçük molekülü PAR1 antagonistlerinden vorapaksar ve bir parmodulin olan ML-161 daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

Vorapaksar

Küçük molekülü bir PAR1 antagonisti olan SCH530348 ileri klinik araştırmalar için seçilmiş ve vorapaksar olarak adlandırılmıştır. Schering Plough tarafından geliştirilen ve Merck tarafından satın alınan vorapaksar; kardiyovasküler olayları azaltmak için (2.08 mg, günde 1 kez) FDA ve EMA tarafından onaylanmış ilk oral PAR1 antagonistidir. MI veya periferik arter hastalığı olan hastalarda standart antiplatelet tedaviye (aspirin ve/veya klopidoğrel) eklenmekte ve kardiyovasküler olay oranını azaltmaktadır. Ancak vorapaksarın güçlü antiplatelet ilaçlara (prasugrel veya ticagrelor) ek olarak verilmesi önerilmemektedir (Tricoci ve ark., 2012; Du ve ark., 2017).

Vorapaksar doğal bir ürün olan himbasinin sentetik trisiklik 3-fenilpiridin analogudur (Şekil 2.13) (S. Chackalamannil ve ark., 2008) ve ilaç geliştirme ve klinik kullanım için kristalize tuzu şeklinde modifiye edilmiştir (Samuel Chackalamannil ve ark., 1996; Doller ve ark., 1999). Vorapaksar protein yapıda olmayan, küçük molekülü, yüksek afiniteli, oral olarak aktif, potent, kompetitif PAR1 antagonistedir ($K_i = 2,7$ nM) (Doller ve ark., 1999; S. Chackalamannil ve ark., 2008). Selektif olarak PAR1'i antagonize ederek primer homeostatik fonksiyonları etkilemeden trombin aracılı platelet aktivasyonunu inhibe etmektedir (Kosoglou ve ark., 2012). Vorapaksar; bağlı ligandın ikinci intraselüler kıvrımı ile etkileşimini keserek PAR1 aktivasyonunu kompetitif olarak inhibe etmektedir (Ahn ve ark., 1999).



Vorapaksar
etil-N-4-[(E)-2-[5-3-florofenil]piridin-2-il-etenil]-
3-metil-1-okso-dekahidro-3H-nafto[6,7]furon-7-il]karbamat

Şekil 2. 8. Vorapaksarın kimyasal yapısı.

İnsanlarda vorapaksar iyi tolere edilmektedir ve tek bir yükleme dozundan sonra 126–269 saatlik bir terminal plazma yarı ömrü ve %90’dan fazla biyoyararlanıma sahip olduğu saptanmıştır (Becker ve ark., 2009). Vorapaksar hızlı bir şekilde absorbe olmakta ve platelet agregasyonunu 2 saatte %80 oranında inhibe etmektedir (Kosoglou ve ark., 2012; Kosoglou, Reyderman ve ark., 2013). Uzun yarılanma ömrü nedeniyle vorapaksarın kararlı durum konsantrasyonuna ulaşması 21 gün ve platelet inhibe edici etkisi ise 4 aydan fazla sürmektedir. Vorapaksar sitokrom P450 CYP3A4 ve CYP2J2 ile metabolize olmaktadır (Ghosal ve ark., 2011). Bu nedenle güçlü CYP3A4 indükleyicileri (antikonvülzanlar, rifampin gibi) veya inhibitörleri (ritonavir, ketokonazol, klaritromisin gibi) ile beraber kullanımından kaçınılmalıdır (Kosoglou, Statkevich ve ark., 2013). Vorapaksar ile birlikte ketokonazol veya rifampinin üç haftadan daha fazla uygulanması sonucu ilaç maruziyetini teorik değerinin yarısı kadar sırasıyla arttığı veya azaldığı rapor edilmiştir (Committees, 2009; Morrow ve ark., 2009; Oestreich, 2009). Vorapaksarın eliminasyonu yavaştır ve başlıca feçes ve sekonder olarak renal klerens (%5’den daha az) ile olmaktadır (Ueno ve ark., 2010). Vorapaksar maruziyeti doz bağımlıdır, bireyler arası değişkenlik %20-40 arasındadır ve cinsiyet ve ırk açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Committees, 2009). Böbrek yetmezliği veya hafif-orta karaciğer bozukluğu olan hastalarda doz ayarlanmasına gerek yoktur, ilaç absorpsiyonu besinlerden etkilenmemektedir (Kosoglou, Reyderman ve ark., 2013).

Vorapaksarın 24 saat boyunca 0,1 mg/kg dozunda oral olarak uygulanması hayvan modellerinde trombin reseptör agonisti peptid (TRAP) ile indüklenen platelet agregasyonunu tamamen inhibe etmiş ve %86 biyoyararlanıma sahip olduğu gösterilmiştir (S. Chackalamannil ve ark., 2008). Plateletten zengin insan plazmasında vorapaksar; trombin ve TRAP ile indüklenen platelet agregasyonunu inhibe etmiştir (IC50 47 nM ve 25 nM). ADP, TxA₂ mimetik U46619 veya kollajen ile indüklenen agregasyonunu etkilememiştir. Ayrıca vorapaksar protrombin zamanını (PT) veya aktive parsiyel tromboplastin zamanını (aPTT) etkilememiştir ve kanama potansiyelini arttırmayacağı öne sürülmüştür (S. Chackalamannil ve ark., 2008). Vorapaksarın tek başına uygulanması veya aspirin ve klopidogrel ile kombinasyonu kanama zamanını veya cerrahi kan kaybını arttırmadığı saptanmıştır (Madhu Chintala, 2008). Vorapaksarın insan olmayan primatlarda ciddi bir kanama oluşturmaksızın trombozu önlenmede etkili olduğunu gösteren deneylerin ardından (M. Chintala ve ark., 2010), akut iskemik olayların sekonder önlenmesi için vorapaksar klinik aşamaya geçmiştir.

Faz I Çalışmaları

Vorapaksar ile yapılan ilk faz I çalışma tek doz oral 5-40 mg vorapaksar alan 50 sağlıklı gönüllüde yürütülmüştür (Kosoglou ve ark., 2009). Tüm katılımcılarda TRAP ile indüklenen platelet agregasyonunda 72 saatten fazla süreyle ortalama %90'dan fazla inhibisyon meydana gelmiştir. Plazma konsantrasyonu açısından bireyler arası değişenliğin az olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada vorapaksar hızlı absorpsiyon ve yavaş eliminasyon ile karakterize edilmiştir. Diğer bir faz I çalışmada sağlıklı Kafkas ve Japon gönüllülerde 40 mg tek doz vorapaksarın güvenli olduğu ve iyi tolere edildiği gösterilmiştir (Kosoglou ve ark., 2008; Reyderman ve ark., 2009). TRAP ile indüklenen platelet agregasyonu her iki popülasyonda da %80 veya daha fazla inhibe olmuştur. Başka faz I çalışmada vorapaksarın dozlama rejimi 28 günlük tedavi periyodu boyunca 40 mg yükleme dozunu takiben günde bir kez 2,5 mg idame dozu şeklinde belirlenmiştir (Kosoglou, 2008). Sağlıklı gönüllülerde yapılan ilk klinik çalışmalar ilacın iyi tolere edildiğini ve uzun süreli PAR1 inhibisyonu sağladığını göstermiştir. Preklinik ve ilk

klirik çalışmalarda vorapaksarın kanamayı önemli oranda arttırmadığı ve koagülasyon üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir.

Faz II alışmaları

Vorapaksarın güvenlilik profili çok merkezli, büyük, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir klinik alışma [Perkten koroner girişimde kardiyovasküler olayların azaltılması için trombin reseptör antagonisti (TRA-PCI)] ile değerlendirilmiştir. 76 merkezden 1030 hastanın dahil edildiği bu çalışmada acil olmayan perkütan koroner girişim (PCI) yapılan hastalara 60 gün boyunca standart oral antiplatelet tedavi (aspirin ve klopidogrel) ve antitrombotik ilaç (heparin veya bivalirudin) ile vorapaksar kombinasyonu uygulanmıştır (Becker ve ark., 2009). Standart antitrombotik tedaviye ek olarak plasebo veya vorapaksar 3:1 olacak şekilde randomize edilmiştir. Hastalar anjiografiden önce 3 yükleme dozundan (10, 20 veya 40 mg) birini almış ve PCI yapılmış hastaların %56'sı 2 ay boyunca 3 dozdan (0,5/1,0/2,0 mg günlük) biri ile idame tedavi almıştır. Primer sonlanım noktası major veya minör kanama insidansı olarak belirlenmiş ve vorapaksar ve plasebo grubu arasında primer sonlanım noktası açısından farklılık görülmemiştir. TRAP ile indüklenen platelet agregasyonunun doz bağımlı olarak vorapaksar ile inhibe olduğu da gösterilmiştir. Vorapaksar 40 mg yükleme dozu ile en erken yarım saatte ve hastaların yaklaşık %30'unda TRAP ile indüklenen platelet agregasyonunu inhibe etmiştir. Bu etki idame doz ile 60 günden fazla devam etmiştir (Jennings ve ark., 2007). Vorapaksar iyi tolere edilmiş ve mevcut antiplatelet ilaçlar olan aspirin ve/veya klopidogrel ile kombinasyon halinde uygulandığında bile majör kanama olaylarında artışa neden olmamıştır. Bu sonuçlar Japon hastalarda yapılmış 2 kk randomize çalışma ile doğrulanmıştır. Bunlardan biri PCI geçirmiş ST elevasyonu olmayan akut koroner sendromlu (NSTEMI-ACS) hastalarda yürütülmüş (n=117) (Goto, Yamaguchi ve ark., 2010), diğerisi ise iskemik inme geçirmiş hastalarda yapılmıştır (n=90) (Shinohara, 2008). Her 2 çalışmada da vorapaksarın iyi bir güvenlik profili olduğu gösterilmiştir ve farklı vorapaksar dozları major ve minör kanamayı arttırmamıştır (20 veya 40 mg yükleme dozunu takiben NSTEMI-ACS hastalarında günlük 1 veya 2,5 mg idame dozu ve iskemik inme hastalarında ise günlük 1 veya 2,5 mg idame

dozu). Bu sonuçlar çok merkezli, randomize, çift kör, plasebo kontrollü faz 3 çalışma tasarlanmasını sağlamıştır.

Faz III Çalışmaları

Sağlıklı bireyler (Kosoglou ve ark., 2012) ve PCI uygulanan hastalarda (Becker ve ark., 2009) yürütülmüş randomize, plasebo kontrollü çalışmalarda vorapaksarın güvenli ve iyi tolere edildiği ve klinik olarak anlamlı bir kanamaya yol açmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ve MI'da azalma eğilimi göz önüne alındığında iki önemli Faz III klinik çalışma başlatılmıştır. Bu çalışmalar akut koroner sendromda klinik olayların azaltılması için trombin reseptör antagonisti (TRACER) (Committees, 2009) ve aterotrombotik iskemik olayların ikincil önlenmesinde trombin reseptör antagonisti (TRA 2°P-TIMI 5050) (Morrow ve ark., 2009) çalışmalarıdır.

TRACER çalışmasında standart antiplatelet tedavi alan ST elevasyonu olmayan miyokard infarktüsü (NSTE-MI) olan 12944 hasta vorapaksar (40 mg yükleme dozunun takiben günlük 2,08 mg) veya plasebo alacak şekilde randomize edilmiştir (Tricoci ve ark., 2012). Primer sonlanım noktası kardiyovasküler nedenlerden ölüm, MI, inme, tekrarlayan iskemi ile hastaneye yatış veya acil koroner revaskülarizasyon olarak belirlenmiştir. Standart tedaviye vorapaksar eklenmesine karşın primer sonlanım noktasında anlamlı azalma olmamıştır, plasebo ile karşılaştırıldığında vorapaksar kardiyovasküler nedenlerden ölüm, MI veya inmede azalma sağlamamıştır (Tricoci ve ark., 2012). Diğer yandan plasebo ile karşılaştırıldığında vorapaksarın yanına aspirin ve bir P2Y₁₂ inhibitörünün eklenmesi anlamlı olarak kanama riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (%7,2 vorapaksar ve %5,2 plasebo, $p=0,001$) (Tricoci ve ark., 2012). Vorapaksar tedavisi alan hastalarda intrakraniyal kanama 5 kat artmıştır (%1,1-%0,2, $p=0,001$). Veri ve Güvenlik İzleme Kurulu vorapaksarın 2 yıl sonra yararlı bir etki göstermeden intrakraniyal kanamayı 3,4 kat artırmış olması nedeniyle bu araştırmayı durdurmuştur.

TRA 2°P-TIMI 5050 çalışmasında ise aterosklerotik hastalığı olan bireylerde uzun süreli vorapaksar tedavisinin etkililiği ve güvenliliği değerlendirilmiştir (Morrow ve ark., 2009). Bu çalışmada koroner, serebral veya periferel damar sistemlerinde ateroskleroz geçmişi/kanıtı olan 26449 hasta standart tedaviye ek olarak günlük 2,5 mg idame dozda vorapaksar veya plasebo alacak şekilde randomize edilmiştir (Morrow ve ark., 2009). Bir yıllık takip boyunca primer sonlanım noktası kardiyovasküler ölüm, MI, inme ve acil koroner revaskülarizasyon olarak belirlenmiştir. Güvenlik sonlanım noktası olarak kanama değerlendirilmiştir. Klasik tedavi kolunda gözlemlenen %12,4'lük kardiyak ölüm oranının vorapaksar kolunda %11,2'e düştüğü gösterilmiştir ancak intrakraniyal kanamada iki kat artış gözlemlenmiştir (Morrow ve ark., 2012).

TRA 2°P-TIMI 5050 çalışmasında dayanarak vorapaksar; geçici iskemik atak ya da inme öyküsü olan hastalar hariç tutularak, MI ya da koroner arter hastalığı geçmişi olan hastalarda trombotik olayların sekonder önlenmesi için standart antiplatelet tedaviye ek olarak FDA tarafından 2014 yılında onaylanmıştır. Ancak vorapaksarın diğer antiplatelet ilaçlarla birlikte uygulanmasının kanama olaylarını arttırabileceği öne sürülmüştür (Tricoci ve ark., 2012). Ayrıca daha yeni bir çalışmada standart antiplatelet tedavi ile karşılaştırıldığında tek başına vorapaksar kullanımı daha yüksek oranda kanama riski ile ilişkilendirilmiştir (Du ve ark., 2017). Beş randomize kontrollü çalışmanın dahil edildiği ve toplam 40630 hastanın yer aldığı bir meta analizde ise ateroskleroz hastalarında standart tedaviye vorapaksar eklenmesi MI ve iskemik inmede anlamlı olmayan bir azalmaya ve intrakraniyal kanama riskinde anlamlı olmayan bir artışa yol açmıştır (Sharma ve ark., 2017). Bu çalışmalarda kanamanın spesifik nedeni bilinmemektedir. Bununla birlikte bu çalışmalarda vorapaksar en çok klopidogrel ve aspirin içeren standart antiplatelet tedaviye eklenmiştir. PAR antagonistlerinin mevcut diğer antiplatelet ilaçlar ile etkileşimi hakkında çok az şey bilinmektedir.

TRACER ve TRA 2°P-TIMI 5050 çalışmaları kardiyovasküler hastalığı olan belirli hasta popülasyonlarında vorapaksarı değerlendirmek için bir alt grup analizi yapılmıştır. Periferik vasküler hastalığı olan hastalarda vorapaksar akut ekstremit

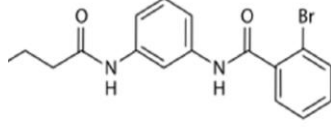
iskemisi (vorapaksar ile %2,3; plasebo ile %3,9; $p=0,006$) ve periferik arter revaskülarizasyonunda (vorapaksar ile %18,4; plasebo ile %22,2; $p=0,017$) azalma ile hastaneye yatış oranını azaltmıştır. Ancak vorapaksar alan hastalarda kanama daha sık gözlemlenmiştir (vorapaksar ile %7,4; plasebo ile %4,5; $p=0,001$) (Bonaca ve ark., 2013). TRA 2°P-TIMI 5050 çalışmasına katılan diyabet hastalarında vorapaksarın primer sonlanım noktası (kardiyovasküler ölüm, MI veya serebrovasküler olay) açısından ek fayda sağladığı gösterilmiştir (vorapaksar ile %12,6; plasebo ile %15,7; $p=0,004$). Ancak kontrol grubuna kıyasla vorapaksar alan diyabet hastalarında kanama 1,59 kat artmıştır ($p=0,02$) (Cavender ve ark., 2015). Vorapaksar; plaseboyla karşılaştırıldığında iskemiye önemli ölçüde azaltmıştır ($p=0,005$). Vorapaksar alan ve koroner arter bypass grefti uygulanan hastalarda kanamada anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir (Whellan ve ark., 2014).

Parmodulinler

PAR1'in hedeflenmesinde yan etkileri önlemek için yeni yaklaşımlar PAR1'in sitoplazmik yüzünü hedefleyen pepdusinler (P. Zhang, Gruber ve ark., 2012) ve parmodulinler (Dockendorff ve ark., 2012) olmak üzere allosterik PAR1 antagonistinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu durum ilk önce pepdusinler adlı reseptör dizisine dayanan lipidlenmiş peptidler kullanılarak açıklanmış (O'Callaghan ve ark., 2012) ve allosterik modülasyon ile downstream sinyal yollarının selektif olarak kontrol edileceği gösterilmiştir. Daha sonra PAR1'in sitozolik tarafında etki eden ve parmodulinler olarak adlandırılan yeni bir PAR1 modülatör sınıf tanımlanmıştır (Dockendorff ve ark., 2012). Pepdusin ve parmodulinler ile allosterik modülasyon downstream sinyal yollarının selektif kontrolünü mümkün kılmaktadır.

İlk çalışmalarda plateletten granül sekresyonunun inhibisyonu için yaklaşık 300000 küçük molekül içeren bir kütüphane taranmış ve 1,3-diaminobenzen çekirdeği olan bileşiklerin PAR1 aracılı plateletten granül sekresyonunu selektif olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Parmodulinlerin öncü bileşiği olan ML161'in modifikasyonu (Şekil 2.14) ile ayrıntılı bir yapı-aktivite ilişkisi gösterilmiştir. Parmodulinlerin PAR1'e

bağlanması PAR1 gizli ligandının bağlanma afinitesini değiştirmediği için reseptörün genel şeklini değiştirmemiştir (Aisiku ve ark., 2015).



ML161

2-bromo-N{3-[(1-oksobutil)amino]fenil}benzamid

şekil 2. 9. Parmodulin-2 (ML161)'nin kimyasal yapısı.

Aisiku ve arkadaşları tarafından tanımlanan parmodylin bileşikleri PAR1'in birden fazla G-proteini ve β -arrestin aracılığıyla sinyal verme yeteneğinden yararlanmaktadır. Bu farklı yolaklar aracılığıyla sinyalleme bias agonizma olarak adlandırılmaktadır. Bۆylece reseptörler bias agonistler tarafından ya da allosterik modölatörler vasıtasıyla farklı yolaklar aracılığıyla sinyali yönlendirebilmektedir. Parmodylin-2 (ML161)'nin insan plateletlerinde $G\alpha_{12/13}$ aracılı PAR1 sinyalinden ziyade tercihen $G\alpha_q$ sinyalini bloke ederek bias PAR1 sinyallesini arttırdığı öne sürölmüştür (Aisiku ve ark., 2015). Vorapaksar gibi ortosterik antagonistler ise PAR1'e bağlandığında hem zararlı hem de sitoprotektif downstream yolakları tümünü bloke etmektedir. Parmodylinlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak etkili olduğu saptanmıştır. Reseptör-G protein kenetlenmesinin bu şekilde ayırt edici inhibisyonunun önemli bir avantajı baskın olarak $G\alpha_q$ 'nın aracılık ettiği PAR1'in protrombotik ve proinflamatuvar etkilerini selektif olarak modöle etmek için bir potansiyele sahip olmasıdır. Parmodylinlerin APC aracılı PAR1'in koruyucu sinyal yolaklarını bloke etmeden veya endotel hasarını indöklemeden protrombotik PAR1 sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir (Aisiku ve ark., 2015). Bu gözlemler vorapaksar gibi ortosterik PAR1 antagonistlerin tüm PAR1 aracılı sinyal yolaklarını ayırım gözetmeden inhibe etmesi ile meydana gelen etkilerin tam tersidir. Bu bulgular PAR1 aracılı patolojik hücre sinyal yolaklarını bloke eden fonksiyonel olarak seçici reseptör antagonizması umudunu arttırmaktadır.

Parmodylin 1 (aka JF5) ve 2 (aka ML161); endotel hücrelerinde APC-koruyucu sinyalizasyona müdahale etmeden PAR1 aracılı platelet ve endotelial aktivasyonu bloke

etmektedir (Aisiku ve ark., 2015). Parmodulinler *in vivo* olarak kanamayı uzatmaksızın tromboz oluşumunu engellemiştir (Aisiku ve ark., 2015). Eş zamanlı olarak patolojik sinyallemeyi bloke eden ve koruyucu sinyallemeyi aktive eden bu bileşikler kompleks inflamatuvar bozuklukların tedavisinde bir strateji sağlayabilir.

Platelet üzerindeki etkileri fare lazer hasarı tromboz modeli ve kuyruk klipsi deneyiyle *in vivo* olarak test edilmiştir. *In vivo* çalışmalardaki karışık olan durum fare plateletlerinin farklı bir PAR çeşitliliğine sahip olması ve PAR1'i eksprese etmemesi ve fare plateletlerinde primer sinyalleme reseptörünün PAR4 olmasıdır. İnsan PAR4'ün aksine fare PAR4'ü parmodulinlerin fare plateletlerinde fonksiyon görmesine izin veren PAR1'e benzer özelliklere sahiptir (Dowal ve ark., 2011; Aisiku ve ark., 2015). Ancak PAR1 inhibisyonunun endotel hücreleri üzerindeki global etkileri ayrıntılı olarak anlaşılamamıştır.

ML161 ayrıca fare miyokardiyal I/R hasarı modelinde kardiyak infarkt boyutunu önemli ölçüde azaltmıştır (Nazir ve ark., 2017). ML161'in doz bağımlı bir şekilde TFLRN-NH₂'nin etkinliğini azalttığı bulunmuştur, PAR1'in negatif allosterik inhibisyonu ile tutarlı bir şekilde reversibl olduğu gösterilmiştir (Gandhi ve ark., 2018). Bu tür bileşikler özellikle sepsis veya I/R hasarı gibi inflamasyonla ilişkili hastalıkların terapötik modülasyonu için önemli bir potansiyele sahiptir. Gelecekteki çalışmalarda PAR1'deki parmodulinlerin bias sinyalizasyonunu ölçmek ve sitoprotektif etkilerini optimize etmek amaçlanmaktadır.

