



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KORONER ARTER HASTALARINDA ASİRİN DİRENCİ İLE
OKSİDATİF STRES ARASINDAKİ İLİŞKİ

Dr. Elif EMRE DOĞRUK

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2011



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KORONER ARTER HASTALARINDA ASİRİN DİRENCİ İLE
OKSİDATİF STRES ARASINDAKİ İLİŐKI**

Dr. Elif EMRE DOĞRUK

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Zehra SERDAR

BURSA – 2011

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet	ii
İngilizce Özet	iv
Giriş	1
1. Koroner Arter Hastalığı	1
2. Trombositler ve Fonksiyonları	6
3. Aspirin	8
3.1. Aspirinin Etki Mekanizması	9
3.2. Aspirin Direnci	10
4. Oksidatif Stres	16
4.1. Serbest Oksijen Radikalleri	17
4.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Yol Açtığı Hücresel Hasarlar	17
5. Antioksidanlar	21
5.1. Antioksidan etkili enzimler	21
5.2. Antioksidan etkili vitaminler	23
Gereç ve Yöntem	26
Bulgular	40
Tartışma ve Sonuç	59
Kaynaklar	69
Ekler	78
Teşekkür	81
Özgeçmiş	82

ÖZET

Aspirin (asetilsalisilik asit), aterotrombotik kardiyovasküler olayların önlenmesinde kullanılan güçlü bir antiagregandır. Ancak aspirinin antiagregan etkinliği tüm hastalarda aynı düzeyde görülmemekte ve bazı hastalar aspirinden yararlanamamaktadır. Bu hastalar klinik olarak aspirin direnci olan hastalar veya aspirine yanıtızsız hastalar olarak adlandırılmaktadır. Aspirin direncinin oluşum mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamış olup bu konuda çok sayıda araştırma yürütülmektedir. Oksidatif stres özellikle son yıllarda ileri sürülen olası mekanizmalardan birisidir.

Bu tezin amacı; koroner arter hastalarında aspirin kullanımının oksidan ve antioksidan parametrelerde yol açtığı değişiklikleri araştırmak ve aspirin direnci ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi incelemektir.

Çalışmaya, koroner arter hastalığı olan total 100 hasta (35 kadın, 65 erkek; ortalama yaş 67 ± 10) ile 45 gönüllü kontrol (16 kadın, 29 erkek; ortalama yaş 63 ± 9) alındı. Trombosit fonksiyonu trombosit fonksiyon analizörü (Multiplate Analyzer) ile değerlendirildi. Düzenli aspirin kullanımına rağmen agregasyon biriminin (AU*dak) 300 - 706 arasında bulunması aspirine orta derecede duyarlılık, > 706 bulunması ise aspirin direnci olarak kabul edildi. Hastaların %7'si (n=7) aspirine dirençli, %15'i ise (n=15) aspirine orta derecede duyarlı bulundu.

Serum malondialdehid (MDA) ve vitamin E konsantrasyonları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenirken, diğer oksidan ve antioksidan parametreler spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Aspirin direnci olan hastalarda serum MDA, protein karbonilleri ve total sialik asit konsantrasyonları anlamlı olarak artarken, serum antioksidan etkili vitaminler (vitamin E ve total karoten) ve enzimler (paraoksonaz, arilesteraz ve katalaz) ise anlamlı olarak azaldı. Aspirin direnci ile oksidan parametreler arasında güçlü pozitif korelasyonlar, antioksidan vitamin ve enzimlerle ise zayıf negatif korelasyonlar bulundu.

Sonuç olarak; koroner arter hastalarında aspirin direnci oksidan ve antioksidan parametrelerle ilişkilidir. Ancak, kardiyovasküler olaylar için bir

risk faktörü olduğu bilinen oksidatif stres ile aspirin direnci arasındaki ilişkiyi daha iyi açıklamak için hala daha ileri çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Aspirin direnci, koroner arter hastalığı, oksidatif stres, antioksidanlar.

SUMMARY

The Relationship Between Aspirin Resistance and Oxidative Stress in Patients with Coronary Artery Disease

Aspirin (acetylsalicylic acid) is a powerful antiplatelet agent used in prevention of atherothrombotic vascular events. However, antiplatelet effect of aspirin is not uniform and some patients could not benefit from aspirin. These patients are clinically called as aspirin resistant or aspirin non-responders. Mechanisms of aspirin resistance have not been elucidated yet and a number of research carried out in this issue. Oxidative stress, especially in recent years is one of the suggested possible mechanisms of aspirin resistance.

The aim of this thesis was to investigate the changes caused by aspirin in oxidant and antioxidant parameters and to examine the relationship between the aspirin resistance and oxidative stress in patients with coronary artery disease.

A total of 100 patients (35 females, 65 males; mean age 67 ± 10 years) with coronary artery disease and 45 voluntary controls (16 females, 29 males; mean age 63 ± 9 years) were enrolled in the study. Platelet function was evaluated by a Multiple Platelet Function Analyzer (Multiplate Analyzer). Moderate sensitivity to aspirin was defined as a 300 - 706 AU*min (agregation unite), and aspirin resistance was defined as a > 706 AU*min despite regular aspirin therapy. 7 %of patients were aspirin resistant and 15 %of patients were moderately sensitive to aspirin by Multiplate Analyzer.

While serum malondialdehyde (MDA) and vitamin E concentrations were determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC), other oxidant and antioxidant parameters were measured spectrophotometrically.

While serum MDA, protein carbonyls and total sialic acid concentrations were significantly increased, serum antioxidant vitamins

(vitamin E and total carotene) and enzymes (paraoxonase, arylesterase and catalase) were significantly decreased in patients with aspirin resistance. We found strong positive correlations between aspirin resistance and oxidant parameters and weak negative correlations between aspirin resistance and antioxidant vitamins and enzymes.

In conclusion; aspirin resistance is related to oxidant and antioxidant parameters in patients with coronary artery disease. However, there is still need for further studies to better elucidate the relationship between aspirin resistance and oxidative stress, which is now known to be a risk factor for cardiovascular events.

Key words: Aspirin resistance, coronary artery disease, oxidative stress, antioxidants.

GİRİŞ

1. Koroner Arter Hastalığı

Koroner arter hastalığı, koroner arter duvarında başlayıp damar lümeninin tıkanmasıyla sonuçlanabilen aterosklerotik bir hastalıktır. Ateroskleroz ise değişik oranlarda lipid, fibroblast, makrofaj ve düz kas hücreleri ile çeşitli hücre dışı maddeler içeren intimal plakların neden olduğu ilerleyici arteryel darlık ve tıkanmalar ile arterlerin esneklik ve antitrombotik özelliklerinin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Ateroskleroz, elastik arterler (aorta, karotis ve iliak arterler) ile orta ve küçük boy müsküler arterlerin (koroner ve popliteal arterler) bir hastalığıdır (1).

Günümüzde ateroskleroza açıklamaya yönelik olarak ileri sürülen hipotezler içinde en geçerli olanı “endotel hasarına karşı yanıt” hipotezidir. Bu hipoteze göre, çeşitli metabolik, mekanik, toksik ve immünolojik olaylar ile infeksiyonlar endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır (2, 3).

Bilinen risk faktörlerinin hemen hepsi [hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet, sigara, okside LDL (low density lipoprotein) vs.] endotelde işlevsel bozukluğa yol açmakla birlikte santral rolü, LDL'nin oksidatif modifikasyonu oynamaktadır. Buna göre aterogenez; LDL'deki lipidlerin oksidatif modifikasyonu ile başlar ve endotel disfonksiyonu, trombositlerin aşırı aktivasyonu ve agregasyonu, köpük hücresi oluşumu, inflamasyon ve trombozisin iç içe olduğu olaylar dizisinin birbirini izlemesi ile gelişir (4).

Aterosklerozun gelişim sürecinde yer alan temel olaylar şu şekilde özetlenebilir (5, 6);

1. Endotel disfonksiyonu:

Aterosklerozun patogenezindeki ilk temel basamağı endotel disfonksiyonu oluşturmaktadır. Normal endotel tabakasının kan-doku permeabilitesini sağlamak, damar tonusunu kontrol etmek, hemostaz ve inflamasyona göre damar yüzeyinin özelliklerini düzenlemek gibi aterogenez engelleyen bazı özellikleri vardır. Disfonksiyonun gelişmesi endotel

tabakasının kan ile damar duvarı arasında bariyer olma özelliğini, seçici geçirgenliğini ve antitrombotik yapısını bozar ve bunun sonucunda gelişen inflamatuvar ve proliferatif olaylar dizisi aterosklerotik plağın oluşmasına neden olur. Endotel disfonksiyonuna yol açan nedenler arasında en önemlilerini yaş, cinsiyet, ailede koroner arter hastalığı öyküsünün bulunması, hipertansiyon, sigara kullanımı, diyabetes mellitus, dislipidemi ve obezite gibi çeşitli risk faktörleri oluşturmaktadır.

2. LDL oksidasyonu:

Plazma LDL düzeyleri arttığında yüksek miktarlarda LDL damar endotelinden intimaya geçerek agregasyon ve oksidasyon gibi bir seri modifikasyona uğrar. Bu modifikasyonlar ile LDL'nin yapısındaki apolipoprotein (apo) E molekülü çok az değişikliğe uğradığından başlangıçta oluşan bu lipoprotein partikülüne çok az değiştirilmiş LDL ("minimally modified" LDL, mmLDL) adı verilir.

LDL oksidasyonu, LDL fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile başlamaktadır. LDL molekülü lipooksijenaz, reaktif oksijen türleri ve malondialdehitin (MDA) etkisiyle tekrar okside olarak yapısındaki lesitinden lizolesitin oluşmakta ve LDL partikülündeki apo B proteini, " scavenger "(çöpçü) reseptörler tarafından tanınacak şekle dönüşmektedir.

Ayrıca apo B'deki lizin kalıntılarının konjugasyonu ile oksidasyona özgü lipid-protein kalıntıları oluşmaktadır.

Okside LDL partikülleri içerdikleri lipid peroksidasyon ürünleri nedeni ile sitotoksiktirler. Okside LDL sitotoksik etkilerini endotel hücre fonksiyonlarını değiştirerek ve endotel hasarına neden olarak göstermektedir.

Okside LDL'nin aterogenezdaki etkileri şöyle özetlenebilir:

- Endotel ve düz kas hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir.
- Dolaşımdaki monositler için kemotaktik etki yapar.
- Endotel adezyon moleküllerinin üretimini uyararak monosit ve T lenfositlerin damar duvarına adezyonunu sağlar.
- Plak içindeki makrofajların motilitesini inhibe ederek, lezyondaki makrofaj sayısının artmasına yardımcı olur.
- Bazı büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanmasını sağlar.

- Antikor oluşumuna yol açarak immün ve inflamatuvar değişikliklere neden olur.

3. Köpük hücre oluşumu:

Malondialdehit, LDL'nin yapısında bulunan apo B molekülündeki lizin aminoasidinin yapısını değiştirerek LDL'nin, makrofajlardaki çöpçü reseptörlerce daha kolay tanınmasını sağlar. Böylece makrofajlar, okside LDL partiküllerini fagosite eder ve yapısındaki kolesterol esterlerini depolar. Hücrenin kolesterol ile yüklenmesi, çöpçü reseptör sayısında bir "down" regülasyona neden olmadığından, bu depolanma sürekli devam eder ve köpük hücreleri (foam cell) oluşur. Oluşan bu köpük hücreleri endotel altında birikerek yağlı çizgilenmeleri oluşturur.

4. Lipid çekirdeği oluşumu:

Lezyon ilerledikçe hücre dışında da lipid birikmeye başlar. Biriken bu lipidin olası iki kaynağı vardır; dolaşımdaki LDL'nin doğrudan doğruya intima tabakasındaki proteoglikanlara bağlanması ya da köpük hücrelerinin yıkımı sonucunda depolanmış kolesterol esterlerinin açığa çıkması. Hücre dışı lipidin çoğunluğunun bu ikinci yoldan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Makrofajların aterosklerotik plaklarda biriktikleri ve dolaşımdaki monositlerin de sürekli olarak plak içine girdikleri bilinmektedir.

Sonuçta oluşan lipid çekirdek, intima tabakasının bağ dokusu yapısı içinde kolesterol ve hücre yıkım ürünleri ile dolu boşluklardır. Bu aşamada lipid çekirdeğin üzerinde henüz fibrotik bir tabaka yoktur.

5. Fibröz başlık oluşumu:

Olgunlaşmış aterosklerotik plağında lipid çekirdeğin üzeri fibröz bir başlıkla örtülüdür. Fibröz başlık düz kas hücreleri ve bağ dokusundan oluşur. Lezyonun yaşı ilerledikçe düz kas hücrelerinin sayısı artar. Düz kas hücrelerinin mediadan göçü ve proliferasyonu, PDGF (platelet derived growth factor) ve FGF (fibroblast growth factor) gibi büyüme faktörlerinin uyarısı ile gerçekleşir. Aynı faktörler, bu hücrelerin bağ dokusu proteinlerini sentezlemesini de uyarır. Fibröz başlık dinamik bir yapıya sahiptir. Bir yandan düz kas hücreleri tarafından kollajen sentezlenirken, diğer yandan da proteazlar tarafından sürekli olarak bağ dokusu yıkılmaktadır.

Bu yapım ve yıkım çok sayıda sitokin tarafından kontrol edilen bir denge içinde oluşmaktadır.

Lipid çekirdek ve etrafındaki fibröz başlıktan oluşan bu ilerlemiş lezyona “fibroaterom” adı verilmektedir. Fibröz başlığın kalınlık derecesi fibroaterom plağının komplikasyon gelişimine yatkınlık derecesini de belirlemektedir. Fibröz başlığın ince olması kolayca yırtılmasına ve bu bölgede trombositlerin aktive olarak kümeleşmesine, trombin oluşumuna ve sonrasında anstabil angina veya miyokard infarktüsü gibi komplikasyonların gelişimine yol açar.

Epidemiyoloji

2007/08 yılında yayınlanan TEKHARF (7) (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri) çalışmasının 1990 - 2008 yıllarını kapsayan izlem sonuçlarına göre, ülkemizde koroner kalp hastalığı prevalansı erkeklerde 13.9, kadınlarda ise 12.1 olarak bildirilmiştir. Bu verilerin yaş gruplarına göre dağılımı ise şu şekildedir; 35 – 44 yaş: erkek 3.9, kadın 0.6; 45–54 yaş: erkek 7.7, kadın 4.6; 55–64 yaş: erkek 17.7, kadın 16.1; 65-74 yaş: erkek 26.9, kadın 28; ≥ 75 yaş: erkek 29.5, kadın 26.2. Söz konusu prevalanslar 1990 yılındakilere kıyasla 50 yaş üstü kesimde %80 oranında artmıştır. Koroner kalp hastalığı, halkımızda 1990 yılından beri yılda %6.4 hızında -diğer bir ifadeyle yılda 200 bin kişi- bir artış göstermektedir. 1990 - 2008 yıllarını kapsayan dönemdeki ölümlerin %42'sinin de koroner kalp hastalığı sonucu olduğu bildirilmiştir.

TEKHARF çalışmasının son takipleri, Türk erişkinlerinde hem koroner kalp hastalığı mortalitesi, hem de yeni koroner olay prevalanslarının çevre ülkedekilerden her iki cinsiyette de daha yüksek olduğunu göstermiş ve ülkemizde koroner hastalıktan koruyucu önlemleri çok daha etkinleştirmenin gerektiğini vurgulamıştır. Ayrıca, erişkin nüfusun önemli bir bölümünün bu hastalıktan aktif yaşlarda, yani orta yaş ve erken yaşlılık dönemlerinde etkilenmesi olayın ekonomik boyutunu da arttırmaktadır. Koroner kalp hastalığının iş gücü kaybı, tedavi giderleri ve yaşam kalitesi bakımından topluma maliyeti çok yüksektir. Bu açıdan, koroner kalp hastalığı riskini

azaltmak için hem primer hem de sekonder koruma her hastada uygulanmalıdır.

Primer koruma, genellikle koroner arter hastalığı olmayan kişilerde koroner kalp hastalığının gelişimini önlemek için risk faktörlerinin tedavisi anlamına gelir. Sekonder koruma ise koroner kalp hastalığı bulunanlarda rekürren koroner kalp hastalığı olaylarını ve koroner mortaliteyi azaltıcı tedavileri içerir. Sekonder koruma stratejilerinin amacı, hem risk faktörlerinin kontrolü hem de koroner arterleri plak rüptüründen direkt olarak korumadır (8).

Sekonder korumada antiagregan tedavinin önemli bir yeri vardır. Türk Kardiyoloji Derneği'nin "Akut Miyokard İnfarktüsü (AMI) Tedavi Kılavuzu" na göre; AMİ seyrinde erken olarak verilen asetilsalisilik asidin (aspirin, ASA) mortaliteyi tek başına %23'e varan bir oranda azalttığı, ayrıca trombolitik tedavi ile birlikte verildiğinde bu oranın %40'lara kadar çıktığı gösterilmiştir. Bu nedenle, eğer kesin bir kontrendikasyon yoksa, trombolitik ilaçlar verilecek olsun veya olmasın, hastalara hemen aspirin verilmelidir.

Türk Kardiyoloji Derneği'nin "Koroner Arter Hastalığına Yaklaşım ve Tedavi Kılavuzu" na göre ise; düşük doz aspirinin tüm nedenlere bağlı mortaliteyi ve koroner olay sıklığını azaltma yönündeki yararı kanıtlanmıştır. Bu nedenle, bu ucuz ve etkili ilaç kanıtlanmış bir kontrendikasyon olmadıkça tüm hastalarda uzun süreli tedavinin bir parçası olmak durumundadır. Warfarin, heparin, tiklopidin ve diğer yeni antitrombotik ilaçların uzun vadeli yararları konusunda ise elde yeterince kanıt yoktur.

Avrupa Kardiyoloji Derneği'nin (European Society of Cardiology), aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan hastalarda "Antitrombosit Maddelerin Kullanımı" ile ilgili çalışma grubunun 2004 yılında yayınladığı kılavuza göre; anti-trombosit profilaksinin olumlu yarar profili sergilediği tüm klinik durumlarda, günde bir kez aspirin kullanılması önerilmektedir. Mevcut kanıtlar, yüksek risk taşıyan hastalarda, ciddi vasküler olayların uzun dönemde önlenmesi amacıyla, 75-100 mg arasındaki günlük aspirin dozlarının kullanımını desteklemektedir. Hemen antitrombotik etkinin gerekli olduğu klinik koşullarda ise (akut koroner sendromlarda veya akut iskemik

inmede olduğu gibi), tromboksan A₂ 'ye (TXA₂) bağımlı trombosit agregasyonunu hızla ve tamamen bloke etmeyi sağlamak amacıyla, tanı konulduğunda 160-300 mg'lik bir aspirin yükleme dozu verilmelidir.

2. Trombositler ve Fonksiyonları

Trombositler kemik iliğindeki megakaryositlerden kaynaklanan, dolaşımdaki ömürleri yaklaşık 10 gün olan ve pıhtı oluşumundan sorumlu olan küçük ve çekirdeksiz hücrelerdir. Trombositler, arteryel trombozun başlangıçtaki hemostatik tıkaç oluşumundan, yara iyileşmesi için gerekli olan lökosit toplanmasına kadar her aşamasında yer alırlar (9). Trombositlerin ana görevi hemostazla birlikte damar tamirini sağlamaktır. Ayrıca tromboz, kanama, inflamasyon, tümör büyümesi ve aterosklerozun ilerlemesi gibi patofizyolojik olaylarda da rol oynarlar (10).

Trombosit aktivasyonu ve agregasyonu

Normal koşullar altında trombositler istirahat halindedirler ve kanda serbestçe dolaşırlar. Normal fonksiyon gören endotel hücreleri salgıladıkları bazı antiagregan moleküller ile (prostaglandin I₂, nitrik oksit ve CD39) tromboz homeostazında non-trombojenik bir durum sağlarlar. Damar duvarı hasarına bağlı endotel zedelenmesi sonucunda ise trombositler subendotelyal bağ dokusu ile temas eder ve aktif hale gelirler. Aktif hale gelen trombositler şekil değiştirerek disk şeklinden dendritik uzantıları olan küremsi bir şekle girerler ve yapılarındaki sekretuar granüllerde bulunan proagregan molekülleri salgılayarak trombosit aktivasyonunu hızlandırıp hasar bölgesinde pıhtı oluşumuna yol açarlar (11).

Trombosit pıhtısının oluşumunu başlatan olay kollajen ile bölgesel trombinin karşılaşmasıdır. Damar hasarını izleyen ilk saniyeler içinde trombositler kollajen reseptörleri aracılığı ile endotel altında bulunan kollajen fibrillerine yapışırlar. Kollajen güçlü bir trombosit agonistidir. Bazı insanlarda kollajenin etkilerine aşırı duyarlı trombositler oluşmaktadır ve bu özellik aspirinin antitrombosit özelliğini baskılamaktadır. Trombositlerin kollajen ile olan bu bağlantısı, yapışkan özellikte bir protein olan ve endotel hücreleri ile

megakaryositlerden sentezlenebilen von Willebrand faktörü (vWF) ile sağlam hale getirilir. VWF, trombosit yüzeyindeki glikoprotein Ib (GPIb) reseptörleri ile birleşerek trombositleri subendotelyal moleküllere bağlar ve vasküler hasar bölgesinde bir trombosit tabakasının oluşmasına yol açar (12).

Trombositlerin endotele adezyonu sonrasında trombositler aktive olarak granüllerinde depolanan adenosin difosfat (ADP), faktör Va, trombospondin, vWF, fibronektin, fibrinojen, heparinaz ve TXA₂ gibi maddeleri salgırlar.

