

T.C

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KALP ve DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**YENİ NESİL ORAL ANTİKOAGÜLANLARIN  
SIÇANLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ  
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR.EMİN BARBARUS

TEZ DANIŞMANI

DR.ÖĞR.ÜYESİ SELİM DURMAZ

**AYDIN-2019**

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

**YENİ NESİL ORAL ANTİKOAGÜLANLARIN  
SIÇANLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ  
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR.EMİN BARBARUS

TEZ DANIŞMANI

DR.ÖĞR.ÜYESİ SELİM DURMAZ

**AYDIN-2019**

Bu araştırma ADÜ BAP Tarafından TPF-18060 sayı ile desteklenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu uzmanlık eğitimi süresince klinik bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, bu süreçte etik olarak ta değerlerini bize aktaran hocalarım Prof.Dr. Erdem Ali ÖZKISACIK, Prof. Dr. Berent DİŞCİGİL, Prof.Dr. Uğur GÜRCÜN, Prof.Dr. Muharrem İsmail BADAĞ, Prof. Dr. Mehmet BOĞA ve Doç.Dr. Tünay KURTOĞLU'na

Tez danışmanım olan ve asistanlık sürecinde hocalık kadar ağabeylik de yapan Dr. Öğr. Üyesi Selim DURMAZ'a

Çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen Prof.Dr. Canten TATAROĞLU, Dr.Öğr. Üyesi Mustafa YILMAZ, Dr. Esin YİĞİTBAŞI ve Dr. Ferhat YILDIZ'a

Yaklaşık beş yıldır birlikte çalıştığımız her zaman dostluklarını göstermiş olan Dr. Muhammet Hüseyin ERKAN ve Dr. Ömer Faruk RAHMAN ile tüm asistan arkadaşlarıma

Görev sürecim boyunca gece gündüz beraber çalıştığımız tüm hemşire, perfüzyonist ve diğer sağlık personeli arkadaşlarıma

Bu süreçte benim hep yanımda olan bugünlere gelmemde çok şey borçlu olduğum başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme

Sevgisi, sabrı ve ilgisiyle hep yanımda olan bu zor ve yoğun günlerimi güzelleştiren eşim Dr. Ezgi BARBARUS'a ve sonradan gelip hayatımıza neşe katan oğlumuz Giray BARBARUS'a

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar; teşekkür ederim

Dr.Emin BARBARUS

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO DİZİNİ	iii
ŞEKİL DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
RESİM DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 İskemi	2
2.2 İskemi Reperfüzyon Hasarı	7
2.2.1 Serbest Oksijen Radikalleri	8
2.2.2 Enflamasyon	14
2.2.3 Mitokondriyal Hasar	21
2.3 Radikallere Karşı Savunma Sistemleri	22
2.4 Antikoagülanlar ve İskemi Reperfüzyon Hasarı	24
2.5 Apiksaban	25
2.6 Dabigatran	28
2.7 Rivaroksaban	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1 Araştırmanın Tipi	36
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	36
3.3 Etik Kurul Onayı	36
3.4 Kullanılan Deney Materyali	36
3.5 Deney Grupları ve Uygulama Protokolü	36
3.5.1 İlaçların Hazırlanması	37
3.5.2 Cerrahi Yöntem	38
3.6 Biyokimyasal Analiz	41
3.6.1 Kan Örnekleri	41

3.6.2 Doku Örnekleri	41
3.7 Kas Dokularının Histopatolojik İncelemesi	42
3.8 İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1 Biyokimyasal Bulgular	44
4.2 Patolojik Bulgular	54
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
7. ÖZET	66
8. ABSTRACT	67
9. KAYNAKLAR	68

## TABLO DİZİNİ

Tablo I:	Reaktif oksijen bileşikleri
Tablo II:	Proinflamatuvar ve Antienflamatuvar sinyaller
Tablo III:	Apiksabanın Onaylanmış Endikasyonları
Tablo IV:	Dabigatranın Onaylanmış Endikasyonları
Tablo V:	Rivaroksabanın onaylanmış endikasyonları
Tablo VI:	Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler
Tablo VII:	Deney ve kontrol grupları iskelet kası IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo VIII:	Deney ve kontrol grupları iskelet kası TNF- $\alpha$ düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo IX:	Deney ve kontrol grupları iskelet kası IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo X:	Deney ve kontrol grupları iskelet kası TAS düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo XI:	Deney ve kontrol grupları iskelet kası TOS düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo XII:	Deney ve kontrol grupları serum IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo XIII:	Deney ve kontrol grupları serum TNF- $\alpha$ düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo XIV:	Deney ve kontrol grupları serum IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo XV:	Deney ve kontrol grupları serum TAS düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo XVI:	Deney ve kontrol grupları serum TOS düzeylerinin karşılaştırılması
Tablo XVII:	Deney gruplarında patolojik incelemede konjesyon skorlaması
Tablo XVIII:	Deney gruplarında patolojik incelemede enflamasyon skorlaması
Tablo XIX:	Deney gruplarında patolojik incelemede atrofi skorlaması
Tablo XX:	Deney gruplarında patolojik incelemede nekroz skorlaması
Tablo XXI:	Deney gruplarında patolojik incelemede fibrozis skorlaması
Tablo XXII:	Deney ve kontrol grupları toplam patoloji skorlarının karşılaştırılması

## ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1: İskemik hasarın hücrede morfolojik ve fonksiyonel sonuçları
- Şekil 2: Hücre hasarında hücre içi  $Ca^{+2}$  artışının kaynakları ve sonuçları
- Şekil 3: Geri dönüşümlü hasar ve nekrozun morfolojik özellikleri
- Şekil 4: İskemi-Reperfüzyon Hasar mekanizmaları ve sonuçları
- Şekil 5: Ksantin Oksidaz aracılı ROS oluşumu
- Şekil 6: Serbest Oksijen radikalleri oluşum mekanizmaları
- Şekil 7: Fagositer hücrelerde ROS üretimi
- Şekil 8: Nitrik oksit sentaz yolağı ve peroksinitrit üretimi
- Şekil 9: Lökosit-Endotel Etkileşimi(Yuvarlanma-Adezyon-Transmigasyon)
- Şekil 10: SOD ve Katalaz reaksiyonları
- Şekil 11: Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz reaksiyonu
- Şekil 12: Apiksaban'ın kimyasal formülü ( $C_{25}H_{25}N_5O_4$ )
- Şekil 13: Dabigatran eteksilat kimyasal formülü( $C_{34}H_{41}N_7O_5$ )
- Şekil 14: Rivaroksaban kimyasal yapısı( $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$ )
- Şekil 15: Deney ve kontrol grupları ortanca kas IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 16: Deney ve kontrol grupları ortanca iskelet kası TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 17: Deney ve kontrol grupları ortanca kas IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 18: Deney ve kontrol grupları ortanca kas TAS düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 19: Deney ve kontrol grupları ortanca kas TOS düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 20: Deney ve kontrol grupları ortanca serum IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 21: Deney ve kontrol grupları ortanca serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 22: Deney ve kontrol grupları ortanca serum IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 23: Deney ve kontrol grupları ortanca serum TAS düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 24: Deney ve kontrol grupları ortanca serum TOS düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 25: Deney ve kontrol grupları ortanca toplam patoloji skorlarının karşılaştırılması

## KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	:	Adenozin Dİ Fosfat
AF	:	Atriyal Fibrilasyon
AKS	:	Akut Koroner Sendrom
AMP	:	Adenozin Mono Fosfat
ANT	:	Adenin Nukleotit Translokaz
ASA	:	Asetilsalisilik asit
ATP	:	Adenozin Tri Fosfat
Ca	:	Kalsiyum
CYP-d	:	Siklofilin D
DAMPs	:	Danger Associated Molecular Patterns
DM	:	Diyabetes Mellitus
DMAH	:	Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DVT	:	Derin Ven Trombozu
ECT	:	Ekarin Pıhtılaşma Zamanı
eNOS	:	Epitelyal Nitrik Oksit Sentaz
ET	:	Endotelin
GM-CSF	:	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
GSH-Px	:	Glutasyon Peroksidaz
GST	:	Glutasyon S Trasnferaz
ICAM-1	:	İnterselüler Adezyon Molekülü-1
IL-1 $\beta$	:	İnterlökin-1 Beta
IL-6	:	İnterlökin-6
IL-8	:	İnterlökin-8
iNOS	:	İndüklenebilir Epitelyal Nitrik Oksit Sentaz
İRH	:	İskemi-Reperfüzyon Hasarı
İ- $\kappa$ B	:	İnhibitör -kappa B
KDH	:	Ksantin Dehidrogenaz
KKY	:	Konjestif Kalp Yetmezliği



KO	: Ksantin Oksidaz
LOOH	: Lipid Hidroperoksit
MAO	: Monoamin Oksidaz
MPTP	: Mitochondrial Permeability Transition Pore
Na <sup>+</sup>	: Sodyum
NAD <sup>+</sup>	: Nikotinamid Adenine Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid Adenine Dinükleotid Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör-kappa B
nNOS	: Nöronal Epitelyal Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NOX	: NADPH Oksidaz
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
PE	: Pulmoner Emboli
PECAM	: Platelet Endotelyel Adezyon Molekülü
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	: Prostaglandin I <sub>2</sub>
PIC	: Mitokondriyal Fosfat Taşıyıcı
PMN	: Polimorfonükleer
PSGL-1	: P-Selektin Glikoprotein Ligand 1
ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Statü
TIA	: Geçici İskemik Atak
TLR	: Toll-Like Reseptör
TNFR-1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör α
TOS	: Total Oksidan Statü
TT	: Trombin Zamanı
TxA <sub>2</sub>	: Tromboksan A <sub>2</sub>
VDAC	: Voltaj Bağımlı Anyon Kanalı
VKA	: Vitamin K Antagonisti

## RESİM DİZİNİ

- Resim 1: Gavaj ile ilaç uygulaması
- Resim 2: İntraperitoneal anestezi uygulanması
- Resim 3: İnfrarenal abdominal aorta
- Resim 4: Buldog klemp ile infrarenal aortanın klemlenmesi
- Resim 5: Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede sham grubunda görülen yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve konjesyon
- Resim 6: Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x200 büyütmede apiksaban grubunda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekrotik hücreler(kesikli oklar nekrotik hücreleri,düz ok ise inflamatuvar hücre infiltrasyonunu göstermektedir)
- Resim 7: Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede rivaroksaban grubunda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekrotik hücreler ve kalsifikasyon alanı(ok ile gösterilen kalsifikasyon alanı)
- Resim 8: Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x200 büyütmede dabigatran grubunda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ok ile gösterilen bölgede saptanan mast hücresi

## 1.GİRİŞ

İskemi-Reperfüzyon Hasarı (İRH) ilk olarak Haimovici tarafından akut iskemi kaynaklı alt ekstremitte revaskülarizasyonu sonrası gelişen miyonefropatik sendrom olarak 1950'li yıllarda tanımlandı.Ardından 1975 yılında Cerra ve arkadaşları köpek myokardiyumunda kan akımı sağlanması sonrası yaptıkları histolojik değerlendirmelerde subendotelyal hemorajik nekrozu göstererek ilk İRH tanımlamasını yaptılar.

Koroner arter hastalıkları,kardiyopulmoner bypass,akut/kronik oklüziv periferik arter hastalıkları,aortik veya periferik vasküler klempleme,turnike uygulaması gibi birçok klinik durum İRH'nın rutin Kalp-Damar Cerrahisi uygulamalarında karşımıza çıkmaktadır. İRH'a bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltmak adına günümüze dek birçok çalışma yapılmış ve devam etmektedir(1).

İskemi bir organa sunulan kan akımının çeşitli nedenlerle engellenmesine bağlı gelişen ve doku hipoksisine yol açan patolojik süreçtir.Reperfüzyon ise iskemik kalan dokuya tekrar kan akımının sağlanması sürecidir(2).IRH iskemik dokunun reperfüze olması sonrası gelişen patolojik süreç olmakla birlikte hem lokal hem de sistemik etkilere sebep olmaktadır. Histopatolojik inceleme ile birlikte kanda ve kas dokusunda biyokimyasal parametreler olan TAS-TOS düzeyleri ile IL-1 $\beta$ ,IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri bu sürecin değerlendirilmesini sağlayan incelemelerdir.

Çalışmamızda İRH patogenezinde daha sonra anlatılacak olan lokal tromboz ve koagülasyon aşamasında engellemeye sebep olabilecek ve klinik uygulamaya son dönemde geçmiş olan Rivaroksaban,Apiksaban ve Dabigatran etken maddesine sahip ilaçların İRH'a karşı olan etkinliklerinin karşılaştırmalı olarak araştırılmasını amaçlanmıştır.

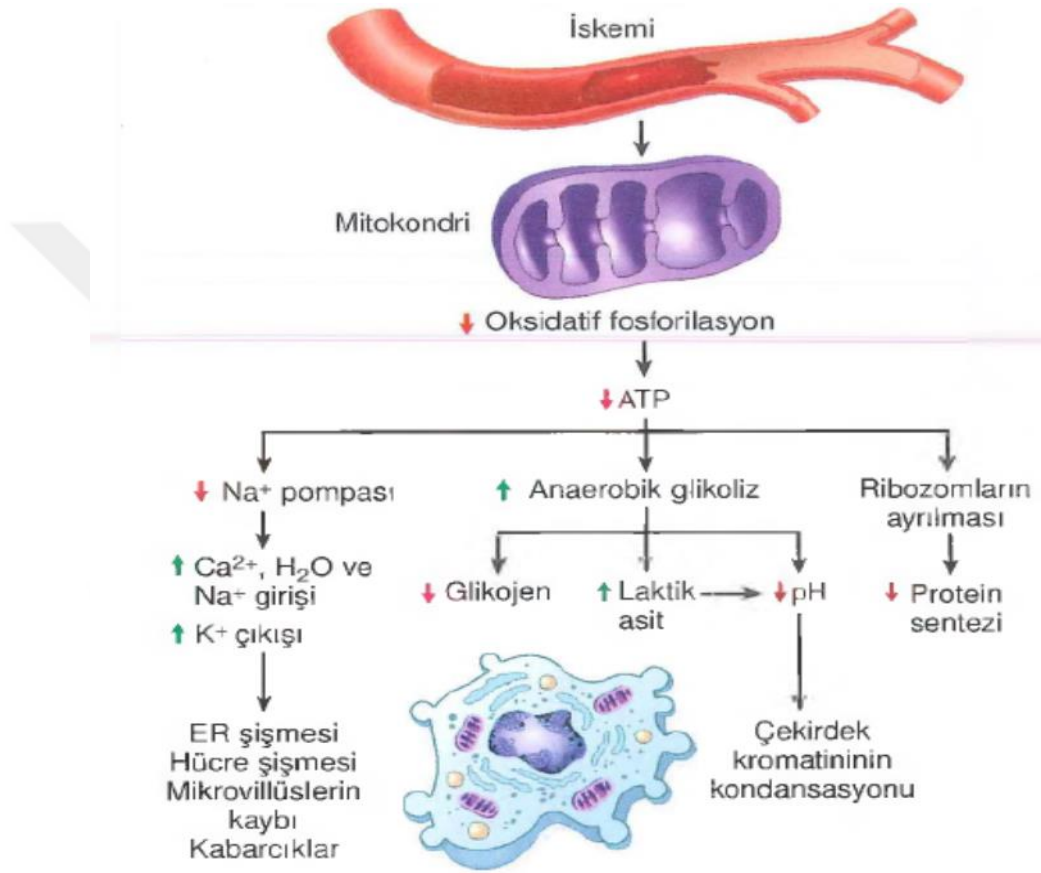
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.İskemi