TRACER veya TRA-2^oP-TIMI 5050 çalışmasında kullanılan dozlama protokolleriyle ulaşılan plazma vorapaksar seviyelerine (Kosoglou ve ark., 2012) yaklaşık konsantrasyonlarda vorapaksar ile hücre kültüründe endotel hasarı görülmüştür (Aisiku ve ark., 2015). PAR1'in knockdown edilmesi endotel hücrelerinin vorapaksar ile indüklenen apoptoza duyarlılığı arttırması yapısal PAR1 sinyalizasyonunun endotel hücre canlılığı için gerekli olduğunu düşündürmüştür (Aisiku ve ark., 2015). PAR1 knockout farelerde gelişme boyunca bozulmuş endotel gelişimi ve vasküler oluşum gözlemlenmiştir (C. T. Griffin ve ark., 2001). Bu nedenle PAR1 endotel hücresi

yaşayabilirliğinde önemli bir faktördür. PAR1 eksikliği yaygın kanamayla ilişkili olarak %50 embriyonik ölüm ile sonuçlanmıştır (C. T. Griffin ve ark., 2001). Parmodulinler ise *in vivo* olarak kanamayı uzatmaksızın tromboz oluşumunu engellemiştir (Aisiku ve ark., 2015).

Sonuç olarak parmodulin 2 ve vorapaksar endotel hücrelerinde proinflamatuvar sinyal yollarını bloke etmiştir. Parmodulin 2; APC aracılı sitoproteksiyonu korumasına rağmen vorapaksar bu yolağı da bloke etmiştir. Buna ek olarak vorapaksar inkübasyonuna uzun süre maruz kalınması endotel hasarını indüklemiştir (Aisiku ve ark., 2015). Bu çalışmalar sitozolik yüzeyi hedefleyen fonksiyonel olarak selektif bileşiklerin fonksiyonel bias sinyali olan GPKR'ler için ortosterik antagonistlere önemli bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada koroner arter bypass cerrahisi sırasında elde edilen sol internal mammarian arter (LIMA) örnekleri kullanılmıştır. Bu araştırma projesi için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuru yapılmış ve etik kurul onay belgesi alınmıştır (Ek 1).

3.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasallar ve Krebs Solüsyonu

Deneyleerde kullanılan ML-161, apamin, karibdotoksin, L-NAME Cayman Chemical firmasından; TFLLR-NH₂, heksadimetrim bromid, baryum klorid dihidrat, D-(+)-Glukoz, L-Arginin monohidroklorid, sodyum nitroprusid dihidrat (SNP), 1H-[1,2,4]oksadiazol[4,3-a]kinoksalin-1-on (ODQ) Sigma firmasından; asetilkolin klorid (ACh), indometazin, fenilefrin hidroklorid (Phe) TCI America firmasından; vorapaksar ADQ firmasından ve kalsiyum klorid dihidrat, magnezyum sülfat, potasyum klorid, potasyum fosfat, sodyum bikarbonat, sodyum klorid Merck firmasından; etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ise Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir.

Glukoz, kalsiyum klorid dihidrat, magnezyum sülfat, potasyum klorid, potasyum fosfat, sodyum bikarbonat ve sodyum klorid distile suda çözülerek Krebs solüsyonunun [(mM): Distile su içinde NaCl (118,4), KCl (4,7), MgSO₄ H₂O (1,2), KH₂PO₄ 2H₂O (1,2), NaHCO₃ (25), CaCl₂ (2,5) ve glikoz (11,1)] hazırlanmasında kullanılmıştır. İndometazin ve ODQ etanolde çözülmüştür. PAR1 antagonisti olan ML161 ve vorapaksar; dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılarak çözülmüştür. Diğer kimyasal maddeleri çözmek için Krebs solüsyonu kullanılmıştır. Kimyasalların istenen konsantrasyonları Krebs solüsyonu ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Verilen konsantrasyonlar kimyasalların organ banyosu solüsyonundaki molar konsantrasyonları olarak ifade edilmiştir.

3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarı altyapısında bulunan izole organ banyosu (MAY, IOBS 99, Commat Ltd., Ankara), bilgisayar tabanlı bir veri toplama sistemi (MP-35, Commat Ltd., Ankara), izometrik transdüser (FDT10, Commat Ltd., Ankara), su banyosu sirkülatörü (WBC3044, Commat Ltd., Ankara) ve hassas terazi (Shimadzu Corporation, Japan) kullanılarak deneyler yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. İzole organ banyosu sistemi.

A) Su banyosu sirkülatörü. B) 4 banyo içeren organ banyosu C) %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz karışımı içeren tüp.

TEM görüntülemesi deneyleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskop Görüntü Analiz Ünitesi'nde bulunan ZEİSS-LEO 906E model TEM ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

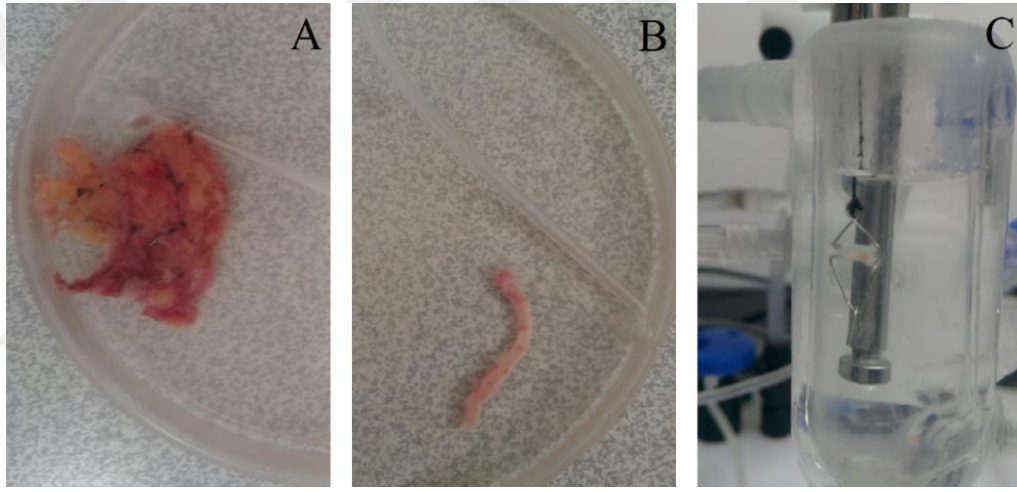


Şekil 3. 2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM).

3.3. İzole Organ Banyosu Deneyleri

3.3.1. İnsan Sol İnternal Mammarian Arter Halkalarının Hazırlanması

Damar örnekleri %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz karışımı ile tamponlanmış 4°C'deki taze Krebs solüsyonuna koyularak hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Damara zarar vermeden damarın etrafındaki bağ dokusu temizlendikten sonra damarlar 3-4 mm uzunluğunda halkalar halinde kesilmiştir. Halkalar damar lümeni zedelenmeden dikkatlice iki paslanmaz çelik klipsten geçirilerek 10 ml'lik organ banyolarına asılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. İnsan LIMA dokusunun hazırlanışı.

A) Etrafındaki bağ ve kas doku temizlenmemiş haldeki LIMA görüntüsü. B) Temizlenmiş haldeki LIMA görüntüsü. C) 2 klipsten geçirilerek organ banyosuna asılmış LIMA halkasının görüntüsü.

Deney süresince banyolarda bulunan Krebs solüsyonunun sıcaklığı 37°C'de sabit tutulmuş, pH'sının 7,4 olması için %95 O₂ ve %5 CO₂ karışım gazı ile gazlandırılmıştır. Damar halkaları organ banyosuna asıldıktan sonra 60 dakika boyunca dinlendirilmiştir. Her 15 dakikada bir banyolardaki Krebs solüsyonu yenilenmiştir. Damar yanıtları bilgisayar tabanlı bir veri toplama sistemine (MP-35, Commat Ltd., Ankara) bağlı izometrik transdüserler (FDT10, Commat Ltd., Ankara) aracılığı ile kaydedilmiştir.

3.3.2. Submaksimal Gerilimin Belirlenmesi

İnsan LIMA halkasının submaksimal gerilimini saptamak için çeşitli gerilimler (1,50/1,75/2,00/2,25 ve 2,5 gram) altında 50 mM KCl solüsyonu ile kasılma yanıtları alınmıştır. Maksimum kasılmanın görüldüğü gerilimin bir altındaki gerilim submaksimal olarak belirlenmiştir. Devam eden deneylerde halkalar tespit edilen bu gerilim altında 60 dakika boyunca dinlendirilmiştir.

3.3.3. PAR1 Agonisti Olan TFLLR-NH₂'nin Vasküler Tonus Üzerindeki Etkisi

Dokuların endotel fonksiyonunu tespit etmek için tek doz Phe (10^{-6} M) ile kasılma yanıtı aldıktan sonra kümülatif olarak ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) uygulanmıştır. Ardından tek doz SNP (10^{-6} M) ile gevşeme yanıtı alınmıştır. ACh ile elde edilen gevşeme yanıtı SNP ile elde edilen toplam gevşemenin yüzdesi olarak hesaplanmıştır. %60'ın üzerindeki değerlere sahip dokuların endotel tabakası sağlam olarak kabul edilmiştir. %60'tan daha az gevşeme yanıtı elde edilen damarların içinden pamuk geçirilmiş ve bu damarlar endotel tabakası hasarlı damarlar olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Ardından endotel tabakası sağlam ve hasarlı LIMA halkalarında 10^{-6} M Phe ile kasılma yanıtı oluşturulmuştur. Kasılma yanıtı platoya ulaşınca dokulara kümülatif olarak TFLLR-NH₂ (10^{-11} - 10^{-6} M) uygulanmıştır. Ardından 10^{-6} M SNP ile dokuların gevşeme yanıtı alınmıştır. TFLLR-NH₂ ile elde edilen gevşeme yanıtı SNP ile elde edilen toplam gevşeme yanıtının yüzdesi olarak verilmiştir. Endotel tabakası sağlam ve hasarlı damarlarda TFLLR-NH₂ ile elde edilen yanıtlar karşılaştırılmıştır.

3.3.4. PAR1 Antagonisti Olan Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkileri

Endotel tabakasının sağlam olduğu tespit edilen damarlar kontrol grubu olarak belirlenmiştir. 45 dakika boyunca dinlendirilen dokulara 30 dakika boyunca vorapaksar/ML161 (10^{-6} M) ile inkübasyon yapılmıştır. Ardından Phe (10^{-6} M) kasılması sonrası kümülatif ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) ile gevşeme yanıtı alınmıştır ve kontrol deneyleri ile karşılaştırılmıştır. Vorapaksar ve ML161'in hazırlanmasında çözücü olarak

kullanılan DMSO'nun deney sonuçlarına etki etmemesi için banyodaki DMSO'nun yüzdesi %0,1'den fazla olmayacak şekilde ayarlanmıştır.

3.3.5. Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkilerinin Altında Yatan Mekanizmalar

PAR1 antagonistleri ile meydana gelen endotel hasarının mekanizmasını araştırmak için PAR1 antagonistleri ile inkübasyon yapılırken ortama endotel bağımlı gevşeme yanıtını inhibe eden moleküller de eklenmiştir. İlk olarak vorapaksar/ML161'in NO aracılı gevşeme yanıtları üzerindeki etkisini belirlemek için selektif olmayan NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) varlığında ilaçlar 30 dakika boyunca organ banyosunda inkübe edilmiştir. Ayrıca NO substratı olan L-arginin (10^{-5} M) varlığında da ilaçlar 30 dakika inkübe edilmiştir. Diğer yolları değerlendirmek için ayrıca guanilaz siklaz inhibitörü ODQ (10^{-5} M) varlığında ilaçlar 30 dakika inkübe edilmiştir. Tek doz Phe (10^{-6} M) kasılması sonrası kümülatif ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) yanıtları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar tek başına ilaç uygulaması ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Vorapaksar/ML161'in PG aracılı gevşeme yanıtları üzerindeki etkisini belirlemek için PG sentezinde görev alan COX inhibitörü olan indometazin (10^{-5} M) varlığında ilaçlar 30 dakika boyunca organ banyosunda inkübe edilmiştir. Ardından tek doz Phe (10^{-6} M) kasılması sonrası kümülatif ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) yanıtı alınmıştır. Sonuçlar tek başına ilaç uygulaması ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Son olarak vorapaksar/ML161'in endotel bağımlı hiperpolarizan faktör (EDHF) aracılı gevşeme yanıtları üzerindeki etkisini belirlemek için büyük kondüktanslı kalsiyumla aktive olan potasyum (BKCa) kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M) ve küçük kondüktanslı kalsiyumla aktive olan potasyum (SKCa) kanal blokörü apamin (10^{-7} M) varlığında 30 dakika boyunca organ banyosunda vorapaksar/ML161 inkübasyonu yapılmıştır. Daha sonra tek doz Phe (10^{-6} M) kasılması sonrası kümülatif ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) yanıtı elde edilmiştir. Sonuçlar tek başına ilaç uygulaması ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

3.3.6. Vorapaksar/Parmodulin-2 ile Yapılan Farklı İnkübasyon Sürelerinin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkileri

LIMA halkaları 30, 60, 90 ve 120 dakika boyunca organ banyosunda vorapaksar/ML161 ile inkübe edilmiştir. Her bir inkübasyon süresi sonunda tek doz Phe (10^{-6} M) ile kasılma yanıtı alınmıştır. Kasılma yanıtı platoya ulaştıktan sonra kümülatif ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) ile gevşeme yanıtı alınmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

3.3.7. Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Bağımsız Gevşeme Yanıtı Üzerindeki Etkileri

Kontrol deneyi olarak tek doz Phe (10^{-6} M) kasılması sonrası kümülatif SNP (10^{-11} - 10^{-6} M) ile gevşeme yanıtı elde edilmiştir. Ardından vorapaksar/ML161 ile 30 dakika boyunca inkübasyon yapılmış ve Phe (10^{-6} M) ardından kümülatif SNP (10^{-11} - 10^{-6} M) yanıtı alınmıştır. Kontrol grubu ve ilaç grubundan elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri karşılaştırılmıştır.

3.3.8. Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Ligand ve Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları Üzerindeki Etkileri

Kalsiyum kanallarının rolünü araştırmak için EDTA (0,4 mM) içeren kalsiyum klorür içermeyen Krebs solüsyonu hazırlanmıştır. LIMA halkaları 45 dakika boyunca bu EDTA'lı kalsiyumsuz Krebs solüsyonunda dinlendirilmiştir. Kontrol deneyi için organ banyolarına kalsiyumsuz Krebs ile hazırlanan 50 mM KCl eklenmiştir. Daha sonra CaCl_2 veya BaCl_2 (0,8 mM x 5 kez) ilave edilerek konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edilmiştir.

Vorapaksar/ML161'in ligand ve voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları üzerindeki etkisini araştırmak için ilaç inkübasyonu sonrası CaCl_2 (0,8 mM x 5 kez) yanıtı alınmıştır. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Vorapaksar/ML161'in sadece voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları üzerindeki etkisini araştırmak için ilaç inkübasyonu sonrası BaCl_2 (0,8 mM x 5 kez) ile elde edilen yanıtlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

3.3.9. Vorapaksar/Parmodulin-2'nin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Etkilerinde Protein C'nin Rolü

Aktive protein C temin edilemediği için ProC Global kitinde (Siemens) bulunan protein C aktivatörü kullanılmıştır. Bu kitte protein C aktivatörü heksadimetrim bromür ile beraber bulunduğu için taşıyıcı olarak heksadimetrim bromür grubu eklenmiştir. İlk olarak protein C aktivatörü varlığında vorapaksar/ML161 ile organ banyosunda 30 dakika inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra tek doz Phe (10^{-6} M) kasılması sonrası kümülatif ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) yanıtı elde edilmiştir. Ayrıca taşıyıcı deneyinde PAR1 antagonisti vorapaksar/ML161 ve heksadimetrim bromür 30 dakika boyunca organ banyosunda inkübe edilmiştir. Ardından tek doz Phe (10^{-6} M) kasılması sonrası kümülatif ACh (10^{-11} - 10^{-6} M) yanıtı elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

3.4. Transmisyon Elektron Mikroskobu Deneyle

PAR1 antagonisti vorapaksar ve parmodulin-2'nin endotel hasarı üzerine etkileri transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri ile değerlendirilmiştir. Bunun için PAR1 antagonistleri ile 30, 60, 90 ve 120 dakika boyunca inkübasyon yapılan çalışmalarda Phe-ACh doz-yanıt eğrileri alınarak endotel yanıtlarının bozulduğu görülen süre tespit edilmiş ve inkübasyon süresi ayarlanmıştır. Ayrıca protein C aktivatörü inkübasyonun endotel hasarını engelleyici etkisi olup olmadığı TEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda LIMA halkaları %4'lük glutaraldehit çözeltisinde (0,1 M Sorensen's fosfat tampon (SFT) solüsyonunda (pH=7,3) hazırlanmış) +4°C de 2 saat boyunca bekletilip fiksasyon işlemi yapılmıştır. Ardından halkalar %6,5'lük sakkaroz çözeltisinde (0,1 M SFT ile hazırlanmış) oda sıcaklığında 3 kez 10 dakika boyunca rotatorda döndürülerek yıkanmıştır. Her yıkamada solüsyon değiştirilmiştir. Daha sonra dokular osmiyum tetraoksit fiksatifi (0,1 M SFT'de hazırlanmış) ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında rotatorda döndürülmüştür. Ardından LIMA halkaları %6,5'lük sükröz çözeltisine (0,1 M SFT ile hazırlanmış) alınmış ve oda sıcaklığında rotatorda 3 kez 10 dakika döndürülerek yıkanmıştır. Son yıkamada şişeler değiştirilmiştir.

Dehidratasyon işlemleri için +4°C’de sırasıyla %30’luk, %50’lik ve %70’lik etanol çözeltileri ile 3 kez 10’ar dakika boyunca bekletilmiştir. +4°C 1 saat boyunca %1’lik üranil asetat solüsyonu (%75’lik etanol ile hazırlanmış) ile blok boyama uygulanmıştır (kontraslama). Ardından tekrar dehidratasyon işlemi için sırasıyla %80’lik, %90’lık, %96’lık ve %100’lük etanol çözeltileri içinde 3’er kez 10 dakika boyunca bekletilmiştir.

Doku örnekleri propilen oksit çözeltilerinde 2 kez 10 dakika bekletilmiştir. Ardından araldit-propilen oksit karışımında (1:1) 1 gece boyunca oda sıcaklığında rotatorda döndürülmüştür. Doku örnekleri kürdan yardımı ile şişeden çıkarılıp, süzgeç kağıdı üzerinde yuvarlanarak fazla çözeltilerden uzaklaştırılmıştır. Ardından LIMA örnekleri 1.Araldit karışımına [Araldit ana karışımı (50 ml) + hızlandırıcı (BDMA-DY-062)(1 ml)] gömülmüştür. 1.Araldit karışımındaki dokular oda sıcaklığında 4 saat boyunca rotatorda döndürülüp ve +60°C’de 48 saat bekletilerek gömülme işlemi yapılmıştır. Etüvden çıkarılan bloklardan önce yarı ince ardından da ince kesitler (50-70 nm) alınmıştır. ZEİSS-LEO 906E model TEM kullanılarak görüntüleme yapılmıştır.

3.5. Veri Analizi ve İstatistik

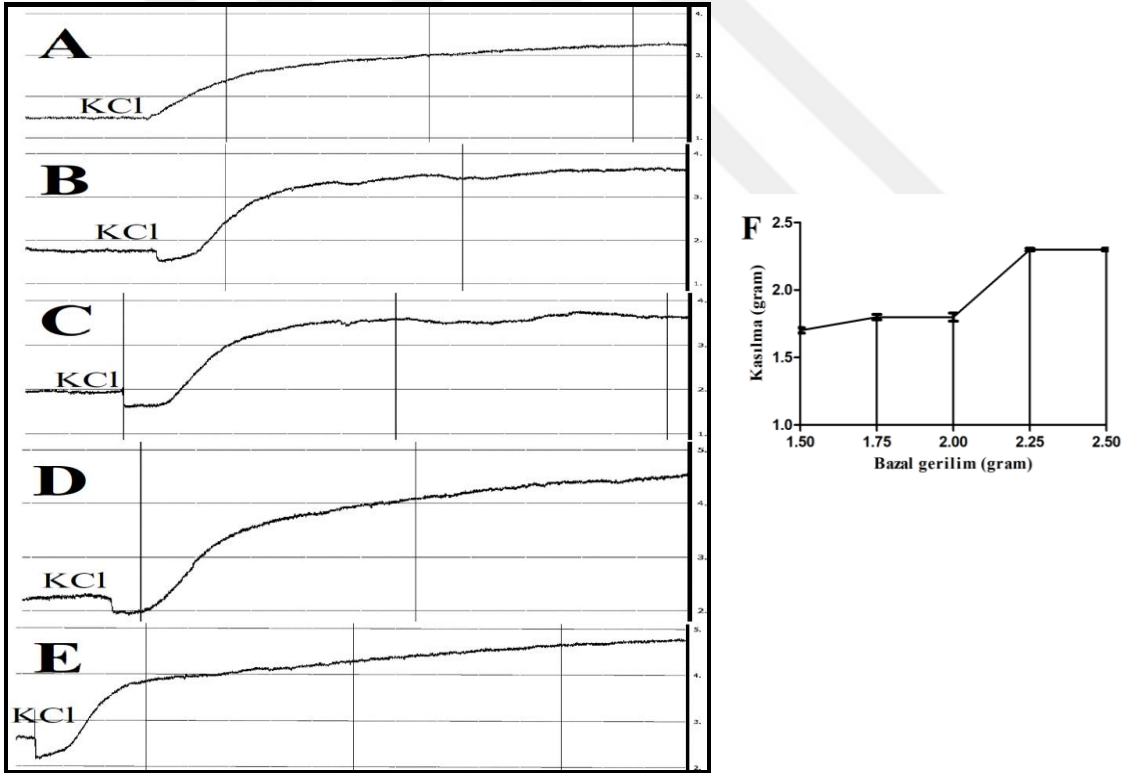
Tüm değerler ortalama \pm SH olarak verilmiştir. ACh ile elde edilen gevşeme yanıtları SNP ile elde edilen toplam gevşeme yanıtına göre % gevşeme olarak ifade edilmiştir. Maksimum yanıtın (Emax) %50’sini oluşturan agonist konsantrasyonu EC50 olarak belirlenmiştir. Potens ise; pD2 (-log EC50) olarak ifade edilmiştir.

Grafik ve istatistiksel analiz için GraphPad Software kullanılmıştır. İstatistiksel yöntem olarak tekrarlayan ölçümler için Student t testi, ikiden fazla gruplar için ANOVA testi, post-hoc analizler için ise Tukey testi kullanılmıştır. *p* değeri 0,05’ten küçük bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmada kullanılan LIMA halkaları için submaksimal gerilim 2 gram olarak belirlenmiştir

Organ banyosunda LIMA halkalarının bazal gerilimini belirlemek için 1,50/1,75/2,00/2,25 ve 2,50 gram şeklinde artan gerilim altında 50 mM KCl ile kasılma yanıtı alınmıştır. 50 mM KCl ile elde edilen kasılma miktarları değerlendirildiğinde maksimum kasılma yanıtının 2,25 gram gerilim altında elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.1). Bu nedenle submaksimal gerilim olarak 2,00 gram gerilim seçilmiştir. Sonuç olarak yapılan deneylerde organ banyosuna asılan LIMA halkaları 2,00 gram gerilime ayarlanarak 60 dakika boyunca dinlendirilmiştir.