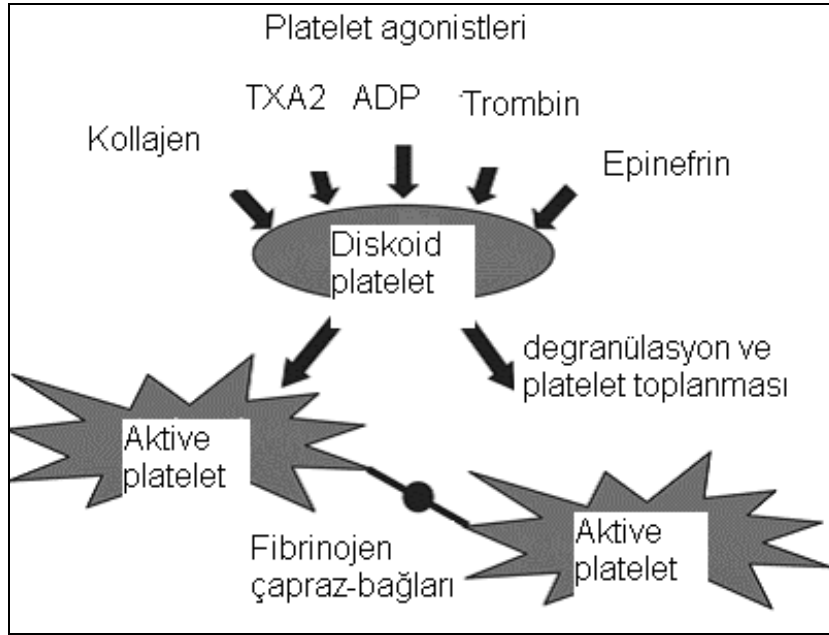
Aktifleşen trombositlerden salınan bu maddeler diğer trombositlerin de vasküler hasar bölgesine gelmesine ve trombosit tıkaçı oluşumuna neden olurlar (13) (Şekil-1).

Bu salınım reaksiyonu fosfatidil inozitol döngüsü ve prostaglandin oluşumu ile birlikte gerçekleşir. Trombosit membranında yer alan iki enzim olan fosfolipaz C ve fosfolipaz A₂, trombositlere bağlanan agonistlerle (adrenalin, kollajen, trombin) aktive olur. Bu enzimler araşidonik asitten iki önemli membran fosfolipidinin salınmasını katalize ederler. Bunlar fosfatidilinozitol ve fosfatidilkolindir. Fosfolipaz C'nin fosfatidilinozitole etkisi sonucu oluşan inozitol trifosfat hücre içinde kalsiyum yoğunluğunu artırır. Prostaglandin metabolizması ile ilgili olarak, araşidonik asitten siklooksijenaz (COX) enzimi etkisiyle TXA₂ oluşur. TXA₂ güçlü bir vazokonstriktördür ve yoğun granüllerden Ca²⁺yi harekete geçirerek salınım reaksiyonunu stimüle eder. Mikro fibrillerin kasılması ile pıhtı retraksiyonu sağlanır ve trombosit tıkaçı sağlam hale gelir. Trombosit agonistlerinin açığa çıkması ile yeni trombositler aktive olur ve trombosit pıhtısı genişler (14).

Trombositlerin bizzat kendileri yüzeylerinde güçlü prokoagulan aktiviteler oluşturarak tıkaçın pekişmesine katkıda bulunurlar. Trombosit agregasyonunu izleyen saniyeler içinde membran fosfolipidlerinde yeniden örgütlenme başlar. Normalde trombosit membranının iç lipid tabakasında yer alan, hidrofobik ve negatif yüklü olan fosfatidil serin ve fosfatidil kolin dış tabakaya çıkarlar. Özellikle K vitaminine bağımlı olan bir dizi pıhtılaşıma faktörü bu fosfolipidlere bağlanır. Fibrinojen, faktör V, VIII ve IX gibi diğer pıhtılaşıma faktörleri de reseptörleri aracılığıyla trombositlere bağlanır.

Trombositlerin yüzeyinde toplanmış pıhtılaştırma faktörleri trombositlerin birbirleriyle etkileşmelerini kolaylaştırır. Ayrıca bir arada toplu bulunan bu pıhtılaştırma faktörleri doğal inhibitör olan antitrombin III ve protein C'nin etkisinden de korunmuş olurlar (9).

Trombosit aktivasyonunu ve pıhtı oluşumunu önlemeye yönelik olarak klinikte kullanılan bir çok antitrombosit etkili ilaç bulunmaktadır. Antitrombosit etkili bu ilaçlar arasında asetilsalisilik asit, klopidogrel ve tiklopidin, tromboksan sentaz inhibitörleri ve reseptör blokerleri (Dipiridamol) ile trombosit glikoprotein IIb/IIIa reseptör blokerleri (Absiksimab, Eptifibatide) sayılabilir. Bunların içinde en fazla araştırma yapılan ve kullanılan asetilsalisilik asittir (ASA) (15).



Şekil-1: Trombosit agregasyon seması.

3. Aspirin

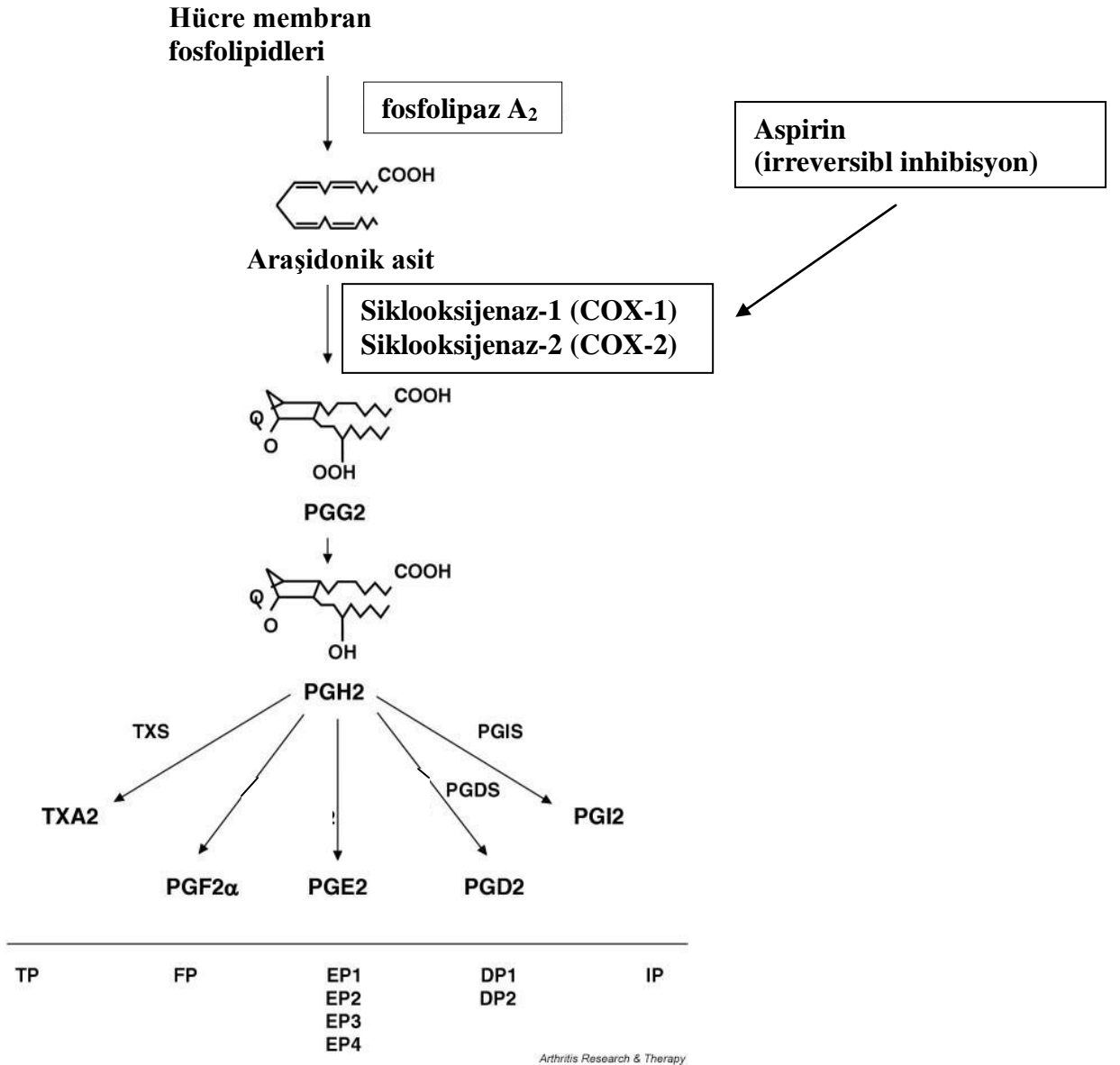
Aspirinin geçmişi salisilat içeren bitkilerin kullanıldığı dönemlere kadar gitmektedir. Maclagan isimli araştırmacı 1874 yılında akçasöğüt yaprağından elde edilen salisini ateş, ağrı ve romatizmal ateşin inflamasyonunu baskılamak için kullanmıştır. Felix Hoffman ise 1897 yılında

salisilik asitin benzen halkası üzerindeki hidroksil grubunu asetilleyerek asetil salisilik asiti (ASA) oluşturmuş ve bu yeni ilaca aspirin adı verilmiştir (16).

3.1. Aspirinin Etki Mekanizması

Hücre membranında bulunan fosfolipidlerin çeşitli uyarılar ile aktive olan fosfolipazlarca yıkımı sonucunda araşidonik asid oluşmaktadır. Araşidonik asidden ise prostaglandin H₂ sentaz enzimi ile prostaglandin H₂ (PGH₂) ardından da prostasiklin (PGI₂), TXA₂ ve prostaglandin E₂ (PGE₂) sentezlenmektedir. Trombositler tarafından sentezlenen TXA₂'nin vasokonstriksiyon, düz kas hücrelerinde proliferasyon ve trombosit agregasyonunu artırıcı etkileri vardır. Prostasiklinler ise damar çeperindeki endotelial hücreler tarafından üretilirler ve vazodilatasyon ile trombosit agregasyonunun inhibisyonundan sorumludurlar (17) (Şekil-2).

Prostaglandin H₂ sentaz enzimi COX ve hidroperoksidaz aktivitelerini içeren bir enzimdir. COX enziminin COX-1 ve COX-2 şeklinde 2 izoenzimi bulunmaktadır. Trombositlerde özellikle COX-1 enzimi bulunur. COX-2 enzimi ise monositlerde, makrofajlarda ve yeni oluşan trombositlerde bulunur ve özellikle inflamasyon ve hücre büyümesinin regülasyonunda rol oynar. Aspirin, COX-1 enziminin 529. pozisyonu ile COX-2 enziminin 516. pozisyonundaki serin aminoasidini geri dönüşümsüz biçimde asetilleyerek etki göstermektedir. Aspirinin COX-1 enzimine olan ilgisinin COX-2'ye göre 50–100 kat daha fazla olduğu ve antitrombosit etkilerinden özellikle COX-1 inhibisyonunun sorumlu olduğu bildirilmiştir. Aspirinin COX enzim inhibisyonu trombositlerin ortalama 8-10 gün olan tüm yaşam süreci boyunca devam etmektedir. COX izoenzimlerinin inhibisyonu aspirinin dozu ile ilişkilidir. Düşük doz aspirin COX-1'i inhibe edebilirken, COX-2'nin inhibisyonu için ise yüksek dozlar gerekmektedir. Bu durum antitrombotik etki (COX-1 enzimiyle) ve anti-inflamatuvar etki (COX-2 enzimiyle) elde etmek için aspirinin neden farklı dozlarda kullanıldığını açıklar (18).



Şekil-2: Araşidonik asit metabolizması ve aspirinin etki mekanizması.

3.2. Aspirin Direnci

Tanım

Aspirinin antiagregan etkinliği tüm hastalarda aynı düzeyde görülmemekte ve bazı hastalar aspirinden yararlanamamaktadır. Bu hastalar klinik olarak aspirin direnci olan hastalar veya aspirine yanıtız hastalar olarak adlandırılmaktadır. Aspirin direnci klinik ve laboratuvar yöntemleri ile tanımlanabilmektedir. Klinik olarak aspirin direnci; aspirinin terapötik dozlarda

kullanımına rağmen trombotik ve embolik vasküler olayların gerçekleşmesi olarak tanımlanmaktadır. Laboratuvar yöntemleri ile ise olağan antiagregan dozlarda aspirin kullanımına rağmen TXA₂ oluşumunun baskılanmasında yetersizlik veya trombosit fonksiyonlarına yönelik testlerde, yeterli antitrombosit etkinliğin gösterilememesi olarak tanımlanmıştır (19, 20).

Aspirin direnci olan hastalarda major kardiyovasküler olay riskinde artış olabileceğine dair kanıtlar günden güne artmaktadır. Aspirin direnci olan bireylerin belirlenmesi, aspirin direncine bağlı olarak artan kardiyovasküler olay riskinin azaltılması ve antiagregan tedavinin etkinliğinin artırılmasına yönelik klinik çalışmalar sürmektedir (21).

Aspirin Direncinin Laboratuvar Yöntemleri ile Belirlenmesi

Çeşitli kardiyovasküler hastalıkları olan bireylerde aspirinin trombosit fonksiyonlarını baskılayıcı etkinliğinin ölçülmesi amacı ile çok sayıda yöntem ve cihaz geliştirilmiştir. Günümüzde bu yöntem ve cihazlar ile yapılan ölçümler sonucunda aspirin direnci belirlenebilmektedir. Literatürde, değişik kardiyovasküler hastaları içeren gruplarda farklı yöntemlerle %5.5-45 oranında aspirin direnci prevalansı bildirilmiştir (21, 22).

Kanama zamanı, aktive pıhtılaşma zamanı, tam kan agregometrisi, trombosit sayım oranı, akım sitometrisi, optik agregometri, PFA-100, Ultegra hızlı trombosit işlev inceleyicisi (Ultegra Rapid Platelet Function Assay-RPFA), plazma veya idrar tromboksan B2 düzeyi ve trombosit yüzey proteinlerinin ölçümü gibi yöntem ve cihazlar trombosit fonksiyonlarını değerlendirmede kullanılmaktadır (24, 25).

İmpedans agregometri: Trombosit fonksiyonlarının tam kanda impedans yöntemi ile değerlendirildiği bir sistemdir. Bu sistemde, trombositler bir agonist yoluyla agregate oldukları zaman iki elektrot arasında oluşan elektriksel impedansdaki değişiklik ölçülmektedir. İmpedans agregometri yöntemi trombositlerin dinlenme aşamasında trombojenik olmaması, fakat araşidonik asid, ADP, epinefrin veya kollajenle aktive olduklarında yüzeylerinde damar çeperleri ve yapay yüzeylere tutunmalarını sağlayan reseptörler ortaya çıkarmaları prensibine dayanır.

Biz de bu tez çalışmasında aspirin direnci ölçümlerini impedans agregometri prensibine göre çalışan “multiple platelet fonksiyon analizörü’nde” (Multiplate) yaptık. “Multiplate” cihazı ve çalışma prensipleri ile ilgili ayrıntılı bilgi “Gereç ve Yöntem” bölümünde verilmiştir.

Optik agregometri: Klinik araştırmalarda trombosit fonksiyonlarını incelemeye kullanılan ve trombositten zengin plazma örneklerinin agregasyonu uyarıcı maddelere maruz bırakıldıktan sonra kan örneğinin spektrofotometri ile değerlendirildiği bir yöntemdir. Trombositlerin agregasyonu ile kan örneğinin optik dansitesinde oluşan değişimin saptanmasına dayanan bu yöntemde, agregasyon uyarıcıları olarak ADP, epinefrin ve araziidonik asid kullanılmaktadır.

Aspirin kullanımı trombositlerin agregasyonunda azalma ve anormal test sonucuna neden olmaktadır. Aspirin direnci olan olgularda ise aspirine rağmen 10 μ M ADP ile \geq %70 ve 0.5 mg/ml araziidonik asid ile \geq %20’lik ortalama trombosit agregasyonu gerçekleşmektedir. Optik agregometri yöntemi; kan örneklerinin hazırlanmasında güçlükler içermesi, tetkik prosedürü bakımından yüksek oranda testi yapan kişiye bağımlı oluşu ve zaman alıcı bir işlem oluşu nedeni ile günlük pratikte zorlukla uygulanabilen bir yöntemdir. Total standart sapma %3.6 - 7.7 arasında bildirilmiştir.

PFA-100: PFA-100 in vitro koşullarda primer hemostazı taklit eden bir sistemdir. Cihaz, sodyum sitrat ile antikoagüle edilen 800 μ L tam kan örneğini 147 μ m çapında bir açıklıktan, kollajen ve diğer trombosit aktive ediciler ile kaplı bir membranın içine doğru aspire eder. Trombositler membran ile etkileşime girerler ve bu olay açıklığın tam kapanması ile sonuçlanır. PFA-100, testin başlangıcından bu açıklığın trombosit tıkaç ile kapanması arasında geçen zamanı ölçer. Kapanma zamanı olarak ifade edilen bu süre in vitro trombosit fonksiyonlarını gösterir. Cihaz iki farklı tipte kartuş kullanabilmektedir; kollajen ve/veya epinefrin (Col/Epi) ile kollajen ve/veya ADP (Col/ADP). Aspirin kullanımı genellikle Col/Epi kartuşları ile yapılan ölçümleri etkilemektedir. Col/ADP kartuşları ise aspirin etkisi dışında oluşan trombosit fonksiyon bozukluklarının incelenmesinde kullanılabilir (von Willebrand hastalığı vb.). PFA-100 için Col/Epi

kartuşlarıyla normal referans aralığı 98-185 saniye, Col/ADP kartuşları ile de 81-113 saniye olarak kabul edilmektedir. Aspirin direnci, düzenli aspirin kullanımına rağmen Col/Epi kartuşları ile yapılan ölçümlerde kapanma zamanının 186 saniyenin altında oluşu olarak tanımlanmaktadır. Doğrulama çalışmaları PFA-100 cihazının Col/ADP ve Col/Epi kartuşları ile yapılan ölçümlerinin gün içi ve günden güne değişim oranının sırasıyla %15 ve %10'dan az olduğunu ve tekrarlanan ölçümler arasında klinik olarak anlamlı fark bulunmadığını göstermektedir.

Ultegra RPFA: Trombosit fonksiyonlarının incelenmesinde kullanılan hızlı, basit ve doğru sonuç veren türbidimetrik bir yöntemdir. Cihaz, reaksiyon odacıklarında trombin aktive edici peptid içermekte olup, fibrinojen kaplı yuvalarına tam kanın yerleştirilmesi ile trombosit agregasyonu gerçekleşmekte ve örneğin optik dansitesinde oluşan fark ölçülmektedir. Ölçümler testi yapan kişiye bağımlı olmayıp hastanın kullandığı diğer ilaçlar, hematolojik parametreler ve demografik bulgulardan etkilenmemektedir .

Plazma veya idrar tromboksan B2 düzeyinin belirlenmesi: 11-Dehidrotromboksan B2 (11-DTB2) TXA₂'nin stabil bir metaboliti olup plazma veya idrar düzeyleri ölçülerek *in vivo* trombosit etkinliğinin bir göstergesi olarak kullanılabilir.

Aspirin Direncinin Olası Nedenleri

Günümüzde aspirin direncinin mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Trombosit fonksiyonlarını etkileyen çeşitli klinik, biyolojik ve genetik faktörlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir (18, 19, 27).

I. Genetik Polimorfizmler

1. COX-1 enzimi gen polimorfizmi: COX-1 enziminin 529. pozisyonunda yer alan serin amino asidinin asetillenmesi ile COX-1 enzimi geri dönüşümsüz olarak inhibe olmaktadır. Ancak Ser529'u etkileyen COX-1 gen polimorfizmi olan olgularda, COX-1 enzimi %86'ya varan oranlarda inhibe edilememektedir. Bu genetik polimorfizmin aspirin direncine neden olabileceği düşünülmektedir (28).

2. Glikoprotein (GP) IIIa gen polimorfizmi: Fibrinojen ve von Willebrand faktörü için bir membran reseptörü olan ve trombosit agregasyonunda önemli rol oynayan GP IIb/IIIa geninde polimorfizm sonucu P1A2 alleli olan kişilerde ve yakınlarında akut koroner sendrom, prematür ateroskleroz ve aspirine daha az yanıt alınması gözlemlenmiştir (29).

Düşük doz aspirin tedavisi altındaki hastalarda GPIIIa, GPIa/IIa ve GPIIb gen polimorfizmlerinin aspirin direnci ile olan ilişkilerinin incelendiği bir çalışmanın sonucunda P1A1, A1 allele sahip bireylerin trombositlerinin düşük doz aspirine daha duyarsız olduğu saptanmıştır (30).

3. 807 C/T (873 G/A) gen polimorfizmi: İntegrin ailesine mensup olan GPIa/IIa trombosit yüzeyinde bulunan bir kollajen reseptörüdür. Bu glikoprotein polimorfizmi kollajene alternatif yanıt ile sonuçlanmaktadır. Kollajenin trombositleri aktive eden ajanlardan biri oluşu, artmış trombosit uyarılması ve aspirin direnci ile sonuçlanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada bu genin polimorfizminin, miyokard infarktüsü riskinde 3 kata varan oranlarda artışa neden olduğu saptanmıştır (31).

4. Trombosit yüzeyinde adenzin 5-difosfat reseptör geni P2Y1'de tek nükleotid polimorfizmi:

Trombosit agregasyonunda rol oynayan bir dizi proteinin genlerindeki nükleotid polimorfizmini inceleyen bir çalışmanın sonuçları P2Y1 geni polimorfizminin aspirin direnci ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu göstermiştir (32).

II. Ekstresek nedenler

1. Aspirin tedavisine uyum göstermeme
2. Tedavi süresinin uzunluğu; aspirinin biyolojik yanıtı azalabilir.
3. Yetersiz dozda aspirin kullanımı
4. Sigara kullanımına bağlı trombosit agregasyonu artışı: Bazı araştırmacılar sigaranın güçlü bir trombosit aktivatörü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sigara kullanımına bağlı artmış trombosit agregasyonu kardiyovasküler hastalıklar için major bir risk faktörü olarak görülmektedir (33).

Yapılan bir araştırmada da sigara içenlerin idrarında tromboksan metabolitlerinin konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır (34).