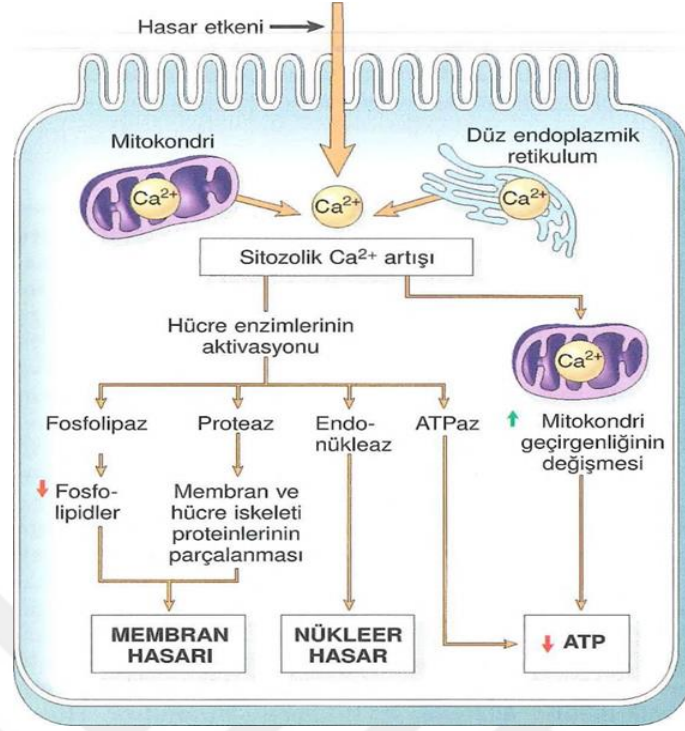
İskemi ya da dokuya gelen arteriyel kan miktarının azalması, insanlarda görülen hastalıkların arka plânında yer alan ve sık karşılaşılan bir akut hücre hasarı nedenidir. Enerji üretiminin (oksidatif yollardan elde edilenden daha az olsa da) anaerob glikoliz üzerinden devam edebildiği hipoksinin aksine iskemide, gelen kan miktarının azalmış olması nedeniyle, glikoliz için gerekli maddelerin sağlanmasında da sorun vardır. Bunun sonucu olarak, dokuya ulaşabilen potansiyel substratlar tükendiğinde ya da glikoliz olayı, normalde venöz kanla dokudan uzaklaştırılan metabolitlerin birikmesi nedeniyle inhibisyona uğradığında, iskemik dokulardaki anaerob enerji üretimi de engellenir. İskemiye bağlı doku hasarı bu nedenle hipoksi nedenli doku hasarından daha çabuk gelişir ve genellikle daha şiddetlidir(2).

İskemi esnasında hipoksiye bağlı mitokondride oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi devam edemez ve sonuç olarak hücre içi ATP depoları hızlı olarak tükenir ve ADP,AMP ve Pi düzeylerinde artış izlenir.Glikoliz stimüle olur ancak hücrenin ihtiyacı olan yeterli düzeyde ATP üretilemez.Laktik asit birikimi ile hücre içi pH düşer ve  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter  $\text{H}^+$ iyonlarının hücre dışına atılması için aktive olur.ATP yokluğuna bağlı hücre içi konsantrasyonu artan  $\text{Na}^+$  iyonları  $\text{Na}/\text{K}^+$  ATPase pompası ile hücre dışına atılamaz.Yüksek hücre içi  $\text{Na}^+$  düzeyleri  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kanalının inhibisyonuna yol açarak hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  düzeyinin artışına yol açar;yüksek hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  düzeyi endonükleaz,fosfolipazlar ve proteazlar gibi enzimleri aktiveştirir.Sonuç olarak uzamış iskemi hücre membran hasarı ve nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanır (1).

İskemik hasar geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hasar olarak ikiye ayrılmaktadır. Dokunun hipoksiye dayanıklılığına göre bu süre her dokuda farklı olabilmektedir (3).



**Şekil 1** İskemik hasarın hücrede morfolojik ve fonksiyonel sonuçları(2)



**Şekil 2** Hücre hasarında hücre içi  $Ca^{2+}$  artışının kaynakları ve sonuçları(2)

### 2.1.1 Geri Dönüşümlü Hasar

İskemide anaerobik glikoliz ve fosfokreatin yolları aktive olur ve bu durumda hücre içindeki glikojen ve fosfokreatinin rezervlerinin kullanılır. Anaerobik glikoliz ile ATP üretimi bir süre daha karşılanır ancak laktat, inorganik fosfat ve adenin nükleotidler hücre içinde birikmeye başlar. Hücre içinde biriken NAD, laktat ve  $H^+$  iyonları hücre içi ve dışı ortamda asidoza yol açarak anaerobik glikolizi en sonunda inhibe ederler. İskemik hücrede ADP hipoksantin ve ksantine metabolize olur ve bu da reperfüzyon aşamasındaki serbest oksijen radikalleri (ROS) üretiminden sorumlu olacaktır. Hücre içi ATP rezervleri azalması ve asidozla glikolizin inhibe olması sonrası daha önce anlatılan ATP bağımlı iyon kanal değişiklikleri ile hücre içi sodyum ve kalsiyum klorür artışına yol açar (4).

*Geri dönüşlü hücre hasarındaki hücre içi değişiklikler:*

- Mikrovillüslerin kabarcıklaşması, küntleşmesi veya distorsiyonu
- Hücre bağlantılarında gevşeme gibi plazma membran değişiklikleri
- Mitokondrielerde şişme ve şekilsiz(amorf) dansitelerin ortaya çıkması

- Endoplazmik retikulum,ribozomların ayrılması,polizomların parçalanması
- Çekirdekte kromatin kümelenmesi(2)

Bir diğer olay da doku hipoksisi nötrofillerin interstisyuma mobilizasyonuna hipoksi adaptif yollarla yol açmaktadır. P-selektin,IL-8 von Willebrand faktör salınımında artış ve fosfolipaz A2 enzim aktivasyonu sonrası oluşan PAF(Platelet activating factor) ve Araşidonik asit nötrofillerin iskemik alana yönelmesini sağlayan hipoksi adaptif yolaklardır.Nötrofil migrasyonu dokuyu reperfüzyon hasarına duyarlı hale getirir (2).

Yukarıda anlatılan tüm aşamalar geri dönüşümlü hasar olup reperfüzyon olması durumunda hücreler normal fonksiyonlarına geri dönebilmektedirler.İskeminin devam etmesi durumunda ise geri dönüşümsüz hasara geçilmektedir (1).

### **2.1.2Geri Dönüşümsüz Hasar**

Geri dönüşlü hasarın ne zaman geri dönüşsüz olacağı ve hücre ölümü yönünde ilerleyeceğini öngördüren olaylar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun klinik önemi çok açıktır; hücre ölümünü doğru biçimde öngörebileğimiz moleküler ve biyokimyasal değişiklikleri saptayabilirsek, geri dönüşlü hücre hasarının geri dönüşsüz hücre hasarına dönmesini önleyecek stratejiler geliştirebiliriz.

Geri dönüşsüz hasarın kesin bir morfolojik veya biyokimyasal ilişkisi yoksa da, onu tutarlı biçimde karakterize eden iki fenomen vardır: Başlangıçtaki hasar düzelmiş olmasına rağmen mitokondri disfonksiyonunun düzelmemesi ve membran fonksiyonlarındaki ağır bozukluklar. Daha önce belirtildiği gibi, lizozom membranlarının hasar görmesi, nekrozun karakteristiği olan ve hasarın nekroz yönünde ilerlediğini kesin olarak belirleyen enzimatik parçalanma ile sonuçlanır (2).