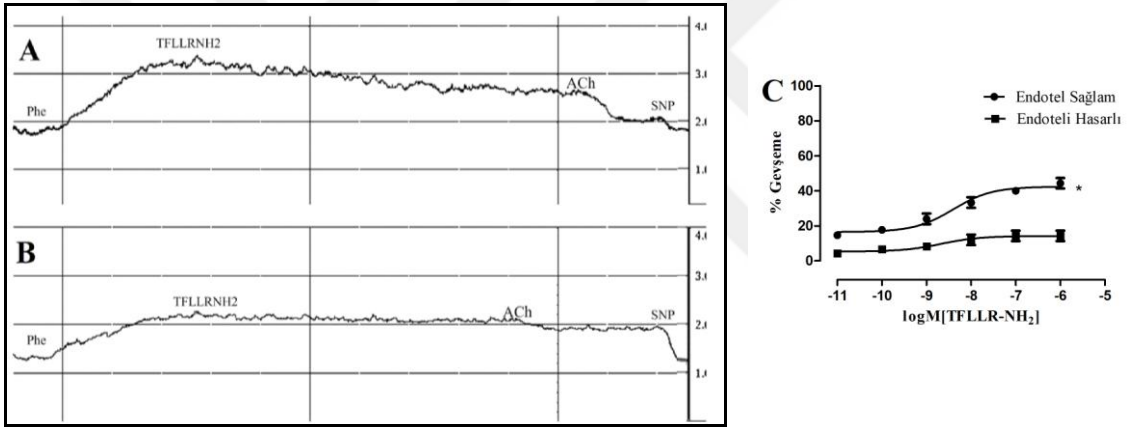


Şekil 4. 1. Farklı gerilimler altında 50 mM KCl ile submaksimal gerilimin belirlenmesi.

A) 1,5 gram gerilim altında 50mM KCl ile elde edilen kasılma yanıtı. B) 1,75 gram gerilim altında 50mM KCl ile elde edilen kasılma yanıtı. C) 2 gram gerilim altında 50mM KCl ile elde edilen kasılma yanıtı. D) 2,25 gram gerilim altında 50mM KCl ile elde edilen kasılma yanıtı. E) 2,5 gram gerilim altında 50mM KCl ile elde edilen kasılma yanıtı. F) Farklı gerilimler altında 50 mM KCl ile elde edilen kasılma yanıtlarının grafiği.

4.2. PAR1 Agonisti Olan TFLLR-NH₂ LIMA Halkalarında Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Meydana Getirmiştir

Endoteli sağlam ve endoteli hasarlı LIMA halkalarına PAR1 agonisti olan TFLLR-NH₂ uygulanmıştır. LIMA halkaları önce tek doz Phe (10⁻⁶ M) ile kasılma yanıtı alınan dokulara kümülatif olarak TFLLR-NH₂ (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) uygulanmıştır. PAR1 agonisti olan TFLLR-NH₂ endoteli sağlam LIMA halkalarında maksimum %44,33±3,33 gevşeme yanıtı oluştururken, endoteli hasarlı damarlarda maksimum %14,33±3,00 gevşeme oluşturmuştur (Şekil 4.2). Endoteli sağlam ve hasarlı damarların TFLLR-NH₂ yanıtları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Endoteli sağlam pD₂±SH=8,39±0,21; endoteli hasarlı 8,66±0,55; p=0,0046; n=7).



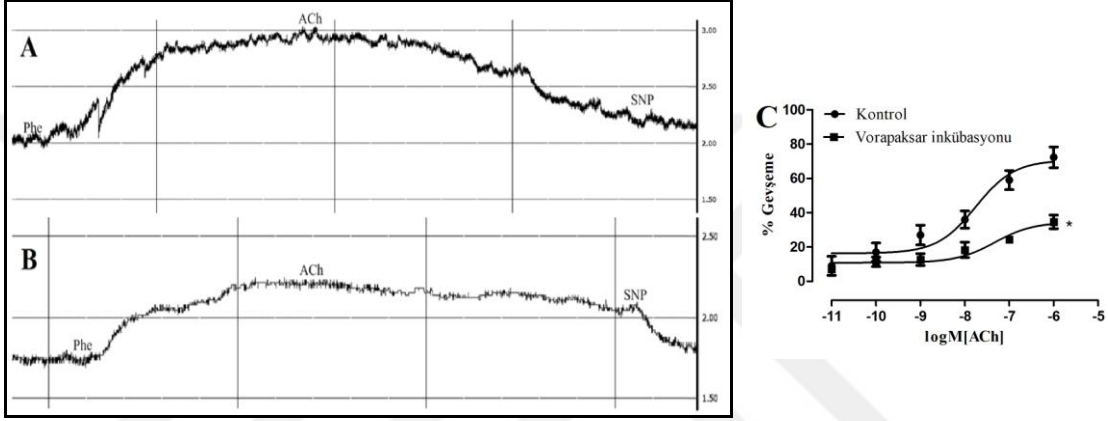
Şekil 4. 2. Kümülatif TFLLR-NH₂ uygulamasının vazoreaktivite üzerindeki etkisi.

A) Endoteli sağlam LIMA halkasında TFLLR-NH₂ yanıtı. B) Endoteli hasarlı LIMA halkasında TFLLR-NH₂ yanıtı. C) Endoteli sağlam ve hasarlı LIMA halkalarında kümülatif TFLLR-NH₂ yanıtının grafiği.

4.3. Vorapaksar İnkübasyonu Sonrası Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Azalmıştır

Endotel fonksiyonunu kontrol etmek için Phe (10⁻⁶ M) ile kasılma yanıtı oluşturulan dokulara kümülatif ACh (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) ve tek doz SNP (10⁻⁶ M) uygulanmıştır ve %60'dan fazla gevşeme elde edilen endoteli sağlam dokular kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon için 10⁻⁶ M konsantrasyonda vorapaksar/ML161 ile çalışılmıştır.

Vorapaksar inkübasyonu öncesi endotel bağımlı gevşeme yanıtı maksimum %72,33±3,50 olarak belirlenmiştir. 30 dakika vorapaksar inkübasyonundan sonra endotel bağımlı gevşeme yanıtı ise maksimum %34,67±2,30 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3). Sonuç olarak vorapaksar inkübasyonu endotel bağımlı gevşeme yanıtını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (Kontrol $pD2 \pm SH = 7,75 \pm 0,17$; vorapaksar $7,33 \pm 0,23$; $p = 0,027$; $n = 7$)

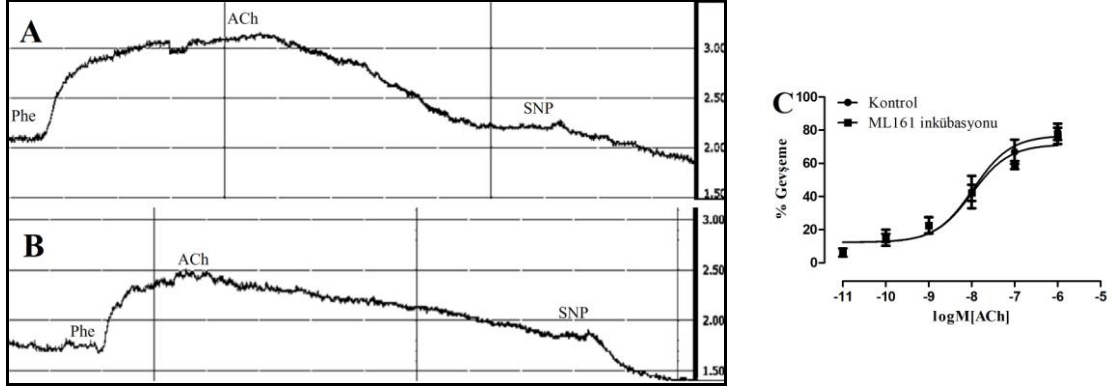


Şekil 4. 3. Vorapaksar inkübasyonunun endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi.

A) Vorapaksar inkübasyonu öncesi Phe-Ach yanıtı. B) Vorapaksar inkübasyonu sonrası Phe-Ach yanıtı. C) Vorapaksar inkübasyonu öncesi ve sonrası endotel bağımlı gevşeme yanıtını gösteren grafik.

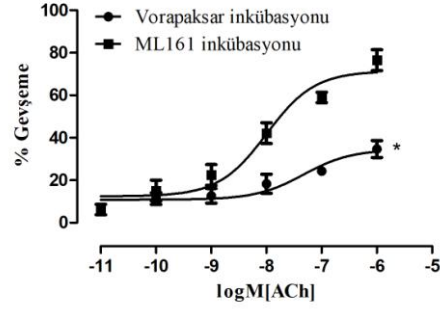
4.4. Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Değişmemiştir

ML161 inkübasyonu öncesi endotel bağımlı gevşeme yanıtı maksimum %79,00±2,73 iken ML161 inkübasyonu sonrasında ise %76,50±2,56 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4). ML161 inkübasyonunun endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır (Kontrol $pD2 \pm SH = 7,96 \pm 0,09$; ML161 inkübasyonu $8,00 \pm 0,09$; $p = 0,917$; $n = 7$).



Şekil 4. 4. Parmodulin-2 inkübasyonunun endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi. A) ML161 inkübasyonu öncesi Phe-Ach yanıtı. B) ML161 inkübasyonu sonrası Phe-Ach yanıtı. C) ML161 inkübasyonu öncesi ve sonrası endotel bağımlı gevşeme yanıtını gösteren grafik.

ML161 ve vorapaksar grubu kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman ML161'e göre vorapaksarın endotel hasarlayıcı etkisinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5) ($p= 0,044$).



Şekil 4. 5. Vorapaksar ve ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının karşılaştırıldığı grafik.

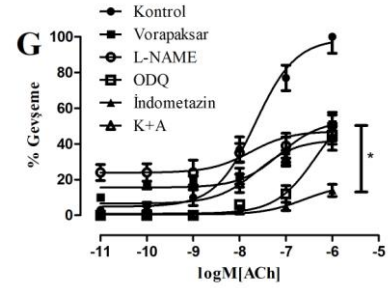
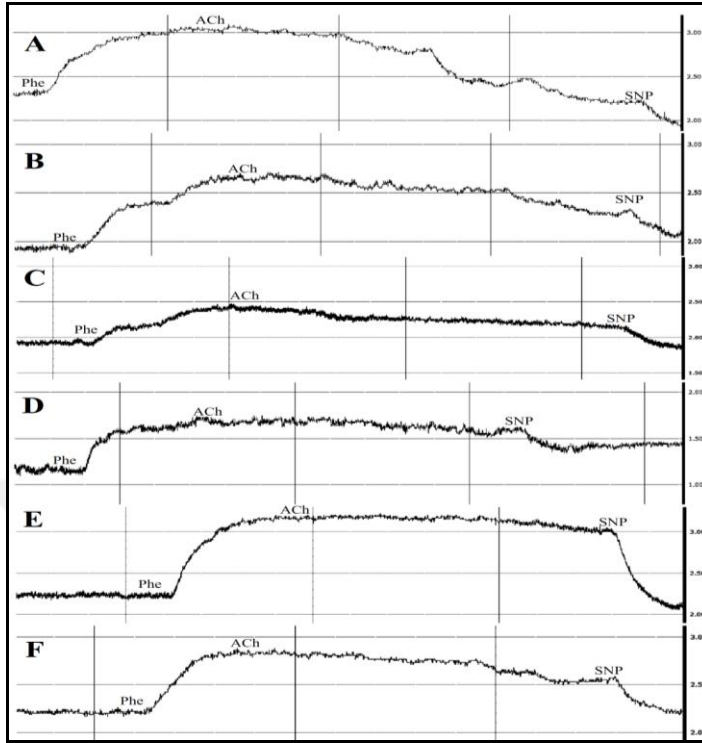
4.5. Vorapaksar İnkübasyonu Sonrası NO ve EDHF Aracılı Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtı Azalmıştır

Vorapaksar ile meydana gelen endotel hasarının altında yer alan mekanizmaları araştırmak için endotel bağımlı gevşeme mekanizmalarını inhibe eden çeşitli moleküller ve L-arginin varlığında Phe-ACh yanıtı alınmıştır. İlk olarak NOS inhibitörü L-NAME ve vorapaksar 30 dakika boyunca inkübe edilmiş ve tek başına vorapaksar inkübasyonu ve vorapaksar+L-NAME inkübasyonu sonrası kümülatif ACh ile elde edilen gevşeme yanıtları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6-C). Emax değerlerine bakıldığında tek başına

vorapaksar grubunda %52,20±3,18; vorapaksar+L-NAME grubunda ise %51,10±2,83 olarak bulunmuştur (Sırasıyla pD2=7,09±0,16; 7,39±0,19; n=7). L-NAME varlığının vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen gevşeme yanıtı üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı görülmüştür ($p=0,18$). Ayrıca cGMP inhibitörü olan ODQ varlığında da vorapaksar inkübasyonu sonrası gevşeme yanıtları değerlendirildiğinde Emax değerinin %45,15±2,3; pD2 değerinin ise 6,34±0,12 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6-D). Tek başına vorapaksar grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p=0,135$). Son olarak NO kaynağı olan L-arginin varlığının vorapaksar inkübasyonu sonrası kümülatif ACh ile elde edilen gevşeme yanıtlarına etkisi araştırılmıştır. Vorapaksar+L-arginin grubunda Emax değeri %46,76±2,10 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7) ve bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Sırasıyla pD2=7,79±0,22; $p=0,95$; n=7).

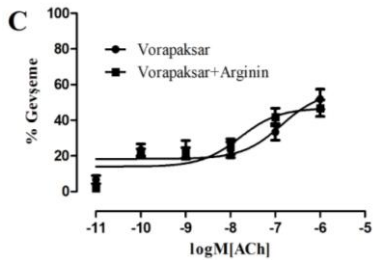
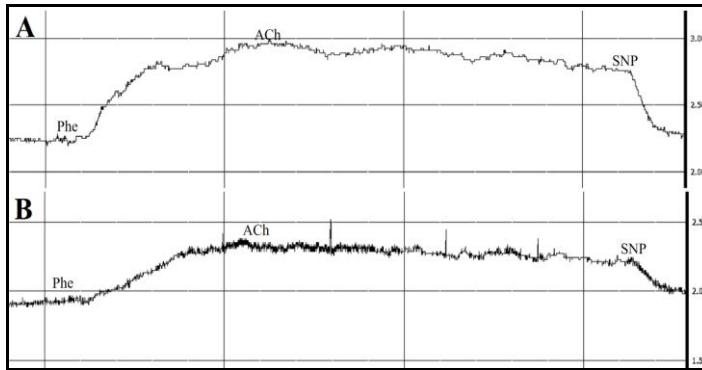
Vorapaksar inkübasyonunun endotel bağımlı gevşeme yanıtını azaltıcı etkisinde prostasiklinlerin etkisini araştırmak için indometazin varlığında kümülatif ACh ile gevşeme yanıtı alınmış ve tek başına vorapaksar uygulanan grupla karşılaştırılmıştır. Tek başına vorapaksar inkübasyonu yapılan gruba göre indometazin varlığı gevşeme yanıtını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p=0,003$; n=7). İndometazin varlığında vorapaksar grubunda gevşeme yanıtı için Emax değerinin %14,00±1,41; pD2 değerinin ise 6,61±0,17 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6-E).

Son olarak vorapaksarın endotel hasarı oluşturucu etkisinde EDHF'nin rolünü değerlendirmek için karibdotoksin ve apamin kullanılmıştır (Şekil 4.6-F). EDHF inhibitörü+vorapaksar inkübasyonu sonrası kümülatif ACh ile elde edilen gevşeme yanıtı için Emax değeri 44,00±3,44 ve pD2 değeri 7,64±0,2 olarak bulunmuştur. Tek başına vorapaksar inkübasyonuna göre gevşeme yanıtları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,487$; n=7).



Şekil 4. 6. Endotel bağımlı gevşeme yanıtını inhibe eden moleküllerin vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.

A) Phe-ACh ile elde edilen kontrol yanıtı. B) Tek başına vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. C) Vorapaksar ve L-NAME inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. D) Vorapaksar ve ODQ inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı E) Vorapaksar ve indometazin inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. F) Vorapaksar ve karibdotoksin-apamin (K+A) inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. G) Çeşitli inhibitör moleküller ve vorapaksar varlığında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtının grafiği.



Şekil 4. 7. L-arginin inkübasyonunun vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.

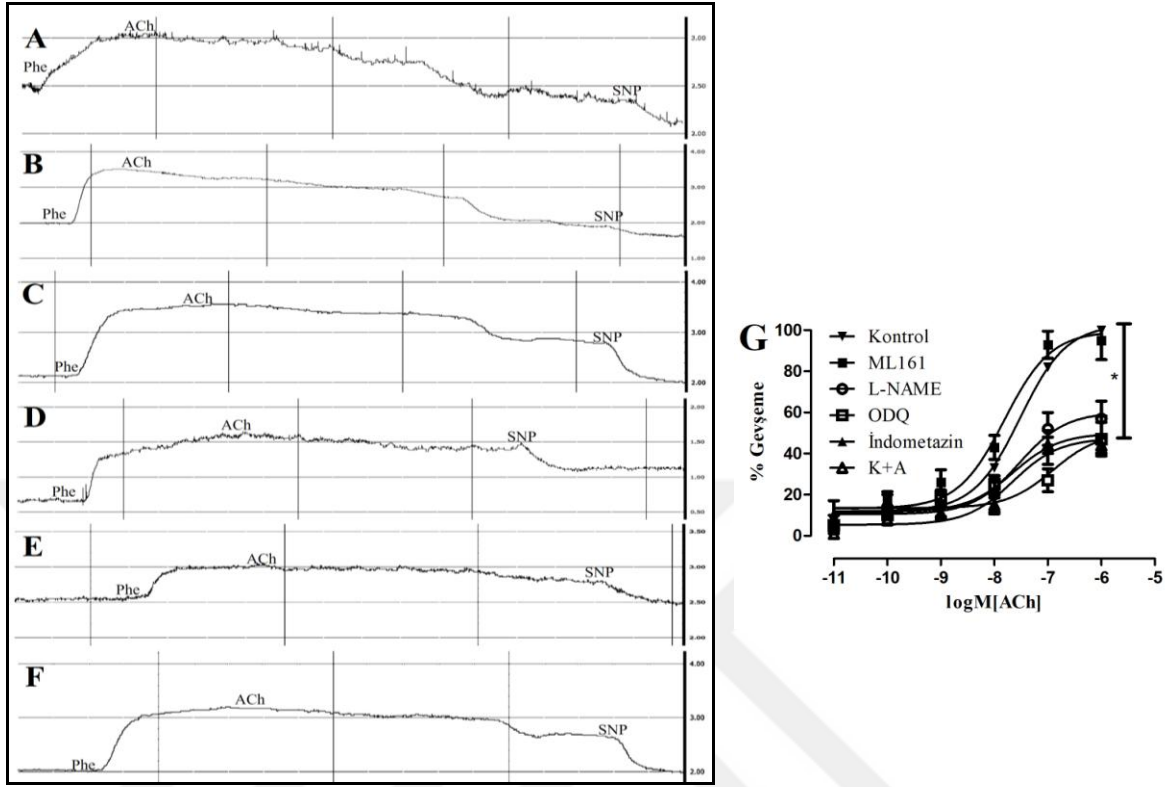
A) Tek başına vorapaksar inkübasyonu sonrası Phe-ACh yanıtı. B) L-arginin ile vorapaksar inkübasyonu sonrası Phe-ACh yanıtı. C) L-arginin inkübasyonunun vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisini gösteren grafik.

4.6. Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Elde Edilen Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtının NO ve EDHF Aracılı Olduğu Saptanmıştır

ML161 inkübasyonu sonrasında kümülatif ACh ile elde edilen gevşeme yanıtının mekanizmalarını araştırmak için öncelikle L-NAME ile NOS enzim blokajının etkisi değerlendirilmiştir. L-NAME varlığında ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen gevşeme yanıtının azaldığı (Şekil 4.8-C) ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0,046$; $n=7$). ML161 inkübasyonu için E_{max} değeri $94,40\pm 3,50$ ve pD_2 değeri $7,81\pm 0,09$ iken L-NAME+ML161 grubunda E_{max} değeri $56,60\pm 3,09$ ve pD_2 değeri $7,53\pm 0,14$ olarak bulunmuştur. ODQ varlığı da ML161 inkübasyonu sonrası gevşeme yanıtını azaltmıştır (Şekil 4.8-D) ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($E_{max}=47,15\pm 3,10$ ve $pD_2=6,51\pm 0,19$; $p=0,03$; $n=7$). Fakat tek başına ML161 inkübasyonuna göre L-arginin varlığında ML161 inkübasyonu sonrasında endotel bağımlı gevşeme yanıtı değişmemiştir (Şekil 4.9; $E_{max}=85,40\pm 3,40$; $pD_2=7,50\pm 0,09$; $p=0,578$).

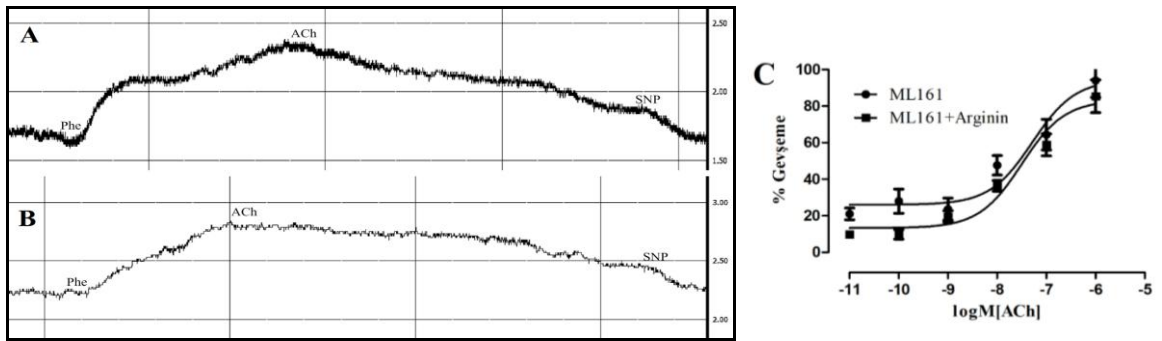
İndometazin ile COX enziminin blokajı ML161 inkübasyonu sonrası kümülatif ACh ile elde edilen gevşeme yanıtını azaltmıştır (Şekil 4.8-E; $E_{max}=49,80\pm 3,43$ ve $pD_2=7,65\pm 0,14$) fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,07$; $n=7$).

EDHF inhibisyonunun ML161 inkübasyonu sonucu elde edilen gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde karibdotoksin+apamin varlığı endotel bağımlı gevşeme yanıtını azalttığı (Şekil 4.8-F; $E_{max}=44,60\pm 1,33$ ve $pD_2=7,65\pm 0,27$) ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p=0,03$; $n=7$).



Şekil 4. 8. Endotel aracılı gevşeme yanıtını inhibe eden moleküllerin ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.

A) Phe-ACh ile elde edilen kontrol yanıtı. B) Tek başına ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. C) ML161 ve L-NAME inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. D) ML161 ve ODQ inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı E) ML161 ve indometazin inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. F) ML161 ve karibdotoksin-apamin (K+A) inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. G) Çeşitli inhibitör moleküller ve ML161 varlığında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtının grafiği.