III. İntrensek nedenler

1. Aspirin emiliminin azalması veya metabolizmasının artması

2. Aşırı egzersiz ve mental strese bağlı artmış katekolamin salınımı: Aşırı egzersiz ve mental stresin, katekolamin artışına ve aspirin direncine yol açtığı ileri sũrũlmektedir (35).

Yapılan bir çalışmada aspirine duyarlı olan koroner arter hastalarının bir kısmında egzersiz sonrası aspirin direnci geliştiği saptanmış ve egzersizin neden olduğu artmış trombosit aktivitesinin aspirin ile önlenemediği bildirilmiştir (36).

3. Tromboksandan bağımsız olarak trombosit etkinliğinin uyarılması (ADP, trombin, serotonin).

4. Akıma bağlı stres ("shear" stres) nedeni ile artmış trombosit etkinliği

5. Artmış isoprostan biyosentezi: TXA₂ benzeri vazokonstriktör ve trombosit agregasyonunu arttırıcı etkileri olan isoprostanların ũretiminden enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu sorumlu tutulmaktadır. Prostaglandin benzeri bileşikler olan isoprostanlar, serbest oksijen radikallerinin non-enzimatik katalizi ile araşıdonik asitten sentezlenmektedirler. Diyabet, hiperlipidemi, sigara ve koroner arter hastalığı gibi dolaşımdaki trombositlerin arttığı durumlarda, COX'dan bağımsız olarak bu prostaglandinlerin ũretiminin arttığı bulunmuştur (37, 38).

6. Trombositlerin kollajen, epinefrin veya ADP'ye artmış duyarlılığı.

7. Trombosit ve insan endotel hũcrelerinde COX-2 mRNA'sının aşırı ekspresyonu: Trombositlerde bulunmayan COX-2 enzimi, sitokinler, endotoksin, bũyũme faktörleri ve akım stresi ile uyarılmış endotel hũcrelerince oluşturulabilmektedir. COX-2 enzimi, COX-1 enzimine oranla aspirine 170 kez daha az duyarlıdır. Ateroskleroz gibi enflamatuvar durumlarda damar endotel hũcreleri uyarılarak COX-2 ekspresyonu artabilmektedir. Bu durum artmış TXA₂ oluşumu ve aspirine dirençli trombosit agregasyonu ile sonuçlanabilmektedir (39, 40).

8. Trombosit döngüsünde (turnover) artış: Aspirin tedavisinin sürmesine karşın geçirilen bir kanama veya cerrahi girişime yanıt olarak trombosit üretiminin artması tromboksan sentezinin sürmesine neden olabilir. Bunun nedeni yeni oluşan trombositlerde COX-2 enziminin bulunması ve TXA₂ sentezinin devam etmesidir. Bir diğer neden de aspirinin yarı ömrünün son derece kısa olması nedeniyle yeni oluşan trombositlerde COX-1 supresyonunun olmamasıdır.

9. Eritrositlerin indüklediği trombosit aktivitesi artışının yetersiz inhibisyonu: Trombositlerin eritrositlerle etkileşiminin aspirin aracılıklı inhibisyonu önleyebileceği ileri sürülmüştür. Ortamda eritrositlerin varlığı trombositlerde TXB₂ sentezinde artış ile serotonin, ADP ve β-tromboglobulin salınımında artışa neden olmaktadır. Eritrositlerin trombosit agregasyonu üzerine etkileri aspirin ile baskılanabilmekte, ancak 2-3 haftalık aspirin tedavisi sonrasında eritrositler trombositlerin reaktivitesini tekrar etkilemeye başlamaktadır (41).

10. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı ve bunların aspirin ile etkileşimi: İbuprofen, indometasin ve naproksen gibi steroid olmayan bazı antiinflamatuvar ilaçların aspirinin COX-1 enziminin aktif bölgesindeki serin kalıntısına bağlanmasını engellediği bildirilmiştir (27).

11. Oksidatif stres: Son yıllarda aspirin direnci ile ilgili olarak yapılan çalışmaların bir kısmı oksidatif stresle ilgilidir. Özellikle koroner arter hastalığı gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülen oksidatif stresin aspirin direnciyle de ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak oksidatif stres ile aspirin ilişkisini inceleyen araştırma sayısı yetersizdir (37, 38).

4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; genel olarak oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulduğu patolojik bir tablodur. Oksidatif stres ve buna bağlı biyolojik etkilerin birçok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında kalp damar hastalıkları, diyabet, kronik renal yetmezlik, bazı kanser türleri, nöro-dejeneratif hastalıklar, katarakt, respiratuvar distres

sendromu, romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları bulunmaktadır (42, 43).

Canlı organizmadaki oksidatif değişikliklerden sorumlu olan serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Serbest oksijen radikalleri normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan yan ürünlerdir ve başlıca hedef molekülleri çoklu doymamış yağ asitleri ile proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerdir (44).

Normal koşullar altında serbest oksijen radikallerinin fizyolojik reaktivitesi detoksifikasyon mekanizmalarıyla hassas bir şekilde dengelenir ve bu dengede özellikle antioksidan savunma mekanizmaları önemli rol oynar. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi bazı enzimler, E vitamini, C vitamini ve karotenler gibi antioksidan etkili vitaminler ile glutatyon ve tiyoller, selenyum gibi eser elementler ve ürik asit, bilirubin gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler antioksidan savunma mekanizmalarının en önemlilerini oluşturmaktadır (45).

4.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri; negatif yüklü elektron sayısının çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir. Temel kimyasal özellikleri dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içermeleridir. Eksik elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile iletişime girer ve bu molekülden ya bir elektron alır veya ona bir elektron verirler. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere “serbest oksijen radikalleri” denilmektedir (46).

4.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Yol Açtığı Hücresel Hasarlar:

a. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve hücre membranlarının yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olay olarak tanımlanır.

Fosfolipidlerin lipid kısımları çoklu doymamış yağ asitlerinden “Polyunsaturated fatty acids” (PUFA) zengindir. PUFA'nın yapısındaki çift bağlar da membranlardaki oksidasyona en duyarlı yerlerdir. Bu nedenle,

serbest radikallerin etkisi ile oluşan radikal reaksiyonlarının en iyi bilineni ve üzerinde en fazla araştırma yapılanı PUFA'nın yapısındaki çift bağlarda meydana gelen lipid peroksidasyonudur (47).

PUFA'daki lipid peroksidasyonu 3 aşamada gerçekleşmektedir (48);

1. Başlangıç dönemi (initiation): Serbest radikaller, zincirde çift bağın olduğu noktada bir hidrojen atomu kopararak reaksiyonu başlatırlar. Radikalin kendisi radikal olmayan bir şekle dönüşürken, PUFA'yı da karbon merkezli bir lipid radikale çevirir. Dayanıksız bir yapıya sahip olan bu lipid radikali bir dizi spontan değişikliğe uğrayarak, 234 nm'de karakteristik UV absorbansı veren konjuge dien şekline çevrilir. Konjuge dien oluşumuna kadar geçen dönem lipid peroksidasyonunun başlangıç dönemini oluşturur.

2. İlerleme dönemi (propagation): Oluşan bu lipid radikali, yani konjuge dien, genellikle oksijen ile birleşerek lipid peroksil radikalini meydana getirirken, lipid peroksil radikali de diğer lipidlerle zincirleme reaksiyonlara girer ve lipid hidroperoksit oluşur. Bu arada lipid radikallerinin oluşumu da devam eder.

3. Sonlanma dönemi (termination): Bütün bu zincirleme reaksiyonlar sonucunda oluşan lipid peroksidasyon ürünleri en sonunda bir başka lipid peroksidasyon ürünü ile reaksiyona girer ve reaksiyon sonlanır. Oluşan lipid hidroperoksitleri stabil olabilir veya katalitik metal iyonları ile reaksiyona girerek yeniden zincir reaksiyonunu başlatır ve alkoksil veya peroksil radikalini oluştururlar.

Malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi aldehit yıkım ürünleri lipid peroksidasyonunun en toksik ürünleridirler. Aldehit yapılı bu bileşikler hem yaşam sürelerinin uzun olması hem de hücre membranlarını kolayca geçebilmeleri nedeniyle hedef organlarda kolayca toksik etkilerini gösterebilirler. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan konjuge dien ve malondialdehit düzeyleri, oksidatif hasarın en sık kullanılan indirekt göstergelerindendir. Lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumu hücre membran akışkanlığında azalma, permeabilite değişiklikleri ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere yol açar (49).

b. Protein Oksidasyonu

Son yıllarda, ateroskleroz patofizyolojisinde lipid peroksidasyonunun yanısıra protein oksidasyonunun da rolü olduğu anlaşılmıştır. Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile modifikasyonu sonucu meydana gelir. Bu reaktif oksijen türevleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein fragmantasyonuna neden olurlar (50).

Yapılan çalışmalar vücut proteinlerinin çok çeşitli ajanlar tarafından (serbest radikaller, MDA ve konjuge dien gibi lipid peroksidasyon ürünleri, aktive makrofajlar, demir ve bakır gibi redoks aktif metaller, UV ve gama ışınları, ozon, sigara, çeşitli ilaçlar ve metabolitleri vs.) okside edilebileceğini göstermiştir (51).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları; enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir. Özellikle proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyona uğraması ile enzim fonksiyonlarında kayıplar, membranlardan iyon ve metabolit transportunda bozulmalar ve kontraktıl fonksiyonlarda bozulmaların olması ile önemli hücresel hasarlar oluşur (50) .

Serbest radikallere bağlı olarak gelişen protein oksidasyon ürünü olan protein karbonil gruplarının dokulardaki ve plazmadaki düzeyleri oksidatif hasarın nisbeten stabil bir belirteçidir ve bu karbonil düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (52).

Serbest oksijen radikalleri tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, çeşitli hastalıkların etyolojisi ve ilerlemesinde de rol oynar. Bu hastalıklar arasında başlıcaları; ateroskleroz, alzheimer, amiyotrofik lateral skleroz, katarakt oluşumu, kronik böbrek yetmezliği, pankreatit, kistik fibroz, diyabet, iskemi ve reperfüzyon hasarı, parkinson, romatoid artrit ve sepsis olarak sayılabilir (53, 54).

c. Karbonhidrat Oksidasyonu

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler oluşur ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Glukoz ve diğer basit monosakkaritler fizyolojik koşullar altında otooksidasyona uğrayarak dikarbonil bileşikleri ile çeşitli serbest radikaller ve hidrojen peroksit oluşturabilirler. Bir aminoasit ile indirgeyici bir şeker (örn. glukoz) arasında oluşan kimyasal bir glikasyon reaksiyonu (Maillard reaksiyon) sonucunda irreversibl “ileri glikasyon son ürünleri (AGEs)” denilen moleküller oluşabilir.

Dokularda bu moleküllerin birikimi serbest radikallerin üretimini arttırdığı gibi özellikle diyabetes mellitus ve komplikasyonlarının gelişimi ile ateroskleroz, renal yetmezlik, katarakt ve alzheimer hastalığı gelişiminde de önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (55).

Sialik Asit

Sialik asit 9 C’lu bir şeker olan nöraminik asitin asetillenmiş türevidir ve bir çok vücut sıvısı ile (plazma, synovial sıvı, idrar vs.) vücut dokusunda (eritrosit, lökosit, trombosit, mide, tükrük bezleri vs.) bulunmaktadır. Sialik asit rezidüleri sıklıkla glikoprotein ve glikolipidlerin oligosakkarid yan zincirlerinin terminal pozisyonunda bulunmaktadır. Özellikle hücre membranında bulunan sialik asit, hücre yüzey reseptörü olarak rol oynadığı gibi, hücre-hücre etkileşiminde ve hücrelerin fonksiyonel stabilitesinin devamında da görev alır ve anti-adheziv fonksiyonları da bulunmaktadır (56).

Son yıllarda koroner arter hastalığı patogenezinde sialik asidin de rol oynadığı ve serum total sialik asit düzeylerindeki artışın kardiyovasküler bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür (57). Özellikle LDL’nin yapısındaki sialik asidin uzaklaştırılmasının (desializasyon) LDL’nin aterojenik potansiyelini arttırdığı ve koroner arter hastalığı gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. Desializasyondan sorumlu faktörler arasında ise serbest oksijen radikalleri de bulunmaktadır (58).

d. DNA Hasarı

Hem endojen hem de eksojen faktörler DNA’da oksidatif hasara yol açabilir. Özellikle mitokondrial DNA’nın serbest radikal hasarına daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Serbest oksijen radikalleri; DNA proteinlerinde çapraz

bağların oluşumuna, halat kırılmalarına, deoksiriboz-fosfat omurgasında hasar gelişimine, pürin ve pirimidin bazlarında spesifik kimyasal modifikasyonlara yol açabilir (59).

5. Antioksidanlar

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan veya kısmen tamir eden moleküllere “antioksidanlar” denir. Sağlıklı bir organizmada oksidanların düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge (homeostazis) içinde bulunur (60). Oksidan ve antioksidan parametreler arasındaki bu dengenin bozulması bir çok hastalığın oluşumuna yol açabilir. Özellikle kardiyovasküler hastalıklarda oksidatif stresin ve antioksidanların etkisi son yıllarda en çok araştırılan konular arasındadır (61, 62).

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu yollarla gösterirler (48);

Çöpçü (scavenging) etki: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek onları yakalama ve çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirme (Örn. Antioksidan enzimler).

Söndürücü (quencher) etki: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girip onlara bir proton aktararak aktivitelerinin azaltılması veya inhibe edilmesi (Örn. Vitaminler).

Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest oksijen radikalleri ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri bağlayarak zincir reaksiyonlarının yavaşlatılması veya sonlandırılması (Örn. Transferrin, ferritin, seruloplazmin).

Onarıcı (repair) etki: Birçok antioksidan bu etkilerden birkaç tanesini bir arada gösterebilmektedir.

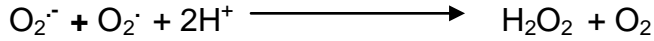
Antioksidan kapasite; süperoksid dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, paraoksonaz (PON) gibi antioksidan enzimler ve antioksidan vitaminler (C, E, A ve diğer karetonoidler) ile sağlanır.

5.1. Antioksidan etkili enzimler

Süperoksit Dismutaz: Süperoksit dismutaz enzimi (SOD), süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüğü

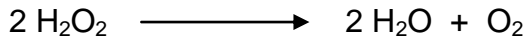
reaksiyonu katalizler. Hücrede serbest radikaller oluşurken ilk basamakta süperoksit radikali meydana geldiği ve SOD enzimi bu radikalin dismutasyonunu sağladığı için, hücre içindeki ilk savunma sistemini bu enzim oluşturmaktadır. Süperoksit radikali kendi başına çok toksik olmamasına rağmen, serbest radikal zincir reaksiyonuna yol açabildiği için ortamdan uzaklaştırılması önemlidir (63).

SOD



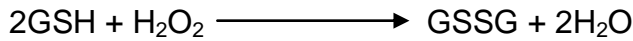
Katalaz: Başlıca peroksizomlarda lokalize ve yapısında 4 “hem” prostetik grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahip olup, hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve moleküler oksijene parçalar. SOD aracılığıyla oluşan H_2O_2 bir radikal olmamasına ve toksisitesi düşük olmasına karşın, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları aracılığı ile son derece reaktif bir radikal olan hidroksil radikali oluşumuna yol açtığı ve membranlarda lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu başlattığı için glutatyon peroksidaz ve katalaz tarafından ortamdan uzaklaştırılması biyolojik yapıların oksidatif hasardan korunması açısından son derece önemlidir (64).

Katalaz



Glutatyon Peroksidaz (GPx): Sitoplazmada yerleşmiş, tetramerik yapılı, selenyum içeren bir hidroperoksidazdır. GPx enzimi, SOD enziminin katalizlediği tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'i indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanarak suya indirger. GSH ise okside glutatyon (GSSG) dönüşür.

GPx



GPx özellikle eritrositlerde lipid peroksidasyonunu engelleyerek membran lipidlerini ve hemoglobini peroksitler aracılığıyla oluşabilecek oksidasyona karşı korur ve oksidan strese karşı en etkili antioksidanlardan birini oluşturur (65).

Paraoksonaz (PON): 354 aminoasitten oluşan 43 kDa ağırlığında ve glikoprotein yapısında olan bir esterazdır. Paration adlı organofosfatın vücuttaki aktif metaboliti olan paraoksonu paranitrofenol ve dimetilfosfata hidrolize ederek zararsız hale getirir. Serumda HDL'deki Apo-AI'e bağlı olarak bulunur. HDL'nin antioksidan kapasitesine katkıda bulunduğu ve LDL'yi oksidatif modifikasyona karşı koruduğu ileri sürülmektedir. Başlıca karaciğerde sentezlenen PON enziminin aktivite ve stabilitesi için Ca^{+2} iyonu gereklidir ve EDTA gibi şelatör ajanlarla inhibe olur. PON ayrıca arilesteraz aktivitesine de sahiptir ve arilesteraz aktivitesinin, PON aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (66). Makrofajlardan köpük hücre oluşumunu azaltarak ateroskleroz gelişimini önlediği ve serum PON aktivitesi ile KAH riski arasında ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir (67).

Aterosklerotik, hiperkolesterolemik, hipertansif ve diyabetik hastalarda da PON aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (68). Son yıllarda aspirin ile PON ilişkisini inceleyen çalışmalar da yapılmasına karşın sayıca yetersizdir (69, 70).

5.2. Antioksidan etkili vitaminler

C Vitamini: Hücre dışındaki en önemli suda çözünür antioksidandır. Suda çözünebilen diğer antioksidanlarla kıyaslandığında lipid peroksidasyonunu engelleyen en iyi antioksidandır. Membranları peroksidatif hasardan koruduğu gibi, çok güçlü bir indirgeme özelliğine de sahiptir. LDL oksidasyonunu önler ve eşleşmemiş elektronların hücre membranındaki E vitaminine transferini sağlar. Oluşan E vitamini radikalini ise indirgeyerek aktif E vitamininin yeniden oluşmasını sağlar. Aktif nötrofil ve monositlerden kaynaklanan oksidanları nötralize ederek membranları oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller.

C vitamini ideal bir elektron vericisidir ve elektronunu verdiği zaman oluşan serbest radikal araürünü (semihidroaskorbik asit) diğer serbest radikaller ile karşılaştırıldığında non-reaktiftir. Kollajen, karnitin ve katekolamin sentezinde rol oynayan çeşitli hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olarak da görev alır (71, 72).

E Vitamini: Güçlü bir antioksidan olan E vitamini tokoferol yapısındadır ve hücre membranlarında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal hasarına karşı korur. α , β , γ , δ olmak üzere dört formu bulunmakta olup, α -tokoferol antioksidan etkisi en fazla olanıdır.

Başlıca LDL'nin yapısında bulunan α -tokoferolün serbest radikallerin oluşturduğu lipoprotein oksidasyonuna karşı koruyucu etkileri vardır. Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda da α - tokoferolün lipid peroksidasyonunu (73) ve endotelial disfonksiyonu önlediği (74) trombosit adhezyon ve agregasyonunu da düzenlediği gösterilmiştir (75).

Literatürde aspirin ve E vitamini kullanımının oksidatif stresle ilişkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (76, 77).

A Vitamini: A vitamini siklohekzenil halkası taşıyan bir poliizoprenoid bileşiktir. A vitamini terimi, bu vitaminin biyolojik aktivitesini gösteren hayvansal kaynaklı tüm bileşikler kapsayan genel bir terimdir. Bunlar retinol, retinoik asit ve retinaldir. A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten antioksidan özelliklerini "quencher etki" ile göstermektedir. Karotenoidlerin yapısındaki konjuge çift bağlar antioksidan aktiviteden sorumludur. Son derece güçlü bir O_2 temizleyicisi olan β -karoten ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu önleyebilir. Literatürde koroner arter hastalığında aspirin ve karotenoid ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Aspirin direncinin nedenleri ve oluşum mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda aspirin ile oksidatif stres ilişkisini araştıran çalışmalar dikkat çekmektedir. Ancak bu çalışmaların sayısı oldukça yetersizdir ve sekonder koruma amacıyla aspirin kullanımının en yaygın olduğu koroner arter hastalığında aspirinin oksidan ve antioksidan

parametreler üzerine etkilerini araştıran ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tezin amacı; koroner arter hastalarında aspirin kullanımının oksidan ve antioksidan parametrelerde yol açtığı değişiklikleri araştırmak ve aspirin direnci saptanan hastalar ile direnç saptanmayan hastaların verilerini karşılaştırarak oksidatif stres ile aspirin direnci arasındaki olası ilişkiyi sorgulamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Gereç

1.1. Olgular

Çalışmaya, yapılan koroner anjiyografi sonucu koroner arter hastalığı tanısı konulmuş ve düşük doz (100 mg veya 150 mg) aspirin tedavisine başlanmış olan 100 hasta (65 erkek, 35 kadın; ortalama yaş 67 ± 10) ile 45 gönüllü kontrol (29 erkek, 16 kadın; ortalama yaş 63 ± 9) alındı. Çalışmaya alınan hastaların en azından 1 aydır aspirin kullanıyor olmalarına dikkat edildi. Aspirin direnci ölçümü “multiple platelet fonksiyonanalizörü’nde” (Multiplate Analyzer) “İmpedans Agregometri” yöntemi ile yapıldı. Düzenli olarak aspirin kullanan hastalarda agregasyon biriminin (AU*dak) < 300 olarak bulunması aspirin tedavisine iyi yanıt, $300 - 706$ arasında bulunması aspirine orta derecede yanıt, > 706 bulunması ise aspirin direnci olarak kabul edildi.

Koroner anjiyografi tüm olgularda “Judkins” tekniği ile yapıldı ve anjiyografik değerlendirme iki ayrı kardiyolog tarafından gerçekleştirildi. Koroner arter hastalığı, koroner anjiyografide majör epikardiyal koroner arterlerde %50 ve üzerinde darlık oluşu olarak kabul edildi. Hastalar, sol ön inen dal, sirkümfleks arter ve sağ koroner arter tutulumlarına göre tek damar ve çok damar (iki damar ve üç damar) hastalığı olmak üzere iki alt gruba ayrıldı.

