



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

SİLOSTAZOL VE PENTOKSİFİLİNİN HİPOKSİK VE NORMOKSİK KOŞULLARDA İN-VİTRO ORTAMDA RAT AORTASI ENDOTEL FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Asist. Dr. FECRİYE SUBAŞI GÜR

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. SELİM DURMAZ

AYDIN-2016

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

**SİLOSTAZOL VE PENTOKSİFİLİNİN
HİPOKSİK VE NORMOKSİK KOŞULLARDA
İN-VİTRO ORTAMDA RAT AORTASI
ENDOTEL FONKSİYONLARI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Asist. Dr. FECRİYE SUBAŞI GÜR

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. SELİM DURMAZ

Bu Araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF – 12032 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

AYDIN-2016

TEŞEKKÜR

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda eğitimime başladığım 2009 yılından itibaren bilgi ve deneyimlerini bilimsel bir sorumluluk ve özveriyle bizlere aktaran hocalarım başta tezimde emeği geçen Prof. Dr. M. İsmail BADAĞ ve Yrd. Doç. Dr. Selim DURMAZ, Prof. Dr. Berent DİŞCİGİL, Prof. Dr. Uğur GÜRCÜN, Prof. Dr. Mehmet BOĞA, Prof. Dr. Erdem Ali ÖZKISACIK, Doç. Dr. Tünay KURTOĞLU hocalarıma teşekkür ederim.

Tezimin uygulama aşamasında bana yardımcı olan Biyofizik Asistanı Cem KÖKEN ve Biyokimya Hocamız Mustafa YILMAZ'a teşekkür ederim.

Son olarak bu yorucu tempoda bana sevgi ve özveriyle her yönden yardım eden aileme çok teşekkür ederim

Asist. Dr. Fecriye SUBAŞI GÜR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ	vi
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Endotel Tabakası.....	3
1.2. Endotel–vazomotor tonus ilişkisi.....	4
1.2.1. Nitrik oksid (NO).....	4
1.2.2. Asetilkolin.....	6
1.2.3. Fosfodiesteraz	6
1.3. Periferik Arter Hastalığı.....	7
1.4. Pentoksifilin	8
1.5. Silostazol.....	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
2.1. Deney hayvanlarının temini.....	18
2.2. Organ banyosu kullanımı.....	18
2.3. Çalışma Grupları.....	21
2.4. İstatistiksel analizler	22
3. BULGULAR.....	22
4. TARTIŞMA	28
5. SONUÇ	32
ÖZET	33
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	37

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I. Kontrol Grubunda Asetilkolinle Endotel Gevşeme Yanıtları Sayısal Verileri .	22
Tablo II. Silostazol ile Normoksik ve Hipoksik Ortamda Endotel Gevşeme Yanıtları..	23
Tablo III. Pentoksifilin İle Normoksik ve Hipoksik Ortamda Endotel Gevşeme Yanıtları	23
Tablo IV. Normoksik ve hipoksik pentoksifilin ve silostazol gruplarında İMA ve NO değerleri	25
Tablo V. Normoksik koşullarda silostazol ve pentoksifilinin gevşeme yanıtları	26
Tablo VI. Hipoksik koşullarda pentoksifilin ve silostazol gevşeme yanıtları	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pentoksifilin'in sentezi(a) ve moleküler yapısı (b) [18].....	9
Şekil 2. Silostazol'un moleküler yapısı	11
Şekil 3. Lipid metabolizması şematik görünümü	12
Şekil 4. Silostazol etki mekanizması [38] (Adenozin alınıminin inhibisyonu)	13
Şekil 5. Silostazol'un endotelinin indüklediği vazospazm ve hücrel proliferasyon üzerindeki etkileri [59].....	16



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1-2. Organ banyosu düzeneđi 19

Resim 3. Kasılma yanıtlarının bilgisayar aracılığı ile değeriendirilmesi..... 20



GİRİŞ VE AMAÇ

Dolaşım bozukluğu ile karakterize pek çok hastalığın patofizyolojisinde vazokonstriksiyon ve buna bağlı meydana gelen perfüzyon bozukluklarının neden olduğu sonuçlar yer almaktadır. Endotelden salınan mediatörler, bu mediatörlerin salınımında meydana gelen bozukluklar periferik arter hastalığı gelişmesinde rol oynamaktadır. Bu bakımdan endotelden salınan bu mediatörlerin vasküler düz kaslar üzerindeki etkileri ve bu etkilerin ortaya çıkış mekanizmaları önem arz etmektedir.

Endotel tabakası sadece damarın iç yüzünü kaplayan yarı geçirgen bir tabaka değildir, aynı zamanda salgıladığı mediatörler aracılığı ile hemostazda önemli bir rol üstlenmektedir. Endotelin yaptığı otokrin ve parakrin görevler de dikkate alındığında bu yapının aslında vücudun her bölgesine yayılmış bir organ olduğundan söz edebiliriz[1].

Hemostazın sağlanmasında gerekli olan damar düz kaslarının kasılması için gerekli olan mediatörler, antikoagülasyon, fibrinolitik ve antitrombotik özellikler gibi bütün yaşamsal işlevler endotel fonksiyonu içerisinde yer alır. Tüm bu basamaklarda meydana gelebilecek bozukluklar endotel hücrelerinin fonksiyon görememesine yani endotel disfonksiyonu ile sonuçlanabilir.

Endotel hücresinden salınan mediatörler hemen altındaki vasküler düz kasları uyarak vazodilatör veya vazokonstriktör etki ortaya çıkartabilir. Bu etkiler normal hemostazın sağlanması için gereklidir. Fakat endotel disfonksiyonu olması durumunda vazospazm, trombüs oluşumu ve ateroskleroz gibi sonuçlar ortaya çıkabilir. Endotel fizyolojik ve patolojik fonksiyonlarına ek olarak selektif permabilite bariyeri, su ve suda eriyenlerin kapiller transportu, plasma lipidlerinin düzenlenmesi, iltihabi ve immun yanıtlar, anjiogenez ve tümör metastazına katkısı, kanın akıcılığını devam ettirerek ve her değişen hemodinamik, humoral duruma bağlı olarak kan damarlarının çapını ayarlayarak kardiyovasküler hemostaza katkıda bulunur. Dolayısıyla endotel disfonksiyonuna yol açan nedenlerin ortadan kaldırılması normal fizyolojik süreçlerin devamını sağlayabilir. Endotelden salınan mediatörlerin vasküler düz kasları uyarma mekanizmaları da yine periferik arter hastalıklarının tedavisinde önemli bir hedeftir.

Silostazol, periferik arter hastalığının medikal tedavisinde kullanılmaktadır ve yürüme mesafesini arttıran bir ilaçtır. Silostazol quinolinone türevi olan spesifik hücrel fosfodiesteraz III A enzim inhibitörüdür [2]. Vazodilatatör ve anti-trombotik etki gösterir. Vasküler düz kaslarda ve trombositlerde cAMP düzeyini artırır ayrıca intrasellüler kalsiyum düzeyinde azalma meydana getirir. Bu sayede vazodilatasyon ortaya çıkartır [3-6].

Pentoksifilin ise bir metilksantin türevidir ve nonspesifik bir fosfodiesteraz inhibitörüdür. Makrofajlardan TNF-alfa salınımını azaltarak NO salınımını inhibe eder. Pentoksifilin bu etkilerini intrasellüler cAMP ve cGMP düzeylerini artırarak meydana getirir. Pentoksifilinin ortaya çıkardığı vazodilatasyona bu mekanizmaların neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmada silostazol ve pentoksifilinin in vitro ortamda rat aortasındaki etkileri incelenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Endotel Tabakası

Endotel tabakası ince bir squamöz epitelden oluşur ve tüm damarlarda bulunur. Endotel tabakasını oluşturan hücreler 10-15µm genişliğinde, 20-25 µm uzunluğundadır ve tek sıra halinde dizilmişlerdir. Endotel tabakasının en önemli görevlerinden birisi de salgıladığı mediatörler aracılığı ile vazokonstriksiyon ve vazodilatasyonda rol oynayarak vasküler hemostazın korunmasıdır [7]. Endotel tabakası damarın iç yüzeyinde kaygan ve yarı geçirgen bir bariyer oluşturur. Sadece bariyer görevi görmez bunun yanı sıra endokrin, parakrin ve otokrin özelliklere de sahiptir. Vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon gibi önemli işlevleri salgıladığı mediatörler aracılığı ile kontrol eder ve hücreler arası boşluğa sıvı ve substrat geçişi üzerinde aktif bir rol oynar [8]. Endotel hücreleri salgıladıkları vazoaktif maddeler, büyüme faktörleri ve büyüme inhibitörleri ile koagülasyonu, fibrinolizisi, hücre proliferasyonu, inflamasyonu ve damar tonusunu, dolayısıyla kan akışını ve kan basıncını düzenlemektedir. Bu fonksiyonlar şu şekilde özetlenebilir [9].

- Dolaşımdan çevredeki dokulara madde geçişini düzenleyen yarı geçirgen bariyerin devamlılığının sağlanması.
- Vazodilatatör veya vazokonstriktör mediyatörler salınımı ile vasküler vazomotor tonus kontrolü.
- Çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin sentezi ve salınımı.
- Arter duvarındaki lipoproteinlerin değişimi ve oksidasyonu.
- Lökosit ve trombositlere nontrombojenik yüzey sağlanması.
- Bazal membran yapısındaki kollajen ve proteoglikanlarının devamlılığının sağlanması.
- Koagülasyon ve fibrinolitik olayların düzenlenmesi.
- İnflamatuar ve immünolojik olaylar.

1.2. Endotel–vazomotor tonus ilişkisi

1.2.1. Nitrik oksid (NO)

Vasküler düz kaslarda meydana gelen kasılma ve gevşeme ile tonus belirlenir ve bu sayede dolaşım kontrol edilmiş olunur. Endotelden salınan en güçlü vazodilatör madde NO'dur. NO, nörotransmitter, otakoid, hücre içi ulak, parakrin maddesi ya da hormon olarak fonksiyon görebilir. Hücre membranlarından kolayca geçebilen, tek nitrojen ve tek oksijen atomunun birleşmesiyle ortaya çıkan bir kimyasal yapıya sahiptir. Yarılanma ömrü 3-50 saniye arasındadır [10].

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

Nitrik oksid endotel hücrelerinde L-arginin amino asidinin terminal guanido atomunun enzimatik oksidasyonu ile nitrik oksid sentaz (NOS) enziminin sentezlenir [11]. NO oluşumunu katalizleyen en az üç farklı enzim başka bir deyişle üç farklı NO-sentetaz (NOS) izoformu olduğu bildirilmiştir. Her üç enzimde aktiviteleri için kofaktör olarak NADPH(Nikotinamid adenin dikleotid fosfat), FAD(Flavin adenin dikleotid), FMN (Flavin mononukleotid) ve tetrahidrobiopterin'e gereksinim duyarlar.

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

- Tip II: iNOS(indüklenebilir): Makrofajlarda ve düz kas hücrelerinde oluşan, sitokinler ve endotoksin tarafından sentezi artırılan induklenebilir iNOS, kalsiyuma bağlı değildir. Sitotoksik, sitostatik, sitoprotektif fonksiyonu vardır.
- Tip III: eNOS(endotelial): Vasküler endotelial, kalp, beyin vb hücrelerden devamlı salınır. Kalsiyuma bağımlıdır. Vasküler düz kas hücrelerinin içine girerek guanilat siklazı aktive eder. Vasküler relaksasyon ve vazodilatasyona neden olur.

NO endotelde oluştuktan sonra damar düz kasına difüze olur ve burada solübl guanilat siklazın hem demirine bağlanarak enzimi aktive eder. Bu enzimin aktivasyonu guanozil trifosfat(GTF)'dan ikinci haberci olarak guanozil monofosfat (cGMP) oluşumuna yol açar. Oluşan bu biyokimyasal olaylar düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akışının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Nitrik oksit aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de artırarak trombosit yapışma ve kümelenmesini azaltır. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak ölmelerine yol açar ve savunma sisteminde rol oynar [12]. Endotelyal NO'nun etkileri aşağıda özetlenmiştir [13].

