

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI AD

**NİLOTİNİBİN KÜLTÜR ORTAMINDAKİ
ENDOTEL HÜCRELERİNİN KOAGÜLAN
İŞLEVİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Uzm. Dr. Abdullah KATGI

HEMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Özden PİŞKİN

İZMİR 2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	viii-ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1-3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kronik Myeloid Lösemi	4
2.1.1 Tanım ve Tarihçe.....	4
2.1.2 İnsidans	4
2.1.3 Etyoloji	4
2.1.4 Klinik.....	4
2.1.5 Kronik faz.....	5
2.1.6 Akselere Faz	5
2.1.7 Blastik Faz	5
2.1.8 KML’de Sitogenetik Değişiklikler	6
2.1.9 BCR-ABL Geni	6
2.1.10 BCR-ABL Geni ve Sinyal İleti Yolakları	7
2.1.10.1 Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Yolağı	7
2.1.10.2 Ras Yolağı	8
2.1.10.3 Src Ailesi Kinazları	8
2.1.10.4 Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) Yolağı.....	8
2.1.10.5 KML’de Tanı	9
2.2 KML’de Tedavi	9
2.2.1 Konvansiyonel Kemoterapi ve İnterferon-Alfa Tedavisi	9
2.2.2 Allogeneik Kök Hücre Nakli.....	9

2.2.3	Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	10
2.2.3.1	İmatinib Mesilat.....	10-12
2.2.3.2	İkinci Kuşak Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	12
2.2.3.3	Nilotinib.....	13-15
2.2.3.4	Dasatinib.....	15-17
2.3	Hemostaz.....	17-19
2.4	Endotel.....	19
2.4.1	Tanım.....	19
2.4.2	Normal Endotel ve Fonksiyonları.....	19
2.4.3	Endotel Fizyolojisi.....	20
2.4.4	Endotelden Salgılanan Mediatörler.....	20
2.4.5	Nitrik Oksit.....	21-23
2.4.6	Endotel Disfonksiyonu.....	23-24
2.4.7	Ateroskleroz.....	24
2.4.8	Endotelyal Disfonksiyona Neden Olan Durumlar.....	25-27
2.4.9	Endotel İşlevinin Değerlendirilmesi.....	27-29
2.5	Endotel İşlevinin Dolaşımdaki Belirteçleri.....	29
2.5.1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1).....	30
2.5.2	Von Willebrand Faktör.....	31
2.5.3	Endotelin-1.....	32
2.5.4	t-PA.....	33
2.5.5	Çalışmanın Amacı.....	33
3.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
3.1	Yöntem.....	34
3.1.1	Hücre Kültür Çalışmaları.....	34
3.1.1.1	İnsan Karotis Arter Endotel Hücreleri (HCtAEC) ve Kültür Koşulları.....	34
3.1.1.2	İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri (HCAEC) ve Kültür Koşulları.....	35
3.1.1.3	Nilotinib'in HCtAEC Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	35

3.1.1.4	Elisa Testi İçin Örnek Alınması ve Saklanması	36
3.1.2	ELISA Çalışmaları	36
3.1.2.1	PAI-1 Düzeylerinin Saptanması	36
3.1.2.2	t-PA Düzeylerinin Saptanması	37
3.1.2.3	ET-1 Düzeylerinin Saptanması.....	38
3.1.2.4	vWF Düzeylerinin Saptanması.....	39
3.1.2.5	Total Nitrik Oksit Düzeylerinin Saptanması.....	40-42
4.	BULGULAR	43
4.1	Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi	43-44
4.2	Nilotinibin, Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Sekresyon Fonksiyonu Üzerindeki Etkisi	45-48
5.	TARTIŞMA.....	49-52
6.	KAYNAKLAR.....	53-61

ÖNSÖZ

Yan dal uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, eğitimimin her aşamasında gösterdikleri sabır ve değerli katkılarından dolayı başta Sayın Prof. Dr. Bülent Ündar olmak üzere, Prof. Dr. Fatih Demirkan, Prof. Dr. Güner Hayri Özsan, Prof. Dr. Mehmet Ali Özcan, Doç. Dr. İnci Alacacıoğlu ve tez danışman hocam SayınYrd. Doç. Dr. Özden Pişkin'e içtenlikle teşekkür ederim.

Eğitimim süresince her zaman desteğini hissettiğim, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İlkay Şimşek'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hücre kültür çalışmaları aşamasındaki sınırsız destekleri için, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim görevlisi Sayın Doç. Dr. Yusuf Baran ve araştırma görevlisi Sayın Aysun Adan Gökbulut'a teşekkür ederim.

Tezimin ELISA çalışmaları esnasında gösterdikleri olağanüstü fedakarlık ve yardımlarından dolayı, Sayın Faize Yüksel ve Sayın Sunay Tunalı'ya teşekkür ederim.

Kendileri ile çalışabilme şansını yakalamış olmaktan onur duyduğum, Uzm. Dr. Selda Kahraman, Uzm. Dr. Ömür Gökmen Sevindik ve Uzm. Dr. Şerife Medeni Solmaz başta olmak üzere, tüm İç Hastalıkları Uzmanlık Öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında destek ve sevgileri ile yanımda olan sevgili annem Fatma Katgı, ablam Semra Çalışkan, kardeşim Serap Duman ve büyük bir özlemle varlığını her an yanımda hissettiğim sevgili babam Mehmet Katgı'ya, en derin minnetlerimle teşekkür ederim

Hiçbir zaman destek ve emeklerini esirgemeyen eşim Dr. Nuran Katgı'ya teşekkür ederim.

Son olarak, varlığı ile hayatımı değiştiren, güzelleştirip anlam katan ve babası olmaktan her zaman gurur duyduğum canım oğlum Mehmet Yiğit Katgı'ya sonsuz teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	t(9;22) translokasyonunun kırık noktalarının, Ph kromozomunun ve BCR-ABL1 fuzyon molekülünün sematik gösterimi	6
Şekil 2.2	BCR-ABL1 molekülünün hücre içi sinyal yollarıyla iletişiminin sematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3	İmatinibin kimyasal yapısı	10
Şekil 2.4	imatinib'in etki mekanizması	11
Şekil 2.5	Nilotinibin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.6	Dasatinibin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.7	Tromboembolizmin kalıtsal ve edinsel nedenleri.....	18
Şekil 2.8	Nitrik oksit sentezi.....	22
Şekil 2.9	Endotel disfonksiyonu nedenleri ve fizyopatoloji.....	25
Şekil 2.10	Endotel Fonksiyonunun Değerlendirilmesi.....	28
Şekil 3:1	48. saat hücre proliferasyonu	36
Şekil 3:2	72. saat hücre proliferasyonu.....	36
Şekil 4:1	PAI-1 Standart	43
Şekil 4:2	t-PA Standart	44
Şekil 4:3	ET-1 Standart.....	44
Şekil 4:4	vWF Standart.....	44
Şekil 4:5	Nitrat Standart	45
Şekil 4:6	Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin t-PA Sekresyonuna Etkisi	46
Şekil 4:7	Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin PAI-1 Sekresyonuna Etkisi.....	46
Şekil 4:8	Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin ET-1 sekresyonuna etkisi.....	47
Şekil 4:9	Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin vWF Sekresyonuna Etkisi.....	47
Şekil 4:10	Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Nitrik Oksit sekresyonuna etkisi.....	48
Şekil 4:11	Nilotinibin kültür ortamındaki karotis arter endotel hücrelerinin salgı fonksiyonu üzerine etkisi.....	48

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2:1 İmatinib, nilotinib ve dasatinibin hedefleri.....	11
Tablo 2:2 İkinci Kuşak TKI'lerinin Spesifik Yan Etkileri Ve Risk Faktörleriyle İlişkileri	17
Tablo 2:3 Endotelden salgılanan mediyatörler ve etkileri	20
Tablo 2:4 Ateroskleroz için risk faktörleri.....	24
Tablo 4:1 Nilotinibin, Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi	45

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

KML	: Kronik Myeloid Lösemi
MI	: Myokard Infarktüsü
PAI-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1
t-PA	: Doku Plazminojen Aktivatörü
vWF	: von Willebrand Faktör
ET-1	: Endotelin 1
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
DDR	: Discoidin Domain Receptor
PDGFR	: Platelet-Derived Growth Factor Receptors
KF	: Kronik Faz
AF	: Akselere Faz
BF	: Blastik Faz
IFN	: İnterferon
Ca	: Kalsiyum
VCAM	: Vascular Cell Adhesion Protein
ICAM	: Intercellular Adhesion Molecule
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
LDL	: Low Density Lipoprotein
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
BH4	: Tetrahidrobiopterin
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	: Flavin Mononükleotid
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
GP1b	: Glikoprotein 1 B
HCAEC	: İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri
HCtAEC	: İnsan Aort Endotel Hücreleri
PAOH	: Periferik Arteryel Oklüziv Hastalık
PGI2	: Prostaglandin I-2 (Prostasiklin)
EDHF	: Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör

NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
ELAM	: Endotelial lökosit adezyon molekülü
BFGF	: Basic Fibroblast Growth Faktör
ICAM	: İntersellüler adezyon molekülü
ILGF	: İnsülin Like growth Faktör
TGFB	: Transforming growth faktör-1
EKHF	: Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör

ÖZET

GİRİŞ: Kronik myeloid lösemi (KML) anormal hemopoetik kök hücreden kaynaklanan, klonal myeloproliferatif bir hastalıktır. Tedavisinde tirozin kinaz aktivitesine sahip BCR-ABL1 kimerik proteinini bloke ederek etkinlik gösteren tirozin kinazlar kullanılmaktadır. Nilotinib, imatinibin kimyasal yapısının değiştirilmesi ile elde edilmiş ikinci sıra tirozin kinaz inhibitörüdür. Nilotinibin, periferik arteriyel oklüziv hastalığa neden olduğu ya da özellikle risk faktörüne sahip olan hastalarda var olan riski daha da arttırdığına dair gözlemler olmakla birlikte, henüz hangi mekanizma ile buna yol açtığı gösterilememiştir. Biz de nilotinibin arteriyel endotel hücrelerine toksik etki göstererek endotel disfonksiyonuna ve sonuçta oklüziv hastalığa yol açabileceğini düşündük.

GEREÇLER ve YÖNTEM: Bu çalışmada, kültür ortamında nilotinibe maruz bırakılmış karotis arter endotel hücrelerinin sekretuar fonksiyonları ve canlılıkları incelenmiştir. Endotel fonksiyonlarını değerlendirebilmek için de, endotelden salınan nitrik oksit (NO), von Willebrand faktör (vWF), doku plasminojen aktivatörü (tPA), plasminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve endotelin-1'in (ET-1) salınımı izlenmiştir.

BULGULAR: Nilotinibe maruz kalmayan hücreler ile karşılaştırıldığında, nilotinibin karotis arter endotel hücrelerinin t-PA, NO, PAI-1, vWF ve ET-1 sekresyonunu doza ve süreye bağlı olarak arttırdığı saptanmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER: Bu sonuçlardan yola çıkarak nilotinibin kültür ortamındaki karotis arter endotel hücrelerinin sekretuar işlevlerini, hem koagülan hem de antikoagülan yönde etkiliyor gibi görünmesi net bir yoruma varmayı güçleştirmektedir. Ancak karotis arter endotel hücrelerinin proliferasyonunu baskılıyor olması, bu vasküler olayların, endotel hasarının onarımının gecikmesinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte invitro koşullarda endotel hücreleri üzerindeki bu etkinlik, invivo koşulları doğrudan yansıtmayabilir. Sonuç olarak, bizim araştırmamız nilotinibin kardiyovasküler risk faktörlerine sahip hastalarda ortaya çıkardığı periferik arteriyel oklüzyonların mekanizmasının açıklığa kavuşturulması amacı ile yapılmış öncü bir araştırma niteliğindedir. Bu konuda yapılacak daha ileri araştırmalar ile bu durumun açığa kavuşturulması, KML hastalarının yönetiminde önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Nilotinib, Periferik Arteriyel Oklüziv Hastalık, Endotel Disfonksiyonu

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chronic myeloid leukemia is a clonal myeloproliferative disorder caused by abnormally proliferating hematopoietic stem cell. CML is treated with tyrosine kinases, which block the effect of BCR-ABL1 chimeric protein already possess tyrosine kinase activity. Nilotinib is a second generation tyrosine kinase inhibitor which is synthetically derived from imatinib. There have been concerns about the possible pro-thrombotic effect of nilotinib especially on the patients with cardiovascular risk factors. The potential mechanism behind the increased risk of thromboembolic events is still not clear. We aimed to evaluate the potential harmful effect or effects of nilotinib on the endothelial cells and their functions.

MATERIAL and METHODS: In this study, we aimed to assess the viability and secretory functions of carotid endothelial cells which were cultivated with Nilotinib. In order to assess the endothelial function, NO, von Willebrand Factor, tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and endothelin 1 (secreted from endothelial cells) levels were evaluated.

RESULTS: Nilotinib increased the secretion of t-PA, NO, PAI-1, vWF and ET-1 when compared with nilotinib naive cells in a dose and duration dependent manner.

CONCLUSION: It cannot be explicitly concluded that nilotinib affects the endothelial cell functions in a pro-thrombotic or anti-thrombotic fashion from the results of this study. While suppressing the viability of endothelial cells nilotinib may cause delayed restoration of endothelial damage and may indirectly play a role in vascular events. In addition the results obtained from this in-vitro designed study may not correctly reflect the in-vivo effect of the drug. We may finally conclude that our study is a preliminary pilot study trying to establish the effect of nilotinib on carotid artery endothelial cells. Some further studies may clarify the possible pathogenetic mechanisms involved in the pro-thrombotic process caused by nilotinib and may induce therapeutic approaches to decrease the incidence of this harmful side effect.

KEYWORDS: Nilotinib, Peripheral Arterial Occlusive Disease, Endothelial Dysfunction

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML), myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılan, pluripotent kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı miyeloid hiperplazi, çevresel kanda olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ve splenomegali ile karakterizedir.

KML’de t(9:22) sonucu 22. kromozomun 11q bandındaki BCR geni ile 9. kromozomun q34 bandına yerleşik ABL geninin, 22. kromozom (Ph kromozomu) üzerinde birleşmesi ile BCR/ABL füzyon geni oluşur. Bu genin bir ürünü olan p210 peptidi tirozin kinaz aktivitesine sahiptir.

Tedavisinde, başlangıçta hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre azaltıcı sitotoksik tedaviler (başlıca hidroksiüre ve busulfan) kullanılmıştır. Sonraki dönemde ise biyolojik yanıt düzenleyici ilaçlar (interferon ve interferon/ARA-C kombinasyonu) remisyon sağlama amaçlı olarak kullanılmıştır.

1998 yılında, spesifik BCR tirozin kinaz inhibitörü imatinib mesilat bir ilaç olarak klinik uygulamaya girdikten sonra, KML tedavisinde birinci kuşak tirozin kinaz inhibitörü olan “İmatinib Dönemi” başlamıştır.

İmatinib BCR/ABL tirozin kinazın ATP bağlanma noktasını bloke eder. Bununla birlikte etki gücüne göre sırasıyla; DDR-1 ve 2 > PDGFR- α / PDGFR- β > c-KIT > BCR-ABL tirozin kinazları da etkilemektedir [1].

İmatinib, 400 mg/gün dozunda özellikle kronik fazda hematolojik, sitogenetik ve moleküler remisyon (BCR/ABL füzyon transkriptinin saptanamaması) sağlayabilmektedir. İmatinib tedavisine yanıtız veya ilerleyen dönemde yanıt kaybı olan hastalarda ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu grupta halen ülkemizde de ruhsatlı olarak kullanılabilen dasatinib ve nilotinib etken maddeli iki ajan bulunmaktadır. Bu ajanlarla imatinib tedavisine yanıt vermeyen hastaların yaklaşık %30-40’ında yanıt alınmaktadır [2]. Her iki ajanın da in vitro etkinliği imatinibden çok daha potenttir ve her iki molekül de imatinibe benzer şekilde BCR-ABL tirozin kinazına özgü değildirler.

Nilotinib (AMN107), imatinibin kimyasal yapısının değiştirilmesiyle elde edilmiş yeni bir aminopirimidin türevi tirozin kinaz inhibitörüdür. İmatinibe benzer şekilde BCR/ABL1’in ATP-bağlayıcı bölgesine kompetitif inhibisyonla bağlanarak etki eder, ancak bağlanma affinitesi ve Abl kinaz seçiciliği imatinibden üstündür.

Nilotinib etki gücüne göre sırayla; DDR-1>DDR-2>BCR-Abl (Abl)> PDGFR α / PDGFR β > KIT>CSF-1R tirozin kinazları etkilemektedir [1].

Dasatinib (BMS-354825), hem BCR/ABL1, hem de SAK'ları inhibe edebilen potent bir moleküldür [3]. İmatinibden farklı olarak BCR/ABL1'in hem aktif hem de inaktif formlarına bağlanabilir [4]. En önemli özelliği, BCR/ABL1 yolağından bağımsız olarak Src ailesinin üyelerinin de aktivasyonunu önleyebilmesidir.

TKİ'lerinin sık yan etkileri: Myelosupresyon, gastrointestinal yan etkiler (bulantı, kusma, ishal gibi), mukozit, hipertansiyon, periferik ödem (özellikle imatinible), güçsüzlük, kalp yetmezliği, QT uzaması (özellikle dasatinib ve nilotinible), pankreatit (özellikle nilotinible), plevral effüzyon (özellikle dasatinible), periferik arteriyel oklüziv hastalık (nilotinible) ve muhtemelen trombosit fonksiyon bozukluğu ile ilişkili gastrointestinal kanamadır (dasatinible) [5].

Tıbbi yazında nilotinible ilgili nadir tromboz vakaları bildirilmiştir. Bu yayınlardan Le Coutre P ve arkadaşlarının 179 hastalık retrospektif bir değerlendirmesinde, 11 hastada şiddetli periferik oklüziv arter hastalığı geliştiği raporlanmıştır. Bu vakalardan 10'unda, nilotinib öncesi periferik arteriyel oklüziv hastalık risk faktörlerinin varlığı (HT, DM; dislipidemi, obesite gibi) gösterilmiştir ve nilotinibin önceden var olan aterosklerotik durumu kötüleştirebileceği, nilotinib kullanacak hastalarda kardiyovasküler risk faktörleri açısından dikkatli olunması ve yakın izlemi önerilmiştir [6].

Benzer bir çalışmada da Aichberger KJ ve arkadaşları Nilotinib kullanan 24 hastadan 3'ünde, hızlı ilerleyen oklüziv periferik arter hastalığı geliştiğini ve bu olguların tekrarlayan anjioplasti ve/veya multipl cerrahi gereksinimi duyduklarını raporlamışlardır. Diğer hastalardan birinde şiddetli olmayan periferik arter hastalığı, 1 hastada myokard infarktüsü, 1 hastada spinal infarktüs, 1 hastada supdural hematoma ve 1 hastada da ani ölüm izlendiğini bildirmişlerdir. Bu raporun sonucunda da; etki mekanizması bilinmemekle beraber, nilotinib kullanan hastalarda periferik oklüziv arteriyel hastalığını da içeren vasküler yan etkilerin olabileceğini, bu nedenle nilotinib öncesi ve kullanırken tüm hastalarda mutlaka kardiyovasküler risk faktörlerinin araştırılması ve izlenmesini önermişlerdir [7].