Trombositopeni (trombosit $< 100.000/mm^3$) veya trombositoz (trombosit > 400.000), anemi (hemoglobin < 10 g/dl), polisitemi (hematokrit $> 50\%$), son 3 ay içinde akut miyokard infarktüsü veya felç geçirilmesi, son 1 ay içinde cerrahi operasyon geçirilmesi, kalp yetmezliği, karaciğer yetmezliği, son dönem böbrek yetmezliği, hematolojik hastalıklar ve kanser varlığı dışlama kriterleri olarak kabul edildi. Ayrıca, son 10 gün içinde steroid dışı antiinflamatuvar ilaç, klopidogrel, tiklopidin, heparin veya glikoprotein inhibitörü almış olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmaya alınan tüm hastalar, kardiyovasküler risk faktörleri yönünden de incelendiler. Hipertansiyon; antihipertansif ilaç kullanımı veya 10 dakika dinlenme sonrası yapılan iki ayrı ölçümde sistolik kan basıncının > 140 mmHg, diyastolik kan basıncının > 90 mmHg olması, hiperlipidemi; antilipidemik ilaç kullanımı veya total kolesterol ve trigliserid değerlerinin > 200 mg/dL olması, diyabet; antidiyabetik ilaç kullanımı veya açlık kan şekerinin farklı günlerde yapılan 2 veya 3 ölçümde \geq 126 mg/dl bulunması, sigara; düzenli sigara içimi veya son üç yıl içinde sigarayı bırakma durumunda risk faktörü olarak kabul edildiler. Birinci derece erkek akrabalarda 55 yaşından önce, 1. derece kadın akrabalarda ise 65 yaşından önce geçirilmiş miyokard infarktüsü veya ani ölüm saptanması da pozitif aile öyküsü olarak değerlendirildi (78).

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından da onaylanan (26 Mayıs 2009 - 9/1) bu çalışma hakkında tüm katılımcılara gerekli bilgi verilerek, "çalışmaya katılım formları" doldurulmuş ve onayları alınmıştır.

1.2. Örnek Toplanması

Kan örnekleri, bir kuru tüp (Greiner Vacuette, North America), bir EDTA içeren tüp (Greiner Vacuette, North America) ve bir hirudin (trombin inhibitörü) içeren tüpe (Dynabyte GmbH-Münich, Germany) 0.18 x 40 mm'lik iğne yardımı ile (Vacutainer, Becton Dickinson, Plymouth, İngiltere) ön kol antekübital bölgedeki venlerden alındı. Hirudin içeren tüplere alınan tam kan örneklerinde 1 saat içinde aspirin direnci ölçümü yapıldı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri kan sayımı için kullanıldı. Kuru tüplere alınan kan örnekleri ise 3000 x rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı.

Ayrılan serumlar küçük porsiyonlar şeklinde - 80 °C'de depolanarak malondialdehit, protein karbonilleri, sialik asit, paraoksonaz, arilesteraz, katalaz, total karoten ile vitamin E ve vitamin C ölçümleri daha sonra topluca yapıldı.

1.3. Araç ve Gereçler

1. Multiplate trombosit fonksiyon analizörü, (Almanya)
2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı, "Shimadzu LC-10AT" (Japonya)
3. Otoanalizör, "Aeroset" ve "Architect" c8000, "Abbot Diagnostics" (A.B.D)
4. Spektrofotometre, "Shimadzu U.V. Visible 1601" (Japonya)
5. Su banyosu, "Julabo UC" (Almanya)
6. Santrifüj, "Hettich EBA 20" (Almanya)
8. Karıştırıcı (vorteks), "Heidolph" (Almanya)
9. Otomatik pipet (10 mL), "Gilson" (ABD)
11. Otomatik pipet (20-200mL), "Eppendorf" (Almanya)
12. Otomatik pipet (500-5000mL), "Eppendorf" (Almanya)
13. Otomatik pipet (200-1000 mL), "Eppendorf" (Almanya)
14. Derin dondurucu (-20 ° C) "Uğur" (Türkiye)
15. Derin dondurucu (-80° C), "Sanyo" (Japonya)
16. Hassas tartı, "OHAUS analytical plus" (İsviçre)
17. Tartı, "Mettler PJ 3000" (İsviçre)

1.4. Kimyasal Malzemeler

1. Fosforik asit, "Aldrich" (Almanya) Kat no: 215104
2. 2-Tiyobarbitürik asit (>%98), "Sigma" (A.B.D.) Kat.no : T 5500
3. Sodyum hidroksit, "Merck" (Almanya) Kat.no : 6462
4. Metanol (HPLC grade), "BDH" (Almanya) Kat.no :15250
5. di-Sodyum hidrojen fosfat, "Merck" (Almanya) Kat.no: 6576
6. Potasyum dihidrojen fosfat, "Merck" (Almanya) Kat.no : 4871
7. 1,1',3,3' Tetrametoksipropan, "Fluka" (İsviçre) Kat.no : 87670
8. CC 250/4 Nucleosil 100-10 C 18 HPLC kolonu "Macherel-Nagel" (Almanya) Kat no: 721689.40
9. E vitamini standartı: α - tokoferol, "Sigma" (A.B.D.) Kat.no : T-3251
10. CC 125/4 Nucleosil 100-3 C 18 HPLC kolonu "Macherel-Nagel" (Almanya) Kat no: 721883.40

11. Glisin, "Merck" (Almanya) Kat.no : 4201
12. Tris, "Merck" (Almanya) Kat.no: 8387
13. Paraokson (Dietil p-nitrofenil fosfat), "Sigma" (A.B.D.) Kat. no: D9286
14. Fenil asetat (%99), "Aldrich" (A.B.D.) Kat.no: 10,872-3
15. Hidroklorik asit, "Merck" (Almanya) Kat.no: 1.00314
16. 2,4,Dinitrofenilhidrazin, "Riedel-De-Haen" (Almanya) Kat.no: 33145
17. Triklorasetik asit, "Sigma" (A.B.D.) Kat.no: S T9159
18. Etanol (%97), "Merck" (Almanya) Kat no: 983
19. Etil asetat "Merck" (Almanya) Kat no: 864
20. Guanidin HCL "Sigma" (Almanya) Kat no: S4505
21. Perklorik asit "Merck" (Almanya) Kat no: 5296132
22. 4-dimetil aminobenzaldehid "Merck" (Almanya) Kat no: 803057
23. Petrolyum eter, "Merck" (Almanya) Kat.no: 910
24. Metafosforik asit, "Sigma" (A.B.D.) Kat.no: 6250
25. Sülfürik Asit (%95-98), "Merck" (Almanya) Kat.no: 713
26. Tiyoüre, "Carlo Erba" Kat.no: 33145
27. Bakır (II) sülfat, "Merck" (Almanya) Kat.no: 2787
28. Askorbik asit, "Sigma" (A.B.D.) Kat.no: S A5960
29. Amonyum molibdat, "Sigma" (A.B.D.) Kat.no: S A7302

2. Yöntemler

2.1. Aspirin direnci ölçümü

Aspirin direnci ölçümü "multiple platelet fonksiyon analizörü'nde" (Multiplate) "İmpedans Agregometri" yöntemi ile yapıldı. Multiplate tam kandan trombosit fonksiyon analizi yapan impedans yöntemle çalışan bir agregometredir (Şekil-3).



Şekil- 3: Multiplate® Cihazı.

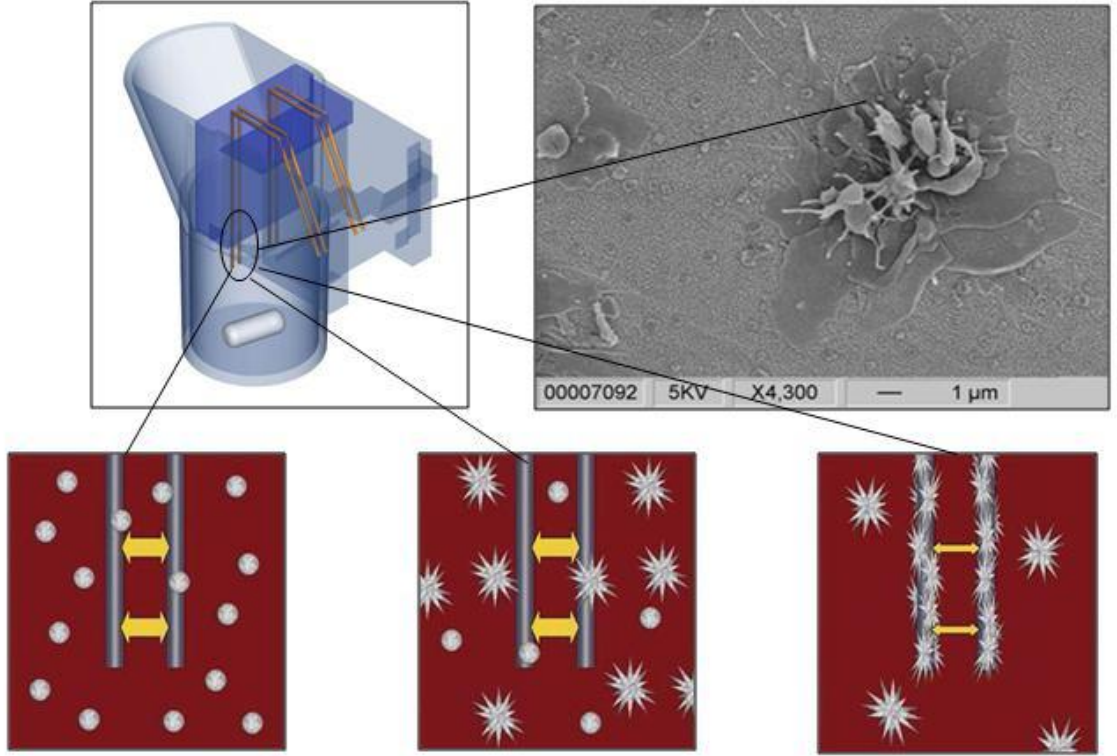
Multiplate; Aspirin, Klopidoğrel ve GpIIb/IIIa antagonistleri ve ADP reseptör antagonistleri gibi trombosit inhibitörlerinin trombositler üzerindeki etkilerini ölçer. Multiplate hem rutin uygulamalara hem de araştırmaya yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Standardize edilmiş aktivatörler ve test prosedürleri rutin kullanıma açık olduğu kadar çeşitli araştırmalar için de uygundur.

Multiplate sistem aynı anda değişik testleri çalışabilmek için 5 farklı kanala sahiptir. Sistem, Microsoft XP tabanlı bir bilgisayar sistemi ve harici printer içerir. Cihaza ayrıca opsiyonel olarak elektronik pipet bağlanabilmektedir.

Bütün testler sistem hafızasında saklanmakta ve USB ile diğer bilgisayarlara kolaylıkla aktarılabilmektedir (79).

Tek kullanımlık test hücresi:

Multiplate sistemde reaksiyon test kuvetleri içinde gerçekleşir. Bu kuvetler, içinde teflon kaplamalı karıştırıcı ve çift ölçüm almak için iki adet sensör birimi bulunan tek kullanımlık kuvetlerdir (Şekil-4).



Şekil- 4:Test kuveti ve reaksiyon prensibi

Multiplate analizinin temel prensibi, trombositlerin aktive olduktan sonra yapışkanlık kazanması ve Multiplate test kuvetindeki metal sensörlere yapışma ve ardından kümeleşme eğilimi göstermelerine dayanır.

Aktive olmuş trombositler metal sensörler üzerine yapıştığında, teller arasındaki elektrik direnci artar. Bu direnç, sistem tarafından düzenli olarak (real-time) izlenmektedir (79).

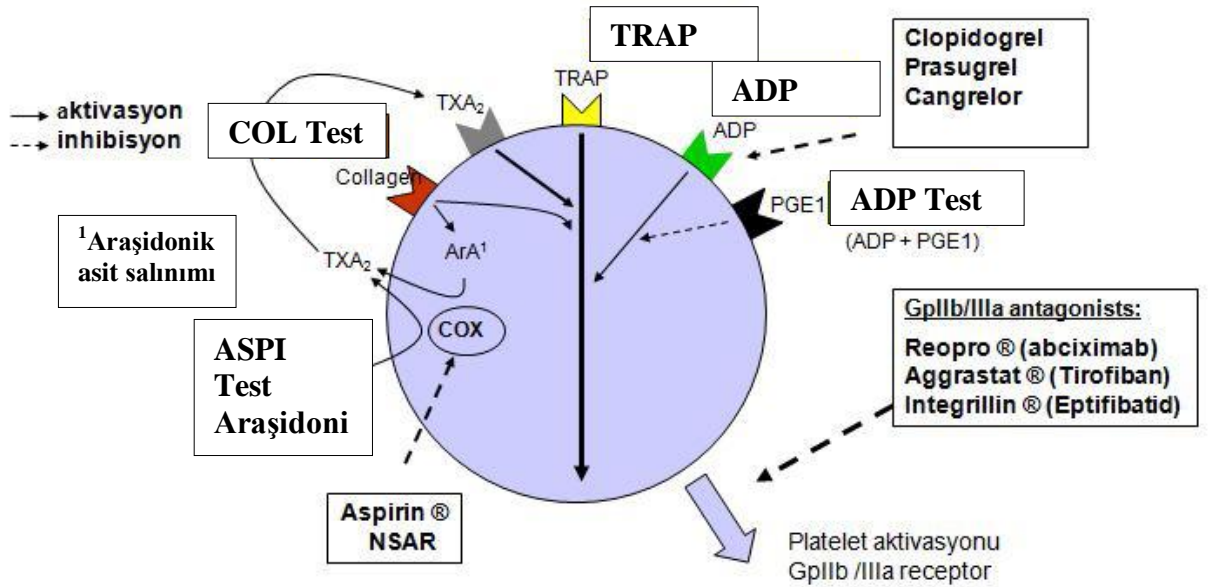
Multiplate çalışma prensibi:

Cardinal ve Flower tarafından geliştirilen ve 1980'lerden beri kullanılan impedans agregometre yöntemi tam kan içinde trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanılır. Impedans agregometre yöntemi trombositlerin dinlenme aşamasında trombojenik olmaması, fakat

aktive olduklarında yüzeylerinde damar çeperleri ve yapay yüzeylere tutunmalarını sağlayan reseptörler ortaya çıkarmaları prensibine dayanır.

Trombositler Multiplate test küvetlerindeki sensör tellerine bağlandıklarında teller arasında sürekli olarak izlenen direnci artırır. Bu direncin artması için sıkı bir bağlanma gerekmektedir.

Multiplate cihazının Born agregometresi ve trombosit sayımından farkı, agregasyonun (kümeleşmenin) yüzeyler üzerinde olmasıdır. Diğer yöntemlerde trombositler yüzeye değil, sıvı içinde birbirine tutunmaktadır. Bu yüzden *invivo* çalışmaya daha yakın bir yöntemdir (80).



Şekil-5: Multiplate Testlerin (Aktivatörler) Etki Mekanizmaları

ASPI Test: Araşidonik asit ile aktivasyon sağlanır. Araşidonik asit siklooksijenazın (COX)'un substratıdır. COX araşidonik asit ile aktive olarak kuvvetli bir trombosit agonisti olan TXA2'ye dönüşür (Şekil-5).

COLTest: Kollajen, kollajen reseptörünü aktive eder ve araşidonik asit salınımına sebep olarak TXA2'ye dönüşür ve daha sonra plateletleri aktive eder.

TRAPTest: TRAP6 trombosit yüzeyindeki trombin reseptörünü uyarır. Trombin çok etkili bir platelet aktivatörüdür. TRAP aynı zamanda Aspirin ya da klopidogrel ile tedavi gören hastalarda GpIIb/IIIa antagonistlerinin etkisini tesbit eder.

ADPTest: ADP, ADP reseptörleri tarafından tetiklenen trombosit aktivasyonunu uyarır.

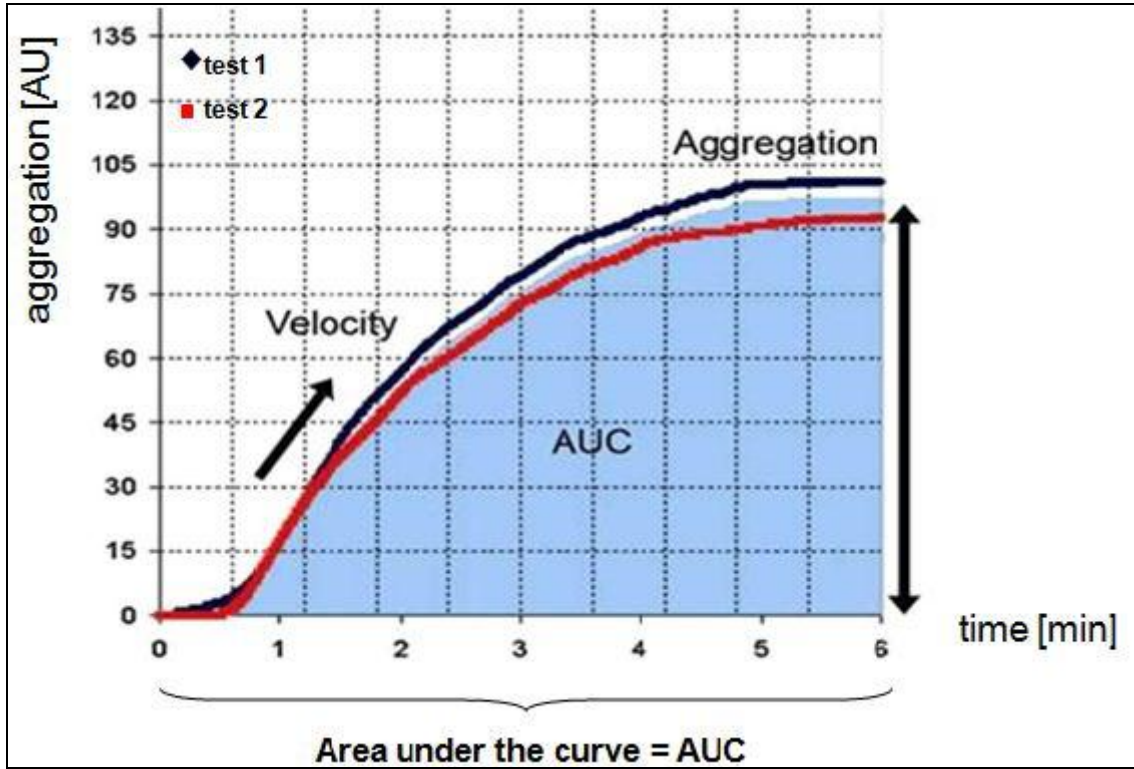
En önemli ADP reseptörü (P2Y12) klopidogrel, prasugrel ve tiklopidine gibi ilaçlarla bloke edilir.

ADP + HS: PGE1 inhibitörü ile P2Y1 reseptörü bloke edilerek test tamamen Klopidogrelle hassas bir hale gelir

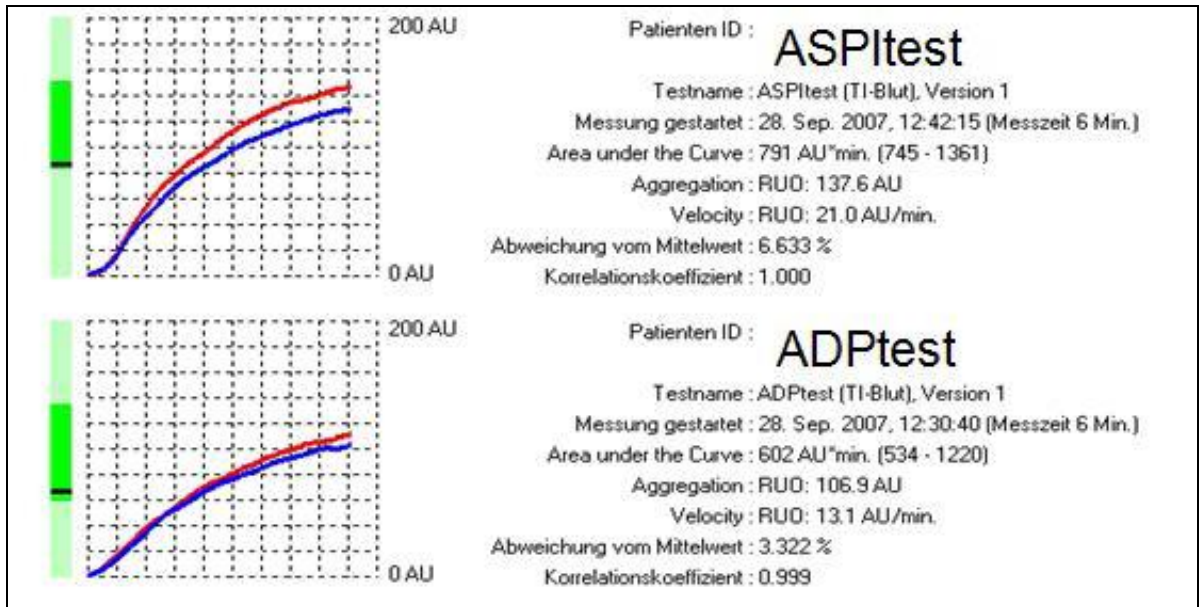
RISTOTest: Ristosetin kullanılarak yapılan bu testte az miktarda kullanılan aktivatörle Von-Willebrand faktör Tip IIb ve GpIb bağımlı agregasyon (Bernard Soulier sendromu) tespit edilebilir.

Multiplate® test sonuçları:

Multiplate® trombositlerin agregasyonunu (kümeleşmesini) sürekli olarak kaydeder. Multiplate sensörlerine yapışan trombositler sayesinde artan impedans, agregasyon (kümeleşme) birimi (AU)'ya çevrilir ve zamana karşı bir grafik oluşturulur (Şekil-6, 7).



Şekil-6: Multiplate test sonuç grafiği



Şekil-7: Multiplate test sonuç örnekleri

Çalışılmış hasta örnekleri

En önemli parametre eğrinin altında kalan alan (AUC) dir. AUC değeri genel trombosit durumunu ölçmek için en uygun parametredir.

