

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP ve DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
TİCAGRELOR'UN İSKELET KASI VİABİLİTESİ VE ADMA,
MDA, GSH SEVİYELERİNE ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Ertuğrul ERTUĞRUL**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Oktay BURMA**

**ELAZIĞ
2014**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Oktay BURMA

Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Oktay BURMA

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca her aşamada sürekli desteklerini gördüğüm Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Oktay BURMA'ya, bilgi, öneri ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayhan UYSAL'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin laboratuvar çalışmalarında katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Dilara KAMAN'a, tezin Histopatolojik incelemelerini yapan ve yol gösteren Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN ve Uzm. Dr. Gökhan ARTAŞ'a tezin yazılmasında bilgi, tecrübe ve önerileriyle bana yol gösteren Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya, bilgi, tecrübe ve önerilerinden yararlandığım Anestezi Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal BAYAR'a ve Anestezi Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İhtisas eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma, ameliyathane, yoğun bakım ve klinikteki tüm hemşire ve personel arkadaşlara teşekkürlerimi sunarım.

Beni tüm zorluk ve sıkıntılara rağmen, okutup bugünlere getiren ve hiçbir fedakarlıktan sakınmayan canım Annem ve Babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Beş yılı aşan bir zaman zarfında ihtisas eğitimim boyunca bir an olsun desteğini benden hiç esirgemeyen eşim Elif ERTUĞRUL'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

İskemi-Reperfüzyon (I-R) hasarının önlenmesi amacıyla birçok ajan deneysel çalışmalarda başarılı sonuçlar olsa da bunların pek azı klinik olarak kullanıma girmiştir. Bu çalışmada deneysel alt extremitte iskemi-reperfüzyon hasarında, yeni bir antiplatelet ajan olan ticagrelorun kan ADMA, MDA ve GSH düzeylerine ve iskelet kası viabilitesine etkileri incelenmiştir.

Çalışmada, 8-10 haftalık 250±20 gram ağırlığında Sprague Dawley cinsi 21 adet erkek rat kullanıldı. Kontrol grubuna (n=7) herhangi bir işlem uygulanmazken, iskemi-reperfüzyon (I-R) grubu (n=7) ve ticagrelor grubuna (n=7) alt extremitte iskemisi oluşturmak amacı ile cerrahi yöntemle infrarenal abdominal aorta (İAA) klemp konarak 2 saat iskemi, klemp kaldırılarak 2 saat süre ile reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyonun sonunda ratlar sakrifiye edilerek soleus kasları eksize edilip kas dokusu örnekleri ve kan örnekleri alındı. Doku örneklerinde histopatolojik inceleme, kan ve kas dokuda ADMA, MDA, GSH düzeyleri çalışıldı.

Tüm gruplarda reperfüzyon süresinin ardından, histopatolojik incelemeler için soleus kası örnekleri alındı. Histopatolojik incelemede, dokular hematoksil-eosin boyasıyla boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi. Belirlenen parametreler için histopatolojik skorlamalar yapıldı. Sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılma ve ödem bakımından kontrol grubuna göre iskemi-reperfüzyon grubu ve ticagrelor gruplarında belirgin derecede artış olduğu saptandı. Ancak bu artışların iskemi-reperfüzyon öncesi ticagrelor uygulanan ratlarda, ticagrelor uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede azalmış olduğu saptandı.

Biyokimyasal ölçüm sonuçları ile yapılan istatistiksel analizde gruplara ait kan ve kas doku ADMA ve MDA düzeylerinin benzer şekilde I-R grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı görüldü. Ticagrelor uygulanan grupta ise bu artış daha azdı. Kontrol grubuna göre ticagrelor grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. Kan GSH düzeylerinde artış I-R grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı. Ticagrelor grubunda kan GSH düzeylerinde artış benzer şekilde kontrol grubuna göre anlamlıydı. I-R grubuna göre ise ticagrelor grubunda anlamlı düzeyde azalmıştı. Kas dokusu GSH düzeylerinde artış I-R

grubunda, kontrol grubuna göre anlamlıydı. Ticagrelor grubunda ise I-R grubuna göre anlamlı bir düşüş olup kontrol grubuna göre artış anlamsızdı.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışmada yeni bir antiplatelet ajan olan ticagrelorun alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarında oksidan düzeyini ve iskelet kası hasarını azalttığına dair veriler elde edilmiştir. Ancak iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerin hangi mekanizmalar aracılığı ile oluştuğunu ayrıntılı olarak aydınlatılabilmek için yeni ve daha kapsamlı deneysel çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir. Bu konuda yapılacak daha geniş ölçekli çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızı destekler ise, günlük klinik kullanımda çok önemli fayda sağlayabileceği, morbidite ve mortaliteyi azaltabileceği, hastane yatış sürelerini kısaltabileceği ve ülke ekonomisine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi-Reperfüzyon Hasarı, ADMA, MDA, GSH, Ticagrelor

ABSTRACT

THE EFFECTS OF TICAGRELOR ON VIABILITY OF SKELETAL MUSCLES AND THE LEVELS OF ADMA, MDA, GSH IN A LOWER EXTREMITY ISCHEMIA-REPERFUSION MODEL

Although successful results were obtained in various experimental studies aiming to prevent Ischemia-Reperfusion (I-R) damage, very few of them came into use clinically. In this study related with experimental lower extremity ischemia-reperfusion damage, the effects of ticagrelor, which is a new antiplatelet agent, on blood ADMA, MDA, GSH levels and skeleton muscle viability were examined.

In the study, 21 male rats aged 8-10 weeks and with a weight of 250 ± 20 gr were used. While no operation was performed on control group (n=7) infrarenal abdominal aorta (IAA) clamp was placed to ischemia-reperfusion (I-R) group (n=7) and ticagrelor group (n=7) and ischemia was applied for 2 hours and reperfusion was applied by 2 hours after removal of clamp. At the end of reperfusion, rats were sacrificed and then their soleus muscles were excised and muscle and blood tissue samples were taken. Histopathological examination was applied to tissue samples and ADMA, MDA, GSH levels were examined on blood samples.

After reperfusion period on all groups, soleus muscle samples were taken for histopathological examinations. In histopathological examination, hematoxylin-eosin staining was applied to tissues and were evaluated by light microscope. Histopathological scoring was applied for determined parameters. When results were statistically evaluated, significant increase was detected in ischemia-reperfusion group compared to control group in terms of deviling loss, separation in muscle fibers and edema. However it was also determined that these increases significantly decreased in samples to which ticagrelor was applied prior to ischemia-reperfusion compared to the group to which ticagrelor was not applied.

In the statistical analysis made with biochemical measurement results it was determined that the blood and muscle tissue ADMA and MDA levels significantly increased in I-R group compared to control group. This increase was less in the group to which ticagrelor was applied. There was no statistically significant difference in the ticagrelor group compared to control group. The increase in blood GSH levels was statistically significant in I-R group compared to control group. The increase in blood GSH levels was similarly statistically significant in ticagrelor group

compared to control group. On the other hand significant decrease was observed in ticagrelor group compared to I-R group. The GSH level increase in muscle tissues was significant in I-R group compared to control group. In ticagrelor group the decrease was significant compared to I-R group while the increase was not significant compared to control group.

As a result, in this study data was obtained that ticagrelor, which is a new antiplatelet agent, decreases oxidant level and skeleton muscle damage in lower extremity ischemia-reperfusion damage. However in order to enlighten through which mechanisms the protective effects were formed, requirement for new and more detailed experimental studies is considered. If the results of the larger scaled studies that will be made about this subject support our study, it is considered that it will provide very important benefit in daily clinical usage, decrease mortality and morbidity, shorten hospital stay periods and provide contribution to country economy.

Key words: Ischemia-Reperfusion injury, ADMA, MDA, GSH, Ticagrelor

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. İskemi	2
1.1.2. İskemi Çalışmalarının Tarihçesi	3
1.1.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	4
1.1.4. İskelet Kasında İskemi-Reperfüzyon Hasarı	4
1.1.5. İskemi-Reperfüzyona Karşı Lokal Mikrovasküler Yanıtlar	5
1.1.6. İskemi-Reperfüzyon Sonrası Uzak Organ Hasarı	6
1.1.7. İskemik ve Hipoksik Zedelenme	7
1.1.7.1. Geri Dönüştü Zedelenme	9
1.1.7.2. Geri Dönüştü Zedelenme	10
1.1.7.3. İskemi Reperfüzyon Zedelenmesi	11
1.1.8. İskemi-Reperfüzyon Hasarı Mekanizması	12
1.1.8.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	12
1.1.8.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Polimorf Nüveli Lökositler	18
1.1.8.2.1. Mikrodolaşım ve No-Reflow Fenomeni	19
1.1.8.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Komplemanın Rolü	20
1.1.8.4. Sitokinler	20
1.1.8.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Endotel Hücresinin Rolü	21
1.1.9. Damar Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon	21
1.1.10. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri	23
1.1.10.1. Enzimatik Antioksidanlar	23

1.1.10.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	24
1.1.10.3. Süpürücü (Zincir Kıran) Antioksidanlar	24
1.1.11. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA)	24
1.1.11.1. ADMA metabolizması	25
1.1.11.2. ADMA'nın Taşınması	27
1.1.11.3. ADMA'nın Vücuttan Uzaklaştırılması	27
1.1.11.3.1. Hücre içi ADMA	29
1.1.11.3.2. Dolaşımdaki ADMA	30
1.1.11.4. ADMA ve Endotel Disfonksiyonu	31
1.1.11.5. ADMA'nın Kardiyovasküler Etkileri	32
1.1.11.6. ADMA ve Oksidan Stres	33
1.1.11.7. ADMA Ölçüm Yöntemleri	34
1.1.12. Glutasyon (GSH)	35
1.1.13. Malondialdehit (MDA)	36
1.1.14. Trombositler (Platelet)	36
1.1.14.1. Platelet Yapısal Anatomisi	37
1.1.14.2. Platelet Fonksiyonel Anatomisi	38
1.1.14.2.1. Platelet Adezyonu	39
1.1.14.2.2. Platelet Aktivasyonu	41
1.1.14.2.3. Platelet Sekresyonu	42
1.1.14.2.4. Plateletlerde Bağlanma	44
1.1.14.2.5. Platelet Agregasyonu	45
1.1.15. ADP Reseptör Antagonistleri	46
1.1.16. Aortik Kros-Klempin Sistemik Etkileri	47
1.1.16.1. Oklüzyonun Seviyesi	48
1.1.16.2. Renin	48
1.1.16.3. Katekolamin	49
1.1.16.4. Serbest Oksijen Radikalleri	49
1.1.16.5. Prostaglandinler	50
1.1.16.6. Kompleman	51
1.1.16.7. Myokardiyal Depresan Faktör	51
1.1.16.8. Endotoksinler, Sitokinler ve Diğer Mediatörler	51

1.1.17. Ticagrelor (AZD6140)	51
1.1.17.1. Ticagrelorun geliştirilme süreci	52
1.1.17.2. Kimyasal özellikler ve reseptör	52
1.1.17.3. Farmakodinami	53
1.1.17.4. Hedeflenmeyen etkiler	54
1.1.17.5. Farmakokinetik	55
1.1.17.6. Emilim	55
1.1.17.7. Dağılım	55
1.1.17.8. Metabolizma	55
1.1.17.9. Atılım	55
1.1.17.10. Güvenlilik ve tolerabilite	56
1.1.17.11. Kontrendikasyonlar	57
2. GEREÇ VE YÖNTEM	58
2.1. Ratların Hazırlanması ve Operasyon Tekniği	58
2.2. Deney Modeli	59
2.3. Histopatolojik Teknikler	60
2.4. Biyokimyasal ve Histopatolojik Değerlendirme ve Ölçüm Yöntemleri	61
2.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	61
2.5. Biyokimyasal Analiz	61
2.6. İstatistik	63
2.6.1. Biyokimyasal istatistikler	63
2.6.2. Histopatolojik istatistikler	63
3. BULGULAR	64
3.1. Kanda ve soleus kasında ADMA, MDA, GSH değerleri	64
3.2. Histopatolojik Bulgular	71
4. TARTIŞMA	74
5. KAYNAKLAR	80
6. ÖZGEÇMİŞ	106

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan bileşikler	13
Tablo 2. ADMA, MDA, GSH ölçümleri için HPLC cihazı ve katalog bilgileri	62
Tablo 3. Rat kan örneklerinde ADMA, MDA, GSH değerleri	65
Tablo 4. Rat kas dokusu örneklerinde ADMA, MDA, GSH değerleri	67
Tablo 5. Soleus kas dokusundaki hasar skorlaması	69
Tablo 6. Rat kas dokusunun histopatolojik incelenmesinde elde edilen veriler	70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	İskemi-reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu	8
Şekil 2.	Hücre zedelenmesinde hücre içi kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları	10
Şekil 3.	İskemik zedelenmede olaylar dizisi	11
Şekil 4.	Serbest radikallerin, hücre yapısını bozarak hastalık oluşumundaki rolü	17
Şekil 5.	İskemi-reperfüzyon hasarında lökosit-endoel etkileşimi	19
Şekil 6.	L-Arginin, ADMA, SDMA ve L-NMMA'nin yapısı	25
Şekil 8.	ADMA sentezi	27
Şekil 9.	ADMA'nın eliminasyonu	28
Şekil 10.	ADMA metabolizmasının NO tarafından düzenlenmesi	29
Şekil 11.	ADMA ve oksidan stres	34
Şekil 12.	Trombositin içyapısı	38
Şekil 13.	Platelet şekil değişikliği A) İstirahat halinde B) Aktive plateletler	39
Şekil 14.	Protipik İntegrinin moleküler yapısı	40
Şekil 15.	Platelet yüzeyindeki GP1b-IX kompleksinin şematik gösterimi	40
Şekil 16.	Aterotrombotik sürecin başlangıcı; Adezyon, aktivasyon, amplifikasyon, agregasyon	42
Şekil 17.	ADP reseptörleri	44
Şekil 19.	Üç farklı ADP reseptörü	47
Şekil 20.	Protokol zamanına ve tedavisine göre IPA (son % düzeyi)	53
Şekil 21.	Kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında kanda ADMA ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması	65
Şekil 22.	Kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında kanda GSH-T ve GSH-R düzeylerinin karşılaştırılması	66
Şekil 23.	Rat kas dokusu örneklerinde kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında ADMA ve MDA düzeyleri	68
Şekil 24.	Rat kas dokusu örneklerinde kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında GSH-T ve GSH-R düzeylerinin karşılaştırılması	68

Şekil 25.	Rat kas dokusunun histopatolojik incelenmesinde çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılma ve ödem yönünden değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması	71
Şekil 26.	Normal soleus kası ışık mikroskopik görünümü. İğsi iskelet kası hücreleri ile periferik yerleşimli oval nukleuslar (HE, X400)	72
Şekil 27.	İskemi-Reperfüzyon grubunda; ödem, çizgilenme kaybı ve kas liflerinde ayrılma (HE, X400)	72
Şekil 28.	İskemi-Reperfüzyon; grubu çizgilenme kaybı ve ödem (HE, X200)	73
Şekil 29.	Ticagrelor grubu; ödem ve kas liflerinde ayrılmada azalma ve çizgilenmeler (HEX400)	73

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Araşidonik asit
AC	: Adenilat siklaz
ADMA	: Asimetrik dimetilarginin
ADP	: Adenozine difosfat
AKK	: Aortik kros-klemp
AKS	: Akut koroner sendrom
ARDS	: Akut solunumsal distres sendromu
ASA	: Asetil salisilik asit
ATP	: Adenozine trifosfat
C5a	: Kompleman faktör 5a
cAMP	: Siklik adenozine monofosfat
CK	: Kreatinin kinaz
CMV	: Sitomegalovirus
COX-1	: Siklooksijenaz 1
CPTP	: Siklopentil-triazolo-pirimidin
CTAP III	: Bağ dokusu aktive edici peptid III
ÇK	: Çizgilenme kaybı
DAG	: Diaçilgliserol
DDAH	: Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz
DM	: Diyabetes mellitus
DMA	: Dimetilamin
DPT	: Dimetilarginin pirüvat aminotransferaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksid sentaz
ENT1	: Dengeleyici nükleozid taşıyıcısı 1
ET	: Endotelin
GDP	: Guanozine 5-trifosfat
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GSH	: Glutatayon
GSH-T	: Total glutatyon
GSH-R	: Redükte glutatyon
GTP	: Guanozine 5'-trifosfat

H2O2	: Hidrojen peroksit
HOCL	: Hipoklorik asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
ICAM-1	: İntersellüler adezyon molekülü-1
IL	: İnterlökin
IP3	: İnositol-1, 4, 5-trifosfat
IPA	: Trombosit agregasyonu inhibisyonu
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
I-R	: İskemi ve reperfüzyon
İAA	: İnfarenal abdominal aorta
KLA	: Kas liflerinde ayrılma
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LDL-K	: Düşük yoğunluklu kolesterol
L-NMMA	: Monometilarginin
LO-	: Alkoksil radikal
LOO-	: Lipid peroksit radikali
LOO-	: Peroksil radikal
LOOH	: Lipid hidroperoksit
LPS	: Lipopolisakkarit
LTB4	: Lökotrien B4
MCP	: Monosit kemoatraktan protein
MDA	: Malondialdehit
MIP	: Makrofaj inflamatuvar protein
MODS	: Multipl organ disfonksiyon sendromu
MS	: Kütle spektrometresi
NADPH	: Nikotinamid Adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
NO	: Nitrik oksit
NO3-	: Nitrat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O2-	: Süperoksit radikal
ONOO-	: Peroksinitrit

ODS	: Oktesil dolgulu kolon
OH-	: Hidroksil radikal
PAF	: Platelet activating factor = Trombosit aktive edici faktör
PAI-1	: Plasminojen aktivator inhibitör
PDGF	: Platelet büyüme faktörü
PECAM-1	: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1=Trombosit endotel hücre adhezyon molekülü-1
PG	: Prostaglandin
PI3K	: Fosfotidilinositol 3-kinaz
PIP2	: Fosfotidilinositol-4, 5-bifosfat
PKC	: Protein kinaz C
PLCβ	: Fosfolipaz C β
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler
PRMT I	: Protein arginin metiltransferaz I
PSGL-1	: P-selectin glycoprotein ligand-1
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SAH	: S-adenozil homosistein
SDMA	: Simetrik dimetilarginin
SOD	: Süperoksit dismutaz
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOR	: Serbest oksijen radikali
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa
TxA2	: Tromboksan A2
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
vWF	: vonWillebrand faktör

1. GİRİŞ

İskemi, dokuya ya da organa gelen kan akımının azalması veya ani olarak kesilmesi ile meydana gelen metabolik son ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak ifade edilir. Doku ya da organa yetersiz miktarda oksijen sunumu ise hipoksi olarak tarif edilebilir. Her iki durumda da reperfüzyonla birlikte hasarının başlaması ve metabolizmanın anaerobik yöne doğru kayması sonucu bu süreçte oluşan doku hasarı İskemi-Reperfüzyon Sendromu olarak tarif edilir (1).

Reperfüzyon ise, enerji ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için doku ya da organa tekrar kan akımının sağlanması olaydır. İskemiye uğrayan hücre ve dokular aerobik metabolizma sağlayamadıkları için anaerobik metabolizma yoluyla enerji ihtiyaçlarını karşılamaya çalışırlar. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan metabolitler doku perfüzyonu olmadığı için dokuda birikir ve kan akımının normale döndürülmesiyle buradaki metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma katılarak kan ile tüm vücuda yayılırlar (2, 3).

Her dokunun kendine özgü bir kritik iskemi süresi bulunmaktadır. İskemi sonucunda oluşan hasarın şiddeti ise hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücre tipine, yaralanmaya karşı hassasiyetine, diferansiasyonuna, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılıklar göstermektedir. İskemik hasara karşı sinir dokusundaki değişiklikler 8 saat, yağ dokusundaki değişiklikler 13 saat, deridekiler 24 saat ve kemik dokusundaki değişiklikler 4 güne kadar geri dönüşümlü olabilirken, bu süre kas dokusu için 4 saattir (4). Bu veriler; iskelet kasının ekstremitelerde iskemiye en duyarlı doku olduğunu göstermektedir. Ekstremitelerde reperfüzyon sendromunun en önemli kısmını kaslarının iskemiye verdiği cevap oluşturmaktadır. Bu cevaplar, mikrosirkülasyon değişiklikleri, lokal ve sistemik inflamatuvar reaksiyonlardan oluşur.

Alt ekstremitelerde iskemi-reperfüzyon hasarı, özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici süre kros-klemp uygulamalarında, tek veya çift taraflı akut arter tıkanıklıklarında, travmatik veya iyatrojenik arteriyal yaralanmalarda görülmektedir. Ayrıca serebrovasküler olaylar, miyokard infarktüsü, mezenter ve periferik arter embolilerinde uygulanan trombolitik tedaviler, organ transplantasyonu, sepsis, şok, yanık, pankreatit gibi cerrahi ve travmatik durumlarda

ortaya çıkan iskemi ve hipovoleminin düzeltilmesi ile ayrıca ekstremitelere cerrahi girişim sırasında kullanılan turnikeler de diğer reperfüzyon hasarı sebepleridir (5).

Abdominal aortaya geçici süre kros-klemp uygulaması sırasında iskemik kalan alt ekstremitte dokusuna oksijen ve diğer metabolitler sağlanamaz. İskemiye bağlı olarak lokal ve uzak organ hasarından sorumlu olan nötrofil aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, komplemanın aktivasyonu, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve proteazların oluşumu, endotelin, angiotensin ve katekolaminler gibi vazokonstrüktör ajanların salınımı gerçekleşir.

Reperfüzyonda uzak organ hasarı etyolojisinde yer aldığı iddia edilen faktörlerden birisi 'washout' fenomenidir. Reperfüzyon sırasında, 'washout' yani yıkanma etkisiyle sistemik dolaşıma birçok kimyasal mediyatör dağılır ve olası mikroembolilerle diğer organ kapiller damarları tıkanarak uzak organlarda hasara katkıda bulunmaktadır (6, 7).

Günümüzde iskemi-reperfüzyon hasarını önlemeye ve azaltmaya yönelik pek çok tedavi stratejisi geliştirilmiştir. Kardiyovasküler cerrahi teknik ve erken postoperatif dönem takip uygulamalarındaki gelişmelere rağmen aortik girişimler sonrasında gelişen iskemi-reperfüzyon hasarı, postoperatif morbidite ve mortaliteyi etkileyen ciddi bir problemdir. Tedavide en uygun stratejinin ne olduğu halen tartışma konusudur.

Antiplatelet ajan olan ticagrelorun alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına ve asimetric dimetil arjinin (ADMA), malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) düzeyleri ile iskelet kası viabilitesi üzerine etkisi henüz bilinmemektedir.

Bu tezin amacı; Deneysel alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası yeni bir antiplatelet ajan olan ticagrelorün, oksidan olan ADMA, MDA, antioksidan olan GSH seviyeleri üzerine ve iskelet kası viabilitesine etkisini araştırmaktır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. İskemi

İskemi, dokunun veya organın oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin perfüzyon bozukluğuna bağlı dolaşım tarafından karşılanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır.

Doku veya organa yetersiz oksijen sunumu neticesinde oluşan hipoksinin en sık görülen sebebi iskemidir. İskemi, kardiyak infarktüsde ve inmede olduğu gibi akut veya tromboanjitis obliterans hastalığındaki gibi kronik olarak seyredebilir. İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. Her iki durumda da iskemi-reperfüzyon hasarının ilk basamağı oluşmakta ve sonuç olarak metabolizma anaerobik yöne doğru kaymaktadır (2). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken ortaya çıkmaktadır (8).

1.1.2. İskemi Çalışmalarının Tarihçesi

Periferik arter hastalıklarının tarihçesi Volkmann'ın 1881 yılında iskemi komplikasyonu olan iskemik kontraktürü tariflemesiyle başlamıştır (9).

1926 yılında Jepson köpeklerde deneysel olarak ekstremiteye turnike uygulanmasının ödeme yol açtığını bildirmiştir (10).

1920'li yıllarda şok ile ilgili toksik faktörleri araştıran ve 1923 yılında 'Traumatic Shock' isimli yayını ile bu gözlemlerini aktaran Cannon, iskemik dokunun tekrar kanlandırılmasına bağlı sistemik etkilerin ortaya çıktığı fikrini ortaya atmıştır (11).

1937 yılında Husveldt ve Bjering otomobil kazaları ile meydana gelen travmatik şoklar sonrası renal lezyonlar oluştuğunu bildirmişlerdir (12).

Bywaters, İkinci Dünya Savaşı'nda Londra'nın bombalanması sırasında meydana gelen ciddi ekstremite yaralanmalarında, renal yetmezlik konusunda geniş hasta sayılı klinik izlemlerini yayınlayarak, tüm dünyanın dikkatini reperfüzyon problemine çekmeyi başarmıştır. Bywaters, böbrek yetmezliğinden ölen hastaların idrarındaki koyu renkli pigmentin myoglobinin olduğunu kaydetmiştir (13).

İskemik ekstremitenin arteryel revaskülarizasyonunun risklerini ilk kez kaydeden araştırmacı 1960 yılında Haimovici'dir. Bu konudaki ilk yayın iki arteryel embolizm hastasında görülen masif iskemik miyopati, miyoglobininüri, hiperkalemi ve metabolik asidoz tablosunu anlatır. Ekstremitte revaskülarizasyonu sonrası ortaya çıkan böbrek yetmezliğini 'myonefropatik metabolik sendrom' olarak tariflemiştir (14, 15.)

1979 yılında yapılan ve 200 akut arteriyel tıkanıklık hastasının değerlendirildiği bir çalışmada, hastaların %7,5'inde myonefropatik metabolik sendrom görüldüğü bildirilmiştir (15). Daha sonra yapılan çalışmalarda açık kalp cerrahisi ve aort cerrahisi sonrasında myonefropatik metabolik sendrom görülebileceği gösterilmiştir (16).

1.1.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi ve reperfüzyona (I-R) bağlı mikrovasküler fonksiyon bozukluğu; trombolitik tedavi, koroner anjioplasti, kardiyopulmoner bypass gibi çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler esnasında görülebilen potansiyel olarak ciddi bir sorundur (17). Dokuların kan akımından yoksun bırakılmasının fonksiyonel sonuçları yıllardır bilinmektedir. Son zamanlarda, iskemi sonrası kan akımının yeniden sağlanması anlamına gelen reperfüzyonun iskemik doku ve organları daha fazla hücresel nekroz riskiyle karşı karşıya bırakması ve böylelikle fonksiyonlarının geri dönmesini azaltabileceği gösterilmiştir. Parankimal hücrelere karşı ölümcül reperfüzyon hasarı görüşü evrensel olarak kabul edilmemesine karşın mikrovasküler yapıların, özellikle mikroskopik kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerinin I-R'nin zararlı sonuçlarına çok yatkın olduğu yaygın olarak kabul görmüştür. I-R hasarının patogeneğinde mikrovasküler disfonksiyon, erken dönemde hız belirleyici bir faktör olup hasarın neden olduğu vasküler değişiklikleri tanımlama ve patolojik sürecin altında yatan mekanizmalarını belirlemeye yönelik büyük bir çaba vardır. Bu araştırmalar damar duvarındaki moleküler ve biyokimyasal değişiklikleri açığa çıkarmıştır (18-20). İskemi sonrası dokulardaki inflamatuvar yanıtın şiddeti, uzak organlarda da aynı şiddette oluşabilir. I-R'nin uzak etkileri sıklıkla böbrek, akciğer ve kardiyovasküler sistemde gözlenir ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve multipl organ disfonksiyon sendromunun (MODS) gelişmesine yol açabilir. Yoğun bakım ünitelerinde SIRS ve MODS, %30-40 oranında mortal seyretmektedir (21).

1.1.4. İskelet Kasında İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Kas dokusu sahip oldukları miyoglobülin oranına göre kırmızı (tip-1) ve beyaz (tip-2) tip kaslar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Pek çok kas, her iki tip kas lifini de benzer oranlarda sahipken, bacak ön kompartmanındaki kaslarda

kırmızı-yavaş seyiren tip-1 lifler, gastrokinemius kasında ise beyaz-hızlı seyiren tip-2 lifler baskın olarak bulunmaktadır. Kırmızı-yavaş seyiren liflerde hücrelerin kullandığı ana enerji kaynağı trigliseritlerin oksidatif metabolizması sonucu ile karşılanırken, beyaz-hızlı seyiren liflerde ana enerji kaynağı olarak glikojenin anaerobik metabolizması ile karşılanır. Bu durum ise kırmızı-yavaş seyiren liflerin iskemiye olan duyarlılığını arttırmaktadır (22).

Belkin ve ark. (23) 1988 yılında yaptıkları sıçan arka bacağına turnike yöntemi ile oluşturulan iskemi sonrasında kaslarda ciddi hasarın, iskeminin 3. saatinde başladığını ve bu hasarın da 6. saatte kontrol grubuna oranla kasta sadece %3 oranında fonksiyon varlığı kaldığını göstermişlerdir. Labbe ve ark. (24), 1987 yılında yaptıkları köpek grasilis kas modeli çalışmasında, iskeminin 3. saatinde %2 olan nekroz oranının, 4. saatte %30'a, 5. saatte ise %90'a kadar yükseldiğini ve nekrozun kasın merkezinde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Hayes ve ark. (25), 1988 yılında yaptıkları çalışmada, iskemi sonrasında oluşan kas nekrozunun dokudaki Adenozin-tri-fosfat (ATP) miktarlarıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. ATP'nin tükenmeye başladığı durumlarda öncelikle glikojen ve kreatinin fosfat enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Anaerobik metabolizmanın kullanılması sonucu ortaya çıkan laktat ise hücre içi pH'sını düşürmektedir. Ayrıca ATP yetersizliğine bağlı olarak, hücre zarından geçiş işlevleri bozulmakta ve birbirine bağlı olayları tetiklemekte, Ca^{+2} ile proinflamatuvar aracılı maddeler hücre içerisinde birikmeye başlamaktadır (26-28). Anaerobik metabolizmanın devreye girmesi ile oksijen radikallerinin oluşumu hızlanmaktadır (29).

1.1.5. İskemi-Reperfüzyona Karşı Lokal Mikrovasküler Yanıtlar

Abdominal aorta ve alt ekstremitte arterlerinin cerrahi girişimler sırasında klempenmesi daha distalde iskemiye neden olmaktadır. Klempin açılarak distal kan akımının tekrar sağlanması lokal, uzak doku ve organlarda reperfüzyon hasarıyla sonuçlanmaktadır (30).

Reperfüzyon hasarı üzerine 1973 yılında yapılmış bir çalışma da iskemik sıçan kalplerinde oksijene bağımlı enzim salınımının önemli rolü olduğunu göstermiştir. Dokulara yeniden oksijen sunulmasıyla miyokard veya diğer hücrelerde

iskemi sırasında oluşan toksik hasar daha da şiddetlenmektedir. Bu nedenle dokuya oksijen sunulması sonucu toksik hasarın şiddetlenmesi olayına oksijen paradoksu adı verilmiştir (30).

Reperfüzyonun ana amacı; iskemik kalan doku veya organın korunması ve yeniden fonksiyonlarını kazanmasının sağlanmasıdır. Reperfüzyon hasarı iskemi sonrası kanlanmanın yeniden sağlanmasıyla başlamakta iskemi süresine bağlı olarak hedef ve uzak organlarda asemptomatik subklinik hasardan hedef dokuda nekroz, ödem, çap artışı, uzak organlarda fonksiyon kaybı, multiorgan yetmezliği ve sonrasında mortaliteye kadar ilerleyen semptomların olduğu geniş bir yelpazede karşımıza çıkmaktadır (30).