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

1.2.2. Asetilkolin

Asetilkolin (Ach) parasempatik sistemin ana nöromediatörüdür ve asetik asit ile kolin esterinin birleşmesi sonucu ortaya çıkar. İlk kez 1914 yılında İngiliz bilim adamı Henry Hallet Dale tarafından tanımlanmış, 1921 yılında ise Avustralyalı bilim adamı Otto Lewi tarafından, kurbağa kalpleri üzerinde yaptığı deneyler sonucu bir

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

Asetilkolin muskarinik reseptöre bağlanarak eNOS tarafından sentezlenen NO'nin saliverilmesine neden olur. Hızla damar düz kas hücrelerine geçen NO, guanilat siklazı aktive ederek cGMP'yi artırır ve gevşeme oluşturur [14]. Bu sayede indirekt etkilerle vazodilatasyon meydana getirmiş olur.

1.2.3. Fosfodiesteraz

Fosfodiesteraz (PDE) enzimi, ikinci haberci olan cAMP(cyclic Adenozin Monofosfat) ve cGMP (cyclic Guanozin Monofosfat)'da bulunan fosfodiester bağına parçalar. İnsan vücudunda çeşitli subtipleri izole edilmiştir. PDE inhibitörlerinin tedavide kullanılabileceği ilk kez 1977 yılında Weiss ve Hait tarafından öne sürülmüştür [15].

cAMP seviyesinin artması serbest kalsiyum iyonlarının plateletlerdeki depo granüllerine geri akımı kolaylaştırmaktadır. Serbest kalsiyum iyonları glikoprotein IIb/IIIa kompleksinin formasyonu için ve tromboxan A2 üretimi için gereklidir. PDE III enzimi trombositler, kalp kası hücreleri, damar düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve yağ dokusu (adipöz) hücrelerinde daha yoğun olarak bulunmaktadır. PDE inhibisyonu ile cAMP artışı meydana gelir ve bu sayede düz kas hücrelerine Ca girişi engellenmiş olur.

1.3. Periferik Arter Hastalığı

Periferik arter hastalığı (PAH) periferik arterlerin kronik ve ilerleyici bir proses sonucunda tıkanması ve kan akımının yeterli düzeyde sağlanamaması durumudur. Bu tanım kabul gören tanımdır ancak diğer taraftan PAH, abdominal aortun aterosklerotik daralması sonucunda bacaklardaki arterlerde egzersiz sırasında ya da dinlenme durumunda arteriyel akışın azalması biçiminde de tanımlanmaktadır (10). İlerlemiş yaş, sigara, diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, erkek cinsiyet, kalp yetmezliği, serebrovasküler olay öyküsü gibi nedenler PAH için risk faktörleri arasında

gösterilebilir (12). PAH varlığında miyokard infarktüsü, inme, amputasyon ve ölüm riski artış göstermektedir. Periferik arter hastalığı risk faktörlerinin azaltılması ile ateroskleroz gelişimini azalttığı ve yaşam kalitesini artırdığı gösterilmiştir (12).

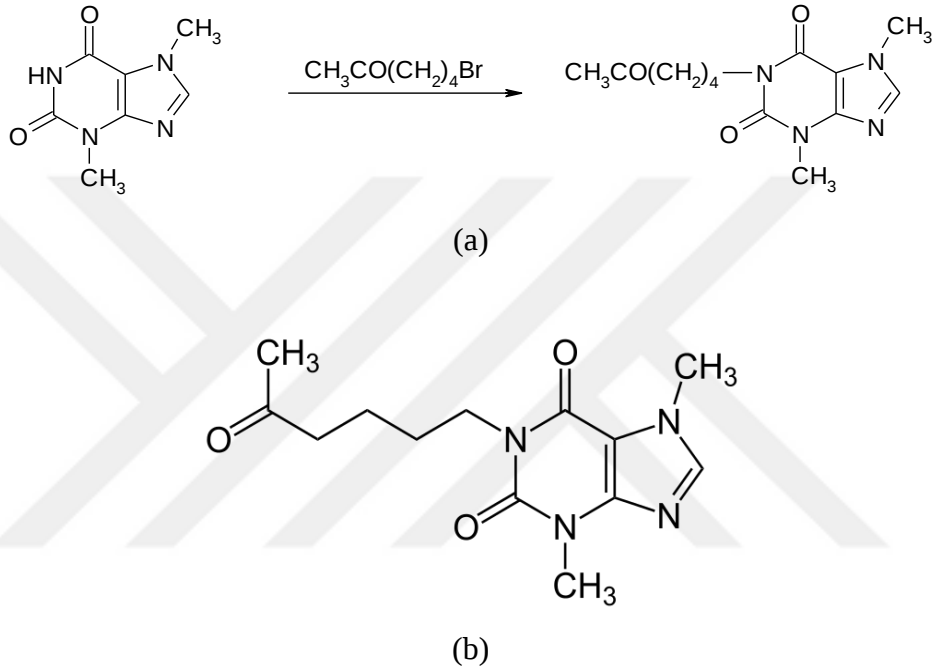
Koroner arter hastalığı, serebrovasküler olaylar ve aterotromboz PAH ile birliktelik gösteren diğer durumlardır. Periferik arter hastalığı mekanizmasında da yer alan aterotrombozun özellikle bifurkasyon bölgelerinde yerleşmesi sonrasında arterlerin korunma mekanizmaları bozulabilir ve lokal intimal hasarlanmalar görülebildiği ileri sürülmektedir (10).

Periferik arter hastalıklarında meydana gelen perfüzyon bozukluğu özellikle eforun arttığı durumlarda daha belirgin şekilde semptom vermektedir. Özellikle alt ekstremitelerde periferik arter hastalığı olan hastalar yürüme esnasında bacaklarında ağrı gelmesi ve durma ihtiyacı hissetme şeklinde şikayetlerle doktora başvururlar (20). Kimi hastalarda semptomlar bu şekilde aşikar olarak görülebildiği gibi, kimi hastalarda da komorbid hastalıklar gibi diğer pek çok durum nedeni ile semptomlar maskelenebilir. Tipik alt ekstremitte iskemik semptomları, hastalarda tembellik ve uyuşukluk hissi yaratırken yürüme ve egzersiz konusunda isteksizliği tetiklemektedir. Kladikasyo mekanizmasını 1) egzersiz ile dokunun oksijen ihtiyacında artış meydana gelmesi 2) kasların anaerobik solunuma başlaması 3) laktik asit ve diğer metabolitlerin üretimi ve 4) bacakta ağrı ortaya çıkması şeklinde özetleyebiliriz.

Kladikasyo, yorgunluk, rahatsızlık hissi ve belli bacak kas gruplarında egzersiz sırasında artan iskemi biçiminde tanımlanmaktadır. Her ne kadar tanım bu şekilde olsa da kladikasyo hastalarının %90'ı asemptomatiktir (22). Rehberlere göre intermittan kladikasyosu olan hastalarda vasküler yapılar fizik muayene ile değerlendirilmeli ve gerekli durumlarda ileri testler yapılmalıdır. Tanı konulan hastalarda revaskülarizasyon girişiminin uygulanması için karar aşamasında kladikasyo semptomlarındaki iyileşmenin net biçimde görülebilmesi için diğer hastalıkların (anjina, kalp yetmezliği, kronik solunum hastalığı, ortopedik yetersizlikler) taranması ve elimine edilmesi gerekmektedir.

1.4. Pentoksifilin

Pentoksifilin bir ksantin türevidir ve fosfodiesteraz enzim inhibitörüdür. İntermittant kladikasyo, serebrovasküler hastalıklar ve sepsis durumlarında kullanılmaktadır[16]. Pentoksifilin kan viskozitesini azaltarak kan akışını kolaylaştırır. Fosfodiesteraz enzimi inhibisyonu sayesinde eritrositlerin esnekliğini artırır, cAMP düzeyini yükseltir. Bu etkileri sayesinde trombosit agregasyonunu da azaltmaktadır[17].



Şekil 1. Pentoksifilin'in sentezi(a) ve moleküler yapısı (b) [18]

Pentoksifilin kapillerlerde dolaşımı artırdığı için özellikle kronik iskemik vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda nötrofil adhezyonunu da engelleyen ksantin türevi bir fosfodiesteraz inhibitörüdür. Düşük dozlarda verildiğinde vazodilatör etkileri çok fazla gözlenmemektedir. Vazodilatör etkinliklerine rağmen Raynaud fenomeninde yeterli derecede etkinliği gösterilememiştir[19].

Pentoksifilin 5'nükleotidaz enzimini inhibe ederek dokuda adenozintrifosfat kaybını azaltmakta, iskemi dönemi ve sonrasında doku enerji tüketimini minimumda tutarak hücre hasarını engellemektedir. Pentoksifilin eritrositlerin esnekliklerinin artırır ve kanın akışkanlığını artırır. Pentoksifilinin siklik adenozinmonofosfat fosfodiesterazını inhibe ederek siklik adenozinmonofosfat düzeyini artırır. Bu sayede

eritrositlerin esnekliği artar. Esnekliğin artması özellikle kapiller bölgede kan akımının rahat sağlanması yardımcı olur [19].

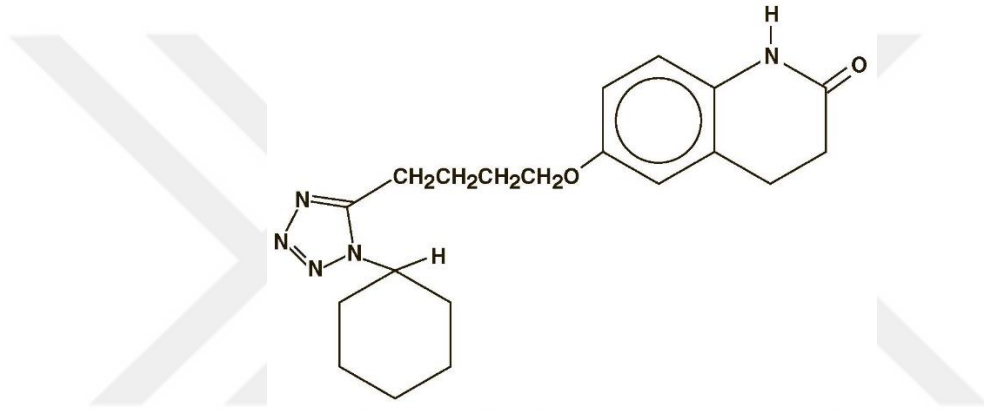
Pentoksifilin proinflatuar sitokin üretimini baskıarken aynı zamanda da anti-inflatuar etkinlik gösterir [20]. Yapılan hayvan ve insan miyokard çalışmaları, yeni doğan miyokardlarının iskemiye direncinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu yeni doğan miyokardlarında 5'nükleotidaz aktivitesinin düşük olması ile açıklanmaktadır [21]. Pentoksifilin etkinliğini 5'nükleotidaz enzimini inhibe ederek gösterir. Bunun sonucunda hem ileri dönem hasarlayıcı metabolik zincirlerin gelişimi engellenebilir, hem de reperfüzyon döneminde dokunun ihtiyacı olan enerji depoları korunabilir. Bu bilgiler göz önüne alındığında kardiyopulmoner bypass sırasında miyokardın korunması amacı ile pentoksifilin kullanılabileceği ileri sürülmüştür [21-24].