Test küvetindeki iki ayrı sensörden alınan veriler iki ayrı eğri olarak işlenir. Program bu iki eğrinin ortalamasını alarak genel sonuçları bu eğri üzerinden değerlendirir. Sistem çift çalışma yaparak böylece kendi içindeki kalite kontrol parametresini oluşturur. İki eğri arasındaki fark sınırların üstündeysen, bu bize test çalışması sırasında kullanıcıdan kaynaklanan hataları gösterir (81).

Multiplate® testlerin antiplatelet ajanlarına karşı hassasiyeti:

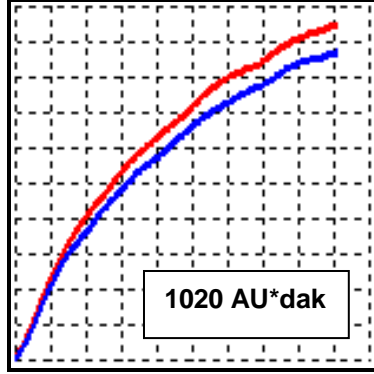
	<u>Aspirin®</u>	<u>Clopidogrel</u>	<u>GPIIb / IIIa Ant</u>
TRAPtest	-	-	+
ASPItest	++	-	+
ADPtest	-	+	+
ADPtest HS	-	++	+

Aspirine olan cevabın değerlendirilmesi:

Test	Normal Değerler (AU*dak) (ilaç kullanmayan)	Multiplate Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi (AU*dak) (ilaç kullanan)
ASPI	706 – 1148	0 – 300: İyi cevap 300 – 706: Düşük yada orta cevap 706 – 1148: Cevapsız

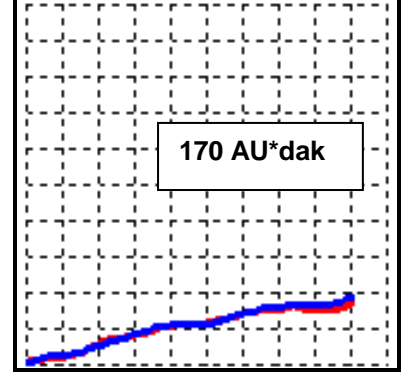
Örnekler:

ASPI Test



Normal donör (ilaç kullanmayan)

ASPI Test



100 mg aspirin/gün kullanan

2.2. Kan sayımı ölçümleri

Plazma eritrosit ve trombosit sayımı ile hemoglobin ve hematokrit ölçümleri "Cell-Dyn 3700" (Abbott, USA) kan sayım analizöründe yapıldı.

2.3. Lipit profili ile glukoz, kreatinin, ALT ve AST ölçümleri

Serum lipit profili için Abbott marka kitler kullanılarak otoanalizörde (Aeroset, USA) ölçüm yapıldı. Total kolesterol ve trigliserid düzeyleri enzimatik hidroliz yöntemi ile, HDL-kolesterol düzeyleri ise enzimatik eliminasyon yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlendi. LDL- kolesterol düzeyleri "Friedewald" formülü ile hesaplandı (82).

Friedewald formülü:

$LDL\text{-kolesterol(mg/dL)} = Total\ kolesterol - (HDL\text{-kolesterol} + VLDL\text{-kolesterol})$

$VLDL\text{-kolesterol(mg/dL)} = Trigliserid(mg/dL) / 5$

2.4. Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümü

Serum MDA düzeyi ölçümü Young ve ark.'nın (83) tanımladığı yöntemle göre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile yapıldı (intra – assay CV %4.2, inter – assay CV %6.8).

Yöntemin prensibi; Tiyobarbiturik asit ile lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın asidik ortamda yüksek ısının etkisi ile pembe renkli bir kompleks oluşturmasıdır.

2.5. Protein karbonillerinin ölçümü

Serum proteinlerinin oksidasyona duyarlılığı Reznick ve ark.'nın (84) tanımladığı yonteme göre ölçüldü (intra-assay CV %5.9, inter-assay CV %8.7).

Yöntemin prensibi: Serum proteinlerinin triklorasetik asit ile çöktürüldükten sonra dinitrofenilhidrazin ile okside edilmesi ve oluşan karbonil gruplarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

2.6. Total siyalik asit ölçümü

Serum total siyalik asit ölçümü Sydow ve ark.'nın (85) tanımladığı yonteme göre yapıldı (intra – assay CV %3.8, inter – assay CV %6.4).

Yöntemin prensibi: Seruma perklorik asitin eklenmesiyle açığa çıkan total sialik asitin, Ehrlich ayıracı ile renklendirilerek, spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

2.7. Paraoksonaz (PON) aktivitesinin ölçümü

Serum PON aktivitesi ölçümü Eckerson ve ark.'nın (86) tanımladığı yonteme göre yapıldı (intra – assay CV %3.7, inter – assay CV %5.6).

Yöntemin prensibi: PON aktivitesinin ölçümü serumdaki paraoksonaz tarafından paraokson'un hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenol'ün miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesidir.

2.8. Arilesteraz aktivitesinin ölçümü

Serum arilesteraz aktivitesi ölçümü Eckerson ve ark.'nın (86) tanımladığı yonteme göre yapıldı (intra – assay CV %3.1, inter – assay CV %4.9).

Yöntemin prensibi: Serumdaki arilesteraz tarafından fenilasetatin hidrolizi sonucu açığa çıkan fenol miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesidir.

2.9. Katalaz aktivitesinin ölçümü

Serum katalaz aktivitesi ölçümü Goth ve ark.'nın (87) tanımladığı yonteme göre yapıldı.

Yöntemin prensibi: Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile serumun inkübe edilmesinden sonra ortamda kalan H_2O_2 'in amonyum molibdat ile stabil bir kompleks oluşturması ve bunun spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır.

2.10. Vitamin C düzeyinin ölçümü

Serum vitamin C ölçümü Mc Cormick ve ark'nın (88) tanımladığı yöntemle yapıldı (intra – assay CV %6.5, inter –assay CV %8.7).

Yöntemin prensibi: Askorbik asitin Cu^{+2} ile dehidroaskorbik asite okside olması ve bu bileşiğin de asidik ortamda 2,4- dinitrofenilhidrazin ile 450 nm. de absorbans veren kırmızı renkli bis-hidrazona dönüşmesi prensibine dayanır.

2.11. Vitamin E düzeyinin ölçümü

Serum vitamin E ölçümü Teissier ve ark.'nın (89) tanımladığı yöntemle göre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapıldı (intra – assay CV %4.3, inter –assay CV %6.5).

Yöntemde 50 μ L ışıktan korunmuş serum 950 μ L HPLC “grade” methanol ile karıştırıldı ve 1600 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra 50 μ L süpernatant alınıp dalga boyu 292 nm ve mobil faz (HPLC “grade” methanol) akış hızı 1 mL/dakika olan HPLC'ye injekte edildi. Sonuçlar α -tocopherol standardı (Sigma, %95'lik) ile hazırlanan standart eğri grafiği ile değerlendirildi ve μ g/ml olarak verildi.

2.12. Total karoten düzeyinin ölçümü

Serum total karoten düzeyi Mc Cormick ve ark.'nın (88) tanımladığı yöntemle göre ölçüldü (intra – assay CV %5.4, inter –assay CV %8.9).

Yöntem; karotenlerin petrol etere ekstrakte edilmeleri prensibine dayanır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için “SPSS 10.0” paket programı kullanıldı. Kantitatif değerler; ortalama \pm standart sapma olarak verilirken, kalitatif değerler ise %olarak verildi. Gruplar arasında kantitatif değerlerin karşılaştırılması yapılırken, normal dağılım gösteren parametreler için 2 grubun karşılaştırılmasında Student's t-testi, 3 grubun karşılaştırılmasında ise ANOVA testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametreler için 2 grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U testi, 3 grubun

karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kalitatif değerlerin karşılaştırılmasında ise ki-kare testi kullanıldı.

Aspirin direnci ile klinik ve laboratuvar parametreleri arasındaki ilişki "Pearson" korelasyon analizi ile incelendi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

1. Klinik Özellikler ve Risk Faktörleri

Çalışmaya alınan tüm koroner arter hastaları (n=100) ile kontrol grubuna (n= 45) ait klinik özellikler ve risk faktörleri Tablo-1'de gösterilmiştir. Hasta grubunu 35 kadın ve 65 erkek hasta oluştururken, kontrol grubunu 16 kadın ile 29 erkek oluşturmuştur. Yapılan koroner anjiyografi sonucu 48 hastada tek damar hastalığı, 52 hastada ise çok damar hastalığı (2 veya 3 damar) olduğu saptanmıştır. Yapılan laboratuvar incelemesi sonuçlarına göre düşük doz aspirin kullanan 78 koroner arter hastasının aspirin tedavisine iyi yanıt verdiği (aspirine duyarlı hastalar), 15 hastanın orta derecede yanıt verdiği (aspirine orta derecede duyarlı hastalar), 7 hastanın ise yanıt vermediği saptanmıştır (aspirine dirençli hastalar).

Vücut kitle indeksi, sistolik ve diyastolik kan basıncı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken yaş, diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara kullanımı ve aile öyküsü açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır. Özellikle hasta grubunda diyabet hipertansiyon ve hiperlipidemi görülme oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0.001$) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sigara kullanımı ($p < 0.01$) ve aile öyküsü ($p < 0.05$) açısından ise iki grup arasındaki farklılığın istatistiksel olarak daha az anlamlı olduğu bulunmuştur.

Tablo-1: Koroner arter hastaları ve kontrol grubunda klinik özellikler ve risk faktörleri

	KAH (n=100)	Kontrol (n=45)
Yaş (yıl)	67 ± 10	63 ± 9 †
Kadın / Erkek	35 / 65	16 / 29
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	28.5 ± 4.1	27.8 ± 4.0
Sistolik kan basıncı (mmHg)	115 ± 18	110 ± 13
Diyastolik kan basıncı (mmHg)	70 ± 10	67 ± 8
Koroner arter tutulumu, n (%)		
Tek damar hastalığı	48 (48%)	-
Çok damar hastalığı	52 (52%)	-
Aspirine duyarlılık (n)		
Aspirine duyarlı hastalar	78	-
Aspirine orta derecede duyarlı hastalar	15	-
Aspirine dirençli hastalar	7	-
Risk faktörleri, n (%) *		
Diyabet	46 (46%)	7 (15%) #
Hipertansiyon	62 (62%)	11 (24%) #
Hiperlipidemi	44 (44%)	9 (20%) #
Sigara	49 (49%)	15 (33%) ‡
Aile öyküsü (%)	44 (44%)	17 (38%) †

KAH: Koroner Arter Hastaları *: ki-kare testi
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: †p< 0.05, ‡p< 0.01, #p< 0.001

Çalışmaya alınan ve aspirin kullanan tüm koroner arter hastalarının “aspirine duyarlılıklarına” göre gruplandırılarak klinik özellikleri ve risk faktörleri açısından karşılaştırılması Tablo-2’de verilmiştir. Aspirine dirençli

hastalarda, hem aspirine duyarlı hem de orta derecede duyarlı olan hastalara göre sistolik ve diyastolik kan basınçlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ejeksiyon fraksiyonu ise aspirine duyarlı olan hastalara göre diğer iki grupta da anlamlı olarak ($p < 0.01$) daha düşük bulunmuştur. Aspirin tedavisine yanıtın değerlendirilmesinde kullanılan agregasyon birimi (AU) beklendiği gibi gruplar arasında anlamlı ($p < 0.001$) olarak farklıdır.

Koroner arter tutulumu açısından grupları karşılaştırdığımızda, aspirine dirençli grupta çok damar hastalığı görülme yüzdesi diğer iki gruba göre daha yüksek bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Risk faktörleri açısından incelediğimizde ise aspirine dirençli hastalarda, hem aspirine duyarlı hem de orta derecede duyarlı olan hastalara göre diyabet ve sigara kullanımı oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Tablo-2: Koroner arter hastalarının aspirine duyarlılıklarına göre klinik özellikler ve risk faktörleri açısından karşılaştırılması.

	Aspirine duyarlı grup (n=78)	Aspirine orta derecede duyarlı grup (n=15)	Aspirine dirençli grup (n=7)
Yaş (yıl)	66.3 ± 9.6	65.9 ± 13.7	72.3 ± 7.2
Kadın / Erkek	24 / 54	7 / 8	4 / 3
VKİ (kg/m ²)	27.8 ± 5.4	31.1 ± 6.4 ^{a †}	31.3 ± 4.3
SKB (mmHg)	115 ± 19	110 ± 13	131 ± 12 ^{a †, b †}
DKB (mmHg)	70 ± 10	67 ± 8	85 ± 9 ^{a #, b #}
EF (%)	42 ± 13	32 ± 9 ^{a †}	27 ± 8 ^{a †}
AU	169 ± 72	416 ± 74 ^{a #}	852 ± 73 ^{a #, b #}
Koroner arter tutulumu, n (%)			
Tek damar hastalığı	38 (49%)	7 (47%)	3 (43%)
Çok damar hastalığı	40 (51%)	8 (53%)	4 (57%)
Risk faktörleri, n (%) *			
Diyabet	35 (45%)	6 (40%)	5 (71%) ^{a †, b #}
Hipertansiyon	47 (60%)	10 (67%)	5 (71%)
Hiperlipidemi	34 (44%)	7 (47%)	4 (57%) ^{a †}
Sigara	36 (46%)	8 (53%)	5 (71%) ^{a †, b †}
Aile öyküsü	35 (45%)	5 (33%)	4 (57%) ^{b †}

VKİ: Vücut kitle indeksi, **AU:** Agregasyon birimi, "Aggregation Unit", **SKB:** Sistolik kan basıncı, **DKB:** Diastolik kan basıncı, **EF:** Ejeksiyon Fraksiyonu,

^a: Aspirine duyarlı grup ile karşılaştırma ^b: Aspirine orta derecede duyarlı grup ile karşılaştırma.

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: †p< 0.05, ‡p< 0.01, #p< 0.001, *: ki-kare testi,

Koroner arter hastalarının tedavisinde kullanılan aspirin dışındaki diğer ilaçların gruplara göre dağılımı sayı ve yüzde olarak Tablo-3'de verilmiştir.

Tablo-3: Koroner arter hastalarının kullandıkları ilaçlar ve gruplara göre dağılımları.

	Aspirine duyarlı grup (n=78)	Aspirine orta derecede duyarlı grup (n=15)	Aspirine dirençli grup (n=7)
ACE inhibitörü, n (%)	26 (33)	6 (40)	4 (57)
β bloker, n (%)	24 (31)	6 (40)	5 (71)
Kalsiyum kanal blokeri, n (%)	16 (21)	4 (27)	2 (29)
Diüretik, n (%)	39 (50)	12 (80)	5 (71)
Lipid düşürücü ajan, n (%)	52 (67)	6 (40)	5 (71)
Anjiyotensin res. blokeri, n (%)	10 (13)	5 (33)	2 (29)
Dijital türevleri, n (%)	18 (23)	7 (47)	3 (43)

2. Biyokimyasal ve Hematolojik Parametreler

Çalışmaya alınan tüm koroner arter hastaları ile kontrol grubuna ait biyokimyasal ve hematolojik parametreler Tablo-4'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo-4: Koroner arter hastaları ve kontrol grubunda biyokimyasal ve hematolojik parametreler*.

	KAH (n=100)	Kontrol (n=45)
Glukoz (mg/dl)	123 ± 47	110 ± 43
Kreatinin (mg/dl)	1.05 ± 0.24	1.01 ± 0.21
AST (IU/L)	24 ± 7	25 ± 5
ALT (IU/L)	23 ± 11	21 ± 10
Total kolesterol (mg/dl)	166 ± 42	173 ± 33
HDL-kolesterol (mg/dl)	38 ± 12	41 ± 13
LDL- kolesterol (mg/dl)	103 ± 32	105 ± 28
Trigliserit (mg/dl)	128 ± 62	134 ± 57
Eritrosit (M/μl)	4.5 ± 0.7	4.7 ± 0.8
Hemoglobin (g/dl)	12.4 ± 1.8	12.7 ± 2.2
Hematokrit (%)	37 ± 6	36 ± 5
Trombosit (K/μl)	241 ± 72	252 ± 67

* Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. **KAH:** Koroner Arter Hastaları

Çalışmaya alınan ve aspirin kullanan tüm koroner arter hastalarının “aspirine duyarlılıklarına” göre gruplandırılarak biyokimyasal ve hematolojik parametreler açısından karşılaştırılması Tablo-5’de verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo-5: Koroner arter hastalarının aspirine duyarlılıklarına göre biyokimyasal ve hematolojik parametreler açısından karşılaştırılması

	Aspirine duyarlı grup (n=78)	Aspirine orta derecede duyarlı grup (n=15)	Aspirine dirençli grup (n=7)
Glukoz (mg/dl)	121 ± 47	134 ± 42	132 ± 51
Kreatinin (mg/dl)	1.06 ± 0.23	1.02 ± 0.27	1.03 ± 0.24
AST (IU/L)	23 ± 7	27 ± 5	24 ± 9
ALT (IU/L)	22 ± 12	25 ± 10	22 ± 8
Total kolesterol (mg/dl)	164 ± 42	166 ± 33	190 ± 48
HDL-kolesterol (mg/dl)	37 ± 12	41 ± 13	43 ± 8
LDL- kolesterol (mg/dl)	102 ± 32	97 ± 23	121 ± 43
Trigliserit (mg/dl)	127 ± 65	134 ± 57	127 ± 39
Eritrosit (M/μl)	4.4 ± 0.7	4.5 ± 0.8	4.8 ± 0.6
Hemoglobin (g/dl)	12.4 ± 1.7	12.6 ± 2.1	12.7 ± 2.4
Hematokrit (%)	37 ± 5	36 ± 5	36 ± 5
Trombosit (K/μl)	239 ± 75	250 ± 69	253 ± 43

* Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

3. Oksidatif Parametreler ile Total Sialik Asit Düzeyleri

Çalışmaya alınan tüm koroner arter hastaları ile kontrol grubuna ait oksidatif parametreler ile total sialik asit düzeyleri Tablo-6'da gösterilmiştir. Hasta grubunda malondialdehit, protein karbonilleri ve total sialik asit düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0.001$) daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Tablo-6: Koroner arter hastaları ve kontrol grubunda oksidatif parametreler ile total sialik asit düzeyleri

	KAH (n=100)	Kontrol (n=45)
Malondialdehit (nmol/ml)	0.95 ± 0.35	0.61 ± 0.25 #
Protein Karbonilleri (nmol/mg prot.)	2.55 ± 0.83	0.56 ± 0.21 #
Total sialik asit (mg/dl)	49.5 ± 10.5	41.8 ± 7.1 #

KAH: Koroner Arter Hastaları
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: # $p < 0.001$

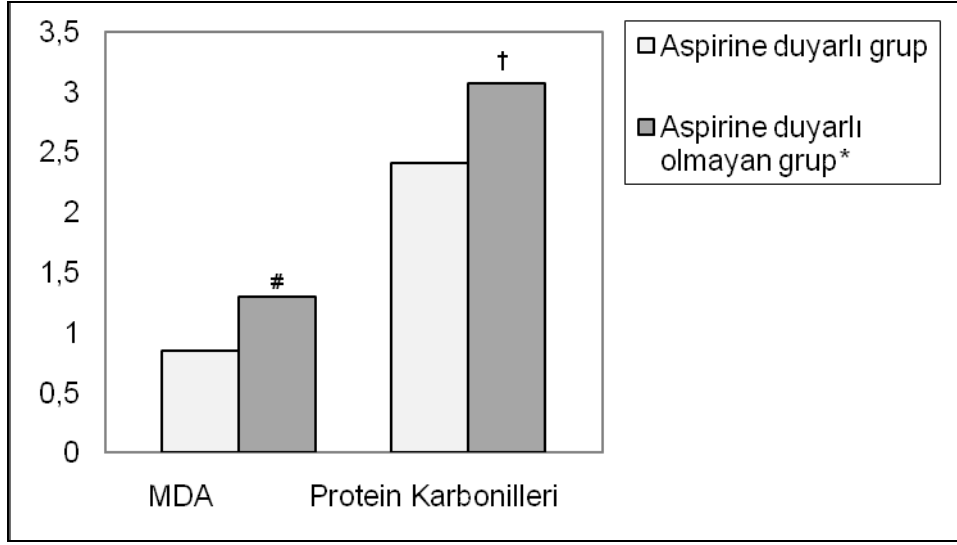
Çalışmaya alınan ve aspirin kullanan tüm koroner arter hastalarının “aspirine duyarlılıklarına” göre gruplandırılarak oksidatif parametreler ile total sialik asit düzeyleri açısından karşılaştırılması Tablo-7’de verilmiştir. Malondialdehit, protein karbonilleri ve total sialik asit düzeylerinin aspirine dirençli ve orta derecede duyarlı gruplarda aspirine duyarlı olan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

Tablo-7: Koroner arter hastalarının aspirine duyarlılıklarına göre oksidatif parametreler ve total sialik asit düzeyleri açısından karşılaştırılması.

	Aspirine duyarlı grup (n=78)	Aspirine orta derecede duyarlı grup (n=15)	Aspirine dirençli grup (n=7)
Malondialdehit (nmol/ml)	0.85 ± 0.29	1.17 ± 0.33 ^{a#}	1.56 ± 0.29 ^{a#, b‡}
Protein karbonilleri (nmol/mg protein)	2.41 ± 0.81	2.89 ± 0.74 ^{a†}	3.43 ± 0.63 ^{a‡}
Total sialik asit (mg/dl)	47.3 ± 9.9	54.6 ± 9.2 ^{a‡}	63.4 ± 5.0 ^{a#, b†}

^a: Aspirine duyarlı grup ile karşılaştırma ^b: Aspirine orta derecede duyarlı grup ile karşılaştırma, İstatistiksel anlamlılık düzeyi: †p< 0.05, ‡p< 0.01, #p< 0.001

Aspirine duyarlı olan hastalar (n=78) ile aspirine duyarlı olmayan tüm hastaların (n=22) (aspirine orta derecede duyarlı grup, n=12 ve aspirine dirençli grup, n=7) oksidatif parametreler ile total sialik asit düzeyleri açısından karşılaştırılması şekil-8 ve şekil-9'da verilmiştir. Şekil-8'de aspirine duyarlı olmayan hastaların malondialdehit (p< 0.001) ve protein karbonil (p< 0.05) düzeylerinin aspirine duyarlı olan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür.