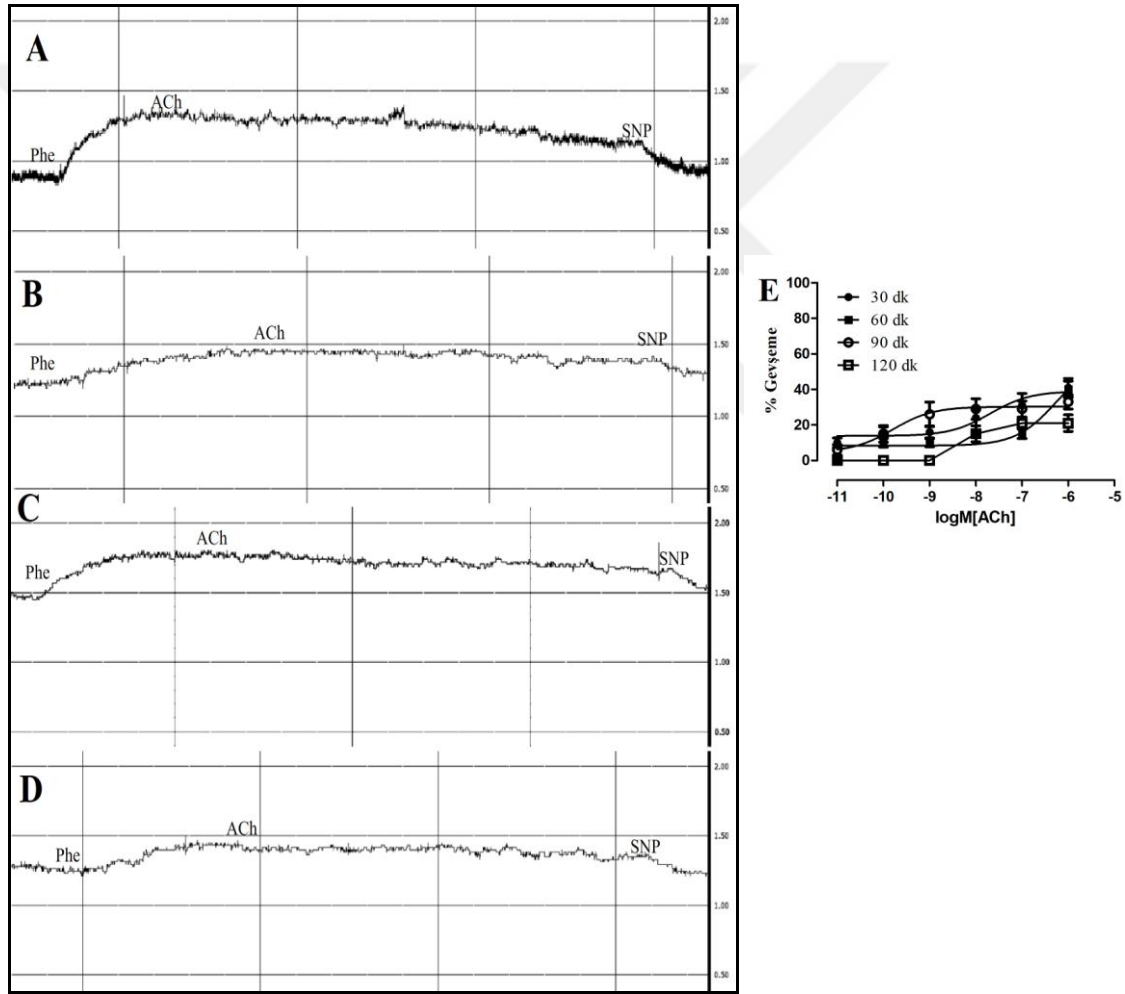


Şekil 4. 9. L-arginin inkübasyonunun ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisi.

A) Tek başına ML161 inkübasyonu sonrası Phe-ACh yanıtı. B) L-arginin ile ML161 inkübasyonu sonrası Phe-ACh yanıtı. C) L-arginin inkübasyonunun ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtına etkisini gösteren grafik.

4.7. İnkübasyon Süresi Vorapaksar/Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Elde Edilen Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtına Etki Etmemiştir

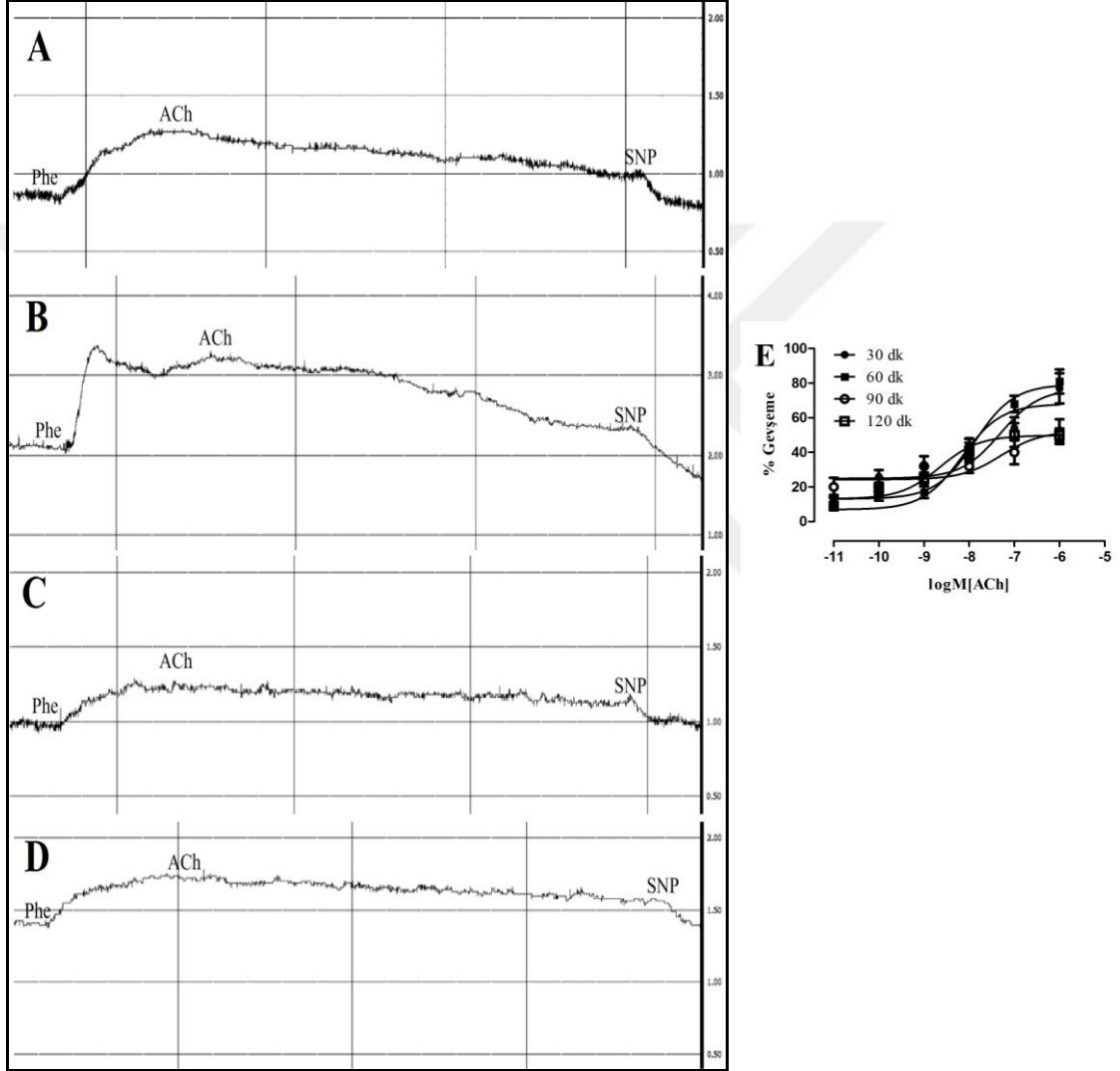
PAR1 antagonisti vorapaksar/ML161 ile 30, 60, 90 ve 120 dakika olmak üzere farklı sürelerde inkübasyon yapılmış ve ardından Phe ile kasılan LIMA halkalarında kümülatif ACh ile gevşeme yanıtı alınmıştır. Vorapaksarla yapılan inkübasyonun süresi uzadıkça ACh ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.10; $p>0,05$; $n=7$).



Şekil 4. 10. Vorapaksar ile yapılan farklı inkübasyon sürelerinin endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerine etkisi.

A) 30 dakika vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. B) 60 dakika vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. C) 60 dakika vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. D) 120 dakika vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. E) Vorapaksar ile farklı inkübasyon sürelerinin Phe-ACh yanıtı üzerine etkisinin grafiksel gösterimi.

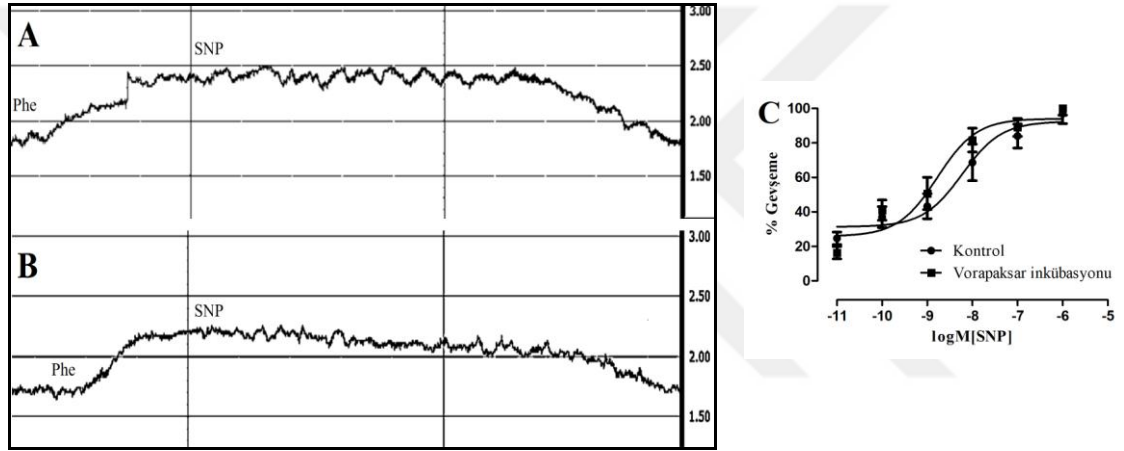
ML161 ile farklı inkübasyon süreleri sonunda elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.11; $p>0,05$; $n=7$). ML161 ile inkübasyon yapılan sürenin uzaması endotel bağımlı gevşeme yanıtına etki etmemiştir.



Şekil 4. 11. ML161 ile yapılan farklı inkübasyon sürelerinin endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerine etkisi. A) 30 dakika ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. B) 60 dakika ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. C) 90 dakika ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. D) 120 dakika ML161 inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. E) ML161 ile farklı inkübasyon sürelerinin Phe-ACh yanıtı üzerine etkisinin grafiksel gösterimi.

4.8. Vorapaksar/Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Endotel Bağımsız Gevşeme Yanıtı Değişmemiştir

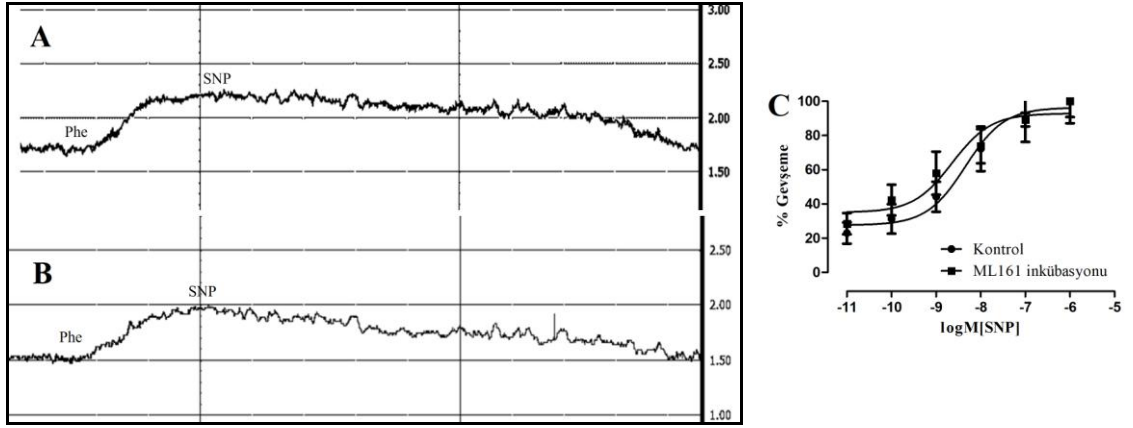
Endotel bağımsız gevşeme yanıtlarını karşılaştırmak için Phe ile kasılan LIMA halkalarında kümülatif SNP ile gevşeme yanıtı alınmıştır. Vorapaksar inkübasyonu sonrasında kümülatif SNP ile gevşeme yanıtı ile vorapaksar inkübasyonu öncesi elde edilen gevşeme yanıtı arasında fark bulunmamıştır (Şekil 4.12; $p=0,812$; $n=7$). Kontrol grubu için $E_{max}=97,33\pm 3,30$ ve $pD2=8,22\pm 0,16$; vorapaksar grubu için ise $E_{max}=100,00\pm 2,2$ ve $pD2=8,87\pm 0,17$ olarak saptanmıştır.



Şekil 4. 12. Vorapaksar inkübasyonunun endotel bağımsız gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi.

A) Vorapaksar inkübasyonu öncesinde elde edilen Phe-SNP yanıtı. B) Vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen Phe-SNP yanıtı. C) Kontrol ve vorapaksar grubunda elde edilen kümülatif SNP yanıtının grafiği.

ML161 inkübasyonu öncesi ve sonrası bu deney protokolü tekrarlandığında SNP ile elde edilen endotel bağımsız gevşeme yanıtının da kontrol grubuna benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13; $p=0,09$; $n=7$). Kontrol grubu için $E_{max}=100,00\pm 6,40$ ve $pD2=8,34\pm 0,17$; ML161 grubu için ise $E_{max}=100,00\pm 4,60$ ve $pD2=8,64\pm 0,20$ olarak saptanmıştır.

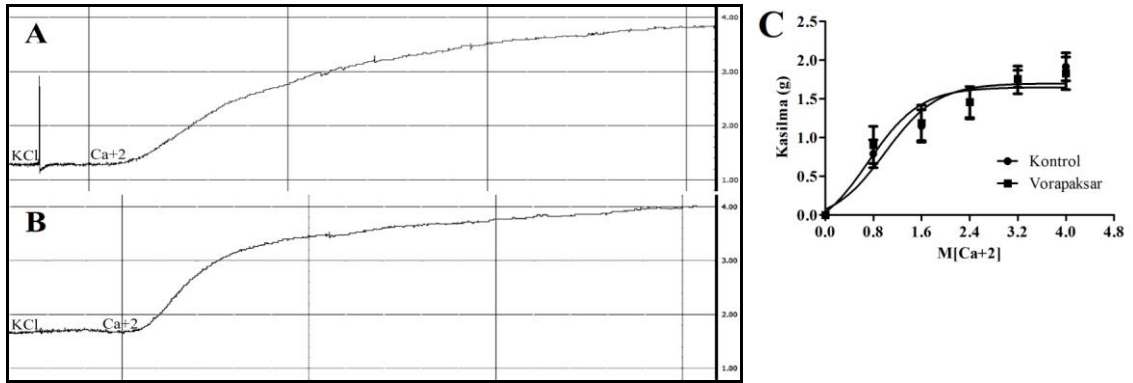


Şekil 4. 13. ML161 inkübasyonunun endotel bağımsız gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi.

A) ML161 ile inkübasyon öncesinde elde edilen Phe-SNP yanıtı. B) ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen Phe-SNP yanıtı. C) Kontrol ve ML161 grubunda elde edilen kümülatif SNP yanıtının grafiği.

4.9. Vorapaksar ve Parmodulin-2 İnkübasyonu Sonrası Ligand ve Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanallarının Etkisi Değişmemiştir

Vorapaksar inkübasyonu öncesi ve sonrasında CaCl_2 solüsyonu ile kümülatif kasılma yanıtı alınmıştır. Vorapaksar inkübasyonu CaCl_2 ile elde edilen kasılma yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yapmamıştır (Şekil 4.14; $p=0,97$; $n=7$). Emax değerleri kontrol grubu için $1,92\pm 0,18$ gram; vorapaksar grubu için $1,83\pm 0,21$ gram olarak saptanmıştır.

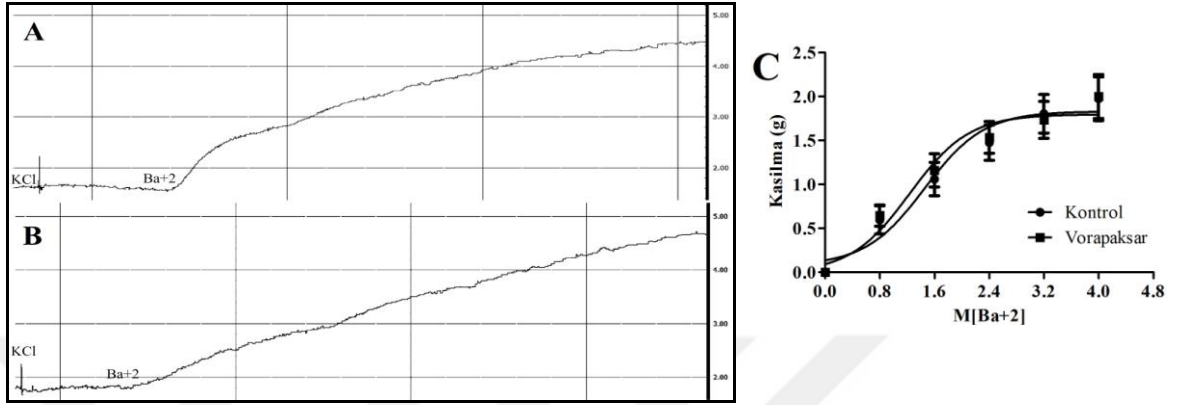


Şekil 4. 14. Vorapaksar inkübasyonu öncesinde ve sonrasında CaCl_2 ile elde edilen kasılma yanıtı.

A) Vorapaksar inkübasyonu öncesi kümülatif CaCl_2 ile edilen kasılma yanıtı. B) Vorapaksar inkübasyonu sonrası kümülatif CaCl_2 ile edilen kasılma yanıtı.

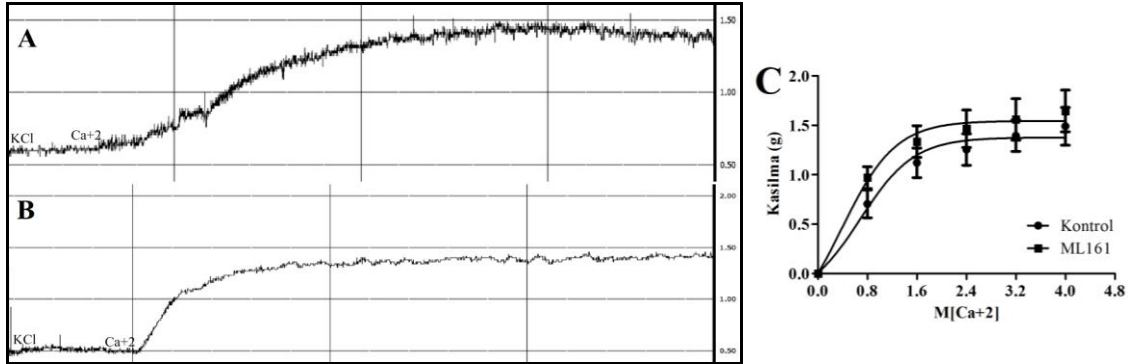
Vorapaksar inkübasyonu sonrasında BaCl_2 solüsyonu ile elde edilen kasılma yanıtında da istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 4.15; $p=0,95$;

n=7). Emax değerleri kontrol grubu için $1,96 \pm 0,25$ gram; vorapaksar grubu için $2,00 \pm 0,25$ gram olarak saptanmıştır.



Şekil 4. 15. Vorapaksar inkübasyonu öncesinde ve sonrasında BaCl₂ ile elde edilen kasılma yanıtı. A) Vorapaksar inkübasyonu öncesi kümülatif BaCl₂ ile edilen kasılma yanıtı. B) Vorapaksar inkübasyonu sonrası kümülatif BaCl₂ ile edilen kasılma yanıtı.

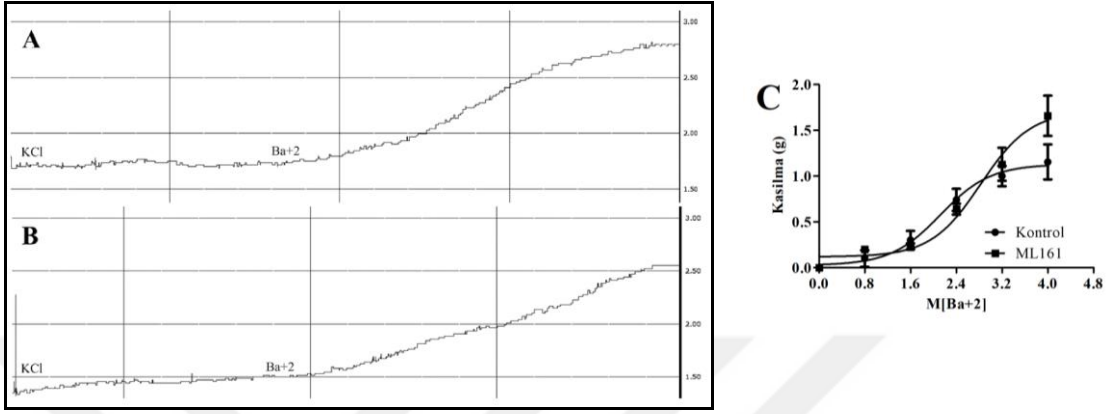
ML161 inkübasyonu sonrasında CaCl₂ solüsyonu ile elde edilen kasılma yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 4.16; $p=0,63$; n=7). Emax değerleri kontrol grubu için $1,49 \pm 0,19$ gram; ML161 grubu için $1,65 \pm 0,21$ gram olarak saptanmıştır.



Şekil 4. 16. ML161 inkübasyonu öncesinde ve sonrasında CaCl₂ ile elde edilen kasılma yanıtı. A) ML161 inkübasyonu öncesi kümülatif CaCl₂ ile edilen kasılma yanıtı. B) ML161 inkübasyonu sonrası kümülatif CaCl₂ ile edilen kasılma yanıtı.

ML161 inkübasyonu sonrasında BaCl₂ solüsyonu ile elde edilen kasılma yanıtında da istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 4.17; $p=0,78$; n=7).

Emax değerleri kontrol grubu için $1,16 \pm 0,19$ gram; ML161 grubu için $1,66 \pm 0,22$ gram olarak saptanmıştır.



Şekil 4. 17. ML161 inkübasyonu öncesinde ve sonrasında BaCl₂ ile elde edilen kasılma yanıtı. A) ML161 inkübasyonu öncesi kümülatif BaCl₂ ile edilen kasılma yanıtı. B) ML161 inkübasyonu sonrası kümülatif BaCl₂ ile edilen kasılma yanıtı.