*Hücrelerin morfolojisine bakıldığında:*

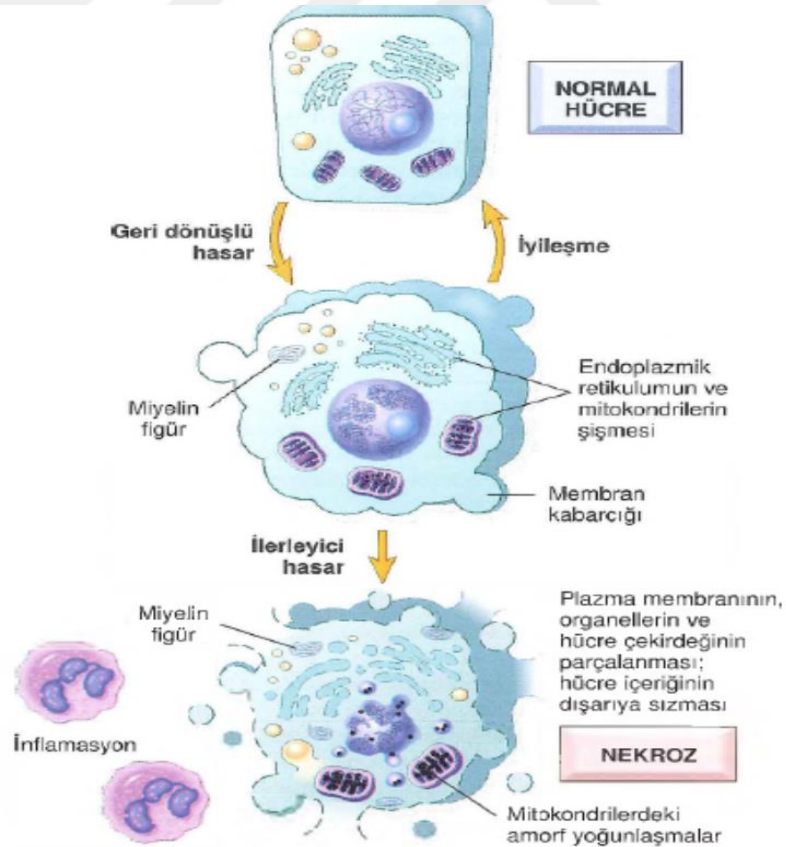
*Sitoplazmik değişiklikler:* Nekroza uğrayan hücrelerde eozinin denatüre plazma proteinlerine bağlanmasıyla eozinofili artışı görülür. Glikojenpartiküllerinin kaybolmuş olması sonucu daha camsı, homojen bir görünüme sahiptir. Miyelin figürleri nekroza uğrayan hücrelerde, geri dönüşlü hasara uğramış hücrelerde olduğundan daha belirgindir.

Enzimatik olarak organellerin sindirilmesiyle sitoplazma vakuollü ve "güve yeniği" görünümündedir.Elektron mikroskopisinde intrastoplazmik myelin figürleri, hem plazma hem

organel membranlarında kesintiler, mitokondriyel belirgin şişme ile amorf büyük dansitelerin oluşması ve lizozomların parçalanması ile karakterizedir.

*Hücre çekirdeğindeki değişiklikler:*Tümü de DNA ve kromatin yıkımı nedeniyle gerçekleşen üç patternden biri şeklindedir: Muhtemelen deoksiribonükleaz(DNAz) aktivitesi sonucu kromatin bazofilisi soluklaşabilir (karyoliz);çekirdek, DNA'nın büzülmüş, solid bir kitle hâlini almasıyla büzülebilir ve artmış bir bazofili sergileyebilir (piknoz);ya da piknotik çekirdek, parçalanır (karyoreksis).Ölen hücrenin çekirdeği, 1-2 gün içerisinde tamamen ortadan kaybolabilir.

*Nekrotik hücrelerin akıbeti :*Nekrotik hücreler, bir süre daha yerlerinde kalabilirler ya da enzimler tarafından sindirilerek tamamen kaybolabilirler. Ölü hücreler miyelin figürlerine dönüşürler. Bunlar ya diğer hücreler tarafından fagosite edilirler ya da yağ asitlerine parçalanırlar. Bu yağ asitlerinin kalsiyum tuzlarına bağlanması, ölü hücrelerin sonunda kalsifiye olmasıyla sonuçlanabilir(2).



**Şekil 3** Geri dönüşümlü hasar ve nekrozun morfolojik özellikleri(2)

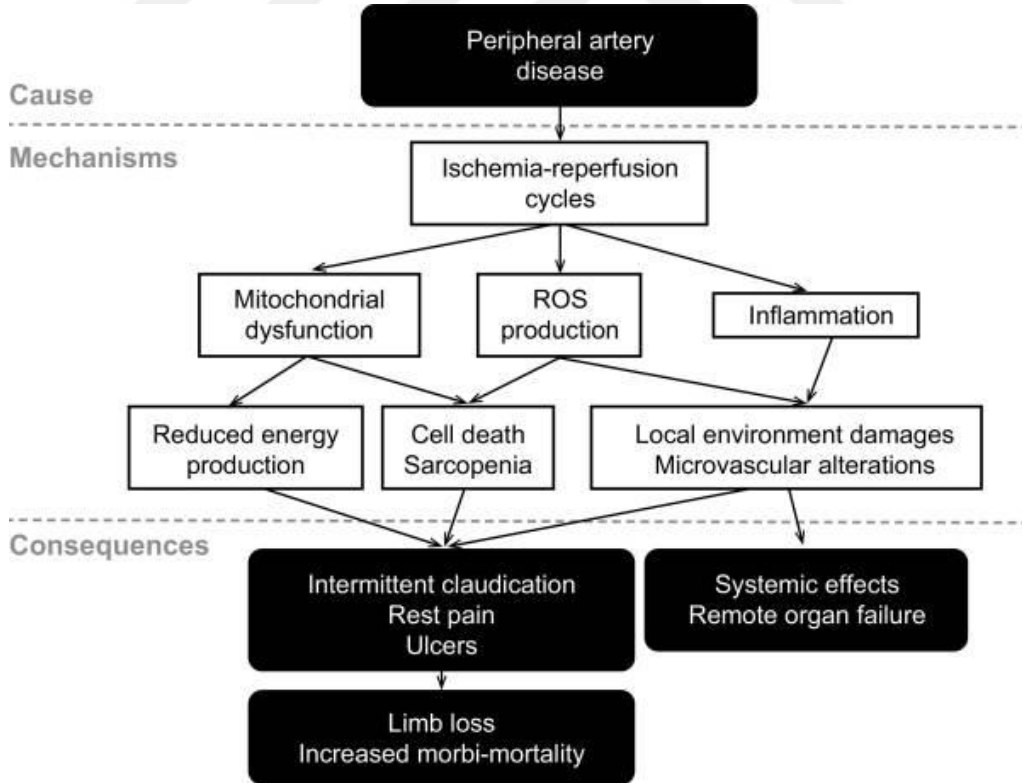


## 2.2 İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

İskemide doku hasarının reverzibilitesinin ve dokunun hayatta kalabilirliğini belirleyen esas faktörler iskeminin süresi ve derinliğidir(5).İskemik doku yaralanması genellikle derin ve uzun bir doku hipoksisi dönemine ve bunun sonucu olarak hücresel ATP tükenmesine bağlanır. İskemide hipoksi süresini kısaltmak,ATP rezervlerini doldurup iyon imbalansını düzeltmek doku hasarını en aza indigeme yolunu oluşturmaktadır. Buna rağmen erken reperfüzyon sonrası paradoksal olarak doku hasarında artış görülmesi 1970’li yıllarda ilk İskemi-Reperfüzyon Hasarı tanımlamasını ortaya çıkarmıştır (6).