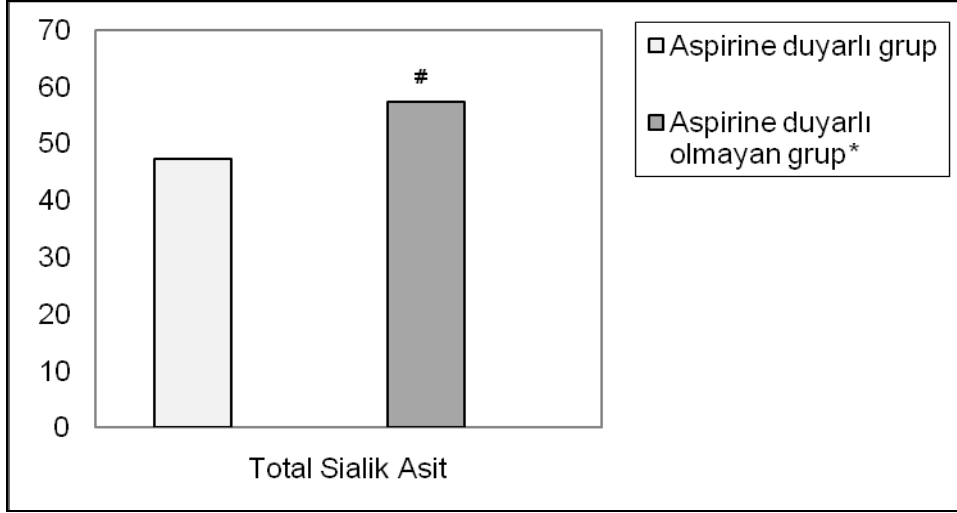
Şekil-8: Aspirine duyarlı grup (n=78) ile aspirine duyarlı olmayan gruplarda (n=22) serum malondialdehid (MDA) ve protein karbonil düzeyleri.

MDA (nmol/ml): Aspirine duyarlı grup, 0.85 ± 0.29 ; aspirine duyarlı olmayan grup, 1.30 ± 0.36

Protein karbonilleri (nmol/mg protein): Aspirine duyarlı grup, 2.41 ± 0.81 ; aspirine duyarlı olmayan grup, 3.07 ± 0.74

*Aspirine duyarlı olmayan grup= Aspirine orta derecede duyarlı grup (n= 15) + Aspirine dirençli grup (n=7) İstatistiksel anlamlılık düzeyi: †p< 0.05, #p< 0.001

Şekil-9'da aspirine duyarlı olmayan hastaların total sialik asit düzeylerindeki artışın aspirine duyarlı olan gruba göre istatistiksel olarak daha anlamlı ($p < 0.001$) olduğu görülmüştür.



Şekil-9: Aspirine duyarlı grup (n=78) ile aspirine duyarlı olmayan gruplarda (n=22) serum total sialik asit düzeyleri.

Total sialik asit (mg/dl): Aspirine duyarlı grup, 47.3 ± 9.9 ; aspirine duyarlı olmayan grup, 57.4 ± 9.0

*Aspirine duyarlı olmayan grup= Aspirine orta derecede duyarlı grup (n= 15)

+ Aspirine dirençli grup (n=7) İstatistiksel anlamlılık düzeyi: # $p < 0.001$

4. Antioksidan parametreler

Çalışmaya alınan tüm koroner arter hastaları ile kontrol grubuna ait antioksidan parametreler Tablo-8'de gösterilmiştir. Hasta grubunda antioksidan enzim aktiviteleri ile vitamin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulunmuştur.

Özellikle paraoksonaz enzim aktivitesi ile vitamin C, vitamin E ve total karoten düzeylerindeki azalmanın istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu görülmüştür (her bir parametre için $p < 0.001$).

Tablo-8: Koroner arter hastaları ve kontrol grubunda antioksidan parametreler.

	KAH (n=100)	Kontrol (n=45)
Paraoksonaz (U/L)	156 ± 47	224 ± 62 [#]
Ariesteraz (kU/L)	110 ± 23	117 ± 12 [†]
Katalaz (kU/L)	46.5 ± 18	53.1 ± 13 [†]
Vitamin C (mg/dl)	0.52 ± 0.17	0.95 ± 0.15 [#]
Vitamin E (µg/ml)	16.5 ± 4.26	29.2 ± 5.59 [#]
Total Karoten (µg/ml)	1.23 ± 0.39	1.48 ± 0.35 [#]

KAH: Koroner Arter Hastaları; İstatistiksel anlamlılık düzeyi: [†] $p < 0.05$, [#] $p < 0.001$

Çalışmaya alınan ve aspirin kullanan tüm koroner arter hastalarının “aspirine duyarlılıklarına” göre gruplandırılarak antioksidan parametreler açısından karşılaştırılması Tablo-9’da verilmiştir. Antioksidan etkili paraoksonaz, arilesteraz ve katalaz enzim aktivitelerinin aspirine duyarlı olan gruba göre diğer iki grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği bulunmuştur.

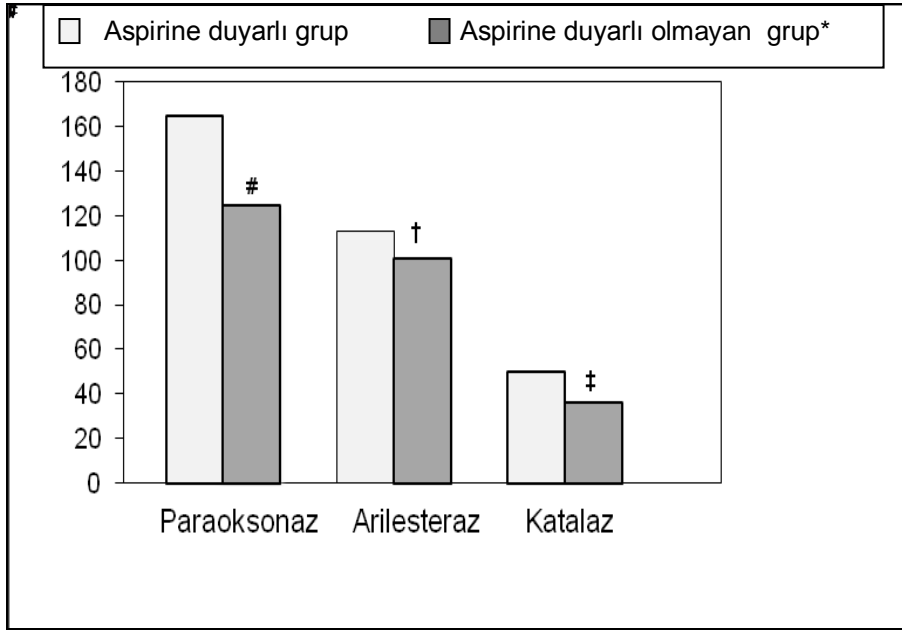
Vitamin E ve total karoten düzeylerinin de aspirine dirençli ve orta derecede duyarlı gruplarda aspirine duyarlı olan gruba göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulunmuştur. Vitamin C düzeylerindeki azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo-9: Koroner arter hastalarının aspirine duyarlılıklarına göre antioksidan parametreler açısından karşılaştırılması

	Aspirine duyarlı grup (n=78)	Aspirine orta derecede duyarlı grup (n=15)	Aspirine dirençli grup (n=7)
Paraoksonaz (U/L)	165 ± 45	132 ± 40 ^{a†}	110 ± 39 ^{a‡}
Arilesteraz (kU/L)	113 ± 23	106 ± 22	90 ± 17 ^{a†}
Katalaz (kU/L)	49.5 ± 18	36.5 ± 13 ^{a†}	35.3 ± 8 ^{a†}
Vitamin C (mg/dl)	0.53 ± 0.18	0.51 ± 0.13	0.46 ± 0.10
Vitamin E (µg/ml)	17.1 ± 4.32	14.1 ± 3.08 ^{a†}	13.9 ± 3.22 ^{a†}
Total Karoten (µg/ml)	1.29 ± 0.38	1.04 ± 0.34 ^{a†}	0.95 ± 0.39 ^{a†}

^a: Aspirine duyarlı grup ile karşılaştırma ^b: Aspirine orta derecede duyarlı grup ile karşılaştırma İstatistiksel anlamlılık düzeyi: [†]p< 0.05, [‡]p< 0.01

Aspirine duyarlı olan hastalar (n=78) ile aspirine duyarlı olmayan tüm hastaların (n=22) (aspirine orta derecede duyarlı grup, n=12 ve aspirine dirençli grup, n=7) antioksidan parametreler açısından karşılaştırılması şekil-10, şekil-11 ve şekil-12 'de verilmiştir. Aspirine duyarlı olmayan hastalarda, incelenen tüm antioksidan etkili enzim aktiviteleri ile vitamin E ve total karoten düzeylerinin aspirine duyarlı olan gruba göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulunmuştur. Vitamin C düzeylerinin ise incelenen iki grup arasında anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur.



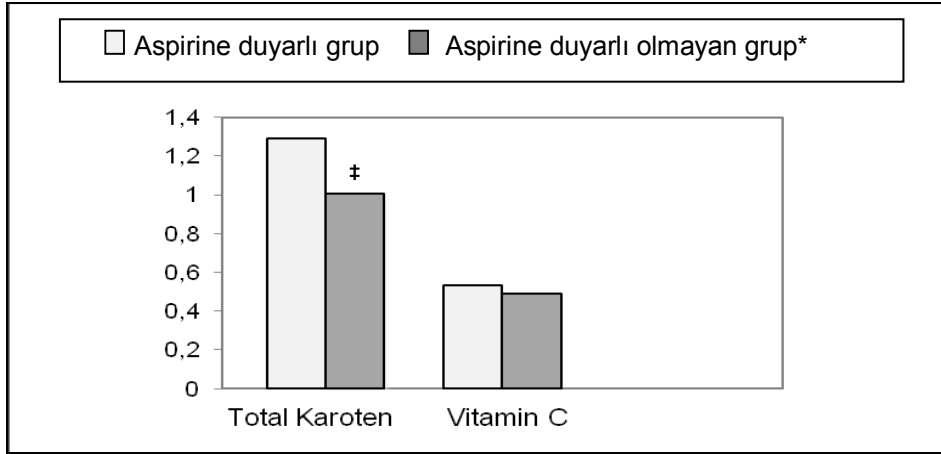
Şekil-10: Aspirine duyarlı grup (n=78) ile aspirine duyarlı olmayan gruplarda (n=22) serum Paraoksonaz, Aril Esteraz ve Katalaz aktiviteleri

Paraoksonaz (U/L): Aspirine duyarlı grup, 165 ± 45; aspirine duyarlı olmayan grup, 125 ± 40

Arilesteraz (kU/L): Aspirine duyarlı grup, 113 ± 22; aspirine duyarlı olmayan grup, 101 ± 22

Katalaz (kU/L): Aspirine duyarlı grup, 49.5 ± 18; aspirine duyarlı olmayan grup, 36.0 ± 12

*Aspirine duyarlı olmayan grup= Aspirine orta derecede duyarlı grup (n= 15)
+ Aspirinedirençli grup (n=7), İstatistiksel anlamlılık düzeyi: #p< 0.001

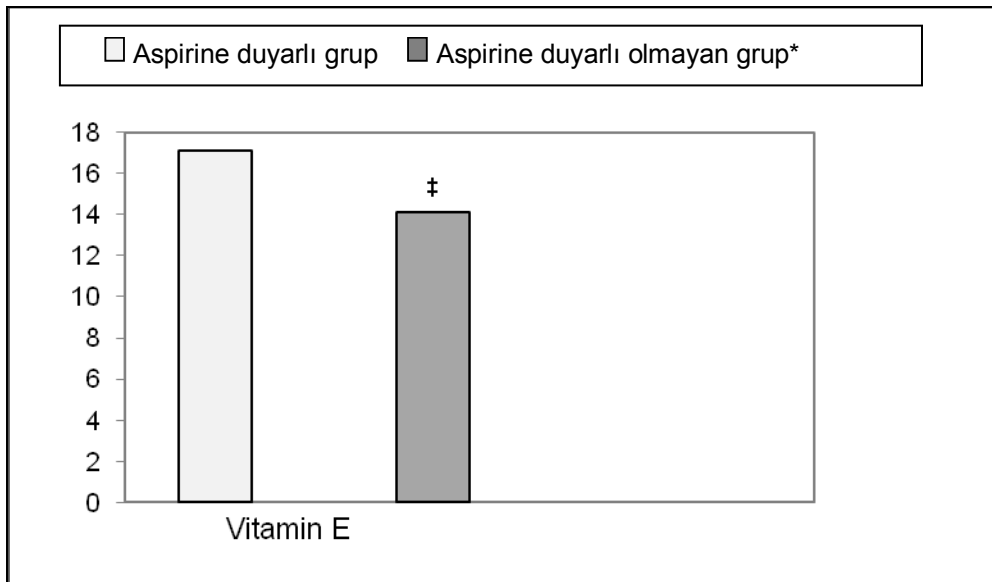


Şekil-11: Aspirine duyarlı grup (n=78) ile aspirine duyarlı olmayan gruplarda (n=22) serum Total Karoten ve Vitamin C düzeyleri.

Total Karoten (µg/ml): Aspirine duyarlı grup, 1.29 ± 0.38; aspirine duyarlı olmayan grup, 1.01 ± 0.36

Vitamin C (mg/dl): Aspirine duyarlı grup, 0.53 ± 0.18; aspirine duyarlı olmayan grup, 0.49 ± 0.12

*Aspirine duyarlı olmayan grup= Aspirine orta derecede duyarlı grup (n= 15) + Aspirine dirençli grup (n=7) İstatistiksel anlamlılık düzeyi: ‡p< 0.01



Şekil-12: Aspirine duyarlı grup (n=78) ile aspirine duyarlı olmayan gruplarda (n=22) serum Vitamin E düzeyleri

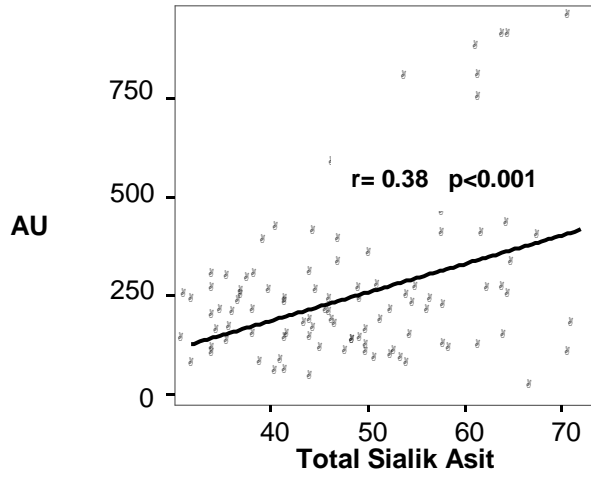
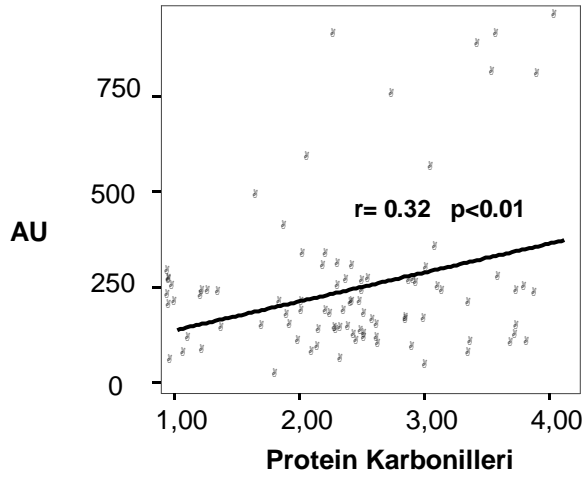
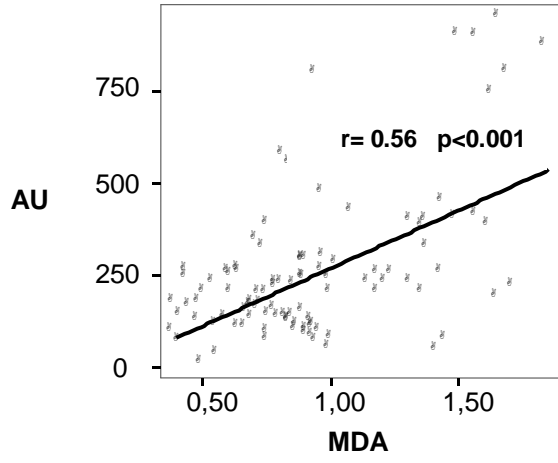
Vitamin E (µg/ml): Aspirine duyarlı grup, 17.1 ± 4.32; aspirine duyarlı olmayan grup, 14.1 ± 3.05 *Aspirine duyarlı olmayan grup= Aspirine orta derecede duyarlı grup (n= 15) + Aspirine dirençli grup (n=7) İstatistiksel anlamlılık düzeyi: ‡p< 0.01

5. Korelasyon İncelemeleri

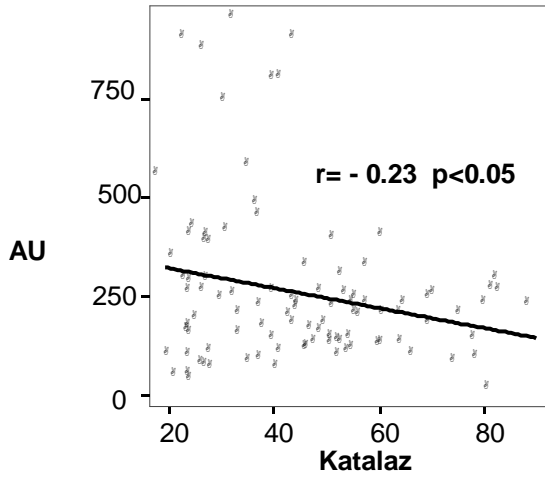
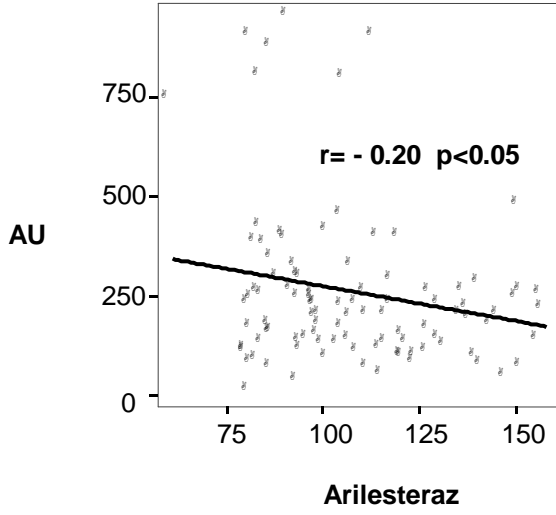
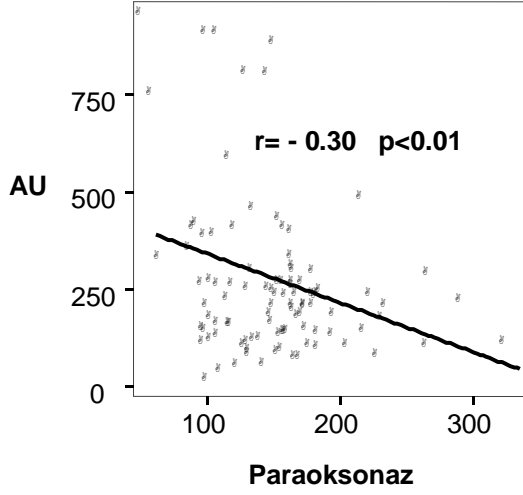
Tüm koroner arter hastalarında (n= 100) aspirin direnci ile oksidan ve antioksidan parametreler arasındaki ilişkiyi incelemek için "Pearson" korelasyon analizi yapıldı.

Aspirin direnci ile oksidan parametreler arasında yapılan korelasyon incelemesinde; aspirin direnci ile MDA ($r= 0.56$, $p < 0.001$), protein karbonilleri ($r= 0.32$, $p < 0.01$) ve total sialik asit ($r= 0.38$, $p < 0.001$) arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunurken, PON ($r= -0.30$, $p < 0.01$), arilesteraz ($r= -0.20$, $p < 0.05$), katalaz ($r= -0.23$, $p < 0.05$), vitamin E ($r= -0.24$, $p < 0.05$) ve total karoten ($r= -0.25$, $p < 0.05$) arasında ise anlamlı negatif korelasyon bulundu. Aspirin direnci ile vitamin C arasında ise anlamlı bir korelasyon bulunamadı.