Endotel, damar duvarı ve dolaşan kan arasında tek sıra endotel hücrelerinden oluşmuş fonksiyonel bir bariyerdir. Sentezlediği ve salgıladığı mediatörler ile vasküler hemostazda çok önemli rol oynayan, vücudun her tarafına yayılmış, pek çok yaşamsal faaliyeti yöneten

bir organdır [8]. Normal endotel, antikoagulan, antitrombotik ve fibrinolitik özellikler gösterir. Endotel hasarı durumunda normal endotel fonksiyonları bozulur (endotel disfonksiyonu) ve klinik olarak vazospazm, trombüs oluşması, hipertansiyon, ateroskleroz veya restenoz şeklinde kendini gösterir. Endotel, damar tonusunun belirlenmesi ve bariyer görevi yapması yanında, salgıladığı birçok mediatörle hemostazda çok önemli rol oynamaktadır. Bu işlevlerini yerine getirememesi endotel disfonksiyonu olarak tanımlanır. Endotel disfonksiyonunu göstermede kullanılabilen bir yöntem salgı işlevinin incelenmesidir. Bu amaçla nitrik oksit, von Willebrand faktör (vWF), doku plasminojen aktivatörü (tPA), plasminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), endotelin, CRP, TNF α ve adhezyon moleküllerinin salınımı kullanılabilir [9].

Nilotinibin, periferik arteriyel oklüziv hastalığa neden olduğu ya da özellikle risk faktörüne sahip olan hastalarda varolan riski daha da arttırdığına dair gözlemler olmakla birlikte, henüz hangi mekanizma ile buna yol açtığı gösterilememiştir. Venöz tromboembolik olaylarda daha çok solubl koagulan faktörler ve staz ön planda iken, arteriyel oklüziv patolojilerde ise daha çok endotel hasarı ön plandadır. Bu nedenle, myelosupresyona da neden olan tirozin kinaz inhibitörü nilotinibin, arteriyel endotel hücrelerine de toksik etki göstererek endotel disfonksiyonuna ve sonuçta oklüziv hastalığa yol açabileceğini düşündük ve bu amaçla kültür ortamındaki arteriyel endotel hücrelerinin fonksiyonları üzerindeki etkinliğini araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kronik Myeloid Lösemi

2.1.1 Tanım ve Tarihçe

Kronik myeloid lösemi (KML) anormal hemopoetik kök hücreden kaynaklanan, miyeloid, eritroid, monositer ve megakaryositer serileri etkileyen klonal myeloproliferatif bir hastalıktır [10]. İlk olarak tanımlandığı 1845 yılından yaklaşık yüzyıl sonra, 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından Philadelphia kromozomunun (Ph) gösterilmesi ile birlikte KML yeni bir boyut kazanmıştır [11]. 1985 yılında ise *BCR-ABL* füzyon geni, BCR-ABL kimerik proteini ve bu proteinin tirozin kinaz özelliği tanımlanmıştır [12]. 1998 yılında ise imatinibin BCR-ABL1 proteinini bloke ederek etkilerini inhibe ettiğinin gösterilmesiyle de KML, moleküler mekanizması üzerinden etkili tedavi geliştirilen ilk hastalıklardan olmuştur [13].

2.1.2 İnsidans

Tüm erişkin lösemilerinin yaklaşık %20'sini oluşturan KML'nin yıllık insidansı 1-2/100.000 kadardır. Her yaşta görülmekle beraber tanı yaşı sıklıkla 50 ve 60'lı yaşlar olup, erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülür (E/K: 3/2) [14].

2.1.3 Etyoloji

KML etyolojisinde rol oynayan faktörler net olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın gelişiminde radyasyonun rolü olduğu uzun zamandır düşünülmektedir [15].

2.1.4 Klinik

Hastaların yaklaşık %40'ı tanı anında asemptomatik olup rutin kan tetkikleri esnasında saptanır [16]. Bununla birlikte semptomatik hastaların çoğunluğunda tanı anında, güçsüzlük, kilo kaybı, gece terlemesi ve dalak büyüklüğüne bağlı abdominal

rahatsızlık hissi gibi yakınmalar saptanır [17]. Tipik olarak 3 fazdan oluşur: Kronik faz (KF), akselere faz (AF) ve blastik faz (BF). Tanı anında hastaların yaklaşık %10'u akselere, %10'u blastik ve %80'i kronik fazdadır.

2.1.5 Kronik Faz

Beyaz küre sayısında artışla beraber, kemik iliğinde myeloid seri proliferasyonu ile giden ve genelde komplikasyonların görülmediği evredir. En sık fizik muayene bulgusu hastaların yaklaşık yarısından fazlasında görülen splenomegalidir [18]. Tedavisiz bırakılan hastalarda KF yaklaşık 3 – 6 yıl sürer, ardından AF'a progrese olur ve en son BF'ye girer. Bununla birlikte bazı vakalarda akselere faza girmeden kronik fazdan blastik faza geçiş de görülebilmektedir. Bu dönem çoğunlukla asemptomatik olmakla beraber, yorgunluk, ateş, kemik ağrıları, kilo kaybı ve karında şişkinlik gibi belirtilerle de seyredebilir.

2.1.6 Akselere Faz

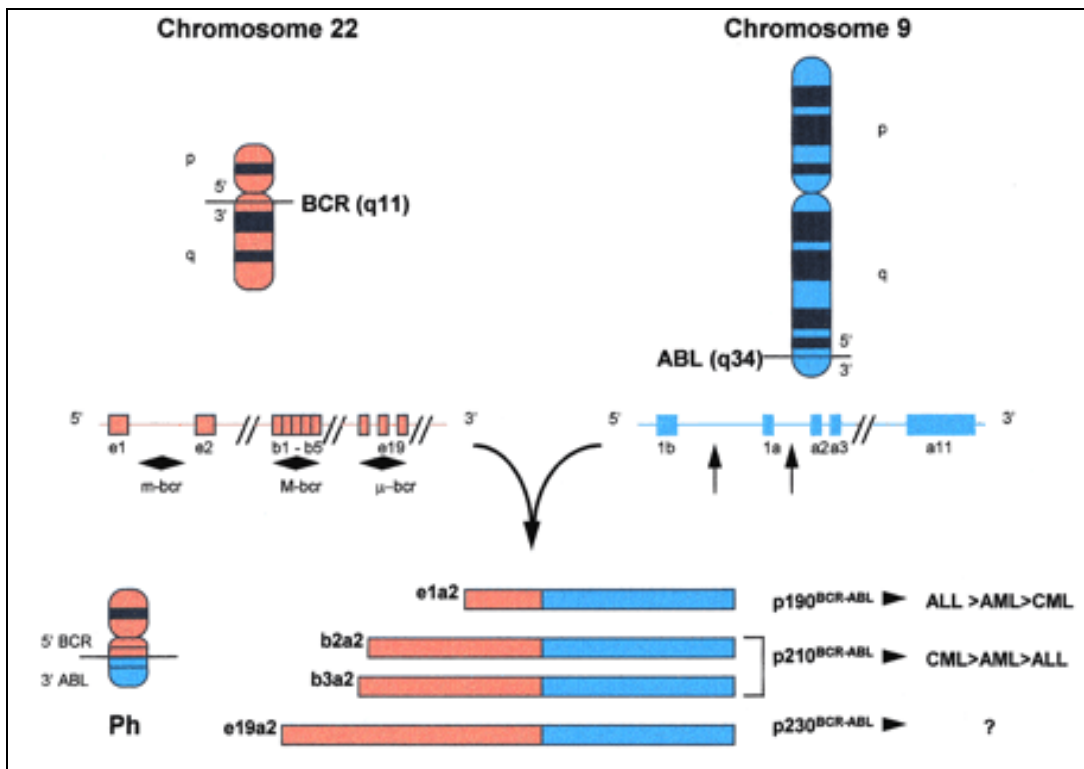
Akselere faz; splenomegali, lökosit sayısında artış, kemik iliği veya çevresel kanda %10-19 blast görülen, tedaviye rağmen artan dalak boyutu olan, çevresel kanda bazofillerde %20 ya da daha fazla artış saptanan, trombositopeni ve klonal evrim (Ph kromozomuna ek sitogenetik anomaliler) gibi belirtilerden bir ya da birden fazlasının görüldüğü fazdır.

2.1.7 Blastik Faz

Kemik iliği veya çevresel kanda %20 ve üzeri blast saptanması veya ekstrameduller blastik hastalığın gösterilmesi ile ortaya çıkan dönemdir. Blastik fazdaki hastaların ortalama yaşam süresi 6 aydan az olup, infeksiyon ve kanama en sık görülen ölüm nedenleridir [19].

2.1.8 KML’de Sitogenetik Değişiklikler

KML hastalarında saptanan sitogenetik anomali, 9. ve 22. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyondur. 9. kromozomdaki Abelson (ABL) protoonkogeni ile 22. kromozomdaki breakpoint cluster region geninin (BCR) 22. Kromozom üzerinde füzyonuna yol açan resiprokal bir translokasyon [t(9;22) q34;q11] sonucu ortaya çıkmış anormal 22. Kromozom olan phledelphia (Ph) kromozomu, KML olgularının yaklaşık %95’inde saptanmaktadır [20, 21].



Şekil 2.1: t(9;22) Translokasyonunun Kırık Noktalarının, Ph Kromozomunun ve BCR-ABL1 Füzyon Molekülünün Şematik Gösterimi [22].

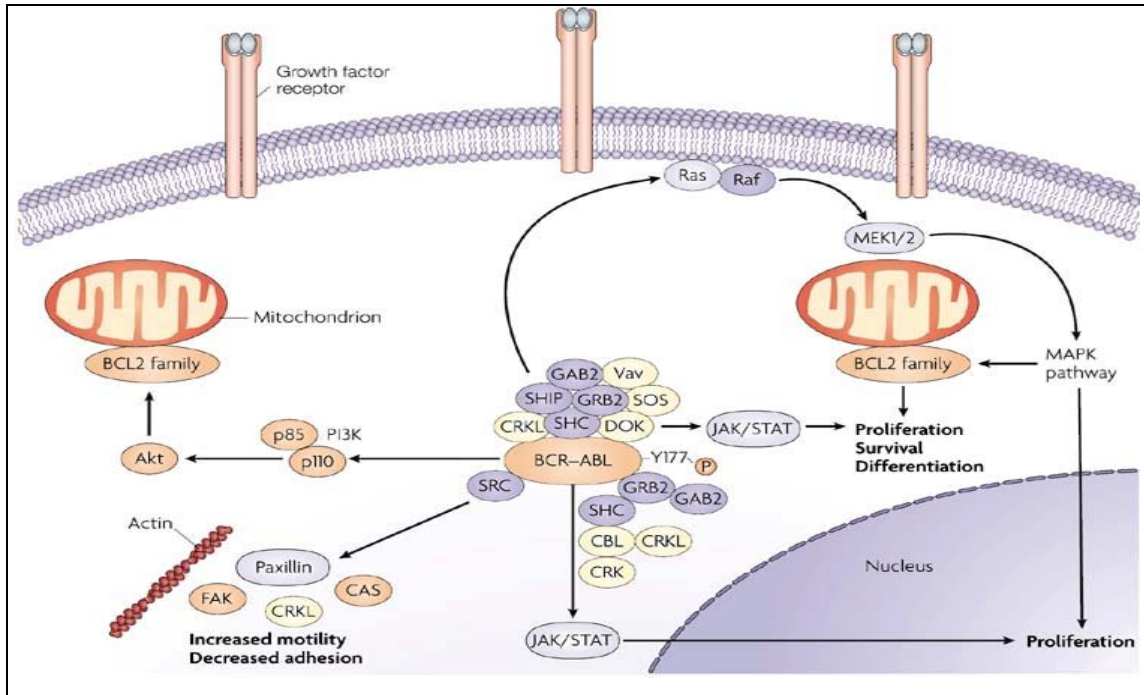
2.1.9 BCR/ABL Geni

Bu translokasyon sonucunda bir füzyon geni olan BCR/ABL oluşur. Bu rekombinan füzyon geninin BCR genindeki kırılma noktasına göre, her biri farklı bir protein ekspresyonu ile beraber olan 3 farklı tipi vardır: P190 ekspresyonu Ph pozitif akut lenfoblastik lösemide, P210 ekspresyonu KML’de ve P230 ekspresyonu da kronik nötrofilik lösemi ve bazı atipik KML olgularında görülür.

2.1.10 BCR/ABL Geni ve Sinyal İleti Yolakları

Tirozin kinaz aktivitesine sahip olan BCR/ABL1 aktivasyonu ile hücre içinde birçok sinyal yolağı aktive olur. Onkogenik BCR/ABL proteinleri çeşitli sinyal ileti yolaklarını değiştirerek hücre çoğalması, adezyonu, migrasyonu ve DNA tamir mekanizmalarını etkiler. Bu yollardan çoğu normalde IL-3, GM-CSF ve trombopoetin gibi hematopoetik büyüme faktörleri ile aktivasyonları düzenlenen yollardır. Çoğu modelde BCR/ABL1 aktivasyonunun, öncül hematopoetik hücrelerde bu büyüme faktörlerine gereksinimi azaltarak ya da yok ederek etki ettiği gösterilmiştir [23].

BCR/ABL füzyon geninin tirozin kinaz aktivitesi ile Ras, Raf, PI3K, JNK/SAPK, Crkl ve STAT5 aktivasyonu meydana gelerek, myeloid hücre apoptozu inhibe olmakta ve proliferasyon uyarılmaktadır. Bu yollardan en iyi tanımlanmış birkaçı aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 2.2: BCR-ABL1 Molekülünün Hücre İçi Sinyal Yolaklarıyla İletişiminin Şematik Gösterimi [24].

2.1.10.1 Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Yolağı

Hematopoetik hücre proliferasyonu ve farklılaşması; IFN'lar, interlokinler ve koloni uyarıcı faktörler olarak bilinen bir grup polipeptid yapılı sitokinlerin hücre yüzeyindeki

reseptörlerine bağlanmasını takiben, Janus kinaz (JAK) adı verilen kinazların, dimerize olarak aktive olmasıyla meydana gelmektedir. Dimerize JAK'lar STAT adı verilen molekülleri aktive eder. STAT'lar ise özellikle büyüme faktörleri üzerinden hücre büyümesini ve hücre sağkalımına etki eden genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir. BCR-ABL kimerik proteini ise, hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak, çoğalma ve transformasyonu indükler. Bu onkoprotein JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına yol açar. Artmış STAT 3 ve STAT 5 aktivitesinin, onkojenik transformasyonda rolü olduğu düşünülmektedir [25].

2.1.10.2 Ras Yolağı

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri ve tümör promotör maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf, MEK ve Erk (MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri ve tümör promotör maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar.

Ras yolağı aktivasyonunun malign transformasyon için tek başına yeterli olmayan, ancak hastalık için gerekli bir antiapoptotik etki oluştuğu gösterilmiştir [23].

2.1.10.3 Src Ailesi Kinazları

BCR/ABL1 aktivasyonunun downstream'inde görev alan Src ailesi kinazları (SAK) BCR/ABL1' den bağımsız olarak diğer molekülleri aktive edebilmeleri açısından önem taşır. Bu moleküller hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalımı ile ilgili yolaklarda yer alan nonreseptör tirozin kinazlardır. SAK'lar KML onkogeninde BCR/ABL1 ile işbirliği yaparlar. İmatinib tedavisine direnç gelişiminde rol aldığı düşünülen SAK'ların patogenezdaki yeri anlaşıldıkça tedavide hedef olarak kullanılmaları gündeme gelmiştir [26].

2.1.10.4 Phosphotidyl Inositol 3 Kinase (PI3K) Yolağı

Fosfoinozotidil-3 kinaz (PI3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir [27]. PI3K aktifleşmesi ile aktive edilen Protein kinaz B uyarısının da apoptoz üzerinde doğrudan etki göstererek antiapoptotik cevabı desteklemektedir [27].

2.1.11 KML'de Tanı

KML tanısı, periferik kan yayması veya kemik iligi incelemesi ile birlikte, sitogenetik ya da moleküler sitogenetik yöntemlerle Ph varlığının ya da moleküler düzeyde BCR/ABL füzyon geninin gösterilmesiyle konur [20].

2.2 KML'de Tedavi

2.2.1 Konvansiyonel Kemoterapi ve İnterferon- α Tedavisi

KML tedavisinde uzun süre, hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre azaltıcı sitotoksik tedaviler (başlıca hidroksiüre ve busulfan) kullanılmış, fakat bu tedavilerle palyasyon hedefinin ötesine geçilememiştir. Sonraki dönemde biyolojik yanıt düzenleyici ilaçlar (interferon ve interferon/ARA-C kombinasyonu) sitogenetik remisyon sağlama amaçlı olarak kullanılmıştır.

Hidroksiüre ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek DNA sentezini engelleyen bir moleküldür. Şu an için KML'deki kullanım yeri sadece, lökostat komplikasyonlarını önlemek amacı ile lökosit sayısını hızlıca düşürmektir [28].

Yine imatinib öncesi dönemde kullanılan Interferon- α tedavisi ile kısmi hematolojik ve sitogenetik yanıtlar alınmışsa da (%15-30 olguda), sağkalımda uzama sadece sitogenetik yanıt alınan olgularda görülmüştür [29].

2.2.2 Allogenik Kök Hücre Nakli

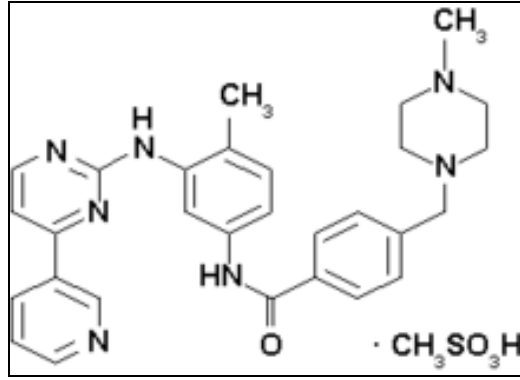
KML'nin bilinen tek küratif tedavisi olarak otuz yıllık bir geçmişe sahiptir [30]. Allogenik kök hücre nakli uzun süreli remisyon sağlaması ve %50'ye varan kür oranları ile imatinib öncesi dönemde önemli bir tedavi seçeneği olarak yer almıştır [31]. Buna karşılık transplantasyonun erken dönem morbidite ve mortalitesi tedavi seçiminde dezavantaj olarak ele alınmaktadır. İmatinibin tedavide kullanıma girmesi ile yapılan transplantasyon sayılarında hızlı bir düşüş olmuş ve ilk tedavi seçeneği olmaktan çıkarılarak sadece seçilmiş hastalarda yapılmaya başlanmıştır.

2.2.3 Tirozin Kinaz İnhibitörleri

2.2.3.1 İmatinib Mesilat

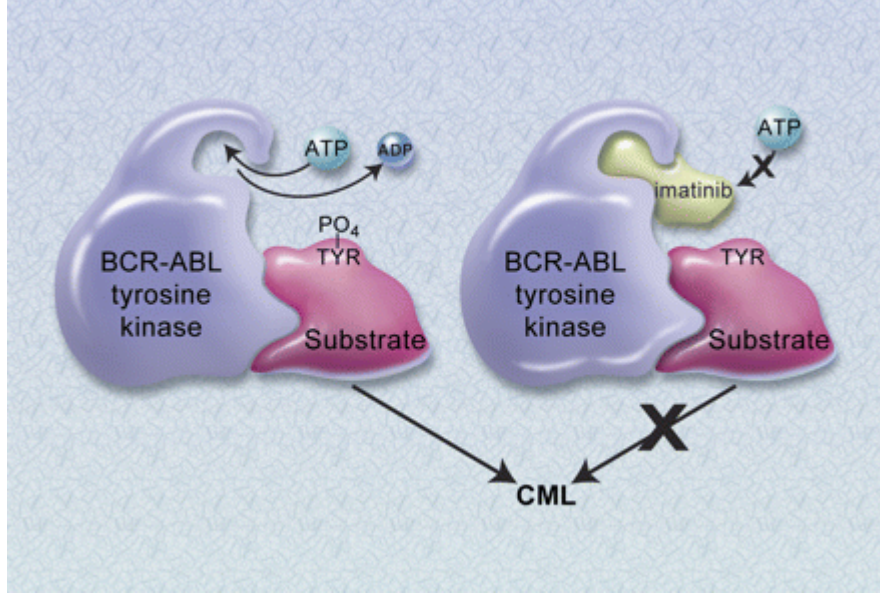
İmatinib Abl-özgü tirozin kinazı inhibe eden 2 -phenylaminopyrimidine türevi bir moleküldür. 1998 yılında spesifik BCR/ABL tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilat bir ilaç olarak klinik uygulamaya girdikten sonra, KML tedavisinde yeni bir dönem başlamıştır [32].

İmatinib tedavisi ile beraber de KML hastalarının toplam sağkalım oranları dramatik olarak artmıştır.



Şekil 2.3: İmatinibin Kimyasal Yapısı

İmatinib, p210 onkoproteininin ATP bağlanan bölgesine kompetitif inhibisyonla bağlanarak ATP'nin bağlanmasını bloke eder ve böylece ATP'den fosfor transferi engellenerek BCR/ABL proteininin inaktif formda kalmasını sağlar. Sonuç olarak BCR/ABL1 sinyal iletiminde görevli proteinlerin tirozin fosforilasyonu inhibe olur, bu sayede sinyal ileti yollarını bloke ederek hücre büyümesinin duraklamasına ve hücre ölümüne neden olur.



Şekil 2.4: İmatinibin Etki Mekanizması [33].

İmatinibin Etki Spektrumu

İmatinib sadece BCR-ABL inhibisyonu yapmaz (Tablo 2:1). Aslında etki gücüne göre sırasıyla DDR-1 ve DDR-2 > PDGFR- α ve PDGFR- β > c-KIT > BCR/ABL tirozin kinazlarını etkilemektedir [1].

Tablo 2:1 İmatinib, Nilotinib ve Dasatinibin Hedefi Olan Tirozin Kinazlar [34].

İmatinib	Nilotinib	Dasatinib				
ABL	ABL	ABL	FRK	EPHA2	GCKHH498/TNN13K	MYT1
ARG	ARG	ARG	CSK	EPHA3	ILK	NLK
BCR-ABL	BCR-ABL	BCR-ABL	BTK	EPHA4	LIMK1	PTK6/Brk
KIT	KIT	KIT	TEC	EPHA5	LIMK2	QIK
PDGFR	PDGFR	PDGFR	BMX	EPHA8	MAP2K5	QSK
DDR1	DDR1	SRC	TXK	EPHB1	MAP3K1	RAF1
NQO2	NQO2	YES	DDR1	EPHB2	MAP3K2	RET
		FYN	DDR2	EPHB4	MAP3K3	RIPK2
		LYN	ACK	EPHB6	MAP3K4	SLK
		HCK	ACTR2B	ERBB2	MAP4K1	STK36/ULK
		LCK	ACVR2	ERBB4	MAP4K5/KHS1	SYK
		FGR	BRAF	FAK	MAPK11/p38 beta	TAO3
		BLK	EGFR/ERBB1	GAK	MAPK14/p38 alfa	TESK2
						TYK2
						ZAK

Yan Etkiler

Genel olarak iyi tolere edilen bir molekül olup hafif veya orta derecede yan etkileri vardır. En sık görülen yan etkiler; periferik ve periorbital ödem (%60), bulantı (%55), kas krampları (%50), döküntü (%30) ve ishaldir (%30) [35]. Doza bağımlı olarak karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk ve myelosüpresyon görülebilir [36].

Hematolojik toksiteleri incelendiğinde ise; derece 3/4 nötropeni (%35), trombositopeni (%20) ve anemi (%10) görülmektedir.

Bu yan etkiler sıklıkla tedavinin ilk 4 haftasında ortaya çıkmakta ve ilaca bağlı yan etkiler nedeniyle tedavinin sonlandırılması hastaların ancak %5 kadarında görülmektedir. Myelosüpresyona bağlı gelişen sitopeniler tedaviye birkaç gün ara verdikten sonra düzelebilmektedir.

İmatinible ilişkili endişe verici kardiyovasküler toksite oranları ise; derece 3/4 ödem %1.3, hipertansiyon %1, hipotansiyon %0.7 ve iskemi/infarktüs %0.08 ile çok düşük oranlarda görülmektedir [37].

İmatinib Direnci

Primer imatinib direnci, 3. ayda tam hematolojik yanıt elde edilmemesi, 6. ayda herhangi bir sitogenetik yanıt elde edilememesi, 12. ayda kısmi sitogenetik yanıt elde edilememesi veya 18. ayda tam sitogenetik yanıt elde edilememesi olarak kabul edilirken, hastalığın herhangi bir devresinde tam hematolojik yanıt kaybı, tam sitogenetik yanıt kaybı veya hastalık ilerlemesi durumu, kazanılmış direnç (yanıt kaybı) olarak ifade edilmektedir [38].

İlk sırada imatinib kullanımıyla sağlanabilen çok iyi yanıt oranlarına rağmen, hastaların yaklaşık üçte biri yetersiz yanıt veya toksisite nedeni ile tedaviye devam edememektedir [39]. Bununla birlikte imatinible tedavi edilen kronik faz KML olgularında yıllık progresyon oranı ise %4'tür [40].

2.2.3.2 İkinci Kuşak Tirozin Kinaz İnhibitörleri

İmatinibin sağladığı yüksek yanıt oranlarına rağmen ilacı tolere edemeyen, imatinib tedavisine yanıtızsız veya ilerleyen dönemde yanıt kaybı olan hastalarda ikinci kuşak tirozin

kinaz inhibitörleri iyi bir tedavi alternatifi olmuştur. Bu grupta halen ülkemizde de ruhsatlı olarak kullanılabilen, dasatinib ve nilotinib etken maddeli iki ajan bulunmaktadır. Bu ajanlarla imatinib tedavisine yanıt vermeyen hastaların yaklaşık %30-40'ında yanıt alınmaktadır [2].

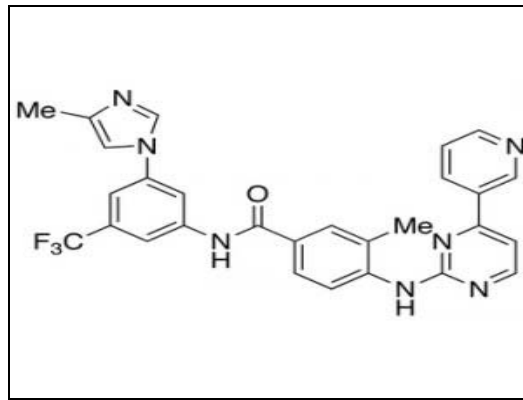
İkinci kuşak TKİ'lerinin imatinibden daha etkili olmaları, BCR/ABL üzerinde daha güçlü etkileri ve ilave hedefleri olması nedeniyledir [41]. Ancak bu ilave hedefler, non-hematolojik hücrelerden de eksprese edilebilen moleküller olduğundan, bu kuşak ilaçların non-hematolojik hedeflerinden de sorumlu olabilirler. Bu yan etkiler pek çok hastada hafif orta derecede ve organ hasarı yapmadan yönetilebilen yan etkiler olmakla beraber, bazı hastalarda yaşamı tehdit edebilecek boyutta da olabilmektedir.

2.2.3.3 Nilotinib

Nilotinib, imatinibin kimyasal yapısının değiştirilmesiyle elde edilmiş aminopirimidin türevi tirozin kinaz olup, BCR/ABL kinaz inhibisyonu etkisi imatinib duyarlı KML hücreleri üzerinde imatinibden 20-50 kat, imatinib dirençli KML hücreleri üzerinde ise 3-7 kat daha potent olan ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörüdür [42].

İmatinibe benzer şekilde BCR/ABL1'in ATP-bağlayıcı bölgesine kompetitif inhibisyonla bağlanarak etki eder, ancak bağlanma affinitesi ve Abl kinaz seçiciliği imatinibden üstündür.

Yapılmış 2 faz II çalışma sonrasında 2007 yılında imatinibe dirençli veya intoleran kronik faz KML ve akselere faz KML olgularında FDA onayı almıştır [43, 44].



Şekil 2.5: Nilotinibin Kimyasal Yapısı

Farmakokinetik:

İmatinibe benzer şekilde sadece BCR/ABL inhibisyonu yapmaz. Nilotinibin inhibe ettiği kinazları araştıran bir farmakodinamik çalışmada nilotinibin etkinlik gücü sırasıyla; DDR-1 > DDR-2 > BCR/ABL (Abl) > PDGFR- α /PDGFR- β > KIT > CSF-1R olarak ifade edilmiştir [1].

Nilotinibin farmakokinetiğinin araştırıldığı bir başka çalışmada standart 400 mg/gün/iki kez dozunda ilaç kararlı plazma konsantrasyonu ortalama C_{min} değeri 1.8 μ M ve ortalama C_{max} değeri de 4.0 μ M olarak saptanmıştır [45].

Yan Etkiler

Nilotinibin yeni tanı kronik faz KML hastalarında etkinlik ve güvenilirliğini gösteren, çok merkezli (35 ülke-217 merkez), 846 olgunun alındığı, randomize, nilotinib 600 mg/gün, nilotinib 800 mg/gün ve imatinib 400 mg/gün dozlarının karşılaştırıldığı ENESTnd çalışmasında: Primer sonlanım noktası 12. Ayda MMY, sekonder sonlanım noktası ise 24. ayda kalıcı MMY olarak dizayn edilmiştir. Bu çalışmada hematolojik yan etkileri imatinibe benzer şekilde raporlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda nilotinibin iyi tolere edilen, kabul edilebilir toksite profili olduğu sonucuna varılmıştır [46]. En sık görülen derece 3/4 hematolojik toksiteler, nötropeni (%29) ve trombositopenidir (%29). Yine aynı çalışmada QT mesafesinde uzama hastaların %1'inde görülmüştür [43].

Nilotinible gelişebilen nonhematolojik toksiteler ise; açlık kan şekeri, bilirubin seviyesinde ve pankreatik enzimlerde yükselme, diare, deri döküntüleri ve kanamadır [47].

Bu sıkça görülen nonhematolojik toksiteler dışında, bazı yayınlarda imatinibden nilotinibe tedavi değişikliği sonrası hızlı ilerleyen ve tedaviye dirençli, şiddetli periferik arteriyel oklüziv hastalık (PAOH) ve diğer vasküler tıkaçıcı olaylar (infarktüs) bildirilmiştir [6, 7].

Nilotinible klinik olarak ciddi plevral effüzyon gelişimi nadirdir, bunun aksine dasatinible bildirilmiş PAOH vakaları görülmemiştir. Ancak bu yan etkilerin her iki ajan içinde ilaç alımıyla ilişkisi veya o ilaca spesifik yan etkiler olduğu prospektif çalışmalarla konfirme edilmemiştir. Son veriler bu yan etkilerin geliştiği hastalarda önceden komorbid risk faktörlerinin varlığını ifade etmektedir. Nilotinib kullanımı esnasında bu tür yan etkiler

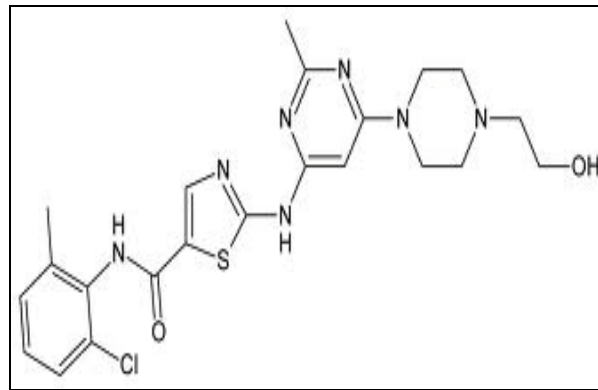
gelişen hastalarda, bu risk faktörlerinden (sigara, arterial hipertansiyon, diabetes mellitus, obesite ve yaş gibi) bir veya daha fazlası saptanmış olmakla beraber, bu hastaların niçin bazılarında hızlı ilerleyen, şiddetli, tedaviye dirençli, tekrarlayan, cerrahi tedaviler ve amputasyon gerektirebilen arteriyel olayların geliştiği bugün için bilinmemektedir.

Gelişen bu vasküler yan etkiler için bazı potansiyel açıklamalar vardır; nilotinibin metabolik etkileri, nilotinibin vasküler hücreler üzerinde direkt etkisi ve koagülasyon ve/veya fibrinolitik sistem üzerine ilaç etkisi varsayımları vardır. Bununla birlikte mevcut risk faktörlü hastalarda gelişiyor da olsa bu vasküler olayların gelişiminde altta yatan mekanizma kesin olarak açıklanamamıştır [48].

2.2.3.4 Dasatinib

İmatinib ve nilotinibden tamamen farklı kimyasal yapısı olan dasatinib, BCR/ABL ve SRC kinaz ailesinin (SRC, LCK, YES ve FYN) potent inhibitörüdür ve BCR/ABL'nin hem aktif hemde inaktif formlarına bağlanabilmesi, geniş bir etki spektrumu olmasını sağlar [4, 49].

Dasatinibin de imatinib ve nilotinib gibi ilave hedefleri vardır. BCR-ABL ve SRC kinaz ailesinin inhibisyonuna ilaveten KIT, PDGFR, ve ephrin receptor (EphA2) tyrosine kinaslarında inhibe eder [49].



Şekil 2.6: Dasatinibin Kimyasal Yapısı [50].

Yan Etkiler

Ashnda dasatinibin kabul edilebilir toksite profili vardır ve gelişen bu yan etkiler olasılıkla geniş bir kinaz inhibisyon spektrumu olması nedeniyle [51]. Dasatinible ilgili hematolojik toksiteler incelendiğinde; derece 3/4 nötropeni, trombositopeni ve anemi gelişimi sırasıyla %21, %10 ve %6 olarak raporlanmıştır.

Yeni tanı KML hastalarında birinci sıra kullanım endikasyonu aldığı DASİSİON çalışmasında, 519 yeni tanı kronik faz KML hastasında imatinib 400 mg/gün dozlamıyla, dasatinib 100 mg/gün dozları karşılaştırılmıştır. Dasatinible gelişen derece 3/4 nötropeni ve anemi imatinible benzer sıklıkta iken, trombositopeni oranı imatinibden daha yüksek bulunmuştur (%19'a karşılık %10). Aynı çalışmada en sık nonhematolojik toksiteleri ise; bulantı, kusma, kas ağrıları, deri döküntüleri, sıvı retansiyonu ve baş ağrısı olarak ifade edilmiş ve gelişen plevral effüzyon imatinib kolunda %0 iken dasatinib kolunda %10 olarak bulunmuştur [52].

Dasatinibin invitro çalışmalarda trombositopeniden bağımsız trombosit fonksiyon bozukluğu yaptığı gösterilmiştir. 140 mg/gün dozlamında çoğunluğu epistaksis ve gastrointestinal sistem olmak üzere, dasatinib alan vakaların %40'ında GİS kanama raporlanmış olup bu olguların % 10'u derece 3 ve 4'tür [53]. Bununla birlikte halen tedavi dozu olan 100 mg/gün ile bu oranlar çok düşük düzeydedir.

Dasatinible gelişen bu yan etkiler tıpkı nilotinible gelişen yan etkilerde olduğu gibi, hiçbirisinin özellikle ilaç ilişkili olduğu ve TKİ 'e spesifik oldukları prospektif çalışmalarla konfirme edilmemiştir. Ayrıca oluşan bu yan etkiler için tanımlanmış risk faktörleri ve komorbid durumlar da söz konusudur (Tablo 2:1).

Tablo 2:2 İkinci Kuşak TKİ'lerinin Spesifik Yan Etkileri ve Risk Faktörleriyle İlişkileri [48].

	Dasatinible Gelişen Plevral Effüzyon	Nilotinible Gelişen PAOH
Kanıtlanan risk faktörleri	Yüksek doz Günde iki doz Tedavi süresi KML süresi AF/BF Kardiyak öykü Arteriyel HT Otoimmün hastalık öyküsü Hiperkolesterolemi Yaş	Arteriyel HT Obesite Sigara içimi Hiperkolesterolemi DM Önceki PAOH öyküsü
Potansiyel Risk Faktörleri	Pulmoner HT Pulpmoner hastalık Enfeksiyon Viral reaktivasyon Alerjik/atopik hastalık İmmün hücre aktivasyonu	Nilotinibe bağlı AKŞ artışı İmatinib sonrası kullanım Tedavi süresi KML nin fazı

2.3 Hemostaz

Hemostaz, bütünlüğü bozulmuş bir damarda kanamayı durdurmayı sağlayan mekanizmaların tümüne verilen isimdir. Bu sistem, travma, cerrahi girişim, endotoksinler gibi damarın endotel tabakasını bozmak suretiyle kanın endotel altı bağ dokusu ile temas etmesine neden olan durumlarla başlatılır. Bu süreç son derece dinamik, iç içe geçmiş çoklu basamaklarla gerçekleşmektedir [54]. Temel olarak 4 basamaktan oluşmaktadır;

- 1) Trombosit plak formasyonu oluşması
- 2) Pıhtılaşma kaskadının aktivasyonu
- 3) Antitrombotik kontrol mekanizmaları ile pıhtılaşmanın sonlandırılması
- 4) Pıhtının fibrinoliz ile ortadan kaldırılması

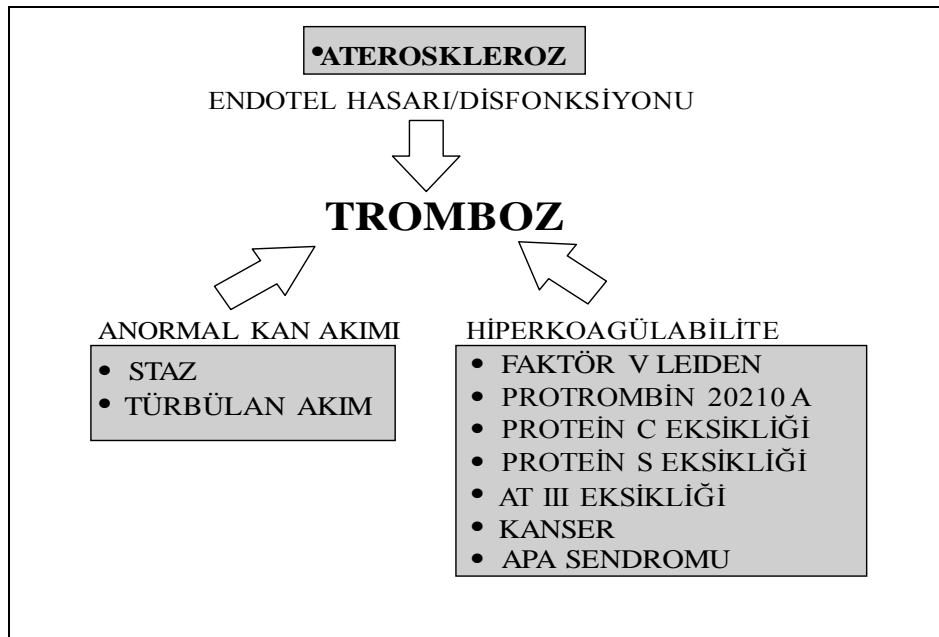
Hemostaz sağlamak için pıhtılaşma sistemi, doğal antikoagulanlar ve fibrinolitik sistem denge halinde olmalıdır. Bu dengenin prokoagülan yönde bozulması anormal tromboz, antikoagülan yönde bozulması durumunda da kanamaya neden olabilir. Damar endotel hücreleri, trombositler, vWF, doku faktörü, pıhtılaşma proteinleri, fibrinolitik sistem ve antikoagülan proteinler hemostaz sisteminin ana elemanlarını oluştururlar. Normal koşullar altında kanın pıhtılaşma fonksiyonu baskın değildir. Ancak, damar duvarında herhangi bir nedenle zedelenme olduğu zaman pıhtılaşma mekanizması aktive olur ve pıhtı oluşumuyla kan kaybı önlenir. Eğer oluşan pıhtı serbest kan akımını engelliyorsa buna trombüs denir.

Trombojenik faktörler, damar duvarı hasarı, trombosit aktivasyonu, kan koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu, fibrinolizin inhibisyonu ve kan akımında stazdır.

Bu nedenle trombozdan korunmada 3 etmenin varlığı temel faktördür:

- 1) Sağlam damar duvarı (endotel)
- 2) Normal kan akımı
- 3) Normokoagülabilité

Bu koruyucu faktörlerden bir veya daha fazlasında oluşabilecek patolojiler tromboza eğilim yaratmaktadır.