*İskemi-Reperfüzyon Hasarına Neden Olan Mekanizmalar:*

- 1-Serbest oksijen radikalleri
- 2-İnflamasyon
- 3-Mitokondriyel Hasar(7,8)



Şekil 4 İskemi-Reperfüzyon Hasar mekanizmaları ve sonuçları (8)

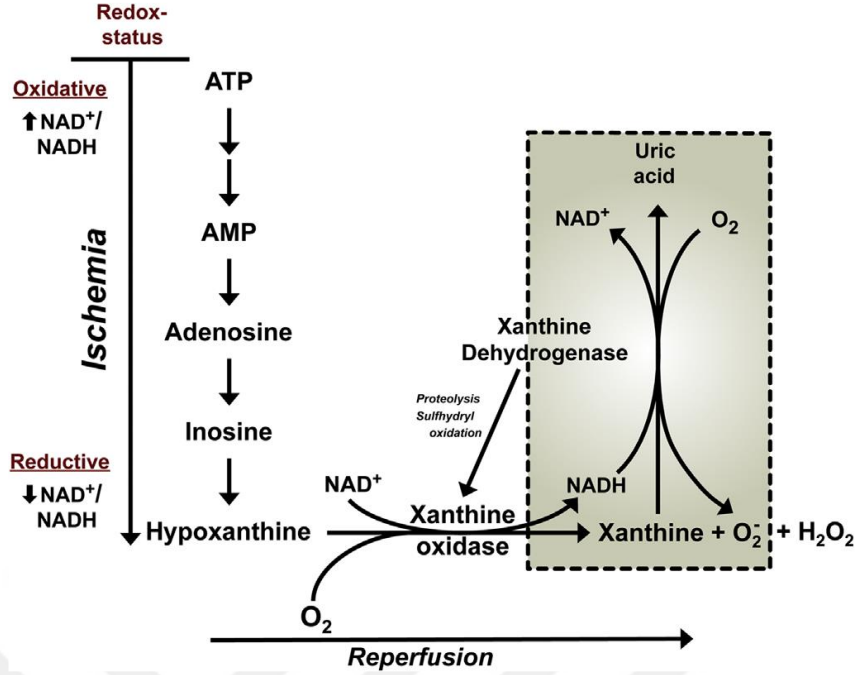
### 2.2.1 Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren molekül ya da atomlardır. Stabil olmamaları nedeniyle çok kısa yarı ömürlüdür. Elektriksel yükleri pozitif, negatif veya nötr olabilir (9).

Organizmada sürekli serbest radikal atakları görülmekte oksijen aerobik organizmanın yaşamı için esansiyeldir. Aerobik metabolizma esnasında fizyolojik olarak sürekli serbest oksijen radikalleri oluşmakta olup bunların organizmaya olabilecek zararlı etkileri endojen antioksidan mekanizmalarla önlenir. Oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit(NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin %95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (7).

#### **Ksantin Oksidaz Aracılı ROS Oluşumu**

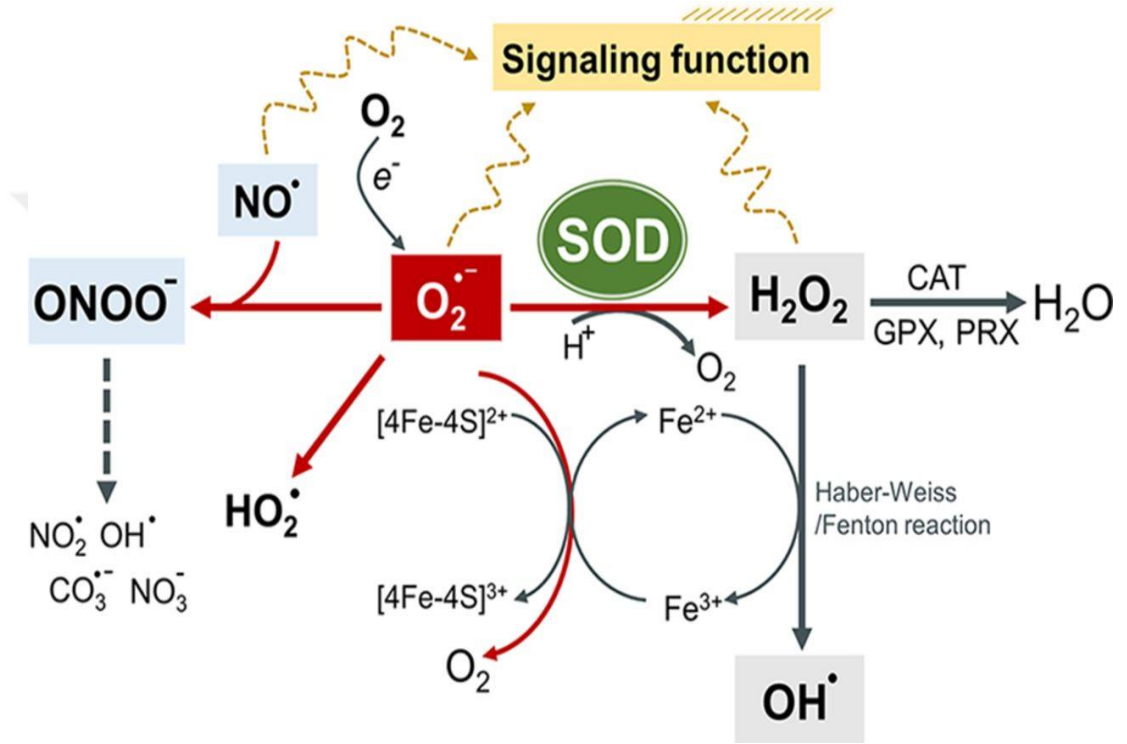
İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den AMP ve adenozin oluşur. Adenozin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı  $NAD^+$  (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dır. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle  $KDH \rightarrow KO$ 'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır (10).



Şekil 5Ksantin Oksidaz aracılı ROS oluşumu(11)

### Süperoksit Radikali ve Diğer Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

Süperoksit radikali birincil oksidandır ve oluşan diğer serbest oksijen radikallerinin kaynağını oluşturur. Normal fizyolojik koşullarda oluşan süperoksit ( $O_2^-$ ) süperoksit dismutaz (SOD) ile önce hidrojen peroksite sonra da katalaz etkisi ile suya dönüşür. Ancak İRH'da ksantin oksidaz etkisine bağlı olarak artan süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), antioksidan kapasiteyi aşar ve ortamdaki etkin bir şekilde temizlenemez. Hidrojen peroksit daha sonra  $Fe^{+2}$  gibi geçiş metalleri veya süperoksit radikalleri ile (Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları) reaksiyona girer ve en güçlü radikal olarak bilinen hidroksil radikalini ( $OH^-$ ) oluşturur(12). İskemik dokularda düşük pH durumunda süperoksitten oldukça reaktif olan hidroperoksil serbest radikal oluşumu diğer bir serbest radikal oluşum mekanizmasıdır (13).



Şekil 6 Serbest Oksijen radikalleri oluşum mekanizmaları(13)

**Tablo I:**Reaktif oksijen bileşikleri (9)

Reaktif Oksijen Bileşikleri		Reaktif Olmayan Oksijen Bileşikleri	
$O_2^-$	Süperoksit	$H_2O_2$	Hidrojen Peroksit
$OH^-$	Hidroksil	$O_2$	Singlet Oksijen
$HO^-$	Hidroperoksil	$HOCL$	Hipokloröz Asit
$RO^-$	Alkoksil	$ONOO^-$	Peroksinitrit Radikali
$ROO^-$	Peroksil	$O_3$	Ozon
$NO^-$	Nitrik Oksit	$LOOH$	Lipid Hidroperoksit
$NO_2^-$	Azot Dioksit		

### **Mitokondriyal ROS oluşumu**

Normal fizyolojik koşullarda mitokondriyum hücre içi oluşan  $O_2^-$ 'nin başlıca kaynağıdır. Hücelere giren oksijenin %90'ı elektron transport zincirinde suya indirgenirken %1-2'lik bir kısım ETZ'den (başlıca kompleks I ve III) elektron kaçığına bağlı olarak süperoksite dönüşür. Normalde oluşan bu süperoksitler, SOD enzimi tarafından hızlıca dismutasyona uğratılır. İskemi durumunda ETZ'inde moleküler oksijen yokluğuna bağlı olarak elektron akışı durduğundan bu kompleksler (özellikle kompleks I) indirgenmiş düzeyde kalır. ETZ'den sızan elektronlar rezidüel oksijenle reaksiyona girerek  $O_2^-$  üretimine yol açarlar.Reperfüzyonda ise moleküler oksijenin gelişi ile ETZ'den elektron sızıntısı artar ve patolojik süreç  $O_2^-$  üretiminin artışı ile devam eder (14).

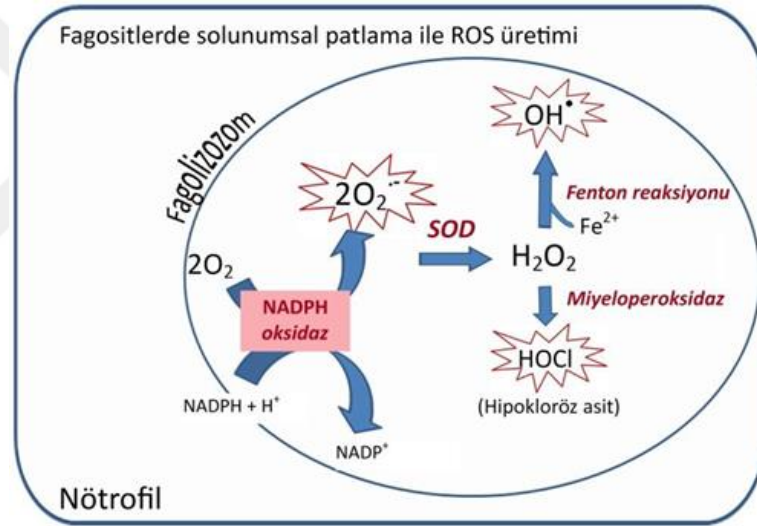
Mitokondriyum dışı zarında bulunan monoaminoksidaz (MAO) enzimi ise mitokondriyal ROS üretiminden sorumlu diğer önemli mekanizmadır. Normal şartlarda MAO, nörotransmitter deaminasyonundan sorumludur ancak reaksiyon sırasında yan ürün olarak pro-oksidan bir molekül olan  $H_2O_2$  üretilir (15).Özellikle kardiyak İRH'da oksidatif stres oluşumunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (16).

### **Fagositler ve Endotel Hücre Aracılı ROS Oluşumu**

Fagositik hücrelerde solunumsal patlamada ROS üretiminden sorumlu başlıca enzim NADPH oksidaz (NOX) olup aktivasyon sırasında oksidan üretimi yaklaşık 50-100 kata kadar artabilir(17). NOX aracılığıyla üretilen süperoksitler, SOD aracılığı ile önce hidrojen peroksite ve sonrasında miyeloperoksidaz etkisi ile de hipokloröz asite veya Fenton

reaksiyonu ile hidroksil radikaline ( $\text{OH}^\cdot$ ) dönüşür ve ortama salınır (18). Polimorf çekirdekli lökositler kaynaklı bu artmış ROS üretimi, reperfüzyon hasarında başlıca rolü oynar. PMNL'den bunun dışında IL-1, IL-6, IL-12,  $\text{IFN}\gamma$  ve  $\text{TNF-}\alpha$  gibi sitokin ve kemokinler ile elastaz ve kollejenaz gibi proteazlar salınarak bölgeye daha fazla inflamatuvar hücre toplanmasına ve daha fazla ROS üretimine yol açar (19).

İskemi-reperfüzyonda endotel hücrelerinin selektin ve integrin gibi adhezyon molekülleri aracılığıyla lökosit toplanmasını ve dolayısıyla daha fazla ROS üretimini tetiklemesi dışında, yüzeyinde bulunan ksantin oksidaz enzimi ile de oksidatif strese katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu enzim hepatosit, enterosit ve kapiller endotel hücrelerde diğer dokulara göre daha belirgin olarak bulunmaktadır (20).

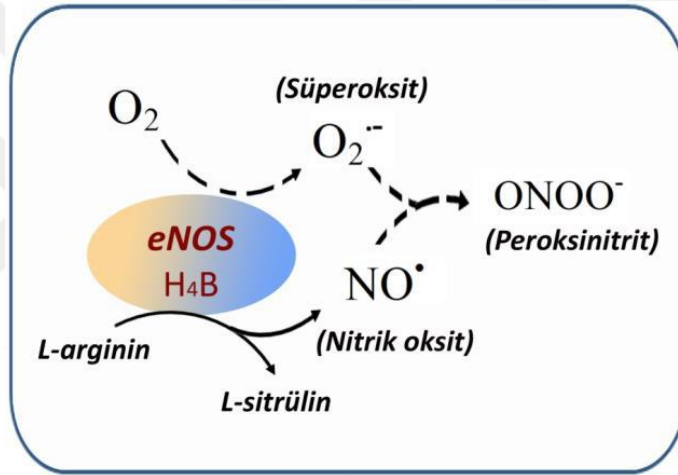


Şekil 7 Fagositer hücrelerde ROS üretimi(21)

### İskemi-reperfüzyonda nitrik oksitin rolü

Nitrik oksit ( $\text{NO}^\cdot$ ), reaktif bir radikal olup başlıca nitrik oksit sentaz (NOS) ailesinin endotelial (eNOS), indüklenebilir (iNOS) ve nöronal (nNOS) izoformları tarafından sentezlenir (22). Oldukça kompleks etki mekanizmasına sahip olan nitrik oksitin bu etkileri üretim hızı ve miktarına göre değişkenlik gösterir ve bu durum İ-R hasarında kritik rol oynar. Dokularda normalde oksijen varlığında argininin sitrüline oksidasyonu ile sentezlenir, kofaktör olarak tetrahidrobiopterin kullanılır (23). Normal fizyolojik koşullarda eNOS

tarafından endotelial hücrelerde oldukça az miktarda üretilir ve vazodilatasyon, düz kaslarda relaksasyon, lökosit adhezyonunu engelleyici, trombosit fonksiyonları, ve hücre içi sinyal iletiminde düzenleyici rol oynar (24). İskemi-reperfüzyonda ise süperoksit radikallerinin oluşumu artar. Artan süperoksit, ortamda endojen olarak bulunan  $\text{NO}^-$  ile reaksiyona girerek oldukça reaktif ve potansiyel olarak toksik peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşumunu sebep olur (22). Ayrıca endojen üretilen  $\text{NO}^-$  miktarının azalmasına yol açtığından,  $\text{NO}^-$  in koruyucuetkilerini engeller ve oksidatif strese katkıda bulunur. Ortamda bulunan  $\text{NO}^-$  ile arginin ve/veya tetrahidrobiopterin kofaktörünün azalması da “eNOS-uncoupling” olarak adlandırılır ve NOS'un süperoksit üretimine yönelmesini tetikleyerek ROS oluşumunu artırır (25).



**Şekil 8** Nitrik oksit sentaz yolağı ve peroksinitrit üretimi (21)

### Serbest Oksijen Radikallerinin Hücresel Etkileri

*Oksidatif stresin 3 major etki yolu vardır:*

1. Hücredeki membran lipidleri, proteinler veya DNA gibi makromoleküllere direk hasar
2.  $\text{NO}$ 'in biyolojik etkinliğinin azalması ve peroksinitrit gibi potansiyel toksik forma dönüşmesi
3. Hücresel sinyal mekanizmalarını etkilemesi (19)

### 2.2.2 Enflamasyon

İRH'de enflamasyon mikroorganizmaların bulunmaması nedeniyle steril enflamasyon olarak tariflenir ve nötrofil artışı, kemokin ve proinflatuar sitokin üretiminde artış ile karakterizedir. ROS üretimi, hidrolitik enzimlerin salınımı ve iskemik dokulara sızan aktif nötrofillerden gözenek oluşturuucu moleküllerin salgılanması parankimal hücrelere geniş çapta kollateral hasara yol açar. Reperfüzyon esnasında tekrar kan akımının sağlanmasıyla iskemik dokuya oksijen ile birlikte nötrofil göçü de gerçekleşmiş olur. İskemik olan dokuya oksijen akışı, hücrese metabolizmayı desteklemek için zorunlu olmasına rağmen, KO ve NADPH oksidaz gibi enzimler tarafından ROS oluşumunu teşvik eder. Nötrofil infiltrasyonu, nekrotik hücrelere ve ROS oluşumuna bağlı olarak gelişen inflamatuvar tepkilerin bir sonucu olarak önce postkapiller venüllere ve ardından dokulara olacak şekilde gelişir. Parankimal hücrelere sitotoksik etkisini gösteren nötrofiller, iskemi kaynaklı hücre hasarını ve ölümünü şiddetlendiren reperfüzyon hasarını indükler(16).

ROS proinflatuar sinyallerin oluşumunu teşvik eder, lökositlerin ve endotel hücrelerinin yüzeyi üzerindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu değiştirir ve NO seviyelerini azaltır (26). Bu değişikliklerle birlikte perivasküler hücreler (örneğin, makrofajlar, mast hücreleri) aktive olur ve diğer inflamatuvar mediatörleri (örneğin TNF $\alpha$  ve diğer sitokinler, PAF, LTB $_4$ ) salgılar. Bu olayların bir sonucu olarak, lökositler postkapiller venüler endotel ile adeziv etkileşimler oluşturmaya başlar. Trombositler ayrıca lökositlerin postiskemik mikro damar yapılarına yapışmasında önemli bir rol oynar. Aktive edilmiş lökositler dokulara göç ederek oksidanlar ve hidrolitik enzimlerin salınması yoluyla mikrovasküler bariyer fonksiyon bozukluğunu indüklerler. Bu değişikliklere ek olarak, lökositler ayrıca postiskemik besleyici perfüzyon yetmezliğine (daha az perfüze edilmiş kılcal damarlar, yani kılcal damar akmayan), arteriyollerde endotele bağlı vazoregülatuar disfonksiyon ve parankimal hücre disfonksiyonuna katkıda bulunur. Bu nedenle, mikro dolaşımda arteriyolar, kılcal ve postkapiller venüler disfonksiyon gelişimini hızlandıran lökosit / endotel hücre yapışkan etkileşimleri, İR tarafından ortaya çıkan ilk doku disfonksiyonu ve yaralanmasının belirtileri arasındadır(27).



## İRH'da hümmoral mediatörler,sitokinler ve kompleman sisteminin rolü

Kompleman sistemi bilindiği üzere klasik,alternatif ve lektin yolu olmak üzere 3 farklı yoldan uyarılmaktadır. İRH'da iskemik doku ölümmü sonucu subsellüler membran içeriklerinin doğal immün sistem tarafından tanınmasıyla klasik kompleman sistemi aktive olmaktadır (28).

IRH patogenezinde TNF- $\alpha$  önemli rol almaktadır. TNF- $\alpha$  çeşitli hücre tipleri tarafından üretilse de, makrofajlar ana kaynaktır. Bu sitokin hem lokal olarak parakrin hem de endokrin bir mediatör olarak etki eder. Serbest bırakıldıktan sonra TNF- $\alpha$ ,kemokinlerin ekspresyonunu ve ROS üretimini indüklemek ve ayrıca NF- $\kappa$ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive etmek ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu teşvik etmek içinspesifik reseptörlere bağlanır.Bu faaliyetler, postiskemik dokularda nötrofillerin adezyon ve aktivasyonunu uyarır (19).

**Tablo II:**Proinflamatuvar ve Antienflamatuvar sinyaller

<b>PROENFLAMATUAR SİNYALLER</b>
• İnterferon- $\gamma$
• Tümör nekroz faktör ( TNF )
• İnterlökin-1 ( IL-1)
• IL-4
• IL-13
• Makrofaj enflamatuvar protein-2 ( MIP-2)
• NF- $\kappa$ B (nükleer faktör - $\kappa$ B )
<b>ANTIENFLAMATUAR SİNYALLER</b>
• Transforming growth factor - $\alpha$ ( TGF - $\alpha$ )
• IL-10
• İnterlökin reseptör anatoginisti ( IL-RA)
• IL-13
• I- $\kappa$ B

## İRİH'da Endojen Tehlike Sinyalleri

İRİH ROS üretimi ve inflamatuvar hücre aktivasyonuna bağılı olan hücre ölümüne giden bir süreçtir. Bu süreçte normalde üretilen hücre proteinleri ve protein fragmanlarının hücre dışına geçişi ile hücre yüzeyinde oksidatif olarak modifiye olan lipid ve proteinlerin birikimi gelişir. Bu yapıların bazıları doğal immün sistemin Toll-like reseptörleri (TLR) ile tanınır ve danger associated molecular pattern (DAMPs) olarak tanımlanırlar (29). Yinelenen birçok çalışma TLR ilişkili inflamasyonun İRH'da merkezi rol aldığını göstermektedir (30).

### *Reperfüzyon ilişkili DAMPs:*

1. Isı şok protein 60 (HSP 60) → TLR-4 tarafından tanınır.
2. Yüksek mobilite grup protein B1 (HMGP B1) → TLR 2,4,9 tanır.
3. Düşük molekül ağırlıklı hyalüronik asit → TLR 2,4 tanır.
4. Extra domain of fibronectin A (EDA) → TLR 2,4 tanır
5. Kardiyak miyozin → TLR 2,8 tanır.

TLR-ligand bağlanması parankimal hücrelerde, endotelde ve dolaşımdaki lökositlerde olup sinyal yollarının aktiflenmesiyle apoptoza veya NF- $\kappa$ B sinyaline yol açarlar (31). NF- $\kappa$ B sitozolde inhibitörü (I- $\kappa$ B) ile birlikte bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. TLR sinyali ile I- $\kappa$ B proteolize uğrar ve NF- $\kappa$ B nükleusa transloke olarak proinflamatuvar genlerin transkripsiyonuna yol açar. Bu indüklenen transkripsiyonlar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve ICAM-1 (intersellüler adezyon molekülü-1) salınır ve bunlar nötrofil ve makrofajların hasarlanmış dokuya yönelmelerini sağlar (32).

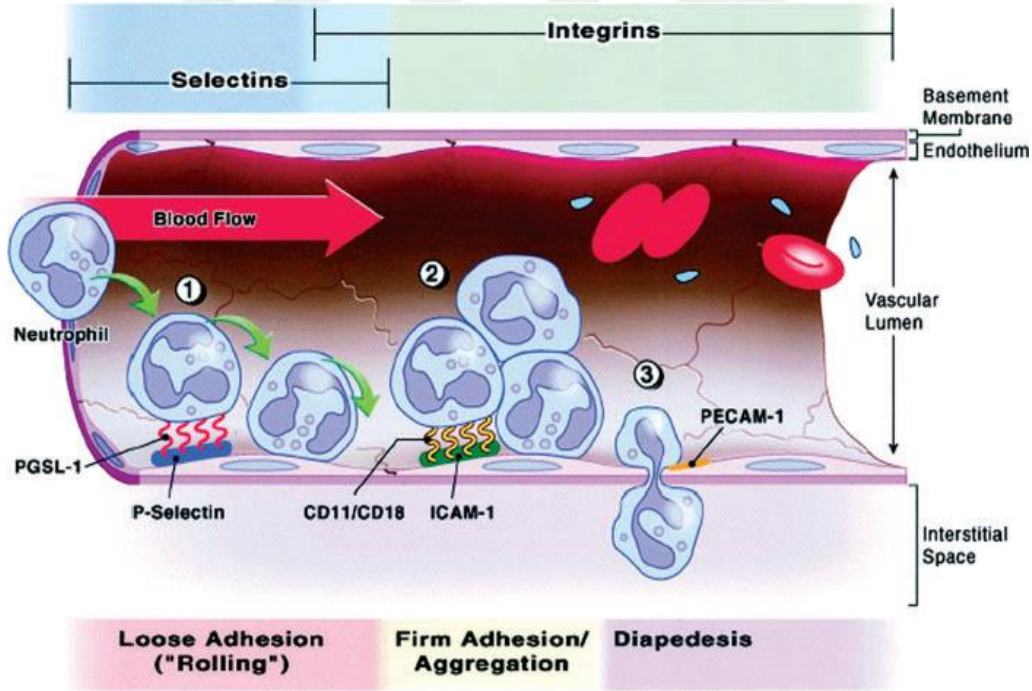
## İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmasında Rol Oynayan Hücreler