Pentoksifilin iskemi reperfüzyon hasarını birden çok mekanizma ile engellemektedir [25-27]. Bu mekanizmalardan biri pentoksifilin hücre içinde siklik adenzin monofosfat düzeyini arttırarak özellikle endotel hücresinde homeostazın ve hücre membran bütünlüğünün korunmasını sağlamasıdır [28]. Pentoksifilin plazma proteinlerine bağlanmaz ve % 93-95'i idrarla atılır [29]. Pentoksifilin hiperkoagulopatıyı önler, yara iyileşmesinde rol oynar, immünomadülatör etkisi ve sepsis ve peritonite karşı koruyucu etkisi vardır [29, 30]. Karaciğerin toksisite modellerinde pentoksifilin hepatoprotektif etkinliği görülmüştür [31]. Pentoksifilin dolaşım üzerinde düzenleyici etkilerinin olduğu, nötrofilleri inhibe ettiği ve lizozomal enzimlerin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir [32, 33]. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu da önlemektedir. Sulkawska ve ark. siklofosfamide bağlı serbest radikallerle oluşın akciğer hasarını önlediğini, karaciğerin oksidatif hasarını önlemede ise yetersiz kaldığını saptadıklarını bildirmişlerdir [34]. Viladkar ve ark. pentoksifilin insan kronik miyelositer lösemi hücrelerinde doksorubisin birikimini arttırarak, doksorubisinin antitümör etkisini arttırdığını rapor etmişlerdir [35]. Pentoksifilin mide barsak kanalından iyi absorbe edilir. Karaciğerde metabolize edilerek inaktif edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 2 saat kadardır. Ağız yoluyla günde 3 kez 200 mg dozunda kullanılır. Klinik kullanımında bir kezlik doz 400 mg kadar arttırılmıştır. Yavaş salıverilen tablet şekli de kullanılabilir. Acil durumlarda 100 mg ilacı 250-500 ml parenteral sıvıda dilüe edilerek iv infüzyonla uygulamak mümkündür. İntravenöz doz günde 50 mg'lık

ilavelerle 400 mg'a kadar çıkarılabilir [36]. Başlıca yan etkisi bulantı, yüzde kızarma, baş dönmesi, baş ağrısı, gastrointestinal bozukluklardır. Kan basıncı ve kalp atış hızını hafif değiştirir.

1.5. Silostazol

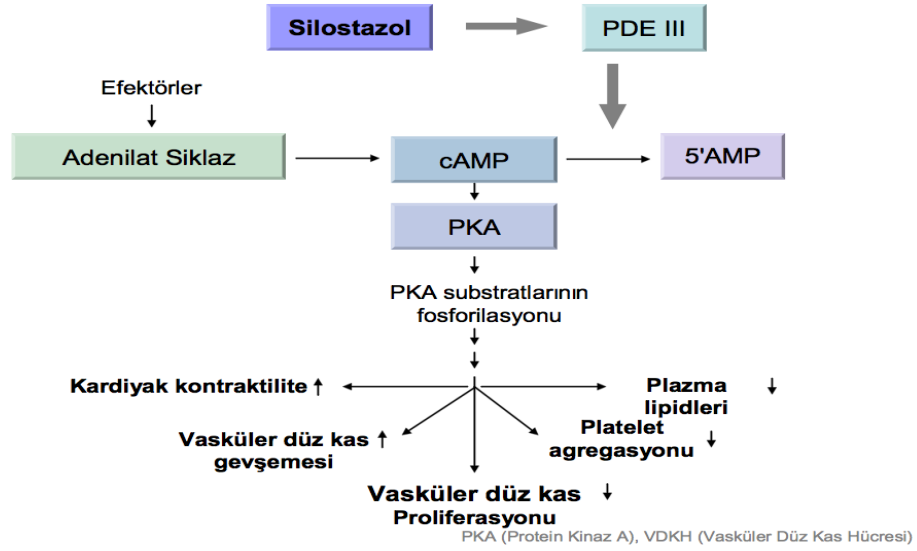
Silostazol, periferik arter hastalığının medikal tedavisinde kullanılmaktadır ve yürüme mesafesini arttıran bir ilaçtır [2]. Silostazol quinolinone türevi olan spesifik hücresel fosfodiesteraz III A enzim inhibitörüdür. Ülkemizde 2006 yılında onay alınarak kullanılmaya başlamıştır.



Şekil 2. Silostazol'ün moleküler yapısı

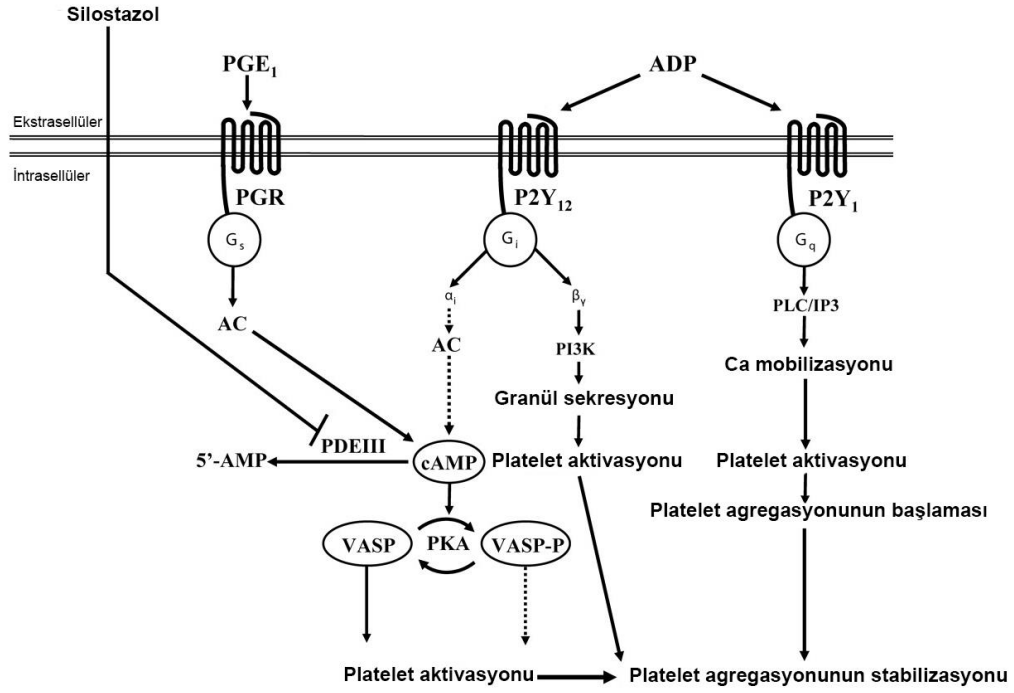
Bu ilaç vazodilatasyon etkisi olan antiplatelet ve antitrombotik bir ilaçtır [37]. Bu trombositlerde ve düz kas hücrelerinde 3'-5'cylic adenosine monophosphate (cAMP) düzeyini artırarak selektif fosfodiesteraz 3 enzim inhibitörüdür ve intrasellüler kalsiyum düzeyinin azaltır ki bu da relaksasyon ve vazodilatasyona yol açar [38]. cAMP seviyelerindeki bu artış sonucunda:

- Platelet (trombosit) agregasyonu inhibe olur.
- Vasodilatasyon oluşur
- Vasküler düz kas hücre proliferasyonu inhibe olur.
- Kalp atım hızında ve kasılma gücünde artış olur.
- Lipid metabolizmasında iyiye doğru gelişme olur (Şekil 3)



Şekil 3. Lipid metabolizması şematik görünümü

Silostazol hücre içine adenosine alınımını da inhibe eder, intertisiyal ve dolaşımdaki adenosin seviyelerini artırır (Şekil 4) [39]. Adenosin alınımının inhibisyonu trombosit ve vasküler düz kas hücrelerinde A_2 reseptörlerini etkiler ve hücre içi cAMP seviyelerini artırır. Adenilat siklaz aktivasyonu ve cAMP seviyelerinde ki artış platelet agregasyonunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu engeller. Kardiyak hücrelerde ise A_1 reseptörlerini aktive eder ve bunun sonucunda PDE 3 inhibisyonu nedeniyle oluşan pozitif kronotrop ve inotrop etkilerinde azalma meydana gelir. Böylece adenosin uptake inhibisyonunda yapan silostazolun dual etki mekanizması sayesinde kardiyak etkiler milrinon gibi sadece PDE III üzerinden etki gösteren diğer PDE III inhibitörlerine göre çok daha zayıftır.



Şekil 4. Silostazol etki mekanizması [38] (Adenozin alınımının inhibisyonu)

İn vitro, ex vivo ve in vivo çalışmalarda silostazolun ADP, kollagen, araşidonic asit, epinefrin, trombin ve duvar gerilimi tarafından indüklenen primer ve sekonder platelet agregasyonunu (kanama zamanını uzatmadan) inhibe eder. Silostazol ADP tarafından indüklenen ex vivo platelet agregasyonu baskılanmasında anlamlı olarak aspirinden daha potanttır ve araşidonic asidin indüklediği platelet agregasyonundan dolayı antiplatelet etkisi tiklopidinden çok daha fazladır [40, 41].

Silostazol ile tedavide; trombositlerden P selektin (Platelet aktivasyon markerı) salınımını baskılar, tromboxan A₂ formasyonu ve Glikoprotein IIb/IIIa kompleksi oluşumu inhibe olur. Silostazolun antitrombotik etkisi aslında antiplatelet etkileri tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir [42].

Silostazolun trombotik komplikasyonları ve restenozu önleyici etkileri mevcuttur [43]. Onada ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada aspirin ve silostazol kombine terapisi OPCAP (off-pump koroner arter bypass) sonrası hastalarda platelet agregasyonunu azaltmada aspirin monoterapisinden daha efektif olduğunu göstermişlerdir, bu kombinasyon terapisi OPCAP sonrası hastalarda antitrombotik rejim için yeni bir tedavi opsiyonunu temsil edebilir [44].

Cleanthis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada silostazol ve aspirin ile kombinasyon tedavisinin egzersiz ile indüklenen platelet agregasyonunu tek başına aspirin tedavisine göre anlamlı derecede daha fazla inhibe ettiği göstermişlerdir. Klopidoğrel ve aspirin ile artmış kanama riski silostazol ve aspirin ile gösterilememiştir [45, 46].

Shear stersin indüklediği plateled agregasyonunu inhibe eder, Prostoglandin I₂ (PGI₂)'nin antiplateled etkisini artırır. Ayrıca trombosit fonksiyonlarının geriye dönüşü daha kısadır [47]. Adezyon molekülü olan CD62P (P- selectin) plateletlerde üretimi ve salınımını baskılar. P selektinin serebral iskemi/reperfuzyon injurisi ve strokta inflamatuvar ve prothrombojenik evreyi induklenmesinde katkıda bulunduğu gösterilmiştir [48]. Nakamura ve arkadaşlarının organ banyosunda yaptığı çalışmada, Silostazol etkisini torasik aortada da ortaya çıkardı, bu yüzden vasküler düz kas hücrelerinde cAMP seviyesinin yükselmesi torasik aortada vasodilatasyona neden olmaktadır [49].