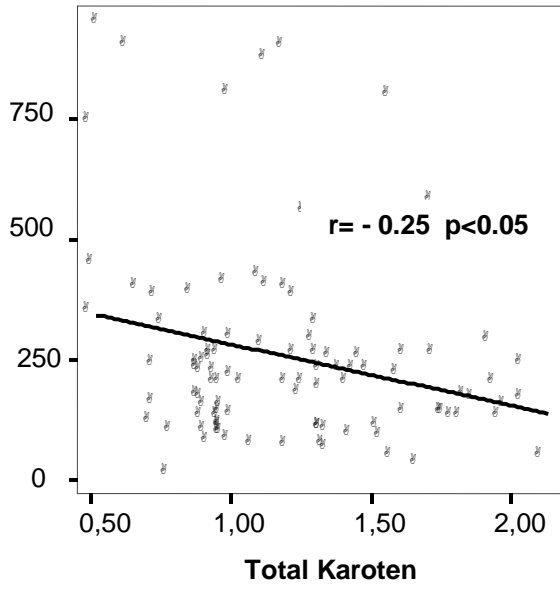
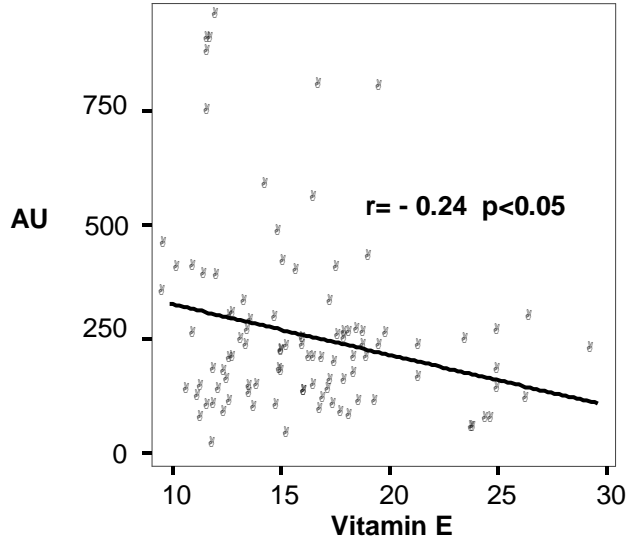
Korelasyon incelemeleri şekil- 13, şekil-14 ve şekil-15 'de gösterildi.



Şekil-13: Koroner arter hastalarında aspirin direnci ile oksidatif parametreler ve total sialik asit arasında yapılan “Pearson” korelasyon incelemesi. (AU: Agregasyon Birimi).



Şekil-14: Koroner arter hastalarında aspirin direnci ile antioksidan enzimler arasında yapılan “Pearson” korelasyon incelemesi. (AU: Agregasyon Birimi).



Şekil-15: Koroner arter hastalarında aspirin direnci ile antioksidan vitaminler arasında yapılan “Pearson” korelasyon incelemesi. (AU: Agregasyon Birimi)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, koroner arter hastalığı nedeniyle düzenli olarak aspirin kullanan hastalarda aspirinin oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisi ile aspirin direnci ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi inceledik. Aspirin direnci olan ve olmayan koroner arter hastalarında oksidan ve antioksidan parametreler açısından anlamlı farklılıklar olduğunu saptadık.

Aspirin direnci, gelişmiş toplumlarda morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri olan koroner arter hastalığı ve serebrovasküler hastalıklarda prognozu olumsuz etkileyebileceği yönünde bulguların artmakta olduğu güncel bir sorundur. Stabil koroner arter hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda, aspirin direnci olan hastalarda major kardiyovasküler olay riskinin daha fazla olduğu bulunmuştur (90, 91).

Gum ve ark.'nın (92) yaptığı bir çalışmada stabil koroner arter hastası olan 326 kişi yaklaşık 2 yıl boyunca takip edilmiş ve akut miyokard infarktüsü, inme, ölüm gibi major kardiyovasküler olay riskinin aspirin direnci olan hastalarda olmayanlara göre 3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) çalışmasında da 5 yıl boyunca takip edilen koroner arter hastalarında yine benzer şekilde aspirin direnci olanlarda riskin daha yüksek olduğu bulunmuştur (93).

Aspirin direncini tanımlamak için kullanılan biyokimyasal metod ve hastanın kullandığı aspirin dozunun, aspirin direnci prevalansını anlamlı bir şekilde etkilediği bildirilmiştir (23). Bu nedenle yapılan çeşitli klinik çalışmalarda farklı hasta gruplarında farklı yöntemlerle değişik oranlarda aspirin direnci saptanmıştır (19, 21, 27).

Genel olarak koroner arter hastalarında %5.5 – 45 arasında olduğu bildirilen aspirin direnci prevalansını biz de %7 bulduk. Aspirine orta derecede duyarlı hastalar için ise prevalansı %15 olarak saptadık. Gum ve ark. da (22) koroner arter hastalarında aspirin direnci prevalansını %5.5, aspirine orta derecede duyarlı hastalar için ise prevalansı %23 olarak bulmuşlardır.

Koroner arter hastalığında sıklıkla karşılaşılan endotel disfonksiyonunda, endotel hücrelerin antikoagulan, antiagregan ve fibrinolitik özelliklerini kaybederek trombosit agregasyonunda artışa neden olabileceği bildirilmiştir. Hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet ve sigaranın yanısıra, endotel disfonksiyonuna yol açan faktörlerden biri de oksidatif strestir. Aspirinin nötrofil, eritrosit ve trombositleri direkt olarak etkileyerek endoteliumu oksidatif stresden koruduğu ve endotel disfonksiyonu azalttığı bildirilmiştir (94).

Endotel disfonksiyonu ile aspirin direnci arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, oksidatif strese bağlı olarak gelişen endotel disfonksiyonunun aspirin direnci oluşturabileceği bildirilmiştir (95). Pamukçu ve ark. (96) ise endotel disfonksiyonunun derecesi ile aspirin direnci arasında bir ilişki olmadığını ileri sürmüşlerdir. Cipollone ve ark.'nın (37) koroner arter hastaları üzerinde yaptığı bir başka çalışmada da, oksidatif stresin endotel disfonksiyonunu indükleyerek aspirine duyarsız tromboksan sentezinde artışa yol açtığı ve bu nedenle oksidatif stresin aspirin direncinin bir diğer nedeni olabileceği ileri sürülmüştür.

Oksidatif stresin endotel disfonksiyonunun yanısıra normal trombosit fonksiyonlarını da bozarak kardivasküler hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Trombosit fonksiyonları ile oksidatif stres ilişkisini araştıran çalışmalarda, trombositler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu uyardığı ve kardivasküler hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. Trombositler ve diğer vasküler kaynaklardan açığa çıkan bu reaktif oksijen türleri içinde, özellikle süperoksit anyonunun oksidatif stresin önemli bir kaynağı olduğu, nitrik oksit (NO) biyolojik aktivitesini azalttığı ve trombosit agregasyon yanıtını arttırdığı gösterilmiştir (97). Bilindiği gibi NO, vasküler homeostazisin sürdürülmesinde önemli rol oynayan vazodilatatör etkili bir ajandır. Taubert ve ark. (98) aspirinin endotel hücre homojenatlarında endotel nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini arttırdığını ve NO salınımını direkt olarak uyardığını göstermişlerdir. Oksidatif strese bağlı olarak endotel fonksiyonlarının bozulması ise aspirinin NO sekresyonunu uyarıcı etkisinin ortadan

kalkmasına yol açmaktadır. Grosser ve ark. da (99) aspirinin NO-cGMP sinyal yolunu aktive ederek endotel hücreleri oksidatif hasardan koruduğunu bildirmişlerdir .

Lipid peroksidasyonu ise zincirleme reaksiyonlar sonucunda alkoksil ve peroksil radikallerinin yanısıra, trombositlerde COX aktivitesinin bir yan ürünü olarak MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de açığa çıkmasına neden olmaktadır (100).

Aspirinin LDL'yi oksidasyondan koruduğunu gösteren çeşitli çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalardan birisinde, aspirinin LDL'yi oksidatif modifikasyondan koruyucu etkisinin hem önemli bir serbest radikal kaynağı olan prostaglandin yolunu inhibe etmesinden hem de LDL'nin apoB proteinindeki lizin kalıntılarına asetil grubunu transfer etmesinden ileri geldiği bildirilmiştir (101). Ayrıca bir aspirin metaboliti olan gentisik asidin de antioksidan etki gösterdiği ve *in vitro* LDL oksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (102). Hermann ve ark. da (103) salisilik asidin LDL oksidasyonunu başlatan süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin etkili bir inhibitörü olduğunu göstermişlerdir. Lapenna ve ark. da (104) aspirinin lipoksijenazın katalizlediği lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Yaptığımız bu çalışmada, lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için kullanılan ve oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA düzeylerini aspirin direnci olan hastalarda, aspirine orta derecede duyarlı hastalar ile aspirine duyarlı hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulmamız nedeniyle, oksidatif stres ile aspirin direnci arasında bir ilişki olabileceğini ileri sürebiliriz. Ayrıca yaptığımız korelasyon incelemesinde de aspirin direnci ile MDA arasında anlamlı ($p < 0.001$) pozitif bir korelasyonun olduğunu bulmamız da bu ilişkiyi destekler niteliktedir. Marwali ve ark.'nın (105) yaptığı bir çalışmada da, aspirin tedavisi uygulanan hastalarda MDA düzeyleri daha düşük bulunmuş ve aspirinin oksidatif stresi azalttığı ileri sürülmüştür.

Aspirinin LDL'yi oksidatif değişikliklerden koruduğunu gösteren pek çok çalışma yapılmasına karşın, Waterman ve ark. (106) sağlıklı gönüllülere verilen düşük doz aspirinin LDL'nin oksidasyona duyarlılığını arttırdığını ileri

sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar ise aspirinin kendisinin de serbest radikal üretiminden sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür (107, 108).

Lipoproteinler ile trombosit fonksiyonları arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, lipoprotein bozukluklarının trombosit fonksiyonlarını etkilediği ve hiperlipidemik hastalarda trombosit aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (109, 110). Özellikle yüksek LDL kolesterol düzeylerinin trombosit fonksiyonlarını uyardığı ve trombositlerin kollajen, ADP, trombin gibi doğal agonistlere karşı duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir. LDL, apoB-100 aracılığı ile trombosit membranındaki reseptörlere bağlanarak lipid transferi yapar ve trombosit aktivitesini artırır. Özellikle okside-LDL'nin trombositlere bağlanmasına aracılık eden ve intrasellüler sinyal iletisini başlatan "scavenger" reseptörler CD36 ve lektin benzeri okside-LDL [(lectin-like ox-LDL receptor-1; (LOX-1)] reseptörüdür. Okside-LDL bu reseptörlere bağlanarak trombosit adezyonunu hızlandırır (111, 112).

Lipid düşürücü tedavi uygulanan hiperlipidemik hastalarda trombositlerde CD36 ve LOX-1 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (113). Yapılan bir çalışmada aspirinin, oksidatif strese bağlı olarak aktive olan trombositlerden reaktif oksijen türlerinin salınımını azalttığı ve MDA düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir. Aspirinin bu etkisini trombositlerde ox-LDL reseptörünü inhibe ederek ve ekspresyonunu azaltarak gösterdiği ve böylece trombosit agregasyonunu önlediği bildirilmiştir (105).

Aspirin direnci olan hiperlipidemik koroner arter hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada ise 3 ay süreyle uygulanan lipid düşürücü statin tedavisi sonrasında hastaların %65'de aspirin direncinin azaldığı gösterilmiştir (114). Deneysel olarak hiperkolesterolemi oluşturulan sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada da aspirin tedavisi sonrasında LDL-K düzeylerinin azaldığı, HDL-K düzeylerinin ise arttığı gösterilmiştir (115).

Biz de yaptığımız bu çalışmada, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte aspirine dirençli grupta, aspirine duyarlı olan gruba göre total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeylerini daha yüksek, HDL-kolesterol düzeylerini ise daha düşük bulduk. Ayrıca hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, sigara ve pozitif aile öyküsü gibi koroner arter hastalığı risk

faktörlerinin de literatürle uyumlu olarak daha yüksek oranda görüldüğünü saptadık. Literatürde koroner arter hastalığı risk faktörleri ile aspirin direnci ilişkisini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (116). Sigarayla ilgili olarak yapılan böyle bir çalışmada, sigaranın trombosit aktivitesini arttırdığı ve aspirin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (117). Özben ve ark. da (118) hipertansif hastalarda aspirin direncinin daha sık görüldüğünü bulmuşlardır.

Ekstrasellüler proteinler yaşam boyunca serbest oksijen radikalleri tarafından oksidatif modifikasyona uğramakta ve çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır. Son yıllarda koroner arter hastalığı gelişiminde protein oksidasyonunun da rol oynadığını gösteren araştırma sayısının gittikçe artmasına rağmen, literatürde protein oksidasyonu ile aspirin ilişkisini araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır. Upchurch ve ark. (119) yaptıkları deneysel bir araştırmada aspirinin, fibrinojen proteininin oksidasyona duyarlı olan fonksiyonel lizin kalıntılarını non-enzimatik olarak asetilleyerek onu oksidatif değişikliklerden koruduğu ve böylece protein oksidasyonunun bir göstergesi olan protein karbonil düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir. Fibrinojenin oksidasyonu fibrin oluşumunu artırırken, aspirin etkisi ile fibrinojenin lizin kalıntılarının asetillenmesinin ise fibrinolizisi arttırıcı yönde etki yaptığı bildirilmiştir (120). Steer ve ark. da (101) salisilatın direkt olarak hidroksil radikallerini temizlediğini, protein oksidasyonunu inhibe ettiğini ve LDL'yi oksidatif modifikasyondan koruyarak aterosklerozun ilerlemesini durdurduğunu ileri sürmüşlerdir.

Biz de çalışmamızda, protein oksidasyonunun bir göstergesi olan protein karbonil düzeylerini aspirin direnci olan hastalarda, hem aspirine aspirine duyarlı hem de orta derecede duyarlılık gösteren hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulduk. Aspirin direnci ile protein oksidasyonu arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla yaptığımız korelasyon incelemesinde de anlamlı ($p < 0.01$) pozitif bir ilişki saptadık.

Hücre membranlarında çeşitli glikoprotein ve glikolipidlerin oligosakkarid yan zincirlerinin terminal pozisyonunda bulunan sialik asit rezidüleri de serbest oksijen radikallerinin hedef molekülleri olabilmekte ve koroner arter hastalarında üretimleri artan serbest oksijen radikalleri, bu

yapılardan sialik asit rezidülerinin salınımına yol açarak serum total sialik asit düzeylerinde artışa neden olmaktadır (121). Benzer şekilde, serbest oksijen radikalleri tarafından LDL'nin yapısındaki sialik asidin uzaklaştırılması da bu artışa katkıda bulunmaktadır. Desialize LDL ise oksidatif değişikliklere daha duyarlı hale gelerek ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca koroner arter hastalarında sialidaz enzim aktivitesindeki artışında hücre membranından veya hücreden sialik asit salınımına yol açtığı bildirilmiştir (122).

Literatürde koroner arter hastalarında aspirin kullanımının serum total sialik asit düzeylerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada hem aspirin direnci olan hastalarda serum total sialik asit düzeylerini anlamlı olarak yüksek bulmamız hem de aspirin direnci ile total sialik asit arasında anlamlı ($p < 0.001$) pozitif bir korelasyon bulmamız nedeniyle aspirin direnci ile sialik asit arasında bir ilişkinin varlığından sözedebiliriz.

Aspirin gibi trombosit fonksiyonlarını inhibe eden başka ilaçlar da bulunmasına karşın hiçbirinin aspirin kadar etkili olmaması nedeniyle, aspirinin antiaterojenik etkilerinden sadece trombosit inhibitör fonksiyonunun sorumlu olamayacağı ayrıca aspirinin antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin de bu süreçte önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (123, 124).

Aspirinin antioksidan özellikleri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar içinde özellikle paraoksonaz (PON) enzimiyle ilgili olanlar dikkat çekicidir.

PON1 enzimi aril esterleri, fosfat esterleri, aromatik karboksilik asit esterleri, karbamatlar ve laktonlar gibi pek çok substratı hidrolizler ve lipid peroksitlerini hidroperoksitlere indirger. Santanam ve ark. (70) aspirinin de bir aril ester olduğunu ve PON1 enzimi tarafından etkin bir şekilde hidrolize olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, aspirinin hidrolizi ile oluşan salisilik asidin serbest radikalleri temizleyen antioksidan bir ürün olduğu ve aspirinin antiaterojenik etkilerinin sadece trombosit fonksiyonlarını inhibe etmesinden kaynaklanmadığı, bundan kısmen salisilik asidin de sorumlu olduğu ileri

sürülmüştür. Ayrıca salisilik asidin anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle de aspirinin antiaterojenik etkilerine katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

PON1 aktivitesi ile aspirin ilişkisini araştıran bir başka çalışmada da, aspirin kullanan kişilerde plazma PON1 aktivitesi ile arilesteraz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (125). Jaichander ve ark.'nın (126) yaptığı deneysel bir çalışmada ise aspirin verilen sıçanlarda plazma PON1 aktivitesinin 2 kat artış gösterdiği ve aynı zamanda karaciğerde PON1 ve apoA-I gen ekspresyonunun da arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada aspirinin antiaterosklerotik etkilerine hidrolitik ürünü olan salisilik asit ile PON1 ve apoA-I indüksiyonunun aracılık ettiği de ileri sürülmüştür.

Kurban ve ark. da (69) aspirin kullanan sağlıklı gönüllülerde PON1 ve arilesteraz aktivitelerinde anlamlı olmayan bir artış olduğunu bulmuşlardır. Aspirinin serbest radikalleri temizleyici antioksidan özellikleri nedeniyle endotel hücreleri hidrojen peroksitin etkilerine karşı koruduğu da gösterilmiştir (115). Bazı araştırmacılar da PON1 enziminin oksidasyona duyarlı olduğunu ve oksidanlar tarafından derhal inaktive edildiğini bildirmişlerdir (127, 128).

Genel olarak koroner arter hastalarında artmış oksidatif stres nedeniyle antioksidanların tüketimi artmakta ve tablo-8'de de gösterildiği gibi antioksidan etkili tüm enzim ve vitamin düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olmaktadır. Bu çalışmada hasta grubunu aspirine verdikleri yanıtı göre incelediğimizde ise antioksidan düzeylerindeki azalmanın özellikle aspirine dirençli hastalarda daha fazla olduğunu bulduk. Aspirin kullanan ve direnç geliştiği saptanan hasta grubunda PON ve arilesteraz aktiviteleri, aspirine duyarlı ve orta derecede duyarlı gruplara göre daha düşüktü. Ayrıca, aspirin direnci ile PON ve arilesteraz aktiviteleri arasında da anlamlı ($p < 0.01$ ve $p < 0.05$) negatif korelasyonlar saptamamız nedeniyle PON ve arilesteraz aktiviteleri ile aspirin direnci arasında bir ilişkinin varlığından söz edebiliriz. Aspirin direnci saptadığımız hasta grubunda oksidatif strese bağlı düşük PON aktivitesi nedeniyle, bir antioksidan olduğu ileri sürülen salisilik asit üretiminin azalması da bu grupta oksidatif stres parametrelerinin daha yüksek bulunmasına katkıda bulunabilir.

Katalaz, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalayan antioksidan etkili önemli bir enzimdir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada, katalazın aktif trombositler tarafından üretilen ve oksidan bir molekül olan hidrojen peroksit üretimini inhibe ederek kollajene bağlı trombosit aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (129). Durak ve ark. da (130) aspirin tedavisinin insanlarda eritrosit katalaz aktivitesinde artışa yol açtığını göstermişlerdir.

Literatürde aspirin ile katalaz ilişkisini gösteren yeterli çalışma bulunmamasına rağmen, biz bu çalışmada aspirine dirençli hastalarda ve orta derecede duyarlı hastalarda, aspirine duyarlı olan hastalara göre katalaz aktivitesini anlamlı olarak düşük bulduk. Ayrıca, aspirin direnci ile katalaz aktivitesi arasında da anlamlı ($p < 0.05$) negatif bir korelasyon saptadık.

Başlıca plazma ve lipoproteinlerin yapısında bulunan E vitamini güçlü bir antioksidandır ve hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal hasarından koruduğu gibi serbest radikalleri de “ scavenger ” etkisi ile temizler. LDL partiküllerinde bol miktarda bulunan E vitamini LDL'yi oksidasyondan koruyarak koroner arter hastalığı gelişimini önlediği gibi vasküler fonksiyonlar ve trombosit agregasyonu üzerinde de etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Freedman ve ark.'nın (75) yaptığı böyle bir çalışmada E vitamininin trombosit agregasyonunu inhibe ettiği ve endotelyumdan kaynaklanan NO aktivitesini düzenleyerek endotelial fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir. González-Correa ve ark. (77, 131) ise yaptıkları çeşitli deneysel çalışmalarda aspirin ve vitamin E kombinasyonunun tek başına kullanıma göre daha iyi antioksidan ve antiagregan etki sağladığını ve TXA2/prostasiklin oranını azalttığını göstermişlerdir.

Keaney ve ark. (132) aspirin ve vitamin E kombinasyonunun trombositlerde NO sentezini uyardığını, Li ve ark. (133) ise E vitamininin olasılıkla NO'in yarı ömrünü uzatarak oksidatif stresi azalttığını bildirmişlerdir.

Celestini ve ark. da (134) E vitamininin aspirinle birlikte kullanılmasının insanlarda trombotik vasküler olayları önlediğini ve aspirinin antiagregan etkisini arttırdığını ileri sürmüşlerdir. E vitamininin bu etkisini kollajene bağlı trombosit aktivasyonunu ve hidrojen peroksit üretimini inhibe

ederek gösterdiğini bildirilmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, aspirin tedavisi alanlarda E vitamininin trombosit–kollajen ekileşimini azalttığı da bulunmuştur. Benzer şekilde Podhaisky ve ark. da (76) aspirin ve E vitamini kombinasyonunun kardiyovasküler hastalıklarda oksidatif strese bağlı endotelial hasarı önlediğini bildirmişlerdir.

Cheng ve ark. (95) koroner arter hastalarında oksidatif stres ile aspirin direnci arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla ölçtükleri plazma vitamin C ve E düzeyleri ile lipoperoksit düzeylerinde ve eritrosit SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir değişiklik bulamamışlar ve oksidatif stresin aspirin direnci ile ilişkili olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bizim yaptığımız bu çalışmada ise aspirin direnci olan hasta grubunda C ve E vitamini ile total karoten düzeylerinin azaldığını, ancak bu azalmanın sadece E vitamini ve total karoten için anlamlı olduğunu bulduk. E vitamini ve total karoten düzeyleri hem aspirine orta derecede duyarlı hem de dirençli olan hastalarda duyarlı olan hastalara göre anlamlı olarak daha düşüktü. Literatürde ise aspirin ile total karoten ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Yaptığımız korelasyon çalışmasında da aspirin direnci ile E vitamini ve total karoten arasında anlamlı ($p < 0.05$) negatif korelasyon bulurken, C vitamini ile korelasyon bulamadık. Cheng ve ark.'nın (95) aksine, biz aspirin direnci olan hastalarla olmayanlar arasında antioksidan etkili enzim ve vitamin düzeylerinde bulduğumuz anlamlı değişiklikler nedeniyle oksidatif stresin aspirin direnci ile ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.