1.1.6. İskemi-Reperfüzyon Sonrası Uzak Organ Hasarı

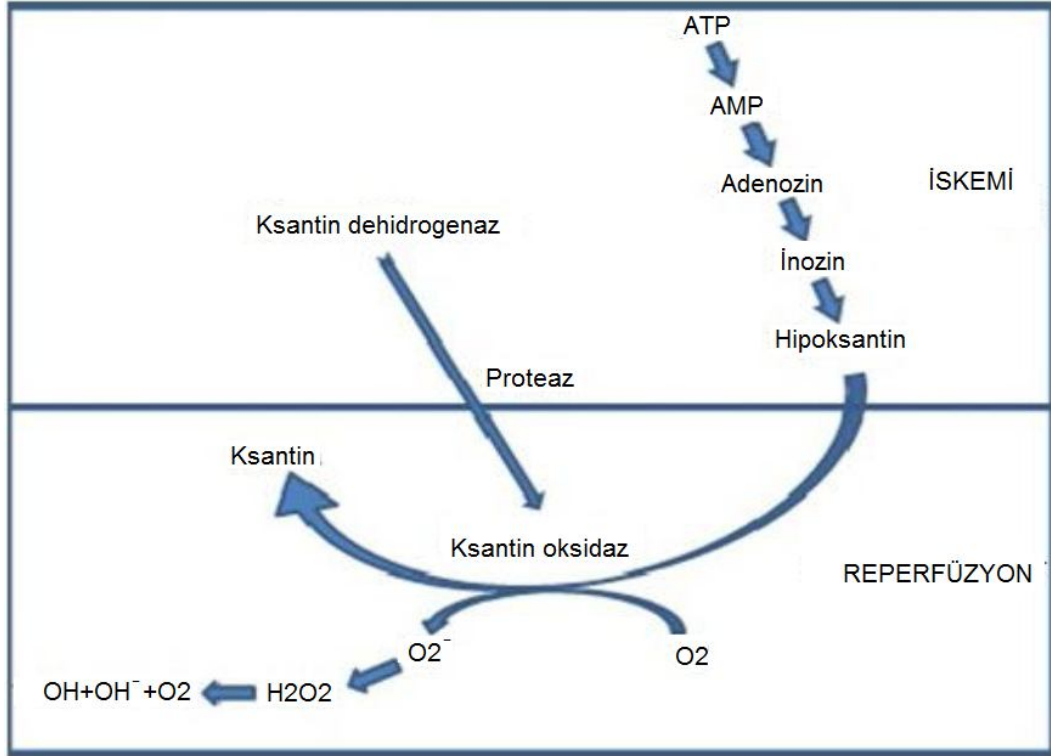
Doku veya organ reperfüzyonunun yıkıcı bir sonucu, başlangıçta iskemik hasara katılmayan organlarda da hasarın oluşmasıdır. MODS, barsak (31-33), karaciğer (34-37) ve iskelet kası (38) reperfüzyonu, yanı sıra aortik oklüzyon-reperfüzyon (39-41) ve hipovolemik şoka bağlı olarak gelişmektedir. Ayrıca MODS, yoğun bakım hastalarında başlıca ölüm sebebidir (42). Çeşitli organlarda I-R sonrası splanknik vazokonstriksiyon ve göreceli mezenterik iskemi görülmektedir. Bu yoğun splanknik vazokonstriksiyon, MODS'un patogeneze katkıda bulunmaktadır. Kısa sürelerde enterik iskemi bile intestinal mukozal bariyer bütünlüğünün kaybı ve intestinal lümeninden mezenterik lenf nodlarına ve portal kana enterik flora veya lipopolisakkaridin (LPS) hareketine ya da translokasyonuna neden olmaktadır (43-45). Enterik makrofajların bakteriyel ürünlerce uyarılması (46) veya reperfüzyon sırasında dolaşıma salınan diğer mediyatörler, hemen hemen her organda makrofaj aktivasyonuna ve vasküler endoteli aktive edebilen inflamatuvar sitokinlerin (TNF α gibi) üretimine neden olabilmektedir (47, 48). Üstelik, reperfüzyonun bir sonucu olarak salınan inflamatuvar mediyatörler dolaşan lökositleri ve vasküler endotel hücrelerini aktive edebilmekte ve adezyon moleküllerinin üretimini arttırmaktadır (49, 50). Bunun sonucunda, vasküler yatakta nötrofil-endotel hücre etkileşimleri gelişmektedir. MODS ile ilişkili akciğer hasarı, akut akciğer hasarı (ALI) olarak adlandırılan hafif disfonksiyondan, ağır solunum yetmezliği veya akut solunumsal distres sendromuna (ARDS) kadar değişen bir dizi akciğer hasarını temsil etmektedir

(51). ARDS ve MODS ile ilişkili akciğer hasarının ayırt edici özelliği pulmoner mikrovasküler permeabilitede ve nötrofilden zengin alveol sıvı birikiminde artıştır (52, 53). Solunum yetmezliğinin ardından hepatik, renal ve gastrointestinal disfonksiyon, ayrıca santral sinir sistemi tutulumu ve myokard yetmezliği gelir (47). Yaygın organ ve sistem tutulumuna ilaveten MODS, koagülasyon kaskadı ve immun sistemde disfonksiyon ile karakterize olup tromboz, dissemine intravasküler koagülasyon ve immun yetmezlik ile sonuçlanır (54). I-R'ye bağlı lokal organ disfonksiyonunu açıklayacak birkaç mekanizma önerilmiştir. Fakat reaktif oksijen türevleri ve inflamatuvar lökositlerin rolü çok fazla ilgi odağı olmuştur (55, 56). Şaşırtıcı olmayan bir biçimde, oksidanlar ve aktive olmuş lökositler iskemi-reperfüzyona bağlı uzak organ hasarının mediyatörleri olarak gösterilmektedir (57).

1.1.7. İskemik ve Hipoksik Zedelenme

Hücre zedelenmesinin klinik tıpta en sık görülen nedeni iskemidir. İskeminin başlaması ile birlikte normalde var olan aerobik metabolizma hızla anaerobik metabolizmaya dönüşerek dokunun biyoenerji ve iyon homeostasisi, moleküler regülasyon ve organ performansında bozulmaya neden olmaktadır. İskemi ve hipoksida aerobik metabolizma devam edemediğinden dolayı dokuda var olan adenzin trifosfat (ATP)'lar tükenmeye başlar ve yeni ATP üretimi yetersiz kaldığından dolayı enerji ihtiyacı için gerekli olan olayların sürekliliği sağlanamaz (58, 59).

Adenzin trifosfat seviyelerinde azalmaya karşın adenzin difosfat (ADP) düzeylerinde artma olur. Artan ADP'ler önce adenzin monofosfata (AMP) daha sonra adenzin, inozin ve sonunda hipoksantine dönüşmektedir. Hipoksantin reperfüzyonun sağlanması halinde oksijen ve ksantin oksidaz enziminin etkisi ile ksantine dönüşür. Ksantin ortamdaki oksijenle reaksiyona girerek ürik asite parçalanır. Tüm bu döngü sonucunda hasardan sorumlu olan serbest oksijen radikalleri meydana gelmektedir. Hipoksinin ilerleyerek devam etmesi durumunda ortamda oksijen bulunmadığından ksantin, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) ve hidrojen ile reaksiyona girerek ürik asit, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) ve H^+ , hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikalleri (O_2^-) oluşur (Şekil 1) (58).



ATP: Adenozin trifosfat; AMP: Adenozin monofosfat.

Şekil 1. İskemi-reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu (58)

İskemi; glikoliz için gerekli maddelerin taşınamamasına ve oluşan metabolitlerin uzaklaştırılmamasına, glikolizin inhibe olmasına sebep olur. İskemi süresinin uzaması durumunda anaerobik enerji üretimi durur. Hipoksidede ise glikolitik enerji üretimi devam edebilmektedir. Bu nedenle iskemi hipoksiden daha hızlı bir şekilde dokulara zarar verir (58).

İskemi veya hipoksinin hücresel etkileri şu şekilde sıralanabilir;

- Hücresel şişme
- Hücresel asidoz
- Hücre membran potansiyelinde bozulma
- Hücresel iyon dağılımında bozulma (intraseküler Ca^{+2}/Na^{+} oranında artış)
- Hücre iskelet bozuklukları
- Hipoksantin artışı ATP azalması
- Fosfokeratin azalması Glutasyon azalması
- Lökosit adezyon moleküllerinde artış (58).

İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak iki türlü hücre sel zedelenme ortaya çıkar:

1.1.7.1. Geri Dönü şlü Zedelenme

Hipoksinin bilinen ilk etkisi hücre nin aerobik solunumu yani mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon üzerine olmaktadır. Oksijen basıncının azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. ATP'nin azalmasının hücre içinde birçok sistem üzerine yaygın etkiler oluşturur (58). Plazma membranında ATP enerjili Na^+ - K^+ ATPaz enzim aktivitesinde azalmaya bağlı olarak sodyum (Na^+) hücre içinde birikir. Bunu potasyumun (K^+) hücre dışına geçişi izler. Artmış sodyumu (Na^+) hücre dışına çıkarabilmek için Na^+ - Ca^{+2} antiport sistemi devreye girer. Bu sistem hücre içinde artmış olan Na^+ iyonundan bir adet hücre dışına çıkarırken bunun yerine bir adet Ca^{+2} hücre içine taşır. Bunun sonucu olarak hücre içi Ca^{+2} miktarı artış meydana gelir. İntrasellüler ortamda Na^+ ve Ca^{+2} birikirken K^+ azalır. Na^+ hücre içinde net artışı, suyun izoosmotik artışı ile birlikte olup akut hücre sel şişmeye neden olur (58).

Adenozin trifosfat düzeylerinde azalma sonucu, fosfofrüktokinaz enzimini uyaran AMP'de artma nedeniyle anaerobik glikolizde artış olur. Glikojenden ATP üretimi, hızla glikojen depolarının tükenmesine yol açar. Artan glikoliz snucunda fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olur. Sonuç olarak hücre içi pH azalır. Azalan pH ve ATP seviyeleri ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmasına ve polizomların monozomlara ayrılmasına yol açar ve protein sentezi azalır (58). Hipoksi düzelmez ise membran permeabilitesinin artması sonucu daha fazla morfolojik bozulmalar meydana gelir. Hücre iskeleti dağılırken, mikrovilluslar gibi ultrastrüktürel özellikler kaybolur. Hücre yüzeyinde kabarcıklar oluşur, mitokondriler, endoplazmik retikulum ve gerçekte tüm hücrelerde osmotik regülasyonun kaybından dolayı çoğunlukla şişmiş görünür.

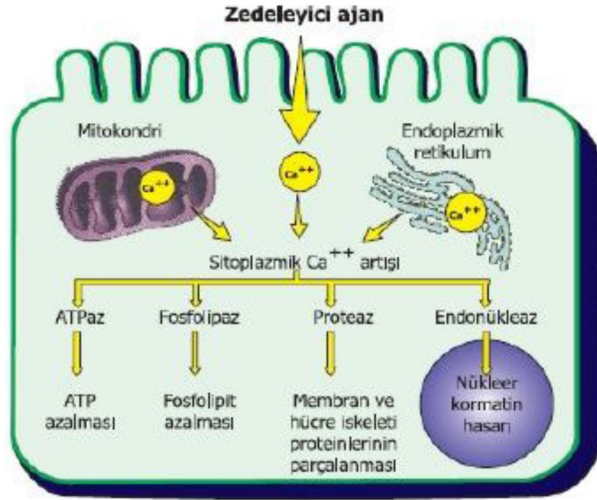
Eğer oksijen düzeyi dokuda eski haline dönerse tüm bu değişiklikler geri dönüşlü olup iskeminin devam etmesi durumunda ise hasar geri dönüşsüz olarak ilerler (58).

1.1.7.2. Geri Dönüşsüz Zedelenme

Kritik iskemi zamanı, dokunun canlılığını sürdürebildiği maksimum iskemi süresidir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermektedir. Uzun süreli iskemide geri dönüşsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (60).

Geri dönüşsüz hasar hücre zarının zedelenmesi ile başlar. Morfolojik olarak plazma zarında aşırı yıkım, lizozomlarda şişme, mitokondri ve mitokondri kristallerinde aşırı vakuolizasyon geri dönüşsüz zedelenmeye yol açan hasarlardır (61).

Membran hasarı ile birlikte Ca^{+2} , yüksek yoğunlukta bulunduğu hücre içerisinden hücre dışına doğru geçer. İskemik dokunun reperfüzyonu ile hücre içine kitlesel kalsiyum akışı olur. Mitokondri tarafından kolayca alınan, amorf Ca^{+2} , dan zengin yapılar mitokondri matriksinde kalıcı şekilde mitokondri hasarına yol açar (Şekil 2) (62).

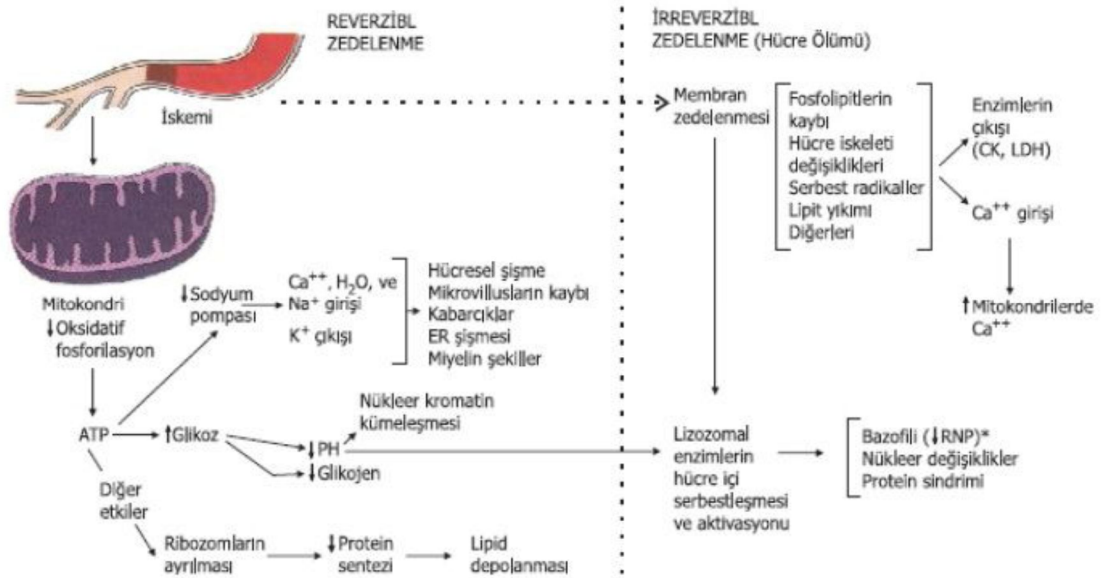


ATP: Adenozin trifosfat.

Şekil 2. Hücre zedelenmesinde hücre içi kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları (58)

Hücre zarlarının tümünde gerçekleşen hasar, hücre organelleri ve hücrede şişme, protein, esansiyel koenzim ile ribonükleik asit kaybı, ATP sentezinde kullanılan metabolitlerin depolanamamasına bağlı yüksek enerjili fosfat depolarında azalma ve interstisyel alandaki makromoleküllerin hücre içine geçişine neden olur. Lizozomal membran hasarı, enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. Asit

hidrolazlar, düşük sitoplazmik pH'da, tüm hücresel elemanların enzimatik yıkımına neden olurlar. Lizozomal sindirim, hücre ölümü sonrası interstisyel alanda da devam eder (63). Hücresel fonksiyonların kaybı hücre ölümünden önce gerçekleşir. Hasarın morfolojik görünümü kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşümsüz hasar oturduktan çok sonra belirgin hale gelir. Hücre şişmesi dakikalar içinde görülebilen geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşümsüz hasar ise 20-60 dakika içinde ışık mikroskopunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir (Şekil 3) (63).



ATP: Adenozin trifosfat; LDH: Laktat dehidrogenaz; CK: Kreatinin kinaz.

Şekil 3. İskemik zedelenmede olaylar dizisi (61)

1.1.7.3. İskemi Reperfüzyon Zedelenmesi

İskemik fakat yaşayabilen dokularda kan akımının düzeltilmesi, zedelenmeyi hızlandırarak şiddetlendirebilir. Reperfüzyonla birlikte oluşan hasarın büyüklüğü iskemi süresi ve şiddeti ile yakından ilişkilidir. Kısa süreli iskemilerde reperfüzyon hasarının şiddeti hafif olurken, iskemi süresinin uzun ve geri dönüşsüz hasarın olduğu durumlarda reperfüzyonla birlikte hücrelerin kurtarılması mümkün olmayabilir (58, 64). İskemi sırasında dokuda oluşan metabolitler, sirkülasyon olmadığından dolayı dokuda birikir. Kan akımının normale dönmesiyle metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma karışır ve kan yolu ile

tüm vücuda yayılarak uzak organ hasarına neden olurlar. İskemi sırasında hasara duyarlı hale gelmiş bazı hücreleri öldürebilen en olası zararlı etkinin serbest oksijen radikalleri olduğu ileri sürülmüştür. Bunlar endotel, parankimal hücreler ve inflamasyon nedeniyle dokuya nüfuz etmiş nötrofillerden kaynaklanabilir. Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikalleri membranlara zarar verebildikleri gibi deoksiribonükleik asit (DNA), protein ve mitokondrilere zarar verebilir. Reperfüzyon esnasında hücre içine Ca^{+2} akümülyasyonunun artması ve Ca^{+2} 'un özellikle mitokondrilere alınması reperfüzyon hasarının bel kemiğini oluşturmaktadır.

İskemi reperfüzyon zedelenmesinden sorumlu tutulan mekanizmalar olarak serbest oksijen radikalleri, proinflamatuvar mediatörlerin artması, lökosit infiltrasyonu, Ca^{+2} yüklenmesi, fosfolipit peroksidasyonu ve azalması ileri sürülmektedir (65).

1.1.8. İskemi-Reperfüzyon Hasarı Mekanizması

İskemi reperfüzyon hasarında fizyopatolojik değişikliklere yol açan faktörler (66):

- a) Serbest oksijen radikalleri,
- b) Polimorf nüveli lökositler,
- c) Kompleman sistemi,
- d) Endotel hücreleridir.

1.1.8.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Atomlarda elektronlar orbita adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan bir atom veya moleküldür. Dış orbitalde, iki ile bölünmeyen elektron varlığı, atom veya molekülü reaktif kılar. Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden olan sızıntılardır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal (O_2^-) üretimi artar (67).

Serbest radikaller stabil olmadığından dolayı ömürleri çok kısadır. Elektriksel yükleri pozitif, negatif veya nötr olabilir (1).

Oksijen molekülü eşlenmemiş iki elektron içeren bir radikaldir. Aerobik canlılar yaşamları için gerekli olan kimyasal ve ısı enerjilerini, besinlerin oksijen (O_2) ile yakılması sonucu elde ederler (1). Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıya kalmaktadır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında belirli oranlarda oluşmaktadır ve içsel mekanizmalar yardımı ile bu radikallerin organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenmektedir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynaklı oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir (66).

Aerobik canlılarda serbest radikaller için en önemli kaynak, moleküler oksijendir. Normal metabolizma sırasında O_2 'nin %98'i suya (H_2O) indirgenmektedir. Geriye kalan yaklaşık %2'lik kısım ise süperoksit (O_2^-) radikali ve hidroksil (OH^-) radikaline dönüşür. En önemli serbest oksijen radikalleri süperoksit (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) anyonlarıdır (Tablo 1) (1).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) biyolojik sistemlerde süperoksit oluşumu yoluyla sık olarak meydana gelmektedir. Burada iki süperoksit molekülü iki hidrojenle reaksiyona girerek H_2O_2 ve O_2 oluşturur. Eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (1, 68).

Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan bileşikler

RADİKALLER:	RADİKAL OLMAYANLAR:
Süperoksit radikal (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2) Singlet oksijen
Hidroksil radikal (OH^-)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Alkoksil radikal (LO^-)	Hipoklorik asit ($HOCL$)
Peroksil radikal (LOO^-)	

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri (Şekil 4):

- Hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar.
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler.
- DNA'yı tahrip ederler.
- Mitokondrilerde aerobik solunumu bozarlar.

-Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler.

-Hücrenin potasyum kaybını arttırmaları.

-Trombosit agregasyonunu arttırmaları.

-Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar.

-Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (68).

Vücutta serbest radikal kaynakları;

- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler)
- Uzun süreli metabolik hastalıklar yaşlanma süreci ve diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara
- Normal biyolojik işlemler (Oksijenli solunum, katabolik ve anabolik işlemler)
- Oksidatif stres yapıcı durumlar (İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon-ksenobiotik maddeler)
- Oksidan enzimler (Ksantin oksidaz- İndolamin dioksigenaz-Triptofan dioksigenaz- Galaktoz oksidaz-Siklooksigenaz-Lipooksigenaz- Monoamino oksidaz) (1, 68)

Hidroksil radikali (OH-): Fenton Reaksiyonu ve Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hücrede olduğu yerden daha uzağa gidemez. Oluştığı yerin hemen çevresinde oldukça büyük hasara yol açabilir, elektronegativitesi ve büyük molekül yapısı nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur (1, 69).

Süperoksid (O₂-): Tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O₂) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Çok toksik olmayan bir serbest radikaldir. Süperoksid radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Zayıf oksidan etkisine karşın düşük pH

değerlerinde protonlanarak hidroperoksil (HO_2^-) oluşur (1). Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince, biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda, moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^-) ile birleşmesi sonucu reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^-), hidroksil radikali (OH^-), nitronyum iyonu (NO_2^-) gibi toksik ürünlere dönüşebilir. Nitrik oksitin (NO^-) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur (70).

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Metal iyonların yokluğunda stabil, zayıf oksidan, zayıf redüktan, biyolojik membranları kolayca geçebilen ve uzun ömürlü bir reaktif oksijen bileşiğidir (1).

Singlet oksijen (O_2): Radikal değildir. Serbest oksijen radikalleri ile birlikte olan reaktif oksijen türüdür (1).

Hidroperoksil (HO_2^-): Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin, iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksidin (O_2^-) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana getirdiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir; ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon, pH 4,8'de en hızlıdır; enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton Reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının (O_2^-) varlığında Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^-) oluşturur. Süperoksit radikalının lipitte çözünübilirliği sınırlı olduğu halde hidrojenperoksit lipitte çözünebilir. Bu nedenle

hidrojenperoksit kendisinin oluştuğu yerden uzakta olan, fakat Fe^{+2} içeren membranlarda hasar yol açabilir (28).

Postiskemik dokularda SOR'un kaynağı ksantin oksidaz ve n6trofilik NADPH oksidaz sistemleridir (71).

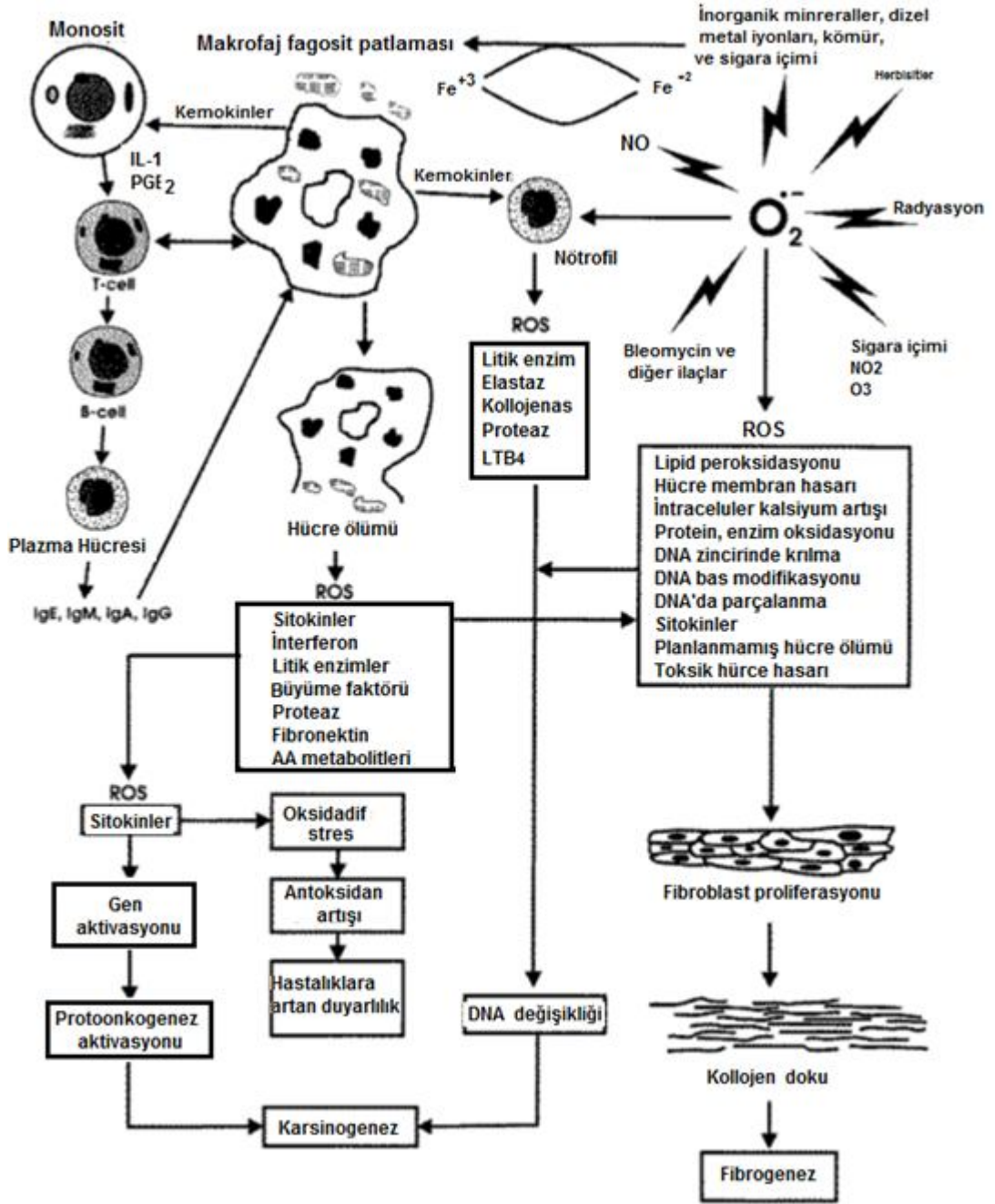
Nitrikoksit (NO-): L-Arginin'in guanidium grubundan, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile endotelde sentezlenen serbest radikaldir. e farklı NOS enzimi vardır.

Endotelial, n6ronal ve normal koşullarda üretilmeyen ancak enflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından ind6klenebilen NOS (iNOS)'dur. NO, s6peroksit anyon radikali ile hızla reaksiyona girdiğinden h6cre koruyucusu olarak d6ř6n6lebilir (1, 72).

Nitrik oksit vask6ler tonusun fizyolojik reg6lasyonu ve normal vask6ler geçirgenliğin idamesi, endotele l6kosit adezyonunun engellenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, oksijen kaynaklı serbest radikallerin temizlenmesi, d6z kas proliferasyonunun engellenmesi, immun defansın g6lendirilmesi, endotel h6crelerinin rejenerasyonu gibi birçok olayda etken bir maddedir (73). Ayrıca iskemik dokularda s6peroksit dismutaz aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (74).

Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrate (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, normal vask6ler fizyolojide NO;

- Vask6ler d6z kas h6crelerinin gevsemesine neden olur.
- Trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyona neden olur.
- Lipit peroksit radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan ve antiaterosklerotik etki oluşturur.
- S6peroksit radikalleri ile etkileşir.
- Damar d6z kas h6crelerinin proliferasyonunu inhibe eder.
- Santral sinir sisteminde n6rotransmitterdir.
- Vasodilat6r ton6s6n devamlılığının sağlar.
- Nontrombotik endotelial y6zeyin s6rd6r6lmesini sağlar.
- L6kosit-endotel h6creleri etkileşiminden korunmada etkilidir.



Şekil 4. Serbest radikallerin, hücre yapısını bozarak hastalık oluşumundaki rolü.

Patolojik olaylarda ise; ödem oluşumunda, makrofajların antimikrobial ve tümorosidal aktivitelerinin düzenlenmesinde pro- ve anti-inflamatuvar ürünler gibi davranır. Ortamdaki nitrik oksidi temizleyen herhangi bir özel enzimi yoktur (75).

Organizmada pek çok türde serbest radikal oluşabilir; ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin açıl grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid

peroksit (LOO-) radikalini oluşturur. Lipid radikallerinin en önemli kaynağı egzersiz yapan iskelet kasıdır (76).

Lipid peroksit radikali, diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipit hidroperoksitler (LOOH) oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehittir (MDA) (67, 74, 75, 77).

1.1.8.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Polimorf Nüveli Lökositler

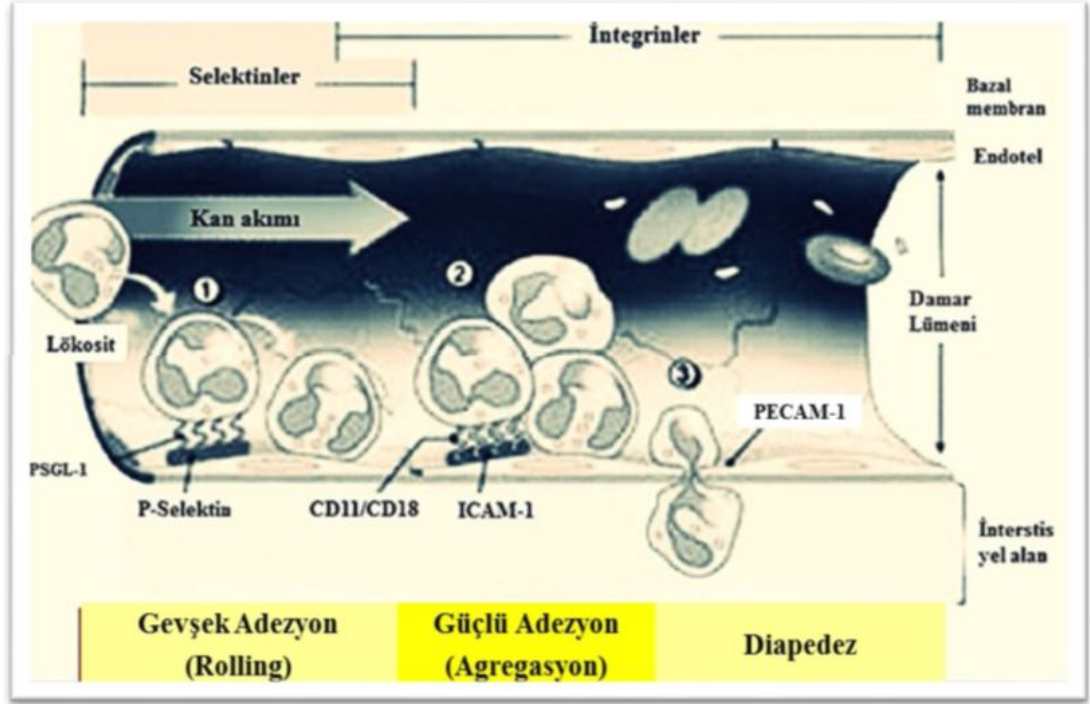
İskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında aktif hale gelen ilk hücreler polimorf nüveli lökositler olup, mikrovasküler permeabilitede artıştan başlıca sorumlu tutulan ana hücrelerdir (78, 79).

İskemi-reperfüzyon hasarında lökosit ve endotel hücre yüzeyleri adezyon molekül oluşumunu artırarak lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit diapedeziyle sonuçlanan kaskadın aktivasyonuna neden olur (75). Bu aktivasyon sonrası oluşturdukları hasar SOR salınımı, interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve TNF- α gibi sitokinlerin ve sitotoksik enzimlerin salınmasını, vasküler permeabilitede artış ile birlikte mikrovasküler oklüzyon oluşturmalarına bağlıdır. Dolaşımda bulunan nötrofiller aktive olduklarında iskemik doku endoteline yapışıp interstisyel alana doğru göç ederler (80).

Polimorf nüveli lökositlerin dokuya göç edebilmelerinin ön koşulu endotel hücrelerine adezyonlarıdır. Nötrofillerin aktivasyon ve migrasyonları lökositler ve aktive olmuş endotel hücreleri arasında oluşan E-selektin, P-selektin ve L-selektin adı verilen adezyon molekülleri aracılığıyla olur. Adezyona uğramış bu lökositler kompleman faktör 5a (C5a), interlökin 8 (IL-8) , lökotrien B4 (LTB4), ve trombosit aktive edici faktör (PAF) aracılığı ile aktive edilirler ve yüzeylerinde CD11b/18 molekülleri belirir. CD11b/18 ve ayrıca intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM- 1) etkinliği sonucu daha önce oluşan adezyon güçlenir ve transendotelial migrasyon meydana gelir (Şekil 5) (66, 69).