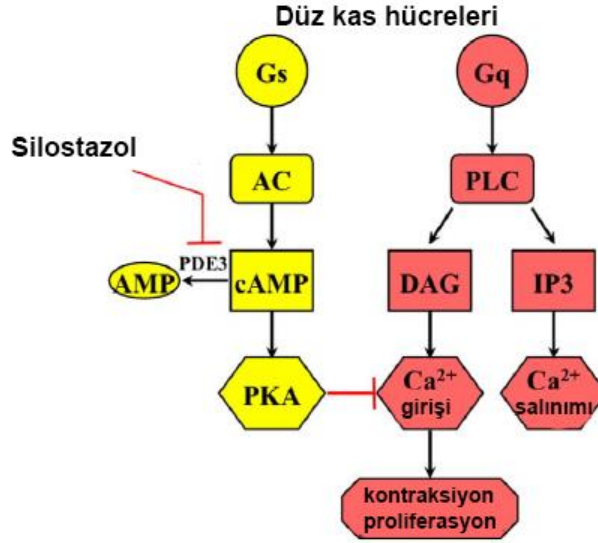
Silostazolun intermittant kladikasyonlu hastalarda arteriyel vazodilatasyon etkisi vardır. cAMP seviyesinde artma ve kalsiyum iyon salınımı blokajı nedeniyle silostazol, düz kas hücrelerinde kontraksiyonu inhibe eder ve vasküler relaksasyona neden olur [50]. Direkt kontraktıl proteinler üzerine etkisi bulunmamaktadır [50]. Oral 100 mg gün iki kez kullanımı anlamlı olarak ortalama ayak bileği kan akımını artırır, deri sıcaklığını ve deri kan akımını anlamlı yükseltir [37, 51]. Silostazol In vitro vasküler düz kas hücreler tarafından indüklenen Nitrik Oksit (NO) üretimini artırır [49]. Cone ve arkadaşları ise cAMP'ın intracellüler seviyelerinde yükselme olması sonucunda tavşan koroner arterlerinin vasküler yatağında vazodilatasyon yaptığını göstermişlerdir [52]. Silostazol terapodik dozda uygulandığında insan venöz düz kas hücrelerinde de relaksasyona neden olmaktadır [53].

Silostazolün, Pentoxifilin ve plasebo ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarında hastaların %67'sinde ağrısız yürüme mesafesinde artma olduğu, hastaların % 50'ünde ise maksimum yürüme mesafesinde artma olduğu gösterilmiş, buda yaşam kalitesinde iyileştirmiştir [54].

Silostazolün plateletler üzerindeki etkilerinin yanı sıra, bu ajanın vazodilatasyonu kolaylaştırdığı da görülmüştür [55]. Her ne kadar vazodilatasyonun altında yatan mekanizmalar kesin olarak belirlenememişse de silostazolün sitoplazmik kalsiyum düzeyini düşürmek suretiyle bu etkiye yol açtığı düşünülmektedir [56]. Vasküler düz kaslarda endotelin vazokonstrüksiyonu tetikleyici etkiler yaparken, uzun sürede hücresel proliferasyonu promote eder [57, 58].

Yapılan çalışmada fare düz kas hücrelerinde endotelin ile uyarılmış damarda ortaya çıkan vazokonstrüksiyonun silostazol tarafından engellenebileceği gösterilmiştir. Silostazol endotelinin indüklediği ekstrasellüler kalsiyum akışını engellerken intraorganellar kalsiyum salınımı üzerinde etkili olmamaktadır. Silostazol intrasellüler kalsiyum salınımını inhibe eder ve protein kinaz aracılığı ile farelerde femoral arterde vazokonstrüksiyona yol açtığı gösterilmiştir [59]. Endotelin sadece sitozolik kalsiyum seviyesini artırmakla kalmaz aynı zamanda vazokonstrüksiyona da yol açar. Maksimum doza yakın düzeyde uygulanan silostazolün (30mM) 10 nM endotelin tarafından indüklenen sitozolik kalsiyum salınımını inhibe etmiştir. Bu veriler endotelin tarafından indüklenen vazospazmın engellenmesinde silostazolün etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Silostazol'ün intrakranial arterlerde intrasellüler kalsiyum salınımını ve vazokonstrüksiyonu PKA aracılığı ile engellediği gösterilmiştir. Ayrıca endotelin tarafından indüklenen vazospazm ve hücresel proliferasyonun da silostazol tarafından engellenebildiği gösterilmiştir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda silostazolün bu etkileri ekstrasellüler bölgeden intrasellüler bölgeye olan kalsiyum akışını engellemek sureti ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir.



Şekil 5. Silostazol'un endotelinin indüklediği vazospazm ve hücresel proliferasyon üzerindeki etkileri [59]

Yapılan diğer çalışmalarda silostazolün endotelin indüklediği kalsiyum girişini engellemek sureti ile endotelinin fonksiyonunu engellediği gösterilmiştir. Endotelin vasküler düz kaslarda hücresel proliferasyonu promote etmektedir. Silostazolün PKA aktivitesi aracılığı ile hücresel proliferasyonu engellemektedir.

Silostazol bir fosfodiesteraz inhibitörüdür ve platelet agregasyonunu cAMP düzeyini artırarak ve dolayısıyla PKA aktivitesi ortaya çıkartarak gösterir. Silostazol her ne kadar intermitant klodikasyo için FDA tarafından kullanım onayı almış olsa da bu ajanın diğer kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Vazodilatör etkilerinden dolayı konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda, iskemik inmelerde, stent uygulaması sonrasında meydana gelen trombozlarda ve diğer aterosklerotik vasküler hastalıklarda kullanılabileceği üzerinde durulmuştur [60, 61].

Kalp yetmezliğinin tedavisinin araştırılmaya başlandığı günden itibaren günümüze kadar çok sayıda fosfodiesteraz III inhibitörü sentezlenmiştir. PDE III inhibitörlerinin vazodilatasyona ve kan basıncında önemli düzeyde azalmaya yol açtığı belirlenmiştir [62]. Silostazol'un kardiyak etkilerinin zayıf olduğu daha çok vasküler düz kaslar üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca anestezi altındaki köpeklerde yapılan bir çalışmada vertebral arterler üzerindeki etkilerinin karotis ve mezenterik

artere kıyasla daha belirgin olduğu gösterilmiştir [63]. Tüm bu sonuçlara dayanarak Silostazol'un akut serebral infarktüs tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Fakat Silostazol'un vasküler düz kas kasılması ve gevşemesi üzerinde hangi mekanizmalar aracılığı ile etki gösterdiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Silostazol potasyum ile indüklenmiş tonik kasılmayı belirgin ölçüde azaltırken, Ca düzeyinde değişikliğe neden olmamıştır. Yine benzer şekilde kafein ile indüklenmiş kontraksiyonu belirgin ölçüde azaltırken Ca düzeyinde değişikliğe neden olmamıştır. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada Silostazol'un kontraktıl proteinlerin Ca'ya karşı olan duyarlılığını azalttığı ve dolayısıyla potasyum veya kafein ile indüklenen kontraksiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [56]. Yine aynı çalışmada histaminin miyofilamanların Ca sensitivitesini artırdığı üzerinde durulmuş ve Silostazol'un histamin varlığında veya yokluğunda Ca sensitivitesini azalttığı gösterilmiştir.

Platelet agregasyonunun serebral tromboz ve geçici iskemik atak gelişmesinde rol oynadığı bilinmektedir [64]. Serebral infarktüs durumunda serebral vazodiladatör ajanların kullanılmasının tedavideki yeri iskemi-perfüzyon hasarı ve intraserebral çalma sendromu gibi nedenlerden ötürü tartışmalıdır [65]. Fakat laküner infarktlarda az da olsa bir perfüzyonun sağlanmasının infarktüsün büyüklüğünün belirlenmesi açısından yararlı olduğu öne sürülmüştür [66]. Bahsedilen minimal perfüzyonun serebral vazodiladatör ajanlarla sağlanması mümkün olabilir. Silostazol'un güçlü anti-platelet etkileri olduğu ve serebral arterlerde vazodilatasyon ortaya çıkardığı göz önüne alındığında rekürren serebral tromboz vakalarında, özellikle laküner infarktüs olan vakalarda, profilaktik olarak faydalı olabileceği ileri sürülebilir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney hayvanlarının temini

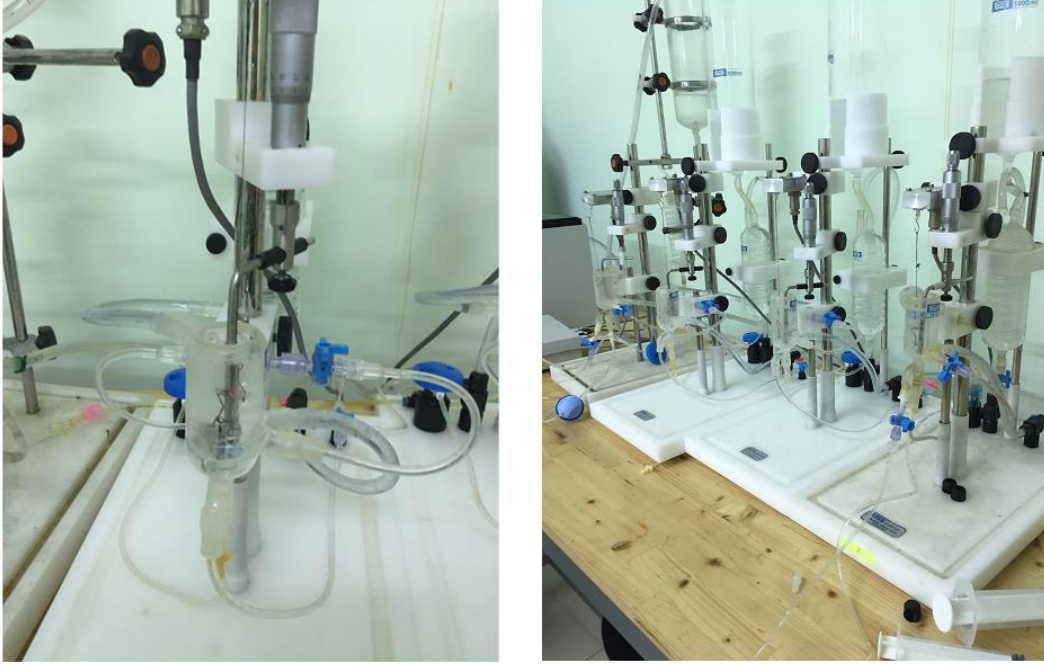
Çalışmamızda ağırlığı 350-450 mg. olan erkek Sprague-Dawley cinsi 48 rat kullanıldı. Hayvanlar kafeslerinde tutularak standart rat yemi ve çeşme suyu ile beslendi. 12 saatlik gece-gündüz ritmi uygulandı. Deney, ratlar 6 gruba ayrılarak (her grupta 8 rat olacak şekilde) Kalp ve Damar Cerrahisi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu ile koordineli olarak 27 Ocak 2015 tarihli 64583101/2015/006 sayılı onayı sonrası yürütülmüştür.

2.2. Organ banyosu kullanımı

Intraperitoneal alfamin ve alfazin anestezisi uygulanarak tüm hayvanların hızlı bir şekilde median sternal yaklaşımla göğüs kafesi açılarak kalp ve akciğerler ayrıldı. Torakal vertebra ile aynı seviyede duran torasik aorta, arkus aorta ile birlikte dikkatli ve hızlı bir şekilde çıkarıldı. Aorta binocular loup (3,5x) kullanılarak üzerindeki yağ ve konnektif dokulardan temizlendikten sonra düzgün kesi ile kesilerek eşit uzunlukta izole aort halkası elde edildi. Bu işlem sırasında endotel dokusuna zarar verilmemeye özen gösterildi. Her bir aort segmenti yaklaşık 3 mm'lik bir ring halinde parçalara bölümlendi. Bu ringler 37°C'de ısıtılan ve sirküle edilen (Isıtıcı ve Sirkulator sistem – May WBC 3044V3), karbojenize (%95 oksijen, %5 karbondioksit= normoksik koşul, %95 azot, %5 karbondioksit= hipoksik koşul) Krebs solusyonuna (118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.22 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25.0 mM NaHCO₃ ve 11.1.mM glukoz, Sigma-Aldrich) zaman geçirilmeden asıldı. Daha önceden tanımlandığı şekilde her bir aort ringi iki adet paslanmaz çelik kancadan geçirilerek 25 ml Krebs solusyonu ile dolu organ banyosuna yerleştirildi (9).