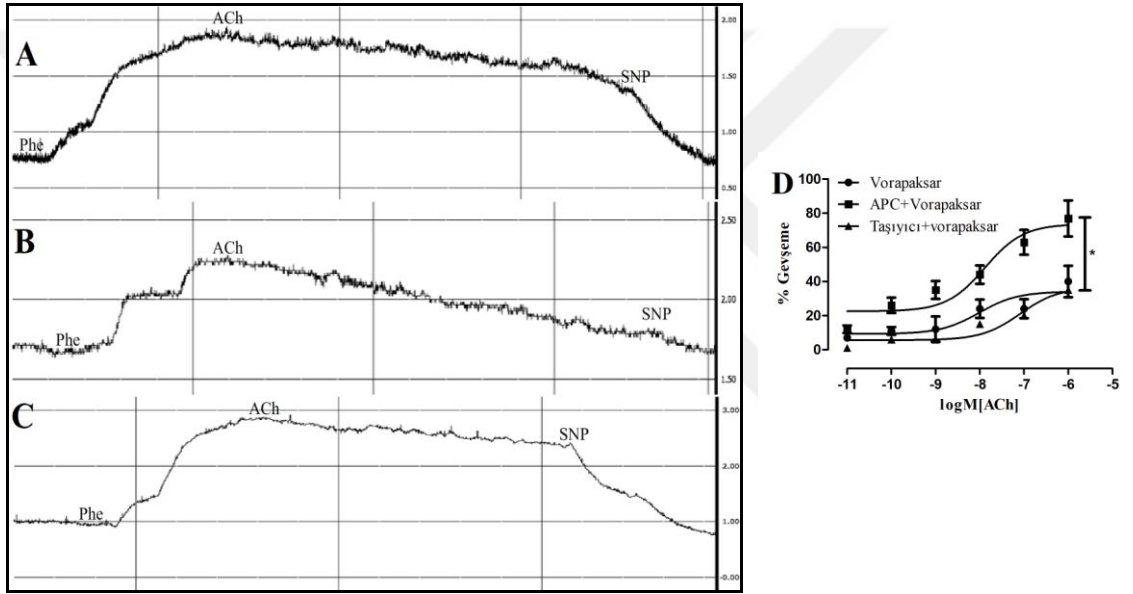
4.10. Protein C Aktivatörü Varlığında Vorapaksar Endotel Hasarına Yol Açmamıştır

Vorapaksarın endotel hasarına yol açtığı tespit edildiği için protein C aktivatörünün endotel bağımlı gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi sadece vorapaksar grubunda değerlendirilmiştir. Endoteli sağlam LIMA halkalarına 30 dakika boyunca tek başına vorapaksar inkübasyonu yapılan grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve Phe-ACh yanıtı alınmıştır. Bir başka gruba ise protein C aktivatörü varlığında vorapaksar ile 30 dakika inkübasyon yapılmış ve inkübasyon sonrası Phe-ACh yanıtı alınmıştır. Ayrıca protein C aktivatörü tek başına temin edilemediği için beraberinde bulunan heksadimetrin bromürün (taşıyıcı) etkisini saptamak amacıyla vorapaksar ve heksadimetrin bromür inkübasyonu yapılarak taşıyıcı grubu oluşturulmuştur.

Protein C aktivatörü+vorapaksar inkübasyonu sonrasında endotel bağımlı gevşeme yanıtının bozulmadığı görülmüştür (Şekil 4.18-B). Tek başına vorapaksar inkübasyonu yapılan grup ile protein C aktivatörü+vorapaksar inkübasyonu yapılan grup endotel bağımlı gevşeme yanıtları açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$; $n=7$). Vorapaksar grubu için $E_{max}=40,20 \pm 5,30$ ve

pD₂=8,01±0,34 iken protein C aktivatörü+vorapaksar grubunda E_{max}=77,35±6,10 ve pD₂=7,88±0,21 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak protein C'nin aktive edilmesi vorapaksarın endotel hasarına yol açmasına engel olmuştur.

Ayrıca taşıyıcı+vorapaksar grubunda tek başına vorapaksar grubuna göre endotel bağımlı gevşeme yanıtının değişmediği saptanmış (E_{max}=35,15±3,20; pD₂=7,09±0,21; *p*>0,05) ve heksadimetrin bromürün vorapaksarın neden olduğu endotel hasarına etki etmediği görülmüştür (Şekil 4.18-C).



Şekil 4. 18. Protein C aktivatörü ve/veya vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtı.

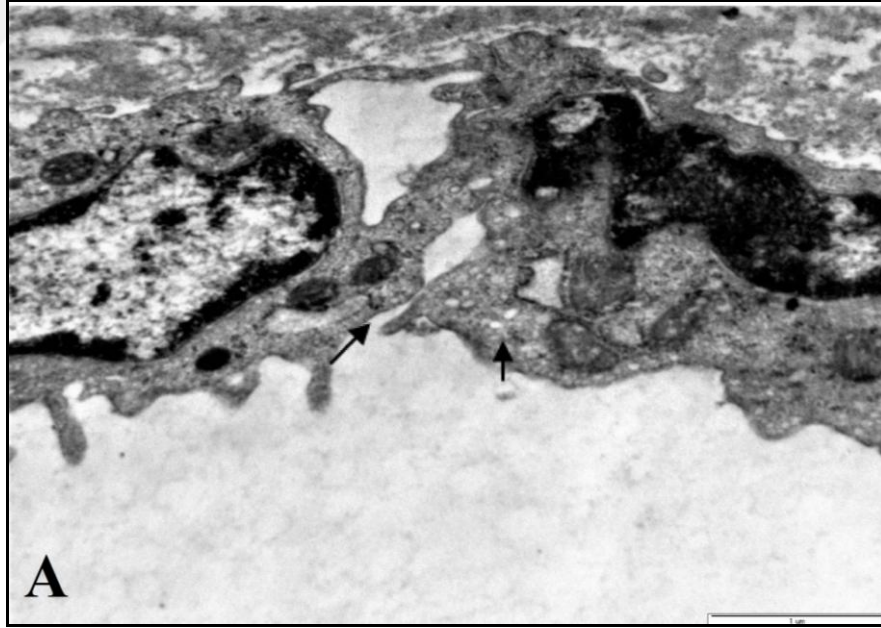
A) Vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. B) Protein C aktivatörü varlığında vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. C) Taşıyıcı ve vorapaksar inkübasyonu sonrası elde edilen Phe-ACh yanıtı. D) Grupların birbirleriyle karşılaştırıldığı grafik.

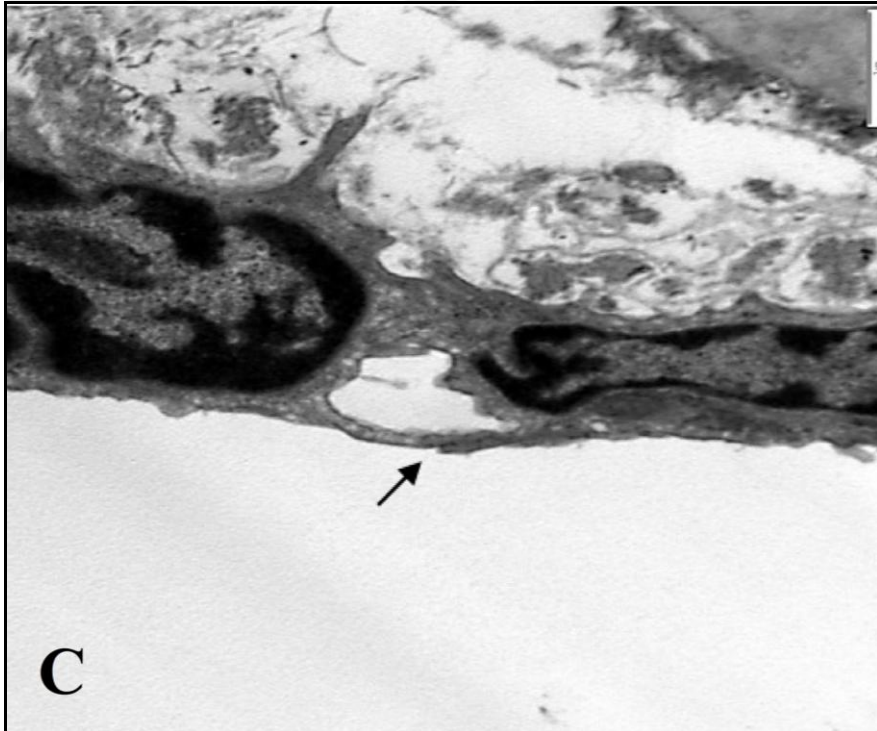
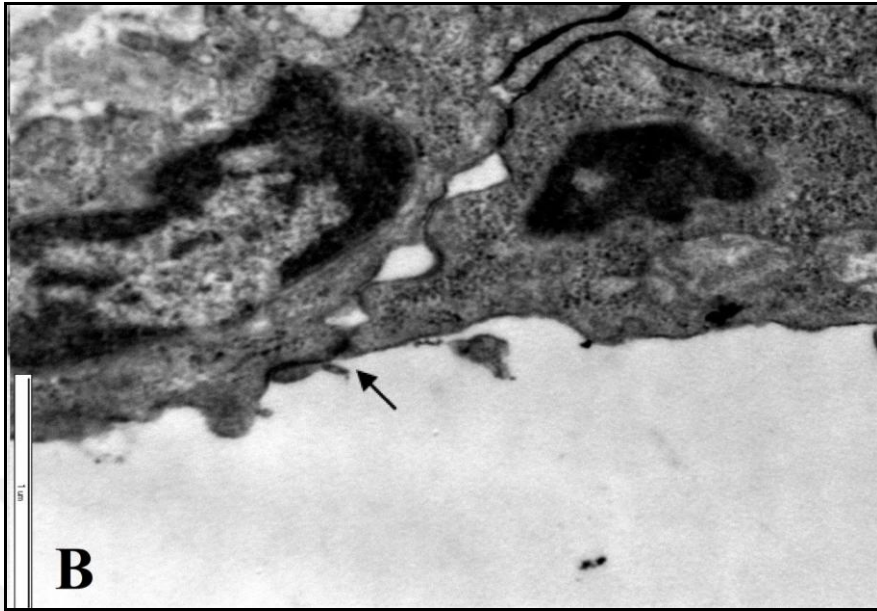
4.11. Vorapaksar İnkübasyonunun Endotel Hasarına Yol Açtığı Sonucu Transmisyon Elektron Mikroskobu Görüntüleri ile Desteklenmiştir

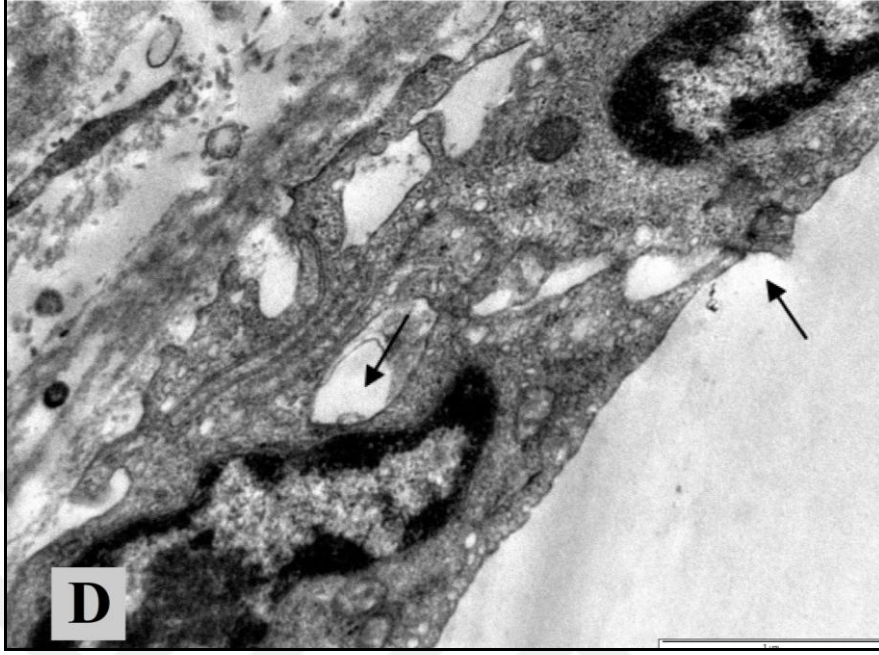
İzole organ banyosu çalışmalarında PAR1 antagonisti vorapaksar ile 30 dakika inkübasyonun endotel hasarı meydana getirdiği saptandığı için 30 dakika vorapaksar/ML161 ile inkübasyon sonrası endotel hücreleri TEM'de incelenmiştir. TEM ile endotel hücreleri görüntülediği zaman endotel hücrelerinde vakuol oluşumu, nükleusun kaybolması, mitokondri sayısında azalma, sitoplazmik organellerin

kaybolması ve hücre membranının püsküllü yapıda olması, endotel hücrelerinin bazal lamina ile bitişik olmaması ve endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulması endotel hasarı olarak değerlendirilmektedir (Onan ve ark., 2014).

Tek başına vorapaksar inkübasyonu endotel hücrelerinde hasarla ilişkili sıkı bağlantılarının bozulduğu ve vakuol oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19-A). Tek başına ML161 inkübasyonu yapılan endotel hücrelerinde ise sıkı bağlantıların korunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19-B). LIMA halkalarının vorapaksar ve protein C aktivatörü ile inkübasyonu sonucu endotel hücrelerinde vakuol oluşumu veya sıkı bağlantılarda herhangi bir bozulma gözlemlenmemiştir (Şekil 4.19-C). Protein C aktivatörünün yanında heksadimetrin bromür de bulunduğu için taşıyıcı grup olarak vorapaksar ve heksadimetrin bromür inkübasyonu yapılan LIMA halkaları da TEM’de incelenmiştir. Vorapaksar grubuna benzer şekilde bu grupta da sıkı bağlantıların bozulduğunu ve vakuol oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19-D).







Şekil 4. 19. Vorapaksar/ML161/Protein C inkübasyonu uygulanan LIMA halkalarının TEM görüntüsü. A) Tek başına vorapaksar inkübasyonu yapılan grup. B) Tek başına ML161 ile inkübasyon yapılan grup. C) Vorapaksar ve protein C aktivatörü ile inkübasyon yapılan grup. D) Vorapaksar ve heksadimetrim bromür ile inkübasyon yapılan taşıyıcı grubu.

5. TARTIŞMA

GPKR disfonksiyonu çeşitli patolojik koşullar ile ilişkilendirilmiştir ve bu nedenle GPKR'ler ilgi çekici bir ilaç hedefidir. GPKR'lerin çoğu sentetik analoglar tarafından kolayca taklit edilebilen peptid, hormon veya iyonlar gibi küçük moleküller tarafından aktive olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan ana moleküller bir GPKR olan PAR1'i farklı mekanizmalarla hedefleyen antiplatelet ilaç olan vorapaksar ve bir parmodulin olan ML161'dir. Vorapaksarın PAR1'in tüm sinyal yollarını inhibe ettiği, ML161'in ise PAR1'in bias ligandı olduğu öne sürülmektedir. ML161'in bias agonist etkiye sahip olması sayesinde PAR1'in endotel koruyucu özelliğini antagonize etmediği ve böylece endotel tabakasında zararlı etkilere sahip olmadığı düşünülmektedir (Aisiku ve ark., 2015). Fakat bu moleküllerin insan LIMA endotel tabakası üzerindeki etkilerine dair bilgi literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada vorapaksar ve ML161'in insan LIMA endotel tabakası üzerindeki etkilerinin *in vitro* olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Antiplateletler ile tedavideki gelişmelere karşın akut koroner sendrom sonrasında tekrarlayan kardiyovasküler olay riski hala yüksektir (Abu-Assi ve ark., 2016). Ayrıca aterotrombotik olayların azaltılması ile elde edilen yararların artışı hemorajik yan etkilerin artışını da beraberinde getirmektedir. Örneğin vorapaksar ile yapılan çalışmalarda da kanama riski göze çarpmaktadır (Magnani ve ark., 2015) ve bu etkinin endotel hücrelerindeki global PAR1 inhibisyonuyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Ramachandran, 2012). Bias ligand olan parmodulinlerin ise kanamaya yol açmadığı öne sürülmektedir (Aisiku ve ark., 2015). Bu da ML161'in bias agonist etkiye sahip olması ile koruyucu yolları bloke etmeden antiplatelet etki oluşturabileceğini desteklemektedir.

Trombinin insan damar sistemindeki fizyolojik etkilerini anlamak zordur çünkü direkt trombin uygulaması *in situ* olarak akut tromboza ve dolayısıyla damar tıkanıklığına neden olma potansiyeline sahiptir. PAR1 reseptör agonistinin kullanımı sayesinde ise

koagülasyon kaskadı ve fibrin oluşumunun enzimatik aktivasyonu olmaksızın direkt trombinin hücrel yanıtı değerlendirilebilmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada PAR1 agonisti SFLLRN-NH₂'nin *in vivo* olarak uygulanmasının insan vaskülatüründe arteriyel dilatasyon, venöz konstriksiyon, platelet aktivasyonu ve doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA) salınımına neden olduğu gösterilmiştir (Gudmundsdottir ve ark., 2006). Trombinin kardiyovasküler hastalığın patofizyolojisindeki merkezi rolü göz önüne alındığında PAR1 aracılı bu etkilerin mekanizmalarını ve özellikle endotelin bu etkideki rolünü tespit etmek önemlidir. Bu tez çalışmasında ise SFLLRN-NH₂'ye göre daha selektif bir PAR1 agonisti olan TFLLR-NH₂ (Fujita ve ark., 2009) literatürle uyumlu olarak endoteli sağlam LIMA halkalarında gevşeme yanıtı meydana getirmiştir. Endoteli hasarlı LIMA halkalarında ise kümülatif TFLLR-NH₂ uygulaması ile gevşeme yanıtı oluşmamıştır. Böylece TFFLLR-NH₂ ile PAR1 aktivasyonu sonucu meydana gelen gevşeme yanıtının endotel bağımlı olduğu saptanmıştır.

Koagülasyon-fibrinoliz sistemindeki proteazlar ve inflamatuvar ve immün hücrelerden üretilenler de dahil olmak üzere diğer proteazlar; trombüs oluşumu, kanama, inflamasyon veya doku hasarı gibi patolojik koşullar altında aktive olmaktadır. Bu nedenle proteazların vasküler etkileri ve PAR'ların rolü patolojik koşullar altında daha önemlidir. Fizyolojik koşullar altında *in vitro* olarak trombin uygulamasının endotel bağımlı vazorelaksasyona aracılık ettiği (Mizuno ve ark., 1998; Hamilton ve Cocks, 2000) ancak endotel bağımlı damar kasılmasını indüklediği de bildirilmiştir (D. D. Ku ve Zaleski, 1993). Patolojik koşullar altında PAR1'in düz kas hücrelerinde direkt aktivasyonu ise vazokonstriksiyona neden olmuştur (David D Ku ve Dai, 1997a). Ayrıca çeşitli patolojik durumlarda özellikle balon anjiyoplasti sonrasında veya aterosklerotik plakların gelişimi sırasında PAR1'in upregüle olduğu (Takada ve ark., 1998; Andrade-Gordon ve ark., 2001) ve bu upregülasyonun vasküler kasılma yanıtlarının artması ile korele olduğu (David D Ku ve Dai, 1997a; Fukunaga ve ark., 2006) gösterilmiştir. Daha önceden yapılan bu çalışmalarda endoteli hasarlı damarlarda PAR1 agonsitleri ile kasılma yanıtı oluşturduğu bulunmuş olmasına karşın bu çalışmada endoteli hasarlı LIMA halkalarına kümülatif TFLLR-NH₂ uygulaması kasılma yanıtı oluşturmamıştır.

PAR1'in bağılı ligand dizisi ile aktive olması farklı PAR1 aktive edici proteazların aynı sinyal kaskadlarını tetikleyeceği ve lineer etkinlik sergileyeceği düşünülmüştür. Ancak PAR1 bias sinyalizasyon göstermektedir ve farklı ligandlar farklı sinyalizasyon kaskadlarını aktive etmektedir. Örneğin endotel hücrelerinde PAR1'in trombin ile aktivasyonu sonucu endotel bariyerde bozulmaya ve damar geçirgenliğinde artışa neden olan proinflatuar yanıtlar oluşurken (Coughlin, 1994), APC ile PAR1 aktivasyonu ise antikoagulan, antiinflatuar ve sitoprotektif sinyalizasyonu tetiklemektedir (Riewald ve ark., 2002; Mosnier ve ark., 2007). İnsan endotel hücre kültüründe trombin ile PAR1 aktivasyonu G α 12/13 ve G α q alt ünitesi ile kenetlenmeyi, RhoA aktivasyonunu, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve endotel bariyerin bozulmasını tetiklemektedir (McLaughlin ve ark., 2005; Komarova ve ark., 2007). APC ile PAR1 aktivasyonunun ise G α 12/13 veya G α q sinyallemesini tetiklemeden G α i sinyalini aktive ederek Rac1 sinyalinin selektif olarak aktivasyonu ile endotel bariyer stabilizasyonunu indüklemektedir (Russo ve ark., 2009). Parmodulinler de G α 12/13 sinyalini ve platelet şekli değişimini büyük ölçüde etkilemeden G α q kaynaklı granül sekresyonunu inhibe etmektedir.

Bu tez çalışmasında Aisiku ve arkadaşlarının (Aisiku ve ark., 2015) hücre kültürü çalışmasında elde ettiği sonuçlara benzer olarak global PAR1 antagonisti olan vorapaksarın endotel fonksiyonunu bozduğu, bias agonist olan ML161'in ise endotel bağımlı gevşeme yanıtını değiştirmedeği organ banyosu deneyleri ile saptanmıştır. Vorapaksar inkübasyonu sonucu endotel tabakası transmisyon elektron mikroskopu ile görüntülenmesi ile vorapaksarın endotel hasarı yapıcı etkisi desteklenmiştir.

Vorapaksarın endotel bağımlı gevşeme yanıtını azalttığı saptandıktan sonra bu etkinin altında yatan mekanizmalar araştırılmıştır. İnsanlarda endotel hasarı çalışmalarını *in vivo* olarak, karşılaştırılabilir ve etik bir şekilde yapmak zordur. Bu nedenle bu çalışmada endotel bağımlı vazodilatasyonun bilinen 3 ana mediyatörü (PGI₂, NO ve EDHF) *in vitro* ortamda farmakolojik olarak inhibe edilmiştir. eNOS enziminin L-NAME ile blokajı veya NO kaynağı olan L-arginin ile inkübasyonu vorapaksar grubunun endotel

yanıtını değiştirmediği için vorapaksarın NOS enziminin aktivitesini bozarak NO üzerinden endotel hasarına yol açtığı ne sürülebilir. Daha önce domuz koroner arterinde PAR1 ve PAR2 agonistlerinin hem endotelyal NO hem de EDHF'ye bağlı olarak vazorelaksasyon yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir (Hamilton ve Cocks, 2000). Bu çalışmada ise EDHF blokeri olan karibdotoksin ve apamin varlığı vorapaksar inkübasyonunun endotel bağımlı gevfeme yanıtında bir miktar azalmaya yol açmıştır fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Böylece vorapaksarın EDHF aracılı gevfeme yanıtını da bozduğu düşünülebilir.

İndometazin varlığı ise vorapaksar inkübasyonu sonrasında elde edilen gevfeme yanıtını ortadan kaldırmıştır. Bu sonuca göre vorapaksar inkübasyonunun insan LIMA halkalarında PGI₂ aracılı endotel bağımlı gevfeme yanıtını bozmadığı ne sürülebilir. PGI₂'nin insan safen ven düz kas hücresinde cAMP ve PKA aracılığıyla PAR1 ekspresyonunu ve mitojenik sinyallemeyi azalttığı daha önce rapor edilmiştir (Pape ve ark., 2008). Bu durum arteriyel damarlarla karşılaştırıldığında PGI₂'yi üretmek için endojen kapasitesi yetersiz olan safen ven bypas greftlerinin azalmış açıklığına katkıda bulunabilir (Subramanian ve ark., 1986). Böylece PAR1 düzenleyici etkilerde insan vasküler düz kas hücrelerinde endojen olarak üretilen PGI₂'nin rolü olabileceği gösterilmiştir. Vorapaksarın PGI₂ üzerinde bir etki oluşurmaması nedeniyle *in vivo* olarak vorapaksar uygulaması boyunca düz kasta PGI₂'nin PAR1 ekspresyonunu azaltıcı etkisinin devam ettiği düşünülebilir. Böylece azalmış PAR1 ekspresyonu nedeniyle vorapaksarın düz kas zerindeki PAR1 antagonizma etkisinde bir miktar azalma olabilir.

Endotel kaynaklı gevfetici ve kasıcı faktörlerin dengesizliği kardiyovasküler hastalıkların belirleyicisidir. Atererosleroza sahip insanlarda eNOS ekspresyonunun azalması sonucu NO üretiminin azaldığı tespit edilmiştir (Oemar ve ark., 1998). Trombin ile meydana gelen endotel bağımlı gevfemenin mekanizmasında eNOS aktivasyonunun veya COX yolağı aracılı PGI₂ salınımının yer aldığı ne sürülmüştür (Z. Yang ve ark., 1994). ngerilim uygulanmış sıçan aort halkasında endotel PAR1 aktivasyonu NO üretimine neden olduğu böylece gevfeme yanıtı oluşturduğu öne

sürülmüştür (Laniyonu ve Hollenberg, 1995). Sıçan perfüze mezenter arter endotelinde PAR1'in trombinin neden olduğu NO-bağımlı gevşemeye aracılık edebileceği düşünülmektedir (Fernandez-Patron ve ark., 2000). İnsan koroner arterinde PAR1 agonistinin baskın olarak NO üretimi ile gevşeme yanıtı oluşturduğu bulunmuştur (Hamilton ve ark., 1998). Daha önce yapılmış bir çalışmada PAR1 ile indüklenen vazodilatasyonda PGI₂ inhibisyonunun etkisinin olmadığı görülmesine karşın NO ve K⁺ kanallarının inhibisyonunun bu gevşemeyi azalttığı saptanmıştır (Gudmundsdottir ve ark., 2008). Benzer olarak bu tez çalışmasında da global PAR1 blokleri olan vorapaksarın NO ve EDHF üzerinden endotel bağımlı gevşeme yanıtını bozduğu bulunmuştur.

ML161 inkübasyonu endotel bağımlı gevşeme yanıtını bozmadığı görülmüştür. Bu nedenle ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtının altında yatan mekanizma araştırılmıştır. Endotel bağımlı gevşeme mekanizmaları olan NO, PGI₂ ve EDHF'nin sırasıyla L-NAME, indometazin ve karibdotoksin ve apamin ile bloke edildiğinde ML161 inkübasyonu sonrasında elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtının azaldığı saptanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde L-NAME ve karibdotoksin ve apamin blokajı sonrasında gevşeme yanıtlarında meydana gelen azalmanın anlamlı olduğu görülmüştür. Böylece ML161 inkübasyonu sonucu elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtında ağırlıklı olarak NO ve EDHF'nin rolü olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar PAR1 aracılı vazodilatasyonda NO ve EDHF'nin rol oynadığını gösteren *in vivo* insan çalışmasının sonuçları ile tutarlı bulunmuştur (Gudmundsdottir ve ark., 2008).

Vorapaksar/ML161 ile inkübasyon süresi arttıkça endotel bağımlı gevşemede anlamlı bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. Vorapaksar maruziyeti sonucu endotel hücrelerinde meydana gelen hasarın inkübasyon süresinden bağımsız olduğu öne sürülebilir. Ayrıca bu çalışmada uzun süreli ML161 inkübasyonunun da endotel hücrelerinde hasara yol açmadığı saptanmıştır.

Vorapaksar/ML161 inkübasyonunun endotel bağımsız gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi değerlendirildiği zaman inkübasyon sonrası SNP ile elde edilen gevşeme yanıtlarının

değiştirmediğ görölmüştür. Böylece vorapaksar/ML161'in düz kas hücrelerinde meydana gelen gevşeme mekanizmaları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı öne sürülebilir. Böylece elde edilen bu sonuç ile vorapaksar inkübasyonu sonucu meydana gelen gevşeme yanıtındaki azalmanın endotel bağımlı olduğu desteklenmiştir.

Vorapaksar/ML161 inkübasyonunun ekstraselüler Ca^{+2} aracılı kasılma yanıtları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Vorapaksar/ML161 inkübasyonunun ligand ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının etkisini değiştirmediğ görölmüştür. Böylece her iki molekülün de ekstraselüler alandan Ca^{+2} girişine etki etmediği düşünülebilir.

Protein C aktivatörü ve vorapaksarın birlikte inkübe edilmesi ile vorapaksarın endotel üzerindeki olumsuz etkisinin önüne geçilmiştir. Ayrıca TEM ile elde edilen görüntülerle protein C'nin aktive edilmesi ile vorapaksarın endotel hasarlayıcı etkisinin önüne geçildiği görölmüştür. Böylece literatüre benzer şekilde bu tez çalışmasında da ortosterik PAR1 antagonisti olan vorapaksarın APC yolağını bloke ederek APC aracılı endotel koruyucu etkileri bozmuş olabileceği öne sürülebilir (Aisiku ve ark., 2015). PAR1'in parmodulinler ile bias olarak uyarılması ile aktive protein C yolağını bozmadan PAR1 antagonist etki elde etmemizi sağlayabilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

PAR'lar; hangi PAR'ın eksprese edildiğine, hangi hücre tipine etki ettiğine ve hangi serin proteazın onu aktifleştirdiğine bağlı olarak çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlemektedir. Farklı kardiyovasküler patolojilerde yer alan PAR1'in vasküler etkileri farklı türlerde ve/veya kan damarlarında büyük ölçüde farklılık göstermektedir ve vazomotor modülasyonunda PAR1'in birçok rolü olduğu öne sürülmüştür. PAR1'in karmaşık rollerin fizyolojik önemi tam olarak anlaşılammıştır. Ayrıca hayvan çalışmalarından elde edilen verilerin insanlara translyasyonu sınırlıdır çünkü PAR1 reseptör ekspresyonu ve fonksiyonu türler arasında değişenlik göstermektedir. PAR1'in insan vaskülatüründeki rolünü araştırılması ile yeni terapötik stratejilerin klinik gelişiminde önemli olacaktır.

Endotel hasarı; koagülasyon kaskadını aktive eden ve ayrıca aterosklerotik süreci tetikleyebilen bir faktördür. Bu tez çalışmasında PAR1 için bias agonist etkiye sahip olan böylece PAR1'in koruyucu yollarını bloke etmeden PAR1 antagonisti olarak etki gösteren ML161'in insan LIMA dokusunda endotel hasarına yol açmadığı tespit edilmiştir. Parmodulinler koruyucu sinyal yollarını koruyarak veya hatta uyararak patolojik sinyalleme aracılık eden yollarını inhibe etmek için kullanılabilir. Parmodulinlerin daha fazla araştırılması endotel hücrelerindeki PAR1 aktivasyonunun mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada global PAR1 antagonisti olan vorapaksarın endotel bağımlı gevşeme yanıtını NO ve EDHF üzerinden bozduğu belirlenmiştir. Global PAR1 antagonisti vorapaksarın kanama için ilave bir risk faktörü oluşturan endotel hücreleri hasarına neden olup olmadığı konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca PAR'ların diğer vasküler hastalıklardaki rolünün daha fazla araştırılması ve tanımlanması PAR antagonistlerinin uygulama alanını genişletecektir.

KAYNAKLAR

Abu-Assi, E., Lopez-Lopez, A., Gonzalez-Salvado, V., Redondo-Diequez, A., Pena-Gil, C., Bouzas-Cruz, N. The risk of cardiovascular events after an acute coronary event remains high, especially during the first year, despite revascularization. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016; 69 (1): 11-18.

Adams, G. N., Rosenfeldt, L., Frederick, M., Miller, W., Waltz, D., Kombrinck, K. Colon cancer growth and dissemination relies upon thrombin, stromal par-1, and fibrinogen. *Cancer Res*. 2015; 75 (19): 4235-4243.

Ahmed, S., & Warren, D. T. Vascular smooth muscle cell contractile function and mechanotransduction. *Vessel Plus*. 2018; 2 (11).

Ahn, H. S., Arik, L., Boykow, G., Burnett, D. A., Caplen, M. A., Czarniecki, M. Structure-activity relationships of pyrroloquinazolines as thrombin receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999; 9 (14): 2073-2078.

Ahn, H. S., Foster, C., Boykow, G., Stamford, A., Manna, M., & Graziano, M. Inhibition of cellular action of thrombin by n³-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7h-pyrrolo[3, 2-f]quinazoline-1,3-diamine (sch 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol*. 2000; 60 (10): 1425-1434.

Aird, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003; 101 (10): 3765-3777.

Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007; 100 (2): 158-173.

Aisiku, O., Peters, C. G., De Ceunynck, K., Ghosh, C. C., Dilks, J. R., Fustolo-Gunnink, S. F. Parmodulins inhibit thrombus formation without inducing endothelial injury caused by vorapaxar. *Blood*. 2015; 125 (12): 1976-1985.

Alexander, R. W., & Griendling, K. K. Signal transduction in vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl*. 1996; 14 (5): S51-54.

Alonso, D., & Radomski, M. W. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev*. 2003; 8 (1): 107-115.

Andrade-Gordon, P., Derian, C. K., Maryanoff, B. E., Zhang, H. C., Addo, M. F., Cheung, W. Administration of a potent antagonist of protease-activated receptor-1 (par-1) attenuates vascular restenosis following balloon angioplasty in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298 (1): 34-42.

Andrade-Gordon, P., Maryanoff, B. E., Derian, C. K., Zhang, H. C., Addo, M. F., Darrow, A. L. Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (22): 12257-12262.

Andre, P., Denis, C. V., Ware, J., Saffaripour, S., Hynes, R. O., Ruggeri, Z. M. Platelets adhere to and translocate on von willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood*. 2000; 96 (10): 3322-3328.

Andreou, A. P., Efthymiou, M., Yu, Y., Watts, H. R., Noormohamed, F. H., Ma, D. Protective effects of non-anticoagulant activated protein c variant (d36a/138d/a39v) in a murine model of ischaemic stroke. *PLoS One*. 2015; 10 (4): e0122410.

Antonaccio, M. J., Normandin, D., Serafino, R., & Moreland, S. Effects of thrombin and thrombin receptor activating peptides on rat aortic vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 266 (1): 125-132.

Antoniak, S., Cardenas, J. C., Buczek, L. J., Church, F. C., Mackman, N., & Pawlinski, R. Protease-activated receptor 1 contributes to angiotensin ii-induced cardiovascular remodeling and inflammation. *Cardiology*. 2017; 136 (4): 258-268.

Antoniak, S., Pawlinski, R., & Mackman, N. Protease-activated receptors and myocardial infarction. *IUBMB Life*. 2011; 63 (6): 383-389.

Antoniak, S., Sparkenbaugh, E., & Pawlinski, R. Tissue factor, protease activated receptors and pathologic heart remodelling. *Thromb Haemost*. 2014; 112 (5): 893-900.

Antoniak, S., Tatsumi, K., Schmedes, C. M., Grover, S. P., Pawlinski, R., & Mackman, N. Protease-activated receptor 1 activation enhances doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol*. 2018; 122: 80-87.

Arnal, J. F., Dinh-Xuan, A. T., Pueyo, M., Darblade, B., & Rami, J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci*. 1999; 55 (8-9): 1078-1087.

Bacon, C. R., Cary, N. R., & Davenport, A. P. Distribution of endothelin receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995; 26 Suppl 3: S439-441.

Bae, J. S., & Rezaie, A. R. Protease activated receptor 1 (par-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein c receptor is occupied by its natural ligand. *Thromb Haemost*. 2008; 100 (1): 101-109.

Bae, S. W., Kim, H. S., Cha, Y. N., Park, Y. S., Jo, S. A., & Jo, I. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase a signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 306 (4): 981-987.

Balligand, J. L., Kobzik, L., Han, X., Kaye, D. M., Belhassen, L., O'Hara, D. S. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type iii) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270 (24): 14582-14586.

Barnes, J. A., Singh, S., & Gomes, A. V. Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. *Mol Cell Biochem.* 2004; 263 (1-2): 227-239.

Barst, R. J. A review of pulmonary arterial hypertension: Role of ambrisentan. *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3 (1): 11-22.

Bassenge, E. Endothelial function in different organs. *Prog Cardiovasc Dis.* 1996; 39 (3): 209-228.

Becker, R. C., Moliterno, D. J., Jennings, L. K., Pieper, K. S., Pei, J., Niederman, A. Safety and tolerability of sch 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase ii study. *Lancet.* 2009; 373 (9667): 919-928.

Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A. Efficacy and safety of recombinant human activated protein c for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 344 (10): 699-709.

Bernatowicz, M. S., Klimas, C. E., Hartl, K. S., Peluso, M., Allegretto, N. J., & Seiler, S. M. Development of potent thrombin receptor antagonist peptides. *J Med Chem.* 1996; 39 (25): 4879-4887.

Beverelli, F., Bea, M. L., Puybasset, L., Giudicelli, J. F., & Berdeaux, A. Chronic inhibition of no synthase enhances the production of prostacyclin in coronary arteries through upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform. *Fundam Clin Pharmacol.* 1997; 11 (3): 252-259.

Bockaert, J., & Pin, J. P. Molecular tinkering of g protein-coupled receptors: An evolutionary success. *EMBO J.* 1999; 18 (7): 1723-1729.

Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Szuba, A., Tsao, P. S., Chan, J. R., Tangphao, O. Asymmetric dimethylarginine (adma): A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998; 98 (18): 1842-1847.

Bohm, F., Ahlborg, G., Johansson, B. L., Hansson, L. O., & Pernow, J. Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22 (4): 674-679.

Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., & Kuliopulos, A. Parl is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell.* 2005; 120 (3): 303-313.

Bonaca, M. P., Scirica, B. M., Creager, M. A., Olin, J., Bounameaux, H., Dellborg, M. Vorapaxar in patients with peripheral artery disease: Results from tra2{degrees}p-timi 50. *Circulation*. 2013; 127 (14): 1522-1529, 1529e1521-1526.

Bono, F., Lamarche, I., & Herbert, J. M. Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (par-2). *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 241 (3): 762-764.

Boo, Y. C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at ser1179 by akt-independent mechanisms: Role of protein kinase a. *J Biol Chem*. 2002; 277 (5): 3388-3396.

Boven, L. A., Vergnolle, N., Henry, S. D., Silva, C., Imai, Y., Holden, J. Up-regulation of proteinase-activated receptor 1 expression in astrocytes during hiv encephalitis. *J Immunol*. 2003; 170 (5): 2638-2646.

Bucci, M., Gratton, J. P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 2000; 6 (12): 1362-1367.

Bultas, J. Antiplatelet therapy—a pharmacologist's perspective. *Cor et Vasa*. 2013; 55 (2): e86-e94.

Bunting, S., Moncada, S., & Vane, J. R. The prostacyclin--thromboxane a2 balance: Pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull*. 1983; 39 (3): 271-276.

Busse, R., & Fleming, I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996; 33 (3): 181-194.

Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Frohlich, L. G., Sickmann, A. Endothelial nitric-oxide synthase (type iii) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 2000; 275 (7): 5179-5187.

Camerer, E., Huang, W., & Coughlin, S. R. Tissue factor- and factor x-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor viia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (10): 5255-5260.

Camerer, E., Kataoka, H., Kahn, M., Lease, K., & Coughlin, S. R. Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor xa signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002; 277 (18): 16081-16087.

Canto, I., Soh, U. J., & Trejo, J. Allosteric modulation of protease-activated receptor signaling. *Mini Rev Med Chem*. 2012; 12 (9): 804-811.

Capers, Q. t., Laursen, J. B., Fukui, T., Rajagopalan, S., Mori, I., Lou, P. Vascular thrombin receptor regulation in hypertensive rats. *Circ Res.* 1997; 80 (6): 838-844.

Capodanno, D., Bhatt, D. L., Goto, S., O'Donoghue, M. L., Moliterno, D. J., Tamburino, C. Safety and efficacy of protease-activated receptor-1 antagonists in patients with coronary artery disease: A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Thromb Haemost.* 2012; 10 (10): 2006-2015.

Cardillo, C., Kilcoyne, C. M., Cannon, R. O., 3rd, & Panza, J. A. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension.* 2000; 35 (6): 1237-1241.

Carreno-Muller, E., Herrera, A. J., de Pablos, R. M., Tomas-Camardiel, M., Venero, J. L., Cano, J. Thrombin induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurones along with the activation of microglia. *J Neurochem.* 2003; 84 (5): 1201-1214.

Cavender, M. A., Scirica, B. M., Bonaca, M. P., Angiolillo, D. J., Dalby, A. J., Dellborg, M. Vorapaxar in patients with diabetes mellitus and previous myocardial infarction: Findings from the thrombin receptor antagonist in secondary prevention of atherothrombotic ischemic events-timi 50 trial. *Circulation.* 2015; 131 (12): 1047-1053.

Chackalamannil, S., Davies, R. J., Asberom, T., Doller, D., & Leone, D. A highly efficient total synthesis of (+)-himbacine. *Journal of the American Chemical Society.* 1996; 118 (40): 9812-9813.

Chackalamannil, S., Doller, D., Eagen, K., Czarniecki, M., Ahn, H. S., Foster, C. J. Potent, low molecular weight thrombin receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001; 11 (21): 2851-2853.

Chackalamannil, S., Wang, Y., Greenlee, W. J., Hu, Z., Xia, Y., Ahn, H. S. Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (sch 530348) with potent antiplatelet activity. *J Med Chem.* 2008; 51 (11): 3061-3064.

Cheng, T., Liu, D., Griffin, J. H., Fernandez, J. A., Castellino, F., Rosen, E. D. Activated protein c blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med.* 2003; 9 (3): 338-342.

Cheng, T., Petraglia, A. L., Li, Z., Thiyagarajan, M., Zhong, Z., Wu, Z. Activated protein c inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med.* 2006; 12 (11): 1278-1285.

Cheung, W. M., Andrade-Gordon, P., Derian, C. K., & Damiano, B. P. Receptor-activating peptides distinguish thrombin receptor (par-1) and protease activated receptor 2 (par-2) mediated hemodynamic responses in vivo. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998; 76 (1): 16-25.

Cheung, W. M., D'Andrea, M. R., Andrade-Gordon, P., & Damiano, B. P. Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19 (12): 3014-3024.

Chieng-Yane, P., Bocquet, A., Letienne, R., Bourbon, T., Sablayrolles, S., Perez, M. Protease-activated receptor-1 antagonist f 16618 reduces arterial restenosis by down-regulation of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase 7 expression, migration, and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (3): 643-651.

Chintala, M. Sch 530348, a novel oral antiplatelet agent, demonstrated no bleeding risk alone or in combination with aspirin and clopidogrel in cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: e138-e139.

Chintala, M., Strony, J., Yang, B., Kurowski, S., & Li, Q. Sch 602539, a protease-activated receptor-1 antagonist, inhibits thrombosis alone and in combination with cangrelor in a folts model of arterial thrombosis in cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30 (11): 2143-2149.

Choi, S. H., Joe, E. H., Kim, S. U., & Jin, B. K. Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci.* 2003; 23 (13): 5877-5886.

Chong, A. J., Pohlman, T. H., Hampton, C. R., Shimamoto, A., Mackman, N., & Verrier, E. D. Tissue factor and thrombin mediate myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75 (2): S649-655.

Chung, S. W., Park, J. W., Lee, S. A., Eo, S. K., & Kim, K. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396 (3): 748-754.

Cirino, G., Cicala, C., Bucci, M. R., Sorrentino, L., Maraganore, J. M., & Stone, S. R. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *J Exp Med.* 1996; 183 (3): 821-827.

Cisowski, J., O'Callaghan, K., Kuliopulos, A., Yang, J., Nguyen, N., Deng, Q. Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating pepducins in lung cancer. *Am J Pathol.* 2011; 179 (1): 513-523.

Clemetson, K. J. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* 2012; 129 (3): 220-224.

Collins, P., Griffith, T. M., Henderson, A. H., & Lewis, M. J. Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: A cyclic guanosine monophosphate-mediated effect. *J Physiol.* 1986; 381: 427-437.

- Committees, T. S. The thrombin receptor antagonist for clinical event reduction in acute coronary syndrome (tra*cer) trial: Study design and rationale. *Am Heart J.* 2009; 158 (3): 327-334 e324.
- Connolly, A. J., Ishihara, H., Kahn, M. L., Farese, R. V., Jr., & Coughlin, S. R. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature.* 1996; 381 (6582): 516-519.
- Connolly, T. M., Condra, C., Feng, D.-M., Cook, J. J., Stranieri, M. T., Reilly, C. F. Species variability in platelet and other cellular responsiveness to thrombin receptor-derived peptides. *Thrombosis and haemostasis.* 1994; 72 (04): 627-633.
- Cook, J. J., Sitko, G. R., Bednar, B., Condra, C., Mellott, M. J., Feng, D. M. An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the african green monkey. *Circulation.* 1995; 91 (12): 2961-2971.
- Cornwell, T. L., Pryzwansky, K. B., Wyatt, T. A., & Lincoln, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic gmp-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 1991; 40 (6): 923-931.
- Cortese-Krott, M. M., Kuhnle, G. G., Dyson, A., Fernandez, B. O., Grman, M., DuMond, J. F. Key bioactive reaction products of the no/h2s interaction are s/n-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112 (34): E4651-4660.
- Coughlin, S. R. Molecular mechanisms of thrombin signaling. *Semin Hematol.* 1994; 31 (4): 270-277.
- Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000; 407 (6801): 258-264.
- Coughlin, S. R. Protease-activated receptors in the cardiovascular system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002; 67: 197-208.
- Coughlin, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (8): 1800-1814.
- Covic, L., Gresser, A. L., Talavera, J., Swift, S., & Kuliopulos, A. Activation and inhibition of g protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99 (2): 643-648.
- Covic, L., Misra, M., Badar, J., Singh, C., & Kuliopulos, A. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med.* 2002; 8 (10): 1161-1165.

D'Andrea, M. R., Derian, C. K., Leturcq, D., Baker, S. M., Brunmark, A., Ling, P. Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46 (2): 157-164.

Damiano, B. P., Cheung, W. M., Santulli, R. J., Fung-Leung, W. P., Ngo, K., Ye, R. D. Cardiovascular responses mediated by protease-activated receptor-2 (par-2) and thrombin receptor (par-1) are distinguished in mice deficient in par-2 or par-1. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 288 (2): 671-678.

Damiano, B. P., D'Andrea, M. R., de Garavilla, L., Cheung, W. M., & Andrade-Gordon, P. Increased expression of protease activated receptor-2 (par-2) in balloon-injured rat carotid artery. *Thromb Haemost.* 1999; 81 (5): 808-814.

Davis, G. E., & Senger, D. R. Extracellular matrix mediates a molecular balance between vascular morphogenesis and regression. *Curr Opin Hematol.* 2008; 15 (3): 197-203.

de Garavilla, L., Vergnolle, N., Young, S. H., Ennes, H., Steinhoff, M., Ossovskaya, V. S. Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol.* 2001; 133 (7): 975-987.

De Meyer, G. R., & Herman, A. G. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997; 39 (4): 325-342.

Derian, C. K., Damiano, B. P., Addo, M. F., Darrow, A. L., D'Andrea, M. R., Nedelman, M. Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304 (2): 855-861.