Endotel hücreleri arasından geçen lökositler hedef dokuya göç ederler. Lökosit göçü esas olarak venöz kılcal damarlardan olur. Hasarlı dokuya olan lökosit kemotaksisi C5a, LTB-4, IL-8 yoluyla sağlanır. İskemi reperfüzyon sırasında oluşan

TNF- α , IL 1 β , PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar aracılardan hepsi nötrofil göçüne katkıda bulunmaktadır (81).



PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1; ICAM-1: İntersellüler adezyon molekülü-1
PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule.

Şekil 5. İskemi-reperfüzyon hasarında lökosit-endothel etkileşimi (66)

Hasarlanmış bölgede biriken hücre tipi inflamasyonun süresi ve uyarının tipine göre değişir. İskemi reperfüzyon hasarına inflamatuvar cevapta ilk 6-24 saat nötrofil hakimiyeti mevcut iken, 24-48 saatte monositler baskın hale geçerler. Bunun nedeni nötrofillerin kanda daha fazla bulunması, daha hızlı aktive olmaları, adezyon moleküllerine yüksek afinite ile bağlanmaları ve yarı ömürlerinin kısa olmasıdır. Dolayısıyla akut dönemde nötrofil, kronik dönemde monosit hakimiyeti vardır (82).

Tüm bu basamaklar sonucunda lökositler dokuda hasarın genişlemesine neden olurlar. Bu durumun klinik yansıması mikrovasküler tromboz ve disfonksiyon ile karakterize no-reflow fenomenidir (68).

1.1.8.2.1. Mikrodolaşım ve No-Reflow Fenomeni

Mikrodolaşım, en uç kan dolaşım sistemidir. No-reflow fenomeni, diğer bir nötrofil aracılı hasardır (2).

İskemi sonrası reperfüzyon periyodunda iskemik dokuda ilk biriken hücreler trombositlerdir. Bunlar endotel aktivasyonuna ve lökosit birikimine katkıda bulunurlar (83, 84). Aktive olmuş lökositler inflamatuvar yanıtın başlamasına yol açar ve mikrodolaşımda birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit-trombosit ve lökosit-endotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur (85, 86).

Lökosit-endotel etkileşimi endotelde şişme ve daha çok lökosit adezyonuyla sonuçlanır. Lökosit-trombosit adezyonu ise trombositlerin subendotel alanda birikerek, endotel ayrılmasına neden olur. Biriken trombositler daha fazla lökosit etkileşimine neden olur (86).

Sonuç olarak endotel-lökosit-trombosit etkileşimleriyle fibrin birikimini takiben trombüs oluşumu gözlenir.

1.1.8.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Komplemanın Rolü

Kompleman sistemi bir dizi plazma proteini ve bu proteinlerin hücre zarı reseptörlerinden oluşur. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübüler ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin sentez yerleridir. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, iC3b ve C5b-9) oluşur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. C5a ayrıca, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı artırır.

Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adezyon molekülleri vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), ICAM-1, E-selektin ve P-selektinlerdir (18, 30). C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (66, 87).

1.1.8.4. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arası iletişimi sağlayan aracı maddelerdir. Sitokinler, salgılandığı hücrenin embriyolojik kaynağına göre farklılık gösteren polipeptid yapıda çok geniş bir ailedir. Sitokin terimi ayrıca, immunomodülatör ajanlar olan

interlökinler ve interferonları da tanımlamak için kullanılır. Literatürde; interlökin-1 (IL1), interlökin-6 (IL6), tromboksan A2 (TXA2) ve tümör nekroz faktörü (TNF)'nin etkileri, iskemi-reperfüzyon hasarı için iyi tanımlanmıştır. Bu sitokinler; lökositler ve vasküler endotel bariyeri arasında sinyal görevi üstlenerek lökositlerin selektif adezyon ve migrasyonunu sağlamaktadır (88).

1.1.8.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Endotel Hücrelerinin Rolü

Endotel kan ile dokuları birbirinden ayıran tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan bir bariyerdir. Damar fonksiyonlarının idamesinde görev alır. Seçici geçirgen bariyer özelliği sayesinde kan ve dokular arasında madde alışverişini sağlar (89). Endotel hücreleri SOR için hedef konumundadır, aynı zamanda SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET) ve NO'nun ana kaynağıdır (90). Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir lökosit adezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri endotelin, NO, IL-1, PAF, prostaglandinler (PGI2, PGE2), granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), büyüme faktörü ve tromboksan A2 (TxA2) salgırlar. Endotel hücreleri aktive olduklarında kendi bazal membranlarını sindiren kollajenler salgırlar (91).

1.1.9. Damar Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon

İskemi-reperfüzyon sendromunda esas olarak iki önemli komponent vardır. Bunlardan biri iskemik sahada oluşan lokal hasar, diğeri yetmezlikle sonuçlanan uzak organ hasarlarıdır (1).

İskelet kası; büyük kütleyle sahip olması ve iskemik hasara karşı en duyarlı dokulardan biri olması sebebiyle alt ekstremitelerde iskemik reperfüzyon hasarının gelişmesinde önemli rol oynar. Reperfüzyon hasarında prognoz kas hasarı miktarıyla orantılıdır (35).

İskemiye karşı doku toleransı, dokunun yapısı ve kollateral akımla yakından ilişkili olmakla birlikte, sıcaklık ve doku kitlesi de önemli etkenlerdir. İskemik dokuda reperfüzyon ile birlikte başlayan inflamatuvar yanıt sonucu lokal hasarı arttırmaktadır. İnflamatuvar yanıt oluşumunda ölen hücrelerden salınan asit fosfataz, histamin benzeri maddeler, inorganik fosfatlar, laktat, lizozimler, miyogloblin, nükleotidler, potasyum, aminoasitler, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz,

kreatin fosfokinaz, proteolitik enzimler, pürin bazları gibi ürünlerin önemli rolleri vardır (1).

Hasarlı dokulardan salınan yıkım ürünleri sonucu pıhtılaşma mekanizmalarının aktifleşmesi ile mikrovasküler hasar ve mikrovasküler trombozis oluşturarak kas hasarının daha da yaygınlaşmasına sebebiyet verir. Böylece kapiller kaçak ve interstisyel basınçta artma gözlenir.

Eğer interstisyel alandaki basınçlar mikrosirkülasyon basıncına yaklaşır veya bu basıncı aşarsa kan akımının engellenmesine neden olur (1).

Doku hasarının ilerlemesine yol açan önemli noktalardan biri de pıhtılaşma sonucu oluşan inflamatuvar mediatörlere bağlıdır. Bu nedenle yapılan bazı çalışmalarda yüksek doz heparinin permeabilite değişikliklerini azaltabileceği, kollateral akımı düzeltebileceği ve iskemik demarkasyon seviyesini azaltabileceği gösterilmiştir (1, 92).

Prokoagülanlar ve yıkım ürünleri dokunun yıkanması sonucu sistemik dolaşıma geçer ve sistemik koagülasyon oluşturabilir. Faktör XII'nin aktivasyonu, kompleman, tromboksan, histamin ve bradikinin gibi inflamatuvar mediatörler pıhtılaşmayı tetikleyebilir (1).

Ekstremitelerde, iskemi-reperfüzyonu izleyen dönemde renal yetmezlik sonucu önemli mortalite artışının olduğu bilinmektedir. Burada iskemik dokudan salınan miyoglobin veya diğer toksik faktörlerin önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (93).

Ayrıca akciğer, karaciğer, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve miyokard disfonksiyonu görülebilir (93). Oluşan komplikasyonların şiddeti tutulan doku kitlesi ve iskemi süresi ile yakından ilişkilidir, morbidite ve mortaliteyi azaltmak amacıyla kas hasarı oluşmadan önceki kritik safhada kan akımının sağlanması gerekmektedir (1).

Bazı deneysel çalışmalarda antioksidanların, antitromboksanların, antilökotrienlerin ve antitrombosit aktive edici faktörlerin reperfüzyonun sistemik etkilerinden korunmak amacıyla kullanılabileceği gösterilmektedir (1).

Lökosit aracılı iskemi reperfüzyon hasarını engellemeyi hedefleyen çalışmalar inflamatuvar mediatör salınımı ve reseptör bağlanması, lökosit adezyon

molekölü sentezi ve lökosit endotel adezyonunun inhibisyonu üzerine odaklanmıştır (94).

1.1.10. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri

Organizmada oksidan radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu etkisi olan hücre içi enzimatik savunma sistemleri, antioksidan savunma sistemleri olarak tarif edilir (95).

Biyolojik sistemlerde oksidan maddeler organizmanın yabancı cisim ve enfeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Belirli düzeylerin üstüne çıktığında ve antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığı durumlarda serbest radikaller lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asit gibi hücrenin bazal yapı taşlarını hasara uğrattır (1).

Memeli hücrelerini oksidan hasara karşı savunmada beş mekanizma yer almaktadır (1).

- 1) Metal iyonlarının bağlanması ile toksik radikal oluşumunun önlenmesi,
- 2) Oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması,
- 3) Radikal zincir reaksiyonlarının kırılması,
- 4) Hedef molekülün hasar sonrası tamiri veya tamir edilemeyecek durumdaki moleküllerin uzaklaştırılması,
- 5) Antioksidan kapasitenin artırılması.

1.1.10.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksid dismutaz (SOD): O_2^- radikalinin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizler.

Katalaz: Membrana bağlı bir peroksizom enzimidir. Hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşumunu katalize eder (1, 95).

Glutasyon peroksidaz: Sitozol ve mitokondride SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 'yi ortadan kaldıran başlıca enzimdir. Yapısında eser element olan selenyum bulunur. İndirgenmiş glutasyonun varlığında H_2O_2 'nin peroksidasyonunu katalizleyerek H_2O ve oksidize glutasyon oluşumuna yol açar (96).

Katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri peroksidlerin güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmalarını sağlar. Bunlar esas olarak peroksizomlarda lokalizedir ve etkilerini hidrojen peroksid üzerinden yaparlar (1).

1.1.10.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Yörüngelerinde eşlenmemiş elektronu bulunan ve serbest radikallerle reaksiyona girebilen demir ve bakır iyonlarını bağlayan laktoferrin, seruloplazmin ve albümin doğal önleyici antioksidanlardır. Bir demir şelatörü olan desferrioksamin aşırı demir iyonunun indüklediği hidroksil radikali üzerinden gerçekleşen membran lipit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan özellik gösterirler.

Beta bloker olan metoprololün lipid peroksidasyonu azalttığı ve indirgenmiş glutatyon konsantrasyonunu arttırdığı kabul edilmektedir. Yine karvedilolün serbest radikal temizleyici özelliği ve oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Bir başka antiaritmik ilaç olan amiodaronun antioksidatif özellikleri olduğu belirtilmektedir (1).

1.1.10.3. Süpürücü (Zincir Kıran) Antioksidanlar

Doğal süpürücü antioksidanlar, hücre içi ve hücre dışında bulunurlar. Askorbik asit, ürik asit, beta karoten, bilirübin, tiyoller, tokoferol, ubikinol ve flavonoidler bu grupta yer almaktadır.

Demir iyonlarına bağlı lipid peroksidasyonunu önleyen salisilatlar, hidroksil radikali süpürücüleri olan mannitol, dimetilsülfoksit ve dimetiltiyüüre, reperfüzyon sırasında süperoksit radikali oluşturan ksantin oksidaz enzimini inhibe eden allopürinol ve oksipürinol farmakolojik süpürücü antioksidanlara örnektir (95).

Bazı çalışmalarda E ve C vitamini ile melatoninin önemli antioksidan etkileri olduğu bilinmektedir. Antioksidan savunma sisteminde, E vitamini lipid peroksid zincir reaksiyonlarını kırar ve radikal temizleyicisi olarak görev yaparlar. E vitamini eksikliğinde oksidatif strese bağlı miyokardiyal hasarlar daha şiddetli olduğundan E vitamini ile tedavi edilen sıçanlarda miyokardın kontraktilite fonksiyonların korunduğu ve infarkt alanının azaldığı gözlenmiştir (1).

1.1.11. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA)

Asimetrik dimetil arginin (ADMA) plazma, idrar ve dokularda bulunan, arginine benzeyen bir aminoasittir (97). ADMA ilk olarak 1970 yılında, idrarla atılan metilenmiş argininler olarak tanımlanmıştır (98). Sonra metilenmiş argininler, hayvanların immun sistem hücrelerinde ve nöronlarında, insanların endotel

hücrelerinde saptanmıştır (99). 1992 yılında Vallance ve arkadaşları insan plazma ve idrarında endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS)'un endojen inhibitörü olarak ADMA'nın varlığını tanımlanmıştır (100).

1.1.11.1. ADMA metabolizması

Metilargininler üç şekilde bulunur;

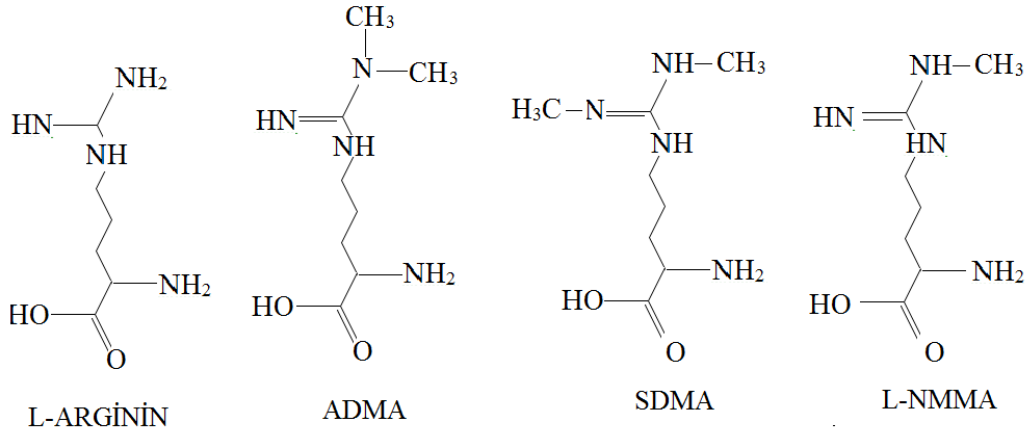
- Asimetrik dimetilarginin (ADMA)
- Simetrik dimetilarginin (SDMA)
- Monometilarginin (L-NMMA) (Şekil 6).

Bunlardan sadece ikisi nitrik oksid sentaz (NOS) enziminin inhibitörüdür;

- NG, NG-dimetil-L-arginin (Asimetrik dimetil-arginin, ADMA)
- NG-monometil-L-arginin (L-NMMA)

Endotel hücrelerinde L-argininden NO oluşumu, ADMA'nın konsantrasyonuna bağımlı olarak azalır (101).

ADMA'nın hücre membrandan transportu için L-argininle yarışması ve NOS'a bağlanmasından buyana L-arginin'de azalma değişmiş NO üretimine yol açabilir. Azalmış olan L-arginin/ADMA oranı endotel fonksiyon bozukluğuyla sonuçlandığı düşünülmektedir (102).

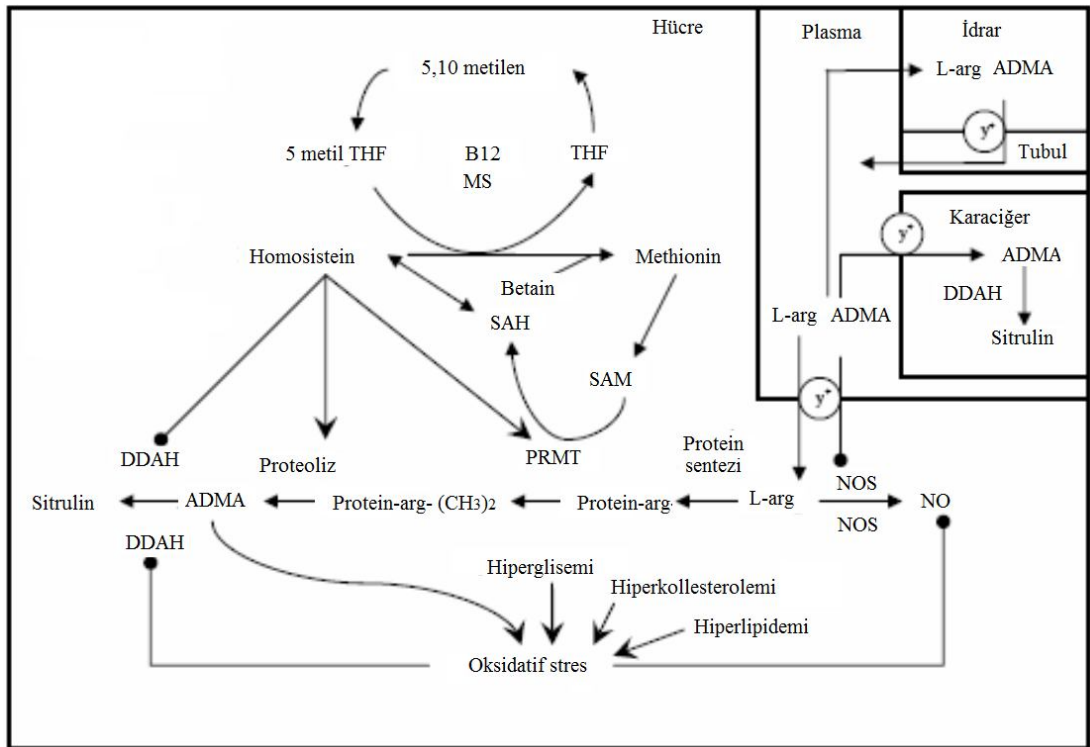


ADMA: Asimetrik dimetilarginin, SDMA: Simetrik dimetilarginin, L-NMMA: Monometilarginin

Şekil 6. L-Arginin, ADMA, SDMA ve L-NMMA'nin yapısı (103).

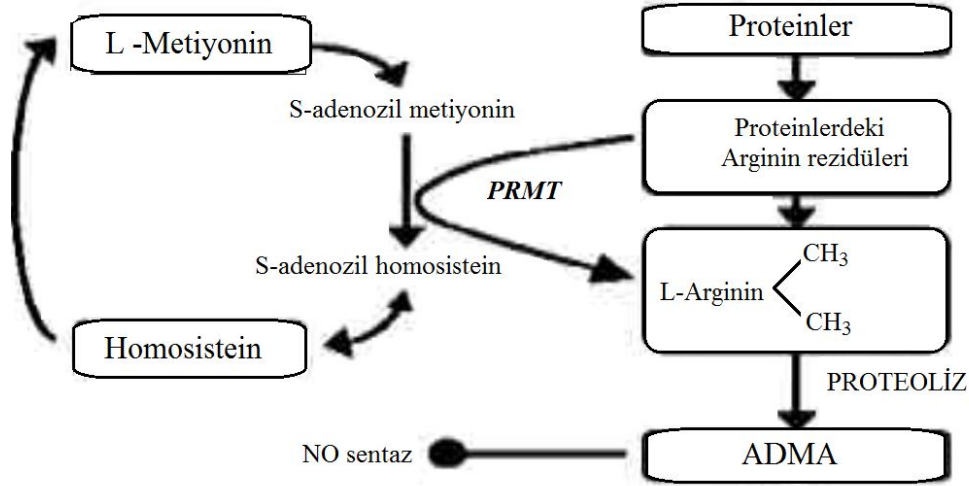
İnsanlarda plazma ADMA düzeyi, L-NMMA düzeyinden 10 kat fazladır. ADMA, nitrik oksid (NO) biyosentezinin major inhibitörüdür (105). ADMA, çoğunlukla nukleusta bulunan, metillenmiş arginin rezidüleri içeren polipeptidlerin veya proteinlerin katabolizmasından oluşur ve proteinlerin hidrolizi sonucu serbestleşir (Şekil 7). ADMA ve L-NMMA sentezi için arginin rezidülerini metilleyen, protein arginin metiltransferaz tip I (PRMT-I) enzimi gereklidir. Metil grubu vericisi olarak S-adenozil metiyonin (SAM) kullanılır (Şekil 8) (104,106, 107).

PRMT-I kalpte, düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde eksprese olur. Damar duvarında ADMA oluşum hızı, PRMT ekspresyonundaki değişiklikler ile düzenlenmektedir. Protein arginin metil transferaz tip II (PRMT-II) ise SDMA'nın oluşumunda görevlidir. SDMA, ADMA'nın stereoizomeridir ve NO sentezi üzerine direkt inhibitör etkisi yoktur (108).



ADMA, asimetrik dimetilarjinin; DDAH, dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz; L-arg, L-arjinin; MS, metionin sentaz; NO, nitrik oksit; NOS, nitrik oksit sentaz; PRMT, protein arjinin metiltransferaz; SAH, S-adenozil-homosistein; SAM, S-adenozil-metionin; THF, tetrahidrofolat

Şekil 7. ADMA'nın sentezi, metabolizması ve intraselüler etkisi (104).



PRMT: Protein arginin metil transferaz, NO: Nitrik oksit, ADMA: Asimetrik dimetil arginin
Şekil 8. ADMA sentezi (107).

1.1.11.2. ADMA'nın Taşınması

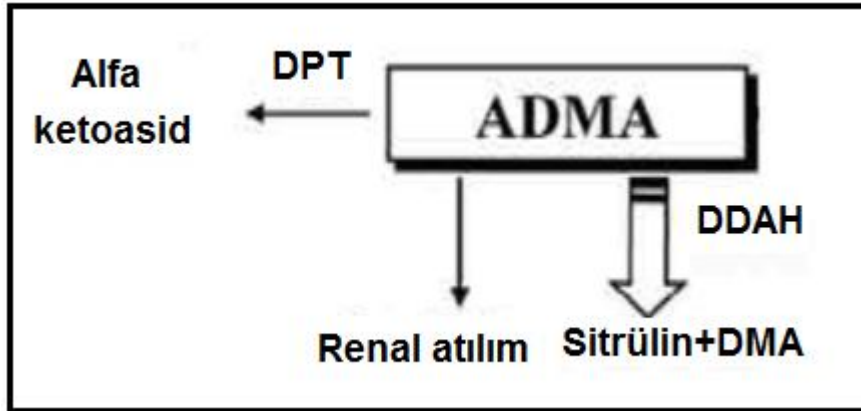
Metil argininler (ADMA, SDMA ve L-NMMA), katyonik aminoasit taşıyıcısı olarak bilinen y^+ taşıyıcı sistemi ile taşınmaktadırlar. y^+ taşıyıcısı aktivitesini kaveolin bağlı NOS ile aynı yerde gösterir. y^+ taşıyıcı aktivitesi, metilargininlerin lokal konsantrasyonlarını saptamada önemli olabilir. Metilargininler, hücre içine transport için birbirleriyle ve arginin ile yarışır. ADMA'nın yüksek düzeyleri, hücre içi L-arginin transportunu potansiyel olarak engelleyebilir. L-arginin transportunda azalma ise, NO sentezinde azalma ile sonuçlanır. Transport sistemi, metilargininleri hücre içi düzeyleri dolaşımdaki düzeylerinden daha fazla olacak şekilde endotel hücreleri içinde yoğunlaştırır. y^+ taşıyıcı sisteminde herhangi bir defekt, dolaşımdaki ADMA düzeylerinde artışa neden olur. Bunun sonucu olarak da NO biyosentezinde azalma görülür. Çeşitli hastalıkların patogenezinde y^+ taşıyıcı sistemi önemli yer tutar (108).

1.1.11.3. ADMA'nın Vücuttan Uzaklaştırılması

ADMA'nın katabolizmasında üç önemli yol mevcuttur:

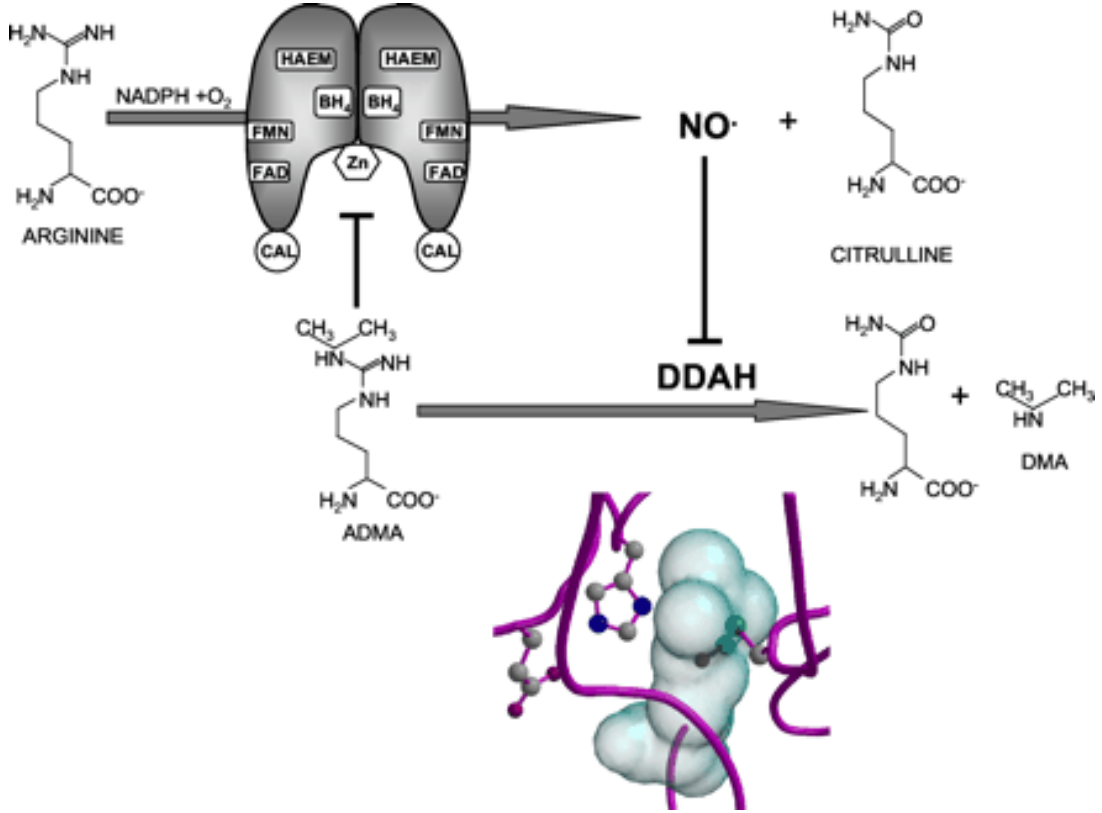
Birincisi; ADMA'nın dimetilarginindimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrülün ve dimetilaminlere yıkılmasıdır (>%90). İkincisi; ADMA'nın değişmeden böbreklerden atılmasıdır (~%5). Üçüncüsü; dimetilarginin pirüvat aminotransferaz enzimi tarafından a-ketoasidlere dönüştürülmesidir (<%5) (109)

110) (Şekil 9). ADMA yıkılımının düzenlenmesinde DDAH merkezi rol oynar. DDAH, böbrek, karaciğer, pankreas ve kan damarlarında eksprese olmaktadır. İki izoformu vardır: DDAH-I, tipik olarak nöronal NOS'un eksprese olduğu dokularda bulunmaktadır. DDAH-II ise eNOS'u içeren dokularda fazla bulunmaktadır. Vücutta sürekli bir ADMA üretimi vardır. DDAH, ADMA için spesifiktir, SDMA'yı etkilemez. Bir çok hastalıkta azalmış DDAH aktivitesi, dolaşımdaki ADMA düzeylerinin artışına yol açmaktadır. Hiperglisemi ve hiperkolesterolemi gibi durumlar direkt olarak ADMA birikimi ile sonuçlanan DDAH aktivitesinde azalmaya neden olurlar (111). Okside-LDL veya tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) tarafından indüklenen oksidatif stres, DDAH aktivitesini azaltır. Homosistein, redoks aracılı mekanizma ile DDAH aktivitesini azaltarak, ADMA düzeylerinin artmasına neden olur (112). NO'nun aşırı üretimi (indüklenebilir NOS artışına bağlı olabilir), DDAH'nın aktif merkezindeki sistein rezidülerinin S-nitrozilasyonuna, dolayısıyla DDAH'nın inaktivasyonuna sebep olmaktadır (Şekil 10) (103). All-trans-retinoikasidin ise, DDAH-II ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Böylece ADMA'yı azaltmak yoluyla endotel hücrelerinde NO sentezini arttırdığı gözlenmiştir (111). Östrojen veya östrojen-progesteron tedavisi DDAH aktivitesini arttırarak plazma ADMA düzeylerini düşürmektedir (113).



DPT: Dimetilarginin pirüvat aminotransferaz, ADMA: Asimetrik dimetilarginin, DDAH: Dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz, DMA: Dimetilamin

Şekil 9. ADMA'nın eliminasyonu (110).



NADPH: Nikotinamid Adenin dinükleotid fosfat, NO: Nitrik oksit, ADMA: Asimetrik dimetilarginin, DDAH: Dimetilarginindimetilaminohidrolaz, DMA: Dimetilamin, FMN: Flavin mononucleotide
FAD: Flavin adenine dinucleotide

Şekil 10. ADMA metabolizmasının NO tarafından düzenlenmesi (108).

1.1.11.3.1. Hücre içi ADMA

ADMA hücrelerin içinde oluşmaktadır. Endotel hücrelerinde PRMT ve DDAH'nın her ikisi de eksprese olur. ADMA birikimi, DDAH inhibisyonuna yol açar. Vasküler sistemde DDAH inhibisyonu, ADMA'nın yüksek düzeyleriyle ilişkili endotel fonksiyon değişikliklerini oluşturur. Endotel hücrelerinden ADMA'nın dolaşıma verilmesi; arginin metilasyon hızı, metilenmiş arginin içeren proteinlerin hidroliz hızı, DDAH tarafından ADMA'nın metabolize edilmiş hızı ve hücrelerden aktif çıkış hızı arasında dengeye bağlıdır (114, 115). Her bir komponentin önemi tam olarak anlaşılmasına karşın, DDAH'nın metabolik kapasitesi oldukça yüksektir ve dengenin devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (114). ADMA molekülü relatif olarak stabildir ve hücreler arasında diffüze olabilir. Bir hücrede oluşturulan ADMA'nın ikinci bir hücre tipinde NOS'u inhibe edebilme kapasitesi vardır. Bu etkileşim makrofajlar ve endotel hücrelerinde kesin olarak gösterilmiştir

(116). ADMA, NOS'un 3 izoformunu da inhibe etmektedir ancak, inhibisyon ortamdaki arginin düzeyine bağlıdır. ADMA, NO oluşumunu engellemesi yanında süperoksit anyonlarının oluşumunda yol açar. Milimolar konsantrasyonlarda metilargininler, Na⁺-K⁺ ATPaz'ı inhibe eder (103).

1.1.11.3.2. Dolaşımdaki ADMA

Sağlıklı kişilerde plazma ADMA düzeyleri 0,2-1,2 µmol/L arasındadır. Patolojik durumlarda artış göstermektedir. Yüksek plazma ADMA düzeyleri, kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere diğer birçok hastalıkta saptanmıştır. Örneğin böbrek yetmezliğinde, metilargininlerin klirensi bozulur ve plazma ADMA ve SDMA düzeyleri artar. SDMA düzeyleri kreatinin ile paralel artış gösterir ve ADMA'dan daha yüksek düzeylere ulaşır. Çünkü ADMA, DDAH tarafından metabolize edilebilirken, SDMA sadece böbrekler yoluyla atılabilmektedir. Diğer durumlarda ise ADMA selektif olarak artış gösterir, SDMA'da değişiklik gözlenmez. PRMT-I enzim aktivitesinin artışı ve DDAH disfonksiyonu dolaşımdaki ADMA düzeylerinde artışa neden olur (117). Her gün 260 µmol/L ADMA metabolize edilir ve 60 µmol ADMA idrarla atılır. ADMA'nın idrarla atılımının tamamen bozulması, plazma ADMA düzeylerinde artışa neden olur. Proteoliz artışına bağlı olarak, dokulardan plazmaya ani ADMA geçişi veya ADMA serbestleşmesinin ani artışı, plazma ADMA düzeylerinde ani değişikliklere neden olabilmektedir (118).

Plazma ADMA düzeylerinin yüksek olarak saptandığı klinik durumlar (108, 113, 119):

- Hiperkolesterolemi
- Hipertrigliseridemi
- Hiperhomosisteinemi
- Endotel disfonksiyonu
- Ateroskleroz
- İnsülin direnci
- Tip 2 diyabetes mellitus
- Hipertansiyon
- Preeklampsi
- Pulmoner hipertansiyon

- Koroner arter hastalığı
- Konjestif kalp yetmezliği
- Periferik arter hastalıkları
- Trombotik mikroanjyopati
- Kronik böbrek yetmezliği
- Erektile disfonksiyon
- Şizofreni
- İnme
- Yaşlanma
- Alzheimer hastalığı

1.1.11.4. ADMA ve Endotel Disfonksiyonu

NO vasküler homeostazda çok önemli bir yere sahiptir ve vazodilatör aktivitesinin yanı sıra, vasküler hastalıklarda anahtar rol oynayan lökosit adezyonu, trombosit agregasyonu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe edebilmektedir. Hayvan modellerinde vasküler NO sentezindeki değişikliklerin, ateroskleroz ve restenozun ilerlemesinde önemli etkiye sahip olduğu izlenmiştir. NOS yolunun bozulması, kardiyovasküler olaylar için bağımsız bir göstergedir. NOS'un endojen inhibitör olarak ADMA'nın önemi, ilk defa Vallance ve ark. (97) tarafından son dönem böbrek hastalığı olan kişilerde tanımlanmıştır. Bu hastalarda renal klirensin azalması sonucu artmış plazma ADMA düzeyleri diyaliz ile düşürülerek endotel fonksiyonunda düzelme sağlanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, artmış ADMA düzeyleri ile endotelial vazodilatör disfonksiyon arasında ilişki birçok kez ortaya konmuştur. Hiperkolesterolemik erişkinlerde yüksek ADMA düzeyleri ile endotel bağımlı vazodilatasyon arasında ters korelasyon gösterilmiştir. Hiperkolesterolemik kişilerde intravenöz arginin infüzyonu, endotel fonksiyonunu onarır ve üriner nitrat ekskresyonunu artırır. ADMA argininin kompetitif inhibitörüdür ve argininin tüm bu etkilerini inhibe edebilir (112). İnsanlarda plazma ADMA düzeyleri, hızla değişebilir. Bu da endotelial vazodilatör fonksiyondaki değişiklikler ile ilişkilidir. ADMA günümüzde endotel disfonksiyonu için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (113).

1.1.11.5. ADMA'nın Kardiyovasküler Etkileri

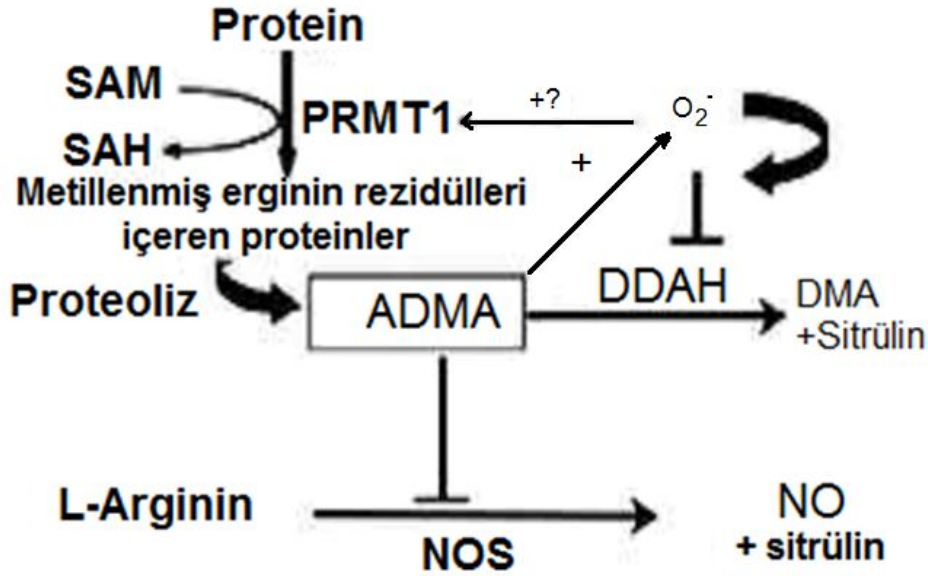
ADMA, NOS inhibisyonu yoluyla NO düzeyini azaltarak, endotel bağımlı gevşemeyi bozar ve kan basıncını yükseltir. NOS inhibisyonu böbrekleri etkileyerek sodyum ekskresyonunun azalmasına neden olur. Vücutta sodyum tutulumunun artışı, hipertansiyon oluşumuna katkıda bulunmaktadır (120). ADMA'ya uzun süre maruz kalma, aterogenezi artırır ve hedef organlarda hipertansif hasar oluşturur. ADMA tarafından uzun süre NOS inhibisyonu, sol ventriül hipertrofisine yol açabilir. ADMA, kalp hızını ve kardiyak outputu düşürür (121). ADMA'nın intraarteriyel infüzyonu lokal vazokonstrüksiyona neden olurken, sistemik infüzyonu sistemik vasküler rezistansı artırır ve renal fonksiyonu bozar. Deneysel ve klinik çalışmalarda ADMA düzeylerindeki küçük değişikliklerin bile vasküler NO üretiminde, vasküler tonusta ve sistemik vasküler dirençte anlamlı değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (119).

ADMA, hayvan modellerinde, anjiogenezi inhibe eder. Kültür hücrelerinde ve deneysel tümör hücrelerinde DDAH'nın aşırı ekspresyonu, anjiogenik olayların başlamasına neden olmaktadır. DDAH'nın aşırı ekspresyonu, vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonunda artışa neden olur ve bunun anjiogenezin ilerlemesinde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (120). ADMA düzeyindeki artışlar, kardiyovasküler riskteki artışa önemli katkıda bulunmaktadır. Hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi, hipertansiyon, insülin direnci, diyabet, hiperhomosisteinemi gibi koroner kalp hastalığına risk oluşturan durumlarda ve aterosklerotik hastalıklarda ADMA düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır (108, 112). Hücre kültürlerinde LDL'nin de DDAH aktivitesi ve PRMT ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir (121). Klinik olarak sağlıklı 116 kişide yapılan çalışmada yüksek ADMA düzeyleri ile karotid arter intima-media kalınlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (122). Orta yaşlı 150 kişiyi içeren çalışmada yüksek ADMA düzeylerinin, akut koroner hastalık riskini 3,9 kat arttırdığı gösterilmiştir (123). Yine yüksek ADMA düzeylerine sahip hastalarda, çeşitli kardiyovasküler komplikasyon gelişme riskinin artmış olduğu bulunmuştur. Bu bilgilerin ışığında ADMA yeni bir kardiyovasküler risk faktörü, olarak tanımlanmaktadır (113).

1.1.11.6. ADMA ve Oksidan Stres

Çeşitli deneysel hayvan modellerinde ve hastalıklarda artmış ADMA düzeyi, artmış oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu arasında anlamlı ilişkiler saptanmıştır. Endotel hücre kültürlerinde veya endotel disfonksiyonu olan hastalarda artmış ADMA düzeyleri, artmış reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ilişkilidir. ADMA'nın vasküler süperoksid düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (124). Endotel hücre kültürlerinde ADMA sentezinde görevli olan PRMT enziminin gen ekspresyonu, LDL ve okside LDL tarafından konsantrasyon bağımlı olarak arttırılır. Hastalarda metiyonin ve homosistein düzeylerindeki artış, ADMA düzeylerinde yükselmeye neden olur. Sydow ve ark. (124) hiperhomosisteinemili hastalarda lipid peroksidasyonu için oldukça spesifik gösterge olan 8- izoprostaglandin F2a'nın üriner ekskresyonunun artmış olduğunu göstermişlerdir. L-arginin verilmesi ile endotel disfonksiyonun düzeldiği ve eş zamanlı olarak 8-izo-prostaglandin F2a'nın üriner atılımının azaldığı görülmüştür (124). Oksidatif stres, ADMA yıkımında görevli enzim olan DDAH'nın aktivitesini azaltır. Okside LDL, inflamatuvar sitokinler, hiperhomosisteinemi, hiperglisemi, hipertansiyon ve CMV gibi ajanlar süperoksid anyon oluşumunu arttırarak endotelial oksidatif stresin artışına neden olur (Şekil 11) (113). DDAH enziminin aktif merkezindeki reaktif sistein rezidülerinin varlığı, bu enzimi süperoksid gibi reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyona veya S-nitrozilasyona uygun hale getirir. Oksidasyon ve S-nitrozilasyon sonucu enzim aktivitesi azalır. Endotel hücre kültürlerinde glukoz etkisiyle DDAH aktivitesinin bozulması ve ardından artmış ADMA düzeyleri, antioksidanlar tarafından inhibe edilmiştir.

DM, HT, LDH,K Homosistein, CMV



SAM: S-adenozil metiyonin, SAH: S-adenozil homosistein, PRMT I: Protein arginin metiltransferaz I, DM: Diyabetes Mellitus, HT: Hipertansiyon, LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol, CMV: Sitomegalovirus, ADMA: Asimetrik dimetilarginin, DDAH: Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz, DMA: Dimetilamin, NOS: Nitrik oksit sentaz, NO: Nitrik oksit

Şekil 11. ADMA ve oksidan stres (113).

DDAH aktivitesinin bozulması ve ardından artmış ADMA düzeyleri, antioksidanlar tarafından inhibe edilmiştir. Endotel hücrelerde homosistein ile inkübasyondan sonra ADMA düzeyleri artmış, DDAH aktivitesi azalmıştır. Ardından bir antioksidan olan pirolidin ditiyokarbamat verildiğinde DDAH aktivitesi düzelmiş, ADMA birikimi azalmıştır. Sonuç olarak oksidatif stresin ADMA üretimini uyarması ve/veya ADMA yıkımını inhibe etmesi, eNOS aktivitesini anlamlı derecede azaltır (124).

1.1.11.7. ADMA Ölçüm Yöntemleri

ADMA ölçümünde High Performance Liquid Chromatography (HPLC) en yaygın olarak kullanılan yöntemdir ve genellikle floresan dedektör kullanılır. ADMA'nın kendisi floresan özellikte olmadığı için genellikle ortoftaldehid derivatizan ajan olarak kullanılır. HPLC ile ölçümün en büyük avantajı bir örnekte aynı anda ADMA, SDMA ve arjininin kantitasyonuna olanak sağlamasıdır. HPLC yönteminin dezavantajı ise analiz süresinin nispeten uzun olması ve zahmetli bir

örnek hazırlama aşamasının gerekliliğidir. Özgüllüğü, zahmetli örnek hazırlama teknikleri gerektirmemesi ve kısa analiz süresi gibi avantajlarıyla kütle spektrometresi (MS) yöntemleri kullanımı da giderek artmaktadır. HPLC ve özellikle MS'in her laboratuarda bulunmaması ve uzmanlık gerektirmesi nedeniyle ELISA yöntemi geliştirilmiş ve onaylanmıştır (125). Bu yöntemde spesifik poliklonal antikorlar kullanılmaktadır. Avantajları; kolay uygulanabilir ve ADMA tayini için sensitif olmasıdır. Dezavantajı ise, tekrarlanabilirliğinin HPLC kadar iyi olmaması, poliklonal antikorların SDMA veya L-NMMA ile çapraz reaksiyon vermesidir. Fakat bu çapraz reaksiyon %5'in altındadır (126, 127).

1.1.12. Glutasyon (GSH)

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde γ -glutamil sistein sentaz ve glutasyon sentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerde sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. GSH homeostazı için diyetle yeterli protein alınmasının gerekli olduğu ve enteral veya parenteral alınan sistin, metiyonin ve N-asetilsisteinin GSH biyosentezinde sisteinin prekürsörü olarak önemli rol oynadığı çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Yaşamsal fonksiyonlarda öneme sahip GSH'ın hayvan çalışmalarında yeterli konsantrasyonlarda lenfositlerin ve ince barsak epitel hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Spermatojenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, influenza enfeksiyonunu inhibe ettiği, T-lenfositlerin, PMNL'lerin ve sitokinlerin aktivasyonu için gerekli olduğu ve immün sistemin önemli bir elemanı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve alzheimer, parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, AIDS, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır (1).

1.1.13. Malondialdehit (MDA)

Membran poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan non-enzimatik oksidatif lipid peroksidlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son üründür (128). Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonun en önemli göstergesidir (129, 130). Malondialdehit gibi sitotoksik aldehyitler hücrede DNA ve proteinler gibi makromoleküllere zarar vererek hücrenin fonksiyonunu kaybetmesine neden olurlar (131). Dokularda lipid peroksidasyon oluşumu ve buna bağlı olarak MDA artışı, hücrede membran bütünlüğünün yok olmasına, permabilitenin artmasına, hücrelere kalsiyum ve sodyum gibi elektrolit geçişlerinin hızlanması sonucu ATP kaybına, DNA hasarına ve hücre ölümleri ile sonuçlanan fizyolojik, metabolik ve işlevsel bozukluklara yol açabilmektedir (132). İki'den fazla çit bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksidler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır. Oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılır. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve mutajenik, genotoksik, karsinojeniktir. MDA miktarının ölçümü, lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de in vivo lipid peroksidlerinin düzeyini yansıtmaktadır (132)

1.1.14. Trombositler (Platelet)

Trombositler hemostaz, tromboz ve koagulyasyonda önemli rol oynar. Bu küçük hücreler sünger şeklinde tanımlanabilir ve hemorajiyi önlemek için kompleks biyokimyasal ve moleküler aktiviteleri olduğu bilinmektedir (133).

İlk kez 1860'da Zimmerman, 1865'de Manschultz tarafından tanımlanmış ve kanın pıhtılaşmasındaki rolü 1878'de Zimmerman ve Haryan tarafından ortaya konmuştur. İlk önceleri cansız hücre parçaları olarak tanınmasına rağmen, aktif hücreler olduğu ve megakaryositler tarafından yapıldığı ilk kez 1882'de Bizzazereo tarafından tanımlanmıştır (134).

Trombositler ışığı kıran, küçük, çekirdeksiz, ovoid ya da yuvarlak hücrelerdir. Soluk gri-mavi sitoplazmaları homojen dağılmış mor-kırmızı granüller içerir. Trombosit agregasyonundan sonra bu granüller hücrenin ortasında konsantre olurlar. Hücre zarının altında şekli sağlayan mikrotubulus şeridi vardır. Dolaşan

trombositlerin hacimleri heterojendir (135). Dolaşan trombositlerin hacmi $7,06 \pm 4.85 \mu\text{m}^3$ (fentolitre), çapı $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (ortalama \pm SD) ve kalınlığı $0,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ dir (136). Anormal küçük ve büyük trombositler sadece bazı hastalık durumlarında olmasına rağmen trombosit hacmi kişiden kişiye değişir. Kandaki normal konsantrasyonları $150.000\text{--}450.000/\text{mm}^3$ 'dür (137).

Trombositler, trombotik etkileri dışında kemotaktik fonksiyonları ile inflamatuvar cevapta kritik rol oynarlar. Adezyon sonrası aktive olmuş trombositler, hem salgıladıkları kemotaktik faktörlerle direkt olarak etki ederler hem de bağlandıkları hücrelerin (endotel/lökosit) kemotaktik özelliklerini değiştirerek etki ederler (138).

Hücre zarı fosfolipidlerinin peroksidasyonu sonucu; hücre zarı bütünlüğü, geçirgenliği ve hücre yüzey reseptör fonksiyonları etkilenir. Reperfüzyon periyoduyla birlikte şiddetli trombosit aktivasyonu oluşur. Artmış bu aktivite, reperfüzyon döneminde artmış trombojenite ve yeniden tıkanıklık risklerininde beraberinde getirir. Trombosit aktivasyonun primer etkeni tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyonla birlikte oluşan SOR patlaması suçlanmaktadır (139).

1.1.14.1. Platelet: Yapısal Anatomisi

Görünürde basit olmasına rağmen platelet fonksiyonları çok komplekstir. Plateletin yapısal fonksiyonu daha iyi kavramak için plateleti 4 farklı anatomik bölgeye ayırabiliriz (Şekil 12) (140).

1) Çevresel Zon

Periferik zone açık kanallükler sistemi oluşturan çıkıntılar ve membrandan oluşur. Üç bölüme ayrılır: dış yüzey, unitmembrane ve membrane altı bölge.

2) Dış Yüzey

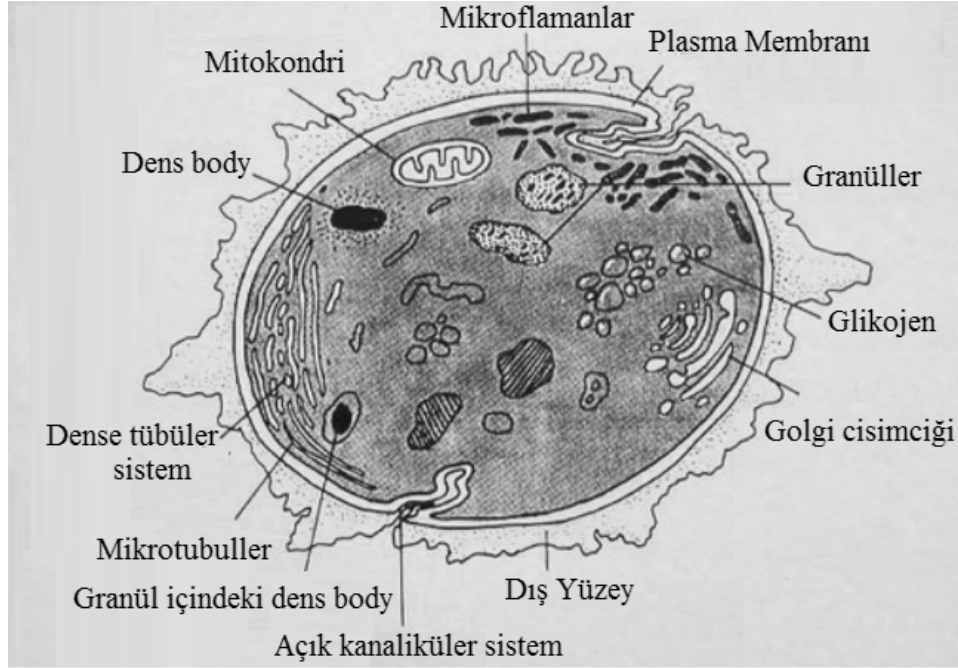
10-20 mm kalın glikokaliks ve zengin glikoprotein içeren tabakadan oluşur (148, 149). Çoğu hücre-hücre, hücre-damar duvarı reseptör ilişkisinden sorumludur.

3) Platelet membranı

Diğer zarlar gibi; (1) fosfolipidden zengin çift katmanlı lipid tabakası, (2) membranlar arası iyon gradiyentini sağlayan anyon ve katyon pompaları ve (3) hücre içi ve hücre dışı fizyokimyasal olayların ayrılmasını sağlayan yapısına ek olarak sıvı faz koagülasyonunda önemli katalizördür (141, 142).

4) Membran altı bölge

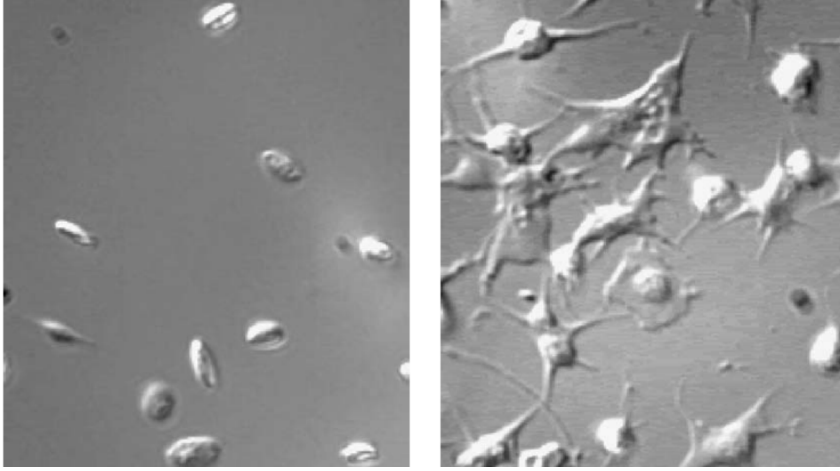
Anatomik ve fonksiyonel olarak membrane glikoproteini ve sitoplazmik filamen sistemi ile yakın ilişkili olan yaygın mikrofilamen ağından oluşmuştur (143, 144).



Şekil 12. Trombositin içyapısı (140).

1.1.14.2. Platelet Fonksiyonel Anatomisi

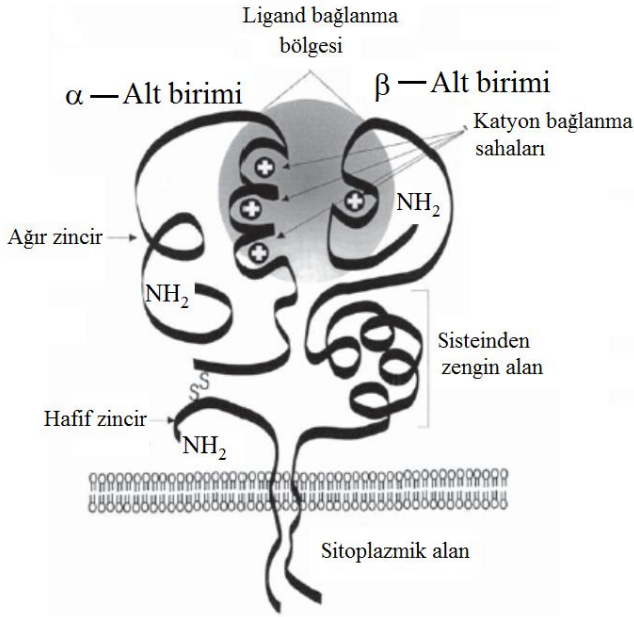
Normal şartlar altında plateletler başka platelet veya vasküler endotelle ilişkili olamdan dolaşımında serbest halde bulunurlar (Şekil 13). Aterosklerotik plak yırtılması veya vasküler yaralanmaya bağlı endotel hasarı olduğu zaman, bir dizi olaylar zinciri tetiklenir ve plateletlerden zengin pıhtı oluşumu gerçekleşir. Başlatan neden bağlı olarak bu olay normal hemostazın getirdiği süreç veya patolojik vasküler tromboz olarak son bulur. Bu karışık biyokimyasal ve hücrel süreci 4 genel kategori altında incelenebilir: Adezyon, aktivasyon, sekresyon, agregasyon.



Şekil 13. Platelet şekil değişikliği A) İstirahat halinde B) Aktive plateletler

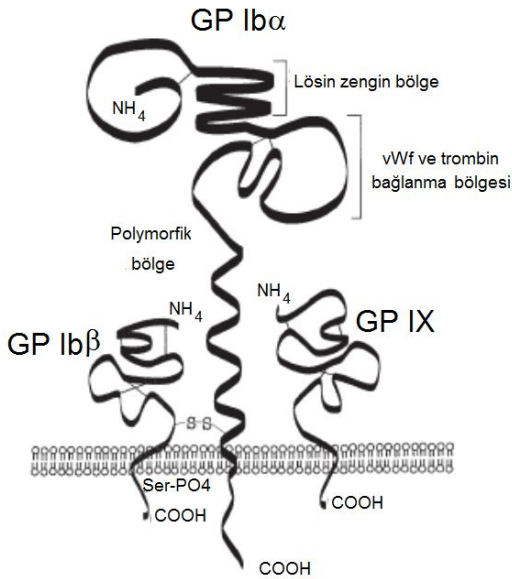
1.1.14.2.1. Platelet Adezyonu

Disfonksiyonel ve hasarlı vasküler endoteliyuma platelet hemen yapışır. Bu olay özellikle subendotel kollajen ve lipidlerin açığa çıktığı aterosklerotik plak yırtılması ve erozyonu sonrası olur. Hasarlanan bölgede açığa çıkan ve platelet membran glikoproteinleri tarafından tanınan adhesiv proteinler aracılığıyla, adezyon olayı gerçekleşir ve primer hemostazın ilk süreci başlamış olur. Plateletler üzerinde bulunan bu spesifik glikoproteinler sadece endotele adezyon görevinde yer almaz ayrıca hücre-hücre etkileşiminde önemli rol alır. Günümüzde dokuz adet platelet membran glikoproteini tanımlanmış olup sınıflandırılması poliakrilamide jel ayırımına göre yapılmıştır (145, 146). Platelet membran reseptörlerinin çoğu non kovalent glikoproteinlerden oluşur. Her reseptörün spesifik bir ligandı olmayıp bir reseptör birden çok liganda cevap verebilmektedir. Ayrıca bu reseptörler integrinler ve non integrinler diye de sınıflandırılabilirler. İntegrinler heterodimerik hücre yüzey molekülü olup alfa ve beta alt ünitelerinden oluşurlar (Şekil 14). Plateletler en az iki beta ve beş alfa subuniti eksprese ederler (156).



Şekil 14. Prototipik İntegrinin moleküler yapısı (156).

Adezyonu başlatan olay temastır. Dolayışında serbest dolaşan inaktive plateletler olay yerinde durur ve sıkıca vasküler hasarın olduğu bölgeye yapışır (148). Bu önemli olay membran glikoproteini olan glikoprotein Ib-IX (Şekil 15) ve vasküler endotel hücrelerinden sentezlenen, luminal ve subendotel bölgelere salınan büyük bir protein olan vonWillebrand (vWF) arasında gerçekleşir. vWF'in ayrıca plateletlerin damar duvarının diğer elemanlarına (kollajen, mikrofibril) bağlanmasını sağlayan fonksiyonel belirteçleri vardır (149, 150).



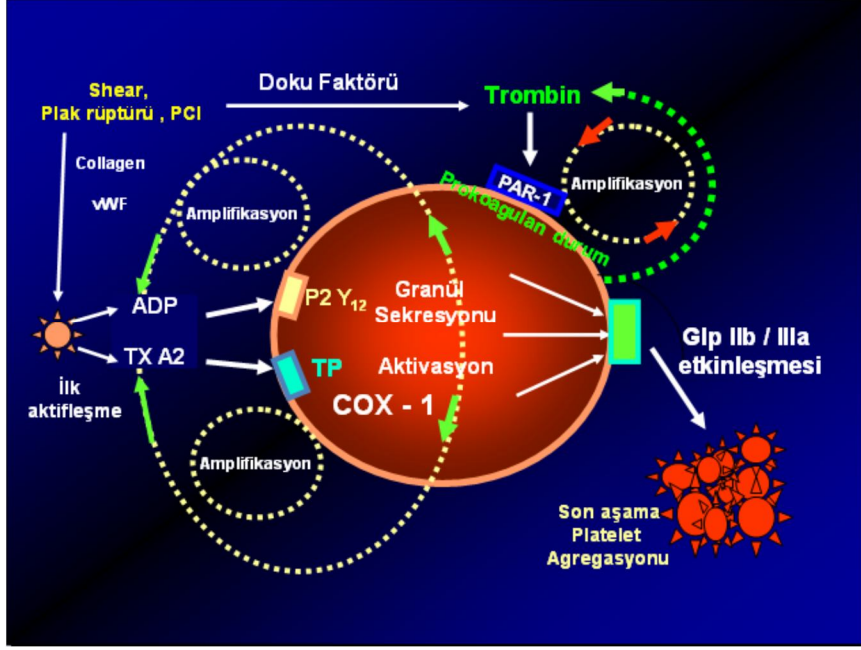
Şekil 15. Platelet yüzeyindeki GP1b-IX kompleksinin şematik gösterimi (150).

Platelet adezyonunda esas gerekli olan çekme kuvvetidir (151, 152). Plateletlerin vaskuler sistemin subendotel içeriğine adezyonu damar duvarı hasarına primer hemostatik cevaptır. Adezyon olayı membran glikoproteinleri aracılığıyla gerçekleşecek olan platelet aktivasyonuna kuvvetli bir uyarandır.

1.1.14.2.2. Platelet Aktivasyonu

Platelet aktivasyonu platelet adezyonuna ek olarak birçok biyokimyasal ve mekanik uyanlarla tetiklenebilir. Bu biyokimyasal agonistlerin çoğu damar duvarına adezyon sonrası plateletler tarafından üretilir veya salınır. Bu uyarılma sonrası biyolojik bir geri dönüşüm mekanizması oluşur ve her uyarana cevap artarak devam eder.

Platelet agonistleri yüzeyde bulunan glikoprotein reseptörlerine bağlanarak, membrandaki mesajcı proteinler (G protein) aracılığıyla iki farklı intraselüler yolağa sinyal iletimini uyarırlar. Fosfoinositid yolağı fosfolipaz C'nin aktivasyonu ile başlar. Fosfoinositol-4-5-bifosfat (PIP2) , sekonder ileticilerden olan inositol-1, 4, 5-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserolü oluşturmak üzere ikiye ayrılır (153). IP3 plateletlerin fizyolojik görevlerini yapabilmesi için görevli enzimlerin aktivasyonunu sağlayan kalsiyumun denstübuler sistemden salgılanmasına neden olur (154). Diaçilgliserol ise fosfolipaz C'yi aktive ederek protein fosforilasyonu, granül sekresyonu ve fibrinojen reseptör ekspresyonunu sağlar. Diğer bir yolak olan fosfolipaz A2 ise aktive olduğunda hücre membranlarından araşidonat sağlanmasını yol açar. Araşidonat bunu plateletlerde bulunan siklooksijenaz enzimi aracılığıyla tromboksan A2 (TxA2)'ye dönüşür. TxA2 çok güçlü bir paltelet agonisti olup, pozitif geri dönüşüm mekanizmasıyla paltelet aracılı trombozu şiddetlendirerek arttırır. Trombin hem fosfoinositid hidrolizinde hem de araşidonat metabolizmasında (fosfolipaz C ve fosfolipaz A2 aracılığıyla) rol alır. Buna ek olarak bu iki yolaktan birini inhibe etmesine rağmen, platelet aktivasyonu ve agregasyonunu hızlandırabilir. Trombinin çok düşük konsantrasyonlarında bile (<0,1IU/ml) platelet agregasyonunu sağlayabildiği gösterilmiştir (Şekil 16) (155).



Şekil 16. Aterotrombotik sürecin başlangıcı; Adezyon, aktivasyon, amplifikasyon, agregasyon (155).

1.1.14.2.3. Platelet Sekresyonu

Platelet aktivasyonu ekstraselüler sinyallere kompleks bir cevap olup, sitoskeleton düzenlenmesi, membran füzyonu, üç farklı platelet depo granülerinden (lizozomlar, alfa granüller, dense cisimcikler) sekresyon (ekzositoz) olaylarını içerir. Alfa granüllerinin füzyonu ve plazma membranıyla derin invajinasyonlarını takiben içeriğinin dışı sekresyonu deneysel olarak gösterilmiştir (156, 157).

Lizozomlar endositoza uğramış materyalleri sindirecek asit hidrolaz (katepsin) enzimlerini içerir ve lizozomal sekresyon dense ve alfa granüllere göre daha yavaş olur (158-160). Plateletler ayrıca osmofilik elektrondan yoğun olan dense cisimcikleri içerir. Dense cisimciklerde çok büyük miktarda metabolik olmayan adeninler (ADP, GDP), divalent katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2}), serotonin, pirofosfatlar bulunur. Platelet aktivasyonuna takiben olan ADP salınımını vasküler hasarlanma bölgesine diğer plateletlerin gelmesini sağlar.

Platelet alfa granülleri sferik cisimcikler olup 300-500nm çapındadır. Platelet spesifik protein, koagülasyon faktörleri ve çeşitli glikoproteinleri içerirler. Platelet spesifik proteinleri içinde en fazla bilgi sahibi olunan platelet büyüme faktörü (PDGF) olup, düz kas hücresi ve fibroblastlar üzerinde iki ayrı reseptörü izole

edilmiştir (161). Platelet damar duvarı etkileşimi sonrası PDGF'nin düz kas hücre çoğalmasını düzenlediği düşünülmektedir. Diğer iki alfa granüller; bağ dokusu aktive edici peptid III (CTAP III) ve platelet faktör-4'tür. CTAP III beta tromboglobulinin prekürsörü olup, fibroblast çoğalmasında görev alırlar. Platelet faktör-4 ise heparine bağlanarak antikoagulan etkisini nötralize ederler (162, 163).

Platelet alfa granülleri birçok sayıda koagülasyon proteinleri içerir. Faktör V' in %20-25'lik kısmı alfa granüllerinde depo edildiği ve alfa trombin stimülasyonu sonrası salınan ve fosforile olan en önemli protein olduğu gösterilmiştir (164, 165). Diğer bir protein protein S olup faktör V ve VII aracılıklı koagülasyonu inhibe eden protein C'nin kofaktörüdür. Protein C'nin etkisini plateletlerin adezyon ve aktivasyon yaptığı bölgelerden olduğu gösterilmiştir (166). Plasminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) diğer bir protein olup lokal fibrinolitik potansiyel özelliğine sahiptir (167). Plateletler ayrıca fibrinojen içerir ve salırlar. Plazma seviyelerine nazaran çok az bulunmasına rağmen, plateletlerde daha yoğun bir şekilde bulunurlar buda plateletlerin hemostatik prosesleri lokalize ettiğini düşündürmektedir (168).

Platelet alfa granülleri ayrıca yedi farklı glikoprotein içeriyor olup bunların bir kısmı salgılanır bir kısmı ise granül membranına bağlı olarak bulunur. Trombospondin majör çözülebilir glikoproteini olup düz kas hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol alır (169). Platelet alfa granüllerinde GPIIb/IIIa deposu bulunmakta olup platelet aktivasyonunu takiben platelet yüzeyindeki GPIIb/IIIa reseptör sayısı bu sayede iki katına kadar çıkabilmektedir (170-172).

1.1.14.2.3.1. Platelet ADP reseptörleri

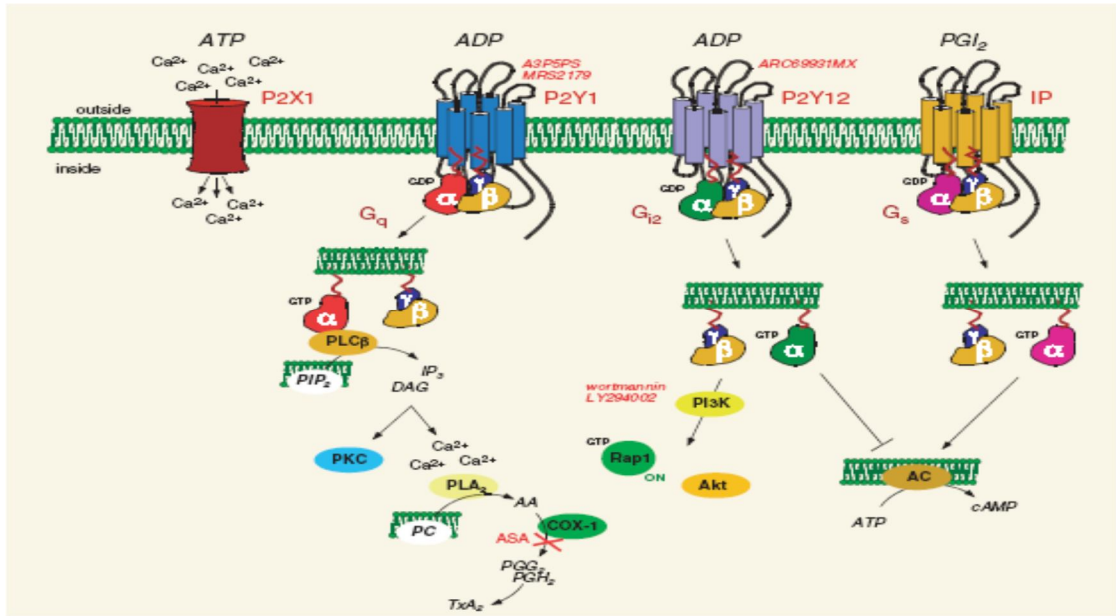
Adenozin difosfat kanda ilk tespit edilen nükleotid olup yabancı bir yüzeye temas halinde platelet davranış değişikliğinde önemli rol oynar. Eritrosit membranlarından ayrıştırılan ADP'nin plateletlerin cama sıkıca yapışmasını arttırdığını, bu olayın ise kalsiyum ve fibrinojen gerektirdiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (173, 174).

Purinerjik reseptörler hücre yüzey reseptörleri olup selektif olarak ADP bağlarlar. Bu ekstraselüler nükleotid yüzey reseptörleri P2 reseptörleri olarak adlandırılırlar. P1 purinreseptörleri ise adenosini bağlar. Günümüzdeki

adlandırmayla, P2 reseptörleri moleküler yapısı ve sinyal ileti mekanizmasına göre adlandırılmış olup şu şekilde sıralanırlar (Şekil 17);

- 1) P2X reseptörleri ligand aracılı iyon kanalları
- 2) G protein aracılı P2Y reseptörleri (P2Y1-P2Y12)

Her iki P2Y reseptörü ADP ile aktive olurlar. P2Y1 aktive olduğunda fosfolipaz C'yi aktive eder ve bu da platelet şekil değişikliğini tetikler. P2Y12 ise Gi ye bağlanır ve adenilat siklaz ativesini inhibe eder. Fonksiyonel olarak P2Y1 aktivasyonu platelet agregasyonunu başlatırken, plateletlerin tam agregasyonu için P2Y12 reseptörüne ihtiyaç vardır (175, 176).



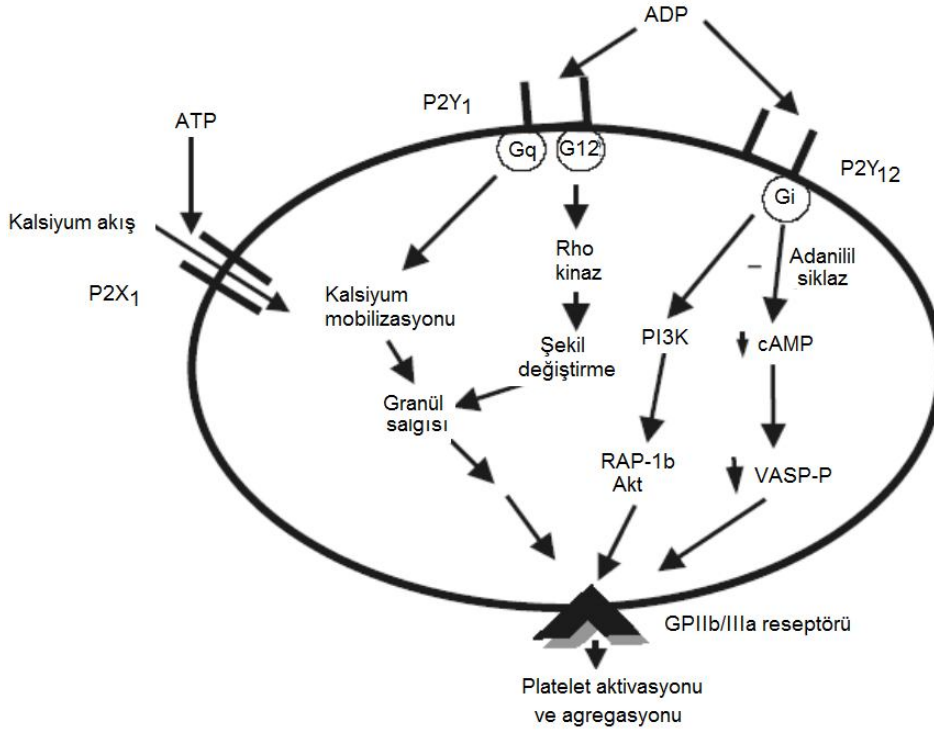
P2Y1 and P2Y12 ADP aracılıklı aktive olan G protein bağımlı reseptörler (G_q and G_{i2}). P2X1 kalsiyum girişine izin veren ATP aracılıklı katyon kanalı. A3P5PS ve MRS2179 P2Y1-selektif antagonistleri. ARC69931MX ise P2Y12-selektif antagonistisi.

Şekil 17. ADP reseptörleri (176).

1.1.14.2.4. Plateletlerde Bağlanma

ADP paltelet yüzeyine reseptörün spesifik bölgesinden bağlanır (moleküler ağırlığı 61kDa). Reseptöre bağlanma afinitesi sırasıyla ATP=ADP>AMP>> adenosine şeklinde sıralanır (177). Platelet reseptörüne ADP bağlandıktan sonra hızlı kalsiyum girişi, intrasüler kalsiyumun depolardan mobilizasyonu, şekil değişikliği, adenilat siklaz inhibisyonu, IP₃ oluşumunun uyarılması, GIIbIIIa ekspresyonu, fosfolipaz A₂ nin uyarılması, dens ve alfa granüllerinden içeriğin salgılanması gibi

bir dizi olaylar meydana gelir (Şekil 18). ADP ve reseptörünün vasküler hemostaz ve patolojik trombozdaki önemli rolünü, ADP bağlanması ve ADP aracılıklı platelet agregasyonunun kalıtsal hastalıklarındaki kanama bozukluklarının tespit edilmesi ortaya koymuştur (178, 179). ADP, P2Y12 reseptörü aracılığıyla trombin yapımını hızlandırır ve potansiyelize eder. Bu reseptör ayrıca PAR-1 uyarılımını da stimüle ederek trombin yapımına katkıda bulunur (180). ADP reseptörleri plateletten başka diğer hücrelerde de bulunur. Fibrinojenin monositlere bağlanmasında ve megakaryositlerde kalsiyum mobilizasyonunu uyarırlar (181). ADP reseptörleri ayrıca glioma hücreleri, hepatosit ve kapiller endotel hücrelerindedey tespit edilmiştir (182).



Şekil 18. ADP'nin platelet aktivasyon ve agregasyonundaki merkezi rolü (178).

1.1.14.2.5. Platelet Agregasyonu

Membran reseptörü olan GPIIbIIIa'da oluşan konformasyonel değişiklik platelet aktivasyonunu takiben meydana gelen en önemli platelet cevabıdır. Bu değişikliği GPIIbIIIa ile fibrinojen etikleşimi izlemekte olup, bunun sonunda platelet arasında birçok çapraz bağ oluşumuyla sonuçlanır.

GPIIbIIIa integrin reseptör ailesinden olup, alfa ve beta alt ünitelerinden oluşur. Alfa alt ünitesi ağır ve hafif zincir içerir. Ağır zincir tamamen ekstraselüler

olmakla beraber, hafif zincir membranda yer alıp kısa bir bölümü ekstraselülerde sonlanır (183). Platelet aktivasyonu ile birlikte GIIbIIIa fibrinojen ve diğer protein bağlara bağlanmak için konformasyonel değişikliğe uğrar. Bu transformasyonun nedeni olan biyokimyasal mekanizma tam anlaşılamamakla beraber GIIbIIIa fibrinojen etkileşimi ile ilgili elektron mikroskopuyla yapılan araştırmalar bazı açıklamalar getirmiştir (184). GIIbIIIa reseptörünün başı fibrinojen molekülünün distal kısmı ile birleşirken kuyruk kısmı ise fibrinojen ile 90 derece açı yapacak şekilde laterale kayar. Kuyruk kısmının bu şekilde davranışı iki platelet arasında köprü vazifesi görmesini sağlar.

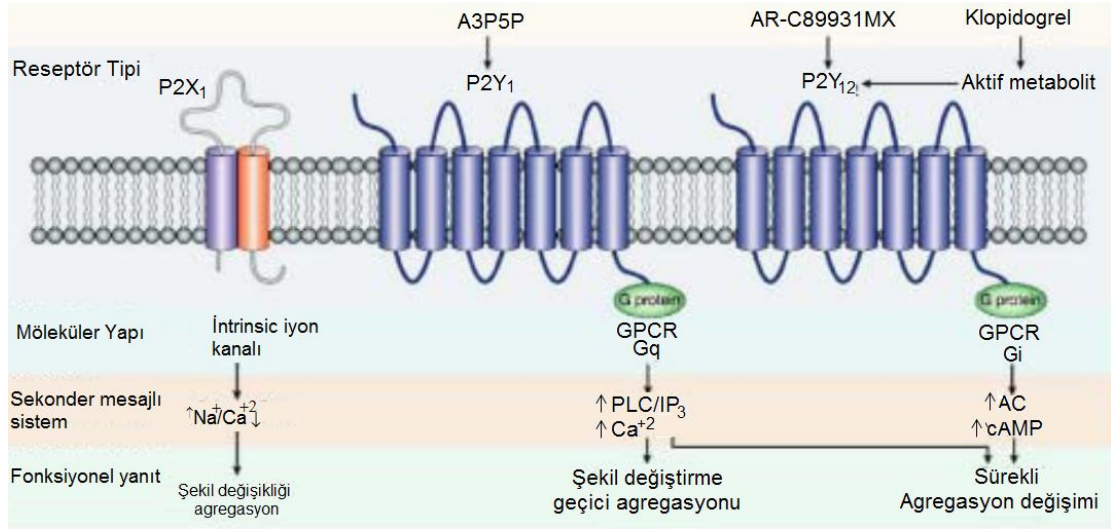
1.1.15. ADP Reseptör Antagonistleri

Plateletlerin nükleik asit ve metabolitlerini ligand olarak algılayan birçok membran reseptörleri vardır. Sınıflandırmada alfabetik P harfi purinlere atıftan alınmış olup reseptörler P harfi ile adlandırılırlar. P1 purinreseptörü adenosin ile aktive olur. P2 reseptörlerine ise ATP ve ADP bağlanırlar ve reseptörler üç gruba ayrılırlar: P2X1, P2Y1, P2Y12, P2X1 reseptörü platelet membranında iyon kanalı olup ATP aktivasyonunu takiben hızlı kalsiyum girişini sağlar. Artmış olan hücre içi kalsiyum plateletlerde şekil değişikliği ve agregasyona neden olur.

P2Y (P2Y1 ve P2Y12) reseptörleri ise membranı yedi kez saran hidrofik bağlantıları olan reseptörlerdir. Reseptörlerin dış yüzeyine ADP bağlanmasıyla aktive olurlar. Platelet dış yüzeyine bağlanma sayısı nisbeten az sayıda olup, tahmini hücre başına 1000 dir. P2Y1 reseptörü G proteinine bağlı olup, intraselüler kalsiyum mobilizasyonunu sağlayan kaskadı başlatır. Artmış olan bu kalsiyum plateletlerde şekil değişikliğine yol açar bunu takiben platelet agregasyonu ve pıhtı oluşumuna neden olur (Şekil 19). P2Y1 reseptörü ilaç gelişimi için ilgi uyandırıcı reseptör olmuştur. Hayvan çalışmalarında farelerde bu reseptörün eksikliğinde daha az tromboz (ADP, kollajen ve epinefrine agonistlerine azalmış yanıt), artmış kanama zamanı gözlenmiş fakat spontan kanama riskinde artma olmamıştır.

P2Y12 reseptörü kardiyovasküler farmakoterapide en çok çalışılan ve araştırılan reseptörlerinden olmuştur. Bu reseptör ADP ile aktive olup G proteinine bağlanır. Bu reseptörün aktive olmasıyla adenilat siklaz enzimi inhibe olur. Bu biyokimyasal kaskadın sonu platelet aktivasyonunda ve agregasyonunda artış,

bununla birlikte daha kuvvetli pıhtı oluşumuyla seyrederek. Holopeter ve ark. (185), tarafından bu reseptörün klonlanması platelet fiziolojisinde yeni bir çığır açmış bunu takiben iki tienopiridin olan tiklopidin ve klopidogrel bu reseptörlere hedef olarak geliştirilmiştir (Şekil 19).



P2X1, P2Y1 ve P2Y12 ve etki mekanizmaları

Şekil 19. Üç farklı ADP reseptörü (185).

1.1.16. Aortik Kros-Klempin Sistemik Etkileri

Aort cerrahisi sırasında aortaya klemp uygulanması ile klempin distalinde (alt ekstremitelerde) iskemi oluşur. Klempin kaldırılması ve iskemiye uğramış dokularda yeniden dolaşımın sağlanması ile de reperfüzyon hasarı oluşur.

Genelde aortik kros-klempin (AKK) hemodinamik cevabı kalp hızında belirgin artış olmadan sistemik vasküler rezistansta ve arteriyel kan basıncında artış olarak karşımıza çıkar. AKK sırasında kardiyak output düşmektedir. Dolu basınçlarında değişiklik olmaması veya artışı bu durum ile uyumsuzluk göstermektedir (186).

Torasik aortanın klemplenmesinde dolu basınçları yani santral venöz basınç, pulmoner kapiller wedge basınç veya sol ventrikül end sistolik basınçları artar (187). Torasik aort cerrahisinde klempin kaldırılması sonucu vasküler rezistans ve arteriyel kan basıncında %70-80'lere varan ciddi düşüşler oluşur (188).

Aortanın değişik seviyelerdeki kros-klemp kan dağılımında değişik derecelerde ve farklı özelliklerde etki yapar. Supraçölyak seviyede aortaya kros-klemp uygulanması ortalama arter basıncı, dolu basıncı ve diyastol sonu

ventriküler volümde anlamlı yükselme yol açar (186). Supraçölyak aortik kros-klempin distalinde venöz kapasitans düşer ve splanknik veya nonsplanknik alandaki kan kalbe yönelir.

1.1.16.1. Oklüzyonun Seviyesi

Aortik kros-klemp seviyesi hemodinamik cevabın şeklini ve şiddetini belirler. Ortalama arter basıncı, dolum basıncı, sistolik veya diyastolik sol ventrikül bölgeleri, ejeksiyon fraksiyonu ve duvar hareket bozuklukları infrarenal AKK'de minimal derecede gerçekleşirken supraçölyak seviyede ise bu değişiklikler daha şiddetli olarak meydana gelir.

Kros-klemp süresi uzadıkça sistemik vasküler rezistans artar ve kardiyak output artar. AKK proksimal aortik basıncı artırır ve sonuç olarak vücudun üst yarısında doku-membran gradiyenti artışı intravasküler alandan interstisyel alana sıvı transferine sebep olur. Bu durum sistemik vasküler rezistansın artışı ve intravasküler volümde azalmayı açıklamaktadır.

Abdominal aorta anevrizma operasyonunda kros-klempdeki hemodinamik cevap tıkaçıcı aort hastalıklarında operasyon sırasında hemodinamik cevaptan daha ciddidir (186). Ayrıca bazı araştırmacılar abdominal aort anevrizma tamir operasyonlarına göre klempin kaldırılmasıyla oluşan hipotansiyonu azaltabilmek için iki kat daha fazla sıvıya ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki hasta grubu arasındaki fark kros-klemp seviyesindeki aortik kollateral damarların durumuyla ilgilidir. Arteriyel ve kapiller basıncın AKK seviyesinin altında düşük seyretmesi intestinal sıvı absorpsiyonunu artırır (188).

1.1.16.2. Renin

Aortik kros-klemp esnasında insan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ışığında renin ve anjiotensin aktivasyonun arttığı bilinmektedir. Supraçölyak uygulanan kros-klempelerde renin aktivasyonunda artışı afferent arteriyollerde basınç düşüşüyle açıklamaktadır. İnfrarenal seviyede ise bu sebepler kolay açıklanabilmiş değildir. Erken postoperatif periyotta plazma renin aktivasyonu ile arteriyel hipertansiyon arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Hem insan hem de hayvan modellerinde beta adrenerjik antagonistler ile önceden tedavi verilmesi renin aktivitesi artışındaki oranı azaltmaktadır (189).

Yapılan çalışmalarda AKK uygulanan sıçanların hemodinamik cevaplarında ACE inhibitörleri ile tedavi edilmeyen gruba göre iki kat arttığı tespit edilmiştir (186). Kaptopril ile ön tedavi yapılan hastaların AKK sırasında ve sonrasında ortalama arter basınçlarında daha az artış olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında ACE inhibitörleri sadece anjiotensin II'nin konsantrasyonunu azaltmakla kalmayıp aynı zamanda bradikinin konsantrasyonunu azaltarak anjiotensin II oluşumunu azaltmaktadır (190).

1.1.16.3. Katekolamin

Torakik aortaya kros-klemp uygulanması yüksek konsantrasyonda epinefrin ve norepinefrin salınımına sebep olur. Abdominal aortaya kros-klemp uygulanması sırasında ise daha az katekolamin salınımı olmakla beraber kros-klemp sırasında epinefrin ve sonrasında ise norepinefrin düzeyleri artmaktadır. AKK sırasında sempatik deşarj multifaktöriyeldir. Bu hipotansiyonda ve şokta, iskemik kalan spinal kord ve adrenal medullada görülen bir reflex mekanizmadır. Kros-klemp sırasında proksimal kan basıncında artış baroreseptörler üzerine etki ederek sempatik aktivasyonu inhibe eder (191).

1.1.16.4. Serbest Oksijen Radikalleri

Aortik kros-klemp esnasında oklüzyonun distalinde laktat privat konsantrasyonları artmaktadır. İntramuskuler pH ve femoral venöz kan akımı ise azalmaktadır. AKK sırasında ve klemp kaldırılmasıyla kaslarda oluşan metabolik düzensizlik ve hücre hasar nedeniyle AKK sırasında azalan enerji depoları ve kreatin havuzu tekrar kan akımı sağlansa bile iskemi öncesi seviyelerine ulaşmaz.

Elektif abdominal aort cerrahisi operasyonu geçiren hastalarda postoperatif hipofosfatemide görülmektedir. Hipofosfatemiden hemodilüsyon, idrar fosfat atılımının arttığı tübüler hasar gibi birçok etken sorumlu tutulabilir. Bu faktörler arasında önemli olan iskemi ve reperfüzyon ile tetiklenen hücre içi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yeniden sentezlenmeye çalışılması sırasında oluşan ekstrasellüler fosfat dengesizliğidir.

Hipoksik şartlarda ATP metabolizması adenzin, hipoksantin, ksantin oksidaz, pürin ve serbest oksijen radikali oluşmasına sebep olur (192). İnsanda sistemik hipoksantin konsantrasyonu infrarenal AKK kaldırılmasıyla 20 kat

artmaktadır. Hipoksantin ise serbest oksijen radikali oluşturarak reperfüzyon sırasında hücrel hasara sebep olur (193).

Reperfüzyon sırasında oksijen sunumunun azaltılması veya gecikmesi durumunda iskemik hasarda anlamlı düzeyde azalma görülür. Örneğin; iskemi sonrasında dokunun ilk perfüzyonunu önce anoksik kan ile ardından normooksik kanla yapmak postiskemik mikrovasküler hasarı azaltmaktadır. Azaltılmış oksijen sunumu ile yapılan kas reperfüzyonunda yine iskemi reperfüzyon hasarında anlamlı düşüşler görülmektedir (194).

Klemp kaldırılması sırasında intravasküler volüm kaybının ve sonrasında arteriyel hipotansiyonun mikrovasküler permeabiliteyi artıran serbest oksijen radikallerine bağlı olması mümkündür (195).

Reaktif oksijen türleri nötrofillerden tromboksan stimülasyonu yaparken serbest oksijen temizleyicileri de tromboksan sentezini azaltmaktadırlar. Buna rağmen serbest oksijen radikallerinin prostaglandin mekanizması üzerine etkileri henüz net olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar tromboksan reseptör antagonistlerinin iskemi sonrası pulmoner permeabilite artışını yavaşlattığını göstermektedir (194).

1.1.16.5. Prostaglandinler

Aortik kros-klemp sonrası prostaglandin konsantrasyonu artmaktadır. Cerrahi sırasında barsak eventrasyonu ve mezenter traksiyonu prostasiklin salınımını artırır ve sonuç olarak vazodilatasyon, sistemik vasküler rezistansta düşme, kardiyak outputta artmaya sebep olan bu durum mezenterik traksiyon sendromu olarak tarif edilir. Kutanöz hiperemi ve arteriyel hipotansiyona sebep olur. Bu durumun asıl nedeni ise prostasiklin (PGI₂)'dir. Prostasiklin artışı Anjiotensin I ve II'nin artışına da bağlı olabilir. Yine klemp açılması sonrası vazodilatör etkisi olan prostaglandin E'nin salınması buna katkıda bulunur (195).

Aort cerrahisi sonrası kardiyopulmoner komplikasyonlar, iskemik dokudan salınan anaerobik metabolik ürünler ve mikroagregatların etkisiyle ortaya çıkar.

Mikrovasküler permeabilitenin akciğerde artması ile tromboksanın indüklediği nötrofil tuzağı oluşur. Nötrofiller proteaz ve serbest oksijen radikallerinin etkisiyle oluşan vazotoksik bir süreçte rol alır. Nötrofil tutunma reseptörü olan CD18 nötrofil bağımlı pulmoner hasarda iskemi reperfüzyon sonrası önem arz eder (196).

1.1.16.6. Kompleman

Abdominal aort cerrahisinde kompleman faktörleri olan C3a ve C5a anaflatoksinlerinin konsantrasyonları artmaktadır. Bu anaflatoksinler çoğu doku ve organda düz kas kontraksiyonu sağlayan potent mediatörler olup pulmoner arter basıncını, pulmoner vasküler rezistansı ve vasküler permeabiliteyi artırmaktadır (197). Hem C3a hem de C5a mast hücrelerinden histamin, lökositlerden proteaz ve peroksidaz ile tromboksan ve platelet aktivatör faktör (PAF) salınımına sebep olur (198).

1.1.16.7. Myokardiyal Depresan Faktör

Aortik kros-klemp kaldırılması sonrası hemodinamik cevapta myokardiyal disfonksiyon önemli rol oynamaktadır. Myokardiyal disfonksiyonun önemli sebeplerinden biri de iskemik kalan dokulardan salınan myokardiyal depresan faktördür.

Özellikle splanknik ve pankreatik vasküler yatağın iskemik kalması sonucu myokardiyal depresan faktörün salınımını artırarak papiller kas depresyonuna yol açar (199).

1.1.16.8. Endotoksinler, Sitokinler ve Diğer Mediatörler

İnfrarenal aort anevrizmalarının elektif veya acil cerrahisi esnasında eşit seviyelerde permeabilite artışı oluşmaktadır. Bu permeabilite artışı aortik cerrahi sonucu endotoksin konsantrasyonunun artışına bağlıdır (200). Özellikle enterik iskemi periyodlarında intestinal mukozal bariyerin bütünlüğünün bozulması ve enterik floranın ve lipopolisakkaritlerin mezenterik lenf nodlarına ve portal kan sistemine geçmeleri sonucunda splenik vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Bu durum ise Multi Organ Disfonksiyon Sendromu (MODS)'na zemin hazırlamaktadır (201).

1.1.17. Ticagrelor (AZD6140)

Trombositlerde P2Y12 reseptörünün geri dönüşümlü antagonisti olan AZD6140, oral aktif ve sentetik bir preparattır. Yükleme dozu yapılmadan iki saat içerisinde etkisinin başlaması, daha fazla trombositin inhibe etmesi, ilacın

kesilmesinden sonra kısa sürede etkisinin kaybolması diğer antitrombosit ilaçlara göre üstünlükleri arasındadır. Sağlıklı gönüllülerde doza bağlı yapılan faz I çalışmalarında, AZD6140'ın 100 mgr veya 400 mgr oral olarak alındığında emilimi hızlı olup, doğrusal ve doza bağlı bir farmakokinetiğe sahiptir. Tüm trombositlerin inhibisyonuna ilacın alımından iki saat sonra ulaşılmaktadır; 300 ve 400 mgr/gün dozda trombositlerin inhibisyonu başlangıçta %100 olurken, 24 saat sonra %90 olur. Ancak, 100 mgr/gün doz uygulandığında 24 saat içinde etkisinin azaldığı gözlemiştir (4. saatte %99, 12. saatte %89 olurken, 24. saatte %57'ye düşmüştür) (202).

Ticagrelor bir siklopentil-triazolo-pirimidindir (CPTP) ve ilk oral yoldan alınan aktif reversibl P2Y12 reseptör antagonistidir (203). Hem tienopiridinler, hem de CPTP'ler, trombositler üzerindeki iki adenosin difosfat (ADP) reseptöründen biri olan P2Y12 reseptörünü bloke ederek ADP'nin indüklediği trombosit aktivasyonu ve agregasyonunu inhibe etmek suretiyle etki gösterirler (204).

Ticagrelor ve başlıca aktif metaboliti olan AR-C124910XX, P2Y12 reseptörünü benzer güçle inhibe etmektedir (203).

1.1.17.1. Ticagrelorun geliştirilme süreci

Ticagrelor, P2Y12 reseptörünün doğal antagonisti olan adenosin-5'-trifosfatın (ATP) stabil analoglarını oluşturma programının parçası olarak geliştirilmiştir. Bu programda ilk olarak erken Faz II çalışmalarında umut vaat eden, fakat geniş ölçekli çalışmalarda klopidogrele bir üstünlüğü gösterilemeyen kangrelor (205, 206) üretilmiştir. Kangrelorun sınırlılıkları ise kısa yarı ömrü ve plazma endonükleazlarıyla hızla degradasyona uğramasıdır. Kangrelorda majör değişiklikler yapılarak pürin çekirdeği ve şeker grubu değiştirilip, fosfat grupları çıkarılarak stabil bir fosfatsız P2Y12 reseptörü antagonisti olan AR-C109318XX elde edilmiştir (207). Ardından gelen düzeltmelerle biyoyararlanım artırılıp ticagrelor geliştirilmiştir.

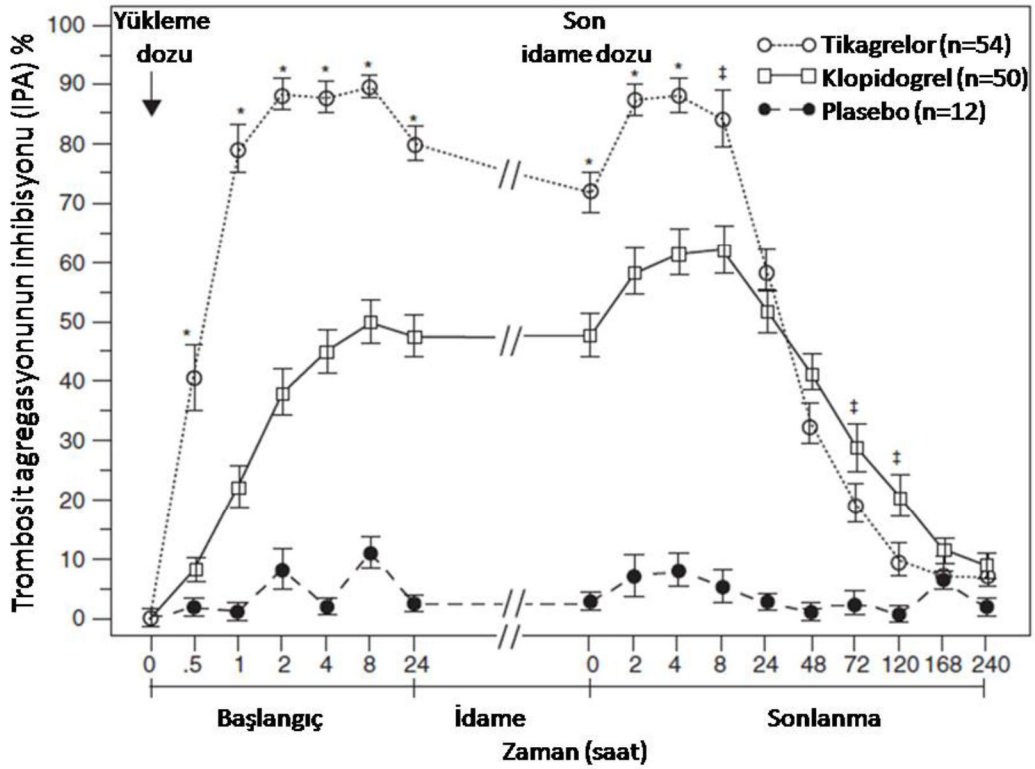
1.1.17.2. Kimyasal özellikler ve reseptör

Ticagrelor P2Y12 reseptörüne ADP'nin bağlandığı yerde farklı bir yerden bağlanarak yapısal bir değişiklik oluşturur ve G proteini aktivasyonunu inhibe eder, böylece sinyal iletimini engelleyerek P2Y12 reseptörünü inaktif hale getirir (208). Oysaki klopidogrel ve prasugrel aktif metaboliti tam tersine P2Y12 reseptörüne

ADP'nin bağlandığı yerden kovalent bağlanarak reseptörü trombositin kalan ömrü boyunca işlevsiz hale getirir.

1.1.17.3. Farmakodinami

Tek bir oral doz halinde verilen ticagrelor dozla ilişkili ve neredeyse tam trombosit agregasyonu inhibisyonu (IPA) sağlar. Maksimum IPA düzeyi bir örneğe ADP ekledikten sonra optik agregasyonla ölçülmekte ve P2Y12 ve P2Y1 reseptörleri üzerindeki etki değerlendirilmektedir. 6 dakika beklendikten sonra ikinci bir ölçüm yapılmakta ve bu son ölçüme asıl olarak P2Y12 reseptörü aracılık etmektedir (202). 50 ila 300 mg arasındaki tek doz çalışmalarında son IPA düzeyi 2 saatte %88-95 arasındadır, 2-8 saat arasında %88-100 düzeyinde plato oluşturmakta ve 12. saatte %74-89'a inmektedir (208, 209). Şekil 20'de ticagrelor ile trombosit inhibisyonunun başlangıcı ve sona ermesi görülmektedir (210).



*p < 0.0001, † p < 0.005, ‡ p < 0.05, klopidoğrelle göre tikagrelor ile.

Şekil 20. Protokol zamanına ve tedavisine göre IPA (son % düzeyi). Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. ONSET/OFFSET çalışması (ticagrelor 90 mg 2x1, 180 mg yüklem dozu) (210).

1.1.17.4. Hedeflenmeyen etkiler

Ticagrelorun aynı zamanda P2Y12 aracılı vazokonstriksiyonu inhibe ettiği düşünülmektedir (208). P2Y12 reseptörleri vasküler düz kaslarda diğer ADP reseptörlerinden daha yaygın olarak bulunmakta ve damar kontraksiyonunu stimüle etmektedir. Kontraksiyon selektif bir reversibl P2Y12 antagonistiyle inhibe edilebilir, fakat klopidogrel ile inhibe edilemez. Klopidogrelin aktif metabolitlerinin yarı ömrünün kısa olmasının ve fizyokimyasal özelliklerinin bu ilaçların damar duvarına girmesini önlediği, ticagrelor gibi sistemik maruziyeti olan ilaçların ise tersine, damar duvarındaki P2Y12 reseptörleriyle etkileştiği varsayılmıştır. ADP aracılı trombosit agregasyonunun tam blokajını sağlayan dozlarda intravenöz ticagrelor ile klopidogrelin karşılaştırıldığı bir köpek tromboz modelinde, ticagrelor tedavisinin daha düşük oranda reoklüzyonla, daha az siklik akım varyasyonu ve infarkt boyutlarında daha fazla azalmayla sonuçlandığı bulunmuş olması; reversibl inhibitörlerin trombosit dışındaki P2Y12 reseptörlerinin inhibisyonu aracılığıyla ek yararlar sağlayabileceğini göstermektedir (211).

Ticagrelor insan eritrositlerinden ATP açığa çıkmasına neden olur, bu da adenezine parçalanır ve aynı zamanda insan eritrositleri tarafından adenezin yakalanmasını inhibe edebilir (208, 212). Buna hücre zarında bulunan bir transport proteini olan ve adenezin gibi nükleozid substratların hücre içine taşınmasından sorumlu olan dengeleyici nükleozid taşıyıcısı 1'in (equilibrative nucleoside transporter 1; ENT1) antagonizması aracılık ediyor olabilir (203, 214). Hayvan çalışmalarında ticagrelorun adenezinle indüklenen ve geçici koroner arter oklüzyonuna verilen reaktif hiperemik yanıttan sorumlu olan koroner kan akımı artışını güçlendirdiği gösterilmiştir (215). Bu mekanizmanın ticagrelorun klinik etkilerinde oynadığı rol henüz tam olarak karakterize edilmemiştir, fakat infarkt boyutunu azaltabilir (216) ve PLATO (Trombosit inhibisyonu ve Hasta Sonuçları) çalışmasında gözlenen bazı yararlı etkilerden sorumlu olabilir (217). Bir fare vasküler hasar modelinde, ticagrelor ile P2Y12 inhibisyonu trombüs oluşumunu azaltmış ve neointimal formasyonu inhibe etmiştir, bu özelliğiyle damar restenozu oranlarını azaltmasına yol açabilir (218).

1.1.17.5. Farmakokinetik

Ticagrelorun farmakokinetiği sağlıklı gönüllülerde (209, 219, 220), akut koroner sendrom (AKS) hastalarında (221), stabil koronar arter hastalığında (KAH) (222), aterosklerozda (16), renal yetersizlikte (219) ve hafif hepatik yetersizlikte (223) incelenmiştir ve aktif metaboliti gibi lineer dozda ve öngörülebilir bir farmakokinetiği olduğu görülmüştür (203).

1.1.17.6. Emilim

Ticagrelor oral yoldan absorbe olur ve 1,5 – 3,0 saatte maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır (219). İlk geçiş metabolizmasına uğrayarak aktif metabolitini oluşturur (AR-C124910XX). Ortalama mutlak biyoyararlanım %36 olarak tahmin edilmektedir (224).

1.1.17.7. Dağılım

Ticagrelor plazma proteinlerine yüksek oranda (>%99,7) bağlanır ve kararlı durumdaki dağılım hacmi 87,5 litredir (224).

1.1.17.8. Metabolizma

Ticagrelor yaygın hepatik metabolizmaya uğrar. Primer olarak sitokrom P450 3A4/5 enzimleriyle metabolize olur ve diğer CYP3A4 substratlarıyla etkileşebilir. Ticagrelor zayıf bir P-glikoprotein inhibitörüdür. AR-C124910XX kanda ticagrelor konsantrasyonunun yaklaşık üçte biri kadar bulunur. Ortalama terminal yarı ömür ticagrelor için yaklaşık olarak 7 - 12 saat ve AR-C124910XX için 8,5 - 10 saattir. Ticagrelorun plazma düzeyleri 2-3 günden sonra kararlı duruma ulaşır (220).

1.1.17.9. Atılım

Hem ticagrelor hem de AR-C124910XX bilier sekresyon yoluyla feçesle büyük miktarda atılırlar (28). İdrarda gözlenen primer bileşenler inaktif metaboliti AR-C133913XX ve onun glukuronid konjugatıdır. Renal yetersizliğin aktif bileşiklere sistemik maruziyet üzerinde küçük bir etkisi vardır ve dozaj ayarlaması gerektirmez (31).

1.1.17.10. Güvenlilik ve tolerabilite

Ticagrelor ile gözlenen majör güvenlilik sorunu kanamadır ve daha önce ele alınmıştır, genel olarak advera etkileri 1x1 klopidogrel ile benzerdir ve iyi tolere edilmektedir (220). Ticagrelorun diğer kayda değer yan etkileri hipotansiyon, ventriküler aralar ve dispnedir.

1.1.17.10.1. Ventriküler aralar

Bu yan etki ilk kez rekürren iskemiye saptamak için holter monitörizasyonunu kullanan DISPERSE-2 çalışması verilerinin post hoc analizi sırasında tanımlanmıştır. 180 mg 2x1 ticagrelor verilen hastalarda ventriküler ara sıklığının arttığı bulunmuştur (34). Semptomatik bradikardi riski belirgin şekilde artmış olan ve pacemakerı olmayan hastalar PLATO çalışmasına dahil edilmemiştir, fakat bir alt çalışmada devamlı elektrokardiyografik değerlendirmeye 2866 hastada bradiaritmi riski değerlendirilmiştir (226). İlk hafta sırasında ticagrelor grubunda >3 sn asemptomatik ventriküler ara sıklığı artmıştır (%5,8'e karşılık 3,6, p = 0.01), fakat 30 gün devam etmemiştir. Bradikardi, senkop, kalp bloğu veya pacemaker takılması insidansında fark yoktur. Araların çoğu SA nod disfonksiyonuna bağlı olduğu ve AKS'nin akut fazında meydana geldiği görülmüştür. Noktürnal araların çoğu ise vagal tonus artışı sırasında SA ve AV nodlarda adenozin artışından ileri gelmiş olabilir (226).

1.1.17.10.2. Dispne

Hafif-orta şiddette dispne riskinin ticagrelor ile arttığı bildirilmiştir (202, 204, 225, 227). Ataklar ağırlıklı olarak kendiliğinden geçen, hafif-orta şiddette olayları ve ilaç nadiren kesilmiştir. PLATO yazarları ticagrelor ile dispne insidansının arttığını (%13,8'e karşılık 7,8, p< 0.001) ve dispne nedeniyle ilacı bırakan hasta oranının daha yüksek olduğunu (%0,9'e karşılık 0,1, p<0.001) bildirmişlerdir. ONSET/OFFSET çalışması prospektif olarak dispne, elektrokardiyografi, ekokardiyografi, serum N-terminal pro-beyin natriüretik peptid ve pulmoner fonksiyon testlerini prospektif olarak değerlendirmiştir. Dispne insidansı daha önce bildirilenden yüksek bulunmuştur ve bu durum semptom farkındalığını artıran çalışma tasarımıyla ilişkili olabilir. Dispne atakları geçici olup kardiyak veya

pulmoner fonksiyonda anlamlı değişiklik saptanmadı. Sağlıklı gönüllülere intravenöz adenozin infüzyonu verilmesinin bronkokonstriksiyonsuz dispneyi indükleyebildiği bilinmektedir (208). Ticagrelor ile adenozin geri alımının inhibe edilmesi dozla ilişkili olarak ekstraselüler adenozin düzeylerinin artmasına yol açabilir ve A1 reseptörlerinin aktivasyonu ile pulmoner vagal C liflerinin uyarılmasına sebep olabilir (228).

1.1.17.11. Kontrendikasyonlar

Ticagrelorun kontrendikasyonlar listesinde aktif patolojik kanama, intrakraniyal hemoraji öyküsü, orta-şiddetli hepatik yetersizlik ve güçlü CYP3A4 inhibitörleriyle (örn. ketokonazol, klaritromisin, nefazodon, ritonavir ve atazanavir) birlikte uygulanma bulunmaktadır (224).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 12/03/2014 tarihli ve 2014/7 sayılı ve 65 nolu etik kurul kararı ile onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Çalışmada, 8-10 haftalık 250±20 gram ağırlığında Sprague Dawley cinsi 21 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar deney öncesi ve deney sırasında standart şartlarda 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı 24-26°C (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda) olacak şekilde 7'şerli gruplar halinde özel kafeslerde bekletildi. Ratların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Tüm ratların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen, Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından (NIH basım no.85-23, 1985 revize edildi), 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz'una uygun olarak yapıldı.

Grup 3 ratlara Ticagrelor (BRILINTA, AstraZeneca) 20 mg/kg dozunda olacak şekilde deneysel iskemi-reperfüzyon uygulanmadan önce 1 hafta süre ile günde sabah ve akşam birer doz olacak şekilde oral gavaj yoluyla verildi.

2.1. Ratların Hazırlanması ve Operasyon Tekniği

Çalışmamızda ratlara 30 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar, Pfizer, Groton, CT) ve 3 mg/kg dozda xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) intramusküler olarak uygulanarak anestezi oluşturuldu. Anestezi süresince ratlar solunum desteğine ihtiyaç duymadan izlendiler. Olabilecek hipotermiyi engellemek için bir ısıtma lambası altında supin pozisyonda operasyon gerçekleştirildi. Cilt aseptik olarak hazırlandı ve batın orta hattın laparotomi yapıldı. Sıvı dengesini korumak amacıyla, 10ml ılık serum fizyolojik peritoneal boşluğa verildi. Bağırsaklar ıslak gaz ile sola çekilerek abdominal aortaya ulaşıldı. Kuyruk veninden intravenöz olarak 150 U/kg heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç San.) ile antikoagülasyon ratlara aortik klemp koyulmadan 2 dk önce uygulandı. Travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp ile infrarenal abdominal aortaya (İAA) klemp konularak ratta alt ekstremitte iskemi modeli oluşturuldu. Klempin distalinde el dopleri ile akımın olmadığı teyit edildi. Isı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için batın insizyonu kapalı olarak tutuldu. Oluşturulan iskemi 2 saat süre ile gözlemlendi, oklüzyon sonrası batın tekrar açılarak infrarenal abdominal aortadaki

mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 2 saat süre ile reperfüzyon sağlandı. Aortik klempleme ile iskemi ve reperfüzyon işlemi, klempleme işlemi sırasında distal aortada akımın kaybolmasının el dopleri ile teyidi, reperfüzyon ise klempin kaldırılması sonrası distal aortada akımın sağlanması el dopleri teyidi ile değerlendirildi. Tüm gruplar deney sonrası anestezisi altında sakrifiye edildikten sonra gerekli kan ve doku örnekleri alındı.

Bu çalışmada kan örnekleri ADMA ve MDA analizleri için düz biyokimya tüpüne GSH için ise EDTA'lı tüplere uygun olacak şekilde alındı. Alınan kanlar oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 5000 g/devirde 10 dakika santrifüj edildi. Rat serum ve plazma örnekleri -20°C derecede çalışılacağı güne kadar derin dondurucuda saklandı. Kas dokusu örneklerinin bir kısmı alüminyum folyoya sarılarak -80°C muhafaza edilirken, diğer kas dokusu örnekleri histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra Hematoksilen-Eozin boyama ile boyanarak histopatolojik olarak incelendi.

2.2. Deney Modeli

Ratlar rastgele seçilerek üç grup oluşturuldu. Her grupta 7 rat (n= 7) olacak şekilde gruplar belirlendi.

Grup 1 Kontrol grubu (n=7): Sham grubu, bazal oksidan ve antioksidan parametrelerin elde edildiği kontrol grubudur. Sakrifiye edilen ratlardan alınan kan ve doku örneklerin biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelendiği grup.

Grup 2 İskemi-reperfüzyon grubu (n =7): Cerrahi yöntemle abdominal aortaya klemp konularak 2 saat iskemi uygulanıp, reperfüzyonun sağlanması amacıyla infrarenal abdominal aortadaki klemp kaldırılarak 2 saat süre ile alt ekstremitelere reperfüzyonu sağlandıktan sonra sakrifiye edilen ratlardan alınacak kan ve doku örneklerin biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelendiği grup.

Grup 3 Ticagrelor verilen ve İskemi-reperfüzyon yapılan grup (n =7): Ticagrelor yapılan çalışmalara göre 20 mg/kg dozunda olacak şekilde ratlara deneysel iskemi yapılmadan 1 hafta süre ile günde sabah ve akşam birer doz olacak şekilde oral gavaj yoluyla verildikten sonra, 2 saat süre ile ratta cerrahi yöntemle infrarenal abdominal aorta klemp konularak alt ekstremitelere iskemisi sağlanmasının ardından klemp açılıp 2 saat süre boyunca alt ekstremitelere reperfüzyonu oluşturulan ratlarda sakrifiye edildikten sonra alınacak kan ve doku örneklerin biyokimyasal ve histopatolojik incelenmesinin yapıldığı grup.

2.3. Histopatolojik Teknikler

Çalışmada alınan kas dokusu örnekleri Elazığ Fırat Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na histopatolojik incelemenin yapılması amacıyla teslim edildi. Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, alınan kas dokusu örneklerinin %10'luk formalin fiksatifinde 24 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Kas dokusu örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutulmuş, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 4'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflandırıldı ve şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatıldı. Hazırlanan tüm preparatlar deney gruplarından habersiz aynı patolog tarafından mikroskopik düzeyde Olympus BX-51 mikroskop ile değerlendirildi ve Olympus DP-71 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

Her örnekte en az iki farklı kesit incelendi ve kas dokusu örneklerini içeren tüm preparatların iskelet kası viabilitesi nekroz, çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılma, ödem ve enflamasyon kriterlerine göre semikantatif olarak skorlandı.

Skorlama sistemi:

(0): Değişiklik yok

(1): Fokal, hafif değişiklikler

(2): Yaygın belirgin değişiklikler

2.4. Biyokimyasal ve Histopatolojik Değerlendirme ve Ölçüm Yöntemleri

2.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır.

Tarihçesi 1906'da Rus botanikçi Twsett'den başlayan sıvı kromatografisi ile ayırma, çözülmüş moleküllerin hareketli sıvı faz ile durgun faz arasında dağılımı ilkesine dayanmaktadır. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ilk olarak 1969 yılında kullanılmaya başlanmış bir sıvı kromatografisi sistemidir. Seçiciliğinin ve duyarlılığının yüksek olması, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan ve sıcaklıkla kolayca bozulabilen maddelerin ayrıştırılmasına uygun olması birçok alanda kullanılmasına olanak sağlamaktadır (229-232).

2.5. Biyokimyasal Analiz

Çalışmada alınan kan örnekleri ADMA ve MDA analizleri için düz biyokimya tüpüne, GSH için ise EDTA'lı tüplere uygun olacak şekilde alındı. Alınan kanlar oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 5 dk 5000 x g/devirde santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Rat serum ve plazma örnekleri -20°C derecede, alınan kas doku örnekleri ise aliminyum folyoya sarılarak -80°C derecede çalışma gününe kadar derin dondurucuda saklandı. ADMA plazmada, MDA serumda GSH tam kanda çalışıldı ve sonuçlar µmol/l olarak ifade edildi.

Çalışma günü -80°C'den çıkarılan doku örneklerinin her biri 100 mg ağırlığında olacak şekilde porsiyonlandı. Doku homojenatları hazırlanarak cihaza enjekte edildi. AMDA, MDA ve GSH doku düzeyleri, pik alanı ölçülerek hesaplandı ve µmol/g olarak ifade edildi.

ADMA, MDA, GSH ölçümleri için Shimadzu marka HPLC Cihazı kullanıldı.

Plazma örneklerinde; ADMA tayini için; EUREKA marka test kitleri, serumda MDA düzeyi ve tam kanda GSH ölçümleri için IMMUCHROM marka test kitleri kullanılarak (Tablo 2) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) yöntemi ile ölçümleri yapıldı.

Tablo 2. ADMA, MDA, GSH ölçümleri için HPLC cihazı ve katalog bilgileri

GSH-TOTAL		GSH-REDÜKTE	
Katalog no: IC1800			
İntra-Assay CV	%1,2	İntra-Assay CV	%1,2
İnter-Assay CV	%2,8	İnter-Assay CV	%3,5
Linearity:	15 mmol/l	Linearity	15 mmol/l
Referans Aralığı:	783-1346 µmol/l	Referans Aralığı	639-1146 µmol/l
GSH-T/GSH-R > %80 Recovery > %96			
Dedektor:	Fluorescence detectör		
Dalga Boyu:	Excitation: 385 nm Emission: 515 nm		
Kolon:	C18		
ADMA için;			
Katalog No:	Z58010		
Kitin ölçüm duyarlılığı:	< 0, 01 µmol/l ADMA		
Linearty	>16, 00 µmol/l		
Plazma referans aralıkları:	< 0.369 µmol/l		
Recovery:	> %98		
Dedektor:	Fluorescence dedector		
Dalga Boyu:	Excitation: 420 nm Emission: 483 nm		
Kolon:	250 mm x 4, 6 mm, 5µ (C18)		
MDA için:			
Katalog No:	IC1900		
İntra-Assay CV	%9		
	%6,4		
İnter-Assay CV:	%10,9		
	%7,5		
Linearty:	50 µmol/l		
Alt limit ölçümü:	0,01 µmol/l		
Recovery:	>%95,7		
Normal Değeri:	< 1 µmol/l		
Ddedektor:	Fluorescence dedector		
Dalga Boyu:	Excitation: 515 nm Emission: 553 nm		
Kolon:	125 mm x 4 mm (C18)		

2.6. İstatistik

2.6.1. Biyokimyasal istatistikler

Bütün değerler; ortalama, standard hata (AO±SH) olarak belirlendi. İstatistiksel analizler ve grafikler sırasıyla; SPSS 21.0 ve Sigma Plot 8.0 programları kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirme, çift yönlü varyans analizi ve ki kare testi kullanılarak yapıldı. Çift yönlü varyans analizinin Post-Hoc hesaplaması için de Tukey's testi kullanıldı. Tüm analizlerde;

$p > 0,05$ gruplar arasında istatistiksel olarak fark yok (anlamsız)

$p < 0,05$ gruplar arasında istatistiksel olarak fark var (anlamlı)

Kan örneklerinden elde edilen ADMA, MDA, GSH değerleri karşılaştırıldı.

2.6.2. Histopatolojik istatistikler

Deney gruplarında histopatolojik incelemede, kas dokuda hücresel nekroz, çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılma, ödem ve enflamasyon histopatolojik özelliklerine göre skorlandı. Tüm veri analizleri SPSS 21.0 ve Sigma Plot 8.0 paket programları ile yapıldı. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edildi.

$p > 0,05$ gruplar arasında istatistiksel olarak fark yok (anlamsız)

$p < 0,05$ gruplar arasında istatistiksel olarak fark var (anlamlı)

Kas doku örnekleri, kontrol grubu, iskemi-reperfüzyon ve ticagrelor grupları kendi aralarında nekroz, çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılma, ödem ve enflamasyon açısından karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

3.1. Kanda ve soleus kasında ADMA, MDA, GSH değerleri

Çalışmamızda ratlardan alınan kan örneklerinden elde edilen ADMA, MDA, GSH değerleri ile yapılan istatistiksel analize göre;

Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) için; Kontrol grubu ADMA değerleri ($0,29 \pm 0,026 \mu\text{mol/l}$) olup, I-R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ADMA değerlerinin ($0,64 \pm 0,058 \mu\text{mol/l}$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($P=0,001$). Ticagrelor grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise ticagrelor grubunda ADMA düzeylerinin ($0,42 \pm 0,039 \mu\text{mol/l}$) artmış olduğu ancak bu artışın I-R grubunda meydana gelen artıştan daha az oranda bir artışa yol açtığı ve kontrol grubuna göre ticagrelor grubunda anlamlı bir artışa neden olmadığı tespit edildi ($p=0,08$).

Malondialdehit (MDA) için; Kontrol grubu MDA değerleri ($0,57 \pm 0,043 \mu\text{mol/l}$) olup, I-R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MDA değerlerinin ($1,48 \pm 0,114 \mu\text{mol/l}$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($P=0,001$). Ticagrelor grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, ticagrelor grubunda MDA düzeylerinin ($0,82 \pm 0,053 \mu\text{mol/l}$) benzer şekilde arttığı ancak bu artışın I-R grubunda meydana gelen artıştan daha az bir artışa yol açtığı ve kontrol grubuna göre ticagrelor grubunda anlamlı bir artışın olmadığı tespit edildi ($p=0,09$).

Total Glutasyon (GSH-T) için; Kontrol grubu GSH-T ($1003,85 \pm 61,283 \mu\text{mol/l}$) olarak saptandı. I-R grubunda GSH-T düzeyi ise ($1468,85 \pm 47,515 \mu\text{mol/l}$) olup istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu görüldü ($p=0,001$). Benzer şekilde Ticagrelor grubunda GSH-T seviyesi ($1263,57 \pm 47,818 \mu\text{mol/l}$), I-R grubuna göre anlamlı düzeyde düşmektedir. ($p=0,03$). Ancak bu düşüşün kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hala anlamlı düzeyde olduğu tespit edildi ($p=0,007$).

Redükte Glutasyon (GSH-R) için; Kontrol grubu GSH-R ($1183,00 \pm 43,127 \mu\text{mol/l}$) olarak saptandı. I-R grubunda GSH-R düzeyi ise ($1757,14 \pm 45,862 \mu\text{mol/l}$) olup istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu görüldü ($p=0,001$). Ticagrelor grubunda ise GSH-R seviyesi ($1377,85 \pm 23,193 \mu\text{mol/l}$), I-R grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olmasına rağmen

(p=0,001), yine de kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi (p=0,006).

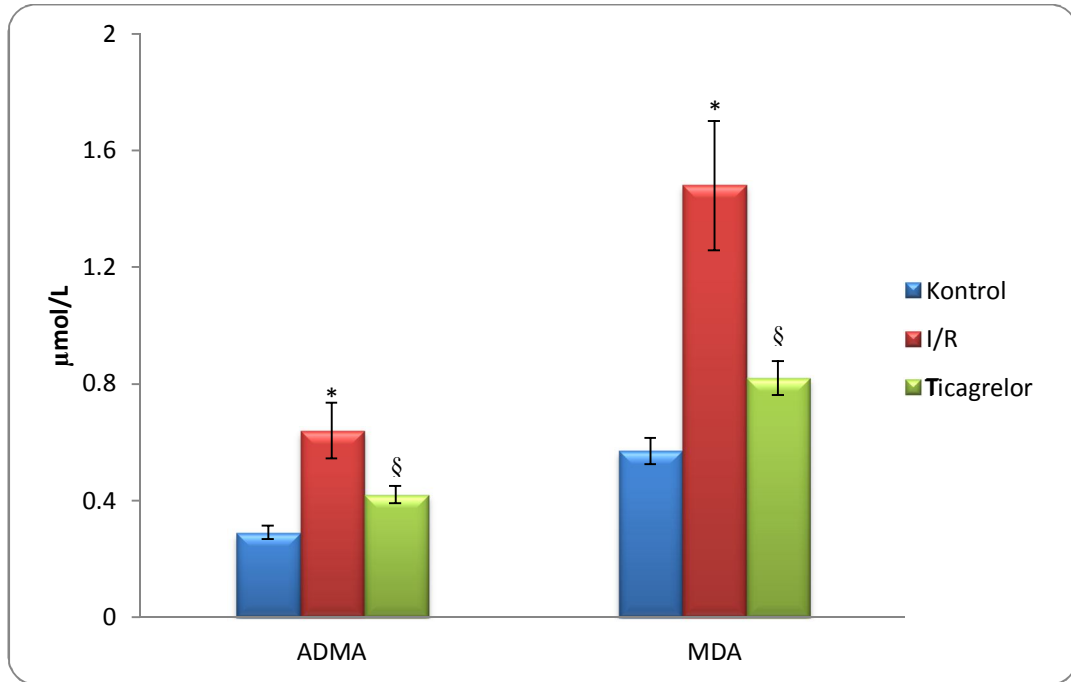
Rat kan örneklerinden elde edilen ADMA, MDA, GSH düzeyleri Tablo 3, Şekil 21 ve 22’de görülmektedir.

Tablo 3. Rat kan örneklerinde ADMA, MDA, GSH değerleri

	Kontrol Grubu (n=7)	I-R Grubu (n=7)	Ticagrelor Grubu (n=7)
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	0,29 \pm 0,026	0,64 \pm 0,058 (*) (p=0,001)	0,42 \pm 0,039(+) (p=0,007)
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	0,57 \pm 0,044	1,48 \pm 0,114 (*) (p=0,001)	0,82 \pm 0,053(+) (p=0,001)
GSH-T ($\mu\text{mol/l}$)	1003,85 \pm 61,288	1468,85 \pm 47,515 (*) (p=0,001)	1263,57 \pm 47,818 (+,*) (p=0,033,p=0,007)
GSH-R ($\mu\text{mol/l}$)	1183,00 \pm 43,127	1757,14 \pm 45,862 (*) (p=0,001)	1377,85 \pm 23,193 (+,*) (p=0,001, p=0,006)

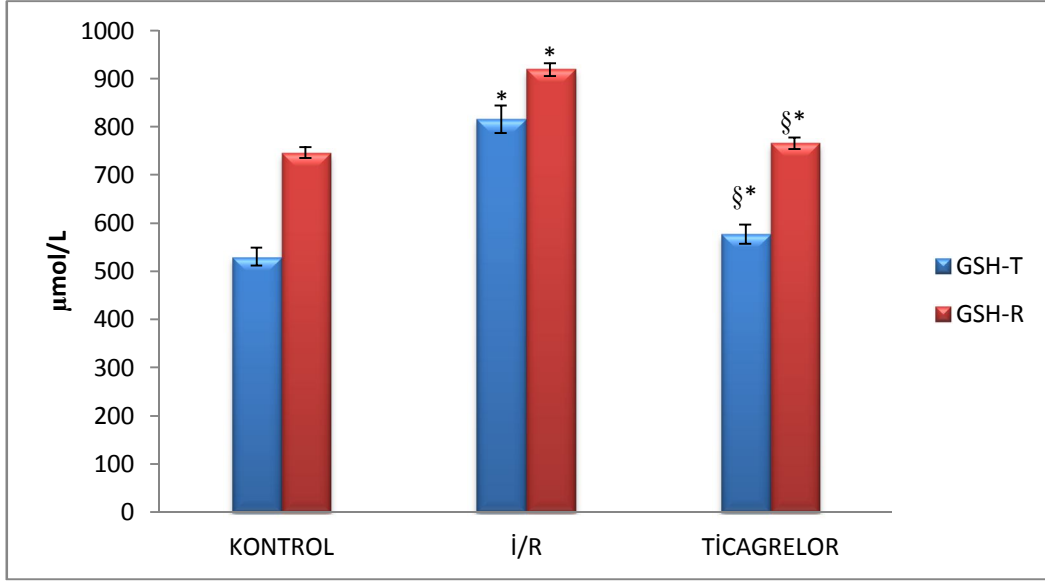
(*): p<0,05 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış

(+): p<0,05 I-R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düşüş



*: p<0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı artış, §: p<0,05 I-R grubuna göre anlamlı düşüş

Şekil 21. Kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında kanda ADMA ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması.



*: $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre anlamlı artış, §: $p < 0,05$ I-R grubuna göre anlamlı düşüş.

Şekil 22. Kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında kanda GSH-T ve GSH-R düzeylerinin karşılaştırılması.

Soleus kas dokusu ADMA, MDA, GSH değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre;

Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) için; Kontrol grubu ADMA değerleri ($0,08 \pm 0,078 \mu\text{mol/g}$) olup, I-R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ADMA değerlerinin ($0,40 \pm 0,044 \mu\text{mol/g}$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($P=0,001$). Ticagrelor grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise ticagrelor grubunda ADMA düzeylerinin ($0,08 \pm 0,051 \mu\text{mol/g}$) kontrol grubuyla benzer şekilde olduğu saptandı ($p=0,99$).

Malondialdehit (MDA) için; Kontrol grubu MDA değerleri ($0,33 \pm 0,098 \mu\text{mol/g}$) olup, I-R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MDA değerlerinin ($0,85 \pm 0,112 \mu\text{mol/g}$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($P=0,001$). Ticagrelor grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise ticagrelor grubunda MDA düzeylerinin ($0,42 \pm 0,119 \mu\text{mol/g}$) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışın olmadığı görüldü ($p=0,2$).

Total Glutasyon (GSH-T) için; Kontrol grubu GSH-T değeri ($530,14 \pm 131,117 \mu\text{mol/g}$) olarak saptandı. I-R grubunda GSH-T düzeyi ise ($815,71 \pm 47,908 \mu\text{mol/g}$) olup istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu görüldü ($p=0,001$). Ticagrelor grubunda ise GSH-T seviyesi

(577,14±102,910µmol/g), I-R grubuna göre anlamlı düzeyde düşmüş olmasına rağmen (p=0,001), kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışın olmadığı tespit edildi (p=0,6).

Redükte Glutasyon (GSH-R) için; Kontrol grubu GSH-R değeri (746,00±166,564µmol/g) olarak saptandı. I-R grubunda GSH-R düzeyi ise (918,57±76,478µmol/g) olup istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu görüldü (p=0,001). Ticagrelor grubunda ise GSH-R seviyesi (765,71±49,280µmol/g), I-R grubuna göre anlamlı düzeyde düşmüş olmasına rağmen (p=0,001), kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışın olmadığı saptandı (p=0,94).

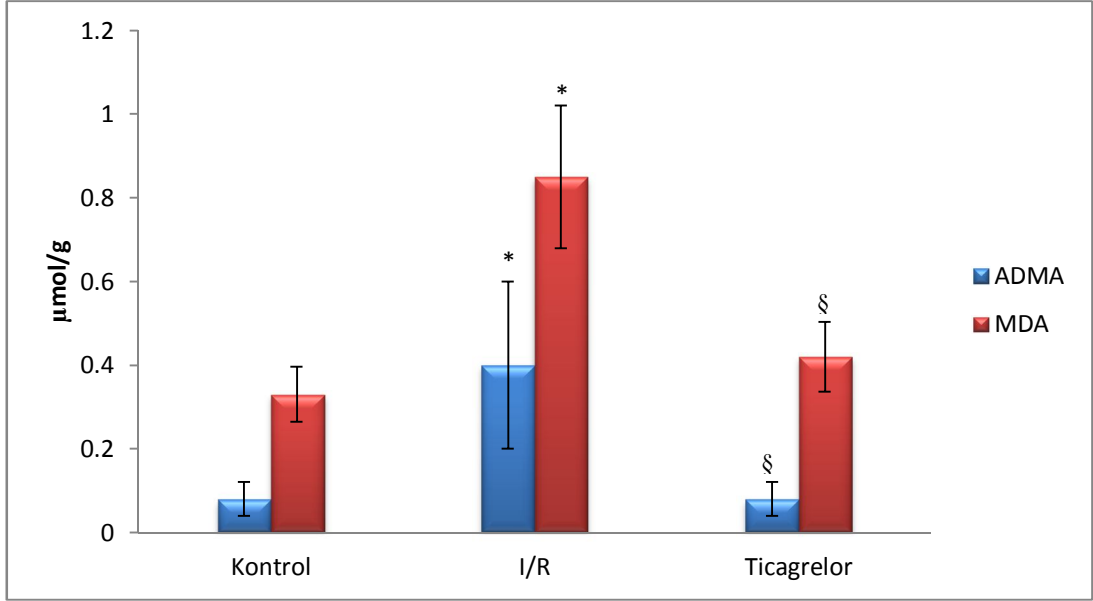
Rat kas dokusundan elde edilen ADMA, MDA, GSH değerleri Tablo 4' te, Şekil 23 ve 24'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Rat kas dokusu örneklerinde ADMA, MDA, GSH değerleri

	Kontrol Grubu (n=7)	I-R Grubu (n=7)	Ticagrelor Grubu (n=7)
ADMA (µmol/g)	0,08±0,078	0,40±0,044(*) (p=0,001)	0,08±0,051(+) (p=0,001)
MDA (µmol/g)	0,33±0,098	0,85±0,112 (*) (p=0,001)	0,42± 0,119(+) (p=0,001)
GSH-T (µmol/g)	530,14±131,117	815,71±47,908(*) (p=0,001)	577,14±102,910(+) (p=0,001)
GSH-R (µmol/g)	746,00± 166,564	918,57±76,478 (*) (p=0,02)	765,71±49,280(+) (p=0,04)

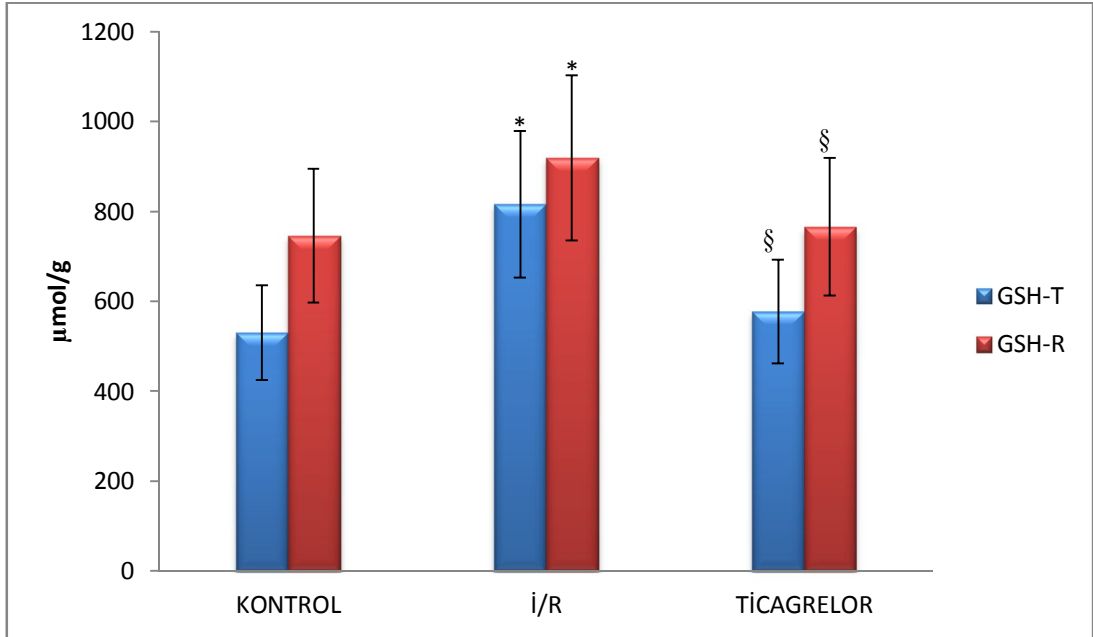
(*): p<0,05 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış

(+): p<0,05 I-R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düşüş



* : $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre anlamlı artış § : $p < 0,05$ I-R grubuna göre anlamlı düşüş

Şekil 23. Rat kas dokusu örneklerinde kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında ADMA ve MDA düzeyleri.



* : $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre anlamlı artış, § : $p < 0,05$ I-R grubuna göre anlamlı düşüş

Şekil 24. Rat kas dokusu örneklerinde kontrol, I-R ve ticagrelor gruplarında GSH-T ve GSH-R düzeylerinin karşılaştırılması

Histopatolojik değerlendirme sonuçları ile soleus kas dokusunda hasar skorlaması ve histopatolojik istatistiksel veriler sırası ile Tablo 5 ve Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. Soleus kas dokusundaki hasar skorlaması

Kontrol grubu	Nekroz	Çizgilenme kaybı	Kas liflerinde ayrılma	Ödem	Enflamasyon
K1	0	0	0	0	0
K2	0	0	0	0	0
K3	0	0	0	0	0
K4	0	0	0	0	0
K5	0	0	0	0	0
K6	0	0	0	1	0
K7	0	0	0	0	0
İ/R Grubu					
I/R1	0	2	2	1	0
I/R2	0	1	1	2	0
I/R3	0	2	2	1	1
I/R4	0	1	2	1	0
I/R5	0	1	1	2	0
I/R6	0	2	1	2	0
I/R7	0	2	2	1	0
Ticagrelor Grubu					
T1	0	1	1	1	0
T2	0	1	0	1	0
T3	0	1	1	0	0
T4	0	1	0	1	0
T5	0	1	1	0	0
T6	0	0	1	1	0
T7	0	0	0	0	0

Soleus kas dokusundaki hasar skorlaması; 0 = Değişiklik yok, 1=Hafif Değişiklik, 2=Yaygın Değişiklik

Histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre; nekroz hiçbir grupta gözlenmemiştir.

Çizgilenme kaybı için yapılan istatistiksel analizde; kontrol grubunda çizgilenme kaybı olmadığı, I-R grubunda (1,57±0,530) kas dokusunda çizgilenme kaybında anlamlı derecede artışın olduğu görüldü (p=0,001). Kontrol grubu ile

ticagrelor grubu ($0,71\pm 0,480$) karşılaştırıldığında ise kas dokusunda çizgilenme kaybında istatistiksel olarak benzer şekilde anlamlı artışın olduğu ($p=0,007$) ancak bu artışın I-R grubunda olan artışa göre ticagrelor grubunda oldukça düşük olduğu saptanmakla birlikte anlamlı olduğu görüldü ($p=0,01$).

Kas liflerinde ayrılma için yapılan istatistiksel analizde; kontrol grubunda kas liflerinde ayrılma olmadığı tespit edildi. I-R grubunda ($1,57\pm 0,530$) ise kas liflerinde ayrılma olduğu bu kas liflerinde ayrılmanın istatistiksel olarak anlamlı derecede önemli olduğu görüldü ($p=0,001$). Kontrol grubu ile ticagrelor grubu ($0,57\pm 0,530$) karşılaştırıldığında kas liflerinde ayrılmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu görüldü ($p=0,023$). Ticagrelor grubundaki bu artışın I-R grubundaki artışa göre oldukça düşük olduğu görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,01$).

Ödem için yapılan istatistiksel analizde; kontrol grubunda ödeme rastlanmadı. I-R grubunda ($1,42\pm 0,530$) ödem açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede artışın olduğu görüldü ($p=0,002$). Kontrol grubu ile ticagrelor grubu ($0,71\pm 0,480$) karşılaştırıldığında ödem açısından istatistiksel olarak benzer şekilde anlamlı artışın olduğu ($p=0,037$) ancak bu artışın I-R grubundaki artışa göre ticagrelor grubunda oldukça düşük olmakla birlikte anlamlı olduğu görüldü ($p=0,03$).

Enflamasyonun her üç grupta da belirgin olmadığı görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($p>0,05$).

Tablo 6. Rat kas dokusunun histopatolojik incelenmesinde elde edilen veriler

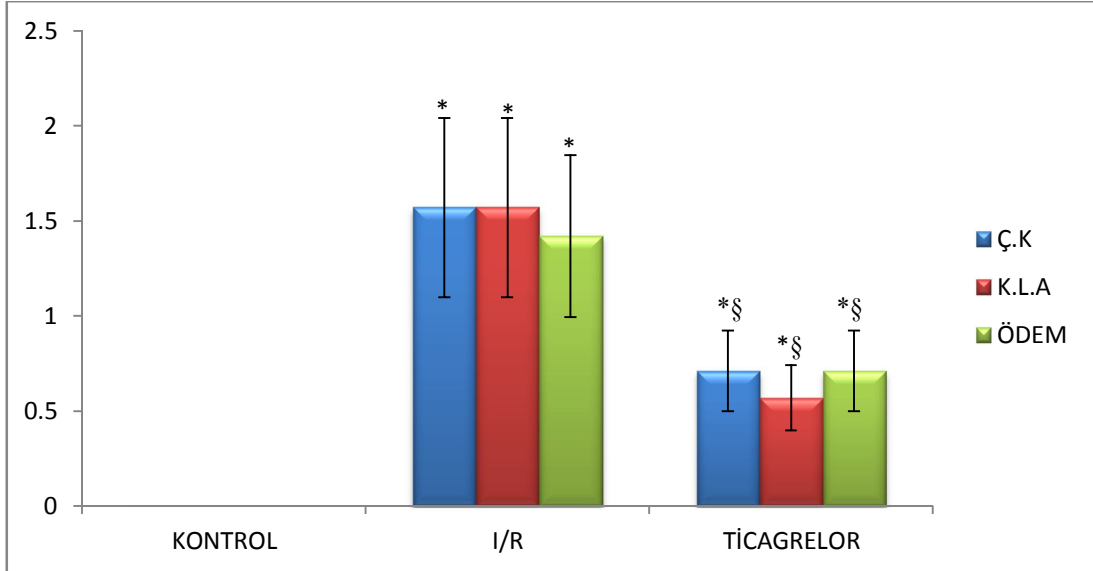
	Kontrol Grubu (n=7)	I-R Grubu (n=7)	Ticagrelor Grubu (n=7)
Nekroz	0,00	0,00	0,00
Çizgilenme Kaybı	0,00	$1,57\pm 0,53(*)$ ($p=0,001$)	$0,71\pm 0,48(*,+)$ ($p=0,007,p=0,01$)
KasLiflerinde Ayrılma	0,00	$1,57\pm 0,53(*)$ ($p=0,001$)	$0,57\pm 0,53(*,+)$ ($p=0,023,p=0,01$)
Ödem	0,00	$1,42\pm 0,53(*)$ ($p=0,002$)	$0,71\pm 0,48(*,+)$ ($p=0,037,p=0,03$)
Enflamasyon	0,00	$0,14\pm 0,37$	0,00

(*): $p<0,05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış

(+): $p<0,05$ I-R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalma

Çalışmaya alınan rat soleus kası doku örneklerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde; çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılma ve ödem bakımından kontrol grubuna göre iskemi-reperfüzyon grubu ve ticagrelor gruplarında belirgin

derecede artış olduğu saptandı. Ancak bu artışların iskemi-reperfüzyon öncesi ticagrelor uygulanan ratlarda, ticagrelor uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede azalmış olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 25).



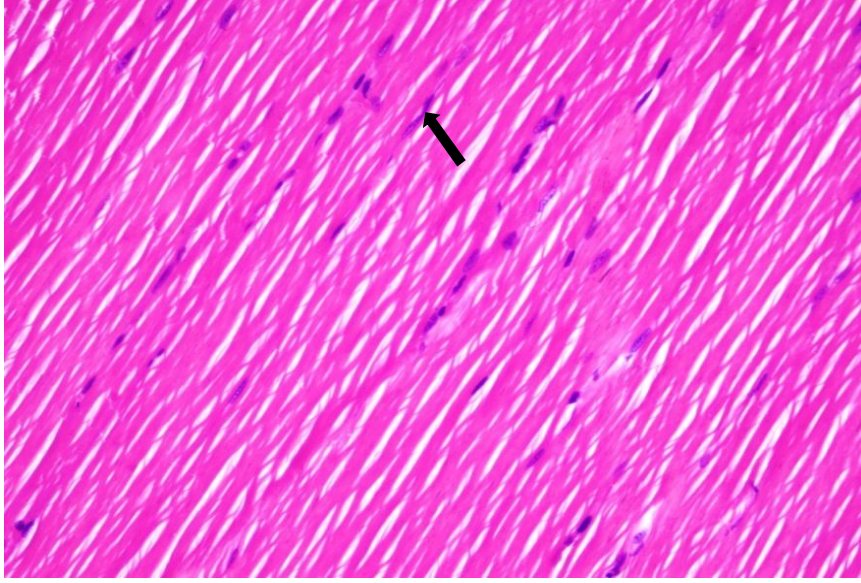
Ç.K: Çizgilenme Kaybı, K.L.A: Kas Liflerinde Ayrılma

* : $p<0,05$ Kontrol grubuna göre anlamlı artış §: $p<0,05$ I-R grubuna göre anlamlı azalma

Şekil 25. Rat kas dokusunun histopatolojik incelenmesinde çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılma ve ödem yönünden değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

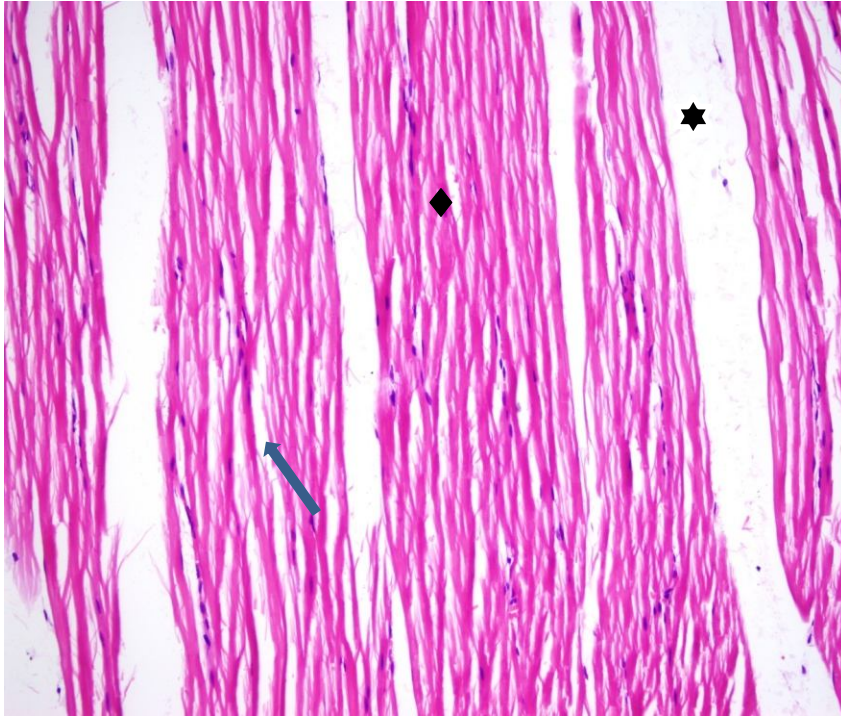
3.2. Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızda rat kas dokularından hazırlanan preparatların Olympus BX-51 ışık mikroskobu ile değerlendirilmesi ve elde edilen görüntülerin Olympus DP-71 digital kamera ile fotoğraflanması (Şekil 26-29)' da gösterilmektedir.



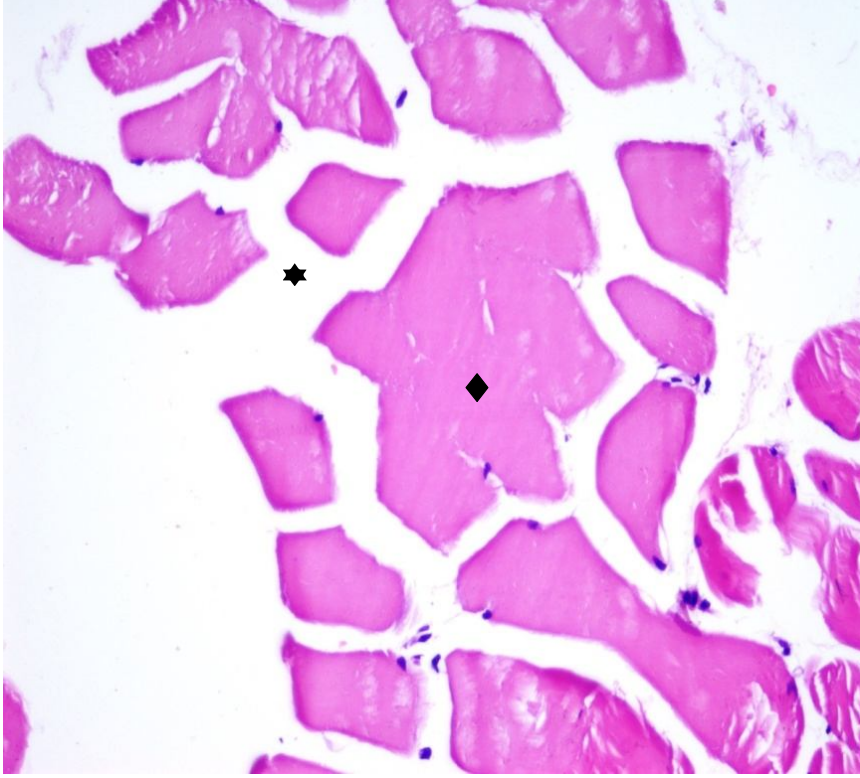
→: Periferik yerleşimli oval nukleuslar

Şekil 26. Normal soleus kası ışık mikroskopik görünümü. İğsi iskelet kası hücreleri ile periferik yerleşimli oval nukleuslar (HE, X400).



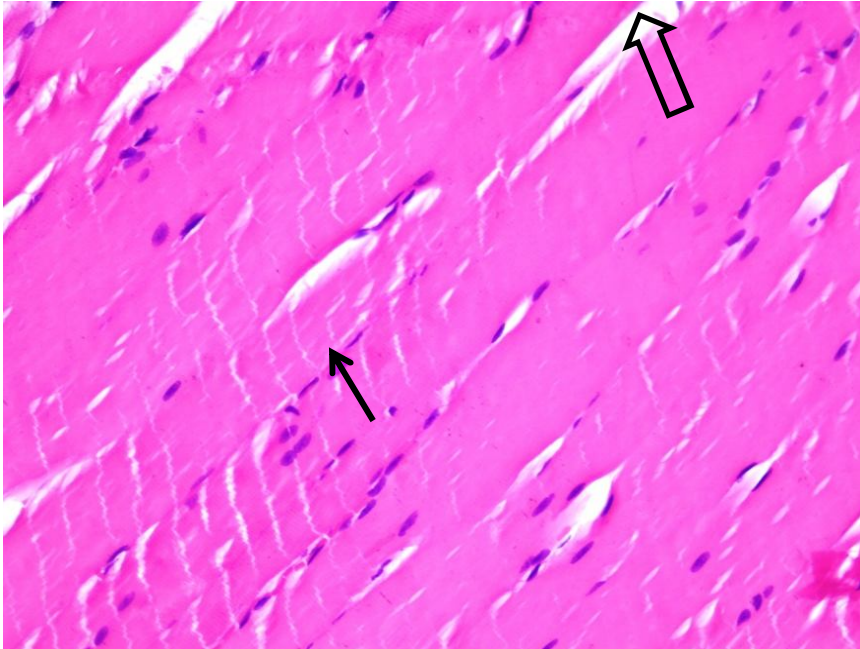
→ Kas liflerinde ayrılma, *: Ödem ◆: Çizgilenme kaybı

Şekil 27. İskemi-Reperfüzyon grubunda; ödem, çizgilenme kaybı ve kas liflerinde ayrılma. (HE, X400)



*: Ödem ◆: Çizgilenme kaybı

Şekil 28. İskemi-Reperfüzyon; grubu çizgilenme kaybı ve ödem (HE, X200)



→: mevcut çizgilenme, ⇒: ödemde azalma

Şekil 29. Ticagrelor grubu; ödem ve kas liflerinde ayrılmada azalma ve çizgilenmeler (HE, X400)

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, rat alt ekstremitesinde iskemi-reperfüzyon modeli oluşturularak, reperfüzyon öncesi yeni bir antiplatelet ajan olan trombosit P2Y12 antagonisti ticagrelor uygulanan ratlarda iskelet kası viabilitesi üzerine ve ADMA, MDA, GSH seviyelerine etkileri araştırılmıştır.

İskemi-reperfüzyon sendromunun neden olduğu lokal ve sistemik etkiler vasküler cerrahide karşımıza çıkmakta, ameliyat sonrası morbidite ve mortaliteyi etkilemektedir. Akciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistem iskemi reperfüzyon hasarının geliştiği bilinen dokulardır (189).

Alt ekstremitelerde akut iskemi-reperfüzyon hasarı özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici süre kros-klemp uygulamalarında, tek ya da çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında meydana gelmektedir. Abdominal aort cerrahisi sırasında iskemik kalan ekstremitede lokal doku hasarı, iskemik alanın dışındaki bölgelerde de uzak doku ve organ hasarı oluşturabilir. Lokal etkiler klemp distalinde damarlarda ve kas dokusunda görülürken, sistemik etkiler başlıca akciğer, böbrek, beyin, kalpde görülür. Özellikle infrarenal abdominal aortaya kros-klemp yerleştirilmesi sonrası oluşan alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarında böbrekler hedef organ konumundadır ve bu durum klinik olarak önem arz etmektedir (233, 234).

Periferik alt ekstremitte hastalıklarının en sık rastlanılan sonucu akut veya kronik süreçte periferik arterlerin tıkanması ve buna bağlı olarak ekstremitte perfüzyonunun bozulmasıdır. Klinikte abdominal aort anevrizması, Leriche sendromu ve aortoiliak hastalıklarda infrarenal aortaya klemp konulmakta ve anastomozlar tamamlanana kadar alt ekstremitte iskemik kalmakta ve aortik klempin kaldırılması ile iskemik dokuların reperfüzyonu gerçekleşmektedir. Deneysel araştırmalar için ekstremitte iskemisinin oluşturulmasında çok sayıda model geliştirilmiştir. Bunlardan biri aortaya klemp konulmasıdır. Özellikle hemodinamik izlemin yapılacağı ve iskemi reperfüzyonun sistemik etkilerinin araştırılacağı durumlarda sıklıkla uygulanır (235, 236). İnfarenal abdominal aortaya klemp konularak model oluşturulması klinikte özellikle aortoiliak girişimlere uygun deneysel bir sıçan çalışma modelidir. Kiriş ve ark. (237) infrarenal aortik iskemi

reperfüzyon modelinde renal hasarı araştırmışlar 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon ile oklüzyonun proksimalindeki uzak organlarda IR hasarının olduğunu, MDA düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerinin artışının tespiti ile göstermişlerdir.

Rat alt ekstremite iskemi-reperfüzyon modelinde, ticagrelorun iskelet kası viabilitesi ve ADMA, MDA, GSH düzeylerine etkilerinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada, iskemi oluşturmak amacıyla mikrovasküler klemp yardımı ile infrarenal abdominal aortaya klemp konarak vasküler oklüzyon oluşturma yöntemi kullanılmıştır (22, 25, 84, 85, 238, 239). Her ne kadar noninvaziv ve kolay uygulanabilir oluşu nedeniyle turnike yöntemi savunan yazarlar olsada (240, 241, 242), uzamış mekanik kompresyon sonucu venöz ve lenfatik oklüzyon, kas ve sinir zedelenmesine neden olabileceği ve net bir iskemi tablosu oluşturamamasından dolayı bu çalışmada turnike yöntemi tercih edilmemiştir.

Çalışmamızda; kolay temin edilebilmesi, deneysel iskemi-reperfüzyon hasarının araştırıldığı çalışmalarda daha çok rat kullanılmış olması, iskelet kasının ratlarda iskemi-reperfüzyon hasarına verdiği yanıtın iyi bilinmesi, bu çalışmalarda yer alan araştırmacıların ratlarla daha çok deneyiminin bulunması ve östrojenin kardiyovasküler sistem üzerine koruyucu etkilerinin olması nedeniyle deney hayvanı olarak S.Dawley cinsi erkek ratlar kullanıldı (25, 238-245).

Reperfüzyon hasarını azaltmak için çeşitli farmakolojik ve terapötik stratejiler üzerinde çalışmalar halen sürmektedir.

Oksidatif stres durumunda serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar arasındaki denge serbest radikaller lehine bozulur (246). Serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemede tiklopidin, askorbik asit, mannitol, süperoksit dismutaz, allopürinol, gibi bazı maddeler denenmiş ve deneysel iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede etkili oldukları gösterilmiştir (247).

Enkaya ve ark. (247)'nin, ratlar ile yaptıkları çalışmada; ilaç grubunda bulunan ratlara, deney gününden önce olmak üzere beş gün süre ile 50 mg/gün ticlopidin (antitrombositer ajan), orogastrik tüp aracılığı ile günde iki kez verilerek ön koşullama oluşturulmuştur. Çalışmada ratların sağ alt ekstremiteleri kalça eklemi hizasından turnike ile sıkılarak bir grupta sadece 4 saatlik iskemi, diğer gruplarda ise 4 saatlik iskeminin ardından 2 saatlik reperfüzyon uygulanmıştır. Çalışmanın

sonucunda Enkaya ve ark. (247) alt ekstremitelerin 4 saatlik iskemi süresinin ardından yapılan iki saatlik reperfüzyonu ile uzak organ hasarı oluşturduğunu ve antitrombosit ajan olan tiklopidinin bunu engellediğini bulmuşlardır.

Siemionov ve ark. (2) farklı iskemi zamanlarında, vücutta oluşan superoksit radikali miktarını sitokrom c-bazlı biyosensör vasıtasıyla ölçmüşler ve superoksit radikalının en yüksek değerlerine iki saatlik iskemi sonrası ulaştığını, iskemi-reperfüzyon sürelerinin arttırılmasının oluşan doku hasarını arttırdığını göstermişlerdir.

Literatürlerin değerlendirilmesinde, iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarının oluşması için farklı iskemi ve reperfüzyon sürelerinin tercih edilmiş olması dikkat çekicidir. Bu çalışmalarda, iskemi süresinin, etkilenmesi beklenen organların iskemiye dayanıklılığı temel alınarak belirlendiği görülmüştür. Örneğin, kas dokusunda belirgin morfolojik değişikliklerin 2 saatlik iskemiden sonra oluşmaya başlaması sebebiyle, iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarının değerlendirildiği çalışmalarda çoğunlukla daha uzun iskemi süreleri kullanılmıştır. İskemi süreleri ile iskemik hasarlanma arasında önemli bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. İskemi-reperfüzyon hasarının hedef dokusu olarak iskelet kasının seçildiği çalışmalarda, 4 saatlik iskemik dönemden sonra kas dokuda geri dönüşümsüz histolojik hasarlanmanın meydana geldiği ve yaygın nötrofil birikiminin olduğu; 4 saatlik iskemi süresi ile 6 saatlik iskemi süresinde oluşan hasar bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadığı ve 8 saatlik iskemi süresinde geri dönüşümsüz hasarlanmanın tam olduğu gözlemlenmiştir. Bu veriler ışığında çalışmamızda iskemi süresinin 2 saat, reperfüzyon süresinin 2 saat olması planlanmıştır (85, 231, 233).

İskemi-reperfüzyon hasarı, hipotermi ile azaltılabilmektedir. Hipotermide, metabolizma hızının yavaşlaması nedeniyle, daha az serbest oksijen radikali oluşumu, dolayısıyla da daha az doku yıkımı olmaktadır. Bununla birlikte bu çalışmada kullanılan ticagrelorun iskemi-reperfüzyon hasarına olan etkilerinin daha anlaşılır olması ve iskemi-reperfüzyon hasarını azaltacak ya da artıracak faktörlerin çalışma dışında bırakılması amacıyla çalışma oda sıcaklığında yapılmıştır (233).

Bu çalışmada ticagrelorun, oksidatif etkinliği olan antiagregan ve sitoprotektif etkileri düşünülerek iskelet kasındaki I-R'a bağlı hasarın önlenmesinde,

ADMA ve MDA seviyelerini azaltmada, GSH seviyelerini artırmada faydalı olabileceği düşünöldü (249, 250).

Asimetrik dimetil arjinin, nükleoproteinlerde bulunan arjinin rezidülerine, protein arjinin metil transferaz (PRMT) enzimi tarafından metil gruplarının sentez sonrası düzenlemeyle eklenmesi ve bu proteinlerin yıkılması sonucunda meydana gelen ve önemi giderek artan bir metillenmiş arjinin türevidir (103).

Vücutta oksidatif stresin arttığı durumlarda ADMA düzeylerinde artış meydana gelir. Oksidan/antioksidan sistem ile ADMA arasında yakın ilişkiyi gösteren çalışmaların sayısı giderek artmaktadır.

Vücutta oksidatif stresin arttığı durumlarda ADMA düzeylerinde artış meydana gelir. ADMA düzeylerinde olan bu artış DDAH enzim aktivitesinde azalmaya bağılı olabilir. Aktivitenin azalmasında DDAH'ın aktif bölgesinde bulunan sistenin yükseltgenmesi önemlidir. Bu yükseltgenme NO tarafından gerçekleşebilmekte ve böylece aktivitesi geri dönüşümlü olarak azaltılabilmektedir (107, 251). İndüklenebilir NOS (iNOS) aktivitesi inflamasyonda çok artar ve NO çok fazla miktarda üretilir. Üretilen NO süperoksit (O₂⁻) radikalleriyle birleşip peroksinitrite (ONOO⁻) dönüşür ve NO'nun yarılanma ömrünü azaltır (8). Peroksinitrit oluşumu süperoksit dismutazın (SOD) süperoksit radikallerini yakalamasından daha hızlı gelişmektedir. Peroksinitrit DDAH'ın aktif bölgesine bağlanarak aktivitesini azaltır, böylece ADMA miktarında artışa ve NO düzeylerinde azalmaya yol açar. Oksidatif stres ADMA yapımında rol alan enzimlerin aktivitelerini değiştirerek ADMA miktarlarında değişime yol açmaktadır. PRMT aktivitesi reaktif oksijen türleriyle artırılır ve ADMA düzeyleri artar (124, 251)

Asimetrik dimetil arjinin, NOS aktivitesini inhibe ettiğinden NO düzeylerinde bir azalmaya yol açmakta, bunun sonucu olarak da endotel fonksiyon bozuklukları gelişmektedir.

Malondialdehit, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. Doku I-R hasarında, ksantin oksidaz enzimi, mitokondriyal oksidasyon, siklooksijenaz aracılı doymamış yağ asidi oksidasyonu, katekolamin oksidasyonu, sitokrom p 450 aracılı oksidasyon, lökosit NADPH oksidaz aktivasyonu, demir salınımı ve redoks siklusu lokal ve sistemik serbest oksijen radikal oluşumuna katkıda bulunur. Bununla birlikte her doku için baskın sistem

farklıdır. Artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidroksil radikali), hücre zarı fosfolipidlerinin (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri) peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve arşidonik asit/lipid peroksil salınımına neden olur. Bu süreçte, zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (61). Dolayısıyla, bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif oksijen türevleri ve membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir. Mevcut çalışmada kontrol grubuna göre hem I-R grubunda hem de ticagrelor grubunda ADMA ve MDA seviyelerinde artış olmakla birlikte ticagrelor verilmesinin bu artışı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi.