İki çengelin üstte olanı transducer'a (May GTA0303 ve Biopac Systemes Inc. Model MP 100) bağlanarak mg olarak kasılmaları ölçüldü. Bilgisayar programı olarak Acq Knowledge 3.8.2 kullanıldı. Daha sonra her bir aort ringi için standart Equilibrium evresi uygulandı. Burada önce aort ringleri 1 gr. ile gerildikten sonra 10 dk. beklenip, sonra gerilim 2 gr.'a çıkarıldı, 10 dk. beklenip ardından 3 gr.'a çıkarıldı, 10 dk. beklenip 4 gr çıkarıldı ve 10 dakika beklendi. Daha sonra Norepinefrin 10⁻⁴ M

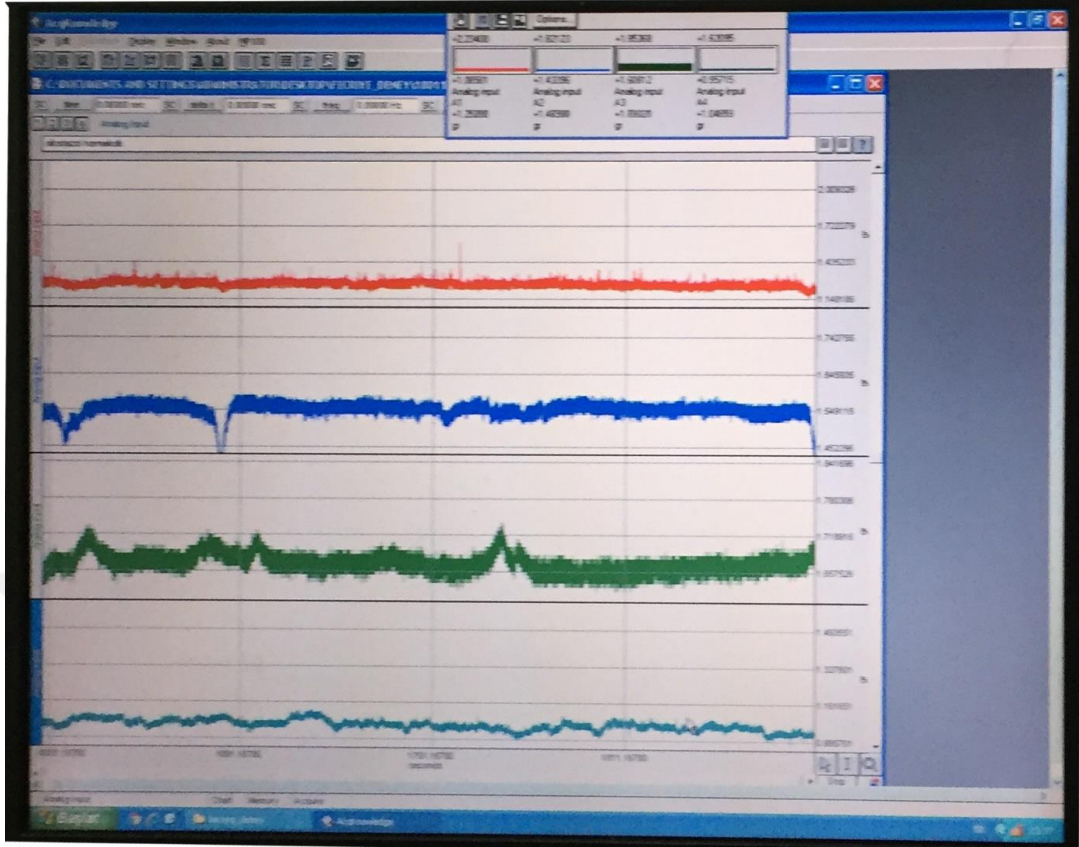
(Molar Konsantrasyon) derişimi banyoya mikropipet yardımı ile 0,1 ml verilerek kasılma yanıtlarına bakıldı.



Resim 1-2. Organ banyosu düzeneđi

Kasılma eğrileri düz seyredince banyo iki kez krebs solusyonu ile yıkandı. Önce Norepinefrin 10^{-4} M derişiminden 0,1 ml ile kasılma eğrisine bakıldı ve daha sonra Asetilkolin 10^{-4} M derişiminden 0,1 ml ile gevşeme yanıtlarına bakıldı. Son olarak banyo tekrar iki kez Krebs solusyonu ile yıkandı ve deneye başlamak için 45 dk beklendi.

Normoksik koşulda karbojenize (%95 oksijen, %5 karbondioksit= normoksik) Krebs solusyonunda (118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.22 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM $CaCl_2$, 25.0 mM $NaHCO_3$ ve 11.1.mM glukoz, Sigma-Aldrich) halkaların 8 tanesi herhangi bir ilaç eklenmeden kasılma ve gevşeme eğrilerine bakıldı, 8 tane halkaya bu ortamda silostazol eklenerek, 8 tane halkaya bu ortama pentoksifilin eklenerek 20 şer dakika beklenerek kasılma gevşeme yanıtlarına bakıldı.



Resim 3. Kasılma yanıtlarının bilgisayar aracılığı ile değerlendirilmesi

Hipoksi ortamı oluşturmak için Krebs-Henseleit solusyonu % 95 N₂-5% CO₂ ile bolancuk şeklinde 20 dakika uyarılarak verildi. Yukarıda sözü edilen hypoxic Krebs çözeltisi aort halkaları 20 dakika karıştırılarak hipoksik koşul sağlandı. Bu ortamda aort halkalarına önce sadece 8 adet halka ilaç eklenmeden daha sonra da silostazol ve pentoksifil ayrı ayrı eklenenerek 20 dakika beklenerek gevşeme ve kasılma eğrilerine bakıldı. Normoksik ve hipoksik koşullarda silostazol ve pentoksifilin eklenen aort halkalarında NO ve iskemik modifiye albumin (İMA) düzeyleri biyokimya laboratuvarında bakılarak karşılaştırma yapıldı.

2.3. Çalışma Grupları

- **Normoksik grup (Grup I, n=8):** Bu gruptaki rat aorta halkaları normoksik koşullarda ki organ banyosuna asılarak kasılma-gevşeme cevabı bakıldı.
- **Silostazol eklenen normoksik grup (Grup II, n=8):** Bu gruptaki rat aorta halkaları normoksik koşullarda ki organ banyosuna asılarak silostazol (DMSO

(Dimethyl sulfoxide) içinde çözülerek) (10 (-6) M-10 (-4) M) etken maddesi eklenerek kasılma-gevşeme cevabı bakıldı.

- **Pentoksifilin eklenen normoksik grup (Grup III, n=8):** Bu gruptaki rat aorta halkaları normoksik koşullarda ki organ banyosuna asılarak pentoksifilin(100microM) etken maddesi eklenerek kasılma-gevşeme cevabı bakıldı.
- **Hipoksik grup (Grup IV, n=8):** Bu gruptaki rat aorta halkaları hipoksik koşullarda (%95 N, %5 CO2 2 gr gerilimle 20 dakika) ki organ banyosuna asılarak kasılma-gevşeme cevabı bakıldı.
- **Silostazol eklenen hipoksik grup (Grup V, n=8):** Bu gruptaki rat aorta halkaları hipoksik koşullarda ki organ banyosuna asılarak silostazol etken maddesi (DMSO (Dimethyl sulfoxide) içinde çözülerek) (10 (-6) M-10 (-4) M) eklenerek kasılma-gevşeme cevabı bakıldı.
- **Pentoksifilin eklenen Hipoksik grup (Grup VI, n=8):** Bu gruptaki rat aorta halkaları hipoksik koşullarda ki organ banyosuna asılarak pentoksifilin etken maddesi (100microM) eklenerek kasılma-gevşeme cevabı bakıldı. Çalışmada normoksik kontrol (grup 1), normoksik silostazol (grup 2), normoksik pentoksifilin (grup 3); hipoksik kontrol (grup 4), hipoksik silostazol (grup 5), hipoksik pentoksifilin (grup 6) olmak üzere gruplara ayrıldı. Daha sonra her bir gruptan elde edilecek sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

2.4. İstatistiksel analizler

Deneyde 48 adet rat kullanıldı. Çalışılan 48 rat aortasının her bir halkası için gevşeme yanıtı gram olarak hesaplandı. Excel tablosu haline getirildi. 48 rat aort halkasında biyokimyasal olarak NO ve IMA değerlerine bakıldı. Çalışmamızda Kruskal – Wallis test, Mann – Whitney Test, T – test lerinden yararlanılmıştır. İstatistik analizlerde $p < 0,05$ ise sonuç anlamlı kabul edilmiştir. İstatistik analizler için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows Release 22 .0, Standard Version paket programı kullanıldı.

3. BULGULAR

Gruplardan elde edilen gevşeme değerleri Tablo I, II, III’de gösterilmiştir.

Tablo I. Kontrol Grubunda Asetilkolinle Endotel Gevşeme Yanıtları Sayısal Verileri

Normoksik grup	Normoksik grup	Hipoksik grup	Hipoksik grup
N1	0,37528gr	N1	0,1242gr
N2	0,14684gr	N2	0,00756gr
N3	0,86744gr	N3	0,01936gr
N4	0,75854gr	N4	0,00682gr
N5	0,33838gr	N5	0,10992gr
N6	0,33838gr	N6	0,63363gr
N7	0,35931gr	N7	0,03227gr
N8	0,86061gr	N8	0,26509gr

Tablo II. Silostazol ile Normoksik ve Hipoksik Ortamda Endotel Gevşeme Yanıtları

Normoksik grup	Normoksik grup	Hipoksik grup	Hipoksik grup
N1	0,2167gr	N1	-0,24172gr
N2	0,11589gr	N2	-0,05809gr
N3	0,14684gr	N3	-0,18417gr
N4	0,11956gr	N4	0,05172gr
N5	0,0515gr	N5	-0,51366gr
N6	0,155138gr	N6	-0,32919gr
N7	0,1296gr	N7	-0,23874gr
N8	0,30389gr	N8	-0,16164gr

Tablo III. Pentoksifilin İle Normoksik ve Hipoksik Ortamda Endotel Gevşeme Yanıtları

Normoksik grup	Normoksik grup	Hipoksik grup	Hipoksik grup
N1	-0,00755gr	N1	-1,01222gr
N2	0,01291gr	N2	-0,11619gr
N3	0,04093gr	N3	-0,65482gr
N4	0,10345gr	N4	-0,53664gr
N5	0,18885gr	N5	-0,48345gr
N6	0,99401gr	N6	-0,38727gr
N7	0,63436gr	N7	-0,7435gr
N8	0,73561	N8	-0,58191gr

Normoksik ortamda asılan aort halkalarında pentoksifilin ve silostazol verilen gruplarda gevşeme yanıtı alındı. Yapılan Kruskal – Wallis test ile endotel üzerinde normoksik ortamda silostazol ile gevşeme yanıtı $p: 0.044$ ($p < 0.05$) anlamlı olarak saptandı. Endotel üzerinde normoksik ortamda pentoksifilin ile elde edilen gevşeme yanıtı ise $p: 0.149$ ($p > 0.05$) olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hipoksik ortamda aort halkalarına silostazol ve pentoksifilin verildi (0.0001 molar dozda). Her bir aort halkasında tablo 3 te görüldüğü gibi kasılma yanıtı alındı, gevşeme yanıtı alınmadı. Yapılan Kruskal – Wallis testinde hipoksik ortamda silostazolün endotel üzerindeki kasılma yanıtı $p: 0,214$ ($p > 0.5$) olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hipoksik ortamda endotel üzerinde pentoksifilin ile görülen kasılma yanıtı $p: 0.000$ ($p < 0.05$) olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Alınan 48 halka -38 dereceye konuldu. Herbir altı gruptaki 8 şer halka da biyokimya laboratuarında NO ve IMA değerleri bakıldı. Normoksik ve hipoksik ortamda NO değerleri anlamlı saptanırken, IMA değerleri anlamlı saptanmadı.