Şekil 2.7: Tromboembolizmin Kalıtsal ve Edinsel Nedenleri

Hemostatik mekanizmalar, damar duvarı ve subendotelyal dokular, dolaşımdaki trombositler ve plazmadaki pıhtılaşma faktörleri arasında çok yönlü etkileşim ile gerçekleşirler. Hemostaz, yapı ve işleyiş bakımından birincil ve ikincil hemostaz olarak ayrı ayrı ele alınır.

Birincil hemostazda, damar hasarı olan bölgede önce endotelden çeşitli maddeler salınır ve vazokonstriksiyon olur. Bunu, uyarılan trombositlerin subendotelyal dokulara adhezyonu ve agregasyonu sonucu trombosit tıkaçı oluşumu, yani primer hemostatik mekanizma izler. Bu olay, hasarı izleyen saniyeler içerisinde gelişir. Esas olarak kapillerlerden, küçük arteriol ve venüllerden kan kaybının durdurulması bakımından önem taşır.

İkincil hemostaz ise plazma pıhtılaşma sistemi reaksiyonlarını kapsar ve sonuçta fibrin oluşur. Bunun tamamlanması birkaç dakika alır. Oluşmuş olan fibrin lifleri birincil hemostaz tıkaçının oluşmasını artırır. İkincil hemostaz daha büyük damarlarda önem taşır ve hasarı izleyen saatler ya da günler sonra kan kaybının önlenmesini sağlar. Aslında primer ve sekonder hemostaz birbirini aktive eder ve yakın ilişki içinde bulunur. Diğer taraftan, antirombotik mekanizmalar aşırı pıhtı oluşumunu engellerken, pıhtı fibrinoliz ile temizlenir.

Sonuçta hemostatik sistem, şu beş önemli sistemde bağlantılı olarak stimüle edici ya da inhibe edici yolların mozaikliğinden oluşan bir bütündür: Kan damarları, trombositler, pıhtılaşma faktörleri, pıhtılaşma inhibitörleri ve fibrinolitik sistem.

2.4 Endotel

2.4.1 Tanım

Endotel, damar duvarı ve dolaşan kan arasında tek sıra endotel hücrelerinden oluşmuş, kanın akıcılığında sorumlu fonksiyonel bir bariyerdir. Bu yapı öncelikle, dolaşımdaki trombositlerle yüksek trombojenik özellikli subendotelyal bağ doku arasında bir bariyer görür. Ayrıca sentezlediği ve salgıladığı mediatörler ile vasküler hemostazda çok önemli bir rol oynayan, kalpten en küçük damarlara kadar uzanan vücudun her tarafına yayılmış, pek çok yaşamsal faaliyeti yöneten ve vasküler homeostazisin ana belirleyicisi olan bir organdır [8].

2.4.2 Normal Endotel ve Fonksiyonları [55].

- 1) Vazodilatör ve vazokonstriktör mediatörlerin salınımı ile vasküler tonusun kontrolü
- 2) Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin sentezi-salınımı (Tablo 2:2)
- 3) Çevre dokulara dolaşımdan madde geçişini düzenleyen yarı geçirgen bariyerin devamlılığının sağlanması
- 4) Lökositler ve trombositlere nontrombojenik yüzey sağlanması
- 5) Arter duvarındaki lipoproteinlerin değişimi ve oksidasyonu
- 6) Bazal mebran yapısındaki proteoglikan ve kollagenin devamlılığının sağlanması

2.4.3 Endotel Fizyolojisi

Endotel, damar düz kası ile lümeni arasında uzanan bazal membran üzerinde yerleşmiş tek sıralı yassı epitel hücrelerden oluşan bir dokudur. Erişkin bir insanda endotel hücre kitlesi 4000-7000 m² alan kadar yer kaplar ve yaklaşık 1 kg ağırlığındadır [56].

İlk kez anatomik olarak keşfedildiği 19. yüzyıldan Furchgott ve arkadaşlarının 1980'li yıllarda endotele bağımlı vazoreaktiviteyi tanımladığı zamana kadar endotel, su ve küçük moleküllerin değişimini sağlayan ve damar duvarının iç yüzeyini döşeyen basit bir bariyer olarak düşünülürdü. Oysa endotel, tek katlı basit yapısına rağmen dolaşan kan ve dokular arasında biyoaktivitesi olan bir yapıdır. Endotel hücreleri kan akımını düzenlediği gibi bazal vazomotor tonüsü de düzenlerler. Bu işlev, vazodilatasyon için nitrik oksit ve prostasiklin (PGI₂), vazokonstrüksiyon içinse endotelin gibi faktörlerin endotel hücrelerinden salınımı ile sağlanır. Normal koşullarda endotel damarı görece dilate durumda tutmak üzere işlev görür. Bununla birlikte, yırtılma (shear) stresi gibi değişik fiziksel uyarılara tepki verme kapasitesine de sahiptir.

2.4.4 Endotelden Salgılanan Mediatörler

Tablo 2.3: Endotelden Salgılanan Mediyatörler ve Etkileri [57].

Vazodilatörler	Vazokonstrüktörler	Uyarıcılar (Promoter)	Baskılayıcılar (İnhibitör)	Adezyon molekülleri	Trombolitik Faktörler
Nitrik Oksit	Endotelin-1	PDGF	Nitrik Oksit	ELAM	t-PA
Bradikinin	Angiotensin II	BFGF	Prostasiklin	ICAM	PAI-1
Prostasiklin	Tromboxan A2	ILGF	Bradikinin	VCAM	Trombomodülin
Serotonin	Serotonin	ET-1	Heparan sülfat		
Histamin	Araşidonik Asit	Anjiotensin	TGFB		
Supstans P	Prostoglandin H2				
EKHF	Trombin				

Vasküler tonus kontrolü, vazodilatör ve vazokonstrüktör mediatörler arasındaki denge tarafından sağlanır. Endotelden salgılanan en önemli vazodilatatör NO olmakla beraber, prostasiklin (PGI₂), bradikinin, serotonin, histamin, substans P ve endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) gibi diğer vazodilatör mediatörleride

salgılamaktadır. Endotel tarafından salgılanan vazokonstrüktör mediatörler ise; anjiotensin benzeri madde, endotelin (ET-1), Tromboxan A2, serotonin, araşidonik asit, prostaglandin H2 ve trombindir [58].

Endotel disfonksiyonu varlığında serotonin gibi trombosit kaynaklı mediatörler vazokonstrüksiyonu indüklerler. Bu vazokonstrüktör yanıt, ET-1 ile arttırılır böylece erken ve ilerlemiş evrede aterosklerozlu hastaların plazmalarında artmış düzeyde saptanır [59].

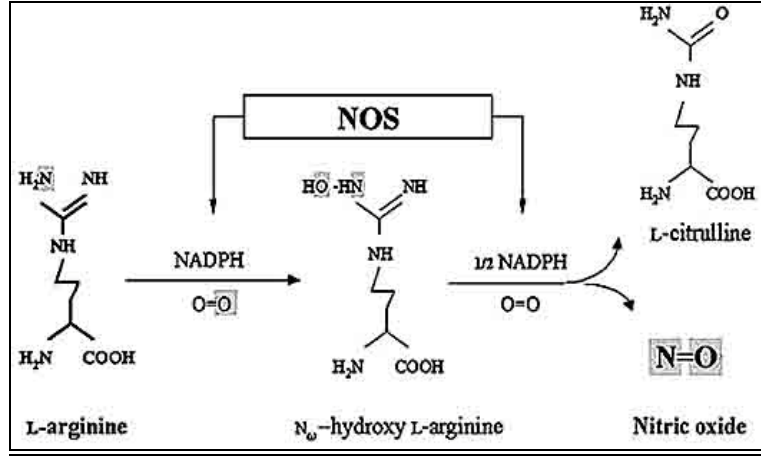
2.4.5 Nitrik Oksit

İlk olarak 1979 yılında endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak isimlendirilen ve vasküler düz kas hücrelerinde relaksasyon yaptığı gösterilen molekülün, 1987 yılında yapılan çalışmalarda NO ile aynı madde olduğu anlaşılmıştır.

NO vasküler hemostazın major düzenleyicisidir ve bu düzenleme işini değişik yollarla yapmaktadır. Endotel hücrelerince sürekli üretilen düşük miktardaki NO, vasküler düz kas hücrelerinin üzerinde etki göstererek bazal vasküler tonusun korunmasında anahtar rol oynar [9].

Nitrik Oksit Sentezi

L-argininin N terminalinden, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenir ve endotele bağlı relaksasyonun temelini oluşturur. Reaksiyon sonrasında L-argininden NO ve citrulline sentezlenmekte olup, bu reaksiyonda oksijen ve NADPH kosubstrat, tetrahidrobiopterin (BH4) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) ile flavin mononükleotid (FMN) ise koenzim olarak rol oynamaktadırlar [60].



Şekil 2.8: Nitrik Oksit Sentezi

Endotel hücrelerinin stoplazmasında üretilen NO hızla damar düz kas hücrelerine ulaşır ve parakrin etkiyle çözünür guanil siklazı aktive ederek 3,5-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) sentezini artırır. NO burada stoplazmik kalsiyum düzeyini düşürerek vasküler düz kas hücrelerinde calcium-calmodulin myosin hafif zincir kinase kompleks oluşumunu inhibe ederek vasodilatasyonu destekler [9].

Endotelyal NO sentezi, bazı mekanik güçler ve biyokimyasal uyarımlarla artar. Mekanik güçler dolaşan kan akımının oluşturduğu basınç (shear stres) ve duvar gerilimi iken, biyokimyasal uyarımlar; trombin, ADP, serotonin, bradikinin ve asetilkolindir [9]. Oluşan NO stabil olmayan, hem yağda hem suda çözünebilme yeteneği sayesinde biyolojik membranlardan çok rahat geçen ve bu sayede çok önemli biyolojik roller üstlenen bir moleküldür ve kısa sürede daha stabil ve inaktif yapıdaki nitrit ve nitrata dönüşmektedir (yarılanma ömrü 6-20 saniyedir). Bunlar NO gibi gaz fazında olmayıp sıvı fazda olduğundan, biyolojik sıvılarda NO yapımının göstergesi olarak kullanılabilirler.

Üç tip nitrik oksit sentaz isoformu mevcuttur [61].

Nöronal NOS (nNOS, NOS- I): Sinir ve bazı dokularda (akciğer, pankreas, mide ve uterus) bulunan nöronal tip. Az miktarda ve kalsiyuma bağımlı salınır.

2) İndüklenebilen NOS (iNOS, NOS-II): İmmunolojik uyarımlarla induklenebilen ve kardiyomiyositler, hepatositler, noronlar, mikroglial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunan, kalsiyumdan bağımsız induklenebilir tip. Özgül sitokinlerin (endotoksinler, oksidanlar) induklemeyle fazla miktarda salınır.

3) Endotelyal NOS (eNOS, NOS- III): Endotel hücrelerinde, trombositlerde ve nötrofillerde bulunan, sürekli ancak az miktarda salınan ve yine kalsiyuma bağımlı olan tip.

Nitrik Oksidin Fonksiyonları:

NO, AT-II ve endotelin gibi endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin etkisine karşı koyarak endotel bağımlı vazodilatasyonu sağlar. Aynı zamanda, trombosit agregasyon ve adezyonunu, doku oksidasyonunu, doku inflamasyonunu, trombojenik faktörlerin aktivasyonunu ve vasküler düz kas proliferasyonunu azaltır ve proaterojenik ve proinflamatuvar sitokinlerin sunumunu baskılayıp fibrinolizi destekler. Trombositler üzerinde gösterdiği inhibitör etki sadece cGMP üretimi yoluyla olmayıp, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu, GPIIb / IIIa ekspresyonunu, trombosit yüzey P-selektin ekspresyonunu ve trombosit-fibrinojen bağlanmasını azaltmak suretiyle yapar [9]. Deney hayvanları ile ilgili yapılmış çalışmalarda NO yetersizliğinde, hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabetin daha hızlı geliştiği gösterilmiştir [62].

NO, proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etkileriyle akut ve kronik inflamasyonda önemli bir role sahiptir. Oldukça reaktif bir moleküldür ve peroksinitrit oluşumu yoluyla oksidan etki gösterir. Bu oksidan özelliğiyle bakterisidal ve tümör hücrelerine karşı gösterdiği sitotoksik etkisiyle de antitümoral olarak görev yapar.

Sonuç olarak, endotel disfonksiyonu varlığında NO salınımı azalır ve azalmış NO nedeni ile, vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu, düz kas hücre proliferasyonu, lökosit adezyonu ve oksidatif stres gibi etkilerle aterosklerotik hasarda artma meydana gelir [63].

2.4.6 Endotel Disfonksiyonu

Vasküler homeostaz büyük oranda endotel hücrelerinin fizyolojik ve mekanik bütünlüğünün korunmasına bağlıdır. Kan ve doku arasında yer alan vasküler endotel, hemodinamik güçler ve kandan kaynaklanan sinyallere duyarlıdır ve bu uyarılara vazoaktif maddelerin sentez ve salınımı ile reaksiyon verir. Bu nedenle endotel kan ile damar duvarı arasında mekanik bir bariyerden çok daha fazla öneme sahiptir.

Endotel işlev bozukluğu genellikle endotel bağımlı vasküler tonus ve vazodilatör yanıtındaki bozulmayı tanımlamak için kullanılmasına rağmen, trombosit ve lökosit işlevi, permeabiliteyi düzenleyici maddeler ile endotel arasındaki ilişkideki anormallikler ve normal dışı endotel aktivasyonuna yol açan durumları da kapsar [55]. Normal endotel,

antikoagülan, antitrombotik ve fibrinolitik özellikler gösterir. Bir başka deyişle sağlıklı endotel normal koşullarda dengeyi antikoagülan faktörler yönüne doğru çekmektedir. Ancak endotel hasarı durumunda bu denge kolaylıkla prokoagülan aktivite yönüne de çekilebilir. Endotel hasarı ile aktive olarak prokoagülan aktivite kazanan endotel, tromboza kolaylıkla eğilim gösterir ve klinik olarak bu durum, vazospazm, trombüs oluşması, hipertansiyon, ateroskleroz veya restenoz şeklinde sonlanır.

Tanım olarak endotel disfonksiyonu; endotel hücrelerinin fonksiyonel olarak değişime uğraması sonucunda, endotel hücrelerinde NO başta olmak üzere vazodilatator maddelerin biyoyararlanımının azalması ve buna karşılık vazokonstruktör faktörlerin artması anlamındadır [64]. Bir başka deyişle; inflamasyon ve klasik kardiyovasküler risk faktörlerinin etkisi ile vazokonstruktörler ile vazodilatörlerin, büyümeyi uyarıcılarla inhibe edenlerin ve aterogenezik ve antiaterogenezik dengelerin kısmen veya tamamen kaybolmasıdır. Bu durum proinflatuar, prokoagulan ve proliferatif bir ortam yaratmaktadır. Sonuç olarak, başlangıç, ilerleme ve aterosklerotik plağın rüptüründe endotel ve inflamatuvar mediatörler temel bir rol oynar gibi görülmektedir.

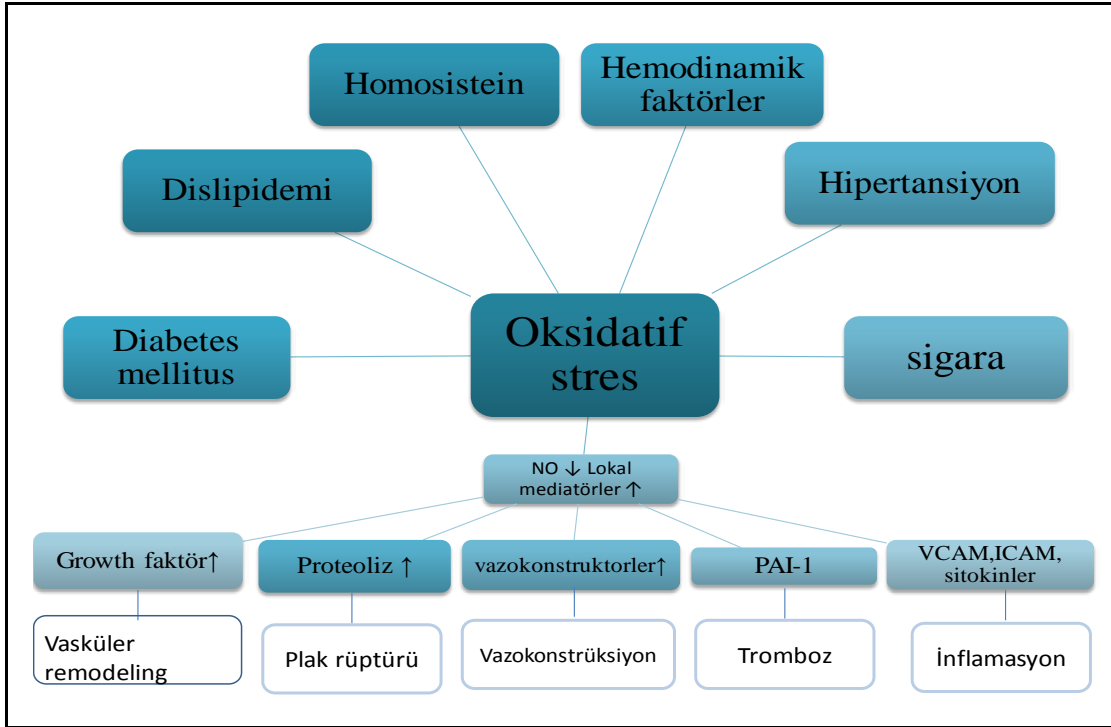
2.4.7 Ateroskleroz

Tablo: 2.4: Ateroskleroz İçin Risk Faktörleri

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	Değiştirilebilen Risk Faktörleri		
	A-Major	B-Minör	C-Yeni
Yaş	Hipertansiyon	Obesite	Hs-CRP
Cinsiyet	D.Mellitus	Atipi kişilik	Lip-a
Aile Öyküsü	Dislipidemi	Sedanter yaşam	Apo -A ve B
	Sigara	Aşırı alkol	Homosisteinemi
			Fibrinojen ↑

Ateroskleroz ve kardiyovasküler risk ile ilişkili çok sayıda, yeni ve geleneksel risk faktörleri tanımlanmıştır ve bu risk faktörlerinin endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir [65]. Tanımlanmış bu risk faktörlerinin etkisi ile oluşan oksidatif stresin, endotel disfonksiyonunda en önemli basamak ve tüm risk faktörlerinin ortak patogenetik yolu olduğu düşünülmektedir [57].



Şekil 2.9: Endotel Disfonksiyonu Nedenleri ve Fizyopatoloji

Yeni anlayış göstermiştir ki endotel disfonksiyonu olarak ifade edilen endotelde meydana gelen olumsuz değişiklikler, aterogenezdeki intimal kalınlaşma ve aterosklerotik plak oluşumunda temel mekanizmadır ve bu durum aterosklerozda en önemli ilk adımı temsil etmektedir. Koroner arterlerde klinik olarak aterosklerotik plak saptanmadan önce endotel disfonksiyonunun varlığı gösterilmiştir [66].

2.4.8 Endotel Disfonksiyonuna Neden Olan Durumlar

Hiperlipidemi: Hiperkolesterolemi, vasküler homeostazda birçok değişikliğe yol açar. NO biyoaktivitesini azaltır, superoksit üretimini artırır ve endotelin reaktivitesini artırır [67]. Ayrıca adezyon moleküllerinde artışa ve endotel bağımlı vazodilatasyonda azalmaya neden olduğu da gösterilmiştir [68].

Hipertansiyon: Hipertansiyonun kendisi endotelial disfonksiyona eşlik eder ve bunun hipertansiyonun nedeni değil, sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu durumun altında yatan sebepler arasında, NO'nin artmış superoksit anyonları üretimine bağlı aktivitesinin azalması veya endotelin-1 üretiminde artışa bağlı olarak NO üretiminin azalması sayılabilir [69]. Yine artmış anjiyotensin II ve azalmış bradikinin seviyeleri NO'nin hem üretimini, hem de aktivitesini baskılar [70].

Diabetes Mellitus: Diabetes mellitusta meydana gelen endotel hasarında pek çok faktör rol oynamaktaysa da endotel disfonksiyonunun ana mekanizması, dislipoproteinemi ve reaktif oksijen radikallerindeki artmadır [69]. Ayrıca glikozun enzimatik olmayan yollarla oksidasyonu sonucu oluşan glikolizasyon son ürünleri de LDL oksidasyonunu artırır ve sonuçta endotel disfonksiyonuna yol açar [71]. Sonuç olarak diabetik bireylerde çeşitli mekanizmalarla meydana gelen başlıca endotelial değişiklikler, NO salınımlarında azalma, endotelin-1 gibi vazokonstriktörlerin salınımlarında, trombosit ve monositlerin vasküler endotele adezyonunda artma olarak sayılabilir [72].

Sigara: Sigara içiminin endotel fonksiyonları üzerine olumsuz etkisi olduğu ve KAH ilerlemesini hızlandığı iyi bilinmektedir. Sigara aracılı endotel disfonksiyonu multifaktöriyel olmasına rağmen, sigara dumanındaki serbest radikallerin ve aromatik hidrokarbonların endotel disfonksiyonu oluşturmasında temel rol oynadıkları düşünülmektedir. Sigara dumanındaki O₂ radikali damar endoteline ulaşabilir ve NO ile etkileşip NO vazoaktif seviyelerini azaltabilir. Ayrıca LDL ve lipoprotein(a)'nın okside olmasına neden olarak vazodilatasyonu bozabilir [73].

Homosistein: Homosistein düzeyi yüksek olan normotansif bireylerde, endotel fonksiyonlarının bozulmuş olduğu görülmüştür. Hücre, hayvan ve insan çalışmaları ile homosisteinin NO aktivitesini oksidatif mekanizmalarla azalttığı gösterilmiştir [74].

Obesite: Hipertansiyon, yüksek serum kolesterolü, HDL kolesterol azalması ve hipertrigliseridemi, insülin direnci gibi endotel üzerinde olumsuz faktörlerin gelişimine katkıda bulunur.

İleri Yaş: Endotel hücrelerinin doğal yaşam süresine bağlı olarak görev görmesi ve yaşlanarak daha az fonksiyonel bir endotele dönüşmesi neticesinde, yaşlanma genel olarak bozuk endotel fonksiyonu ile beraberdir. İleri yaşla birlikte, endotel disfonksiyonu yapabilen hipertansiyon, ateroskleroz, dislipidemi gibi durumlar daha sık görülmekle beraber, ileri yaş bağımsız bir risk faktörü olarak endotele bağımlı vazodilatasyonun bozulmasına da neden olmaktadır [75]. **Hiperinsülinemi ve İnsülin Direnci:** İnsülinin metabolik etkilerinin yanında sempatik sistem ve NO üzerine etkileri de olmaktadır. İnsülin direncinin dolaşımdaki yağ hücresi kaynaklı sitokinlerin (IL-6, TNF- α) düzeyini etkilediği, ayrıca insülinin L-arjininin hücre içine transportunu sağladığı ve NOS'ı aktive ettiği gösterilmiştir. İnsülin direnci ile NO sentezi ve biyoaktivitesinde oluşan değişiklikler sonucunda endotel işlev bozukluğu oluşmaktadır [70].

Enfeksiyonun: Enfeksiyon ve sonucunda oluşan inflamasyon, endotel disfonksiyonu oluşturabilir. Hayvan modellerinde C. Pneumonia ile tekrarlayan enfeksiyon gelişmesi, azalmış NO ulaşılabilirliği aracılığı ile endotel disfonksiyonu ile sonuçlanabilir [76].

Radyasyon Tedavisi: Radyasyon tedavisi endotel hücre ölümü ile sonuçlanabilir ve NO ulaşılabilirliğini azaltarak radyasyona maruz kalan arterlerde endotelial disfonksiyona neden olabilir [77].

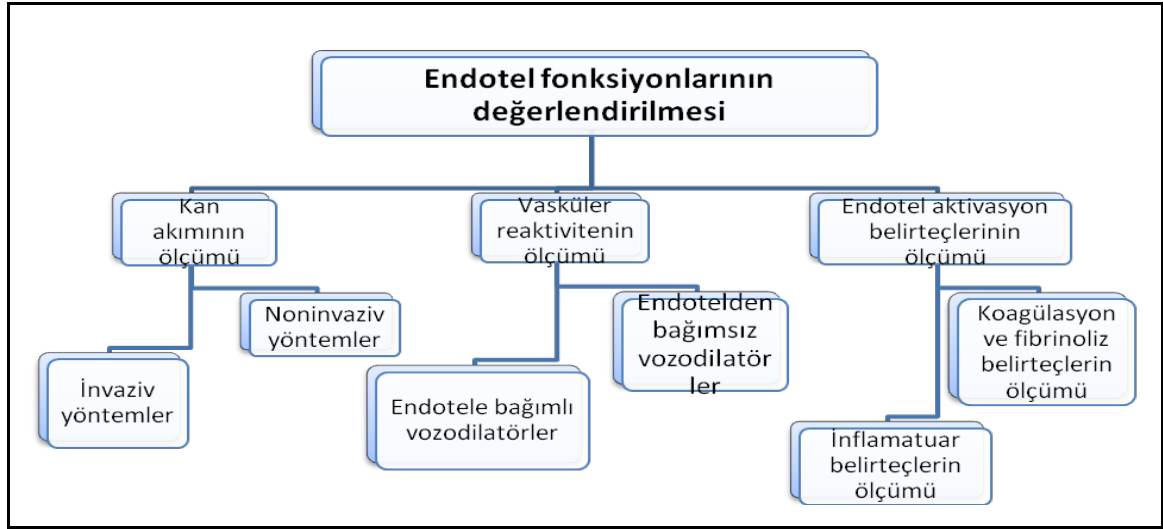
Kemoterapi: Doksorubisin ve daunorubisin gibi antrasiklin grubu kemoteropatik ajanların endotel reaktivitesini bozduğu gösterilmiştir [78].

Behçet Hastalığı: Behçet hastalığındaki endotelial hasardan, yüksek homosistein ve endotelin-1 düzeyinin sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

2.4.9 Endotel İşlevinin Değerlendirilmesi

Endotel fonksiyon bozukluğunu tesbit edebilecek yöntemin tercihen, invaziv olmayan, güvenilir, kolayca ulaşılabilir ve sublinik aterosklerozu değerlendirebilen bir test olması gereklidir. Ancak bugün için endotel fonksiyonlarını tam olarak değerlendirebilecek, tüm bu özelliklere sahip tek ve standart bir test yoktur [69].

Son yıllarda endotel fonksiyonlarını değerlendirebilmek için birçok invaziv ve non-invaziv yöntem geliştirilmiştir. Testlerin bazıları invaziv niteliktedir ve bu testlerde ya doğrudan koroner arterler ya da ön kol arterleri kullanılmaktadır.



Şekil 2.10: Endotel Fonksiyonunun Değerlendirilmesi

İnvaziv yöntemler kullanılarak kan akımı ve vasküler reaktivite ölçümü ile endotel fonksiyonunun değerlendirilmeye başlanması, ilk olarak 1986 yılında Ludmer ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, intrakoronar asetilkolin enjeksiyonu öncesi ve sonrasında anjiyografik olarak koroner arter çapları değerlendirilmiştir [79]. Sağlıklı endotele sahip bir damarda asetilkoline karşı oluşan yanıt, NO salınımında artış ve buna bağlı vazodilatasyondur. Endotel disfonksiyonu varlığında ise, NO salınımı bozulmuş olduğundan asetilkolinin düz kas kasıcı etkisi belirgin hale gelir ve vazokonstriksiyon gözlenir.

O tarihten bu yana daha az invaziv ve noninvaziv pek çok teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden özellikle non-invaziv, kolaylıkla uygulanabilen, tekrarlanabilmesi ve güvenilirliği nedeniyle klinik araştırmalarda en sık kullanılan test, akıma göre uyarılabilen endotel bağımlı vazodilatasyondur (Flow Mediated Dilation, FMD) ve bu yöntem günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir [80].

Bu yöntemde endotele bağımlı vazodilatasyonun ultrasonografi ile değerlendirilmesi mümkün olup, yöntemin tekrarlanabilir olması ve girişimsel bir yöntem olmaması avantaj olarak görülmektedir. Yöntemin mantığı, ön kolda belirli süre iskemi oluşturulması ve

iskeminin ortadan kaldırıldığında kan akımı ile oluşan post-iskemik vazodilatasyon miktarının ölçülmesi esasına dayanır. Burada oluşturulan shear stres ile brakiyal arterde oluşan dilatasyon, esas olarak NO'nin endotelden salınmasına bağlıdır ve koroner endotelial fonksiyonun invaziv olarak değerlendirilmesi ile uyum gösterir [81]. Yöntemin en büyük avantajları invazif olmayışı ve güvenilirliğidir. Dezavantajı ise ortamın sıcaklığı, yemekler, ilaçlar, sempatik uyarı ve işlemden önceki fizik aktivite gibi faktörlerden etkilenebilmesidir.

Endotel disfonksiyonunu ölçmek için bir diğer yaklaşım ise, normal endotel fonksiyonlarını sağlayan, endotel tarafından salgılanan maddelerin ölçülmesidir. Bu amaçla, endotel aktivasyon üyesi olan vasküler cell adezyon molekülü (VCAM), soluble intrasellular adhezyon molekül (ICAM), endotelin-1 gibi veya koagülasyon ve fibrinolizde önemli görevleri olan t-PA, PAI-1, vWF gibi veya düşük dereceli inflamasyon belirteçleri olan, CRP, IL-6, IL-1, TNF- α gibi endotelden salgılanan maddeler ölçülebilmektedir [82].

2.5 Endotel İşlevinin Dolaşımdaki Belirteçleri

2.5.1 Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1)

Serpin süperailisine ait, 48 kD molekül ağırlığında ve 379 aminoasitlik tek zincirli bir glikoproteindir. Yapısında bol miktarda metiyonin bulunması nedeni ile okside edici ajanlar ile geri dönüşümsüz şekilde inaktive edilmeye meyillidir [83].

Aynı aileye ait 4 farklı protein vardır. Bunlardan PAI-2 plasenta, monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenir. Normal kanda PAI-2 saptanamaz ancak çeşitli hastalıklarda ölçülebilir düzeye gelir. PAI-3 ve PAI-4 olarak tanımlanan inhibitörlerin ise daha sonra Protein C inhibitör ve Proteaz Neksin-1 oldukları anlaşılmıştır [84].

Fibrinolizisi sınırlayan major plazminojen aktivatör inhibitörü, plazminojen aktivatör inhibitör 1 (PAI-1) dir. Endojen fibrinolitik aktivitesi olan bir faktördür ve plazma yarı ömrü yaklaşık 2-3 dakikadır. PAI-1, t-PA ve ürokinaz ile kompleks yaparak onları hızla inhibe eder ve fibrinolizin kontrolsüz bir şekilde oluşmasını engeller. Dolaşımdan karaciğer hücrelerince temizlenen PAI-1, başlıca endotel hücrelerinden sentezlenir. Diğer sentez bölgeleri ise trombositler, damar düz kas hücreleri, makrofajlar, karaciğer, dalak ve adipoz dokudur [85]. PAI-1 biyosentezi insülin, sitokinler (IL-1), trombin, anjiyotensin-II,

tümör nekroz faktör, fibroblast büyüme faktörü ve endotoksin gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir.

Plazmada ve diğer biyolojik sıvılarda, aktif, inaktif ve latent olmak üzere, yapısı birbirinden farklı olan üç formda bulunur. Hücrelerden aktif bir molekül olarak salınır ancak fizyolojik koşullarda spontan olarak hızla inaktif forma döner. Böylece yarılanma ömrü 1 saat olacak şekilde latent forma dönüşür. Aktif formda, PAI-1' in reaktif merkezi yüzeyde bulunurken, latent formda protein globül içine batmış haldedir. Aktif PAI-1' in latent PAI-1' e dönüşüm mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Aktif PAI-1 esas olarak plazma ve dokularda fibronektine bağlanarak stabilize olur. Oluşan bu fibronektin-PAI-1 kompleksi sayesinde PAI-1'in aktif halde kalması sağlanır, ömrü uzar ve etkisi artar [85].

PAI-1' in hem aktivasyon hem de antijen ölçümü yapılabilir. PAI-1 antijen tüm PAI-1 formlarını kapsar (aktif, inaktif, latent, serbest, fitronektine veya t-PA' e bağlı). Biyosentez hızı yüksek olmakla beraber 8-10 dakikalık kısa yarılanma ömrü nedeniyle göreceli olarak düşük plazma seviyelerine sahiptir. En fazla trombosit ve plazmada bulunan PAI-1 damar hasarına bağlı olarak trombositlerin aktive olması neticesinde, trombositlerden salgılanır ve trombus olan bölgede konsantrasyonu belirgin olarak artar. Trombositler bu şekilde fibrin yapısını korumaya çalışır [85].

PAI-1 düzeyleri sirkadiyan değişiklik gösterir. Sabah erken saatlerde en yüksek, akşamları en düşük düzeydedir. Sabah olan bu yükseklik ateromatöz plak rüptürünün olduğu yerde trombotik oklüzyona neden olur. Böylece akut miyokard infarktüsü, ani kardiyak ölüm ve iskemik strok gibi durumlar meydana gelir [83]. Yine kışın en yüksek, yazın ise en düşük düzeyde olmak üzere mevsimsel değişikliklerde göstermektedir. Damar duvarında sürekli oluşan fibrin depozitleri fibrinolitik sistem aktivasyonu ile düzenlenmektedir. Herhangi bir nedenle meydana gelen PAI-1 düzeyinde artma neticesinde tromboembolik olaylar meydana gelmektedir [86].

PAI-1 plazma düzeyi üzerinde etkili faktörler:

Genetik faktörler: Erken yaşta miyokard infarktüsü geçiren hastalarda yapılan bir çalışmada, bireyler arasında genetik varyasyonlara bağlı olarak PAI-1 düzeyinin değişiklik gösterdiği saptanmıştır [87].

Diabetes mellitus: Gerek yüksek insülin düzeyi ve gerekse yüksek plazma glukozu, PAI-1 sentez ve sekresyonu ile ilişkilidir. Koroner ateromektomi örnekleri incelendiğinde DM' li hastalarda olmayanlara nazaran aterom içeriğinde daha yüksek miktarda PAI-1 bulunmuştur [88]. İnsülin direnci ile kardiyovasküler risk artışı arasındaki ilişki incelendiğinde, hiperinsülinemi, karaciğerde fibrinojen ve PAI-1 yapımını uyarmakta, böylece protrombotik durum ortaya çıkmaktadır [89].

Obesite: Yağ dokusunun kendisi PAI-1' in ekspresyonunun artmasına direkt olarak katkıda bulunur. Klinik çalışmalar obes hastalarda kilo kaybı ile belirgin şekilde plazma PAI-1 seviyelerinin düştüğünü göstermiştir [90].

Menopoz: Östrojen etkisi ile premenapozal kadınlar postmenapozal kadınlara göre daha düşük plazma PAI-1 seviyelerine sahiptir [91].

Diğer nedenler: Angiotensin II, fibroblast büyüme faktörü, trombin, sitokinler (İL-1), yaş, ırk, cinsiyet, total kolesterol ve plazma fibrinojen seviyeleri, alkol tüketimi, sigara içimi, diyet ve fiziksel aktivite PAI-1 düzeyini etkileyen diğer faktörlerdir.

2.5.2 Von Willebrand Faktör (vWF)

vWF, endotel hücreleri ve megakaryositler tarafından sentezlenen, trombositlerin alfa granüllerinde ve endotel hücrelerinin stoplazmalarında bulunan Weibel-Palade cisimciklerinde saklanarak gereksinim halinde salgılanmak üzere depolanan, büyük multimerik polipeptid yapılı proteindir [92]. Molekülün primer yapısı, birbirini birkaç kez tekrarlayan D, A, B ve C bölgelerden oluşur ve her bölgenin farklı bağlanma fonksiyonları vardır.

A1 bölgesi trombosit membranındaki GPIb reseptörünü, kollajeni, heparini ve ristosetini bağlar [93], A2 bölgesi ADAMTS13 kırılma bölgesini [94], A3 bölgesi kollajeni [94] ve C1 bölgesi de trombositin agregasyon bölgesi olan GP IIb/IIIa'yı bağlar [95]. D bölgesi ise FVIII bağlanma bölgesidir.

Yarılanma ömrü yaklaşık 8-12 saat olan vWF, dolaşımda molekül ağırlıkları 10.000 kD'a kadar çıkabilen farklı büyüklükte multimerler şeklinde bulunur. Bu multimerik yapısı hemostatik fonksiyonu bakımından çok önemlidir. Yüksek molekül ağırlıklı multimerlerin kaybı veya normal multimerik yapının bozulması hemostatik fonksiyonun da azalmasına

veya kaybına yol açar çünkü molekül ağırlığı en yüksek multimerler, hemostatik olarak en etkin olanlardır.

vWF'ün hemostazda iki önemli kritik fonksiyonu vardır:

1) Yaralanan damarın endotel altı dokusundaki kollajene ve trombositlere (GPIb reseptörü ile) bağlanarak, damar duvarına trombositlerin adezyonunu ve agregasyonunu sağlar.

2) Plazmada faktör VIII için taşıyıcı protein rolü oynayarak, faktör VIII'i stabilize eder ve böylece erken proteolizden korunmasını sağlar.

Damar yaralanmasını izleyen normal hemostatik yanıtta, bir taraftan koagülasyon sistemi aktive olup fibrin oluşmaya başlarken, diğer taraftan yara yerinde vWF aracılığı ile trombosit adezyon ve agregasyonu olur.

vWF düzeyinin endotel hasarının ve bununla ilişkili kardiyovasküler olayların bir göstergesi olduğuna inanılmaktadır [96]. Yapılmış prospektif çalışmalarla, yüksek serum vWF düzeyinin, MI ve ani ölüm gibi major kardiyovasküler olayların önemli bir belirteci olduğu gösterilmiştir [97, 98].

2.5.3 Endotelin-1

İlk olarak 1985 yılında endothelial contracting factor olarak tanımlanmış ve 1988 yılında domuz aorta kültür endotel hücrelerinden izole edilmiş olan, bilinen en güçlü vazokonstriktör moleküldür [99, 100]. ET-A ve ET-B olmak üzere iki önemli reseptörü vardır. Her iki reseptör de endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, kardiyak myositler ve fibroblastlardan eksprese edilir [101]. Bu reseptörlerin aktivasyonu ile farklı hemodinamik etkiler ortaya çıkmaktadır. ET-A reseptörün aktivasyonunda, vazokonstriksiyon ve damar düz kas proliferasyonu meydana gelir. ET-B'nin vasküler endoteldeki aktivasyonunda, NO salınımını arttırarak vazodilatasyon, vasküler düz kastaki aktivasyonu ile de vazokonstriksiyona aracılık eder [102, 103]. ET-1, sadece direkt bir vazokonstriktör etki göstermekle kalmayıp, norepinefrin ve serotonin gibi diğer bazı vazokonstriktör maddelere karşı ortaya çıkan kontraktıl yanıtları da potansiyelize ederek, vasküler tonusun regülasyonunda önemli rol oynar. Ayrıca, bu vazokonstriktör etkisinin yanında, kalp üzerinde de direkt pozitif inotropik ve pozitif kronotropik etkileri vardır. Ateroskleroz, hiperkolesterolemi ve sigara içiciliği gibi endotel disfonksiyonunun eşlik

ettiği durumlarda plazma ET-1 düzeyleri yükselmektedir [104]. MI geçirmiş hastalarda yapılan bir çalışmada, yüksek serum ET-1 düzeyinin, bir yıllık sağkalımla ters orantılı ve yüksek mortalite riski ile beraber prediktif değerinin olduğu kabul edilmiştir [105].

Sonuç olarak endotelinin, sistemik ve pulmoner hipertansiyon, kalp yetmezliğinde görülen uzamış vazokonstriksiyon ve myokard infarktüsü gibi kardiyovasküler olaylarda önemli rol oynadığı düşünülmektedir [106, 107] .

2.5.4 Doku Plazminojen Aktivatörü (t-PA)

Endotel hücreleri tarafından tek zincirli aktif enzim olarak sentezlenip salınan, 68 kD ağırlığında, endojen fibrinolitik aktivitesi olan bir serin proteazdır [85]. Plazmin ile proteolitik parçalanma sonucunda iki zincirli moleküle dönüşür. Hem tek hem de iki zincirli formları aktivatör özelliğe sahiptir. Normal koşullarda fizyolojik olarak düşük düzeyde salınır. Trombosit ve koagülasyon kaskadı aktive olur ise endotelial depolardan hızla ve çok miktarda salınır. Böylece plak rüptürünü ve tıkaç oluşumunu engellemeye çalışır. Fibrin yokluğunda zayıf bir enzim iken, fibrin oluştuğunda etkinliği güçlü bir şekilde artar. Fibrinin, t-PA ve plazminojeni absorbe edebilen bir yüzey oluşturmasıyla siklik üçlü bileşik ortaya çıkar. t-PA, plazminojen ve fibrinden oluşan bu üçlü bileşik, t-PA' nın fibrinojene karşı affinitesinin artmasına neden olur. Salınımı, trombin, serotonin, bradikinin, sitokinler ve epinefrin tarafından stimüle edilmektedir [108].

Sağlıklı ve iskemik kalp hastalığı olan hastalarla yapılmış epidemiyolojik çalışmalarda, yüksek t-PA düzeylerinin gelecekteki koroner olayların bir belirteci olduğu ifade edilmiştir [109].

2.5.5. Çalışmanın amacı

Çalışmamızın amacı, nilotinibin özellikle kardiyovasküler risk faktörlerine sahip hastalarda ortaya çıkardığı bildirilen ve mekanizması henüz açıklanamamış olan, periferik arteriyel oklüzyonların mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasıdır.

Biz de bu durumun, olası endotel hasarı yolu ile olabileceğini düşünerek, kültür ortamında nilotinibe maruz bırakılmış arter endotel hücrelerinin, sekretuar fonksiyonlarını ve canlılıklarını incelemeyi planladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır (Proje No: 2012.KB.SAG.028).

Çalışma, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarında, Ağustos 2012 - Ocak 2013 tarihleri arasında 6 ay sürede tamamlanmıştır.

Çalışmada büyük damar modeli olarak insan karotis arter endotel hücre hattı, küçük-orta damar modeli olarak da insan koroner arter endotel hücre hattı kullanılmıştır.

3.1. Yöntem

3.1.1 Hücre Kültür Çalışmaları

Hücrelerin kültüre edilmesi işlemleri, biyolojik güvenli kabinde yapılmıştır ve dikkat edilmesi gereken tüm hususlar üretici firma tarafından belirlendiği şekilde yerine getirilmiştir.

3.1.1.1 İnsan Karotis Arter Endotel Hücreleri (HCtAEC) ve Kültür Koşulları

HCtAEC hücreleri, Cell Applications Inc. (San Diego, CA. ABD)' den kryoprezerve olarak temin edilmiştir (katalog numarası 3014-05). Kryoprezerve vial içindeki hücreler 37°C'ta sıcak su havuzunda 1 dakikada çözüldü. Vial kurulandı ve %70 alkol ile sterilize edildi. Biyolojik güvenli kabinde açılan vialden alınan hücreler, 15 ml Arter Endotel Hücre Büyüme ortamı içeren T-75 flaskına aktarıldı. T-75 flaskı homojeniteyi sağlamak amacı ile hafifçe sallandıktan sonra, 37 °C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatöre alındı ve 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra, Arter Endotel Hücre Büyüme ortamı, hücreler rahatsız edilmeyecek şekilde flasktan alınıp yerine taze 15 ml Arter Endotel Hücre Büyüme ortamı kondu. Büyüme ortamı, hücreler %60 kaplanma oranına ulaşınca dek güneşiriy yenilendi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında ise Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu, steril konik tüp içinde 220 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet, taze besiyerinde homojenize edilerek iki T-75 flaskında kültüre alındı.

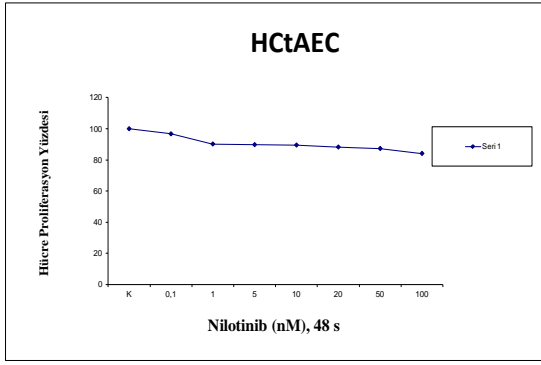
Her iki T-75 flasksındaki hücreler %80 yoğunluğa ulaşıncaya dek yeniden kültüre edildi, bu flakslardan elde edilen hücreler çalışmalarda kullanılacak yeterli hücre sayısına ulaşıncaya kadar uygun koşullarda yeniden kültüre edildi.

3.1.1.2 İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri (HCAEC) ve Kültür Koşulları

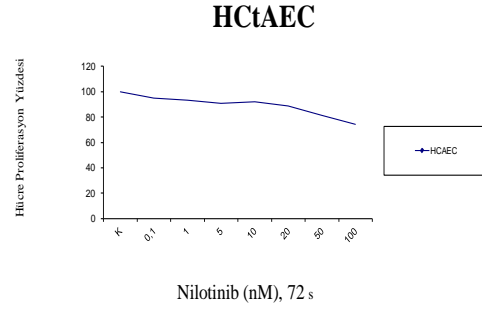
HCAEC hücreleri, Cell Applications Inc. (San Diego, CA. ABD)' den temin edilmiştir ve hücreler kültüre edilirken, üretici firma tarafından belirlenen tüm koşullar yerine getirilmesine rağmen, yapılan pasajlamalarda çalışmalara yetecek hücre sayısına ulaşılamamıştır (katalog numarası 300-05).

3.1.1.3 Nilotinib'in HCtAEC Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Nilotinib'in, HCtAEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, MTT hücre proliferasyon testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, HCtAEC hücreleri, 96-kuyucuklu plâğin her bir kuyucuğunda 100 µl besiyerinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin üzerine 100'er µl'lik hacimlerde artan konsantrasyonlarda nilotinib (0.1-100 nM) eklenmiştir. 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 ve 72 saat boyunca ilaca ayrı ayrı maruz bırakılan hücrelerin üzerine, 20 µl MTT reaktifi eklenmiş ve 4 saat daha 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süresinden sonra 96-kuyucuklu plakalar 1800 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve santrifüj sonunda oluşan formazan kristallerinin üzerindeki süpernatant atılmıştır. Oluşan kristallerin üzerine 100 µl DMSO eklendikten sonra 5 dakika çalkalanarak çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra, 96-kuyucuklu plakalarda oluşan formazan yoğunlukları, spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okunmuştur. Spektrofotometrik sonuçlara göre hücre çoğalma grafiği oluşturulmuş ve bu grafiğe göre de ilacın HCtAEC hücrelerinin proliferasyonunu %50 inhibe eden doz bulunmuştur (Şekil 3:1,3:2).



Şekil 3:1 48. Saat Hücre Proliferasyonu



Şekil 3:2 72. Saat Hücre Proliferasyonu

3.1.1.4 ELISA Testi İçin Örnek Alınması ve Saklanması

HCTAEC hücreleri, 6-kuyucuklu tabağın her bir kuyucuğunda 2 ml besiyerinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve belirlenen dozlarda 48 ve 72 saat boyunca nilotinib ile muamele edilmişlerdir. Bu dozlar HCTAEC hücrelerinde nilotinib için 5, 10 ve 100 nM'dir. Hücre hattı, 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildikten sonra, her bir kuyucuktaki süpernatant hücrelere dokunmaksızın steril hücre dondurma tüplerine alınmıştır. Alınan örnekler, ELISA deneyi gerçekleştirilene kadar -80 °C de muhafaza edilmiştir. Ayrıca, 48 ve 72 saatlik inkubasyonlar sonucunda hücrelerin yapışma yüzdeleri kontrol ile karşılaştırılarak ifade edilmiştir.

3.1.2 ELISA Çalışmaları

Hücre kültür süpernatantları çalışma gününe kadar -80 °C' de saklanarak ELISA çalışmalarından hemen önce çözüldü. Çalışmalarda üretici firma önerilerine uyuldu ve örnekler duplike olarak çalışıldı.

3.1.2.1 PAI-1 Düzeylerinin Saptanması

PAI-1 düzeyleri Boster sandviç ELISA kiti (Katolog no:EK0859) kullanılarak saptandı. Bu amaçla anti-insan PAI-1 antikorları ile kaplı 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kite, hazır liyofilize halde bulunan 10000 pg/ml konsantrasyonundaki standart örnek distile su ile dilüe edildi. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlarla 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı. -80 °C de saklanan hücre kültür örnekleri çözöldükten sonra ELISA çalışmasına uygun hale getirildi. Hücre kültür süpernatantları örnek dilüenti ile 1:2 dilüe edildi. Her bir kuyucuğa 100 µl hücre kültür süpernatant örneği ya da standart konsantrasyondaki örneklerden konuldu. 37 °C de 90 dk inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriği aspire edilerek alındı. Her bir kuyucuğa 100 µl Biotin konjuge anti-insan PAI-1 antikoru ilave edildi. 37 °C de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak PBS (phosphate buffered saline) ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Ardından her bir kuyucuğa 100 µl Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi ilave edildi. 37 °C de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası ELISA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak PBS (phosphate buffered saline) ile 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl Tetramethyl-benzidine (TMB) substrat ilave edilerek 20-25 dk 37°C karanlıkta inkübe edildi. Tüm kuyucuklara 100 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

PAI-1 düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japonya) örneklerin absorbansları ölçöldü. Bilgisayarda Lineer-Lineer grafik kullanarak X eksenine PAI-1 standart değerleri (pg/ml), Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretleterek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretleterek karşılarna denk gelen PAI-1 seviyeleri belirlendi.

3.1.2.2 t-PA Düzeylerinin Saptanması

tPA düzeyleri e-Bioscience platinum sandviç ELİSA kiti (Katolog no:BMS258) kullanılarak saptandı. Bu amaçla anti-insan t-PA antikoları ile kaplı 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı.

Standart ve örneklerin hazırlanması: ELISA kitinde bulunan standartlar, örnek dilüenti, HRP konjugatı, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi. Kitte hazır liyofilize halde bulunan 2000 pg/ml konsantrasyonundaki standart distile su ile dilüe edildi. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı. -80 °C de saklanan hücre kültür süpernatant örnekleri çözüldükten sonra ELISA çalışmasına uygun hale getirildi. ELISA plağına çalışma öncesi 2 kez yıkama yapıldı. Kuyucuklara 10 µl hücre kültür süpernatant örneği + 90 µl örnek dilüenti (her kuyucukta toplam toplam 100 µl) ve 100 µl standart örnek eklendi. Ardından her bir kuyucuğa 50 µl HRP-konjugat solusyonu ilave edilerek 2 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 100 µl TMB substrat ilave edildi. 10 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. Ardından kuyucuklara 100 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

t-PA düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japonya) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Log-Log grafik kullanarak X eksenine t-PA standart değerleri (pg/ml), Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen t-PA seviyeleri belirlendi.

3.1.2.3 ET-1 Düzeylerinin Saptanması

ET-1 düzeyleri Cusabio sandviç ELISA kiti (Katolog no: CSB-E07007h) kullanılarak saptandı. Bu amaçla anti-insan ET-1 antikorları ile kaplı 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitte hazır liyofilize halde bulunan 200 pg/ml konsantrasyonundaki standart vial 8000 rpm de 30 sn santifüj edildikten sonra

distile su ile dilüe edildi. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar ile 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12.5 pg/ml, 6.25 pg/ml, 3.12 pg/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı. -80 °C de saklanan hücre kültür örnekleri çözüldükten sonra ELISA çalışmasına uygun hale getirildi. Kuyucuklara 100 µl hücre kültür süpernatant örneği ve 100 µl standart örnek eklendi. 37 °C de 120 dk inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriği aspire edilerek alındı. Her bir kuyucuğa 100 µl Biotin konjuge anti-insan ET-1 antikoru ilave edildi. 37 °C de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Ardından her bir kuyucuğa 100 µl HRP-Avidin kompleksi ilave edildi. 37 °C de 60 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası ELISA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat ilave edilerek 37°C 15-30 dk karanlıkta inkübe edildi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

ET-1 düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japonya) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Log-Log grafik kullanarak X eksenine ET-1 standart değerleri (pg/ml), Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen ET-1 seviyeleri belirlendi.

3.1.2.4 vWF Düzeylerinin Saptanması

vWF düzeyleri Asserachrom sandviç ELİSA kiti (Katolog no:00942) kullanılarak saptandı. Bu amaçla anti-insan vWF antikorları ile kaplı 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitte hazır liyofilize halde bulunan %103 konsantrasyonundaki standart distile su ile dilüe edildi. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar ile %51.5, %25.75, %12.88, %6.44 konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı. -80 °C de saklanan hücre kültür örnekleri çözüldükten sonra ELISA çalışmasına

uygun hale getirildi. Hücre kültür örnekleri örnek dilüenti ile 1:51 dilüe edildi. vWF kontrol örneği (vWF düzeyi: %65-89) distile su ile çözüldükten sonra örnek dilüenti ile 1:51 dilüe edildi. 200 µl dilüe hücre kültür örnekleri, 200 µl standart örnekler ve 200 µl kontrol serumu ELISA plağı kuyucuklarına eklendi. Oda ısısında (18-25°C) 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Ardından her bir kuyucuğa 200 µl Anti-vWF Peroksidaz ilave edildi. Oda ısısında (18-25°C) 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 200 µl TMB substrat ilave edilerek Oda ısısında (18-25°C) karanlıkta 5 dk inkübe edildi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

vWF düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japonya) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Lin-Lin grafik kullanarak X eksenine VWF standart değerleri (%), Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen VWF seviyeleri belirlendi.

3.1.2.5 Total Nitrik Oksit Düzeylerinin Saptanması

Total Nitrik Oksit düzeyleri R&D ELISA kiti (Katolog no: KGE001) kullanılarak saptandı. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 2 adet 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi. Total Nitrik Oksit ölçümü 2 basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta **endojen nitrit konsantrasyonu (µmol/L)** ölçülmektedir. İkinci basamakta nitrat redüksiyon yöntemi kullanarak nitratin nitrite dönüştürülmesi sonucu oluşan **total nitrit konsantrasyonu (µmol/L)** ölçülmektedir. Hücre kültüründeki total nitrat konsantrasyonunu saptamak için, total nitrit konsantrasyonundan endojen nitrit konsantrasyonu çıkartılmaktadır.

1. Endojen nitrit konsantrasyonu ölçümü:

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitten hazır liyofilize halde bulunan 2000 µmol/L konsantrasyonundaki **nitrit** standartı reaksiyon dilüenti ile çözüldü. Daha sonra 1:10 dilüe edilerek 200 µmol/L konsantrasyonundaki birinci standart elde edildi. Dilüsyon sonrası seri dilüsyonlar 100 µmol/L, 50 µmol/L, 25 µmol/L, 12,5 µmol/L, 6.25 µmol/L, 3.12 µmol/L ve 0 µmol/L konsantrasyonlarda olacak şekilde ayarlandı. -80 °c de saklanan hücre kültür örnekleri çözüldükten sonra ELISA çalışmasına uygun hale getirildi. Hücre kültür örnekleri reaksiyon dilüenti ile 1:5 dilüe edildi. 50 µl dilüe hücre kültür örnekleri, 50 µl standartlar 96 kuyucuklu ELISA plağına eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µl Reaksiyon dilüenti, 50 µl Griess I reaktifi (2N hidroklorik asit-Sulfanilamid) ve 50 µl Griess II reaktifi (2N hidroklorik asit-N-etilendiamin) eklendi. 10 dk oda ısısında (18-25°C) inkübe edildi.

Endojen nitrit düzeyinin ölçümü: 540 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japon) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Log-Log grafik kullanarak X eksenine nitrit standart değerleri (µmol/L), Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen endojen nitrit seviyeleri belirlendi.

2. Total nitrit konsantrasyonu ölçümü (nitrat redüksiyon yöntemi):

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitten hazır liyofilize halde bulunan 2000 µmol/L konsantrasyonundaki **nitrat** standartı reaksiyon dilüenti ile çözüldü. Daha sonra 1:10 dilüe edilerek 200 µmol/L konsantrasyonundaki birinci standart elde edildi. Dilüsyon sonrası seri dilüsyonlar 100 µmol/L, 50 µmol/L, 25 µmol/L, 12,5 µmol/L, 6.25 µmol/L, 3.12 µmol/L ve 0 µmol/L konsantrasyonlarda olacak şekilde ayarlandı. -80 °c de saklanan hücre kültür örnekleri çözüldükten sonra ELISA çalışmasına uygun hale getirildi. Hücre kültür örnekleri reaksiyon dilüenti ile 1:5 dilüe edildi. 50 µl dilüe hücre kültür örnekleri, 50 µl standartlar 96 kuyucuklu ELISA plağına eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µl Reaksiyon dilüenti, 25 µl NADH (β-Nikotinamid adenin dinükleotid) ve 25 µl Nitrat

redüktaz eklendi. 30 dk 37°C de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 50 µl Griess I reaktifi (2N hidroklorik asit-Sulfanilamid) ve 50 µl Griess II reaktifi (2N hidroklorik asit-N-etilendiamin) eklendi. 10 dk oda ısısında (18-25°C) inkübe edildi.

Total nitrit düzeyinin ölçümü: 540 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japon) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Log-Log grafik kullanarak X eksenine nitrat standart değerleri($\mu\text{mol/L}$),Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen total nitrit seviyeleri belirlendi.

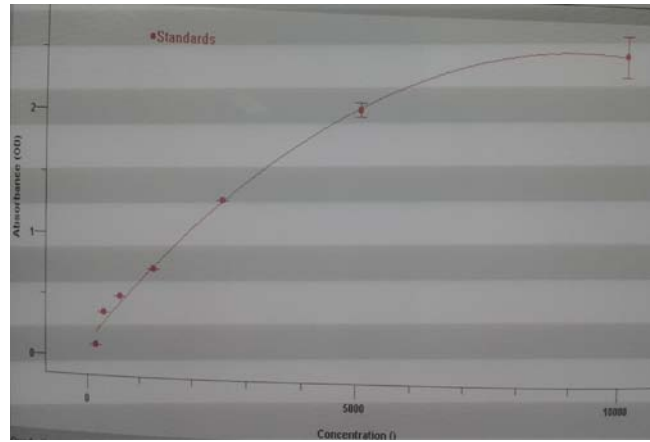
4. BULGULAR

4.1 Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

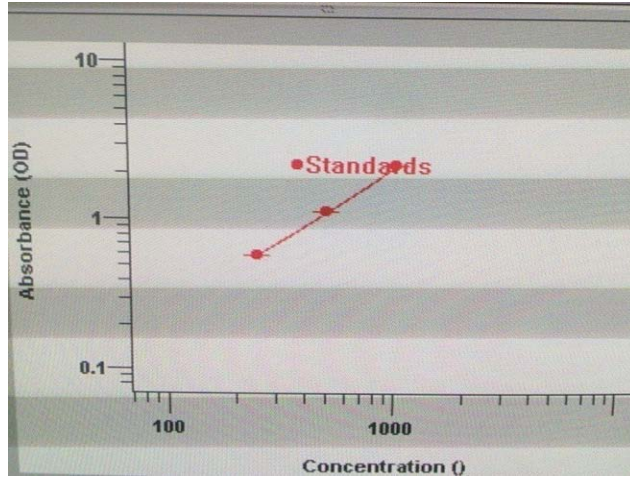
48 sonra yapılan değerlendirmede, 5 ve 10 nM nilotinib içeren kültür ortamındaki endotel hücrelerinin, nilotinib içermeyen ortamdakilerle aynı oranda çoğaldıkları, 100 nM nilotinib içeren kültür ortamındaki endotel hücrelerinin ise, nilotinib içermeyen ortamdakilerin %90'ı oranında oęalabildikleri saptanmıştır.

72 saat sonra yapılan değerlendirmede ise, 5 nM nilotinib içeren kültür ortamındaki endotel hücrelerinin nilotinib içermeyen kültür ortamdakiler ile aynı oranda çoğaldığı, 10 nM nilotinib içeren kültür ortamındaki endotel hücrelerinin, nilotinib içermeyen ortamdakilere göre %90 ve 100 nM nilotinib içeren kültür ortamındaki endotel hücrelerinin ise nilotinib içermeyen ortamdakilerin %80'i oranında oęalabildikleri saptanmıştır.

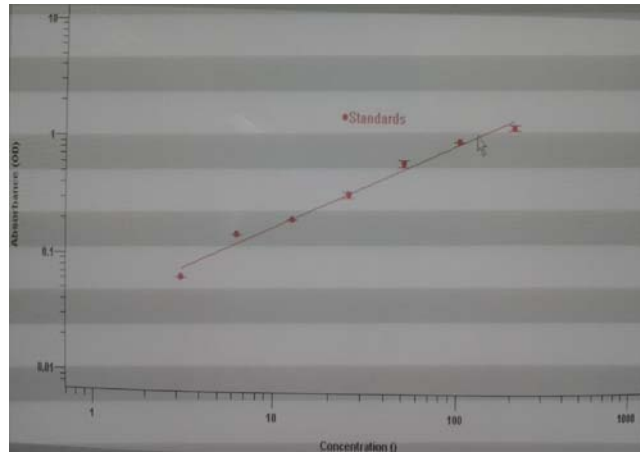
Bu bulgular, nilotinibin kültür ortamındaki karotis arter endotel hücrelerinin proliferasyonunu, doza ve süreye bağlı olarak inhibe ettiğini göstermektedir.



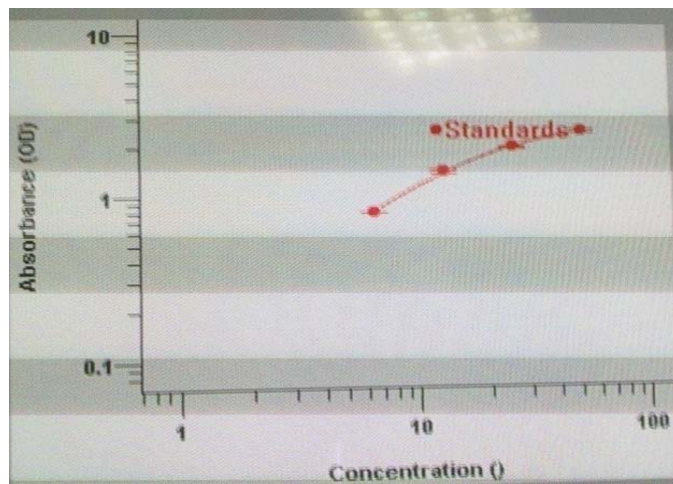
şekil 4:1 PAI-1 Standart



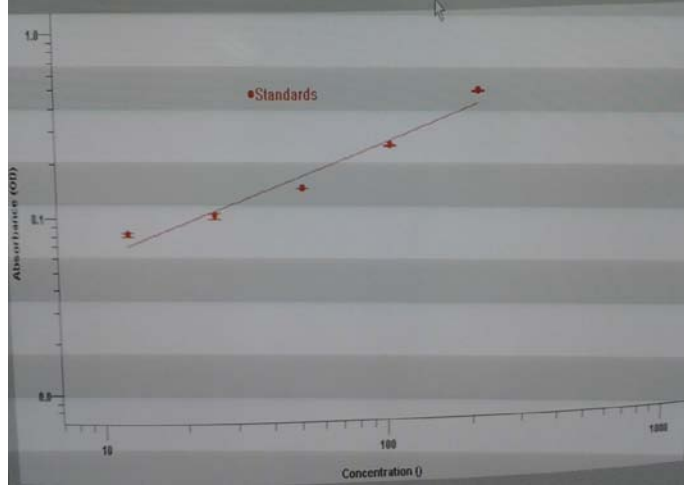
Şekil 4:2 t-PA Standart



Şekil 4:3 ET-1 Standart



Şekil 4:4 vWF Standart



Şekil 4:5 Nitrat Standart

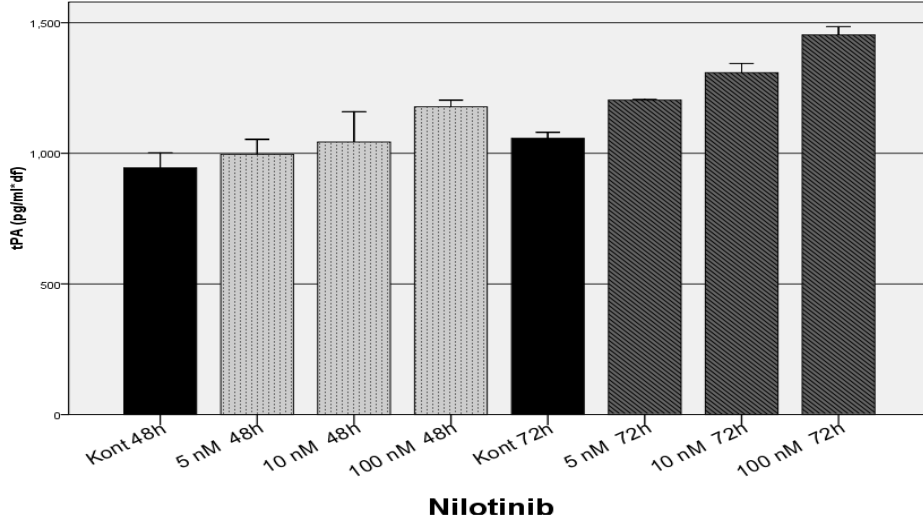
Tablo 4:1 Nilotinibin, Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

	Kontrol (Nilotinib 0 nM)	Nilotinib (5 nM)	Nilotinib (10 nM)	Nilotinib (100 nM)
48. saat	% 100	% 100	% 100	% 90
72.saat	% 100	% 100	% 90	% 80

4.2 Nilotinibin, Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Sekresyon Fonksiyonu Üzerindeki Etkisi

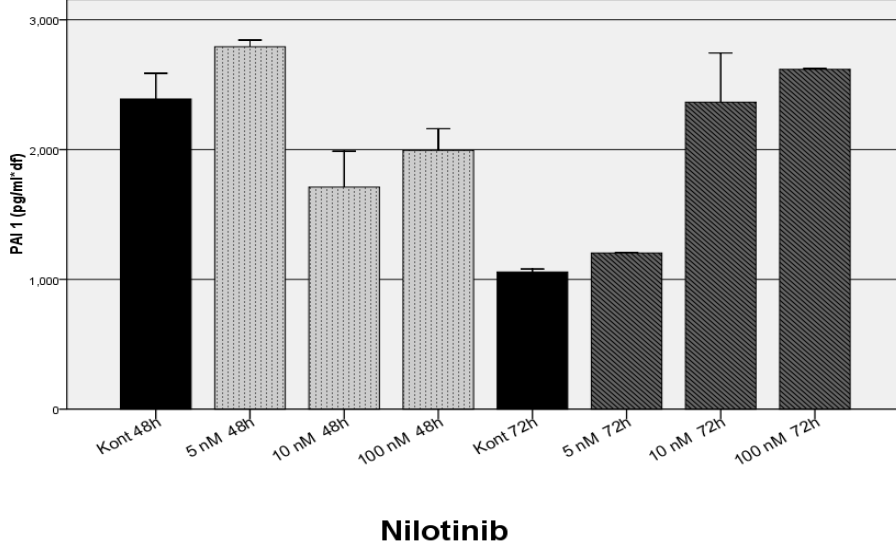
Nilotinibin, kültür ortamındaki karotis arter endotel hücre proliferasyonunu, doz ve süreye bağlı olarak inhibe etmesi nedeni ile hücre başına düştüğü varsayılan, sekrete edilen belirteç miktarının daha iyi yansıtılması amacı ile kültür ortamlarında saptanan belirteçlerin miktarları, hücrelerin kontrole göre (nilotinib içermeyen ortam) proliferasyon oranları gözetilerek düzeltilmiştir.

Örnek Formül: Ortam vWF miktarı%proliferasyon X 100. Örneğin, 72.saat, 100 nM nilotinib içeren ortam için elde edilen vWF miktarı 4000 pg/ml ve hücre çoğalma oranı %80 olduğunda, sonuç $4000/80 \times 100 = 5000$ olacaktır.



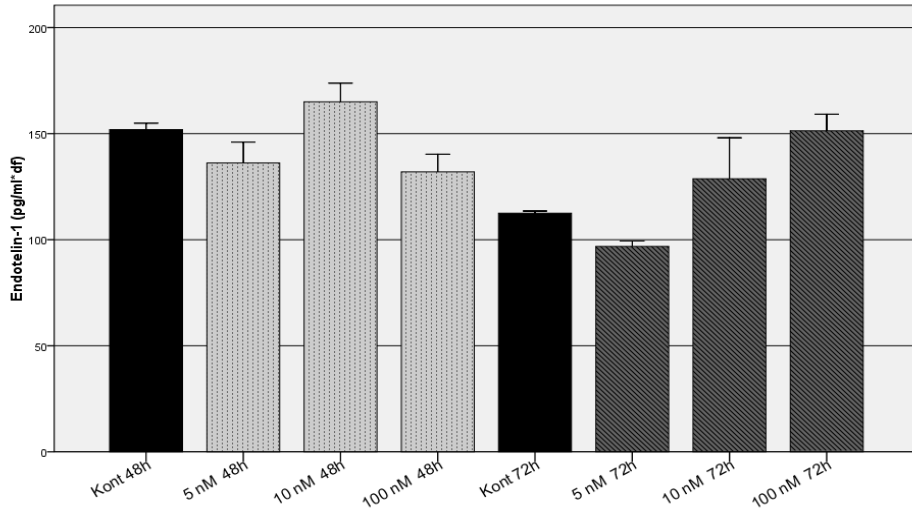
Şekil 4:6 Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin t-PA Sekresyonuna Etkisi

Buna göre, nilotinibe maruz kalmayan hücreler ile karşılaştırıldığında, nilotinibin karotis arter endotel hücrelerinin t-PA sekresyonunu doza ve süreye bağlı olarak arttırdığı saptanmıştır.



Şekil 4:7 Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin PAI-1 Sekresyonuna Etkisi

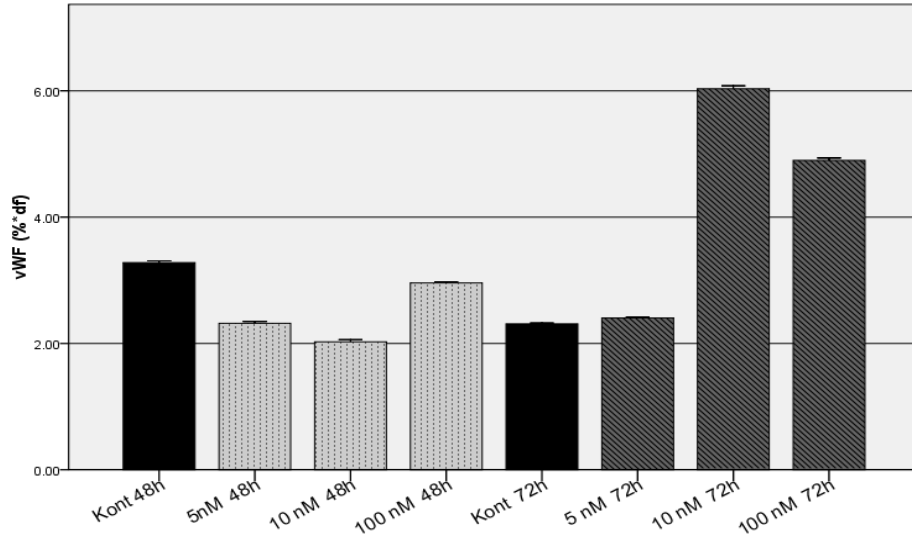
PAI-1 sekresyonunu 48. saatte hafif düzeyde inhibe ettiği, 72. saatte doza bağlı olarak arttırdığı saptanmıştır.



Nilotinib

Şekil 4:8 Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin ET-1 Sekresyonuna Etkisi

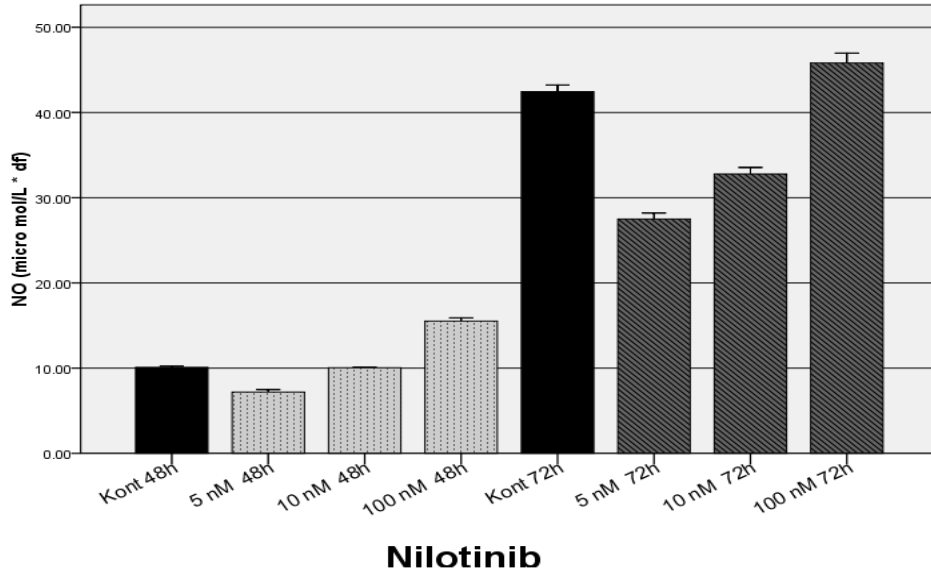
ET-1 sekresyonunun 48. saatte önemli oranda etkilenmediği, 72. saatte ise doza bağımlı olarak arttığı saptanmıştır.



Nilotinib

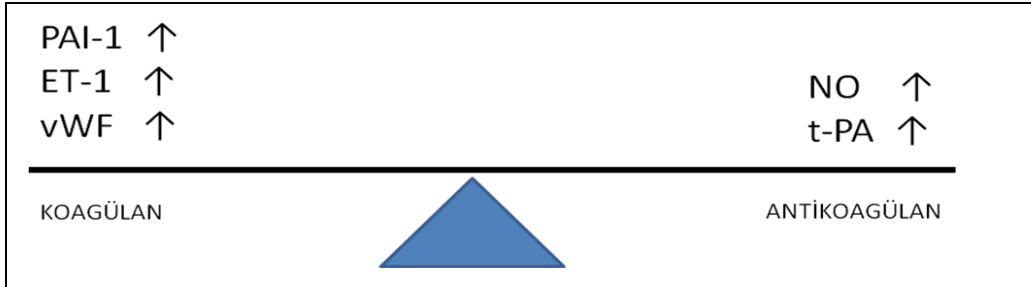
Şekil 4:9 Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin vWF Sekresyonuna Etkisi

vWF sekresyonunu 48. saatte hafif düzeyde inhibe ederken, 72. Saatte ise belirgin oranda arttırdığı saptanmıştır.



Şekil 4:10 Nilotinibin Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Nitrik Oksit Sekresyonuna Etkisi

Nitrik oksit sekresyonunu da doza ve süreye göre bağlı olarak belirgin oranda arttırdığı saptanmıştır.



Şekil 4:11 Nilotinibin Kültür Ortamındaki Karotis Arter Endotel Hücrelerinin Salgı Fonksiyonu Üzerine Etkisi.

5. TARTIŞMA

KML bir ileri yaş hastalığıdır ve yaşlanmayla birlikte ortaya çıkan çeşitli kardiyovasküler hastalıkların varlığı, bu hastaların tedavisinde önemli bir teropatik sorun yaratmaktadır. Bu durum, hastalığın yönetimini, prognozu ve sağkalımı önemli oranda etkilemektedir. Tedavide kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri, her ne kadar standart konvansiyonel kemoteropatik ajanlara göre daha az yan etki gösteriyor ve daha iyi tolere edilebiliyor olsalar da, özellikle kardiyovasküler risk faktörü taşıyan hastalarda, asemptomatik QT uzamasından, semptomatik kalp yetmezliği, akut koroner sendrom ve ani ölüme kadar değişebilen çeşitli kardiyovasküler hastalıklara yol açabilmektedirler [110].

KML tedavisinde kullanılan TKİ'lerinin, bu iyi bilinen kardiyak toksiteleri dışında diğer bir kardiyovasküler sistemle ilgili toksisiteleri ise, bazı yayınlarda bildirildiği üzere nadirde olsa gelişebilen vasküler olaylardır. Bu olaylar, imatinibden nilotinibe tedavi değişikliği sonrası gelişmiş, hızlı ilerleyen ve tedaviye dirençli peripheral arterial okluziv hastalık (PAOH) ve diğer vasküler tıkaçıcı olayları (infarktüs) kapsamaktadır.

TD kip all ve arkadaşları, 2004-2011 yılları arasında nilotinib kullanan 81 hastayı geriye dönük inceleyerek, 7 kardiyak olay geliştiğini (6 hastada akut koroner sendrom 1 hastada yeni gelişen atrial fibrilasyon) ve bu hastalardan birinin de MI nedeniyle hayatını kaybettiğini raporlamışlardır. Kardiyak olay gelişen hastaların tedavi öncesi bir veya daha fazla kardiyak risk faktörlerinin olması ve tümünün önceden imatinib almış olması nedeniyle, gelişen bu olaylarda nilotinib doğrudan suçlanmamış, ancak mevcut risk faktörlerine ilave yük getirebileceği ya da diğer komorbid durumlar üzerinde direkt vasküler etkilerle riski arttırıyor olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu olası vasküler etkilerini de, Aichberger ve arkadaşlarından gelen nilotinible ilgili periferik arteriyel okluziv vakalarla ilişkilendirmişlerdir [110].

Aichberger ve arkadaşlarının yayınladığı bu çalışmada, nilotinib kullanan 24 hastadan 3'ünde gelişen hızlı ilerleyen okluziv periferik arter hastalığı nedeni ile anjioplasti ve/veya multipl cerrahi gereksinimi duyduklarını, 1 hastada şiddetli olmayan periferik arter hastalığı, 1 hastada myokard infarktüsü, 1 hastada spinal infarktüs, 1 hastada supdural hematoma ve 1 hastada da ani ölüm izlendiğini bildirmişlerdir. Periferik arteriyel oklüzyon gelişen hastaların tümünün, nilotinib öncesi imatinib kullanmış olmaları ve

nilotinib başlanması ile PAOH gelişimi arasındaki sürenin kısa olması nedeni ile önceki tedavilerin bu durum için bir risk faktörü oluşturabileceğini, ilaveten imatinib ile nilotinibin benzer tedavi hedeflerinin olduğunu, bu nedenlerden dolayı da sadece nilotinibin suçlanamayacağını ifade etmişlerdir. Ancak bu durumu açıklayabilecek yeterli kanıtları olmamakla beraber, nilotinib kullanan hastalarda periferik okluziv arteriyel hastalığı da içeren vasküler yan etkilerin olabileceğini, bu nedenle nilotinib öncesi ve kullanırken tüm hastalarda mutlaka kardiyovasküler risk faktörlerinin araştırılması ve izlenmesini önermişlerdir [7].

Yine aynı grup, 4 merkez verilerini birleştirerek nilotinib kullanan 179 hastayı geriye dönük olarak incelemişler ve bu hastalardan 11'inde daha önceden görülmeyen invaziv tedaviler gerektiren şiddetli PAOH geliştiğini raporlamışlardır. Benzer şekilde bu hastaların tümünde tedavi öncesi kardiyovasküler risk faktörlerinin olduğunu, yine de nilotinib kullanan hastalarda önceki kardiyovasküler durumların kötüleşebileceğini ifade etmişlerdir [6]. Merak uyandıran bu raporlardan sonra tefferi ve arkadaşları da kendi deneyimlerinden benzer iki olguyu yayınlamışlardır. Bu hastalardan birinde girişimsel tedavi gerektiren ve tekrarlayan PAOH ile beraber akut koroner sendrom ve koroner arter bypass greft operasyonu uygulandığını, diğer hastada ise nilotinib sonrası ani ölüm geliştiğini bildirmişlerdir. Üstelik bu hastaların önceki bildirilen çalışmalardaki hastaların aksine, nilotinib öncesi herhangi bir kardiyovasküler risk taşımadıklarını saptamışlardır. Bu nedenle, imatinibe kıyasla halen 2. Kuşak TKİ'lerinin uzun süreli izlemlerinin olmaması ve bu tür açıklanamayan, ciddi yan etkileri nedeni ile de ilk sırada kullanımları konusuna şüpheyle yaklaşılması gerektiğini vurgulamışlardır [111].

Gelişen bu vasküler yan etkiler için bazı potansiyel açıklamalar ortaya atılmıştır. Nilotinibin metabolik etkileri, vasküler hücreler veya koagülasyon / fibrinolitik sistem üzerine direkt ilaç toksisitesi gibi varsayımlar vardır. Bununla birlikte nilotinibe bağlı vasküler komplikasyon gelişen bu hastaların, kardiyovasküler hastalık açısından bir veya daha fazla risk faktörünü (sigara, sistemik hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite ve ileri yaş gibi) taşıyor olmaları da doğrudan nilotinibin suçlanmaması gerektiği görüşünü desteklemektedir. Ancak yine de, bu hastaların niçin bazılarında yaşamı tehdit eden ciddi arteriyel olayların geliştiği bugün için bilinmemekte ve bu vasküler olayların gelişiminde altta yatan mekanizma kesin olarak açıklanamamıştır. Bu nedenle de yaygın olarak kabul

gören öneri, kardiyovasküler risk faktörlü hastalarda nilotinib kullanımını esnasında dikkatli olunması ve hastaların yakından izlenmesi şeklindedir [48].

Nilotinible ilişkili olduğu düşünülen bu vasküler olaylar ilgi çekicidir. Biz de gelişen bu vasküler olayların zemininde, nilotinib endotel etkileşimi olabileceğini düşünerek kültür ortamında nilotinibe maruz bırakılmış endotel hücrelerinin sekretuar fonksiyonlarını ve canlılıklarını incelemeyi planladık. Çünkü bilindiği üzere, sağlıklı koşullarda normal endotel antikoagülan ve antitrombotik etkinlik göstererek, fizyolojik olmayan trombüs oluşumunu engellemekte ve bu sayede trombotik olaylardan korunmada çok önemli bir rol oynamaktadır. Herhangi bir nedenle endotel hasarı meydana geldiği durumlarda endotel hücreleri uyarılmakta ve tromboza eğilim yaratmaktadır. Güncel bakış açısına göre endotel disfonksiyonu, aterosklerozun başlangıcında, gelişiminde, aterosklerotik plak progresyonunda ve aterosklerotik komplikasyonlarda çok önemli bir faktör olarak görülmektedir. Hatta endotel disfonksiyonu gelecekte olabilecek kardiyovasküler olaylar için de öngördürücüdür [57, 112].

Endotel fonksiyonlarının değerlendirilebilmesinde farklı yöntemler vardır ve endotelden salınan belirteçlerin ölçümü de bu yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Biz de bu amaçla nilotinibe maruz bırakılmış endotel hücrelerinin nitrik oksit, von Willebrand faktör (vWF), doku plasminojen aktivatörü (tPA), plasminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve endotelin-1'in salınımını izledik.

Sonuçlarımız incelendiğinde: Nilotinibin kültür ortamındaki kardiyovasküler risk faktörlerine maruz kalmamış karotis arter endotel hücrelerinin sekretuar işlevlerini hem koagülan hem de antikoagülan yönde etkiliyor gibi görünmesi net bir yoruma varmayı güçleştirmektedir ve aynı zamanda da özgün bir tirozin kinaz ileti yolu inhibisyonuna işaret etmemektedir. Bununla birlikte, nilotinibin bir tirozin kinaz inhibitörü olması nedeni ile sekresyonları arttırıcı değil inhibe edici yönde etkili olması beklenirken, arttırıcı yönde etkinlik göstermesi, toksik bir etkiye maruz kalan hücrelerin reaktif yanıtı olabileceğini akla getirmektedir.

Mekanizması açık olmamakla birlikte, nilotinibin olgun karotis arter endotel hücrelerinin proliferasyonunu baskılıyor olması, tromboza yatkınlığın mekanizmasının risk faktörlerinin yarattığı endotel hasarlanmasının onarımının gecikmesine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Olgun endotel hücrelerinin işlevleri esas olarak VEGFR-2 üzerinden düzenlenmektedir. Bununla birlikte endotel hasarının onarılmasında ve yeni damar

oluşumunda önemli işlevlere sahip dolaşan öncül endotel hücreleri bir büyüme faktörü olan c-KIT reseptörleri de eksprese etmektedir. Dolaşan endotel öncü hücrelerinin proliferasyonunun c-KIT inhibisyonuna bağlı olarak etkilenmesi ve endotel hasarının onarımında eksikliğe yol açması da bir olasılıktır. Bununla birlikte invitro koşullarda endotel hücreleri üzerindeki bu etkinlik, invivo koşulları doğrudan yansıtmayabilir.

Sonuç olarak, bizim araştırmamız nilotinibin kardiyovasküler risk faktörlerine sahip hastalarda ortaya çıkardığı periferik arteriyel oklüzyonların mekanizmasının açıklığa kavuşturulması amacı ile yapılmış öncü bir araştırma niteliğindedir. Bu konuda yapılacak daha ileri araştırmalar ile mekanizmaların açığa kavuşturulması KML hastalarının yönetiminde önemli katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Manley, P.W., et al., *Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib*. Biochim Biophys Acta. **1804**(3): p. 445-53.
2. Milojkovic, D., et al., *Early prediction of success or failure of treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia*. Haematologica. **95**(2): p. 224-31.
3. Jabbour, E., J.E. Cortes, and H.M. Kantarjian, *Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy?* Mayo Clin Proc, 2009. **84**(2): p. 161-9.
4. Talpaz, M., et al., *Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias*. N Engl J Med, 2006. **354**(24): p. 2531-41.
5. Wei, G., S. Rafiyath, and D. Liu, *First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib*. J Hematol Oncol. **3**: p. 47.
6. Le Coutre, P., et al., *Severe peripheral arterial disease during nilotinib therapy*. J Natl Cancer Inst. **103**(17): p. 1347-8.
7. Aichberger, K.J., et al., *Progressive peripheral arterial occlusive disease and other vascular events during nilotinib therapy in CML*. Am J Hematol. **86**(7): p. 533-9.
8. Petty, R.G. and J.D. Pearson, *Endothelium--the axis of vascular health and disease*. J R Coll Physicians Lond, 1989. **23**(2): p. 92-102.
9. Jin, R.C. and J. Loscalzo, *Vascular Nitric Oxide: Formation and Function*. J Blood Med. **2010**(1): p. 147-162.
10. Mughal, T.I. and J.M. Goldman, *Chronic myeloid leukaemia. STI 571 magnifies the therapeutic dilemma*. Eur J Cancer, 2001. **37**(5): p. 561-8.
11. Nowell PC, H.D., *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science, 1960. **132**: p. 1497.
12. Shtivelman, E., et al., *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia*. Nature, 1985. **315**(6020): p. 550-4.
13. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1031-7.

14. Goldman, J.M. and J.V. Melo, *Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment*. N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1451-64.
15. Faderl, S., et al., *The biology of chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **341**(3): p. 164-72.
16. Cervantes, F., et al., *The changing profile of Ph-positive chronic myeloid leukemia at presentation: possible impact of earlier diagnosis on survival*. Haematologica, 1999. **84**(4): p. 324-7.
17. Breed, C.D., *Diagnosis, treatment, and nursing care of patients with chronic leukemia*. Semin Oncol Nurs, 2003. **19**(2): p. 109-17.
18. Savage DG, S.R., Goldman JM., *Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period*. . Br J Haematol. , 1997. **96**(1): p. 111-116.
19. Schiffer, C.A., *BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia*. N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 258-65.
20. Tefferi, A. and J.W. Vardiman, *Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 14-22.
21. Geary, C.G., *The story of chronic myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2000. **110**(1): p. 2-11.
22. Faderl, S., et al., *Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1998. **91**(11): p. 3995-4019.
23. Sattler, M. and J.D. Griffin, *Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene*. Semin Hematol, 2003. **40**(2 Suppl 2): p. 4-10.
24. Weisberg, E., et al., *Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(5): p. 345-56.
25. Steelman, L.S., et al., *Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 686-707.
26. Li, S., *Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(1): p. 19-26.

27. Chang, F., et al., *Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy.* Leukemia, 2003. **17**(3): p. 590-603.
28. Kennedy, B.J., *Hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia.* Cancer, 1972. **29**(4): p. 1052-6.
29. Haznedaroğlu, C., *Kronik myeloid lösemi.* Türkiye Klinikleri J Int Med Sci, 2007. **3**(2): p. 56-61.
30. Fefer, A., et al., *Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin.* N Engl J Med, 1979. **300**(7): p. 333-7.
31. Pavlu, J., et al., *Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned?* Blood. **117**(3): p. 755-63.
32. Hughes, T.P., et al., *Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1423-32.
33. Druker, B.J., *Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML.* Blood, 2008. **112**(13): p. 4808-17.
34. Hantschel, O., U. Rix, and G. Superti-Furga, *Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib.* Leuk Lymphoma, 2008. **49**(4): p. 615-9.
35. Deininger, M.W., et al., *Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib.* J Clin Oncol, 2003. **21**(8): p. 1637-47.
36. Thanopoulou, E. and I. Judson, *The safety profile of imatinib in CML and GIST: long-term considerations.* Arch Toxicol. **86**(1): p. 1-12.
37. Guilhot, F., *Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management.* Oncologist, 2004. **9**(3): p. 271-81.
38. Apperley, J.F., *Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia.* Lancet Oncol, 2007. **8**(11): p. 1018-29.
39. de Lavallade, H., et al., *Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis.* J Clin Oncol, 2008. **26**(20): p. 3358-63.
40. Silver RT, T.M., Sawyers CL, et al. , *Four years of follow-up of 1027 patients with late chronic phase (L-CP), accelerated phase (AP), or blast crisis (BC) chronic*

- myeloid leukemia (CML) treated with imatinib in three large phase II trials.* Blood, 2004. **104**(11.a).
41. Rix, U., et al., *Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets.* Blood, 2007. **110**(12): p. 4055-63.
 42. Weisberg, E., et al., *Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl.* Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 129-41.
 43. Kantarjian, H.M., et al., *Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance.* Blood, 2007. **110**(10): p. 3540-6.
 44. le Coutre, P., et al., *Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia.* Blood, 2008. **111**(4): p. 1834-9.
 45. Tanaka, C., et al., *Clinical pharmacokinetics of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor nilotinib.* Clin Pharmacol Ther. **87**(2): p. 197-203.
 46. Saglio, G., et al., *Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med. **362**(24): p. 2251-9.
 47. Breccia, M., et al., *Impaired fasting glucose level as metabolic side effect of nilotinib in non-diabetic chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib.* Leuk Res, 2007. **31**(12): p. 1770-2.
 48. Valent, P., *Severe adverse events associated with the use of second-line BCR/ABL tyrosine kinase inhibitors: preferential occurrence in patients with comorbidities.* Haematologica. **96**(10): p. 1395-7.
 49. Lombardo, L.J., et al., *Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays.* J Med Chem, 2004. **47**(27): p. 6658-61.
 50. Tokarski, J.S., et al., *The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants.* Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5790-7.

51. Bantscheff, M., et al., *Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(9): p. 1035-44.
52. Kantarjian, H., et al., *Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med. **362**(24): p. 2260-70.
53. Brave, M., et al., *Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(2): p. 352-9.
54. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.
55. Anderson, T.J., *Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(3): p. 631-8.
56. Fishman, A.P., *Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **401**: p. 1-8.
57. namrata, c., *Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis*. Internet Journal of Medical Update, 2009. **4**(1): p. 33-41.
58. Cosentino, F. and T.F. Luscher, *Endothelial function in coronary artery disease*. Cardiologia, 1997. **42**(12): p. 1221-7.
59. Caballero, A.E., *Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease*. Obes Res, 2003. **11**(11): p. 1278-89.
60. Moncada S, H.A., *The L-arginin and nitric oxide pathway*. New Eng J Med 1993. **323**: p. 2003-2012.
61. Krumenacker, J.S., K.A. Hanafy, and F. Murad, *Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase*. Brain Res Bull, 2004. **62**(6): p. 505-15.
62. Busse, R. and I. Fleming, *Endothelial dysfunction in atherosclerosis*. J Vasc Res, 1996. **33**(3): p. 181-94.
63. Abraham, D. and M. Dashwood, *Endothelin--role in vascular disease*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47 Suppl 5**: p. v23-4.
64. Ferroni, P., et al., *Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16**(3): p. 222-33.
65. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.

66. Kinlay, S. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy*. Am J Cardiol, 1997. **80**(9A): p. 11I-16I.
67. Lerman, A., et al., *Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs*. Circulation, 1993. **88**(6): p. 2923-8.
68. Creager, M.A., et al., *Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans*. J Clin Invest, 1990. **86**(1): p. 228-34.
69. Watts, G.F. and D.A. Playford, *Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis*. Atherosclerosis, 1998. **141**(1): p. 17-30.
70. Kharbanda, R.K. and J.E. Deanfield, *Functions of the healthy endothelium*. Coron Artery Dis, 2001. **12**(6): p. 485-91.
71. Bucala, R., et al., *Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6434-8.
72. Hartge, M.M., U. Kintscher, and T. Unger, *Endothelial dysfunction and its role in diabetic vascular disease*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2006. **35**(3): p. 551-60, viii-ix.
73. Zeiher, A.M., V. Schachinger, and J. Minners, *Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1094-100.
74. Endemenn DH, S.E., *Endothelial dysfunction*. J Am Soc Nephrol. , 2004. **15**(8): p. 1983-92.
75. Love, M.P. and J.J. McMurray, *Endothelin receptor antagonists and cardiovascular diseases of aging*. Drugs Aging, 2001. **18**(6): p. 425-40.
76. Liuba, P., et al., *Endothelial dysfunction after repeated Chlamydia pneumoniae infection in apolipoprotein E-knockout mice*. Circulation, 2000. **102**(9): p. 1039-44.
77. Beckman, J.A., et al., *Radiation therapy impairs endothelium-dependent vasodilation in humans*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(3): p. 761-5.
78. Chow, A.Y., et al., *Anthracyclines cause endothelial injury in pediatric cancer patients: a pilot study*. J Clin Oncol, 2006. **24**(6): p. 925-8.
79. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1986. **315**(17): p. 1046-51.

80. Corretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 257-65.
81. Raitakari, O.T. and D.S. Celermajer, *Testing for endothelial dysfunction*. Ann Med, 2000. **32**(5): p. 293-304.
82. Winkler, G., et al., *Elevated serum TNF-alpha level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients*. Diabet Med, 1999. **16**(3): p. 207-11.
83. Huber, K., *Plasminogen activator inhibitor type-1 (part one): basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease*. J Thromb Thrombolysis, 2001. **11**(3): p. 183-93.
84. Zorio, E., et al., *Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms*. Curr Med Chem, 2008. **15**(9): p. 923-9.
85. Dobrovolsky, A.B. and E.V. Titaeva, *The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(1): p. 99-108.
86. Dawson, S. and A. Henney, *The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review*. Atherosclerosis, 1992. **95**(2-3): p. 105-17.
87. Dawson, S., et al., *Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(1): p. 183-90.
88. Sobel, B.E., et al., *Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients: a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence*. Circulation, 1998. **97**(22): p. 2213-21.
89. Haffner, S.M., et al., *Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Diabetes Care, 1999. **22**(4): p. 562-8.
90. Folsom, A.R., et al., *Impact of weight loss on plasminogen activator inhibitor (PAI-1), factor VII, and other hemostatic factors in moderately overweight adults*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(2): p. 162-9.

91. Grancha, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter 4G/5G genotype and increased PAI-1 circulating levels in postmenopausal women with coronary artery disease*. *Thromb Haemost*, 1999. **81**(4): p. 516-21.
92. De Meyer, S.F., H. Deckmyn, and K. Vanhoorelbeke, *von Willebrand factor to the rescue*. *Blood*, 2009. **113**(21): p. 5049-57.
93. Miura, S., et al., *Interaction of von Willebrand factor domain A1 with platelet glycoprotein Ibalpha-(1-289). Slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(11): p. 7539-46.
94. Jenkins, P.V., K.J. Pasi, and S.J. Perkins, *Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease*. *Blood*, 1998. **91**(6): p. 2032-44.
95. Fujimoto, T., S. Ohara, and J. Hawiger, *Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets*. *J Clin Invest*, 1982. **69**(6): p. 1212-22.
96. Blann, A.D. and C.N. McCollum, *von Willebrand factor, endothelial cell damage and atherosclerosis*. *Eur J Vasc Surg*, 1994. **8**(1): p. 10-5.
97. Jansson, J.H., T.K. Nilsson, and O. Johnson, *von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death*. *Br Heart J*, 1991. **66**(5): p. 351-5.
98. Cortellaro, M., et al., *The PLAT Study: hemostatic function in relation to atherothrombotic ischemic events in vascular disease patients. Principal results. PLAT Study Group. Progetto Lombardo Atero-Trombosi (PLAT) Study Group*. *Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(9): p. 1063-70.
99. Hirata, Y., *Endothelin peptides*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1996. **5**(1): p. 12-5.
100. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. *Nature*, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
101. Colucci, W.S., *Myocardial endothelin. Does it play a role in myocardial failure?* *Circulation*, 1996. **93**(6): p. 1069-72.
102. Bialecki, R.A., et al., *Functional comparison of endothelin receptors in human and rat pulmonary artery smooth muscle*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(2 Pt 1): p. L211-8.
103. de Nucci, G., et al., *Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and*

- endothelium-derived relaxing factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9797-800.
104. Lerman, A., et al., *Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis*. N Engl J Med, 1991. **325**(14): p. 997-1001.
 105. Omland, T., et al., *Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction*. Circulation, 1994. **89**(4): p. 1573-9.
 106. Mayes, M.D., *Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(5): p. 1190-9.
 107. Miyauchi, T. and T. Masaki, *Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system*. Annu Rev Physiol, 1999. **61**: p. 391-415.
 108. Stein, C.M., et al., *Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(1): p. 117-22.
 109. Newby, D.E., et al., *Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction*. Circulation, 1999. **99**(11): p. 1411-5.
 110. Kim, T.D., et al., *Clinical cardiac safety profile of nilotinib*. Haematologica. **97**(6): p. 883-9.
 111. Tefferi, A. and L. Letendre, *Nilotinib treatment-associated peripheral artery disease and sudden death: yet another reason to stick to imatinib as front-line therapy for chronic myelogenous leukemia*. Am J Hematol. **86**(7): p. 610-1.
 112. Matsuzawa, Y., et al., *Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women*. J Am Coll Cardiol. **55**(16): p. 1688-96.