Glutasyon, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde γ -glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerde sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutarak grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH, eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (252). Bu çalışmada, GSH düzeyleri, I-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı. Ticagrelor grubunda ise GSH değerleri kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen I-R grubuna göre daha az oranda artış göstermekteydi.

Grupların histopatolojik olarak değerlendirilmesinde, soleus kası kontrol, I-R, ticagrelor gruplarında histopatolojik olarak çizgilenme kaybı, kas liflerinde ayrılmada artış ve ödem bakımından anlamlı değişiklik olduğu gösterilmiştir. Bu hasar ticagrelor grubunda, I-R grubuna göre kıyaslandığında daha az, kontrol grubuna göre kıyaslandığında ise daha fazla oranda olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda deneysel infrarenal aortik iskemi reperfüzyon modelinde oluşan iskelet kası hasarına ve oksidan olan ADMA, MDA ve antioksidan olan GSH düzeylerine karşı ticagrelorun etkinliği araştırıldı. Ticagrelorun hem iskelet kası hasarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı hem de kan ve kas dokuda

ADMA ve MDA düzeylerinin I-R grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu görüldü. Ticagrelor uygulanan grupta bu artışın daha az düzeyde olduğu, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı tespit edildi. Antioksidan karakterde olan GSH düzeylerinde ise kanda I-R grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu ancak ticagrelor grubunda, I-R grubuna göre anlamlı düzeyde azalma olmasına rağmen kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış olduğu görüldü. Kas dokusu GSH düzeyleri ise I-R grubunda istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. Ticagrelor grubunda ise, I-R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş olmasına rağmen, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışın olmadığı tespit edildi. GSH'nin ticagrelor grubunda I-R grubuna göre daha az yükselmiş olması ticagrelorun oksidan hasarı azaltmaya yardımcı olduğu ve bu nedenle cevaben antioksidan olan GSH düzeyinde I-R'de olduğu kadar fazla yükseltmediği şeklinde yorumlanabilir. Ticagrelorun iskemi-reperfüzyon hasarını azaltma potansiyelinin bilimsel olarak saptanması için daha kapsamlı çalışmalar neticesinde klinik ajan olarak iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olabileceği ve kullanımda tedavi stratejileri arasında yer alabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; iskemi-reperfüzyon hasarı mekanizmasının tam olarak anlaşılması, hasarın çabuk ve en uygun bir şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Çalışmamızın sonucunda ticagrelorun alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında oksidan düzeyini ve iskelet kası hasarını azalttığı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ortaya çıkmıştır. Bunun yanında bu yararlı etkinin hangi mekanizmalar aracılığı ile oluştuğunu tam olarak aydınlatılabilmek için yeni ve daha kapsamlı deneysel çalışmalara gereksinim vardır. Bu konuda yapılacak daha geniş ölçekli çalışmaların sonuçları bu çalışmamızı desteklemesi durumunda, günlük klinik kullanımda çok önemli fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E (Editör). Kalp ve damar cerrahisi. I.Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004: 197-215.
2. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004; 24: 468-75.
3. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147: 153-159.
4. Hammersen F. The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia on reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 1989; 13: 1–26.
5. Koksall C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N. Aprotinin ameliorates ischemia/ reperfusion injury in a rat hind limb model. *VasculPharmacol* 2004; 41: 125-129.
6. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. Chemokine expression during hepatic ischemia/ reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest* 1995; 95: 134-141.
7. Şirin H, Sarıbülbül O, Cerrahoğlu M, Aksoy Ö, Baltalarlı A, Saçar M ve ark. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonunun yol açtığı pulmoner hasarda aprotininin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001; 9: 233-237.
8. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.
9. Von Volkmann R. Die Ischämischen muskellähmungen und-kontraktüren. *Zentralbl Chir* 1981; 8: 801–803.

10. Jepson PN. Ischemia contracture: an experimental study. *Ann Surg* 1926; 84: 785–795.
11. Cannon WB. *Traumatic Shock*. New York: Appletonand Co, 1923.
12. Husveldt E, Bjerling T. Renallesions from traumatic shock. *Acta Med Scand* 1937; 91: 279.
13. Bywaters EGL. Ischemic muscle necrosis, crushing injury, traumatic edema, the crush syndrome, traumatic anuria, compression syndrome: a type of injury seen in air raid casualties following burial beneath debris. *JAMA* 1944; 124: 1103–1109.
14. Haimovici H. Arterial embolism with acut emassive ischemic myopathy an myoglobinuria: evaluation of a hitherto unreported syndrome with report of two cases. *Surgery* 1960; 47: 739–744.
15. Haimovici H. Metabolic complications of acut arterial occlusions and related conditions: myonephropathic-metabolic syndrome. *Haimovici's Vascular Surgery* 4th ed. 1996; 511.
16. Fujii H, Ohashi H, Tsutsumi Y et al. Myonephropathic Metabolic Syndrome after Cardiacor Aortic Surgery. *Jpn J Cardiovasc Surg* 2003; 32: 230–233
17. Grace PA, Mathie RT. *Ischemia-reperfusion Injury*. London: Blackwell Science 1999.
18. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: 1269-1275.
19. Grisham MB, Granger DN, Lefer DL. Modulation of leukocyte-endothelial Interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad Biol* 1998; 25: 404-33.

20. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6: 167-178.
21. Neary P, Redmond HP. Ischemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. Grace PA, Mathie RT, (eds). *Ischemia-Reperfusion Injury*. London: BlackwellScience, 1999: 123-136.
22. Belkin M, Brown RD, Wright JG. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg* 1988; 156: 83–86.
23. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1990; 12: 8–15.
24. Labbe R, Lindsay T, Walker PM. The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia. *J Vasc Surg* 1987; 6: 152–157.
25. Hayes G, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. *Surg Forum* 1988; 39: 306–308.
26. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: A review. *Microsurgery* 1993; 14: 165-175.
27. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJC, Davis JM, Fantini GA. Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: Role of leukocytes and leukotriens. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99: 1485-1493.
28. Russel RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG: Reperfusion injury and oxygen free radicals: A review. *J Reconstr Microsurg* 1989; 5: 79-84.
29. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985; 201: 357-359.

30. Boğa M. Akut ekstremite iskemisi. *Türk Aile Hek Derg* 2009; 13: 11-15.
31. Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2529-2534.
32. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Bannerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma* 1992; 32: 723-7
33. Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE: Circulation xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1992; 263: 394-401.
34. Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH, Odselius R. Multiple system organ damage resulting from prolonged hepatic in flow interruption. *Arch Surg* 1996; 131: 442-7.
35. Liu P, Yin K, Yue G, Wong P. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion with endotoxemia. *J Inflamm* 1995; 46: 144-54.
36. Nielsen VG, Tan S, Baird MS, McCammon AT, Parks DA. Gastric intramucosal pH and multiple organ injury: impact of ischemia-reperfusion and xanthine oxidase. *Crit Care Med* 1996; 24: 1339- 1344.
37. Weinbroum AA, Nielson VG, Tan S. Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine-oxidase. *Am J Physiol* 1995; 268: 988-996.
38. Fantini GA, Conte MS. Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am Surg* 1995; 61: 316-319.
39. Barry MC, Wang JH, Kelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Plasma factor augments neutrophil and endothelial activation during aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13: 381-387.

40. Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* 1997; 84: 513-519.
41. Gadaleta D, Fantini GA, Silane MF, Davis JM. Neutrophil leukotriene generation and pulmonary dysfunction after abdominal aortic aneurysm repair. *Surgery* 1994; 116: 847-852.
42. Harward TR, Welborn MB, Martin TD. Visceral ischemia and organ dysfunction after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. A clinical and cost analysis. *Ann Surg* 1996; 223: 729-734.
43. Neary P, Redmond HP. Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. Grace PA, Mathie RT, (eds). *Ischemia-Reperfusion injury*. London: Blackwell Science 1999: 123-136.
44. Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, Chaudry IH. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* 1994; 1: 141-145.
45. Goris RJA, te Boekhorst TPA, Nuytinck JKS, Gimbere JSF. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation. *Arch Surg* 1985; 120: 1109-1115.
46. Livingston DH, Mosenthal AC, Deitch EA. Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horizon* 1995; 3: 257-266.
47. Gallay P, Jongeneel CV, Barras C. Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes. *J Immunol* 1993; 150: 650-693.
48. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *CircRes* 1996; 79: 560-569.

49. Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Wolitzky BA, Granger DN. Endothelial cell adhesion molecule expression in gene-targeted mice. *Am J Physiol* 1997; 273: 1903-1908.
50. Foulds S, Mireskandari M, Kalu P. Visceral ischemia and neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. *J Surg Res* 1998; 75: 170-6.
51. Upperman JS, Deitch EA, Guo W, Lu Q, Xu D. Posthemorrhagic shock mesenteric lymph is cytotoxic to endothelial cells and activates neutrophils. *Shock* 1998; 10: 407-414.
52. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Fick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 720-723.
53. Carden DL, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 1998; 275: 385-392.
54. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. Lung neutrophil retention and injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 1997; 4: 359-367.
55. Bulkley GB. Mesenteric vascular insufficiency. *Curr Probl Surg* 1997; 34: 943-990.
56. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of post ischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 311-332.
57. Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-Reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: 1269-1275.
58. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevæarai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb circulation. 2008; 118: 1920-1928.

59. Bilal M, Sarioğlu T. İskemik miyokard injurisi ve intraoperatif miyokard korunmasına genel bir bakış. *GKD Cer Derg* 1992; 1: 118-126
60. Lahiri S. Historical perspectives of cellular oxygen sensing and responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1467-1473.
61. Kumar V. Abbas A. Fausto N Mitchell R. Robbins Basic Pathology. 8th Edition. W.B. Saunders Elsevier 2007: 482.
62. Branda M. Roselino J. Piccinato C. Cherri J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 2003; 110: 235–240.
63. Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000; 50: 279–289.
64. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Medical Bulletin* 2004; 70: 71–86.
65. Ranjan K. Dash, Yanjun L, Kim J, Beard D A, Saidel GM, Cabrera ME. Metabolic dynamics in skeletal muscle during acute reduction in blood flow and oxygen supply to mitochondria: In-Silico Studies 2008; 3: 1-21.
66. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
67. Zimiani K. Guarnier F. Miranda H. Watanabe M. Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide* 2005; 13: 196–203.
68. Pham-Huy L A, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health *Int J Biomed Sci* 2008; 4: 89-96.
69. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *The Surg Res* 2002; 105: 248-258.

70. Lefler AM, Lefler DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 743-751.
71. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.
72. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
73. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.
74. Yavaş D, Zengin M, Kaklıkaya İ, Uzun Z, Ören A, Elşin M C, Değer O, Özcan F Serbest oksijen radikal temizleyici olarak aprotininin rolü (deneysel çalışma). *GKD Cer Derg* 1994; 2: 208-215.
75. Jackson MJ, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; 102: 1664-1670.
76. López-Neblina F, Páez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of protection of verapamil by preventing neutrophil infiltration in the ischemic rat kidney. *J Surg Res* 1996; 61: 469-472.
77. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 662-675.
78. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki S, Baba S, Nakano M. Involvement of platelet activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996; 23: 1656-1663.
79. Kumar V. Abbas A. Fausto N Mitchell R. Robbins Basic Pathology. 8th Edition, WB. Saunders Elsevier 2007: 482.

80. De Silva R, Dunning J, Trull A, Vuylsteke A. A review of ischaemia-reperfusion injury in the cardiorespiratory system. *Ann Cardiac Anaest* 2003; 6: 126–131.
81. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Molec Cell Bioch* 1998; 179: 169–187.
82. Blaisdell F W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardio Surg* 2002; 10: 620–630.
83. Xu Y, Huo Y, Toufektsian M, Ramos S I, Ma Y, Tejani A.D, Brent A. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 692- 699.
84. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg* 2009; 22: 5-14.
85. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 92-95.
86. Rodrigues S F, Granger D N. Role of blood cells in ischaemia–reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovascular Research* 2010; 87: 291–299.
87. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101: 148-160.
88. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle Injury. *Int J Care Injured* 2011; 4590-6: 1-6.
89. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist Pet al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): A missing link in

- neutrophil-evoked alteration of vascular permeability *Nat Med* 2001; 7: 1123-1127.
90. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéquez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48: 109-114.
 91. Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-170.
 92. Becker M, Menger MD, Lehr HA. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol* 1994; 297: 925-930.
 93. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-66.
 94. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 537-550.
 95. Günaydın B, Çelebi H. Genel anesteziklerin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkisi. *Anestezi Derg* 2003; 11: 87-98.
 96. Demiryürek AT, Kennedy S, Wainwright CL, Wadsworth RM, Kane KA. Influence of nitric oxide on luminol-enhanced chemiluminescence measured from porcine-stimulated leukocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30: 332-7.
 97. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-576.
 98. Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of NG, NG-, and NG, N^ωG-dimethyl-arginine, N-mono, di, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl- d-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970; 245: 5751-8.

99. Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG NG dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 657-62.
100. Vallance P, Leone A, Calver A. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: 60- 62.
101. Böger RH. Association of Asymmetric Dimethylarginine and Endothelial Dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1467-1472.
102. Mittermayer F, Namiranian K, Pleiner J, Schaller G, Woltz M. Acute Escherichia coli endotoxemia decreases the plasma L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio in humans. *Clin Sci* 2004; 106: 577-581
103. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1023-1030.
104. Zsuga J, Gesztelyi R, Török J, Keki S, Bereczki D. Asy dimethylarginine: A molecule responsible for the coexistence of insulin resistance and atherosclerosis via dual nitric oxide synthase inhibition. *Med Hypotheses* 2005; 65: 1091-1098.
105. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-7.
106. Ghosh SK, Paik WK, Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain: myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J Biol Chem* 1988; 263: 19024-19033.
107. Valkonen VP, Laaksonen R. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clin Chim Acta* 2004; 348: 9-17.
108. McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transport I and endothelial nitric oxide

synthase may explain the arginine paradox Ö. J Biol Chem 1997; 272: 31213-31216.

109. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. J Biol Chem 1989; 264: 10205-10209.
110. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Dimethylarginine: pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identify with alanine: glyoxylate aminotransferase 2. J Biol Chem 1990; 265: 20938-20945.
111. Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? Diabetologia 2002; 45: 1609-1616.
112. Bšger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res 2003; 59: 824-833.
113. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? Circulation 2004; 109: 1813-1818.
114. MacAllister R, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell R, Hodson H, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Br J Pharmacol 1996; 119: 1533-1540.
115. Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: regulation and action. Pharmacol Res 2009; 60: 448-460.
116. Fickling SA, Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Vallance P, Whitley G. Regulation of macrophage nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for NG, NG dimethylarginine. Acta Physiol Scand 1999; 167: 145-50.
117. Bšger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. J Nutr 2004; 134: 2842-2847.

118. Achan V, Broadhead M, Malaki M. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolised by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1455-1459.
119. Bšger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005; 10: 14-23.
120. Smith CI, Birdsey GM, Anthony S, Arrigoni FI, Leiper JM, Vallance P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGF expression, and cell phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 984-989.
121. Bšger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyl transferases. *Circ Res* 2000; 87: 99-105.
122. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-1146.
123. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127-2128.
124. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler* 2003; 4: 41-51.
125. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 1377–1383
126. Bšger RH. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1124-1129.

127. Siroka R, Trefil L. Asymmetric dimethylarginine comparison of HPLC and ELISA methods. *J Chromat* 2007; 850: 586-587.
128. Bray TM. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress, *Nutrition* 2000; 16: 578-581.
129. Iwama KG. Stress in fish. *Fish Biology Fisheries* 2004; 8: 35-56.
130. Moraes G, Metabolic responses in adaptation to stress in fish. Brazil: International Congress on the Biology of Fish 2004: 47.
131. Ritola O, Peters LD, Livingstone DR, Seppä PL. Effects of in vitro exposure to ozone and hyperoxia on superoxide dismutase, catalase, glutathione and lipid peroxidation in red blood cells and plasma. *Aquaculture Res* 2002; 33: 165-175.
132. Tarin JJ, Brings J, Cano A, Serbest radikalleri antioksidanlar ve infertilite ile klinik ilişkiler, *Human Reproduction*, 1998; 13: 2371-2376.
133. Adelson E, Rheingold J, Crosby W. The platelet as a sponge: a review. *Blood* 1961; 17: 767-774.
134. Lee GR, Bithall TC, Foerster J. *Wintrobe's Clinical Hematology*; 9. ed. Philadelphia London: WB Saunders, 1993.
135. Paulus JM, Bury J, Grosdent JC. Control of platelet territory development in megakaryocytes. *Blood Cells* 1979; 5: 59-88.
136. Frojmovic MM, Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J* 1976; 16: 1071-1089.
137. Guyton & Hall. *Hemostaz ve kan pıhtılaşması*. Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 1996; 463-473.
138. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004; 15: 498-511.

139. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 1997; 18: 885-891.
140. White JG. Platelet ultrastructure. Bloom AL, Thomas DP (eds.) *Haemostasis and Thrombosis*, 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987: 20.
141. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Hale R, Krishnaswamy S. Surfacedependent relations of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* 1990; 76: 1-16.
142. Tracy PB. Regulation of thrombin generation at cell surfaces. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14: 227-233.
143. Zucker-Franklin D. The submembranous fibrils of human blood platelets. *J Cell Biol* 1970; 47: 293-299.
144. White JG. The submembrane filaments of blood platelets. *Am J Pathol* 1969; 56: 267-277.
145. George JN. Studies on platelet plasma membranes. IV. Quantitative analysis of platelet membrane glycoproteins by (125I)-diazotized diiodosulfanilic acid labeling and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Lab Clin Med* 1978; 92: 430-446.
146. Phillips DR, Agin PP. Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of none-equivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1977; 252: 2121-2126.
147. Plow EF, Ginsberg M. The molecular basis of platelet function. Hoffman R, Benz EJ, Shaltil SJ, Furie B, Cohen HJ (eds.) *Hematology. Basic Principles and Practice*. New York: Churchill Livingstone, 1991: 1165.
148. Roth GJ. Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunol Today* 1992; 13: 100-105.

149. Fuvel F, Grant ME, Legrand YJ. Interaction of blood platelets with a microfibrillar extract from adult bovine aorta: requirement for vonWillebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 551–554.
150. Birembaut P, Legrand HY, Bariety J. Histochemical and ultrastructural characterization of subendothelial glycoprotein microfibrils interacting with platelets. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 75–80.
151. Roth GJ. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood* 1991; 77: 5–19.
152. Turitto VT, Baumgartner HR. Platelet-surface interactions. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (eds.) *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: JB Lippincott 1987: 555.
153. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 159–193.
154. Rink TJ, Sage SO. Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 431–449.
155. Packham MA. Platelet reactions in thrombosis. Gottlieb AI, Langille BL, Federoff S (eds.) *Atherosclerosis. Cellular and Molecular Interactions in the Artery Wall*. New York: Plenum Press, 1991: 209.
156. Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol* 1984; 98: 748–760.
157. Ginsberg MH, Taylor L, Painter RG. The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. *Blood* 1980; 55: 661–668.
158. Holmsen H, Day HJ. The selectivity of the thrombin-induced platelet release reaction: Subcellular localization of released and retained constituents. *J Lab ClinMed* 1970; 75: 840–855.

159. Kenney DM, Chao FC. Microtubule inhibitors alter the secretion of beta-glucuronidase by human blood platelets: involvement of microtubules in release reaction II. *J. Cell Physiol* 1978; 96: 43–52.
160. Holmsen H, Robkin L, Day HJ. Effects of antimycin A and 2-deoxyglucose on secretion in human platelets. Differential inhibition of the secretion of acid hydrolases and adenine nucleotides. *Biochem J* 1979; 182: 413–419.
161. Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: three isoforms and two receptor types. *Trends Genet* 1989; 5: 108–111.
162. Wenger RH, Wicki AN, Walz A, Kieffer N, Clemetson KJ. Cloning of Cdna coding for connective tissue activating peptide III from a human platelet derived lambda gtII expression library. *Blood* 1989; 73: 1498–1503.
163. Deuel TF, Keim PS, Farmer M, Heinrikson RL. Aminoacid sequence of human platelet factor 4. USA: *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 2256–2258.
164. Viskup RW, Tracy PB, Mann KG. The isolation of human platelet factor V. *Blood* 1987; 69: 1188–1195.
165. Rand MD, Kalafatis M, Mann KG. Platelet coagulation factor Va: the major secretory platelet phosphoprotein. *Blood* 1994; 83: 2180–2190.
166. SchwarzHP, Heeb MJ, Wencel-Drake JD, Griffin JH. Identification and quantitation of protein S in human platelets. *Blood* 1985; 66: 1452–1455.
167. Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest* 1984; 74: 1465–1472.
168. Keenan JP, Solum NO. Quantitative studies on the release of platelet fibrinogen by thrombin. *Br J Haematol* 1972; 23: 461–466.

169. Majack RA, Goodman LV, Dixit VM. Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol* 1988; 106: 415–422.
170. Woods VL Jr, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986; 261: 15242–15251.
171. Nijja K, Hodson E, Bader R. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 1987; 70: 475–483.
172. Savage B, Hunger CS, Harker LA, Woods VI Jr, Hanson SR. Thrombin induced increase in surface expression of epitopes on platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex and GMP-140 is a function of platelet age. *Blood* 1989; 74: 1007–1014.
173. Hellem A. The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand J Clin Invest* 1960; 12: 1–117.
174. Gaarder A, Jonsen A, Laland S, Hellem AJ, Owren PA. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 1961; 195: 531–532.
175. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2 purinoceptor? *Gen Pharmacol* 1985; 16: 433–440.
176. Fredholm B, Abbracchio MP, Burnstock G, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 143–156.
177. Nachman RL, Ferris B. Binding of adenosine diphosphate by isolated membranes from human platelets. *J Biol Chem* 1974; 249: 704–710.
178. Cattaneo M, Lecchi A, Randi AM, McGregor JL, Mannucci PM. Identification of a new congenital defect of platelet aggregation characterized

by severe impairment of platelet response to adenosine diphosphate. *Blood* 1992; 80: 2787–2796.

179. Nurden P, Savi P, Heilmann E. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest* 1995; 95: 1612–1622.
180. van de Meijden PE, Feijge MA, Giesen PL, Huijberts M, van Raak LP, Heemskerk JW. Platelet P2Y₁₂ receptors enhance signalling towards procoagulant activity and thrombin generation: a study with healthy subjects and patients at thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2005; 93: 1128–1136.
181. Altieri DC, Mannucci PM, Capitano AM. Binding of fibrinogen to human monocytes. *J Clin Invest* 1986; 78: 968–976.
182. Feolde E, Vigne P, Breittmayer JP, Frelin C. ATP, a partial agonist of atypical P2Y purinoceptors in rat brain capillary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1199–1203.
183. Poncz M, Eisman R, Heidenreich R. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb: homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem* 1987; 262: 8476–8482.
184. Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem* 1992; 267: 16637–16643.
185. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202–207.
186. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.

187. Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 1995; 82: 1026-1060.
188. Klotz KF, Klingsiek S, Singer M, Wenk H, Eleftheriadis S, Kuppe H, Schmucker P. Continuous measurement of cardiac output during aortic cross-clamping by the oesophageal Doppler monitor ODM 1. *Br J Anaesth* 1995; 74: 655-660.
189. Roberts AJ, Nora JD, Hughes WA, Quintanilla AP, Ganote CE, Sanders JH Jr, Moran JM, Michaelis LL. Cardiac and renal responses to cross-clamping of the descending thoracic aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86: 732-741.
190. Grant RP, Jenkins LC. Modification by preoperative beta-blockade of the renin response to infrarenal aortic cross-clamping. *Can Anaesth Soc J* 1983; 30: 480-488.
191. Kataja JH, Kaukinen S, Viinamaki OV, Metsa-Ketela TJ, Vapaatalo H. Hemodynamic and hormonal changes in patients pretreated with captopril for surgery of the abdominal aorta. *J Cardiothorac Anesth* 1989; 3: 425-432.
192. Gelman S, Bredle DL, Bradley WE, Cain SM. Angiotensin and alpha-adrenoceptor activation play a role in hemodynamic response to aortic cross-clamping. *Am J Physiol* 1990; 259: 68-73.
193. Nielsen VG, Weinbroum A, Tan S, Samuelson PN, Gelman S, Parks DA. Xanthine oxidoreductase release after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107: 1222-1227.
194. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245: 285-289.
195. Huval WV, Lelcuk S, Allen PD, Mannick JA, Shepro D, Hechtman HB. Determinants of cardiovascular stability during abdominal aortic aneurysmectomy (AAA). *Ann Surg* 1984; 199: 216-222.

196. Gottlieb A, Skrinska VA, O'Hara P, Boutros AR, Melia M, Beck GJ The role of prostacyclin in the mesenteric traction syndrome during anesthesia for abdominal aortic reconstructive surgery. *Ann Surg* 1989; 209: 363-367.
197. Anner H, Kaufman RP, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary leukosequestration induced by hind limb ischemia. *Ann Surg* 1987; 206: 162-167.
198. Bengtson A, Heideman M Altered anaphylatoxin activity during induced hypoperfusion in acute and elective abdominal aortic surgery. *J Trauma* 1986; 26: 631-637.
199. del Balzo U, Polley MJ, Levi R. Cardiac anaphylaxis. Complement activation as an amplification system. *Circ Res* 1989; 65: 847-857.
200. del Balzo UH, Levi R, Polley MJ. Cardiac dysfunction caused by purified human C3a anaphylatoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 886-890.
201. Roumen RM, van der Vliet JA, Wevers RA, Goris RJ. Intestinal permeability is increased after major vascular surgery. *J Vasc Surg* 1993; 17: 734-737.
202. Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S, Sandset PM, Wickens M, Peters G. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y₁₂ antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J* 2006; 27: 1038-1047.
203. van Giezen JJ, Humphries RG. Preclinical and clinical studies with selective reversible direct P2Y₁₂ antagonists. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 195-204.
204. Storey RF. Biology and pharmacology of the platelet P2Y₁₂ receptor. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 1255-1259.
205. Ingall AH, Dixon J, Bailey A. Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J Med Chem* 1999; 42: 213-220.

206. Ueno M, Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Update on the clinical development of cangrelor. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010; 8: 1069-1077.
207. Springthorpe B, Bailey A, Barton P. From ATP to AZD6140: the discovery of an orally active reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 6013-6018.
208. Husted S, van Giezen JJ. Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist. *Cardiovasc Ther* 2009; 27: 259-274.
209. Teng R, Butler K. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66: 487-496.
210. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K. Randomized double-blind assessment of the ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease: the ONSET/OFFSET study. *Circulation* 2009; 120: 2577-2585.
211. Wang K, Zhou X, Huang Y. Adjunctive treatment with ticagrelor, but not clopidogrel, added to tPA enables sustained coronary artery recanalisation with recovery of myocardium perfusion in a canine coronary thrombosis model. *Thromb Haemost* 2010; 104: 609-617.
212. Ohman J, Kudira R, Albinsson S. Ticagrelor induces adenosine triphosphate release from human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 418: 754-758.
213. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 2004; 447: 735-743.
214. Gan L, Wittfeldt A, Emanuelson H. Adenosine may mediate ticagrelor-induced dyspnea. 61st Annual Scientific Meeting American College of Cardiology. *J Am Col Cardiol* 2012; 59: 344.

215. van Giezen JJ, Sidaway J, Glaves P. Ticagrelor inhibits adenosine uptake in vitro and enhances adenosine-mediated hyperemia responses in a canine model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2012; 17: 164-172.
216. Rose JB, Naydenova Z, Bang A. Equilibrative nucleoside transporter 1 plays an essential role in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: 771-777.
217. Serebruany VL. Mortality benefit in PLATO cannot be explained by antiplatelet properties of ticagrelor. *Cardiology* 2010; 117: 231-233.
218. Patil SB, Jackman LE, Francis SE. Ticagrelor effectively and reversibly blocks murine platelet P2Y12-mediated thrombosis and demonstrates a requirement for sustained P2Y12 inhibition to prevent subsequent neointima. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2385-2391.
219. Butler K, Teng R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of multiple ascending doses of ticagrelor in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 70: 65-77.
220. Teng R, Oliver S, Hayes MA, Butler K. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ticagrelor in healthy subjects. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 1514-1521.
221. Storey RF, Husted S, Harrington RA. Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y12 receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1852-1856
222. Husted SE, Storey RF, Bliden K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticagrelor in patients with Stable Coronary Artery disease: results from the ONSET-OFFSET and RESPOND Studies. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51: 397-409.

223. Butler K, Teng R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of ticagrelor in volunteers with mild hepatic impairment. *J Clin Pharmacol* 2011; 51: 978-987.
224. AstraZeneca. BRILINTA (Ticagrelor) Approved Product Information 2011.
225. Cannon CP, Husted S, Harrington RA. Safety, tolerability, and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1844-1851.
226. Scirica BM, Cannon CP, Emanuelsson H. The incidence of bradyarrhythmias and clinical bradyarrhythmic events in patients with acute coronary syndromes treated with ticagrelor or clopidogrel in the PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes) trial: results of the continuous electrocardiographic assessment substudy. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1908-1916.
227. Wallentin L, Becker RC, Budaj A. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361: 1045-1057.
228. Burki NK, Dale WJ, Lee LY. Intravenous adenosine and dyspnea in humans. *J Appl Physiol* 2005; 98: 180-185.
229. Synder LR, Glacjch JL, Kirkland JJ. Practical HPLC method development, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-62782-8, 1-15, 1988.
230. Tswett MS. A Russian botanist, creates and baptizes the technique of chromatography. *Ber Dtsch. Botan Ges* 1906; 24: 316-384.
231. Yıldız A, Genç Ö. Enstrümental Analiz. İstanbul: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1993: 421-438.
232. Tietz WN. Text book of clinical chemistry. 1986; 159-172.

233. Nath AK, Fischereder M and Hostetter H. The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int* 1994; 45: 111-115.
234. Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 1993; 49: 621-629.
235. Falciani M, Rinaldi B, D'Agostino B, Mazzeo F, Rossi S, Nobili B, et al. Effects of Nebivolol on human platelet agregation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 922-929.
236. Okutan H, Savaş Ç, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2004; 3: 519-522.
237. Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibas N. Deneysel aortik iskemi reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005; 14: 13-18.
238. Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989; 38: 181-188.
239. Bagchi D, Garg A, Krohn RL. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 95: 179-189.
240. Cell Injury, Cell Death and Adaptations. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007: 1-29.
241. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988; 16: 947-953.
242. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. Grace PA, Mathie RT (eds). *Ischemia-reperfusion injury*. London: Blackwell Science 1999: 3-19.

243. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 15: 1456-1462.
244. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370.
245. Belkin M, Brown RD, Wright JG. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg* 1988; 156: 83-86.
246. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30-39.
247. Enkaya I, Ökten B, Saba D, Güven H, Dirican M, Serdar Z, Tolunay Ş, Özer Z. İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında tiklopidin. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1999; 7: 405-410.
248. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Lab Clin Med* 1992; 99: 598-620.
249. Slawsky MT, Colucci WS, Gottlieb SS, Greenberg BH, Haeusslein E, Hare J, et al. Acute hemodynamic and clinical effect of levosimendan in patients with severe heart failure. *Circulation* 2000; 102: 2222-2227.
250. Unal D, Yeni E, Erel O, Bitiren M, Vural H. Antioxidative effects of exogenous nitric oxide versus antioxidant vitamins on renal ischemia reperfusion injury. *Urol Res* 2002; 30: 190-194.
251. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13527-13532.
252. Göksel S, Yeğen BC. İskemi Reperfüzyon Hasarı Klinik Gelişim Dergisi, 2009; 22: 5-13.

6. ÖZGEÇMİŞ

1984 Elazığ doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ Nahit Ergene İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Lise eğitimimi Elazığ Balakgazi Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2002 yılında Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başladım. 2008 yılında Tıp Fakültesinden mezun oldum. Aynı yıl mecburi hizmet görevim için Trabzon Tonya İskenderli Sağlık Ocağı'nda pratisyen hekim olarak göreve başladım. İhtisasıma 2009 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda başladım. 2014 yılında ihtisasımı tamamlamış bulunmaktayım. Evliyim.