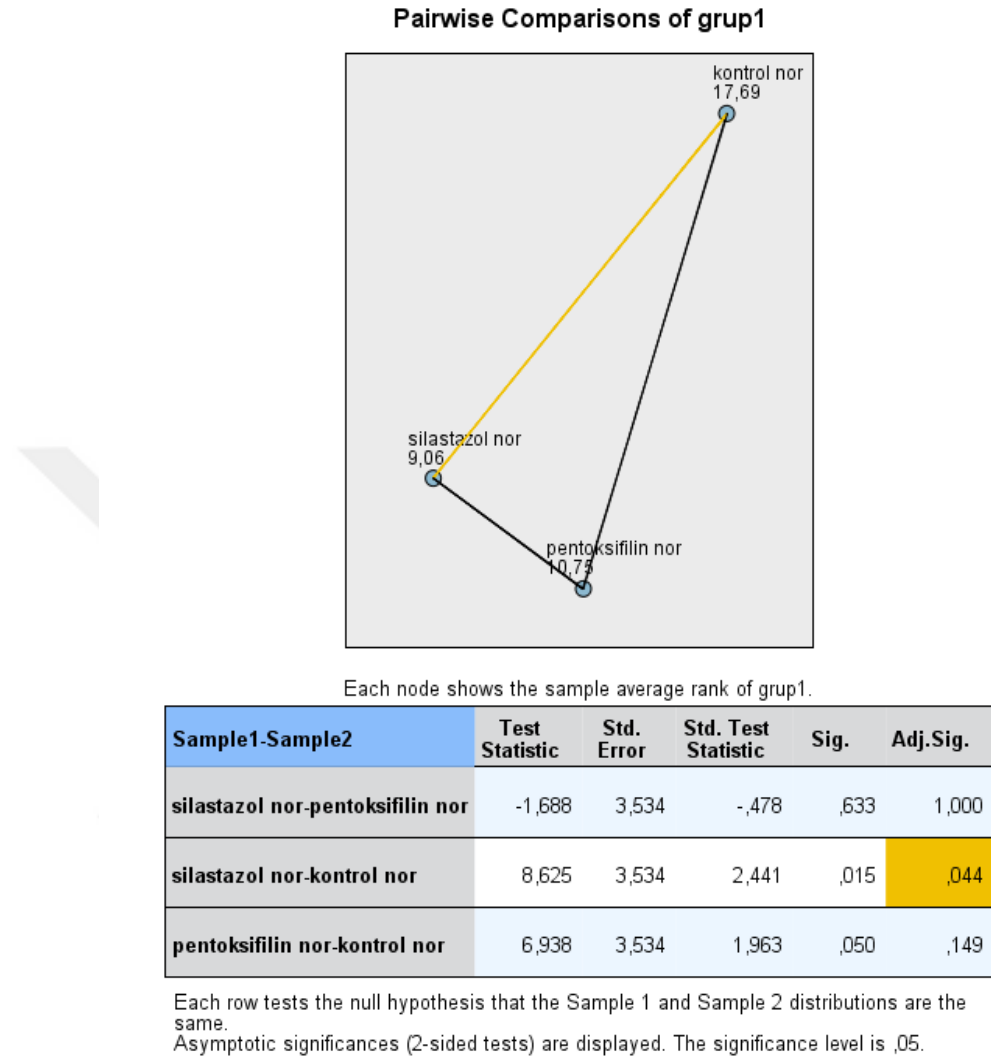
Tablo IV. Normoksik ve hipoksik pentoksifilin ve silostazol gruplarında İMA ve NO değerleri

	N	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
			Lower Bound	Upper Bound		
IMA kontrol	8	125,66105	65,0838	659,3662	48,60	1189,70
nor+sil	8	177,59710	138,8746	978,7754	58,80	1321,10
nor+pen	8	303,55330	356,9230	1792,5020	267,30	2543,40
hip+kontrol	8	78,11503	230,9123	600,3377	98,30	799,10
hip+sil	8	130,98727	332,6768	952,1482	94,70	1259,70
hip+pen	8	91,88424	678,5283	1113,0717	490,70	1226,70
Total	48	74,96461	507,4573	809,0760	48,60	2543,40
NO kontrol	8	12,30478	13,0913	71,2837	3,60	90,40
nor+sil	8	1,07337	1,9244	7,0006	1,30	10,90
nor+pen	8	45,20697	37,3775	251,1725	31,80	421,40
hip+kontrol	8	28,33196	98,1556	232,1444	47,50	269,80
hip+sil	8	32,10630	42,6932	194,5318	3,80	254,20
hip+pen	8	78,36100	75,5682	446,1568	55,30	738,20
Total	48	20,02009	82,3164	162,8669	1,30	738,20

Test of Homogeneity of Variances

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IMA Between Groups	3092038,904	5	618407,781	2,709	,033
Within Groups	9585988,663	42	228237,825		
Total	12678027,567	47			
NO Between Groups	334682,927	5	66936,585	4,936	,001
Within Groups	569530,690	42	13560,255		
Total	904213,617	47			

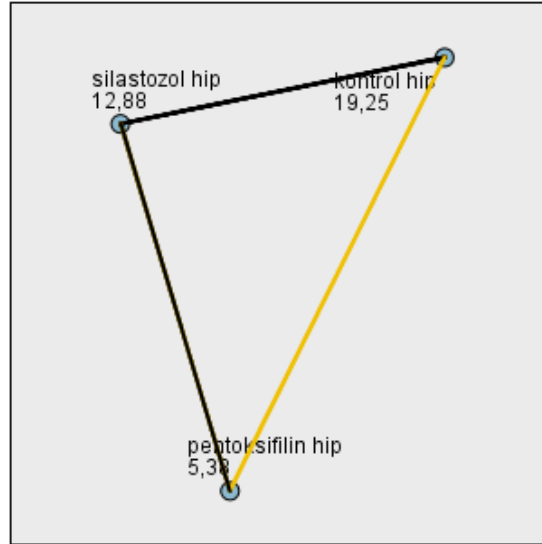
Tablo V. Normoksik koşullarda silostazol ve pentoksifilin gevfeme yanıtları



Normoksik ortamda bakılan aort halkalarında NO değeri silastazol verilen halkalarda NO değeri normoksik ortamdaki halkalara göre düşük saptandı. Silostazol verilen gruptaki bu NO değeriindeki düşme anlamlı olarak saptandı. Hipoksik ortamda pentoksifilin verilen gruptaki aort halkalarında NO değeri artma saptandı ve bu artma anlamlı olarak bulundu.

Tablo VI. Hipoksik koşullarda pentoksifilin ve silostazol gevşeme yanıtları

Pairwise Comparisons of grup1



Each node shows the sample average rank of grup1.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
pentoksifilin hip-silastazol hip	7,500	3,536	2,121	,034	,102
pentoksifilin hip-kontrol hip	13,875	3,536	3,924	,000	,000
silastazol hip-kontrol hip	6,375	3,536	1,803	,071	,214

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.

Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

4. TARTIŞMA

Periferik arter hastalığı olan kişilerde intermittan kladikasyo görülebileceği gibi, hastalık herhangi bir bulgu vermeden de ilerleyebilir. Semptomatik veya asemptomatik olan PAH hastalarında miyokard infarktüsü, inme ve kardiyovasküler olay geçirme sıklığı artış göstermiştir. Bu hastalarda tedaviye yaklaşımda 2 yöntem söz konusudur (1) sadece medikal tedavi (silostazol) ya da perkutan veya cerrahi girişimlerle hastaların semptomlarını azaltmak, (2) daha geniş bir müdahale programı ile yaşam tarzı değişikliği yapmak (sigaranın bırakılması, egzersiz, kan basıncının kontrol altında tutulması, LDL düzeylerinin istenilen aralığa getirilmesi, antiplatelet tedavi ve kan şekerinin kontrol altına alınması).

Endotel tabakası sadece damarın iç yüzünü kaplayan yarı geçirgen bir tabaka değildir, aynı zamanda salgıladığı mediatörler aracılığı ile hemostazda önemli bir rol üstlenmektedir. Hemostazın sağlanmasında gerekli olan damar düz kaslarının kasılması için gerekli olan mediatörler, antikoagülasyon, fibrinolitik ve antitrombotik özellikler gibi bütün yaşamsal işlevler endotel fonksiyonu içerisinde yer alır. Tüm bu basamaklarda meydana gelebilecek bozukluklar endotel hücrelerinin fonksiyon görememesine yani endotel disfonksiyonu ile sonuçlanabilir. Endotel hücresinden salınan mediatörler hemen altındaki vasküler düz kasları uyarak vazodiladatör veya vazokonstriktör etki ortaya çıkartabilir. Bu etkiler normal hemostazın sağlanması için gereklidir. Dolayısıyla endotel disfonksiyonuna yol açan nedenlerin ortadan kaldırılması normal fizyolojik süreçlerin devamını sağlayabilir. Endotelden salınan mediatörlerin vasküler düz kasları uyarma mekanizmaları da yine periferik arter hastalıklarının tedavisinde önemli bir hedeftir.

Silostazol bir fosfoesteraz 3 inhibitörüdür. Silostazol, hücre fonksiyonunu düzenleyen trombosit agregasyonunu inhibe eder tromboz önler vasküler düz kas gevşetici, hücre çoğalmasını inhibe eden ve kan lipid seviyesini düzenleyen hücre içi cAMP konsantrasyonunda bir artış ile birlikte PDE-3 aktivitesini inhibe edebilmektedir. Apoptoz indükleyen faktörü (AIF) sinir hücresi ölümü ile bağlantılıdır. Poli ADP-riboz polimeraz aşırı aktivasyonu (PARP), kromatin yoğunlaşması, DNA fragmanları ile, hücre çekirdeğine mitokondri arasında AIF salınmasını tetikler mitokondri nükleer

sinyali gönderir. Silostazol serebral iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkileri vardır ve koruyucu etkileri PARP inhibisyonu ile sağlar [49].

Pentoksifilin, periferik damar hastalığı tedavisinde hemoreolojik madde olarak kullanılan bir siklik AMP fosfodiesteraz inhibitörüdür. Pentoksifilin kan viskozitesini azaltarak kan akışını kolaylaştırır. Fosfodiesteraz enzimi inhibisyonu sayesinde eritrositlerin esnekliğini artırır, cAMP düzeyini yükseltir. Bu etkileri sayesinde trombosit agregasyonunu da azaltmaktadır. Pentoksifilin 5'nükleotidaz enzimini inhibe ederek dokuda adenozintrifosfat kaybını azaltmakta, iskemi dönemi ve sonrasında doku enerji tüketimini minimumda tutarak hücre hasarını engellemektedir. Pentoksifilin eritrositlerin esnekliklerinin artırır ve kanın akışkanlığını artırır. Pentoksifilinin siklik adenozinmonofosfat fosfodiesterazını inhibe ederek siklik adenozinmonofosfat düzeyini artırır. Bu sayede eritrositlerin esnekliği artar. Esnekliğin artması özellikle kapiller bölgede kan akımının rahat sağlanmasına yardımcı olur.

Bu çalışmada 48 rat kullanılmıştır. Denekler her bir grupta 8 adet rat olacak şekilde 6 eşit gruba ayrılmıştır. Ratların aortalarını endotele hasar vermemeye dikkat edilerek çıkartılmıştır. Deney aşamasına geçmeden önce rat aortaların endotelinin sağlam olduğunu asetilkolin ile aldığımız gevşeme yanıtı ile gösterilmiştir. Asetilkolin ile gevşeme yanıtı alınan aort halkalarını deneyimize dahil edilmiş, gevşeme yanıtı alınamayan aort halkalarını deneye dahil edilmemiştir.

Normoksik ortamda aort halkalarına in vitro olarak 10-4 molar dozdan silostazol ve pentoksifilin eklenerek sonuçlar değerlendirildi. Silostazol ve pentoksifilin verilen her iki grupta gevşeme yanıtı alındı. Ancak sadece silostazol ile alınan gevşeme yanıtı ($p < 0.05$) anlamlı olarak saptandı.

Hipoksik ortamda deneylerde deneylere başlamadan önce her bir aort halkasındaki endotel hasarının tespiti için normoksik ortamda asetil kolin ile gevşeme yanıtı alınan halkalar deneye alındı. Her bir halka 20 dakika hipoksik krebs bekletildi. Daha sonra 10-4 molar dozda silostazol ve pentoksifilin eklenerek gevşeme yanıtı alınıp alınmadığına bakıldı. Hem silostazol ile hem pentoksifilinle kasılma yanıtı alındı ve her iki gruptan da gevşeme yanıtı alınmadı. Ancak bu kasılma yanıtı sadece pentoksifilin için ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

Çalışılan 48 halka -38 derecede bekletildi. Gruplar biyokimya laboratuvarında bekletildi. Yapılan biyokimyasal çalışma ile her bir halkada İMA ve NO değerleri bakıldı. İMA değerlerinde her bir grup için anlamlı bir fark görülmedi. NO ise normoksik sillostazol grubunda düzeyi anlamlı olarak ($p<0.05$) düşük saptanırken hipoksik pentoksifilin grubunda anlamlı olarak yüksek saptandı.

Sıçan torasik aortasında fosfodiesteraz 3 inhibitörü olan silostazolün endotel üzerinde gevşeme yanıtı adlı çalışmada Silostazol konsantrasyona bağımlı bir şekilde fenilefrin ile torasik aorta gevşeme neden olmuştur [49]. Konsantrasyona bağımlı gevşeme Bu gevşemenin endotele kısmen bağımlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada silostazol verilen sıçanlarda nitrit idrar atılımı, NO istikrarlı bir metaboliti ve aort halka NO bazal üretimi silostazol almayan sıçan grubuna göre anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Bu bulgular Silostazol ile indüklenen damar genişlemesi sıçan torasik aort aortik endotel hücrelerinden serbest endotel NO bağımlı olarak saptanmıştır.

Pentoksifilin rat aortasında endotel üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada pentoksifilin endotelyum-ilişkili gevşeme faktörü (EDRF) ile etkileştiği, vazodilatör etkisini bu sayede ortaya çıkardığı, ancak bu damar genişletici özelliğin önemsiz olduğu saptanmıştır [25]. Yine benzer şekilde; rat aortası üzerinde oxpentifylline ve teofilin vazodilatör etkileri adlı çalışmada oxpentifylline vasküler düz kas fosfodiesteraz üzerinde inhibe edici bir etki için hem birinci hem de muhtemelen endotel kaynaklı gevşeme faktörü aracılık etmekte olduğu saptanmıştır [67].

Pentoksifilin travma ve hemorajik şokta endotel hücre fonksiyonu ve damar kas kasılması üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise, pentoksifilin endothelium kaynaklı nitrik oksid üretiminde kaynaklı azalmaya neden olduğu; aynı zamanda düz kas kasılma fonksiyonu üzerinde inhibisyon oluşturduğu saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda normoksik ortamda aort halkalarında silostazol ve pentoksifilinle gevşeme yanıtı alındı. Silostazol ile alınan gevşeme yanıtında $p<0.05$ saptandı ve anlamlı olarak kabul edildi. Hipoksik ortamda silostazol ve pentoksifilin ile kasılma yanıtı alındı. Pentoksifilin ile olan kasılma $p < 0.05$ anlamlı olarak bulundu. Dokuda bakılan NO değerlerinde de aynı şekilde normoksik ortamda silostazol verilen grupta NO düşük $p<0.05$ saptandı. Hipoksik koşullarda pentoksifilin verilen grupta NO değerlerinde artış $P < 0.05$ olarak saptandı.

Pentoksifilin vazodilatör etkilerinin endotelyum kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) ile ilişkili olduğu, bu faktörden bağımsız olan koşullarda zayıf bir vazorelaksan etki elde edildiği gösterilmiştir [67]. Oxpentifylline vasküler düz kasta fosfodiesteraz üzerinde inhibisyon oluşturarak hem EDRF ile ilişkili hem de bağımsız olarak bir gevşeme oluşturabilir [68].

Yapılan önceki çalışmalarda silostazolün vazodilatör etkileri araştırılmıştır [49]. Silostazolün konsantrasyona bağımlı olarak önceden fenilefrin verilen torasik aortalarda gevşeme meydana getirdiği gösterilmiştir. Konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtının elde edildiği çalışmada yanıtın kısmen endotel ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada silostazol ile indüklenen vazodilatasyonun endotel kaynaklı nitrik okside bağımlı olduğu gösterilmiştir.

5. SONUÇ

Çalışmamızda silostazol ve pentoksifilin verilen her iki grupta normoksik ortamda gevşeme yanıtı alındı. Ancak sadece silostazol ile alınan gevşeme yanıtı ($p < 0.05$) anlamlı olarak saptandı. Hipoksik koşullarda hem silostazol ile hem pentoksifilinle kasılma yanıtı alındı ve her iki gruptan da gevşeme yanıtı alınmadı. Ancak bu kasılma yanıtı pentoksifilin için ($p < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi. Sonuç olarak hem pentoksifilin hem de silostazolün ratlarda in - vitro koşullar altında aortada vazodilatasyon meydana getirdiği saptanmıştır. Silostazol ile alınan yanıtın istatistiksel olarak anlamlı bulunması buna karşın pentoksifilin ile alınan yanıtın anlamlı bulunmaması silostazolün vazodilatasyon açısından daha potent bir etki ortaya çıkardığına işaret etmektedir.

ÖZET

Giriş ve Amaç

Dolaşım bozukluğu ile karakterize pek çok hastalığın patofizyolojisinde vazokonstriksiyon ve buna bağlı meydana gelen perfüzyon bozukluklarının neden olduğu sonuçlar yer almaktadır. Endotelden salınan mediatörler, bu mediatörlerin salınımında meydana gelen bozukluklar periferik arter hastalığı gelişmesinde rol oynamaktadır. Pentoksifilin ve silostazol sahip oldukları vazodilatör ve antikoagülan etkilerinden dolayı iskemik hastalıklarda, periferik arter hastalıkların ve sepsis gibi pek çok geniş alanda kullanılmaktadır. Bu çalışmada silostazol ve pentoksifilinin ratlarda in-vitro ortamda kasılma yanıtlarına olan etkileri değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda ağırlığı 350-450 mg. olan erkek Sprague-Dawley cinsi 48 rat kullanıldı. Ratlar 6 gruba ayrıldı. Her bir aort segmenti yaklaşık 3 mm'lik bir ring halinde kesildi. Krebs solusyonuna zaman geçirilmeden asıldı İki çengelin üstte olanı transducer'a bağlanarak mg olarak kasılmaları ölçüldü. Daha sonra her bir aort ringi için standart Equilibrium evresi uygulandı. Normoksik koşulda karbojenize krebs solusyonunda halkaların 8 tanesi herhangi bir ilaç eklenmeden kasılma ve gevşeme eğrilerine bakıldı , 8 tane halkaya bu ortamda silostazol eklenerek , 8 tane halkaya bu ortama pentoksifilin eklenerek 20 şer dakika beklenerek kasılma gevşeme yanıtlarına bakıldı. Hipoksik koşulda 24 halka 20 dakika bekletildikten sonra karbojenize krebs solusyonunda halkaların 8 tanesi herhangi bir ilaç eklenmeden kasılma ve gevşeme eğrilerine bakıldı, 8 tane halkaya bu ortamda silostazol eklenerek, 8 tane halkaya bu ortama pentoksifilin eklenerek 20 şer dakika beklenerek kasılma gevşeme yanıtlarına bakıldı.

Bulgular

Normoksik ortamda asılan aort halkalarında pentoksifilin ve silostazol verilen gruplarda gevşeme yanıtı alındı. Yapılan Kruskal – Wallis test ile endotel üzerinde normoksik ortamda silostazol ile gevşeme yanıtı $p: 0.044$ ($p<0.05$) anlamlı olarak saptandı. Ancak endotel üzerinde normoksik ortamda pentoksifilin ile olan

gevşeme yanıtı $p:0.149$ ($p >0.05$) anlamlı saptanmadı. Hipoksik ortamda silostazolün endotel üzerindeki kasılma yanıtı $p: 0,214$ ($p>0.5$) anlamsız olarak saptandı. Hipoksik ortamda endotel üzerinde pentoksifilin ile görülen kasılma yanıtı $p:0.000$ ($p< 0.05$) anlamlı olarak saptandı. Normoksik ortamda bakılan aort halkalarında NO değerinde silostazol verilen halkalarda NO değeri normoksik ortamdaki halkalara göre düşük saptandı. Silostazol verilen gruptaki bu NO değerindeki düşme anlamlı olarak saptandı. Hipoksik ortamda pentoksilin verilen gruptaki aort halkalarında NO değerinde artma saptandı ve bu artma anlamlı olarak bulundu.

Sonuç

Çalışmamızda normoksik ortamda silostazol ve pentoksifilin verilen her iki grupta da gevşeme yanıtı alındı. Ancak sadece silostazol ile alınan gevşeme yanıtı ($p <0.05$) anlamlı olarak saptandı. Hipoksik ortamda hem silostazol ile hem pentoksifilinle kasılma yanıtı alındı ve her iki gruptan da gevşeme yanıtı alınmadı. Ancak bu kasılma yanıtı pentoksifilin için ($p<0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

SUMMARY

Aim

The results of vasoconstriction in the pathophysiology of many diseases characterized by circulatory disturbances and consequent perfusion defects due to this disorder. Endothelium-releasing mediators, disorders that occur in the release of these mediators play a role in the development of peripheral artery disease. Because of the vasodilators and anticoagulant effects they have, pentoxifylline and cilostazol are used in a wide range of ischemic diseases, including peripheral arterial diseases and sepsis. In this study, the effects of cilostazol and pentoxifylline on contractile responses in vitro in rats were evaluated.

Materials And Method

The weight of our study is 350-450 mg. 48 male Sprague-Dawley rats were used. The rats were divided into 6 groups. Each aortic segment was cut into a 3 mm ring. The Krebs solution was suspended without time. The two hooks were attached to the transducer at the top to measure the contractions in mg. The standard Equilibrium phase was then applied to each aortic ring. In normoxic condition, 8 of the rings were examined for contraction and relaxation curves without adding any drug. Cilostazol was added to the 8 rings in this ring and the relaxation responses of the rings were evaluated by adding 20% of the pentoxifylline to 8 rings. Twenty-four rings in hypoxic condition were allowed to stand for 20 minutes, then 8 of the rings were examined for contraction and relaxation curves without the addition of any drug. Cilostazol was added to the 8 rings in this carbonized krebs solution and the relaxation responses were evaluated by adding 20 pounds of pentoxifylline to 8 rings.

Results

Relaxation responses were obtained in groups of pentoxifylline and cilostazol in the aortic rings hanging in normoxic environment. In the normoxic medium on the endothelium, the relaxation response with cilostazol was significantly ($p: 0.044$) ($p < 0.05$). However, the relaxation response with pentoxifylline on the endothelium in the normoxic medium was not significant ($p: 0.149$, $p > 0.05$). In the hypoxic

environment, the response of the cilostazol on the endothelium was $p: 0.214$ ($p > 0.5$). Concentration of pentoxifylline on the endothelium in the hypoxic environment was 0.000 ($p < 0.05$) significant. The NO value of the aortic ring in the normoxic environment was lower than that in the normoxic environment. The decrease in this NO value in the cilostazol-administered group was significantly determined. An increase in NO was detected in the aortic ring in the pentoxifylline-treated group in the hypoxic environment, and this increase was significant.

Conclusion

In our study, relaxation response was obtained in both groups given cilostazol and pentoxifylline in normoxic environment. However, only relaxation response with cilostazol ($p < 0.05$) was found to be significant. In the hypoxic environment, cilostazol and pentoxifylline were used to induce the contractile response and no relaxation response was obtained from both groups. However, this contraction response was considered significant for pentoxifylline ($p < 0.05$).