Sonuç olarak; pek çok faktörün aspirin direncine yol açtığı ileri sürülmekle beraber, günümüzde halen bunun nedenlerinin tam olarak anlaşılmasına yönelik yeni araştırmalar yapılmaya devam etmektedir. Biz de bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre, aspirin direnci olduğunu saptadığımız hastalarda genel olarak oksidatif stres göstergeleri olan MDA, protein karbonilleri ve total sialik düzeylerini yüksek bulmamız, buna karşılık C vitamini dışında antioksidan etkili vitamin ve enzim düzeylerini düşük bulmamız ve aynı zamanda aspirin direnci ile oksidan parametreler arasında

anlamli pozitif korelasyon bulurken, antioksidan parametreler ile de anlamli negatif korelasyonlar bulmamiz nedeniyle, bu hastalarda oksidatif stresin aspirin direnci ile iliskili oldugunu ve aspirin direnci gelismine katkıda bulunabilecegini soyleyebiliriz. Bu hastalarda oksidan / antioksidan dengenin iyilestirilmesi amacıyla yapilacak tedaviler aspirin direncini azaltabilir. Ancak buna yonelik olarak ve daha fazla sayıda hastayi iceren yeni calismaların yapılmasına gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Kher N, Marsh JD. Pathobiology of atherosclerosis-a brief review. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 665-72.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis- an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
3. Tousoulis D, Koutsogiannis M, Papageorgiou N, Siasos G, Antoniadis C, Tsiamis E, Stefanadis C. Endothelial dysfunction: potential clinical implications. *Minerva Med* 2010;101:271-84.
4. Björkbacka H. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:548-9.
5. Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of low-density lipoprotein, and cardiovascular disease. *Thromb Haemostasis* 1999; 79: 287-93.
6. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low-density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:1-15.
7. Onat A, Uğur M, Tuncer M, et al. TEKHARF Taramasında ölüm yaşı: 56700 Kişi-yıllık izlemede dönemsel eğilim ve bölgesel dağılım *Türk Kardiyol Dern Arş* 2009;37:155-60.
8. Demirtaş E. Koroner kalp hastalığında primer ve sekonder koruma. *T Klin J Cardiol* 2000;13:67-81.
9. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308: 81-106.
10. Ruggeri ZM. Thrombocytes in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8:1127-34.
11. Ilveskero S, Siljander P, Lassila R. Procoagulant activity of thrombocytes adhered to collagen or plasma clot. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:628-35.
12. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, De Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2004; 2:561-73.
13. Rendu F, Brohard-Bohn B. The thrombocyte release reaction; granules' constituents, secretion and function. *Thrombocytes* 2001; 12:261-73.
14. Brass L. Understanding and evaluating platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;1:387-96.
15. Moser M, Bode C. Antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: how can we improve the outcomes? *J Thromb Thrombolysis* 2010;30:240-9.
16. Vainio H, Morgan G. Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug. *Pharmacol Toxicol* 1997;81:151-2.
17. Maree AO, Fitzgerald DJ. Aspirin and coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2004; 92: 1175-81
18. Gabriel SA, Beteli CB, Taniguchi RS, Tristao CK, Gabriel EA, Job JR. Aspirin resistance and atherothrombosis. *Braz J Cardiovasc Surg* 2007; 22: 96-103.

19. Pamukçu B. A review of aspirin resistance: definition, possible mechanisms, detection with platelet function tests, and its clinical outcomes. *J Thromb Thrombolysis* 2007;23:213-222.
20. Bhatt DL. Aspirin resistance: more than just a laboratory curiosity. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1127-29.
21. Mason PJ, Jacobs AK, Freedman JE. Aspirin Resistance and Atherothrombotic Disease. *Am Coll Cardiol* 2005;46:986 –93
22. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001; 88: 230-5.
23. Hovens MC, Snoep JD, Eikenboom CJ, et al. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: A systematic review *Am Heart J* 2007;153:175-281.
24. Pamukçu B, Oflaz H, Nişancı Y. A current problem in atherothrombotic diseases--aspirin resistance: definition, mechanisms, determination with laboratory tests and clinical implications. *Anadolu Kardiyol Derg* 2007;7 (Suppl 2):20-6.
25. Braunwald E, Angiolillo D, Bates E, et al. Assessing the current role of platelet function testing. *Clin Cardiol* 2008;31(3 Suppl 1):110-6.
26. Mansour K, Taher AT, Musallam KM, Alam S. Aspirin resistance. *Adv Hematol* 2009. DOI:10.1155/937352.
27. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006 18;367:606-17.
28. Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA. Human platelet erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 1991; 5: 2304-12.
29. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, et al. Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101: 1013-8.
30. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, et al. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T (GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ib) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1115-9.
31. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, et al. Associations of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction. *Lancet* 1999; 353: 351-4.
32. Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, et al. Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol* 2005; 95: 805-8.
33. Pamukcu B, Oflaz H, Onur I, Cimen A, Nisanci Y. Effect of Cigarette Smoking on Platelet Aggregation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011. DOI: 10.1177/1076029610394440
34. Weber AA, Liesener S, Schanz A, Hohlfeld T, Schror K. Habitual smoking causes an abnormality in platelet thromboxane A2 metabolism and results in an altered susceptibility to aspirin effects. *Platelets* 2000;11:177–82.

35. Walle'n NH, Held C, Rehnqvist N et al. Effects of mental and physical stress on platelet function in patients with stable angina pectoris and healthy controls. *Eur Heart J* (1997) 18:807–815
36. Pamukcu B, Oflaz H, Acar RD, et al. The role of exercise on platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease: exercise induces aspirin resistant platelet activation *J Thromb Thrombolysis* 2005;20:17-22.
37. Cipollone F, Ciabattone G, Patrignani P, et al. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000; 102: 1007-13.
38. Csiszar A, Stef G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress-induced isoprostane formation may contribute to aspirin resistance in platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002; 66: 557-8.
39. Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102: 840-5.
40. Cipollone F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001;104:921–927.
41. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest* 1991; 87: 571-80.
42. Zima T, Stipek S, Tesar V, Nemecek K, Mechurova A. Free radicals in the pathogenesis of selected diseases. *Cas Lek Cesk* 1995; 134: 291-5.
43. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:259-69.
44. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 2011;434: 201-10.
45. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 794-804.
46. Kuhn MA. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am J Nurs* 2003;103: 58-62.
47. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-9.
48. Armstrong D. Free radical and antioxidant protocols. *Methods Mol Biol* 1998; 108: 299-313.
49. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872-9.
50. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997;324: 1-18.
51. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 203-13.
52. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol* 1999; 300: 145-56.

53. Winterbourn CC, Bonham J, Buss H, et al. Elevated protein carbonyls as plasma markers of oxidative stress in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 375-82.
54. Butterfield DA, Kanski J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* 2001;122: 945-62.
55. Edeas M, Attaf D, Mailfert AS, Nasu M, Joubet R. Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathol Biol (Paris)*. 2010;58:220-5.
56. Millar JS. The sialylation of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 2001; 154: 1-13.
57. Wakabayashi I, Sakamoto K, Yoshimoto S, Kakishita E. Serum sialic acid concentration and atherosclerotic risk factors. *J Atheroscler Thromb* 1994; 1: 113-7.
58. Gökmen SS, Kılıçlı G, Özçelik F, Ture M, Gülen S. Association between serum total and lipid-bound sialic acid concentration and the severity of coronary atherosclerosis. *J Lab Clin Med* 2002; 140: 110-8.
59. Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, et al. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem Soc Trans*. 2008;36:1071-6.
60. Shapoval GS, Gromovaia VF. Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress. *Ukr Biokhim Zh* 2003; 75: 5-13.
61. Abrescia P, Golino P. Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 159-71.
62. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:259-69.
63. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:263-74.
64. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1203:120-5.
65. Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* 2009 1790:1486-500.
66. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1304–16.
67. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, et al. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:319–24.
68. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:83–106.
69. Kurban S, Mehmetoğlu I. Effects of acetylsalicylic acid on serum paraoxonase activity, Ox-LDL, coenzyme Q10 and other oxidative stress markers in healthy volunteers. *Clin Biochem* 2010;43:287–290.
70. Santanam N, Parthasarathy S. Aspirin is a substrate for paraoxonase-like activity: Implications in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007;191:272–275.

71. Krajcovicova-Kudlackova M, Paukova V, Bacekova M, Dusinska M. Lipid peroxidation in relation to vitamin C and vitamin E levels. *Cent Eur J Public Health* 2004;12: 46-8.
72. Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 2009;157:1097-110.
73. Devaraj S, Adams-Huet B, Fuller CJ, Jialal I. Dose-response comparison of RRR- α -tocopherol and all rac- α -tocopherol on LDL oxidation. *Arter Thromb and Vas Bio* 1997;17: 2273–9.
74. Keaney JF, Guo Y, Cunningham D et al. Vascular incorporation of α -tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation *J Clin Invest* 1996;98: 386–94.
75. Freedman JE, Keaney JF. Vitamin E Inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *J Nutr* (2001)131: 374S–377S.
76. Podhaisky HP, Abate A, Polte T, Oberle S, Schröder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress--possible synergism with vitamin E. *FEBS Lett* 1997;417:349-51.
77. González JA, Arrebola MM, Guerrero A, et al. Antioxidant and antiplatelet effects of the alpha-tocopherol–aspirin combination in type 1-like diabetic rats. *Life Sciences* (2006) 79 1405–1412.
78. Greenland P, Smith SC, Grundy SM. Improving coronary heart disease assessment in asymptomatic people. Role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. *Circulation* 2001; 104: 1863-7.
79. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2006;96(6):781-8
80. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost.* 2008 Jan;99(1):121-6.
81. Görlinger K, Jambor C, Hanke AA, et al. Perioperative Coagulation Management and Control of Platelet Transfusion by Point-of-Care Platelet Function Analysis. *Transfus Med Hemother* 2007; 34:396–411.
82. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
83. Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 504-8.
84. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-63.
85. Sydow G. A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed Biochem Acta* 1985; 44: 1721.
86. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase / arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 1126-38.
87. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-51.

88. McCormick DB, Greene HL. Vitamins. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). Tietz text book of clinical chemistry. 3rd edition. Philadelphia: WB. Saunders Co; 1999. 999-1029.
89. Teissier E, Walters-Laporte E, Duhem C, et al Rapid quantification of α -tocopherol in plasma and low- and high density lipoproteins. Clin Chem 1996; 42: 430-5.
90. Pamukcu B, Oflaz H, Oncul A, et al. The role of aspirin resistance on outcome in patients with acute coronary syndrome and the effect of clopidogrel therapy in the prevention of major cardiovascular events. J Thromb Thrombolysis 2006;22:103-10.
91. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2008;26;336:195-8.
92. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. J Am Coll Cardiol 2003; 41:961–5.
93. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of MI, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. Circulation 2002; 105: 1650–5.
94. Muller G, Goettsch C, Morawietz H. Oxidative stress and endothelial dysfunction. Hamostaseologie. 2007;27:5-12.
95. Cheng G, Shan J, Xu G, et al. Relationship between endothelial dysfunction, oxidant stress and aspirin resistance in patients with stable coronary heart disease. J Clin Pharm Ther 2007; 32: 287-92.
96. Pamukçu B, Onür I, Oflaz H, Elitok A, Buğra Z, Nişancı Y. The relationship between aspirin resistance and endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. Arch Turk Soc Cardiol 2008;36:103-7.
97. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitride-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. J Biol Chem 1994;269:26066–75.
98. Taubert D, Berkels R, Grosser N, Schröder H, Gründemann D, Schömig E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. Br J Pharmacol 2004;143:159-65.
99. Grosser N, Schröder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide-cGMP pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1345-51.
100. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:11-6.
101. Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M. Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. Heart 1997;77:333–7.
102. Ashidate K, Kawamura M, Mimura, et al. Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. Eur J Pharmacol 2005;513:173–9.

103. Hermann M, Kapiotis S, Hofbauer R, et al. Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Lett* 1999;445:212–4.
104. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, et al. Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:25-30.
105. Marwali MR, Hu CP, Mohandas B, et al. Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:1324-32.
106. Waterman M, Fuhrman B, Keidar S, Hayek T. Aspirin promotes low density lipoprotein susceptibility to oxidative modification in healthy volunteers. *Isr Med Assoc J* 2009;11:730-4.
107. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987;32:1395-402.
108. Kirkova M, Ivancheva E, Russanov E. In vitro effects of aspirin on malondialdehyde formation and on activity of antioxidant and some metal- containing enzymes. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1994;108: 145-52.
109. Malle E, Sattler W. Platelets and the lipoproteins:native, modified and platelet modified lipoproteins. *Platelets* 1994;5:70–83.
110. Betteridge DJ, Cooper MB, Saggerson ED, et al. Platelet function in patients with hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1994;24(Suppl 1):30–33.
111. Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW, Malle E Low density lipoprotein and its effect on human blood platelets. *Cell Mol Life Sci* (2003) 60:961–971.
112. Bruni F, Pasqui AL, Pastorelli M, et al. Different effect of statins on platelet oxidized-LDL receptor (CD36 and LOX-1) expression in hypercholesterolemic subjects. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005;11:417-28.
113. Puccetti L, Sawamura T, Pasqui AL, et al. Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest* 2005;35:47-51.
114. Tirnaksiz E, Pamukcu B, Oflaz H, Nisanci Y. Effect of high dose statin therapy on platelet function; statins reduce aspirin-resistant platelet aggregation in patients with coronary heart disease. *J Thromb Thrombolysis* 2009;27:24-8.
115. Tauseef M, Shahid M, Sharma KK, Fahim M. Antioxidative action of aspirin on endothelial function in hypercholesterolaemic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103:314-21.
116. Gasparyan AY, Watson T, Lip GY. The role of aspirin in cardiovascular prevention: implications of aspirin resistance. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1829-43.
117. Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995;92:2432–6.


118. Ozben B, Tanrikulu AM, Ozben T, Caymaz O. Aspirin resistance in hypertensive patients. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2010;12:714-20.
119. Upchurch Jr GR, Ramdev N, Walsh MT, Loscalzo J. Prothrombotic consequences of the oxidation of fibrinogen and their inhibition by aspirin. *J Thromb Thrombolysis* 1998;5:9-14.
120. Bjornsson TD, Schneider DE, Berger H Jr. Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis: fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;250:154–61.
121. Serdar Z, Yeşilbursa D, Dirican M, Sarandöl E, Serdar A. Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct* 2007;25:655-64.
122. Melnichenko AA, Tertov VV, Ivanova OA, et al. Desialylation decreases the resistance of apo B-containing lipoproteins to aggregation and increases their atherogenic potential. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140: 51-54.
123. Mehta JL. Salutary effects of aspirin in coronary artery disease are not limited to its platelet inhibitory effects. *Clin Cardiol* 1998;21:879–84.
124. Amann R, Peskar BA. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol* 2002;447:1–9.
125. Blatter-Garin MC, Kalix B, De Pree S, James RW. Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the anti-oxidant enzyme, paraoxonase-1. *Diabetologia* 2003;46:593–4.
126. Jaichander P, Selvarajan K, Garelnabi M, Parthasarathy S. Induction of paraoxonase1 and apolipoprotein A-I gene expression by aspirin. *J Lipid Res* 2008;49:2142–8.
127. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892–904.
128. Karabina SA, Lehner AN, Frank E, Parthasarathy S, Santanam N. Oxidative inactivation of paraoxonase-implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725:213–21.
129. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998; 91:484-90.
130. Durak I, Karaayvaz M, Cimen MY, et al. Aspirin impairs antioxidant system and causes peroxidation in human erythrocytes and guinea pig myocardial tissue. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:34-7.
131. González-Correa JA, Arrebola MM, Guerrero A, et al. Influence of vitamin E on the antiplatelet effect of acetylsalicylic acid in human blood. *Platelets* 2005;16:171-9.
132. Keaney JF, Simon DI, Freedman JE. Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *The FASEB J* 1999; 13: 965–976.
133. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Different isoforms of tocopherols enhance nitric oxide synthase phosphorylation and inhibit human platelet aggregation and lipid peroxidation: implications in therapy with

vitamin E. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* (2001) 6 (2), 155–161.

134. Celestini A, Pulcinelli FM, Pignatelli P, et al. Vitamin E potentiates the antiplatelet activity of aspirin in collagen-stimulated platelets. *Haematologica* 2002;87:420-6.

EKLER

EK-1: Etik kurul onay yazısı.

	T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Sayı : B.30.2.ULU.0.20.00.00.02.020/ 6557	<u>BURSA</u>
Konu : Etik Kurul Kararı.	04 Mayıs 2009
Sayın Dr.Elif EMRE DOĞRUK Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi	
Fakültemiz Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulunun 26 Mayıs 2009 tarih ve 2009-9/11 o'lu kararı ile usul ve esas yönünden uygun görülen "Koroner Arter Hastalarında Aspirin Direnci İle Oksidatif Stres Arasındaki İlişki" isimli çalışmanız Dekanlığımızca da uygun görülmüştür.	
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.	
Prof.Dr.Sadık KILIÇTURGAY Dekan	
EK: -Etik Kurul kararı (1 adet)	
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 16059 Görükle Yerleşkesi / BURSA Tel : (224)2960000 Faks : (224)2960000	

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ULUDAG UNIVERSITY
Görüle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI





BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Koroner Arter Hastalarında Aspirin Direnci İle Oksidatif Stres Arasındaki İlişki
	ARAŞTIRMA SORUMLULARI	Doç.Dr.Zehra Serdar, Dr.Elif Emre Doğruk
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Prof.Dr.O.Akın Serdar
	ARAŞTIRMANIN TAHMİNİ SÜRESİ	1 yıl
	KATILACAK GÖNÜLLÜ SAYISI	100
DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	Masraflar araştırmacılar tarafından karşılanacaktır.	
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ / NİTELİĞİ	Dönem IV (Faz IV) / Uzmanlık Tez çalışması	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Dili
		ARAŞTIRMA İZİN VE ONAY BAŞVURU FORMU	12.05.2009
	AYDINLATILMIŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU		
	KABUL EDİLMİŞ ve HARIÇ TUTULMA KRİTERLERİ FORMU		
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	12.05.2009	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2009-9/11	Tarih : 26 Mayıs 2009
	Fakültemiz Biyokimya AD Öğretim Üyesi Doç.Dr.Zehra Serdar ve Araştırma Görevlisi Dr.Elif Emre Doğruk'un sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen merkezli araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda yapılmasının uygun olduğuna ve araştırmacının aşağıda belirtilen hususlar göz önüne alınarak yürütülmesi gerektiğinin sorumlu araştırmacıya bildirilmesine oybirliği ile karar verildi. 1- Etik Kurul kaşesi bulunan "Onam" formunun kullanılması ve bu formun hastaya çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulması. 2- Çalışmanın UÜ-SK Tıbbi Araştırma Prosedürüne uygun olarak yürütülmesi. 3- Çalışmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve çalışma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesi. 4- Çalışmaya alınan gönüllülerin (hasta ve sağlıklı gönüllüler) adı-soyadı ve protokol numaralarının 6(altı)ayda bir kurulumuza yazılı olarak (Gizlilik ilkesi nedeniyle kapalı zarf içerisinde) bildirilmesi.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU
ÜYELER	

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYSAL Başkan	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji .AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN Başkan Yardımcısı	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Selim Giray NAK Raportör	İç Hastalıkları Gastroenteroloji	U.Ü.T.F. İç Hastalıkları AD. Gastroenteroloji BD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Katılmadı
Prof. Dr. Ayşegül DEMİRHAN Üye	Deontoloji	U.Ü.T.F. Deontoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Katılmadı
Prof.Dr.Fahir ÖZKALEMKAŞ Üye	İç Hastalıkları Hematoloji	U.Ü.T.F. İç Hastalıkları AD. Hematoloji BD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Ömer YERCI Üye	Patoloji	U.Ü.T.F. Patoloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ULUDAG UNIVERSITY
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

Doç. Dr. Zehra SERDAR Üye	Biyokimya	U.Ü.T.F. Biyokimya AD.	K	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	Çalışmada bulunduğu için çalışma hakkında görüş bildirmemiştir.
Doç.Dr.Betül Berrin SEVİNİR Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Davit SABA Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	U.Ü.T.F. Kalp ve Damar Cerrahisi AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Katılmadı
Av.E.Dilek HARAÇCI Üye	Hukuk	U.Ü.Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

* Araştırma ile ilişki
** Toplantıda Bulunma

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimim ve tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Zehra SERDAR'a şükranlarımı ve saygılarımı sunarım. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Esmâ GÜR'e, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak zamanlarını ve emeklerini harcayan kürsümüzün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi hazırlamamdaki destekleri için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Osman Akın SERDAR'a ve araştırma görevlisi Dr. Şeyda GÜNER'e teşekkür ederim.

Beraber görev yaptığım dostluklarını, arkadaşlıklarını unutmayacağım sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma, bilgi, deneyim ve dostluğu ile her zaman yanımda olan sevgili Yard. Doç. Dr. Arzu Yılmaztepe ORAL'a, ayrıca Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı personeline, Uludağ Üniversitesi Merkez Laboratuvarı teknisyenlerine ve elemanlarına yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren aileme, hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen değerli eşime ayrıca mutluluk kaynağım biricik kızım Defne'ye teşekkür eder ve sevgilerimi sunarım.

Son olarak bu çalışmaya katılmayı kabul eden tüm kişilere teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Bursa'da doğdum. İlkokul ve ortaokulu Altıparmak İlköğretim okulunda, lise öğrenimimi Bursa Erkek Lisesi'nde 2000 yılında tamamladım. Aynı yıl Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım ve 2006 yılında tıp doktoru olarak mezun oldum. 2007 yılı haziran ayında ise Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım.