



ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

SİLOSTAZOLUN ENDOTELE BAĞLI VAZODİLATASYON ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. NAİL SİREK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet BOĞA

AYDIN-2010

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM
DALI

SİLOSTAZOLUN ENDOTELE BAĞLI VAZODİLATASYON ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. NAİL SİREK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet BOĞA

AYDIN-2010

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitim süresi boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağına sahip olduğum, yanında yetişmiş olmaktan gurur duyacağım başta anabilim dalımız kurucusu Prof. Dr. Berent DİŞCİGİL olmak üzere, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sürecinde değerli katkılarını esirgemeyen Anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet BOĞA ile anabilim dalının diğer öğretim üyeleri Doç. Dr. M. İsmail BADAK, Doç. Dr. Uğur GÜRCÜN, Doç. Dr. Erdem ÖZKISACIK'a çalışmanın istatistiksel analizini yönlendiren Doç. Dr. Mevlüt TÜRE'ye, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli asistan arkadaşlarıma, tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan sevgili eşime, beni yetiştiren ve bugünlere getiren anne ve babama, en içten duygularıyla teşekkür ediyorum.

Saygı ve Sevgilerimle

Dr. Nail SİREK

İÇİNDEKİLER

Konu	Sayfa no
Tablo Dizini	v
Şekil Dizini	vi
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vii
Resimler Dizini	viii
Giriş ve Amaç	1-2
Genel bilgiler	3-29
Gereç ve Yöntem	30-36
Bulgular	37-40
Tartışma	41-42
Sonuç	43
Özet	44-45
İngilizce isim ve özet (Summary)	46-47
Kaynaklar	48-57

TABLO DİZİNİ

Tablo no	Tablo Başlığı	Sayfa no
Tablo I	Endotel hücrelerinden salgılanan maddeler	5
Tablo II	Çalışmada kullanılan Asetilkolin konsantrasyonları	34
Tablo III	Kontrol-Silostazol grupları arasındaki tanımlayıcı istatistik ($\bar{X} \rightarrow$ Ortalama, SD $\rightarrow$ Standart Sapma)	37
Tablo IV	Kontrol-DMSO grupları arasındaki tanımlayıcı istatistik ($\bar{X} \rightarrow$ Ortalama, SD $\rightarrow$ Standart Sapma)	38

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil no	Şekil Başlığı	Sayfa no
Şekil 1	Damar endotel hücresi iskeleti	3
Şekil 2	Nitrik Oksid sentezi.	6
Şekil 3	Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu	7
Şekil 4	Asetil kolin strüktürel formülü	8
Şekil 5	Asetilkolin etki mekanizması	9
Şekil 6	Prostasiklin sentez mekanizması	10
Şekil 7	Prostasiklin strüktürel formülü	10
Şekil 8	Silostazol Strüktürel Formülü	17
Şekil 9	Silostazol etki mekanizması (PDE III İnhibisyonu)	20
Şekil 10	Silostazol etki mekanizması (PKA üzerinden yürütülen fizyolojik etkiler)	21
Şekil 11	Silostazol etki mekanizması (Adenozin alınımının inhibisyonu)	22
Şekil 12	Silostazol etki mekanizması (Hücre içi kalsiyum akışını engeller)	23
Şekil 13	Silostazolun lipit metabolizmasında düzelmenin mekanizması	26
Şekil 14	Organ Banyosu Düzenegi	33
Şekil 15	Gruplara göre Asetilkolin kümülatif dozlarına göre oluşan gevşeme yüzdeleri	39
Şekil 16	Gruplara göre Asetilkolinin ilk üç dozu sonrası oluşan gevşeme yüzde değerlerinin grafiksel görünümü	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PAH	Periferik Arter Hastalığı	NO	Nitrik Oksid
EDRF	Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör	NOS	Nitrik Oksid Sentaz
Ach	Asetilkolin	NADPH	Nikotinamid adenin dikleotid fosfat
FAD	Flavin adenin dikleotid	FMN	Flavin mononukleotid
PGI ₂	Prostasiklin=Prostaglandin I ₂	cGMP	siklik Guanozin Monofosfat
GTP	Guanozin Trifosfat	PGE ₂	Prostaglandin E2
cAMP	siklik Adenozin Monofosfat	VCAM	Vasküler Hücre Yapışma Molekülü
MCP-1	Monosit Kemoattractan Protein-1	PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PKA	Protein Kinaz A	PDE	Fosfodiesteraz
TNF- α	Tümör Necrosis Faktör- α	LDL-C	Düşük Dansiteli Kolesterol
HDL-C	Yüksek Dansiteli Kolesterol	HbA1C	Hemoglobin A1C
ABI	Ankle-Brachial Index	IC	İntermittent Klodikasyo
CYP 3A4	Cytochrome 3A4	CYP 2C19	Cytochrome 2C19
OPCAP	Off-pump koroner arter bypass	ADP	Adenosin Difosfat
PTCA	Perkütan Transluminal Koroner Angioplasti	HGF	Hepatocyte Growth Factor
IL-6	Interlökin-6	LPS	Lipopolisakkartit
DMSO	Dimethyl Sulfoxide		

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Resim Başlığı	Sayfa no
Resim 1	Kalp Damar Cerrahisi araştırma laboratuvarı	30
Resim 2	Ratlara intraperitoneal silostazol verilmesi	31
Resim 3	Organ banyosu düzeneği	32
Resim 4	Doz-Cevap eğrisinin bilgisayar görüntüsü	35

GİRİŞ VE AMAÇ:

Periferik arter hastalığı (PAH) ateroskleroz zemininde gelişen ve hastalarda intermittant kladikasyo (yürüme sırasında bacak kaslarında ağrı) yakınmasından, extremité kaybına kadar gidebilen bir damar hastalığıdır. Kladikasyo en erken ve en sık semptomudur. Sistemik aterosklerozun bir parçası olarak ortaya çıkar. Genel populasyonun %12'sini etkilemesi ve 70 yaş üzeri kişilerin %20'sini kapsaması ve morbitésinin yüksek olması nedeniyle toplum sağlığı açısından büyük bir problem oluşturmaktadır (1). Ateroskleroz oluşmasındaki en önemli etkenin ise endotelial fonksiyon (endotelial disfonksiyon) bozukluğu olduğu bilinmektedir.

Endotel damar duvarı ve dolaşan kan arasında tek sıra endotel hücrelerinden oluşmuş fonksiyonel bir bariyerdir. Endotel katmanı eskiden düşünüldüğü gibi kan damarlarının içini kaplayan, dokularla kan arasında bulunan pasif yarı geçirgen bir hücre tabakası değil, tersine sentezlediği ve salgıladığı mediatörlerle vasküler hemostazda çok önemli bir rol oynayan, vücudun her tarafına yayılmış, pek çok yaşamsal faaliyeti yöneten bir organdır (2).

Vücut ile kan arasındaki kritik stratejik yeri işgal eden ve birçok düzenleyici rolü üstlenen önemli bir endokrin, parakrin, otokrin ve intrakrin fonksiyonları olan bir organdır. Endotel hücreleri fizyolojik ve patolojik uyarılara yanıt olarak gevşetici (relaxing) ve kasıcı (contracting) faktörler oluşturarak hemen altındaki damar düz kas hücrelerinin tonüsünü ayarlarlar. Normal endotel adeziv olmayan damar iç yüzeyini devam ettirir. Antikoagülan, fibrinolitik ve antitrombotik özellikler gösterir. Endotel hasarı veya aktivasyonu onun normal düzenleyici özelliklerini bozar ve anormal endotel hücre fonksiyonlarıyla (endotel disfonksiyonu) sonuçlanır. Klinik olarak endotel disfonksiyonu vazospazm, trombüs oluşması, ateroskleroz veya restenoz şeklinde kendini gösterir. Endotel hücreleri vaskülit ve ateroskleroz patojenezine katkısı olabilen sitokinlere yanıtta fonksiyonel veya morfolojik değişikliğe uğrarlar.

Endotel fizyolojik ve patolojik fonksiyonlarına ek olarak selektif permabilite bariyeri, su ve suda eriyenlerin kapiller transportu, plazma lipidlerinin düzenlenmesi, iltihabi ve immün yanıtlar, anjiogenez ve tümör metastazına katkısı, kanın akıcılığını devam ettirerek ve her değişen hemodinamik, humoral duruma bağlı olarak kan damarlarının çapını ayarlayarak kardiyovasküler homostaza katkıda bulunur.

Endotel hücreleri, bu fonksiyonları başlıca çevresindeki değişiklikleri algılayarak ve kendisinin yaptığı endotelden kaynaklanan faktörler, küçük moleküller ve proteinler gibi biyolojik aktif sübstanların bu uyarılara yanıt vermesiyle başarılılar.

Silostazol, periferik arter hastalığının medikal tedavisinde kullanılan ağrısız yürüme mesafesini ve maximal yürüme mesafesini arttıran bir ilaçtır (3).

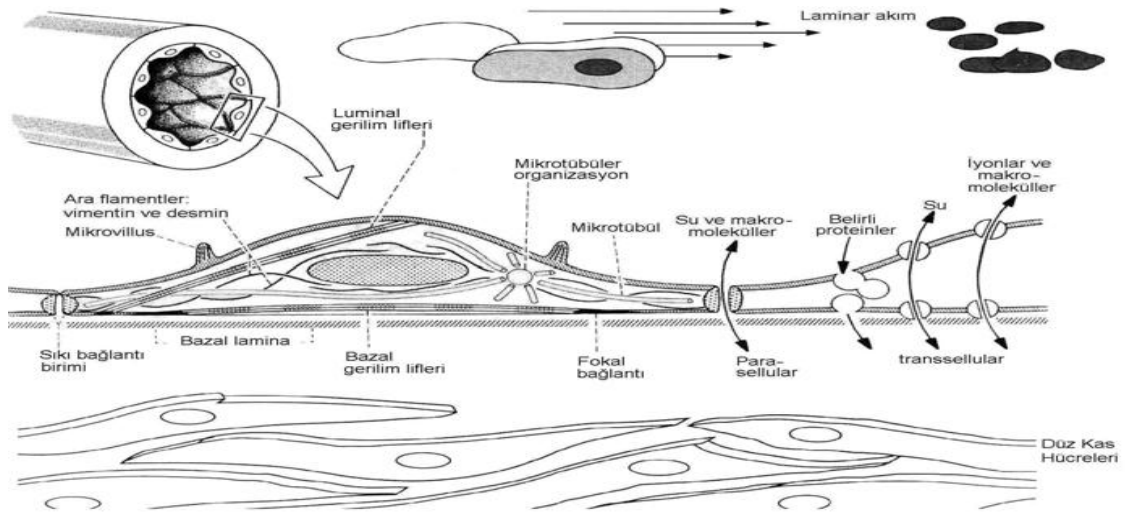
Çalışmamızdaki amacımız silostazolun vasküler reaktivite üzerine olan etkisini araştırmak idi. Bu amaçla intraperitoneal olarak 6 hafta boyunca silostazol verilen ratların aortasını çıkarttık ve bu aortaların organ banyosunda endotele bağlı vazodilatasyon üzerine olan etkisini inceledik.

GENEL BİLGİLER:

A-Normal Endotel:

Normal endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir squamöz epitel tabakasıdır. Endotel hücreleri, 10-15 μm genişliğinde, 20-25 μm uzunluğunda tek sıra poligonal hücrelerdir. Vazodilatatör ve vazokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır (4).

Kaygan, parlak yüzeyle, vazodilatasyona eğilimli bir yapıdır. Endotel damar iç yüzeyini döşeyen tek sıra yassı hücrelerden oluşur ve kana geçirgen değildir. Pasif bir bariyer olmayıp son derece aktif olan endotel, endokrin, parakrin, otokrin fonksiyonlara sahiptir ve hemostaz ile vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde ana etkindir (Şekil 1).



Şekil 1. Damar endotel hücresi iskeleti. Protein, iyon, su ve çeşitli makromoleküllerin endotel tabakasından direkt ve indirekt yoldan parasellüler aralığa geçişleri (5).

Endotel hücreleri salgıladıkları vazoaktif maddeler, büyüme faktörleri ve büyüme inhibitörleri ile koagülasyonu, fibrinolizisi, hücre proliferasyonu, inflamasyonu ve damar tonusunu, dolayısıyla kan akışını ve kan basıncını düzenlerler.

Bu fonksiyonlar aşağıda özetlenmiştir.

Endotel'e özgül fonksiyonlar:

1.Vazodilatatör veya vazokonstriktör mediyatörler salınımı ile vasküler vazomotor tonüs kontrolü.

2.Dolaşımdan çevredeki dokulara madde geçişini düzenleyen yarı geçirgen bariyerin devamlılığının sağlanması.

3.Çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin sentezi ve salınımı.

4.Arter duvarındaki lipoproteinlerin değişimi ve oksidasyonu.

5.Lökosit ve trombositlere nontrombojenik yüzey sağlanması.

6.Bazal membran yapısındaki kollajen ve proteokliganlarının devamlılığının sağlanması.

7.Koagülasyon ve fibrinolitik olaylarda modülatör rol oynar.

8.İnflamatuar ve immünolojik olaylarda rol oynar (4,6).

Böylece endotel hücresinin korunması ve normal fonksiyonunun devam etmesi büyük önem taşımaktadır. Birçok hastalığın nedeni ve seyrinde endotel hücre fonksiyonlarında patolojik dönüşümler (Endoteliopati) olmaktadır. Bu hastalıkların en başında da ateroskleroz gelmektedir.

Endotelin sağlıklı insanlarda normal fizyolojinin sürdürülmesinde 3 ana rolü vardır:

1-Vasküler vazomotor regülasyonun idamesi,

2-Lökosit adhezyonunun ve inflamasyonun kontrolü ve denetimi,

3- Trombozis ve fibrinolizis arasındaki dengenin idamesi.

Endotel hücresi bulunduğu yere göre değişik yapı ve etkide hemostaz, vazoaktivite, immün reaksiyon ve iltihabi olaylarda rol oynayan çok sayıda mediatörün sentezlenip salgılandığı yerdir. Salgılanan bu maddeler ile vasküler tonus, hücre proliferasyonu, koagülasyon, antikoagülasyon, inflamasyon ve damar geçirgenliği gibi fonksiyonlar düzenlemektedir (Tablo I).

Tablo I: Endotel hücrelerinden salgılanan maddeler (4, 6, 7).

Vazodilatatörler	Hücresel (Sellüler) Adezyon Molekülleri	Koagülan/Fibrinolitikler
1-Nitrik Oksid (NO= Endotel kaynaklı gevşetici faktör (Endothelium derived relaxing factor (EDRF) 2-Prostasiklin (PGI ₂ = Prostaglandin I ₂) 3-Bradikinin 4-Asetilkolin	1-Damarsal hücre adezyon Molekülü-1 (VCAM-1= Vascular cell adhesion molecule) 2-Hücreiçi hücre adezyon molekülü (ICAM= Intracellular cell adhesion molecule) 3-E-selektin 4-P-selektin	1-von Willebrand faktör 2-Doku tipi plazminojen aktivatörü -Plazminojen aktivatör İnhibitörü (PAI)
Vazokonstriktörler	Büyüme Faktörleri	Kimokinler
1-Endotelinler 2-Anjiotensin II 3-Tromboksan A2	1-Damar endoteli büyüme faktörü 2-Trombosit kaynaklı büyüme faktörü 3-Transformasyon büyüme faktörü 4-Heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü 5-M-koloni uyarıcı faktörü	1-Monosit kemotaktik protein 2-Interlökin-8 (IL-8)

I-Endotelial Vazomotor Tonüs Kontrolü:

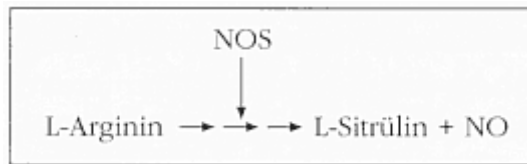
a-Nitrik Oksid (NO):

Vasküler yatakta vazomotor tonus kontrolü, vasküler relaksasyonla kontraksiyon arasındaki denge tarafından belirlenir. Endotel kaynaklı en önemli vazodilatatör madde Nitrik Oksidtir (NO).

Nitrik Oksid, nörotransmitter, otakoid, hücre içi ulak, parakrin maddesi ya da hormon olarak fonksiyon görebilir. Hücre membranlarından kolayca geçebilen, tek nitrojen ve tek oksijen atomunun birleşmesiyle ortaya çıkan bir kimyasal yapıya sahiptir. Yarılanma ömrü 3-50 saniye arasındadır (8).

İlk olarak 1980 yılında Furchgot ve Zawadski tarafından tanımlanan tavşan aortik damar şeritlerinde noradrenalin, fenilefrin veya başka bir kasıcı agonistle maksimal bir kasılmanın % 60-70'i bir kasılma sağladıktan sonra ortama asetilkolin (Ach) ilavesi ile gevşemelerin oluştuğu gösterildi. Furchgot ve Zawadski bu gevşemenin endotele bağımlı olduğunu ve bu etkiden endotelden düz kasa geçebilen non-prostanoid labil bir maddenin sorumlu olduğunu ileri sürdüler. Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırılan bu maddenin, daha sonra venler, arterler ve mikrodamarlarda yapılan çalışmalarda, Ach'den başka trombin, adenin nükleotidler, P maddesi, bradikinin, bir kalsiyum iyonoforu olan A23187 ve elektriksel stimülasyonla da salınımının uyarıldığı bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda EDRF'nin nitrik oksit (NO) veya NO ilişkili bileşikler olduğu saptanmıştır (7,9).