KAYNAKLAR

1. Petty, R.G. and J.D. Pearson, *Endothelium--the axis of vascular health and disease*. J R Coll Physicians Lond, 1989. 23 (2): p. 92-102.
2. Weintraub, W.S., *The vascular effects of cilostazol*. Can J Cardiol, 2006. 22 Suppl B: p. 56B-60B.
3. Ahn, C.M., et al., *Cilostazol reduces the progression of carotid intima-media thickness without increasing the risk of bleeding in patients with acute coronary syndrome during a 2-year follow-up*. Heart Vessels, 2011. 26 (5): p. 502-10.
4. Hankey, G.J., *Cilostazol shows promise as an alternative to aspirin for patients with ischaemic stroke*. Lancet Neurol, 2008. 7 (6): p. 469-70.
5. Huang, Y., et al., *Cilostazol as an alternative to aspirin after ischaemic stroke: a randomised, double-blind, pilot study*. Lancet Neurol, 2008. 7(6): p. 494-9.
6. Kai, Y., et al., *Cilostazol improves symptomatic intracranial artery stenosis - Evaluation of cerebral blood flow with single photon emission computed tomography*. Surg Neurol Int, 2011. 2: p. 8.
7. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. 323(1): p. 27-36.
8. Loscalzo, J., *Nitric oxide and vascular disease*. N Engl J Med, 1995. 333 (4): p. 251-3.
9. Anderson, T.J., *Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans*. J Am Coll Cardiol, 1999. 34 (3): p. 631-8.
10. Murad, F., *Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling*. Biosci Rep, 1999. 19 (3): p. 133-54.
11. Ignarro, L.J., *Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990. 30: p. 535-60.
12. Tamir, S., et al., *DNA damage and genotoxicity by nitric oxide*. Methods Enzymol, 1996. 269: p. 230-43.
13. Klabunde, R.E., *Cardiovascular physiology concepts*. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ix, 235 p.

14. Fryer, A.D., A. Christopoulos, and N. M. Nathanson, *Muscarinic receptors*. Handbook of experimental pharmacology,. 2012, Heidelberg: Springer. xiii, 499 p.
15. Weiss, B. and W.N. Hait, *Selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors as potential therapeutic agents*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1977. 17: p. 441-77.
16. Wu, C.C., et al., *Pentoxifylline improves circulatory failure and survival in murine models of endotoxaemia*. Eur J Pharmacol, 1999. 373 (1): p. 41-9.
17. Strano, A., et al., *Double-blind, crossover study of the clinical efficacy and the hemorheological effects of pentoxifylline in patients with occlusive arterial disease of the lower limbs*. Angiology, 1984. 35 (7): p. 459-66.
18. Lee, K.S., et al., *Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity*. Am J Physiol, 1997. 273 (5 Pt 1): p. G1094-100.
19. Dökmeci, İ., *Farmakoloji ilaç uygulamaları*. 1992, İstanbul: Nobel Kitap Evleri.
20. Gomez-Cambronero, L., et al., *Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. 293(2): p. 670-6.
21. Olszanski, D.A., et al., *Precursor trapping: a "neonatal" mechanism of myocardial protection*. J Surg Res, 1993. 54 (6): p. 539-44.
22. Cain, B.S., et al., *Adenosine reduces cardiac TNF-alpha production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion*. J Surg Res, 1998. 76 (2): p. 117-23.
23. Sawa, Y., et al., *Attenuation of cardiopulmonary bypass-derived inflammatory reactions reduces myocardial reperfusion injury in cardiac operations*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996. 111 (1): p. 29-35.
24. Sullivan, G.W., et al., *Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline*. Infect Immun, 1988. 56 (7): p. 1722-9.
25. Berkenboom, G., et al., *Prevention of cyclosporine A-induced vascular toxicity by pentoxifylline*. J Cardiovasc Pharmacol, 1991. 18 (5): p. 761-8.
26. McDonald, R.J., *Pentoxifylline reduces injury to isolated lungs perfused with human neutrophils*. Am Rev Respir Dis, 1991. 144 (6): p. 1347-50.

27. Reignier, J., et al., *Reduction of ischemia-reperfusion injury by pentoxifylline in the isolated rat lung. Paris-Sud University Lung Transplantation Group.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. 150 (2): p. 342-7.
28. Yamashita, M., et al., *Pentoxifylline in flush solution improves early lung allograft function.* Ann Thorac Surg, 1996. 61(4): p. 1055-61.
29. Samlaska, C.P. and E. A. Winfield, *Pentoxifylline.* J Am Acad Dermatol, 1994. 30 (4): p. 603-21.
30. Shukla, V.K., et al., *Pentoxifylline in perforated peritonitis: results of a randomised, placebo controlled trial.* Eur J Surg, 2001. 167 (8): p. 622-4.
31. Sneed, R.A., et al., *Pentoxifylline attenuates bacterial lipopolysaccharide-induced enhancement of allyl alcohol hepatotoxicity.* Toxicol Sci, 2000. 56(1): p. 203-10.
32. Freitas, J.P., P. Filipe, and F. Guerra Rodrigo, *[Potential antioxidative effects of pentoxifylline].* C R Seances Soc Biol Fil, 1995. 189 (3): p. 401-5.
33. Sener, G., et al., *The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury.* Fundam Clin Pharmacol, 2001. 15 (1): p. 19-22.
34. Sulkowska, M., S. Sulkowski, and E. Skrzydlewska, *The effect of pentoxifylline on ultrastructure and antioxidant potential during cyclophosphamide-induced liver injury.* J Submicrosc Cytol Pathol, 1999. 31 (3): p. 413-22.
35. Viladkar, A., et al., *Amelioration of doxorubicin resistance by pentoxifylline in human chronic myeloid leukemia cells in vitro.* Sel Cancer Ther, 1991. 7 (3): p. 119-26.
36. Kayaalp, O., *Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar.* 2005, Ankara: Tıbbi Farmakoloji.
37. Yasuda, K., M. Sakuma, and T. Tanabe, *Hemodynamic effect of cilostazol on increasing peripheral blood flow in arteriosclerosis obliterans.* Arzneimittelforschung, 1985. 35 (7A): p. 1198-200.
38. Schror, K., *The pharmacology of cilostazol.* Diabetes Obes Metab, 2002. 4 Suppl 2: p. S14-9.

39. Liu, Y., et al., *Inhibition of adenosine uptake and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. 36 (3): p. 351-60.
40. Chapman, T.M. and K.L. Goa, *Cilostazol: a review of its use in intermittent claudication*. Am J Cardiovasc Drugs, 2003. 3 (2): p. 117-38.
41. Minami, N., et al., *Inhibition of shear stress-induced platelet aggregation by cilostazol, a specific inhibitor of cGMP-inhibited phosphodiesterase, in vitro and ex vivo*. Life Sci, 1997. 61 (25): p. PL 383-9.
42. Kohda, N., et al., *Effect of cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on experimental thrombosis in the porcine carotid artery*. Thromb Res, 1999. 96 (4): p. 261-8.
43. da Rosa, M.P., G.V. Baroni, and V.L. Portal, *Cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor: future perspectives in atherosclerosis*. Arq Bras Cardiol, 2006. 87(5): p. e222-6.
44. Onoda, K., et al., *Inhibition of platelet aggregation by combined therapy with aspirin and cilostazol after off-pump coronary artery bypass surgery*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2008. 14 (4): p. 230-7.
45. Igawa, T., et al., *Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells*. Thromb Res, 1990. 57 (4): p. 617-23.
46. Cleanthis, M., et al., *Combined aspirin and cilostazol treatment is associated with reduced platelet aggregation and prevention of exercise-induced platelet activation*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2009. 37 (5): p. 604-10.
47. Iwamoto, T., et al., *Recovery of platelet function after withdrawal of cilostazol administered orally for a long period*. J Atheroscler Thromb, 2003. 10 (6): p. 348-54.
48. Kariyazono, H., et al., *Inhibition of platelet aggregation and the release of P-selectin from platelets by cilostazol*. Thromb Res, 2001. 101 (6): p. 445-53.
49. Nakamura, T., et al., *Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta*. Life Sci, 2001. 69 (15): p. 1709-15.

50. Tanaka, T., et al., *Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle*. Pharmacology, 1988. 36 (5): p. 313-20.
51. Ohashi, S., et al., *Thermographic evaluation of the hemodynamic effect of the antithrombotic drug cilostazol in peripheral arterial occlusion*. Arzneimittelforschung, 1985. 35 (7A): p. 1203-8.
52. Cone, J., et al., *Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. 34 (4): p. 497-504.
53. Becker, R.W., et al., *Effects of cilostazol on human venous smooth muscle*. Ann Vasc Surg, 2005. 19 (3): p. 393-7.
54. Thompson, P.D., et al., *Meta-analysis of results from eight randomized, placebo-controlled trials on the effect of cilostazol on patients with intermittent claudication*. Am J Cardiol, 2002. 90 (12): p. 1314-9.
55. Nakamura, K., F. Ikomi, and T. Ohhashi, *Cilostazol, an inhibitor of type 3 phosphodiesterase, produces endothelium-independent vasodilation in pressurized rabbit cerebral penetrating arterioles*. J Vasc Res, 2006. 43 (1): p. 86-94.
56. Shiraishi, Y., Y. Kanmura, and T. Itoh, *Effect of cilostazol, a phosphodiesterase type III inhibitor, on histamine-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ and force in middle cerebral artery of the rabbit*. Br J Pharmacol, 1998. 123 (5): p. 869-78.
57. Kawanabe, Y. and S.M. Nauli, *Involvement of extracellular Ca^{2+} influx through voltage-independent Ca^{2+} channels in endothelin-1 function*. Cell Signal, 2005. 17 (8): p. 911-6.
58. Kawanabe, Y. and S.M. Nauli, *Endothelin*. Cell Mol Life Sci, 2011. 68 (2): p. 195-203.
59. Kawanabe, Y., et al., *Cilostazol prevents endothelin-induced smooth muscle constriction and proliferation*. PLoS One, 2012. 7 (9): p. e44476.
60. Al-Qudah, Z.A., A.E. Hassan, and A.I. Qureshi, *Cilostazol in patients with ischemic stroke*. Expert Opin Pharmacother, 2011. 12 (8): p. 1305-1315.
61. Sallustio, F., et al., *Cilostazol in the management of atherosclerosis*. Curr Vasc Pharmacol, 2010. 8 (3): p. 363-72.

62. Polson, J.B. and S.J. Strada, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. 36: p. 403-27.
63. Kimura, Y., et al., *Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis*. Arzneimittelforschung, 1985. 35 (7A): p. 1144-9.
64. Uchiyama, S., et al., *Platelet function tests in thrombotic cerebrovascular disorders*. Stroke, 1983. 14 (4): p. 511-7.
65. Capon, A., et al., *Action of vasodilators on regional cerebral blood flow in subacute or chronic cerebral ischemia*. Stroke, 1977. 8 (1): p. 25-9.
66. Baron, J.C., et al., *Comparison study of CT and positron emission tomographic data in recent cerebral infarction*. AJNR Am J Neuroradiol, 1983. 4 (3): p. 536-40.
67. Marukawa, S., et al., *Vasorelaxant effects of oxpentifylline and theophylline on rat isolated aorta*. J Pharm Pharmacol, 1994. 46 (5): p. 342-5.
68. Wang, P., et al., *Pentoxifylline attenuates the depressed endothelial cell function and vascular muscle contractility following trauma and hemorrhagic shock*. J Trauma, 1995. 39 (1): p. 121-6; discussion 126-7.
69. Ba, X.H., L.P. Cai, and W. Han, *Effect of cilostazol pretreatment on the PARP/AIF-mediated apoptotic pathway in rat cerebral ischemia-reperfusion models*. Exp Ther Med, 2014. 7 (5): p. 1209-1214.