Derian, C. K., Santulli, R. J., Tomko, K. A., Haertlein, B. J., & Andrade-Gordon, P. Species differences in platelet responses to thrombin and sflrn. Receptor-mediated calcium mobilization and aggregation, and regulation by protein kinases. *Thromb Res.* 1995; 78 (6): 505-519.

Derkach, D. N., Ihara, E., Hirano, K., Nishimura, J., Takahashi, S., & Kanaide, H. Thrombin causes endothelium-dependent biphasic regulation of vascular tone in the porcine renal interlobar artery. *Br J Pharmacol.* 2000; 131 (8): 1635-1642.

Dery, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M., & Bunnett, N. W. Proteinase-activated receptors: Novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol.* 1998; 274 (6): C1429-1452.

Dockendorff, C., Aisiku, O., Verplank, L., Dilks, J. R., Smith, D. A., Gunnink, S. F. Discovery of 1,3-diaminobenzenes as selective inhibitors of platelet activation at the par1 receptor. *ACS Med Chem Lett.* 2012; 3 (3): 232-237.

Doller, D., Chackalamannil, S., Czarniecki, M., McQuade, R., & Ruperto, V. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of himbacine derived muscarinic receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999; 9 (6): 901-906.

Domotor, E., Benzakour, O., Griffin, J. H., Yule, D., Fukudome, K., & Zlokovic, B. V. Activated protein c alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein c receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood*. 2003; 101 (12): 4797-4801.

Dowal, L., Sim, D. S., Dilks, J. R., Blair, P., Beaudry, S., Denker, B. M. Identification of an antithrombotic allosteric modulator that acts through helix 8 of par1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (7): 2951-2956.

Du, M., Chase, M., Oguz, M., & Davies, G. State transition model: Vorapaxar added to standard antiplatelet therapy to prevent thrombosis post myocardial infarction or peripheral artery disease. *Curr Med Res Opin*. 2017; 33 (9): 1535-1543.

Edwards, G., & Weston, A. H. Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarizations. *Pharmacol Res*. 2004; 49 (6): 535-541.

Falker, K., Haglund, L., Gunnarsson, P., Nylander, M., Lindahl, T. L., & Grenegard, M. Protease-activated receptor 1 (par1) signalling desensitization is counteracted via par4 signalling in human platelets. *Biochem J*. 2011; 436 (2): 469-480.

Félétou, M. (2011). *The endothelium, part i: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators*. Paper presented at the Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function.

Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1988; 93 (3): 515-524.

Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26 (6): 1215-1225.

Fernandez-Patron, C., Radomski, M. W., & Davidge, S. T. Role of matrix metalloproteinase-2 in thrombin-induced vasorelaxation of rat mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 278 (5): H1473-1479.

Fetalvero, K. M., Martin, K. A., & Hwa, J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007; 82 (1-4): 109-118.

FitzGerald, G. A. Mechanisms of platelet activation: Thromboxane a2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol*. 1991; 68 (7): 11B-15B.

Flaumenhaft, R., & De Ceunynck, K. Targeting par1: Now what? *Trends Pharmacol Sci*. 2017; 38 (8): 701-716.

Fleming, I., & Busse, R. Signal transduction of enos activation. *Cardiovasc Res.* 1999; 43 (3): 532-541.

Forstermann, U., & Munzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113 (13): 1708-1714.

Fox, M. T., Harriott, P., Walker, B., & Stone, S. R. Identification of potential activators of proteinase-activated receptor-2. *FEBS Lett.* 1997; 417 (3): 267-269.

Fu, J., Naren, A. P., Gao, X., Ahmmed, G. U., & Malik, A. B. Protease-activated receptor-1 activation of endothelial cells induces protein kinase calpha-dependent phosphorylation of syntaxin 4 and munc18c: Role in signaling p-selectin expression. *J Biol Chem.* 2005; 280 (5): 3178-3184.

Fujita, T., Liu, T., Nakatsuka, T., & Kumamoto, E. Proteinase-activated receptor-1 activation presynaptically enhances spontaneous glutamatergic excitatory transmission in adult rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol.* 2009; 102 (1): 312-319.

Fukunaga, R., Hirano, K., Hirano, M., Niuro, N., Nishimura, J., Maehara, Y. Upregulation of proteinase-activated receptors and hypercontractile responses precede development of arterial lesions after balloon injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291 (5): H2388-2395.

Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288 (5789): 373-376.

Gailani, D., & Renne, T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (12): 2507-2513.

Gallo, R., Padurean, A., Toschi, V., Bichler, J., Fallon, J. T., Chesebro, J. H. Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation.* 1998; 97 (6): 581-588.

Gandhi, D. M., Majewski, M. W., Rosas, R., Jr., Kentala, K., Foster, T. J., Greve, E. Characterization of protease-activated receptor (par) ligands: Parmodulins are reversible allosteric inhibitors of par1-driven calcium mobilization in endothelial cells. *Bioorg Med Chem.* 2018; 26 (9): 2514-2529.

Garcia, J. G., Davis, H. W., & Patterson, C. E. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: Role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol.* 1995; 163 (3): 510-522.

Garcia, J. G., Patterson, C., Bahler, C., Aschner, J., Hart, C. M., & English, D. Thrombin receptor activating peptides induce ca²⁺ mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin

synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium. *J Cell Physiol.* 1993; 156 (3): 541-549.

Ghosal, A., Lu, X., Penner, N., Gao, L., Ramanathan, R., Chowdhury, S. K. Identification of human liver cytochrome p450 enzymes involved in the metabolism of sch 530348 (vorapaxar), a potent oral thrombin protease-activated receptor 1 antagonist. *Drug Metab Dispos.* 2011; 39 (1): 30-38.

Gilman, A. G. G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56: 615-649.

Gleeson, E. M., Dichiara, M. G., Salicio, A., Quinn, L. M., Drakeford, C., Russell, S. E. Activated protein c beta-glycoform promotes enhanced noncanonical par1 proteolysis and superior resistance to ischemic injury. *Blood.* 2015; 126 (7): 915-919.

Godin, D., Rioux, F., Marceau, F., & Drapeau, G. Mode of action of thrombin in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol.* 1995; 115 (6): 903-908.

Gonda, K., Miyashita, M., Higuchi, H., Tada, H., Watanabe, T. M., Watanabe, M. Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging. *Sci Rep.* 2015; 5: 14322.

Goto, S., Ogawa, H., Takeuchi, M., Flather, M. D., & Bhatt, D. L. Double-blind, placebo-controlled phase ii studies of the protease-activated receptor 1 antagonist e5555 (atopaxar) in japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2010; 31 (21): 2601-2613.

Goto, S., Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Kato, K., Yamaguchi, H., & Jensen, P. Safety and exploratory efficacy of the novel thrombin receptor (par-1) antagonist sch530348 for non-st-segment elevation acute coronary syndrome. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17 (2): 156-164.

Gremmel, T., Frelinger, A. L., 3rd, & Michelson, A. D. Platelet physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016; 42 (3): 191-204.

Griffin, C. T., Srinivasan, Y., Zheng, Y. W., Huang, W., & Coughlin, S. R. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science.* 2001; 293 (5535): 1666-1670.

Griffin, J. H., Mosnier, L. O., Fernandez, J. A., & Zlokovic, B. V. 2016 scientific sessions sol sherry distinguished lecturer in thrombosis: Thrombotic stroke: Neuroprotective therapy by recombinant-activated protein c. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36 (11): 2143-2151.

Griffin, J. H., Zlokovic, B. V., & Mosnier, L. O. Activated protein c: Biased for translation. *Blood.* 2015; 125 (19): 2898-2907.

Gudmundsdottir, I. J., Lang, N. N., Boon, N. A., Ludlam, C. A., Webb, D. J., Fox, K. A. Role of the endothelium in the vascular effects of the thrombin receptor (protease-activated receptor type 1) in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51 (18): 1749-1756.

Gudmundsdottir, I. J., Megson, I. L., Kell, J. S., Ludlam, C. A., Fox, K. A., Webb, D. J. Direct vascular effects of protease-activated receptor type 1 agonism in vivo in humans. *Circulation.* 2006; 114 (15): 1625-1632.

Gurbel, P. A., Bliden, K. P., Turner, S. E., Tantry, U. S., Gesheff, M. G., Barr, T. P. Cell-penetrating pepducin therapy targeting par1 in subjects with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36 (1): 189-197.

Hamill, C. E., Mannaioni, G., Lyuboslavsky, P., Sastre, A. A., & Traynelis, S. F. Protease-activated receptor 1-dependent neuronal damage involves nmda receptor function. *Exp Neurol.* 2009; 217 (1): 136-146.

Hamilton, J. R., & Cocks, T. M. Heterogeneous mechanisms of endothelium-dependent relaxation for thrombin and peptide activators of protease-activated receptor-1 in porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol.* 2000; 130 (1): 181-188.

Hamilton, J. R., Moffatt, J. D., Frauman, A. G., & Cocks, T. M. Protease-activated receptor (par) 1 but not par2 or par4 mediates endothelium-dependent relaxation to thrombin and trypsin in human pulmonary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 38 (1): 108-119.

Hamilton, J. R., Nguyen, P. B., & Cocks, T. M. Atypical protease-activated receptor mediates endothelium-dependent relaxation of human coronary arteries. *Circ Res.* 1998; 82 (12): 1306-1311.

Hamilton, J. R., & Trejo, J. Challenges and opportunities in protease-activated receptor drug development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017; 57: 349-373.

Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., & Sims, P. J. Stimulated secretion of endothelial von willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein gmp-140. *J Biol Chem.* 1989; 264 (14): 7768-7771.

Hernandez, N. A., Correa, E., Avila, E. P., Vela, T. A., & Perez, V. M. Par1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients: A cohort study. *J Transl Med.* 2009; 7: 47.

Hirano, K. The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (1): 27-36.

Hirano, K., & Kanaide, H. Role of protease-activated receptors in the vascular system. *J Atheroscler Thromb.* 2003; 10 (4): 211-225.

Hirano, K., Yufu, T., Hirano, M., Nishimura, J., & Kanaide, H. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (pars): Regulation of the expression of pars. *J Pharmacol Sci.* 2005; 97 (1): 31-37.

Hollenberg, M. D., & Compton, S. J. International union of pharmacology. Xxviii. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2002; 54 (2): 203-217.

Hollenberg, M. D., Laniyonu, A. A., Saifeddine, M., & Moore, G. J. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains of thrombin receptor-derived polypeptides in biological activity in vascular endothelium and gastric smooth muscle: Evidence for receptor subtypes. *Mol Pharmacol.* 1993; 43 (6): 921-930.

Hollenberg, M. D., Saifeddine, M., Sandhu, S., Houle, S., & Vergnolle, N. Proteinase-activated receptor-4: Evaluation of tethered ligand-derived peptides as probes for receptor function and as inflammatory agonists in vivo. *Br J Pharmacol.* 2004; 143 (4): 443-454.

Huynh, D. T. N., & Heo, K. S. Therapeutic targets for endothelial dysfunction in vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2019; 42 (10): 848-861.

Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S., & Kadowitz, P. J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 237 (3): 893-900.

Ishihara, H., Connolly, A. J., Zeng, D., Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Timmons, C. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature.* 1997; 386 (6624): 502-506.

Ivey, M. E., & Little, P. J. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via par-1 and multiple downstream signalling pathways. *Thromb Res.* 2008; 123 (2): 288-297.

Jaffre, F., Friedman, A. E., Hu, Z., Mackman, N., & Blaxall, B. C. Beta-adrenergic receptor stimulation transactivates protease-activated receptor 1 via matrix metalloproteinase 13 in cardiac cells. *Circulation.* 2012; 125 (24): 2993-3003.

Jennings, L. K., Earhart, A., Becker, R. C., Reyderman, L., Veltri, E., & Harrington, R. A. (2007). Thrombin receptor antagonist (tra; sch530348) is a selective, potent inhibitor of par1 activity with predictable pharmacokinetics. In: *Am Heart Assoc.*

Johnson, K., Choi, Y., DeGroot, E., Samuels, I., Creasey, A., & Aarden, L. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol.* 1998; 160 (10): 5130-5135.

Jones, K. A., Wong, G. Y., Jankowski, C. J., Akao, M., & Warner, D. O. Cgmp modulation of ca²⁺ sensitivity in airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 1999; 276 (1): L35-40.

Kahn, M. L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M. J., Ishihara, H., & Coughlin, S. R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* 1999; 103 (6): 879-887.

Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998; 394 (6694): 690-694.

Kai, Y., Hirano, K., Maeda, Y., Nishimura, J., Sasaki, T., & Kanaide, H. Prevention of the hypercontractile response to thrombin by proteinase-activated receptor-1 antagonist in subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2007; 38 (12): 3259-3265.

Kaneider, N. C., Leger, A. J., Agarwal, A., Nguyen, N., Perides, G., Derian, C. 'role reversal' for the receptor par1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol.* 2007; 8 (12): 1303-1312.

Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., Munzel, T., & Daiber, A. Enos uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des.* 2014; 20 (22): 3579-3594.

Kassel, K. M., Owens, A. P., 3rd, Rockwell, C. E., Sullivan, B. P., Wang, R., Tawfik, O. Protease-activated receptor 1 and hematopoietic cell tissue factor are required for hepatic steatosis in mice fed a western diet. *Am J Pathol.* 2011; 179 (5): 2278-2289.

Kataoka, H., Hamilton, J. R., McKemy, D. D., Camerer, E., Zheng, Y. W., Cheng, A. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood.* 2003; 102 (9): 3224-3231.

Kato, Y., Kita, Y., Hirasawa-Taniyama, Y., Nishio, M., Mihara, K., Ito, K. Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, fr171113, in the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 2003; 473 (2-3): 163-169.

Kato, Y., Kita, Y., Nishio, M., Hirasawa, Y., Ito, K., Yamanaka, T. In vitro antiplatelet profile of fr171113, a novel non-peptide thrombin receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1999; 384 (2-3): 197-202.

Katusic, Z. S. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20 (3): 443-448.

Kenakin, T., & Christopoulos, A. Signalling bias in new drug discovery: Detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12 (3): 205-216.

Knezevic, N., Tauseef, M., Thennes, T., & Mehta, D. The g protein betagamma subunit mediates reannealing of adherens junctions to reverse endothelial permeability increase by thrombin. *J Exp Med.* 2009; 206 (12): 2761-2777.

Kogushi, M., Kobayashi, H., Matsuoka, T., Suzuki, S., Kawahara, T., Kajiwara, A. (2003). *Anti-thrombotic and bleeding time effects of e5555, an orally active protease-activated receptor-1 antagonist, in guinea pigs.* Paper presented at the Circulation.

Kogushi, M., Matsuoka, T., Kawata, T., Kuramochi, H., Kawaguchi, S., Murakami, K. The novel and orally active thrombin receptor antagonist e5555 (atopaxar) inhibits arterial thrombosis without affecting bleeding time in guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2011; 657 (1-3): 131-137.

Kogushi, M., Matsuoka, T., Kuramochi, H., Murakami, K., Kawata, T., Kimura, A. Oral administration of the thrombin receptor antagonist e5555 (atopaxar) attenuates intimal thickening following balloon injury in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011; 666 (1-3): 158-164.

Komarova, Y. A., Mehta, D., & Malik, A. B. Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci STKE.* 2007; 2007 (412): re8.

Komuro, T., Miwa, S., Minowa, T., Okamoto, Y., Enoki, T., Ninomiya, H. The involvement of a novel mechanism distinct from the thrombin receptor in the vasoconstriction induced by trypsin. *Br J Pharmacol.* 1997; 120 (5): 851-856.

Kosoglou, T. Optimizing dose of the novel thrombin receptor antagonist sch 530348 based on pharmacodynamics and pharmacokinetics in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 83 (1): S55.

Kosoglou, T., Reyderman, L., Tiessen, R., Fales, R., Cutler, D., Keller, R. (2009). *Trap-induced platelet aggregation following single and multiple rising oral doses of sch 530348, a novel thrombin receptor antagonist, in healthy volunteers.* Paper presented at the Clinical Pharmacology & Therapeutics.

Kosoglou, T., Reyderman, L., Tiessen, R. G., van Vliet, A. A., Fales, R. R., Keller, R. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the novel par-1 antagonist vorapaxar (formerly sch 530348) in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68 (3): 249-258.

Kosoglou, T., Reyderman, L., Tseng, J., Kumar, B., Xuan, F., Schiller, J. Effect of food, antacid, and age on the pharmacokinetics of the oral thrombin receptor antagonist vorapaxar (sch 530348) in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2013; 2 (3): 223-230.

Kosoglou, T., Statkevich, P., Kumar, B., Xuan, F., Schiller, J. E., Johnson-Levonas, A. O. The effect of multiple doses of ketoconazole or rifampin on the single- and multiple-dose pharmacokinetics of vorapaxar. *J Clin Pharmacol.* 2013; 53 (5): 540-549.

Kosoglou, T., Tiessen, R., Van Vliet, A., Fales, R., Keller, R., & Cutler, D. (2008). *Safety and tolerability of sch 530348, a novel antiplatelet agent, after single and multiple oral dosing in healthy subjects*. Paper presented at the EUROPEAN HEART JOURNAL.

Kranzhofer, R., Clinton, S. K., Ishii, K., Coughlin, S. R., Fenton, J. W., 2nd, & Libby, P. Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circ Res*. 1996; 79 (2): 286-294.

Ku, D. D., & Dai, J. Expression of thrombin receptors in human atherosclerotic coronary arteries leads to an exaggerated vasoconstrictory response in vitro. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1997a; 30 (5): 649-657.

Ku, D. D., & Dai, J. Expression of thrombin receptors in human atherosclerotic coronary arteries leads to an exaggerated vasoconstrictory response in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997b; 30 (5): 649-657.

Ku, D. D., & Zaleski, J. K. Receptor mechanism of thrombin-induced endothelium-dependent and endothelium-independent coronary vascular effects in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22 (4): 609-616.

Kuchan, M. J., & Frangos, J. A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol*. 1994; 266 (3 Pt 1): C628-636.

Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., & Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89 (14): 6348-6352.

Laniyonu, A. A., & Hollenberg, M. D. Vascular actions of thrombin receptor-derived polypeptides: Structure-activity profiles for contractile and relaxant effects in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 1995; 114 (8): 1680-1686.

Lau, D., & Baldus, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*. 2006; 111 (1): 16-26.

Lee, H., & Hamilton, J. R. The par1 antagonist, sch79797, alters platelet morphology and function independently of pars. *Thromb Haemost*. 2013; 109 (1): 164-167.

Lee, M., Saver, J. L., Hong, K. S., Wu, H. C., & Ovbiagele, B. Risk of intracranial hemorrhage with protease-activated receptor-1 antagonists. *Stroke*. 2012; 43 (12): 3189-3195.

Leger, A. J., Covic, L., & Kuliopulos, A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2006; 114 (10): 1070-1077.

Levin, E. R. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995; 333 (6): 356-363.

Libby, P. The interface of atherosclerosis and thrombosis: Basic mechanisms. *Vasc Med.* 1998; 3 (3): 225-229.

Libby, P., Aikawa, M., & Jain, M. K. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; (176 Pt 2): 285-306.

Lyden, P., Levy, H., Weymer, S., Pryor, K., Kramer, W., Griffin, J. H. Phase 1 safety, tolerability and pharmacokinetics of 3k3a-apc in healthy adult volunteers. *Curr Pharm Des.* 2013; 19 (42): 7479-7485.

Lyden, P., Pryor, K. E., Coffey, C. S., Cudkowicz, M., Conwit, R., Jadhav, A. Final results of the rhapsody trial: A multi-center, phase 2 trial using a continual reassessment method to determine the safety and tolerability of 3k3a-apc, a recombinant variant of human activated protein c, in combination with tissue plasminogen activator, mechanical thrombectomy or both in moderate to severe acute ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2019; 85 (1): 125-136.

Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., & Plevin, R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53 (2): 245-282.

Magnani, G., Bonaca, M. P., Braunwald, E., Dalby, A. J., Fox, K. A., Murphy, S. A. Efficacy and safety of vorapaxar as approved for clinical use in the united states. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4 (3): e001505.

Majerus, P. W. Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest.* 1983; 72 (5): 1521-1525.

Malik, A. B., & Fenton, J. W., 2nd. Thrombin-mediated increase in vascular endothelial permeability. *Semin Thromb Hemost.* 1992; 18 (2): 193-199.

Maragoudakis, M. E., & Tsopanoglou, N. E. On the mechanism(s) of thrombin induced angiogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 476: 47-55.

Marti, C. N., Gheorghide, M., Kalogeropoulos, A. P., Georgiopoulou, V. V., Quyyumi, A. A., & Butler, J. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60 (16): 1455-1469.

Martorell, L., Martinez-Gonzalez, J., Rodriguez, C., Gentile, M., Calvayrac, O., & Badimon, L. Thrombin and protease-activated receptors (pars) in atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2008; 99 (2): 305-315.

Marwali, M. R., & Mehta, J. L. Cox-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thromb Haemost.* 2006; 96 (4): 401-406.

Maryanoff, B. E., Zhang, H. C., Andrade-Gordon, P., & Derian, C. K. Discovery of potent peptide-mimetic antagonists for the human thrombin receptor, protease-activated receptor-1 (par-1). *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2003; 1 (1): 13-36.

Masaki, T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995; 35: 235-255.

McAdam, B. F., Catella-Lawson, F., Mardini, I. A., Kapoor, S., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (cox)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of cox-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (1): 272-277.

McLaughlin, J. N., Shen, L., Holinstat, M., Brooks, J. D., Dibenedetto, E., & Hamm, H. E. Functional selectivity of g protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J Biol Chem*. 2005; 280 (26): 25048-25059.

McNamara, C. A., Sarembock, I. J., Bachhuber, B. G., Stouffer, G. A., Ragosta, M., Barry, W. Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: Implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin Thromb Hemost*. 1996; 22 (2): 139-144.

McNamara, C. A., Sarembock, I. J., Gimple, L. W., Fenton, J. W., 2nd, Coughlin, S. R., & Owens, G. K. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest*. 1993; 91 (1): 94-98.

Melnikova, V. O., Balasubramanian, K., Villares, G. J., Dobroff, A. S., Zigler, M., Wang, H. Crosstalk between protease-activated receptor 1 and platelet-activating factor receptor regulates melanoma cell adhesion molecule (mcam/muc18) expression and melanoma metastasis. *J Biol Chem*. 2009; 284 (42): 28845-28855.

Michel, T., & Feron, O. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 1997; 100 (9): 2146-2152.

Mihara, K., Ramachandran, R., Renaux, B., Saifeddine, M., & Hollenberg, M. D. Neutrophil elastase and proteinase-3 trigger g protein-biased signaling through proteinase-activated receptor-1 (par1). *J Biol Chem*. 2013; 288 (46): 32979-32990.

Minami, T., Sugiyama, A., Wu, S. Q., Abid, R., Kodama, T., & Aird, W. C. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24 (1): 41-53.

Mirza, H., Yatsula, V., & Bahou, W. F. The proteinase activated receptor-2 (par-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1996; 97 (7): 1705-1714.

Mizuno, O., Hirano, K., Nishimura, J., Kubo, C., & Kanaide, H. Mechanism of endothelium-dependent relaxation induced by thrombin in the pig coronary artery. *Eur J Pharmacol.* 1998; 351 (1): 67-77.

Mizuno, O., Hirano, K., Nishimura, J., Kubo, C., & Kanaide, H. Proteolysis and phosphorylation-mediated regulation of thrombin receptor activity in in situ endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2000; 389 (1): 13-23.

Moens, A. L., Goovaerts, I., Claeys, M. J., & Vrints, C. J. Flow-mediated vasodilation: A diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest.* 2005; 127 (6): 2254-2263.

Molino, M., Raghunath, P. N., Kuo, A., Ahuja, M., Hoxie, J. A., Brass, L. F. Differential expression of functional protease-activated receptor-2 (par-2) in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (5): 825-832.

Momota, F., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J., & Kanaide, H. Involvement of gi/o in the par-4-induced no production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342 (2): 365-371.

Moncada, S., & Higgs, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 1: S193-201.

Morgan, A. R., Rerkasem, K., Gallagher, P. J., Zhang, B., Morris, G. E., Calder, P. C. Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics. *Stroke.* 2004; 35 (6): 1310-1315.

Morrow, D. A., Braunwald, E., Bonaca, M. P., Ameriso, S. F., Dalby, A. J., Fish, M. P. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 2012; 366 (15): 1404-1413.

Morrow, D. A., Scirica, B. M., Fox, K. A., Berman, G., Strony, J., Veltri, E. Evaluation of a novel antiplatelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: Design and rationale for the thrombin-receptor antagonist in secondary prevention of atherothrombotic ischemic events (tra 2 degrees p)-timi 50 trial. *Am Heart J.* 2009; 158 (3): 335-341 e333.

Moser, M., & Patterson, C. Thrombin and vascular development: A sticky subject. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23 (6): 922-930.

Mosnier, L. O., Zlokovic, B. V., & Griffin, J. H. The cytoprotective protein c pathway. *Blood.* 2007; 109 (8): 3161-3172.

Muramatsu, I., Laniyonu, A., Moore, G. J., & Hollenberg, M. D. Vascular actions of thrombin receptor peptide. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992; 70 (7): 996-1003.

Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y. W., Sulciner, D. J., Weiss, E. J., Ludeman, M. J., & Coughlin, S. R. Par3 is a cofactor for par4 activation by thrombin. *Nature*. 2000; 404 (6778): 609-613.

Nazir, S., Gadi, I., Al-Dabet, M. M., Elwakiel, A., Kohli, S., Ghosh, S. Cytoprotective activated protein c averts nlrp3 inflammasome-induced ischemia-reperfusion injury via mtorc1 inhibition. *Blood*. 2017; 130 (24): 2664-2677.

Nelken, N. A., Soifer, S. J., O'Keefe, J., Vu, T. K., Charo, I. F., & Coughlin, S. R. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest*. 1992; 90 (4): 1614-1621.

Nguyen, K. T., Frye, S. R., Eskin, S. G., Patterson, C., Runge, M. S., & McIntire, L. V. Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2001; 38 (5): 1038-1043.

Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., & Sundelin, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (20): 9208-9212.

O'Brien, P. J., Molino, M., Kahn, M., & Brass, L. F. Protease activated receptors: Theme and variations. *Oncogene*. 2001; 20 (13): 1570-1581.

O'Brien, P. J., Prevost, N., Molino, M., Hollinger, M. K., Woolkalis, M. J., Woulfe, D. S. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than par1 include the transactivation of par2 by thrombin-cleaved par1. *J Biol Chem*. 2000; 275 (18): 13502-13509.

O'Callaghan, K., Kuliopulos, A., & Covic, L. Turning receptors on and off with intracellular pepducins: New insights into g-protein-coupled receptor drug development. *J Biol Chem*. 2012; 287 (16): 12787-12796.

O'Donoghue, M. L., Bhatt, D. L., Wiviott, S. D., Goodman, S. G., Fitzgerald, D. J., Angiolillo, D. J. Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: The lessons from antagonizing the cellular effects of thrombin-acute coronary syndromes trial. *Circulation*. 2011; 123 (17): 1843-1853.

Oemar, B. S., Tschudi, M. R., Godoy, N., Brovkovich, V., Malinski, T., & Luscher, T. F. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 97 (25): 2494-2498.

Oestreich, J. Sch-530348, a thrombin receptor (par-1) antagonist for the prevention and treatment of atherothrombosis. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009; 10 (9): 988-996.

Onan, B., Yeniterzi, M., Onan, I. S., Ersoy, B., Gonca, S., Gelenli, E. Effect of electrocautery on endothelial integrity of the internal thoracic artery: Ultrastructural analysis with transmission electron microscopy. *Tex Heart Inst J.* 2014; 41 (5): 484-490.

Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84 (2): 579-621.

Ozkor, M. A., & Quyyumi, A. A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol Res Pract.* 2011; 2011: 156146.

Palmer, R. M., Ashton, D. S., & Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. *Nature.* 1988; 333 (6174): 664-666.

Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E., Jr., & Epstein, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990; 323 (1): 22-27.

Pape, R., Rauch, B. H., Rosenkranz, A. C., Kaber, G., & Schror, K. Transcriptional inhibition of protease-activated receptor-1 expression by prostacyclin in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28 (3): 534-540.

Pawlinski, R., Tencati, M., Hampton, C. R., Shishido, T., Bullard, T. A., Casey, L. M. Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy. *Circulation.* 2007; 116 (20): 2298-2306.

Perez, M., Lamothe, M., Maraval, C., Mirabel, E., Loubat, C., Planty, B. Discovery of novel protease activated receptors 1 antagonists with potent antithrombotic activity in vivo. *J Med Chem.* 2009; 52 (19): 5826-5836.

Petersson, J., Zygmunt, P. M., & Hogestatt, E. D. Characterization of the potassium channels involved in edhf-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* 1997; 120 (7): 1344-1350.

Pittner, J., Wolgast, M., Casellas, D., & Persson, A. E. Increased shear stress-released no and decreased endothelial calcium in rat isolated perfused juxtamedullary nephrons. *Kidney Int.* 2005; 67 (1): 227-236.

Prast, H., & Philippu, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001; 64 (1): 51-68.

Pries, A. R., & Kuebler, W. M. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; (176 Pt 1): 1-40.

Putney, J. W., Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 1986; 7 (1): 1-12.

Queiroz, K. C., Shi, K., Duitman, J., Aberson, H. L., Wilmink, J. W., van Noesel, C. J. Protease-activated receptor-1 drives pancreatic cancer progression and chemoresistance. *Int J Cancer*. 2014; 135 (10): 2294-2304.

Quilley, J., & McGiff, J. C. Is edhf an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci*. 2000; 21 (4): 121-124.

Quoyer, J., Janz, J. M., Luo, J., Ren, Y., Armando, S., Lukashova, V. P. P. Pepducin targeting the c-x-c chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory g protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110 (52): E5088-5097.

Radjab, A. R., Sawada, K., Jagadeeswaran, S., Eichbichler, A., Kenny, H. A., Montag, A. Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface. *J Biol Chem*. 2008; 283 (5): 2822-2834.

Rahman, A., Anwar, K. N., True, A. L., & Malik, A. B. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream nf-kappa b site of the promoter mediates endothelial icam-1 expression and neutrophil adhesion. *J Immunol*. 1999; 162 (9): 5466-5476.

Ramachandran, R. Developing par1 antagonists: Minding the endothelial gap. *Discov Med*. 2012; 13 (73): 425-431.

Ranieri, V. M., Thompson, B. T., Barie, P. S., Dhainaut, J. F., Douglas, I. S., Finfer, S. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 2012; 366 (22): 2055-2064.

Rao, L. V., & Pendurthi, U. R. Tissue factor-factor viia signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25 (1): 47-56.

Rauch, B. H., Scholz, G. A., Baumgartel-Allekotte, D., Censarek, P., Fischer, J. W., Weber, A. A. Cholesterol enhances thrombin-induced release of fibroblast growth factor-2 in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27 (4): e20-25.

Rees, D. D., Palmer, R. M., & Moncada, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86 (9): 3375-3378.

Reyderman, L., Kosoglou, T., Kasserra, C., Young, S., Pei, J., Schiller, J. (2009). *Lack of ethnic differences in the pharmacodynamics (pd) and pharmacokinetics (pk) of sch 530348, a novel oral antiplatelet agent, in japanese and caucasian subjects*. Paper presented at the CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS.

Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M., & Ruf, W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein c pathway. *Science*. 2002; 296 (5574): 1880-1882.

Riewald, M., & Ruf, W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98 (14): 7742-7747.

Rohatgi, T., Sedehizade, F., Reymann, K. G., & Reiser, G. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: Thrombin as signaling molecule in the brain. *Neuroscientist*. 2004; 10 (6): 501-512.

Rosenkranz, A. C., Rauch, B. H., Freidel, K., & Schror, K. Regulation of protease-activated receptor-1 by vasodilatory prostaglandins via nfat. *Cardiovasc Res*. 2009; 83 (4): 778-784.

Russo, A., Soh, U. J., Paing, M. M., Arora, P., & Trejo, J. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (15): 6393-6397.

Sabri, A., Muske, G., Zhang, H., Pak, E., Darrow, A., Andrade-Gordon, P. Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors. *Circ Res*. 2000; 86 (10): 1054-1061.

Sabri, A., Short, J., Guo, J., & Steinberg, S. F. Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: Distinct par-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes. *Circ Res*. 2002; 91 (6): 532-539.

Sandoo, A., van Zanten, J. J., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J*. 2010; 4: 302-312.

Scarborough, R. M., Naughton, M. A., Teng, W., Hung, D. T., Rose, J., Vu, T. K. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem*. 1992; 267 (19): 13146-13149.

Schmidt, V. A., Nierman, W. C., Maglott, D. R., Cupit, L. D., Moskowitz, K. A., Wainer, J. A. The human proteinase-activated receptor-3 (par-3) gene. Identification within a par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets. *J Biol Chem*. 1998; 273 (24): 15061-15068.

Sen, P., Gopalakrishnan, R., Kothari, H., Keshava, S., Clark, C. A., Esmon, C. T. Factor viia bound to endothelial cell protein c receptor activates protease activated receptor-1 and mediates cell signaling and barrier protection. *Blood*. 2011; 117 (11): 3199-3208.

Sevastos, J., Kennedy, S. E., Davis, D. R., Sam, M., Peake, P. W., Charlesworth, J. A. Tissue factor deficiency and par-1 deficiency are protective against renal ischemia reperfusion injury. *Blood*. 2007; 109 (2): 577-583.

Sharma, A., Helft, G., Garg, A., Agrawal, S., Chatterjee, S., Lavie, C. J. Safety and efficacy of vorapaxar in secondary prevention of atherosclerotic disease: A meta-analysis of randomized control trials. *Int J Cardiol.* 2017; 227: 617-624.

Shi, X., Gangadharan, B., Brass, L. F., Ruf, W., & Mueller, B. M. Protease-activated receptors (par1 and par2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res.* 2004; 2 (7): 395-402.

Shimokawa, H. 2014 williams harvey lecture: Importance of coronary vasomotion abnormalities-from bench to bedside. *Eur Heart J.* 2014; 35 (45): 3180-3193.

Shinohara, Y. A phase ii safety study of novel antiplatelet agent, sch 530348, in japanese patients with prior ischemic stroke. *Int J Stroke.* 2008; 3 (1): 139.

Silini, A., Ghilardi, C., Ardinghi, C., Bernasconi, S., Oliva, P., Carraro, F. Protease-activated receptor-1 (par-1) promotes the motility of human melanomas and is associated to their metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis.* 2010; 27 (1): 43-53.

Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B., & Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2010; 160 (2): 191-203.

Soh, U. J., & Trejo, J. Activated protein c promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through beta-arrestin and dishevelled-2 scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (50): E1372-1380.

Soifer, S. J., Peters, K. G., O'Keefe, J., & Coughlin, S. R. Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am J Pathol.* 1994; 144 (1): 60-69.

Sonin, D. L., Wakatsuki, T., Routhu, K. V., Harmann, L. M., Petersen, M., Meyer, J. Protease-activated receptor 1 inhibition by sch79797 attenuates left ventricular remodeling and profibrotic activities of cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2013; 18 (5): 460-475.

Steinberg, S. F. The cardiovascular actions of protease-activated receptors. *Mol Pharmacol.* 2005; 67 (1): 2-11.

Steven, S., Munzel, T., & Daiber, A. Exploiting the pleiotropic antioxidant effects of established drugs in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2015; 16 (8): 18185-18223.

Stoop, A. A., Lupu, F., & Pannekoek, H. Colocalization of thrombin, pai-1, and vitronectin in the atherosclerotic vessel wall: A potential regulatory mechanism of thrombin activity by pai-1/vitronectin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20 (4): 1143-1149.

Strande, J. L., Hsu, A., Su, J., Fu, X., Gross, G. J., & Baker, J. E. Sch 79797, a selective par1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 2007; 102 (4): 350-358.

Striggow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, A., Schmidt, W., Henrich-Noack, P., Breder, J. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci.* 2001; 14 (4): 595-608.

Subramanian, V. A., Hernandez, Y., Tack-Goldman, K., Grabowski, E. F., & Weksler, B. B. Prostacyclin production by internal mammary artery as a factor in coronary artery bypass grafts. *Surgery.* 1986; 100 (2): 376-383.

Takada, M., Tanaka, H., Yamada, T., Ito, O., Kogushi, M., Yanagimachi, M. Antibody to thrombin receptor inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation without causing inhibition of platelet aggregation or altering hemostatic parameters after angioplasty in rat. *Circ Res.* 1998; 82 (9): 980-987.

Tesfamariam, B. Distinct receptors and signaling pathways in alpha-thrombin- and thrombin receptor peptide-induced vascular contractions. *Circ Res.* 1994a; 74 (5): 930-936.

Tesfamariam, B. Thrombin receptor-mediated vascular relaxation differentiated by a receptor antagonist and desensitization. *Am J Physiol.* 1994b; 267 (5 Pt 2): H1962-1967.

Thomas, M. R., & Storey, R. F. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost.* 2015; 114 (3): 449-458.

Tran, Q. K., Ohashi, K., & Watanabe, H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2000; 48 (1): 13-22.

Tressel, S. L., Kaneider, N. C., Kasuda, S., Foley, C., Koukos, G., Austin, K. A matrix metalloprotease-par1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol Med.* 2011; 3 (7): 370-384.

Tricoci, P., Huang, Z., Held, C., Moliterno, D. J., Armstrong, P. W., Van de Werf, F. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2012; 366 (1): 20-33.

Ueno, M., Ferreiro, J. L., & Angiolillo, D. J. Mechanism of action and clinical development of platelet thrombin receptor antagonists. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010; 8 (8): 1191-1200.

Vallance, P., Collier, J., & Moncada, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989; 2 (8670): 997-1000.

van Nieuw Amerongen, G. P., van Delft, S., Vermeer, M. A., Collard, J. G., & van Hinsbergh, V. W. Activation of rhoa by thrombin in endothelial hyperpermeability: Role of rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res.* 2000; 87 (4): 335-340.

Vane, J. R., Anggard, E. E., & Botting, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990; 323 (1): 27-36.

Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf).* 2017; 219 (1): 22-96.

Vergnolle, N., Hollenberg, M. D., & Wallace, J. L. Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: A distinct role for proteinase-activated receptor-1 (par1). *Br J Pharmacol.* 1999; 126 (5): 1262-1268.

Villares, G. J., Zigler, M., Dobroff, A. S., Wang, H., Song, R., Melnikova, V. O. Protease activated receptor-1 inhibits the maspin tumor-suppressor gene to determine the melanoma metastatic phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (2): 626-631.

Vouret-Craviari, V., Bourcier, C., Boulter, E., & van Obberghen-Schilling, E. Distinct signals via rho gtpases and src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2002; 115 (Pt 12): 2475-2484.

Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991; 64 (6): 1057-1068.

Vu, T. K., Wheaton, V. I., Hung, D. T., Charo, I., & Coughlin, S. R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature.* 1991; 353 (6345): 674-677.

Wallez, Y., & Huber, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778 (3): 794-809.

Wang, H., Ubl, J. J., & Reiser, G. Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia.* 2002; 37 (1): 53-63.

Wang, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev.* 2012; 92 (2): 791-896.

Wettschureck, N., & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 2005; 85 (4): 1159-1204.

Whellan, D. J., Tricoci, P., Chen, E., Huang, Z., Leibowitz, D., Vranckx, P. Vorapaxar in acute coronary syndrome patients undergoing coronary artery bypass graft surgery:

Subgroup analysis from the tracer trial (thrombin receptor antagonist for clinical event reduction in acute coronary syndrome). *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63 (11): 1048-1057.

Whitehead, I., Kirk, H., & Kay, R. Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries. *Mol Cell Biol.* 1995; 15 (2): 704-710.

Whitmont, K., McKelvey, K. J., Fulcher, G., Reid, I., March, L., Xue, M. Treatment of chronic diabetic lower leg ulcers with activated protein c: A randomised placebo-controlled, double-blind pilot clinical trial. *Int Wound J.* 2015; 12 (4): 422-427.

Wijewardena, A., Lajevardi, S. S., Vandervord, E., Vandervord, J., Lang, T. C., Fulcher, G. Activated protein c to heal pressure ulcers. *Int Wound J.* 2016; 13 (5): 986-991.

Wilcox, J. N., Rodriguez, J., Subramanian, R., Ollerenshaw, J., Zhong, C., Hayzer, D. J. Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation. *Circ Res.* 1994; 75 (6): 1029-1038.

Wiviott, S. D., Flather, M. D., O'Donoghue, M. L., Goto, S., Fitzgerald, D. J., Cura, F. Randomized trial of atropaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: The lessons from antagonizing the cellular effect of thrombin-coronary artery disease trial. *Circulation.* 2011; 123 (17): 1854-1863.

Xu, W. F., Andersen, H., Whitmore, T. E., Presnell, S. R., Yee, D. P., Ching, A. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95 (12): 6642-6646.

Yang, E., Boire, A., Agarwal, A., Nguyen, N., O'Callaghan, K., Tu, P. Blockade of par1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis. *Cancer Res.* 2009; 69 (15): 6223-6231.

Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K. H₂s as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science.* 2008; 322 (5901): 587-590.

Yang, Z., Arnet, U., Bauer, E., von Segesser, L., Siebenmann, R., Turina, M. Thrombin-induced endothelium-dependent inhibition and direct activation of platelet-vessel wall interaction. Role of prostacyclin, nitric oxide, and thromboxane a₂. *Circulation.* 1994; 89 (5): 2266-2272.

Yang, Z., Ruschitzka, F., Rabelink, T. J., Noll, G., Julmy, F., Joch, H. Different effects of thrombin receptor activation on endothelium and smooth muscle cells of human coronary bypass vessels. Implications for venous bypass graft failure. *Circulation.* 1997; 95 (7): 1870-1876.

Yuan, S., Patel, R. P., & Kevil, C. G. Working with nitric oxide and hydrogen sulfide in biological systems. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015; 308 (5): L403-415.

Yufu, T., Hirano, K., Bi, D., Hirano, M., Nishimura, J., Iwamoto, Y. Rac1 regulation of surface expression of protease-activated receptor-1 and responsiveness to thrombin in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25 (7): 1506-1511.

Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D. H., Fung, J. J., Palmer, D., Zheng, Y. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*. 2012; 492 (7429): 387-392.

Zhang, H. C., Derian, C. K., Andrade-Gordon, P., Hoekstra, W. J., McComsey, D. F., White, K. B. Discovery and optimization of a novel series of thrombin receptor (par-1) antagonists: Potent, selective peptide mimetics based on indole and indazole templates. *J Med Chem*. 2001; 44 (7): 1021-1024.

Zhang, P., Gruber, A., Kasuda, S., Kimmelstiel, C., O'Callaghan, K., Cox, D. H. Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating par1 pepducin. *Circulation*. 2012; 126 (1): 83-91.

EKLER

EK-1

Etik kurul onay belgesi

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

2017

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr
	ETİK KURUL KODU	2012-KAEK-20
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Cahit NACİTARHAN	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	PAR-1 Antagonisti Varopaksar ve Parmodulin-2'nin İnsan Sol İnternal Mammarian Arter Üzerindeki Fizyolojik Etkilerinin İn Vitro Karşılaştırılması	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 678	Tarih: 15.11.2017
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın yapılmasında bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Öğr.Gör.Dr.M. Levent ÖZGÖNÜL
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Selahattin KURURU
Üye

Prof.Dr.Oğuz DURSUN
Üye (Izinli)

Doç.Dr.Banu NUR
Üye

Prof.Dr.Murat CANPOLAT
Üye

Prof.Dr.Emine KARSLI
Üye

Doç.Dr.Gülşim ÖZGE BAYSAL
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mehtap TÜRKAY
Üye (Izinli)

Turgut ALTUN
Üye

Av.Mustafa AÇIKEL
Üye (Izinli)

Prof.Dr.Arda YASATARGIL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Özge İNAN
Üye

Prof.Dr.Veli YAZISIZ
Üye (Izinli)

Doç.Dr.Dijle KIPMEN KORGUN
Üye

Dr.Özge HÜLÜR
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zinnet Şeval	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Soyadı	AKSOYALP	Tel no	0 538 944 03 43
Doğum tarihi	06.05.1991	e-posta	sevvalaksoyalp@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2009
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	6 ay (2015-2015)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	5 yıl (2015-2019)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS-2014	76,25
	YÖKDİL-2017	83,75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
TDK-2018-3270	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi	2 yıl (2018-2019)

Burslar-Ödüller: Tübitak 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı

Yayınlar ve Bildiriler:

Aksoyalp, Z. Ş., & Nacitarhan, C. (2018). Kardiyovasküler hastalıklarda barsak mikrobiyotasının rolü. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 75(2), 100-109.

Nacitarhan C., Aksoyalp Z. S., “Probiotics”, 1st International Ahi Evran Medical and Health Science Congress (IAMHC), Kırşehir, TÜRKİYE, 11-14 Nisan 2019, ss. 11-14

Aksoyalp Z. S., Nacitarhan C. “Calorie Restriction Mimetics in Cardiovascular Diseases”, 2nd International Health Science and Life Congress (IHSLC 2019), Burdur, TÜRKİYE, 24-27 Nisan 2019, ss. 579-590

Aksoyalp Z.S., Demir Dora D., "Perspectives of Medical Students about Biotechnological Drugs", International IVEK BIO Congress, İstanbul, TÜRKİYE, 26-28 Kasım 2018, ss.65-65

Aksoyalp Z.S., Barutçigil A., Demir Dora D., Nacitarhan C., “Evaluation of Medical Students’ Perspectives on “Over-The Counter” Drug Use”, 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, TÜRKİYE, 26-29 Nisan 2017, ss.731

Barutçigil A., Aksoyalp Z.S., Demir Dora D., Nacitarhan C., “Comparison of Perspectives of 1st And 5th Year Medical Students About Complementary And Alternative Medicine (CAM)”, 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, TÜRKİYE, 26-29 Nisan 2017, ss.431

Aksoyalp Z.Ş., Barutçigil A., Akbaş M. N., Nacitarhan C., Demir Dora D., “Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem 1 ve Dönem 5 Öğrencilerinin Tamamlayıcı ve Alternatif Tedaviye Bakış Açılarının Karşılaştırılması”, 3. Ulusal Klinik Eczacılık Kongresi, Antalya, TÜRKİYE, 9-12 Şubat 2017, ss. 59

Gümüş A., Aksoyalp Z. Ş., Nacitarhan C., "Rat Abdominal Aort Fizyolojik Yanıtlarına Bevasizumabın Etkileri", 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ankara, TÜRKİYE, 7-10 Eylül 2015, ss.280