Nitrik oksid endotel hücrelerinde L-arginin amino asidinin terminal guanido atomunun enzimatik oksidasyonu ile nitrik oksid sentaz (NOS) enziminin sentezlenir (10). (Şekil 2)



Şekil 2: Nitrik Oksid sentezi.

Nitrik oksid oluşumunu katalizleyen en az üç farklı enzim başka bir deyişle üç farklı Nitrik Oksid Sentaz (NOS) izoformu olduğu bildirilmiştir. Her üç enzimde

aktiviteleri için kofaktör olarak NADPH (Nikotinamid adenin dikleotid fosfat), FAD (Flavin adenin dikleotid), FMN (Flavin mononukleotid) ve tetrahidrobiopterin'e gereksinim duyarlar.

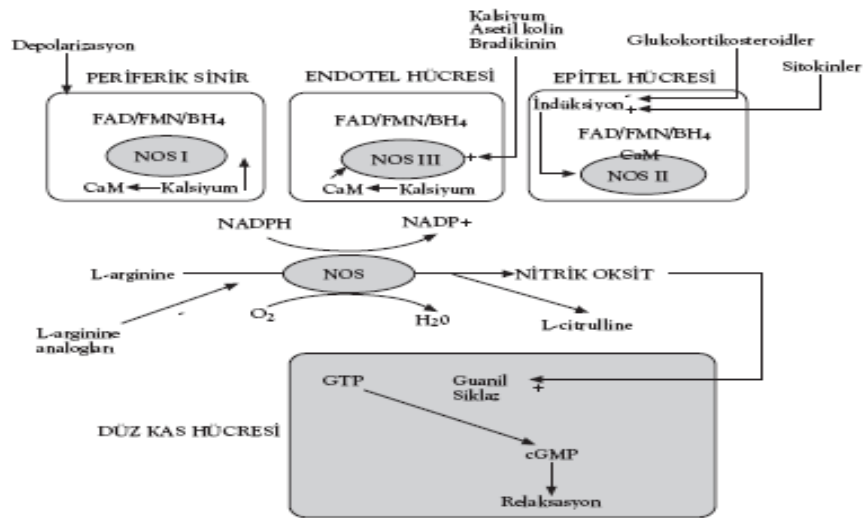
-Tip I: nNOS(nöronal): Sinir hücrelerinden devamlı salınır. Kalsiyuma bağımlıdır. Santral sinir sisteminde ve periferik sinir sisteminde nörotransmittör olarak görev alır.

-Tip II: iNOS(indüklenebilir): Makrofajlarda ve düz kas hücrelerinde oluşan, sitokinler ve endotoksin tarafından sentezi artırılan indüklenebilir iNOS, kalsiyuma bağlı değildir. Sitotoksik, sitostatik, sitoprotektif fonksiyonu vardır.

-Tip III: eNOS(endotelial): Vasküler endotelial, kalp, beyin vb. hücrelerden devamlı salınır. Kalsiyuma bağımlıdır. Vasküler düz kas hücrelerinin içine girerek guanilat siklazı aktive eder. Vasküler relaksasyon ve vazodilatasyona neden olur.

Nitrik Oksid, endotelde oluşuktan sonra damar düz kasına difüze olur ve burada solübl guanilat siklazın hem demirine bağlanarak enzimi aktive eder. Bu enzimin aktivasyonu guanozil trifosfat (GTP)'dan ikinci haberci olarak guanozil monofosfat (cGMP) oluşumuna yol açar. Oluşan bu biyokimyasal olaylar düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akışının düzenlenmesinde önemli rol oynar (Şekil 3).

Nitrik oksit aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de artırarak trombosit yapışma ve kümelenmesini azaltır. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak ölmelerine yol açar ve savunma sisteminde rol oynar (10).



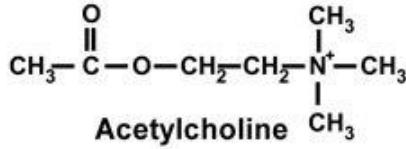
Şekil 3: Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu (10).

Endotelial Nitrik Oksid'in etkileri:

- Direkt vazodilatasyon
- İndirekt vazodilatasyon (vazokonstriktör ajanları inhibe ederek)
- Anti-trombotik etki (vasküler endotelde trombosit adezyonunun inhibisyonu)
- Anti-inflamatuar etki (vasküler endotelde lokosit adezyonunun inhibisyonu)
- Anti-proliferatif etki (düz kas hücre proliferasyonu inhibisyonu) (11).

b-Asetilkolin (Ach):

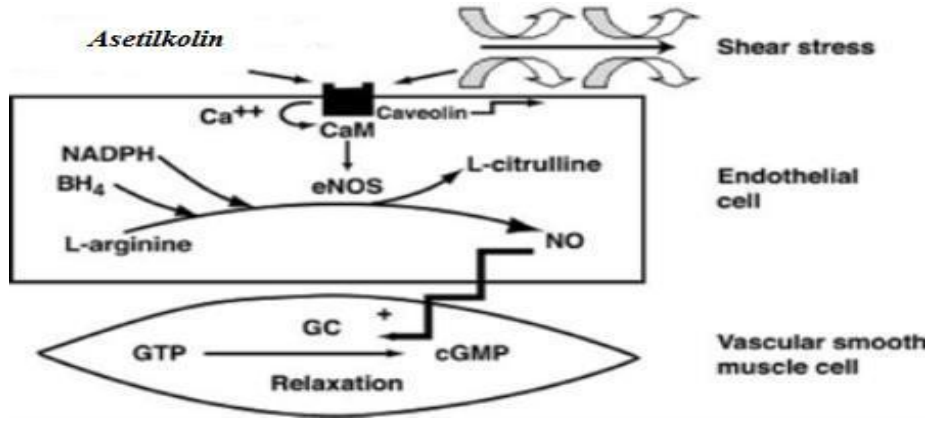
Asetilkolin parasempatik sistemin nöromediatörüdür. Formülü $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ olan asetilkolin, asetik asit ile kolin'in esteridir (Şekil 4). İlk kez 1914 yılında İngiliz bilim adamı Henry Hallet Dale tarafından tanımlanmış, 1921 yılında ise Avustralyalı bilim adamı Otto Lewi tarafından, kurbağa kalpleri üzerinde yaptığı deneyler sonucu bir nörotransmitter olarak doğrulanmıştır.



Şekil 4: Asetilkolin strüktürel formülü.

Asetilkolin belli nöronlarda kolin asetil transferaz enzimi tarafından, kolin ve asetil-CoA'dan sentez edilir. Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi yardımıyla kolin ve asetat'a (asetik asit tuzu) çevrilerek yıkılır. Etkisi kısa sürelidir.

Asetilkolin indirekt etki ile vazodilatasyon oluşturmaktadır. Muskarinik reseptöre bağlanarak eNOS tarafından sentezlenen NO'nin salıverilmesine neden olur. Hızla damar düz kas hücrelerine geçen NO, guanilat siklazı aktive ederek cGMP'yi artırır ve gevşeme oluşturur (12,13). (Şekil 5).

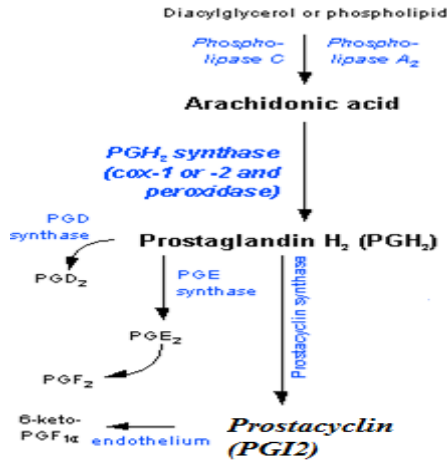


Şekil 5: Asetilkolin etki mekanizması

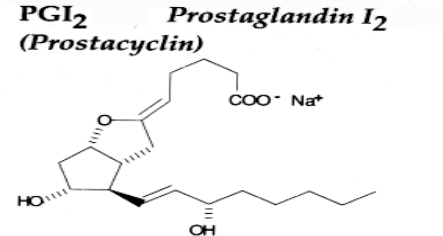
Asetil kolinin endotelial kaynaklı kuvvetli vazodilatör ajan olan prostasiklin (PGI_2) sentezi üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir. Kamata ve arkadaşlarının diabetik ratlarda yaptığı çalışmada asetil kolinin indüklediği endotele bağlı vazodilatasyonu prostasiklinin tarafından düzenlendiğini göstermiştir (14). Asetil kolin ayrıca ekstrasellüler Ca^{+2} akımını arttırarak (G proteini aracılığı ile) prostasiklin salınımı uyarmaktadır (15).

c-Prostasiklin (PGI_2 = Prostaglandin I_2):

Prostasiklin endotelial hücrelerde araşidonik asid metaboliti olan prostaglandin H_2 'den prostasiklin sentaz enzimi yardımıyla üretilir (Şekil 6 ve 7). Endotelial hücrelerden salınan prostasiklin, G protein reseptörleri üzerinden etki göstererek cAMP üretimine yol açar. cAMP protein kinaz A (PKA) ile etkileşime girer, böylece düz kas hücrelerinde relaxasyon ve vazodilatasyon oluşur. Şiddeti raynould fenomeni, extremite iskemisinde vazodilatör olarak ve pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılır (16, 17).



Şekil 6: Prostasiklin sentez mekanizması



Şekil 7: Prostasiklin strüktürel formülü

Prostasiklin esas olarak akciğerlerde ve damar endotelinde oluşur. Katabolizması diğer prostaglandinlerin aksine pulmoner yataкта olmayıp nonenzimatik hidrolizle karaciğerde olur. PGI₂ yarı ömrü kısa olup 2,7 dakikadır. Metaboliti 6 keto PGF_{1α}'dır.

Ayrıca trombosit agregasyonunun en güçlü endojen inhibitörüdür. Bu etkisinde de adenilat siklazı aktive ederek cAMP düzeylerinde artışa neden olur (18). Prostasiklin ve PGE₂ adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salıverilmesini inhibe ederek indirekt vazodilatör etkide meydana getirebilirler.

Serebral aterosklerozlu hastalarda yapılan çalışmada silostazol tedavisi sonrası tromboxan A₂ düzeyinde azalma, prostasiklin düzeyinde artma saptanmıştır (19).

II-Endotelial Disfonksiyon ve Ateroskleroz:

Vasküler dengenin düzenlenmesinde endotel; vazodilatasyon, düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonu, inflamatuvar yanıt inhibisyonu gibi çok önemli etkileri mevcuttur. Bu etkilerinin oluşmasında nitrik oksidin arabuluculuğu vardır. NO üretimi veya aktivitesindeki bir kusur sonucu endotel disfonksiyona yol açar. Bu disfonksiyon ateroskleroz için bir etkindir (20).

Endotelial disfonksiyon kardiyovasküler hastalıkların hassas bir göstergesidir, prognozu belirler ve ateroskleroz gelişimi ile yakından ilişkilidir (21,22).

Ateroskleroz devamlı gelişim gösteren makroskopik olarak normal arterden, belirgin hasarlı, rüptüre plaklı bir damara kadar geniş bir perspektifi olan bir hastalıktır. Ateroskleroz için önemli basamaklar endotelial geçirgenliğin artması, adezyon moleküllerinin salınımı, monositlerin endotel yüzeyine yapışması ve intimaya geçmesi,

köpük hücre oluşumu, yağlı çizgi oluşumu, plak formasyonu ve plak rüptürü ve trombüs oluşumudur (21).

Oksidatif stres endotel disfonksiyonuna yol açar. Bu da NO'nin biyoaktivite ve biyoyararlanımında azalmaya ile sonuçlanır. Oksidatif stres ve endotelial disfonksiyon aterosklerozis için major risk faktörüdür.

B-Fosfodiesteraz Enzimi:

Fosfodiesteraz (PDE) enzimi, ikinci haberci olan cAMP (cylic Adenozin Monofosfat) ve cGMP (cylic Guanozin Monofosfat)'da bulunan fosfodiester bağı parçalar. İnsan vücudunda çeşitli subtipleri izole edilmiştir. PDE inhibitörlerinin tedavide ilk kez kullanılabileceği 1977 yılında Weiss ve Hait tarafından öne sürülmüştür (23).

Fosfodiesteraz inhibisyonu ile oluşan cAMP artışı:

a) Düz kas hücrelerinde; kalsiyum girişini ve migrasyonunu, proliferasyonu ve matrix sentezini inhibe eder.

b) Endotel hücrelerinde cAMP sitümulasyonu; endotelial hücre proliferasyonu, adezyon moleküllerinin salınımının azaltılması (Vasküler cell adezyon molekülü-1=VACM-1), sitokin salınımının inhibisyonu (Monosit kemoattractan protein-1=MCP-1, platelet derived growth factor=PDGF, tümör necrozis faktör- α =TNF- α) ve apoptozin inhibisyonu situmule eder.

c) Trombositlerde ise PDE 2 ve 5 reaktif olmakla birlikte PDE 3 daha önemlidir. cAMP seviyesinin artması serbest kalsiyum iyonlarının plateletlerdeki depo granüllerine geri akımı kolaylaştırmaktadır. Serbest kalsiyum iyonları glikoprotein IIb/IIIa kompleksinin formasyonu için ve tromboxan A2 üretimi için gereklidir (23).

Fosfodiesteraz III enzimi trombositler, kalp kası hücreleri, damar düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve yağ dokusu (adipöz) hücrelerinde daha yoğun olarak bulunmaktadır.

C-Periferik Arter Hastalığı:

I-Tanım:

Lipidler, fibroblastlar, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddeleri değişik oranlarda içeren intimal plaklara bağlı olarak meydana gelen, ilerleyici (progresif) arteriyel darlık ve tıkanmalara, arterlerin esneklik ve antitrombotik özelliklerinin bozulmasına yol açan hastalığa ateroskleroz adı verilmektedir. Ateroskleroz nedenleri tesbit edilip tedavi edilebildiği takdirde durdurulabilen veya geriletilebilen multifaktöryel, morbit ve mortal, sadece koroner damarları değil tüm arteriyel yapıları tutabilen ve etkileyen sistemik bir hastalıktır.

Ateroskleroz yaşamın erken dönemlerinde arteriyel duvarda yağlı çizgilenmeler olarak başlayan ve aterosklerotik plakların oluşmasıyla arter lümeninde daralma ile sonuçlanan patolojik bir süreçtir. Lezyonların yerleşim yerlerine göre anjina, myokart enfarktüsü, periferik tıkaçıcı arter hastalığı ve iskemik inme gibi klinik tablolarla karşımıza çıkabilmektedir.

Uluslararası REACH (The Reduction of atherothrombosis for Continued Health) kayıt çalışmasında (24) aterosklerotik risk faktörleri bulunan hastaların durumları ve tedavisi hakkında veri toplamak üzere yapılmıştır. Semptomatik ve asemptomatik hastalar ele alınmıştır. En sık görülen hastalık grubu koroner arter hastalıkları olmasına rağmen, 3. yılın sonunda vasküler ölüm ve rehospitalizasyon en sık periferik arter hastalığı grubunda görülmüştür.

Periferik arter hastalığı ekstremitelerinin (çoğunlukla femoro-popliteal bölgenin) oklüzyonuna yol açar. Oklüzyonun sebebi genellikle arterlerdeki aterosklerotik değişikliklerdir. Semptomların şiddeti intermittant klodikasyondan (kesik topallama) kritik bacak iskemisine, istirahat ağrısı, ülser, gangrene kadar eşlik edebilir. Eksersiz esnasında klodikasyo meydana gelmesi bacak kaslarının metabolik ihtiyacının arteriyel kan akımı tarafından ateroskleroza bağlı oluşan daralma nedeniyle karşılayamamasıdır. Böylece kas iskemisi meydana gelir. Hastaların başlangıçta yürümeleri normaldir, ancak çok geçmeden bunu sürdüremezler, çünkü kas iskemisi ağrıya neden olur. Yürüme mesafesindeki azalmalar insanların otonomisini, sosyal hayatını ve yaşam kalitesini etkileyerek, günlük yaşamsal aktivitelerinin azalmasına neden olmaktadır.

Alt ekstremit  arterlerinde ateroskleroz



Eksersiz esnasında oksijen sunumunda azalma



Kaslarda Anaerobik metabolizmanın işlemeye başlaması



Laktik asid ve diğ er metabolitlerin birikimi



Alt ekstremit  ağrısı ile sonuçlanır.

II-Etiyoloji:

Periferik arter hastalığının major risk faktörü aterosklerozistir. Aterosklerozis gelişiminde ise bilindiğı gibi sigara kullanımı, diabet, dislipidemi, hipertansiyon ve hiperhomosistinemi etkindir (25).

III-Prevalans ve Doğal Seyir:

Aort bifurkasyonunun distalindeki arterlerin tıkalıcı, aterosklerotik hastalığı olan periferik arter hastalığının batı ülkelerindeki prevalansı, cinsiyete ve yaşı aralığına bağılı olarak % 6,9-21,4 arasında değışmektedir (26).

Asemptomatik periferik arter hastalığı prevalansı ise % 3-10 arasındadır ve 70 yaşı üzerinde bu oran % 15-20 düzeyine ulaşış, Kuzey Amerika ve Avrupa'da 27 milyon insanı etkilediğı tahmin edilmektedir (27, 28).

Periferik arter hastalığı varlığı başı başına bir kötü prognoz kriteridir. On yıllık kardiyovasküler mortalite $ABI < 0,9$ (Ankle-brachial index-ABI) olan erkeklerde % 18.7, kadınlarda %12.6 bulunmuştur. ABI azalması mortalite ile doğıru orantılıdır (29). İntermittant kladikasyonu olan periferik arter hastalarında mortalite oranları, aynı yaşı grubundaki periferik arter hastası olmayan hastalardan 2,5 kat yüksektir (30).

Ness ve arkadaşlarının (31) yaptığı çalışmada ise periferik arter hastalığı tanısı alan kişilerin % 68'inde koroner arter hastalığı, % 42'sinde ise serebrovasküler hastalık eşlik ettiğini göstermiştir.

İntermittant kladikasyon sıklığı hastaların yaşı ile artar. 60 yaşı altındaki hastalarda intermittant kladikasyon sıklığı %3'd r, 60-70 yaşı arasında ise %3-7'dir. İntermittant kladikasyonu hastaların % 75'i stabilize olacaklar veya eksersiz programı veya yaşam

stili değişimi ile semptomları düzelecektir. Diğer çeyrekteki hastalar ise semptomları kötüleşir ve bunların %2-4' major amputasyon gerektirir.

Periferik arter hastalığı mevcut erkeklerde 5 yıllık mortalite prostat kanserinden kötüdür, kolon kanseri ile benzerdir. Bu nedenle PAH tanısı alan hastalar etkin bir tedavi altına alınmalıdır. Bu tedaviler arasında sigara bırakılması, hiperlipidemi tedavisi (LDL<100 mg/dl, Trigliserid 150 mg/dl), hipertansiyon (Kan basıncının <130/85 mmHg) ve diyabetin kontrol altında tutulması (Açlık kan şekerinin 80-120 mg/dl, tokluk kan şekrinin <180 mg/dl, HbA1C < 7%), egzersiz rehalibitasyonu ve antiagregan tedavi (Aspirin, Klopidoğrel, Silostazol) bulunmaktadır (32).

Kritik bacak iskemisi olan (ABI ≤ 0,4) hastalarda primer tedaviye rağmen (medikal tedavi, revaskularizasyon veya primer amputasyon) 1 yıl sonra %25'i hayatlarını kaybeder, %30 amputasyona uğrar, %25 kritik bacak iskemisi devam eder, sadece %25'i kritik bacak iskemisi düzelir (30).

IV-Risk Faktörleri:

Periferik arter hastalığında risk faktörleri olarak; Irk, ileri yaş, erkek cinsiyet, sigara kullanımı, diyabetes mellitus, hipertansiyon, dislipidemi, kronik renal yetmezlik, hiperhomosistinemi, hiperviskosite ve hiperkoagulabilite gösterilmiştir (30).

V-Semptom ve Bulgular:

Periferik arter hastalıklı (PAH) hastaların büyük çoğunluğunda egzersiz kapasitesi ve yürüme mesafesi kısıtlanır. Sonuç olarak PAH azalmış fiziksel fonksiyon ve yaşam kalitesi ile ilişkilidir.

Periferik arter hastalarında semptomlar Fontaine sınıflamasına göre yapılmış olup, kladikasyo intermittant ana semptomudur ve Fontain 2'de yer almaktadır. İntermittant kladikasyonlu hastalarda ağrı, uyuşukluk, kas zayıflığı ve kramplar ortaya çıkmaktadır. (33).

Periferik arter hastalığına sahip 50 yaş ve üzeri popülasyondaki hastalarda ilk klinik başvurusunda %10-35 oranında kladikasyo, %1-2 kritik bacak iskemisi, %40-50 atipik bacak ağrısı ile başvururken ve %20-50'si ise asemptomatiktir. Kritik bacak iskemili hastalarda bir yıl sonra %25'i kardiyovasküler mortalite sonucu kaybedilir, %25'i ampute olur, %50'si sağ ve her iki extremiteye sahiptir. Kladikasyolu

hastaların ise 5 yıl sonraki izlemlerinde %15-30'unda mortalite, %20'sinde ise non-fatal kardiyovasküler olay gelişir. Bu mortalitenin ise %75'i kardiyovasküler nedenlidir (25).

Periferik arter hastalığında karşılaşılan semptom ve bulgular:

-İntemittant Kladikasyo (Kesik Topallama):

Eksersizle ortaya çıkan ve istirahat ile geçen alt ekstremitte ağrısıdır. Bu yakınma ateroskleroza bağlı oluşan kronik arteriyel yetersizliğin önemli bir semptomudur. İntermittent kladikasyo belirli bir mesafe yürümekle ortaya çıkar, kramp tarzındadır ve istirahatla 2-5 dakikada geçer. Zamanla yürüme mesafesi kısalır ve istirahat ağrısı başlar. İlerleyen dönemde ise iskemik ülser ve gangren ortaya çıkar. Alt ekstremitenin en sık tıkalı bölgesi femoroopliteal olduğundan (%50 oranında) intermittent kladikasyo ağrısı uyluk-baldır bölgesindedir (34).

-İstirahat ağrısı:

Damar tıkanıklığının ileri düzeyde olduğu, istirahatte dahi yeterli kan ulaştırılamadığı durumda oluşur. Genelde geceleri başlar, Ayağı yukarı kaldırmakla gelir, daha sonra kalıcı olur, Genelde uçlarda iskemik yara ve gangren ile beraberdir, kesin olarak nabız alınamaz.

-Gangren ve iskemik yara:

-Empotans (Leriche Sendromu):

-Bacaklarda uyuşukluk.

-Baldır kaslarında güçsüzlük ve atrofi.

-Bacaklarda ve ayaklarda soğukluk ve üşüme hissi.

-Ayaklarda renk değişikliği: Havaya kaldırıldığına soluklaşma, indirildiğinde koyu kırmızı renk alması

-Trofik değişiklikler: Bacaklarda ve ayak sırtında tüylerin dökülmesi, ayak tırnaklarının kalınlaşması.

VI-Tanı ve Tedavi:

-Tanı:

Hastaların tipik anamnezi sonrası yapılan nabız muayenesinde alt ekstremitte nabızlarında zayıflama veya alınamaması mevcut periferik arter hastalığını düşündürür.

Nabız muayenesinden sonra yapılması gereken diğer tanı yöntemi ise ABİ ölçmektir. Periferik arter hastalığı sıklığının araştırılmasında en sık kullanılan yöntem

ayak bileği/kol basınç indeksinin (Ankle-brachial index-ABI) ölçülmesidir. Periferik arter hastalığının tanısı için ABI değerinin <0,9 olması kriter olarak kabul edilmektedir. Semptomatik periferik arter hastalığı prevalansı 60'lı yaşlarda %6 düzeylerine yükselmektedir. Periferik arter hastalığının non-invazif tanımlanmasında kullanılan ABI'in 0,90 altında olması %90 sensitif, %95 spesifiktir (35).

Tanıda altın standart ise; oklüzyonun yerini ve yaygınlığını belirlemek ve yapılacak tedaviyi planlamak amacıyla konvansiyonel anjiyografi yapılmalıdır (36).

–Medikal Tedavi:

Periferik arter hastalığının tedavisindeki temel Amaçlar:

- Bölgesel progresyonun önlenmek, semptomların düzelmesini sağlamak ve yürüme kapasitesini arttırmak
- Yaşam kalitesini iyileştirmek
- Total mortalitenin yanı sıra kardiyak ve serebrovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltmaktır.

Girişimsel risklere ve rekonstrüksiyonların (Anjioplasti ve Bypass Cerrahisi) sınırlı etkinliğine bağlı olarak intermittent klodikasyonlu hastalar sıklıkla konvansiyonel olarak tedavi edilmektedir (30). Konservatif tedavide sigaranın bırakılması, egzersiz, kan basıncı kontrolü, anti-platelet tedavi, diyet önerileri, diyabet ve hiperlipidemi tedavisini içermektedir.

Intermittent klodikasyonun medikal tedavisi için birçok çeşitli ajan kullanılmıştır; vasodilatörler, antiplatelet ajanlar, antikoagülanlar, prostaglandin analogları ve diğerleri. Bu ilaçlar çeşitli çalışmalarla femoral ve derideki kan akımını arttırdığı kanıtlanmıştır, bazılarının da antikoagülan ve antiplatelet aktivitesi vardır. Yürüme esnasında ağrının olmaması ilaçların temel amacıdır. Klavuzlara göre kullanılan ilaçların, ağrısız yürüme mesafesi ve maksimal yürüme mesafesinde baz değere göre en aza %30'luk bir artışın sağlanması gerektiği önerilmektedir.

Silostazol maksimal yürüme mesafesini 12-24 haftalık tedavi sonrası %40-60 oranında arttırmaktadır (25).

2007'de yayınlanan TASC II klavuzunun önerisi şu olmaktadır. Öneri 16: İntermittan klodikasyonun medikal tedavisinde;

Klodikasyon semptomlarının azaltılması için 3-6 ay süre ile kullanılan silostazol en seçkin tedavi yöntemidir. Gerek koşu bandı testleri, gerek yaşam kalitesi

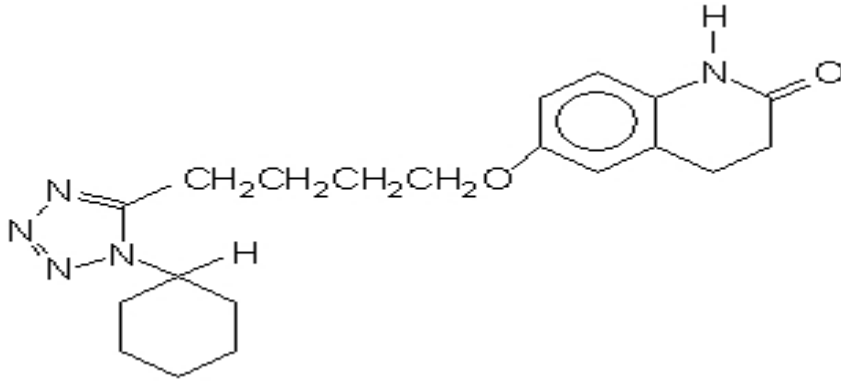
skorlamalarında önemli düzelme sağlamaktadır. Kontrollü veriler Naftidrofuryl'in etkinliğini desteklemekte ancak pentoxifylline etkinliğini ancak minimal olarak desteklemektedir (30).

Tüm tedaviye rağmen kladikasyo intermittantlı hastalarda mortalite (%80'i kardiyovasküler olaya bağlı ölüm olmak üzere), tanıdan sonraki 5 yıl içinde %20'lik ölüm oranı ile oldukça yüksek seyretmektedir (37).

D-Silostazol:

I. Tanım:

Silostazol (Pletaal®, Otsuka Pharmaceutical Co. , Ltd) quinolinone türevi olan spesifik hücrel fosfodiesteraz III A enzim inhibitörüdür (38, 39, 40). Moleküler formülü $C_{20}H_{27}N_5O_2$ ve moleküler ağırlığı 369,46'dır. Silostazol (6-[4-(1-Cylohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxyl]-3,4-dihydro-2(1H)-quiolinone, OPC-13013)'dur (41).(Şekil 8)



Şekil 8. Silostazol Strüktürel Formülü (42).

Silostazol, Japonya ve Asya ülkelerinde 1988'de, Amerika Birleşik Devletlerinde ise 1999 yılında kullanıma giren ve periferik arter hastalığının semptomu olan kladikasyo intermitantın tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (43). Ülkemizde 2006 yılında onay alınarak kullanılmaya başlamıştır.

Bu ilaç vazodilatasyon etkisi olan antiplatelet ve antitrombotik bir ilaçtır (44). Bu trombositlerde ve düz kas hücrelerinde 3'-5'cylic adenosine monophosphate (cAMP) düzeyini arttıran selektif fosfodiesteraz 3 enzim inhibitörüdür ve intrasellüler kalsiyum düzeyinin azaltır ki bu da relaksasyon ve vazodilatasyona yol açar (41). Silostazolün, Pentoxifilin ve plasebo ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarında bu ilacı kullanmakla hastaların %67'sinde ağrısız yürüme mesafesinde artma olduğu, hastaların %50'sinde

ise maksimum yürüme mesafesinde artma olduğu gösterilmiş, bu da yaşam kalitesinde iyileştirmiştir (45).

II. Giriş:

Kladikasyo intermittant sistemik aterosklerozun bir sonucu olarak alt extremité periferik hastalıklarının tipik bir semptomudur. Aterosklerotik lezyonlar periferik arterlerde kan akımını azaltır ve egzersiz veya dinlenme esnasında kasların iskemisine yol açar (46). Bu bulgular ağrı, uyuşukluk, ağırlık hissi veya zayıflıktır, tipik olarak baldır, uyluk veya kalçadadır. Kladikasyo hareketliliği sınırlar ve yaşam kalitesinde büyük etkiye yol açar.

İntermittent kladikasyoda (IC) tedavideki ana hedef vasküler hastalığın ilerlemesini ve kardiyovasküler komplikasyonların gelişmesini önlemektir, semptomlar egzersiz kapasitesini ve yaşam kalitesini azaltır. Cerrahi tedavi genellikle şiddetli ve ilerleyen IC'li hastalarda uygulanır. İntermittent kladikasyo için klasik risk faktörleri sigara içme, hipertansiyon, hiperlipidemi ve diabetes mellitusdur. Çünkü aterosklerozun sistemik doğasıdır, IC'li hastalarda kardiyovasküler (MI) ve serebrovasküler (strok) risk artmıştır (46). İntermittent kladikasyo için primer strateji egzersiz ve risk faktörlerinin azaltılmasıdır, ancak farmakoterapideki amaç kladikasyodaki semptomlarını iyileştirmeye yönelik olarak biraz daha fayda sağlamaktır.

Silostazol, antiplatelet, antitrombotik ve vazodilatasyona yol açan fosfodiesteraz 3 selektif inhibitörüdür (47, 48, 49). Damar düz kas hücresinde antiproliferatif etki yapar (50). Kalp de pozitif inotrop ve kronotrop etkisi olduğu gösterilmiştir (41). Silostazol anlamlı olarak serum trigliserid seviyelerinde azalma, HDL kolesterol seviyelerinde artma yaptığı gösterilmiştir (51). O'Donnell ve arkadaşlarının (52) yaptığı çalışmada ise silostazolun periferik arter hastalığı mevcut olan hastalarda egzersize bağlı inflamatuvar yanıtı ileri derecede azalttığı; lipid hidroperoksit, beta-karoten, P-selektin ve hücre adezyon molekül seviyelerinde anlamlı iyileşme sağladığını göstermişlerdir.

Randomize, çift kör, placebo kontrollü 12-24 hafta 2000 hasta üzerindeki denemelerde orta ve şiddetli kladikasyolu hastalarda silostazol kullanımı ile yürüme mesafesi anlamlı ölçüde arttırmıştır ve placebo ile karşılaştırıldığında yaşam kalitesini iyileştirmiştir. Ayrıca 24 haftalık uzun karşılaştırmalı denemede günde iki kez uygulanan silostazol göstermiştir ki günde üç kez 400 mg uygulanan pentoksifilinden

daha etkilidir (Pentoxifilin'in placebodan farkı yoktur). Silostazolun başlangıç ve mutlak yürüme mesafesindeki arttırmadaki etkisi bilinmektedir, bunlara ek olarak tedavi sonrası ABİ'de düzelme olmaktadır (53).

Intermittant kladikasyonun şiddeti temel olarak ağrısız yürüme mesafesi ile belirlenir (İnitial Claudication Distance-ICD) ve maximum yürüme kapasitesi (Absolute Claudication Distance-ACD) treadmill testi ile standardize edilmiştir (54). ICD ve ACD artma silostazol uygulamasından en az 8 hafta sonra ortaya çıkmaktadır (55).

Silostazol uygulanması sonucunda maksimal yürüme mesafesinde; 50 mg ile 36 metre, 100 mg'lık dozda ise 70 metre artış sağlanmıştır.

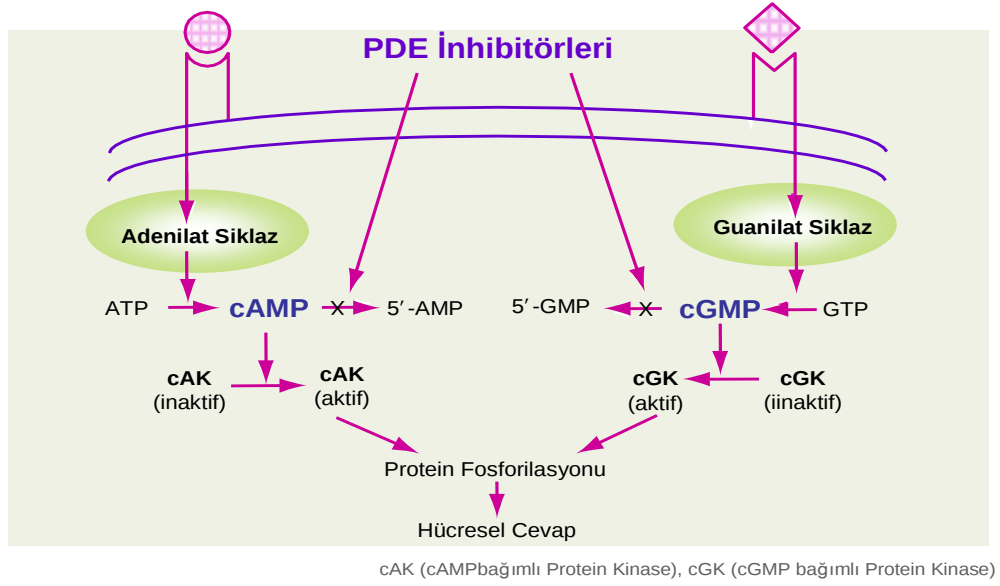
Orito ve arkadaşlarının (56) ratlarda alt extremité arterlerini oklude ederek yaptığı çalışmada, silostazolun tekrarlayan uygulamalarında D_{GD} (Yürüyüş bozukluğu–rahatsızlık gelişmesi) azalttığını göstermiştir. Ayrıca Silostazol kullanmakla kanama komplikasyonlarının getirdiği riski arttırmadan strok riskini azaldığı görülmüştür (57).

Silostazol genelde iyi tolere edilir. Yan etki olarak baş ağrısı, diyare, infeksiyon, rinitis, anormal dışkılama ve periferik ödem rapor edilmiştir. Bu etkiler genelde orta ılımlı şiddetinde, geçici veya semptomatik tedavi sonrası ortadan kalkar veya nadiren tedaviyi bırakırmayı gerektirir. CYP 3A4 (Cytochrome 3A4) veya CYP 2C19 (Cytochrome 2C19) inhibitörü alan hastalarda kontrendikedir.

III. Farmokodinamik Profil:

a. Etki Mekanizması:

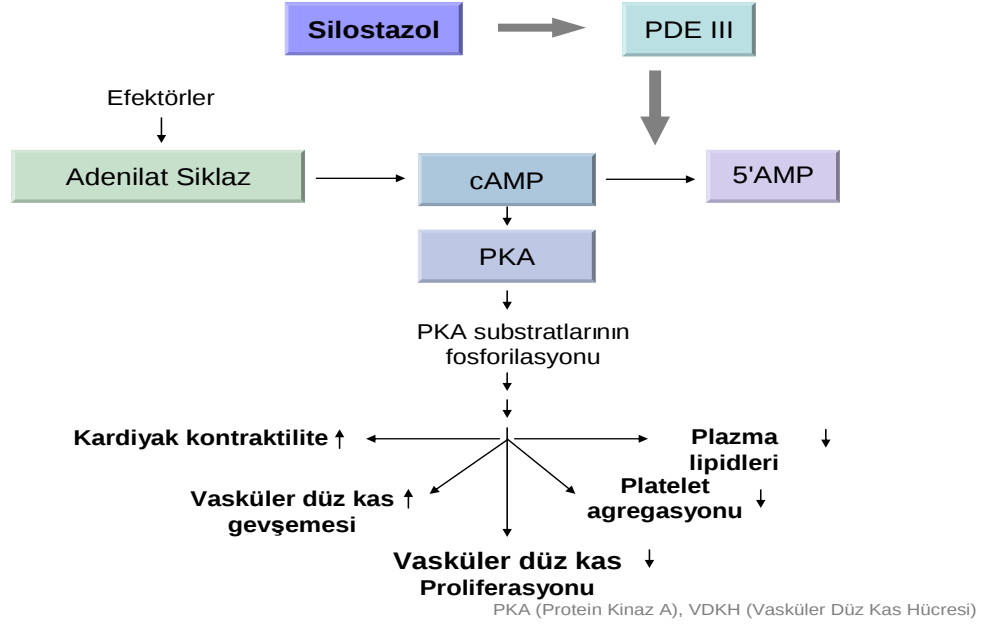
İntermittent kladikasyon semptomlarının düzelmesinde silostazolun mekanizması tam bilinmemekle birlikte, tüm farmakolojik etkilerini alt ekstremité kan akımında artma ve kladikasyon semptomlarında azalma ile yapar (58). Fosfodiesteraz enziminin silostazol tarafından inhibisyonu PDE III' den zengin hücrelerde cAMP seviyelerinde artmaya neden olur (trombositler, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kardiyomyositler ve adipositlerde olduğu gibi) (59,60). (Şekil 9)



Şekil 9: Silostazol Etki Mekanizması (PDE III İnhibisyonu) (61).

cAMP seviyelerindeki bu artış sonucunda:

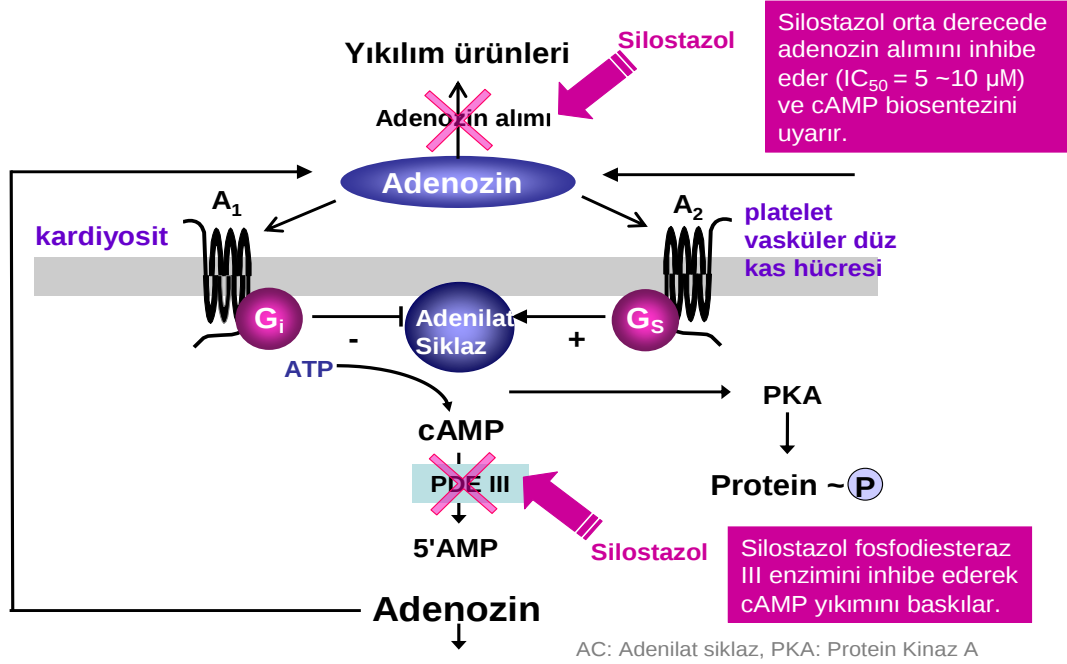
- Platelet (trombosit) agregasyonu inhibe olur.
- Vasodilatasyon oluşur.
- Vasküler düz kas hücre proliferasyonu inhibe olur.
- Kalp atım hızında ve kasılma gücünde artış olur.
- Lipid metabolizmasında iyiye doğru gelişme olur (Şekil 10).



Şekil 10: Silostazol etki mekanizması (PKA üzerinden yürütülen fizyolojik etkiler) (62).

Silostazol hücre içine adenosine alınımını da inhibe eder, intertisiyal ve dolaşımdaki adenosin seviyelerini artırır (63). (Şekil 11).

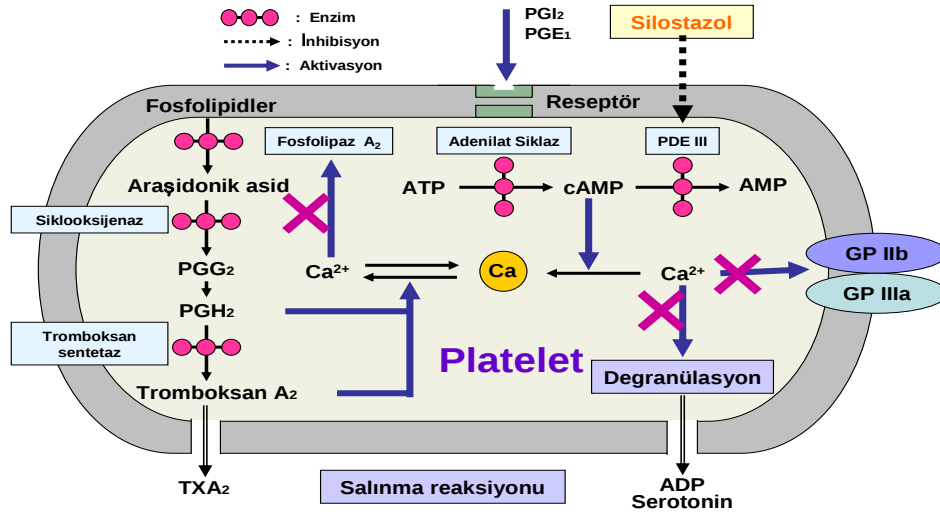
Adenosin alınımının inhibisyonu trombosit ve vasküler düz kas hücrelerinde A_2 reseptörlerini etkiler ve hücre içi cAMP seviyelerini artırır. Adenilat siklaz aktivasyonu ve cAMP seviyelerindeki artış platelet agregasyonunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu engeller. Kardiyak hücrelerde ise A_1 reseptörlerini aktive eder ve bunun sonucunda PDE 3 inhibisyonu nedeniyle oluşan pozitif kronotrop ve inotrop etkilerinde azalma meydana gelir. Böylece adenosin uptake inhibisyonunda yapan silostazolun dual etki mekanizması sayesinde kardiyak etkiler milrinon gibi sadece PDE III üzerinden etki gösteren diğer PDE III inhibitörlerine göre çok daha zayıftır.



Şekil 11: Silostazol etki mekanizması (Adenosin alımının inhibisyonu) (41).

Fosfodiesteraz 3 inhibisyonu sonucunda cAMP seviyeleri artar ve bunun etkisiyle serbest kalsiyum iyonlarının trombositlerdeki depo granüllerine geri girişi kolaylaşır. Böylece serbest kalsiyum iyonlarına bağlı etkiler oluşmaz (Şekil 12). Serbest kalsiyum iyonu şunlar için gereklidir:

- 1- Glikoprotein IIb/IIIa kompleks oluşumu.
- 2- ADP, serotonin gibi agregan bileşikler içeren depo granüllerinin degranülasyonu.
- 3- Tromboxan A₂ yapımı için gereklidir. Çünkü fosfolipaz A₂ kalsiyum tarafından aktiflenir.



Şekil 12: Silostazol etki mekanizması (Hücre içi kalsiyum akışını engeller) (64).

b. Antiplatelet ve Antitrombotik Etki:

İn vitro, ex vivo ve in vivo çalışmalarda silostazolun ADP, kollagen, araşidonik asit, epinefrin, trombin ve duvar gerilimi tarafından indüklenen primer ve sekonder platelet agregasyonunu (kanama zamanını uzatmadan) inhibe ettiği gösterilmiştir. Silostazol ADP tarafından indüklenen ex vivo platelet agregasyonu baskılanmasında anlamlı olarak aspirinden daha potenttir ve araşidonik asidin indüklediği platelet agregasyonundan dolayı antiplatelet etkisi tiklopidinden çok daha fazladır (58, 65). Silostazol ile tedavide; trombositlerden P seletin (Platelet aktivasyon markeri) salınımını baskılar, tromboxan A₂ formasyonu ve Glikoprotein IIb/IIIa kompleksi oluşumu inhibe olur. Silostazolun antitrombotik etkisi aslında antiplatelet etkileri tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir (48).

Silostazolun trombotik komplikasyonları ve restenozu önleyici etkileri mevcuttur (43). Onada ve arkadaşlarının (66) yaptığı çalışmada aspirin ve silostazol kombine terapisi OPCAP (off-pump koroner arter bypass) sonrası hastalarda platelet agregasyonunu azaltmada aspirin monoterapisinden daha efektif olduğunu

göstermişlerdir, bu kombinasyon terapisi OPCAP sonrası hastalarda antitrombotik rejim için yeni bir tedavi opsiyonunu temsil edebilir.

Cleanthis ve arkadaşlarının (67) yaptığı çalışmada silostazol ve aspirin ile kombinasyon tedavisinin egzersiz ile indüklenen platelet agregasyonunu tek başına aspirin tedavisine göre anlamlı derecede daha fazla inhibe ettiği göstermişlerdir. Klopidoğrel ve aspirin ile artmış kanama riski silostazol ve aspirin ile gösterilememiştir.

Shear stersin indüklediği platelet agregasyonunu inhibe eder ve endotel kaynaklı prostasiklin (PGI₂)'nin etkilerini potansiyelize ederek antiplatelet etkisini artırır (68). Ayrıca trombosit fonksiyonlarının geriye dönüşü daha kısadır (69). Adezyon molekülü olan CD62P (P-selectin) plateletlerde üretimi ve salınımını baskılar. P selektinin serebral iskemi/reperfüzyon injurisi ve strokta inflamatuvar ve prothrombojenik evreyi indüklenmesinde katkıda bulunduğu gösterilmiştir (70).

c. Vasodilatör ve Hemodinamik Etkiler:

Nakamura ve arkadaşlarının (71) organ banyosunda yaptığı çalışmada, Silostazol etkisini torasik aortada da ortaya çıkarmıştır, bu yüzden vasküler düz kas hücrelerinde cAMP seviyesinin yükselmesi torasik aortada vasodilatasyon mümkün olmaktadır.

Silostazolun intermittent kladikasyonlu hastalarda arteriyel vasodilatasyon etkisi vardır. cAMP seviyesinde artma ve kalsiyum iyon salınımı blokajı nedeniyle silostazol, düz kas hücrelerinde kontraksiyonu inhibe eder ve vasküler relaksasyona neden olur. (72). Direkt kontraktıl proteinler üzerine etkisi bulunmamaktadır (72). Oral 100 mg gün iki kez kullanımı anlamlı olarak ortalama ayak bileği kan akımını artırır, deri sıcaklığını ve deri kan akımını anlamlı yükseltir (44, 73). Silostazol In vitro vasküler düz kas hücreler tarafından indüklenen Nitrik Oksid (NO) üretimini artırır (71). Cone ve arkadaşlarının (74) tavşanlarda yaptığı çalışmada silostazol vazodilatör etkisini koroner arterlerde de göstermiştir

Silostazol terapodik dozda uygulandığında insan venöz düz kas hücrelerinde de relaksasyona neden olmaktadır (75).

d. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Antiproliferatif Etki:

Silostazol aterosklerozun başlangıcında ve progresyonunu potansiyel olarak önleyebilir, bu da vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engellemesi ile olur (50). Hücresel büyüme faktörlerinin inhibisyon mekanizması tam bilinmemektedir.

İn vitro silostazol uygulanan insan endotelial hücre kültüründe monosit kemoattractan protein-1 (MCP-1) üretim kaybı anlamlı saptanmıştır, MCP-1 aterosklerotik lezyonların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (76).

Silostazol rat karotid arterlerine balon injuri sonrası lokal olarak uygulanması düz kas hücre proliferasyonu ve neointimal formasyonu önlemektedir. Bu da silostazolun sistemik yan etkileri olmadan bypass greftin anastomoz bölgesine lokal uygulanması neointimal formasyonu önleyebileceğini göstermiştir (77). Silostazol başarılı PTCA sonrası hedef lezyon revaskülarizasyon oranlarını ve restenozu anlamlı derecede azaltır (78).

Sonuç olarak vasküler düz kas proliferasyonunun inhibe edilmesiyle myointimal hiperplazinin önlenmesini neden olur (79).

e. Endotel Hücre Üzerine Olan Etkileri:

Organ banyosunda yapılan çalışmada silostazol endotele bağlı relaksasyonu induklemektedir, buna ek olarak düz kasta direkt relaksasyon etkisi mevcuttur (71). Silostazol ayrıca:

- HGF (Hepatosit büyüme faktörü) seviyelerini artırır. HGF neointimal oluşumu inhibe eder ve endotel yenilenmesini artırarak endotelial fonksiyon bozukluğunu düzeltir (80).

- TNF α (Tümör Nekrosis Faktör), VCAM1 (Vascular Cell Adezyon Molekülü) ve IL6 (İnterlökin 6) salınımını inhibe eder (81, 82, 83).

- Yüksek glikoz seviyeleri ile indüklenmiş PDGF (Platelet kaynaklı büyüme faktörü) üretiminin artışını inhibe eder. PDGF seviyesinde artma ateroskleroz gelişiminde önde gelen bir rolü vardır (84).

- Endotel hücresinde cAMP'yi artırarak MCP-1 (Monosit Chemoattractant Protein) yapımını inhibe eder. MCP-1 vasküler inflamasyon ile ilişkilidir ve ateroskleroz gelişimine katkısı vardır (85).

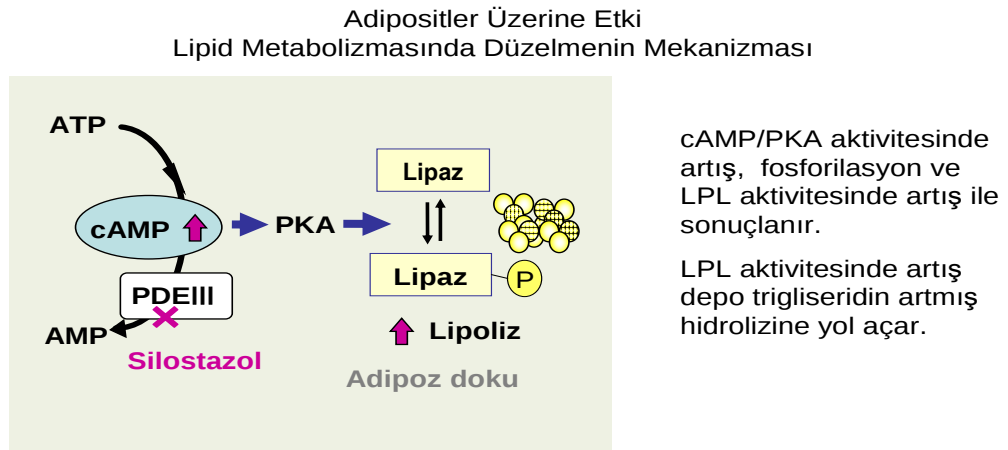
- NO (Nitrik Oksit) konsantrasyonunda artışa neden olur (86).

-LPS (Lipopolisakkartit) ile indüklenen endotel hücre apoptozunu inhibe eder (87).

-Sitokinlerin inhibisyonu (MCP-1, PDGF, TNF α) yol açar.

f. Lipid Etkileri:

Silostazol normal veya yüksek lipit seviyeli intermittent kladikasyonu hastalarda plazma HDL-C (Yüksek dansiteli kolesterol) ve trigliserid seviyeleri üzerine olumlu etkileri vardır. 100 mg günde iki kez alınan silostazol 8-12 haftalık tedavi sonrası HDL-C seviyesinde % 9,5 artma ve trigliserid seviyesinde %15 azalmaya yol açar. Bu ilaç LDL-C (Düşük dansiteli kolesterol) ve total kolesterol üzerine etkisi yoktur, ancak lipoprotein A seviyesini % 6,3 artırır (88, 89). Lipoprotein lipaz salımını artırır (51).



PKA: Protein Kinaz A, LPL: Lipoprotein Lipaz

Şekil 13: Silostazolun lipit metabolizmasında düzelmenin mekanizması (51, 90)

IV. Farmakokinetik Profil:

a. Absorbsiyon ve Dağılım:

Silostazol oral yoldan alımı takiben gastrointestinal sistemden hızlı ve iyi absorbe edilir, son uygulama sonrası maximum plazma konsatrasyonuna (C_{max}) 2,7 saatte ulaşır. Kararlı duruma ulaşması 4 gün içinde olur (91). Silostazol ağırlıklı olarak albumin

olmak üzere %95 ile %98 oranında proteinlere bağlanır. Yağlı yiyecekler ile absorpsiyonu ve emilim oranı artar.

b. Metabolizma ve Eliminasyon:

Silostazol hepatik enzim olan sitokrom P450 (CYP) 3A4 ile kapsamlı olarak metabolize edilir, daha az miktardaki kısmı ise CYP 2C19 ile metabolize olur (92). Ana metabolitleri dehidrocilostazol (OPC-13015) ve monohidroxi-cilostazol (OPC-13213)'dür. Her iki ana metabolitide platelet agregasyonu üzerine etkilidir. OPC-13015 üç kez daha fazla aktiftir ve OPC-13213 silostazolden üç kez daha az potenttir (58). CYP 3A4 ile OPC 13015'e ve CYP 2C19 ile OPC 13213'e metabolize olur (92, 93, 94).

Eliminasyon yarı ömrü 10,5 saattir (91). Eliminasyonu ise %73,8'i idrar ile % 21,7'si ise feçes ile atılır.

c. Özel Durumlar:

Günde iki kez 100 mg uygulanması iki ana metabolitinde yaş ve cinsiyet tarafından etkisi anlamlı değildir (95).

Farmakokinetik etkileri hafif ve orta renal yetmezlikte etkilenmez. Ancak şiddetli renal yetmezlikte plasma konsatrasyonunda ve proteine bağlanmasında değişiklikler olur. Çünkü şiddetli renal yetmezlikte azalan albumin düzeyine bağlı olarak serbest fraksiyonda artma meydana gelir. Bunun için şiddetli renal yetmezlikte silostazol kontendikedir (96).

Silostazol ve metabolitlerinin kapsamlı farmakokinetik etkisi hafif hepatik yetmezlikte değişmez. Orta ve ağır hepatik yetmezlikte kullanımı kontendikedir (97).

Çalışmalarda kardiyak indexi, koroner kan akımı ve kontraktibilitesi düşük olan akut MI'lı hastalarda dahi güvenle kullanılabileceği gösterilmiştir (98).

Silostazol konjestif kalp yetmezlikli hastalarda etkileri bilinmemektedir. Bunun için herhangi bir şiddette olan konjestif kalp yetmezlikli hastalarda kullanılmamalıdır (99, 100).

d. İlaç Etkileşimleri:

CYP3A4 ve CYP2C19'ı etkileyen ilaçların kullanılması silostazolun farmakokinetik etkisini değiştirir, eğer endikasyonu varsa düşük dozlarda verilmelidir.

(eritromisin, diltiazem, ketakonazol, itrakonazol, fluvoxamine, fluoxetine, nefazodone, sertralin, omeprazol v.b.). (58, 98).

Asetilsalisilik asit, klopidoğrel veya tiklopidinde olduğu gibi kanama zamanında uzamaya neden olmaz (101).

Aspirin ve silostazolun birlikte uygulanması koagölasyon parametrelerinde (aPTT, PT), kanama zamanında, platelet agregasyonunda veya plazma konsatrasyonunda anlamlı bir değışikliğe yol açmaz (102). Hemorajik yan etkileri insidansı silostazol-aspirin ve plasebo-aspirin alan hastalarda benzerdir. Benzer olarak warfarin ile birlikte kullanılması farmakokinetik ve farmakolojik etkide değışikliğe yol açmaz (103).

V. Terapötik Etkinlik:

Günde iki kez 100 mg alınan silostazol maksimum yürüme kapasitesi ve ağrısız yürüme kapasitesini arttırır (55, 104). Etkinliği, terapinin başlangıcından en erken 2-4 hafta sonra gözlemlenmektedir. Ancak yararlı etkilerinin ortaya çıkması için 12 hafta kadar zaman gerekebilir.

Silostazolun intermittant kladikasyonlu hastalarda tedaviye yanıtı doza bağılı olarak göstermektedir. Günde iki kez 100 mg kullanılması, maksimum yürüme kapasitesinde 50 mg kullanılmasından daha büyük düzelme sağlamaktadır. Günde iki kez uygulanan tedavi ile dinlenme ABİ’de plasebo ile karşılaştırıldığında anlamlı artma olmuştur (55, 105).

VI. Tolarabilite:

Silostazol genellikle iyi tolere edilir. Yan etkileri 6 haftadan kısa sürede oluşur ancak hastaların %10,3’ünde kesilmesi ile sonuçlanır (60).

Yan etkileri genellikle başağrısı (en sık yan etki), diyare, anormal dışkılama, çarpıntı, taşikardi, ağrı, enfeksiyon, farenjit, rinit, periferel ödem ve mide bulantısıdır. %5 veya daha fazla görülür. Yan etkiler genellikle ılımlı-orta yoğunluktadır, semptomatik tedavi sonrası çabuk düzelirler ve nadir olarak tedavi bıraktırırlar (55, 104).

VII. Dosaj ve Uygulama:

ABD’de ve Avrupa’da günde iki kez 100 mg tavsiye edilir. Sabah kahvaltısı ve akşam yemeğinden 30 dk önce veya iki saat sonra alınmalıdır. Hamilelerde ve emziren kadınlarda kontrendikedir (99).

Sonuç olarak Silostazolun;

- Trombosit aktivasyon ve agregasyonunu inhibe edici,
- Trombozu azaltıcı,
- Düz kas hücre kontraksiyonunu inhibe edici,
- Düz kas hücre proliferasyonunu azaltıcı,
- Bacak kan akımını artırıcı,
- Plasma HDL-C (high density lipoprotein-cholesterol) kolesterol seviyesini artırıcı,
- Plasma trigliserid seviyesini azaltıcı,
- Angiogenezi artırıcı,
- İnflamasyonu azaltıcı etkileri vardır (106).

GEREÇ VE YÖNTEM:

Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (ADÜ-HAYEK) 13 Haziran 2008 tarihli toplantısında, 2008/022 karar sayısı ile etik kurulu onayı alındıktan sonra yapılmıştır.

Biz bu çalışmamızda Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarından elde edilen 36 adet erkek Wistar Albino cinsi Rat kullanıldı. Organ banyosu deneyleri ise Kalp –Damar Cerrahisi Araştırma Laboratuvarında yapıldı (Resim 1).



Resim 1: Kalp Damar Cerrahisi Araştırma Laboratuvarı.

Hayvanlar kendi kafeslerinde tutuldu, yaklaşık 16 haftalık olana kadar standart rat besini ve çeşme suyu kullanılarak beslendi. 12 saatlik gündüz ve gece ritmi uygulandı. Ratların çalışma başlamadan ağırlığı 270-300 gr olarak ölçüldü. Silostazolu intraperiotenal verebilmek için DMSO (Dimethyl sulfoxide) içinde çözündürüldü.

Ratlar daha sonra üç gruba ayrıldı.

1-Kontrol grubu (Grup 1, n: 10): Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir ilaç verilmedi. Organ banyosunda doz cevap eğrileri araştırıldı.

2-DMSO (Dimethyl sulfoxide) grubu (Grup 2, n:10): Bu gruptaki hayvanlara günde iki kez olmak üzere, 6 hafta boyunca intraperitoneal 0,045 ml dozunda dimethyl sulfoxide verildi ve organ banyosunda doz cevap eğrileri araştırıldı. Bu grubun

oluşturulmasındaki amaç DMSO'ya bağlı herhangi bir etkinin olup olmayacağını araştırmaktır.

3-Silostazol + Dimethyl sulfoxide grubu (Grup 3, n:16): Bu gruptaki hayvanlara günde iki kez, 6 hafta boyunca intraperitoneal 0,045 ml dozunda Silostazol (10 mg/kg) + Dimethyl sulfoxide verildi ve organ banyosunda doz cevap eğrileri araştırıldı.

Silostazol'un (Pletal® 100 mg tb-Merck Index; Sıra no 2335) ticari formu kullanıldı. Diğer kimyasal maddeler ticari kaynaktan elde edildi (Sigma-Aldrich Co.). Tabletler önce steril şartlarda ezilerek toz haline getirildi, daha sonra her tablete 1,5 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide D 5879, Sigma-Aldrich) ilave edildi ve Vorteks cihazında (Yellow Line) 2500 devir/dk hızında 5 dakika boyunca karıştırıldı ve tam olarak çözüldüğü görüldü. Eriyik insülin enjektörüne (26 G 0,45x10 mm) alınarak ratlara intraperitoneal verildi (10 mg/kg) (Resim 2).



Resim 2: Ratlara intraperitoneal silostazol verilmesi.

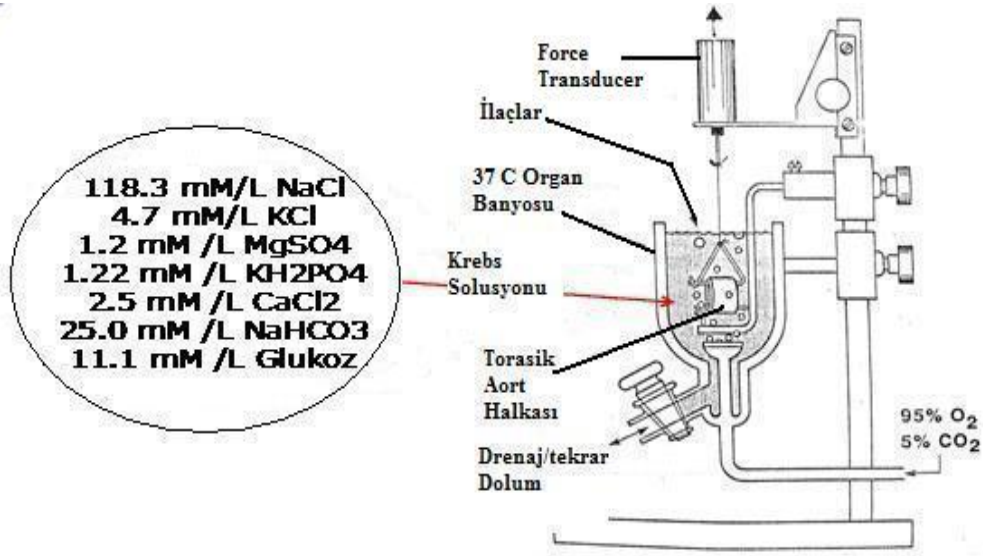
6 haftalık uygulama sonunda eter anestezisi ile tüm hayvanlar dekapite edilip hızlı bir şekilde median sternal yaklaşımla göğüs kafesi açılıp kalp ve akciğerler ayrıldı. Torakal vertebra ile aynı seviyede bulunan torasik aorta, arkus aorta ile birlikte dikkatli ve hızlı bir şekilde çıkarıldı. Aorta binocular loup (3,5x) kullanılarak üzerindeki yağ ve konnektif dokulardan temizlendikten sonra düzgün kesi ile kesilerek eşit uzunlukta izole

aort halkası elde edildi. Bu işlem sırasında endotel dokusuna zarar verilmemeye çalışıldı. Her bir aort segmenti yaklaşık 3-4 mm'lik bir ring halinde kesildi. Bu ringler 37°C 'de ısıtılan ve sirküle edilen (Isıtıcı ve Sirkulator sistem – May WBC 3044V3) , karbojenize (%95 oksijen, %5 karbondioksit) Krebs solusyonuna (118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.22 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25.0 mM NaHCO₃ ve 11.1.mM glukoz, Sigma-Aldrich) zaman geçirilmeden asıldı (107).

Her bir aort ringi iki adet paslanmaz çelik kancadan geçirilerek 25 ml Krebs solusyonu ile dolu organ banyosuna (May IOBS 99 Ankara-Türkiye) asıldı. (Resim 3) ve (Şekil 14).



Resim 3: Organ Banyosu Düzenegi



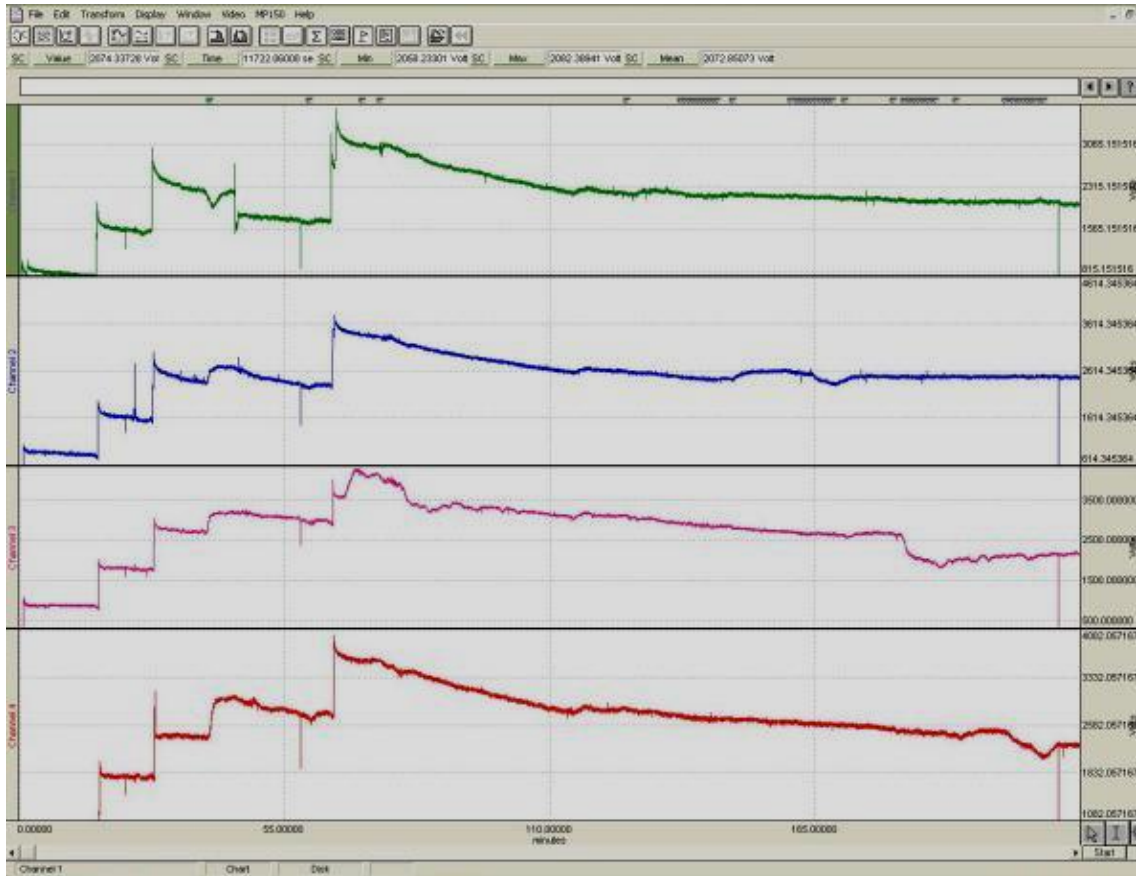
Şekil 14: Organ Banyosu Düzenegi

İki çengelin üstte olanı transducer'a (May GTA0303 ve Biopac Systemes Inc. Model MP 100) bağlanarak mg olarak kasılmaları ölçüldü (108). Bilgisayar programı olarak Acq Knowledge 3.8.2 kullanıldı. Daha sonra her bir aort ringi için standart Equilibrium evresi uygulandı. Burada önce aort ringleri 1 gr ile gerildikten sonra 10 dakika beklendi, sonra gerilim 2 gr'a çıkıldı, 10 dakika beklendi, ardından 3 gr'a çıkıldı ve 10 dakika beklendi. Daha sonra Norepinefrin 10^{-4} M (Molar Konsantrasyon) derişimi banyoya mikropipet yardımı ile 0,1 ml verilerek kasılma yanıtları alındı. Kasılma eğrileri düz seyredince banyo iki kez Krebs solusyonu ile yıkandı. Banyo 4 gr'a kadar gerildi ve stabil oluncaya kadar beklendi. Önce Norepinefrin 10^{-4} M derişiminden 0,1 ml ile kasılma eğrisi alındı ve daha sonra Asetilkolin 10^{-4} M derişiminden 0,1 ml ile gevşeme yanıtları alındı. Son olarak banyo tekrar iki kez Krebs solusyonu ile yıkandı ve deneye başlamak için 45 dakika beklendi. Bu evrelerde kasılma ve gevşeme yanıtları alınmayan banyolar deney safhasına alınmadı (109).

Daha sonra deney safhasına geçildi. Önce norepinefrin 10^{-4} M 0,1 ml her bir banyoya verildi. Banyolarda oluşan kasılma yanıtları gözlemlendi. Oluşan kasılma eğrisinde plato düzeyi oluşup stabil seyretmeye başlayınca hazırlanan asetilkolin derişimleri banyolara verildi. Asetilkolinin önce 10^{-9} M derişiminden 0,1 ml verildi. Gevşeme yanıtı gözlemlendi, bu gevşeme olmamaya başladığından itibaren asetilkolin $3,16 \times 10^{-9}$ M verildi. Yine gevşeme yanıtı sonlandığında diğer derişim olan 10^{-8} M asetilkolin verildi. Böylece (düşük konsatrasyondan yüksek konsantrasyona doğru) sırayla $3,16 \times 10^{-8}$ M, 10^{-7} M, $3,16 \times 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3,16 \times 10^{-6}$ M, 10^{-5} M, $3,16 \times 10^{-5}$ M, 10^{-4} M asetilkolinden her birinden 0,1 ml olmak üzere toplam 11 doz verildi (Tablo II). Her bir dozda oluşan gevşeme yanıtları gözlemlendi ve kaydedildi (Resim 4). Deney tüm rat gruplarında aynı şekilde ve aynı şartlarda yapıldı.

Tablo II: Çalışmada kullanılan Asetilkolin konsantrasyonları

<i>Dozlar</i>	<i>Asetilkolin</i>	<i>Miktar</i>
1.doz	10^{-9} M	0,1 ml
2.doz	$3,16 \times 10^{-9}$ M	0,1 ml
3.doz	10^{-8} M	0,1 ml
4.doz	$3,16 \times 10^{-8}$ M	0,1 ml
5.doz	10^{-7} M	0,1 ml
6.doz	$3,16 \times 10^{-7}$ M	0,1 ml
7.doz	10^{-6} M	0,1 ml
8.doz	$3,16 \times 10^{-6}$ M	0,1 ml
9.doz	10^{-5} M	0,1 ml
10.doz	$3,16 \times 10^{-5}$ M	0,1 ml
11.doz	10^{-4} M	0,1 ml



Resim 4:Doz-cevap eğrilerinin bilgisayar görüntüsü

İstatiksel Analizler:

Tüm denekler mortalite olmaksızın çalışmayı tamamladı ve intraperitoneal enjeksiyon yapılan gruplarda enfeksiyona rastlanılmadı. Deney esnasında miligram olarak bulunan gevşeme değerleri istatistik çalışmaları öncesinde yüzde olarak gevşeme değerlerine dönüştürüldü. Öncelikle maximal kasılma değerleri bulundu, daha sonra her bir doz için gevşeme değerleri bulunarak bu iki değer oranlanarak her bir doz için yüzde gevşeme değerleri hesaplandı.

Bu sonuca göre gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının incelenmesi amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) testinden yararlanılmıştır. Yüzde değerlerinin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi ve dozlara ve gruplara yüzde değerleri normal dağılım gösterdiği için tanımlayıcı

İstatistikler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Çoklu karşılaştırma testi olarak ise Tamhane testi kullanıldı.

İstatistik analizlerde $p < 0,05$ ise sonuç anlamlı kabul edilmiştir. İstatistik analizler için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows Release 15.0, Standard Version paket programı kullanıldı.

BULGULAR:

Gruplardan elde edilen gevşeme yüzdelerine ait tanımlayıcı istatistikler, ortalama $\pm$ standart sapma cinsinden Tablo III ve Tablo IV’de verilmiştir.

Tablo III ve Tablo IV’de çalışma gruplarına göre gevşeme yüzdeleri ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ayrı ayrı verilerek gruplar arasında ortaya çıkan benzerlikler ya da farklılıklar ortalama bakımından açıkça gösterilmeye çalışılmıştır. 0,05’den küçük p (<0,05) değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo III: Kontrol-Silostazol grupları arasındaki tanımlayıcı istatistik ($\bar{X}$ →Ortalama, SD→Standart Sapma)

<i>Dozlar</i>	<i>Kontrol</i> $\bar{X} \pm SD$ (% gevşeme)	<i>Silostazol</i> $\bar{X} \pm SD$ (% gevşeme)	<i>P</i>
1.doz	52,08 $\pm$ 11,88	84,23 $\pm$ 52,79	p>0,05
2.doz	59,74 $\pm$ 11,90	103,23 $\pm$ 65,05	p>0,05
3.doz	65,50 $\pm$ 18,61	116,10 $\pm$ 75,64	p>0,05
4.doz	69,55 $\pm$ 16,48	120,58 $\pm$ 75,55	p>0,05
5.doz	71,65 $\pm$ 15,27	133,47 $\pm$ 83,62	0,031
6.doz	78,84 $\pm$ 11,52	150,09 $\pm$ 89,79	0,019
7.doz	81,55 $\pm$ 18,60	157,48 $\pm$ 94,43	0,018
8.doz	78,75 $\pm$ 18,83	167,15 $\pm$ 99,26	0,009
9.doz	84,30 $\pm$ 14,67	187,35 $\pm$ 104,85	0,004
10.doz	86,61 $\pm$ 12,96	217,29 $\pm$ 99,72	0,001
11.doz	89,17 $\pm$ 9,74	280,42 $\pm$ 99,43	0,001

Tablo III’de görüldüğü gibi, kontrol grubu ile Silostazol grubu arasında asetilkolinin ilk dört dozundan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmuştur. Böylece ilk dört dozdan sonra silostazol verilen ratların aortalarında asetilkoline daha çok gevşeme yanıtı elde edilmiştir.

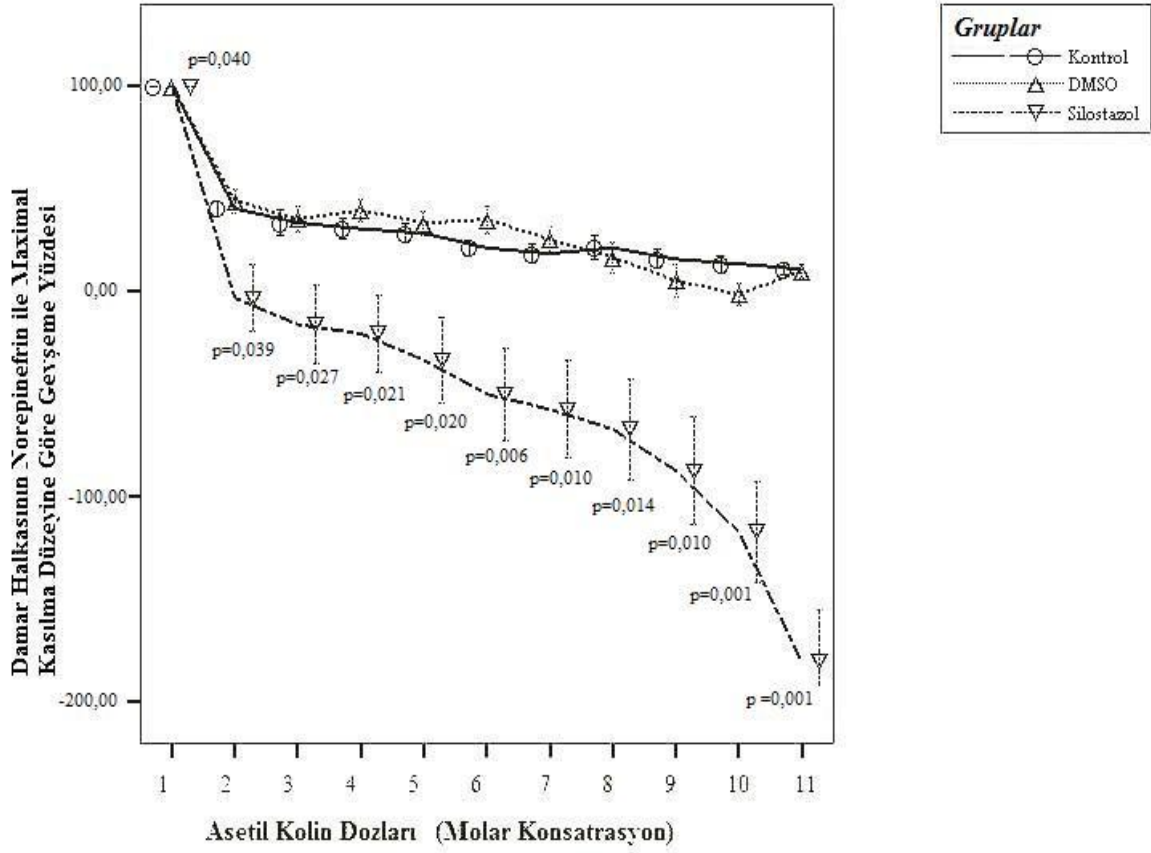
Tablo IV: Kontrol-DMSO grupları arasındaki tanımlayıcı istatistik ($\bar{X}$ →Ortalama, SD→Standart Sapma)

<i>Dozlar</i>	<i>Kontrol</i> $\bar{X} \pm SD$ (% gevşeme)	<i>DMSO</i> $\bar{X} \pm SD$ (% gevşeme)	<i>P</i>
1.doz	52,08±11,88	50,15±15,88	p>0,05
2.doz	59,74±11,90	55,83±18,89	p>0,05
3.doz	65,50±18,61	64,69±19,04	p>0,05
4.doz	69,55±16,48	60,51±16,38	p>0,05
5.doz	71,65±15,27	66,67±17,96	p>0,05
6.doz	78,84±11,52	64,95±21,22	p>0,05
7.doz	81,55±18,60	74,64±20,19	p>0,05
8.doz	78,75±18,83	83,40±23,50	p>0,05
9.doz	84,30±14,67	94,69±24,18	p>0,05
10.doz	86,61±12,96	101,47±17,99	p>0,05
11.doz	89,17±9,74	90,08±10,03	p>0,05

Tablo IV’de görüldüğü gibi, Kontrol ve DMSO grubundaki rat aortalarının asetilkoline verdiği gevşeme yanıtları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

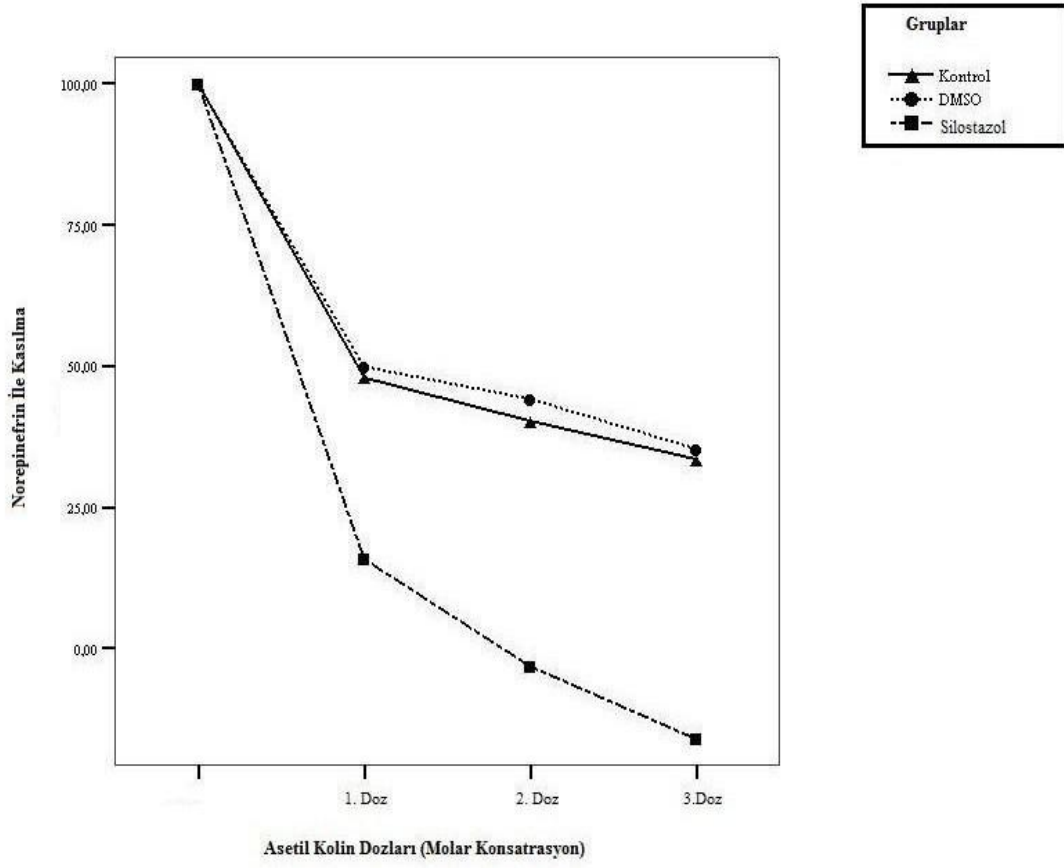
Ancak 5. asetil kolin dozundan sonra silostazol grubu, her iki gruptan anlamlı derecede farklı gevşeme yüzdesine sahiptir. Bu anlamlı farklılık 9. asetilkolin dozundan sonra iyice belirginleşiyor ve 10-11. dozlarda p değeri minimal değere inmiştir, p değeri 0,001 bulunmuştur. Bu da asetilkolin dozlarında değişiminin artması ile silostazol grubunda gevşeme yüzdelерinde büyüme olduğu yani vazodilatasyona eğilimi belirgin derecede arttırdığını göstermektedir. Tablo III’de görüldüğü gibi silostazol verilen ratlarda gevşeme yüzdesi kontrol grubundan anlamlı derecede farklıdır (p<0,05). Ancak kontrol (1. grup) ve DMSO (2. grup) verilen çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Gevşeme yüzdelерinin grafiksel görünümü şekil 15’de gösterilmiştir. Şekil 15’de görüldüğü gibi silostazol rat aortalarında diğer iki gruba göre daha fazla oranda gevşeme sağlamışlardır. Buda bu ilacın anlamlı derecede vazodilatasyon yaptığını göstermektedir.



Şekil 15: Gruplarda Asetilkolin kümülatif dozlarına göre oluşan gevşeme yüzdeleri

Silostazol grubu ikinci asetilkolin dozundan sonra %100'den fazla bir oranda gevşeme (%103,23) sağlamıştır. Yani damar halkasının bazal tonusunun altında olan bir vazodilatasyona neden olmuştur. Son dozda bu gevşeme (vazodilatasyon) % 280,42 düzeyine ulaşmıştır. Gevşeme oranının ikinci dozdan sonra %100'ü geçmesi damar halkasının bazal başlangıç tonusunda altında vazodilatasyona uğradığını gösterir. Diğer iki çalışma grubunda ise hiç bir asetilkolin dozunda damar halkası %100 sınırını geçmemiştir, dolayısıyla bazal tonusun altında vazodilatasyona uğramamıştır. Şekil 16'da asetil kolinin ilk üç dozu sonrası oluşan gevşeme yüzde değerlerinin grafiksel görünümü verilmiştir.



Şekil 16: Gruplara göre Asetilkolinin ilk üç dozu sonrası oluşan gevşeme yüzde değerlerinin grafiksel görünümü.

TARTIŞMA:

Periferik arter hastalarında semptomlar Fontaine sınıflamasına göre yapılmış olup, kladikasyon intermittant ana semptomdur ve Fontain 2’de yer almaktadır. İntermittant kladikasyonlu hastalarda ağrı, uyuşukluk, kas zayıflığı ve kramplar ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda hedef, hastalığın ilerlemesini durdurmak, kan akımını arttırmak, ağrıyı azaltmak ve ülser-gangrenleri önlemektir. Bu amaçla kullanılan tedavi seçenekleri; fizik terapi, farmakolojik tedavi, cerrahi ve non operatif müdahalelerdir (33).

Silostazol periferik arter hastalığının ana semptomu olan intermittent kladikasyonun farmakolojik tedavisinde kullanılan fosfodiesteraz 3 enzim inhibitörüdür. Bu ilacı kullanmakla ağrısız yürüme mesafesinde ve maximal yürüme mesafesinde artma meydana gelmektedir (110). Buda ilacın temel etkilerinden olan vazodilatasyon oluşturmaya bağlıdır (41).

Bu çalışmadaki amacımız silostazolun vasküler reaktivite üzerine olan etkisini araştırmak idi. Bu amaçla intraperitoneal olarak 6 hafta boyunca silostazol verilen ratların aortasını çıkartılarak ve bu aortaların organ banyosu düzeneğinde endotele bağlı vazodilatasyon üzerine olan etkisini incelenmiştir. Deneylerden elde edilen sonuçlarda silostazolun kontrol grubuna göre vazodilatasyon üzerine etkisinin anlamlı derecede farklı olduğu, ileri derecede vazodilatasyon oluşturduğu ispatlanmıştır. Özellikle bu vazodilatasyon asetilkolinin yüksek konsantrasyonlarına doğru belirginleşmiş ve silostazol grubunda (grup 3) bazal tonusun altında gevşeme yüzdeleri elde edilmiştir. Bu etkinin silastazole bağlı olup olmadığını ayırmayı yapmak amacıyla silastazolün içinde çözündüğü DMSO ayrıca ratlara verilmiş ve bu ratların aort halkalarının gevşeme yanıtlarına bakılmıştır. DMSO verilen ratlar ile kontrol grubundaki ratların aort halkalarının gevşeme yanıtları arasında bir fark oluşmamıştır (Tablo IV, Şekil 15). Bu bulgu, bize DMSO’nun vasküler reaktivite üzerinde bir etkisinin olmadığını, silastazol verilen ratların aort halkalarındaki asetilkoline bağlı gevşeme yanıtlarının daha fazla olmasında silastazolün kendisinin etkisi olduğunu kanıtlayan bir bulgudur.

Endotel kaynaklı vazodilatasyonda endotelden salgılanan PGI₂ ve NO önemli rol oynamaktadır. Asetilkolin, endotel hücrelerinden NO ve PGI₂ salgılanmasına yol açarak damar düz kas hücrelerinde vazodilatasyona neden olduğu bilinmektedir. Nitrik Oksid salınımını artırması damar düz kasında gevşemeye yol açmaktadır (12,13). Asetilkolinin ayrıca kuvvetli vazodilatör ajan olan prostasiklin üzerine etkiside

mevcuttur. Rat akciğerlerinde yapılan çalışmada asetilkolinin verilmesinin muhtemelen siklooksijenaz yolu üzerinden prostasiklin (PGI_2) sentezini arttırarak vazodilatasyon yaptığı öngörülmüştür (111). Yapılan bazı çalışmalarda asetilkolinin prostasiklin salınımına katkısı gösterilmiştir (14, 15).

Silostazol fosfodiesteraz 3 enzim inhibisyonu ile cAMP seviyesinde yükselme oluşturmaktadır, ayrıca kalsiyum iyon salınımını da engeller. Bunun sonucunda vasküler düz kas hücresinde vazodilatasyona yol açar (71, 72, 74). Silostazolun diğer bilinen etkisi vasküler düz kas hücreleri tarafından indüklenen nitrik oksid (NO) üretiminde artma oluşturduğudur (71, 86).

Silostazol ayrıca prostasiklin etkisini arttırmaktadır (Vazodilatasyon ve antiagregan etki). Serebral aterosklerozlu hastalarda yapılan çalışmada silostazol tedavisi sonrası tromboxan A_2 düzeyinde azalma, prostasiklin düzeyinde artma saptanmıştır (19). Prostrasiklin etkisi cAMP üzerinden gösteren kuvvetli bir vazodilatatör ajandır. Tüm bu etkilerin sonucunda silostazolun vazodilatasyon etkisi belirginleşmektedir.

Prostrasiklin ve PGE_2 adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salıverilmesini inhibe ederek indirekt vazodilatör etkiye meydana getirebilmektedirler.

Böylece silostazol alan grubumuzda artan NO ve PGI_2 seviyeleri torasik aort halkasında daha fazla vazodilatasyona yol açmış olabilir.

Silostazol vazodilatasyonu, endotelden vazodilatatör ajanların salgılanmasını sağlayarak, ayrıca direkt vasküler düz kaslar üzerine olan etkisi sonucunda da yapmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları göstermiştir ki silostazol endotele bağlı relaksasyonu indüklemektedir. Buna ek olarak direkt düz kasta vazodilatasyon etkisi mevcuttur (vasküler düz kas hücrelerinde cAMP arttırması). Silostazol alan deney grubunda (Grup 3) oluşan ve bazal tonusunda altına inen ileri derecedeki vazodilatasyondan yukarıda açıklanan birkaç faktöre bağlı olabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER:

Bu çalışmada, silostazolün damarda endotele bağlı vazodilatasyon oluşturan vazodilatatör ajanlara olan duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Silostazol cAMP düzeyinde artmaya neden olarak vazodilatasyon etkileri mevcuttur. Silostazol ayrıca endotel kaynaklı PGI₂-Prostasiklin düzeyinde artmaya neden olmaktadır (Vazodilatasyon ve antiaggregan etki). Endotel kaynaklı vazodilatasyonda endotelden salgılanan PGI₂ ve NO önemli rol oynamaktadır. Asetilkolin, endotel hücrelerinden NO ve PGI₂ salgılanmasına yol açarak damar düz kas hücrelerinde vazodilatasyona neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmamızda, Silostazol, damarın endotele bağlı vazodilatatör ajanlara duyarlılığını arttırmıştır. Silostazol bu etkisini, doğrudan cAMP üzerinden ve endotelial kaynaklı vazodilatatörlerin (NO ve PGI₂) bazal salınımını arttırmak suretiyle göstermiş olabilir. Silostazolün etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bu çalışma periferik arter hastalığının ana semptomu olan ve hastaların yaşam kalitesinde düşmeye yol açan klodikasyo intermittant tedavisinde etkin olarak kullanılan silostazolün etki mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir katkı sağlamıştır.

ÖZET:

SİLOSTAZOLUN ENDOTELE BAĞLI VAZODİLATASYON ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Amaç: Silostazol etkisini fosfodiesteraz 3A enzim inhibisyonu ile cAMP artışına yol açan, vazodilatasyon etkisi olan antiagregan ve antitrombotik olan bir ilaçtır. Periferik arter hastalığında kullanımı ile ağrısız yürüme mesafesinde (%67) ve maximal yürüme mesafesinde (%50) artış sağlanmaktadır. Bu çalışmada amaç, silostazolün vasküler reaktivite üzerine olan etkisinin araştırmak idi. Bu amaçla, çalışmamızda intraperitoneal silostazol verdiğimiz ratların torasik aortalarını çıkartarak organ banyosundaki endotele bağlı vazodilatasyon üzerine olan etkisini inceledik.

Materyel-Metod: Çalışmamızda 36 adet erkek Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratların torasik aortaları organ banyosunda çalışıldı. Ratlar üç gruba ayrıldı. Grup 1: Kontrol grubu (n=10) Herhangi bir medikasyon uygulanmadı. Grup 2: DMSO grubu (n=10), Sadece intraperitoneal DMSO verildi (Silostazol, DMSO içinde çözündürüldü). Grup 3: Silostazol+DMSO grubu (n=16), İntraperitoneal 10 mg/kg dozunda, günde iki kez ile 12 saat ara, 6 hafta süre ile Silostazol+DMSO verildi. Ratlar dekapite edildikten sonra torasik aortaları çıkarıldı. Aortadan 3-4 mm uzunlukta damar segmentleri intimal yüzeyine dokunmamaya dikkat edilerek halka şeklinde hazırlandı. Krebs solüsyonu (37°C, %95 O₂, %5 CO₂, pH 7.4) ile dolu organ banyolarına (20 mL) asıldı. Damar halkaları, 10⁻⁴M (molar) norepinefrin derişimi 0,1 ml ile kasıldıktan sonra endotele bağlı vazodilatasyon asetilkolin (cGMP üzerinden vazorelaksasyon) ile doz-cevap eğrileri (toplam 11 doz) alınarak çalışıldı.

Bulgular: Silostazol verilen grupta elde edilen yüzde olarak gevşeme değerleri, asetilkolinin tüm molar konsantrasyonundan alınan gevşeme yanıtlarında (toplam 11 doz) kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı olduğu görüldü (p<0,05). Silostazol grubu ilk 3 Asetilkolin dozundan sonra damar halkasında bazal tonusun altında gevşeme yüzdesine ulaştı. Diğer iki grupta bazal tonusun altında gevşeme olmadı. Kontrol ve DMSO grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Sonuç: Silostazol cAMP düzeyinde artmaya neden olarak vazodilatasyon etkileri mevcuttur. Silostazol ayrıca endotel kaynaklı PGI₂-Prostasiklin düzeyinde artmaya

neden olmaktadır (Vazodilatasyon ve antiaggregan etki). Endotel kaynaklı vazodilatasyonda endotelden salgılanan PGI_2 ve NO önemli rol oynamaktadır. Asetilkolin, endotel hücrelerinden NO ve PGI_2 salgılanmasına yol açarak damar düz kas hücrelerinde vazodilatasyona neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmamızda, Silostazol, damarın endotele bağlı vazodilatatör ajanlara duyarlılığını arttırmıştır. Silostazol bu etkisini, doğrudan cAMP üzerinden ve endotelial kaynaklı vazodilatatörlerin (NO ve PGI_2) bazal salınımını arttırmak suretiyle göstermiş olabilir. Silostazolün etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Silostazol, periferik arter hastalığı, vazodilatasyon, asetil kolin, prostasiklin.

İletişim Adresi: Dr.Nail SİREK

Adnan Menderes Üniversitesi Kalp-Damar Cerrahisi Kliniği, AYDIN.

SUMMARY:

THE EFFECT OF CILOSTAZOL OVER ENDOTHELIUM DEPENDENT VASODILATATION

Aim: Cilostazol is an agent bearing antiaggregant and antithrombotic properties acting via cAMP increment through inhibition of phosphodiesterase 3A. Cilostazol treatment results in an increase in claudication free walking distance (%67) and maximum walking distance (%50) in peripheral arterial disease. The aim of this study is to investigate the effect of cilostazol over vascular reactivity. In this study we extracted the thoracic aorta of the rats which were given intraperitoneal cilostazol and examined the endothelium dependent vasodilatation in organ bath.

Material and Methods: 36 male Wistar Albino rats were included in the study. Thoracic aorta of the rats examined in organ bath. Rats were randomized into three groups. Group 1: Control group (n=10) no medication was applied. Group 2: DMSO group (n=10) (cilostazol was dissolved in DMSO). Group 3: Cilostazol+DMSO group (n=16), intraperitoneal cilostazol+DMSO 10 mg/kg was given twice a day (12 hours between each dosage) to 6 weeks. Then rats were decapitated and thoracic aorta were extracted. Aortic rings each 3-4 mm length were prepared by paying meticulous care for not touching to the intimal surface. Aortic rings were immersed tissue bath (20 ml) containing Krebs solution (37°C, %95 O₂, %5 CO₂, pH 7,4). Vasoconstriction in aortic rings were induced by means of treating them with 0,1 ml (10⁻⁴ molar) norepinephrine solution and then dose-response to acetylcholine induced endothelium dependent vasodilatation (vasorelaxation via cGMP) was studied (11 dosage as a whole).

Findings: The percent of relaxation for each relaxation response at any dosage of molar acetylcholine concentration (total 11 dosage) in cilostazol group was significantly different (p<0,05) as compared with control group. The percentage of vasodilatation in vascular ring after the first 3 acetylcholine dosage was beyond the basal vascular tonus. However, there was no significant difference between control and DMSO groups.

Results: Cilostazol causes vasodilatation by increasing the levels of cAMP. Cilostazol also leads to increased levels of endothelium derived PGI₂-Prostacyline

(vasodilatation and antiaggregant activity). PGI₂ and NO which are secreted from endothelium play an important role in endothelium derived vasodilatation. Acetylcholine is known to produce vasodilatation by relaxation of vascular smooth muscle cells through inducing NO and PGI₂ secretion from endothelial cells. In this study we observed that cilostazole increases the sensitivity of endothelium to vasodilator agents. This effect of cilostazole may occur either directly through increase of cAMP levels or via triggering the basal secretion of endothelium derived vasodilators (NO and PGI₂). Further studies are needed for understanding the exact mechanism of cilostazole.

Key words: Cilostazole, peripheral arterial disease, vasodilatation, prostacycline.

Correspondence address: Nail SİREK. MD.

ADÜ Faculty of Medicine Department of Cardiovascular Surgery, AYDIN

KAYNAKLAR:

- 1-Rudherford RB. Vaculer Surgery Sixty Edition. Elservier Saunders, 2005: 582.
- 2-Peety RG, Pearson JD. Endothelium the axis of vascular health and disease. J R Coll Physicians 1989; 23: 92-101.
- 3-Weintraub W. The vascular effect of cilostazol. Can J Cardiol 2006; 22: 56-60.
- 4-Torun E, Bayram F. Endokrin Bir Organ Olarak Endotel ve Endotelinin Hipertansiyondaki Rolü. Erciyes Tıp Dergisi 2004; 26: 126-131.
- 5-Emre M, Özcal I, Şan M. Endoteldeki İyon Kanalları ve İşlevleri. Erciyes Tıp Dergisi 2004; 26: 186-193.
- 6-Anderson T J. Assessment and Treatment of Endothelial Dysfunction in Humans. Journal of the American College of Cardiology 1999; 34: 631-638.
- 7-Şan M. Endotel ve Sistemlerimiz, İstanbul. Printaş Basım AŞ, 2005: 8-50.
- 8-Murad F. Discovery of some biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. Bioscience Reports 1999; 19: 133-154.
- 9-Büyükaşar K. Nitrik Oksitin Farmakolojisi. Türk Farmakoloji Derneği, Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı Mersin. Mayıs 2005. Seminer Özetleri.
- 10-Özkan M. Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. Toraks Dergisi 2003; 4: 88- 94.
- 11-Richard E. Cardiovascular physiology concepts, a textbook published by Lippincott Williams&Wilkins 2005.
- 12-Brown JH, Taylor P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddo RW, Gilman AG (eds). Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of therapeutics 9 th edit. Ch 7. New York: McGraw Hill, 1995. pp. 141-160.
- 13-Dural ÖA. Farmokoloji. Nobel Tıp Kitapevi, 2002: 80-81.
- 14-Kamata K, Hosokawa M, Matsumoto T, Kobayashi T. Acetylcholine-induced vasodilatation in the perfused kidney of the streptozotocin induced diabetic rat: role of prostacyclin. J. Smooth Muscle Res. 2006; 42: 159-170.
- 15-Kan H, Ruan Y, Malik U. Signal Transduction Mechanism Involved in Prostacyclin in Coronary Endothelial Cells of Rabbit Heart. J Pharmacol Exp Ther. 1997; 282: 113-122

- 16-Palevsky HI, Long W, Crow J, Fishman AP.** Prostacyclin and acetylcholine as screening agents for acute pulmonary vasodilator responsiveness in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1990; 82: 2018-2026.
- 17-Shimokawa H, et al.** Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 95: 1197-1203.
- 18-Vane JR, Botlin RM.** Pharmacodynamic profile of prostacycline. *Am J Cardiol.* 1995; 75: 3A-10A.
- 19-Nagakawa Y, Onuki Y, Orimo H,** Effect of cilostazol on arachidonic acid metabolism. *Jpn. Pharmacol Ther.* 1986; 14: 6319-6324.
- 20-Davignon J, Ganz P.** Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: III-27-III-32.
- 21-Gale J, Quasching T, Seibold S, Wanner C.** Endothelial dysfunction and inflammation: What is the link? *Kidney International* 2003; 63; 45–49.
- 22-Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrang D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al.** Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1235-1241.
- 23-Park JS, Kim YJ.** The Clinical Effects of Cilostazol on Atherosclerotic Vascular Disease. *Korean Circ J* 2008; 38: 441-445.
- 24-Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, Mas JL, Goto S, Liao CS, Richard AJ, Röther J, Wilson PW; REACH Registry Investigators.** International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis *JAMA* 2006; 295: 180-189.
- 25-Hirsch AT, Haksal ZJ, Hertzner NR.** ACC/AHA 2005 Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 4: 1240-1312.
- 26-Stoffers H, Rinkens P, Kester A, Kaiser V, Knottnerus J.** The prevalence of asymptomatic and unrecognized peripheral arterial occlusive disease. *Int J Epidemiol.* 1996; 25: 282–290.

- 27-**Selvin E, Erlinger TP. Prevalance of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrion Examination Survey, 1999-2000. *Circulation* 2004; 110: 738-743.
- 28-**Hankey GJ, Norman PE, Eikelboom JW. Medical treatment of peripheral arterial disease. *JAMA* 2006; 295: 547-553.
- 29-**Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis Ankle Brachial Index collaboration *JAMA* 2008; 300: 197-208.
- 30-**Norgen L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, on behalf of the TASC II Working Group. Intersociety consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33: S1-75.
- 31-**Ness J, Aronow WS. Prevalence of coexistence of coronary artery disease, ischemic stroke, and peripheral arterial disease in older persons, mean age 80 years, in an academic hospital-based geriatrics practice. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47: 1255-1256.
- 32-**Türk Kalp Damar Cerrahisi Derneği Periferik Arter ve Ven Kılavuzu 2008.
- 33-**Hashuguchi M, Ohno K, Saiot R. Studies on the effectiveness and safety of cilostazol, betaprost sodium, prostaglandin E1 for the treatment intermittent claudication. *The pharmaceutical society of Japan* 2004; 124(6): 321-332.
- 34-**Bozkurt A.K, Kanbur E. Kesik topallaması olan hastaların tedavi prensipleri. *Ateroskleroz sempozyum dizisi* 2006; 52: 113-117.
- 35-**Greenland P, Abrams J, Aurigemma P, et al. Prevention Conferance V: beyond secondary prevention: identyfying the high risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosklerotic burden: Writing Group III. *Circulation* 2000; 101: 16-22.
- 36-**Duran E. Kalp ve Damar Cerrahisi. Çapa Tıp Kitapevi 2004. 759-760.
- 37-**Steg PD, Bhatt DL, Wilson PW, D'Agostino Sr R, Ohman EM, Röther J, et al. One year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* 2007; 297: 1197-1206.
- 38-**Umekawa H, Tanaka T, Kimura Y, Hidaka H. Purification of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase from human platelets using new-inhibitor Sepharose chromatography. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 3339-3344.

- 39-**Ascher E. Haymovici's Vascular surgery, fifth edition. 2004 by Blackwell Publishing.185.
- 40-**Ikeda Y. Antiplatelet therapy using cilostazol, a specific PDE3 inhibitor. *Thromb Hemost* 1998; 82: 435-438.
- 41-**Schrör K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2002; 4: 14-19.
- 42-**Bramer SL, Suri A. Inhibition of CYP2D6 by Quinidine and its effects on the metabolism of cilostazol. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 41-51.
- 43-**Rosa MP, Baroni GV, Portal VL. Cilostazol, a Phosphodiesterase III inhibitor: Future prospects for atherosclerosis. *Portal Arq Bras Cardiol* 2006; 87: 221-225.
- 44-**Yasuda K, Sakuma M, Tanabe T. Hemodynamic effect of cilostazol on increasing peripheral blood flow in arteriosclerosis obliterans. *Arzneim- Forsch/Drug Res* 1985; 35: 1198-1200.
- 45-**Thompson P, Zimet R, Forbes WP, Zhang P. Meta analysis of results from eight randomized, placebo-controlled trials on the effect of cilostazol on patients with intermittent claudication. *Am J Cardiol* 2002; 90: 1314-1319.
- 46-**Fernandez Jr BB. A rational approach to diagnosis and treatment of intermittent claudication. *Am J Med Sci* 2002; 323: 244-251.
- 47-**Yasunaga K, Mase K. Antiaggregatory effect of oral cilostazol and recovery of platelet aggregability in patients with cerebrovascular disease. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1189-1192.
- 48-**Kohda N, Tani T, Nakayama S, Adachi T, Marukawa K, Ito R, Ishida K, Matsumoto Y, Kimura Y. Effect of Cilostazol, a Phosphodiesterase III Inhibitor, on Experimental Thrombosis in the Porcine Carotid Artery. *Thromb Res* 1999; 96: 261-268.
- 49-**Shiraishi Y, Kanmura Y, Itoh T. Effect of cilostazol, a phosphodiesterase type III inhibitor, on histamine-induced increase in $[Ca^{2+}]$ and force in middle cerebral artery of the rabbit. *British Journal of Pharmacology* 1998; 123: 869-878.
- 50-**Takahashi S, Oida K, Fujiwara R, et al. Effect of cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: 900-906.
- 51-**Tani T, Uehara K, Sudo T, Marukawa K, Yasuda Y, Kimura Y. Cilostazol a selective type III phosphodiesterase inhibitor, decreases triglyceride and increasing HDL cholesterol

levels by increasing lipoprotein lipase activity in rats. *Atherosclerosis* 2000; 152: 299-305.

52-Donnell ME, Badger S, Sharif M, Makar R, McEneny J, Young I, Lee B, Soong CV. The Effects of Cilostazol on Exercise-induced Ischaemia–reperfusion Injury in Patients with Peripheral Arterial Disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2009; 37: 326-335.

53-Mohler ER, Beebe HG, Salles-Cuhna S, Zimet R, Zhang P, Heckman J. Effects of cilostazol on resting ankle pressures and exercise-induced ischemia in patients with intermittent claudication. *Vasc Med* 2001; 6: 151-156.

54-Dawson DL, Cutler BS, Meissner MH, Strandness DE. Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication. Results from a multicenter, randomized, prospective, double blind trial. *Circulation* 1998; 98: 678-686.

55-Money SR, Herd JA, Isaacsohn JL, Davidson M, Cutler B, Heckman J, Forbes WP. Effect of cilostazol on walking distances in patients with intermittent claudication caused by peripheral vascular disease. *Journal of Vascular Surgery* 1998; 27: 267-275.

56-Orito K, Kishi M, Fujiki H, Nakazawa T, Imaizumi T, Kimura Y, Mori T, Kambe T. A method for evaluating drug effects on intermittent claudication using a treadmill in rats with unilateral hindlimb artery occlusion. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2004; 49: 25-29.

57-Goto S. Cilostazol potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. *Atherosclerosis Supplements* 2006; 6: 3-11.

58-Chapman T.M, Goa K.L. Cilostazol: A Review of its Use in Intermittent Claudication. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 2003; 3: 117-138.

59-Reilly MP, Mohler ER. Cilostazol: treatment of intermittent claudication. *The Annals of Pharmacotherapy* 2001; 35: 48-56

60-O'Donnell M, Badger S, Sharif M, Young I, Lee B, Soong C. The vascular and biochemical effects of cilostazol in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2009; 49: 1226-1234.

61-Essayan M. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) Inhibitors and Immunomodulation. *Biochemical Pharmacology* 1999; 57: 965-973.

- 62-Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi J.** Cilostazol (Pletal®): A Dual Inhibitor of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Type 3 and Adenosine Uptake. *Cardiovascular Drug Reviews* 2001; 19: 369–386.
- 63-Liu Y, Fong M, Cone J, Wang S, Yoshitake M, Kambayashi J.** Inhibition of Adenosine Uptake and Augmentation of Ischemia-Induced Increase of Interstitial Adenosine by Cilostazol, an Agent to Treat Intermittent Claudication. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2000; 36: 351-360.
- 64-Okuda Y, Kimura Y, Yamashita K.** Cilostazol. *Cardiovascular Reviews* 1999; 11: 451-456.
- 65-Minami N, Suzuki Y, Yamamoto M, Kihira H, Imai E, Wada H, Kimura Y, Ikeda Y, Shiku H, Nishikawa M.** Inhibition of shear stress-induced platelet aggregation by cilostazol, a specific inhibitor of cGMP-inhibited phosphodiesterase, in vitro and ex vivo. *Life Sci* 1997; 61: 383-389.
- 66-Onodo K, Ohashi K, Hashimoto H, Okuda M, Shimono T, Nishikawa M, Shimpo H.** Inhibition of platelet aggregation by combined therapy with aspirin and cilostazol after off-pump coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 14: 230-237.
- 67-Cleanthis M, Bhattacharya V, Smout J, Ashour H, Stansby G.** Combined Aspirin and Cilostazol Treatment is Associated with Reduced Platelet Aggregation and Prevention of Exercise-Induced Platelet Activation. *Journal of Vascular Surgery* 2009; 37: 604-610.
- 68-Igawa T, Chijiwa T.** Potentiation of antiplatelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thromb Res* 1990; 57: 617-623.
- 69-Iwamoto T, Kin K, Miyazaki K, Shin K, Takasaki M.** Recovery of platelet function after withdrawal of cilostazol administered orally for a long period. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 348-354.
- 70-Kariyazono H, Nakamura S, Shinkawa T, et al.** Inhibition of platelet aggregation and the release of p selectin from platelets by cilostazol. *Thromb Res* 2001; 101: 445-453.
- 71-Nakamura T, Houchi H, Minami A, Sakamoto S, Tsuchiya K, Niwa Y, Minakuchi K, Nakaya Y.** Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta. *Life Sciences* 69 2001; 1709-1715.

- 72-**Tanaka T, Ishikawa T, Hagiwara M, Onoda K, Itoh H, Hidaka H. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology* 1988; 36: 313-320.
- 73-**Ohashi S, Iwatani M, Hyakuna Y, Morioka Y. Thermographic evaluation of the hemodynamic effect of the antithrombotic drug cilostazol in peripheral arterial occlusion. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1203-1208.
- 74-**Cone J, Wang S, Tandon N, et al. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 497-504.
- 75-**Becker RW, Lusic E, Sohn RL, Kline RA. Effects of Cilostazol on Human Venous Smooth Muscle. *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 1-5.
- 76-**Nishio Y, Kashiwagi A, Takahara N, Hidaka H, Kikkawa R. Cilostazol, a cAMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in response to tumor necrosis factor- α in vascular endothelial cells. *Horm Metab Res* 1997; 29: 491-495.
- 77-**Ishizaka N, Taguchi J, Kimura Y, Ikari Y, Aizawa T, Togo M, Kurowa K, Ohno M. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis* 1999; 142: 41-46.
- 78-**Tsuchikane E, Fukuhara A, Kobayashi T, Kirino M, Yamasaki K, Kobayashi T, Izumi M, Otsuji S, Tateyama H, Sakurai M, Awata N. Impact of Cilostazol on Restenosis After Percutaneous Coronary Balloon Angioplasty. *Circulation* 1999; 100: 21-26.
- 79-**Douglas JS, Holmes DR, Kereiakes DJ, Grines CL, Block E, Ghazzal ZM, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation* 2005; 112: 2826-2832.
- 80-**Morishita R, Higaki J, Hayashi SI, Yo Y, Aoki M, Nakamura S, Moriguchi A, Matsushita H, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T. Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation: prevention of high D-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor. *Diabetologica* 1997; 40: 1053-1061.
- 81-**Hong KW, Kim KY, Shin HK, et al. Cilostazol prevents tumor necrosis factor- α -induced cell death by suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from

chromosome 10 phosphorylation and activation of akt/cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 1182- 90.

82-Otsuki M, Saito H, Xu X, Sumitani S, Kouhara H, Kurabayashi M, Kasayama S. Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF- κ B binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis* 2001; 158: 121-128.

83-Lee T, Su S, Hwang J, et al. Differential lipogenic effects of cilostazol and pentoxifylline in patients with intermittent claudication: potential role for interleukin-6. *Atherosclerosis* 2001; 158: 471-476.

84-Mizutani M, Okuda Y, Yamashita K. Effect of Cilostazol on the Production of Platelet-Derived Growth Factor in Cultured Human Vascular Endothelial Cells. *Biochemical and Molecular Medicine* 1996; 57: 156-158.

85-Tsai CS, Lin FY, Chen YH, Yang TL, Wang HJ, Huang GS, Lin CY, Tsai YT, Lin SJ, Li CY. Cilostazol Attenuates MCP-1 and MMP-9 Expression In Vivo in LPS-Administrated Balloon-Injured Rabbit Aorta and In Vitro in LPS-Treated Monocytic THP-1 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008; 103: 54–66.

86-Ikeda U, Ikeda M, Kano S, Kanbe T, Shimada K. *European Journal of Pharmacology* 1996; 314: 197-202.

87-Lim JH, Woo JS, Shin YW. Cilostazol protects endothelial cell against lipopolysaccharide-induced apoptosis through ERK 1/2 –and P38 MAPK – dependent pathways. *The Korean Journal of internal Medicine* 2009; 24: 113-122.

88-Elam MB, Heckman J, Crouse JR, et al. Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1942-1947.

89-Lee TM, Su SF, Hwang JJ, Tseng CD, Chen MF, Lee YT, Wang SS. Inhibition of adenosine up take and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 351-360.

90-Motoyoshi T, Morita T, Ueki H. Involvement of the Rapid Increase in cAMP content in the Vanadate-Stimulated release of Lipoprotein Lipase Activity from rat Fat Pads. *Biol Pharm.* 1996; 19: 1412-1416.

- 91-**Bramer SL, Forbes WP, Mallikaarjun S. Cilostazol pharmacokinetics after single and multiple oral doses in healthy males and patients with intermittent claudication resulting from peripheral arterial disease. *Clinical pharmacokinetics* 1999; 37: 1-11.
- 92-**Abbas R, Chow CP, Browder NJ, Thacker D, Bramer SL, Fu CJ, Forbes W, Odomi M, Flockhart DA. In vitro metabolism and interaction of cilostazol with human hepatic cytochrome P450 isoforms. *Hum Exp Toxicol* 2000; 19: 178-184.
- 93-**Suri A, Forbes WP, Bramer SL. Effects of CYP3A inhibition on the metabolism of cilostazol. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 61-68.
- 94-**Suri A, Bramer SL. Effect of omeprazole on the metabolism of cilostazol. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 53-59.
- 95-**Suri A, Forbes WP, Bramer SL. Pharmacokinetics of multiple-dose oral cilostazol in middle-age and elderly men and women. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 144-150.
- 96-**Mallikaarjun S, Forbes WP, Bramer SL. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of cilostazol and its metabolites. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 37: 33-40.
- 97-**Bramer SL, Forbes WP. Effect of hepatic impairment on the pharmacokinetics of a single dose of cilostazol. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 37: 25-32.
- 98-**Pratt CM. Analysis of the cilostazol safety database. *Am J Cardiol* 2001; 87: 28-33.
- 99-**Otsuka Pharmaceuticals. Summary of product characteristics: Pletal.
- 100-**Mukherjee D, Yadav JS. Update on peripheral vascular diseases: from smoking cessation to stenting. *Cleve Clin J Med* 2001; 68: 723-733.
- 101-**Kim J, Lee K, Kim Y, Tamai Y, Nakahata R, Takami H. A randomized crossover comparative study of aspirin, cilostazol, on primary hemostasis using a quantitative bleeding time test apparatus. *Hemostasis* 1999; 29: 269-276.
- 102-**Mallikaarjun S, Forbes WP, Bramer SL. Interaction potential and tolerability of the coadministration of cilostazol and aspirin. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 37 Suppl 2: 87-93.
- 103-**Mallikaarjun S, Bramer SL. Effect of cilostazol on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 37 Suppl 2: 79-86.
- 104-**Strandness DE Jr, Dalman RL, Panian S, Rendell MS, Comp PC, Zhang P, Forbes WP. Effect of cilostazol in patients with intermittent claudication: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Vasc Endovascular Surg*. 2002; 36: 83-91.

- 105-**Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR, Hobson RW 2nd, Martin JD, Bortey EB, Forbes WP, Strandness DE Jr. A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med.* 2000; 109: 523-530.
- 106-**Chi YW, Lavie CJ, Milani RV, White CJ. Safety and efficacy of cilostazol in the management of intermittent claudication. *Vascular Health and Risk Management* 2008; 4 : 1197-1203.
- 107-**Discigil B, Evora PRB, Pearson PJ, Viaro F, Rodrigues AJ, Schaff HV. Ionic radiocontrast inhibits endothelium-dependent vasodilation of the canine renal artery in vivo: possible mechanism of renal failure following contrast medium infusion. *Braz Med Biol Res.* 2004; 37; 259-265.
- 108-**Evora PRB, Pearson PR, Discigil B, Oeltjen MR, Shaff HV. Pharmacological studies on internal mammary artery bypass grafts. *J Cardiovasc Surg* 2002; 43: 761-771.
- 109-**Evora PRB, Pearson PR, Chua YL, Discigil B, Shaff HV. Exogenous hyaluronidase induces release of nitric oxide from the coronary endothelium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 120: 707-711.
- 110-** Rudherford RB. *Vascular Surgery* Sixty Edition. 2005. Elsevier Saunders. 604-605.
- 111-**Feddersen CO, Mathias MM, McMurtry IF, Voelkel NF. Acetylcholine induces vasodilation and prostacyclin synthesis in rat lungs. *Prostaglandins.* 1986; 31: 973-987.