### Lökositler ve Endotel Hücreleri

Lökositlerin endotel hücreleri ile etkileşimi üç ayrı aşama ile gerçekleşmektedir:

- 1-Rolling (Yuvarlanma)
- 2-Adezyon
- 3-Transmigrasyon (Şekil 9) (33)

İlk adım İRH ilişkili endotelial P-selektin yüzey ekspresyonunun artışı ve lökosit karşı reseptör P-selektin glikoproteini 1 (PSGL-1) ile etkileşime girmesi sonucu oluşan yuvarlanma(Rolling) aşamasıdır. Adezyon aşaması endotelial ICAM-1 ile lökositler  $\beta$ integrinler olan CD11a / CD18 ve CD11b / CD18'in etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Lökosit interstisyel kompartmana geçişi, endotel hücre kavşakları boyunca yapısal olarak eksprese edilen trombosit-endotel hücre yapışma molekülü 1 (PECAM-1) ile kolaylaştırılır. Ekstravasküler kompartmana ulaşıldığında aktive edilmiş lökositler toksik ROS, proteazlar ve elastaz salgırlar, bu da artan mikrovasküler geçirgenlik, ödem, tromboz ve parankimal hücre ölümü ile sonuçlanır. Ekstravasküler kompartmandaki PMN hücre birikimi hipoksik dokulardan salınan Interlökin-8 (IL-8) ile de kolaylaştırılır, böylelikle nötrofilleri intravasküler alandan hipoksik interstisyuma doğru yönlendiren kemotaktik bir gradyent ortaya çıkar.



Şekil 9 Lökosit-Endotel Etkileşimi (Yuvarlanma-Adezyon-Transmigirasyon)

Normal şartlar altında, hemostazın endotel kontrolü, trombosit, pıhtılaşma sistemi ve fibrinolizi kapsayan antitrombotik durumu korur. Ancak, bu İRH'den sonra tersine çevrilir. İR kaynaklı endotel NO kaybı 4 yol ile trombosit agregasyon artışına yol açar;

1-Vazokonstriksiyon,

2-Trombosit aktivasyonu

3-NO kaynaklı cGMP ilişkili trombosit kalsiyum seviyeleri artışı ile yüzey P-selektin ekspresyonu

4-Fibrinojen trombosit bağlanması (Yüzey integrin proteini olan GP2b-3a ile)(34)

İRH endotel doku faktörü (TF)'nün yüzey ekspresyonunu indükler ve sırayla pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonunu ve İR'den sonra no-reflow fenomenine katkıda bulunabilecek mikrotrombüs oluşumunu hızlandırır (35).

*Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir:*

-Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir.

-Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.

-SOR üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar (36).

İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda  $O_2^-$  oluşurken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin

bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF-a gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (37).

İRH oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri ROS için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da ROS üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımda ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İRH'de endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (38).

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. ROS etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak IL-1, PAF, prostaglandinler (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılaya yeteneğindedir (37).

### **Trombosit**

Bol miktarda kanıt, trombositlerin İRH'ye verdiği trombojenik ve enflamatuvar yanıtlarda kritik bir rolü desteklemektedir, burada lökositler, lenfositler ve endotel hücreleri ile etkileşimleri, yaralanmayı teşvik eder (39). Normal hemostatik koşullarda trombositler nitrik oksit ve prostasiklin gibi inhibitör faktörlerin varlığı nedeniyle inaktif bir durumda dolaşırlar. Doku hasarı ve ROS ve diğer faktörlerin serbest bırakılması üzerine aktive olmuş trombositler endotel, dokudaki ve dolaşan lökositler ve lenfositlere agrege olur. Trombositler İRH'den sonra mikrovasküler endotel hücre yüzeyi üzerinde biriken fibrinojene bağlanan ve sonra da endotel yüzey ICAM-1'e bağlanan mikrovasküler endotel hücre yüzeyi üzerinde biriken fibrinojene bağlanan GPIIb/IIIa gibi birkaç integrin reseptörünü eksprese eder (40). Trombositler ayrıca hem P-selektini hem de ligandlarını, PSGL-1 ve GPIIb'a'yı eksprese eder ve bu CAM-ligand kompleksleri, trombositlerin hem endotel hücrelerine hem de lökositlerine yapışmasına aracılık eder ve ayrıca trombosit-trombosit agregasyonu için önemlidir (41). GPIIb ayrıca endotel von Willebrand faktörüne de bağlanır, ancak bu son etkileşim, tipik olarak İRH'de yer alan postkapiller venüllerde değil, yüksek shear stresine maruz kalan arteriyel damarlarda trombosit yapışmasında daha fazla rol oynayabilir(42). PMN'nin trombositlerle

endotel yapışmasının karşılıklı düzenlenmesi PMN'lerin trombosit-endotel adezyonu olduğu bildirilmiştir. Damar duvarına yapışan trombositlerin yaklaşık% 75'inin endotel-yapışık lökositlere bağlı olduğu, geri kalanının doğrudan endotel tarafından bağlandığı gösterilmiştir(43). Aktivasyonun ve trombositlerin endotele alınmasının patofizyolojik sonuçları açıkça anlaşılmasa da, aktive olmuş trombositlerin, IL-1, RANTES, çözünebilir CD154, hidrojen peroksit gibi sitotoksik ajanlar da dahil olmak üzere bir dizi proinflamatuvar, mitojenik ve proapoptotik (kalpain,TGF- $\beta$ )molekül saldığı bilinmektedir. Bu sonuçlar trombositlerin İRH'a aracılık etmede doğrudan etkilerini göstermektedir. Ancak, trombositlerin İRH mekanizmasına katkısı büyük ölçüde lökosit aktivasyonu ve adezyonu ile oluşmaktadır (42).

### **Lenfositler**

Genellikle İRH üzerine çalışmalar doğal immün sistem üzerine odaklanmış olsa da edinilmiş immün sistemin İRH üzerine etkilerini gösteren birçok çalışma mevcuttur.Çalışmalarda beyin dokusu hariç İRH patogenezinde lenfosit infiltrasyonunu göstermekle birlikte adezyon ve transmigrasyonun ICAM-1,VCAM,P-Selektin ve CD47 aracılığıyla oluştuğı gösterilmiştir (44).

CD4<sup>+</sup> T lenfositler Th1 ve Th2 olarak ikiye ayrılmakta olup Th1 STAT 4 üzerinden proinflamatuvar etki(IL-2,IL-12,TNF- $\alpha$ ,IFN- $\gamma$ )Th2 ise STAT 6 üzerinden antiinflamatuvar etki(IL-4, IL-5, IL-10,ve IL-13)oluşturmaktadır (45,46). Th1/Th2 oranının İRH patogenezi üzerine etkileri araştırılmış olmakla birlikte endojen sinyal yollarını kesin olarak belirleyen bir kanıt bulunmamaktadır.Ayrıca Th17 olarak adlandırılan üçüncü bir CD4<sup>+</sup> T lenfosit alt tipi de organ transplantasyonu sonrası İRH doku reddi patogenezinde gösterilmiştir.Th17 tarafınca salgılanan IL-17 başka hücreler tarafınca da salgılanabilmesi nedeniyle henüz bu hücrelerin İRH'daki etkileri belirsizdir (47).

T lenfositlerin aktivasyonu üzerinde antijen bağımsız ve antijen bağımlı mekanizmalar üzerinde durulmuş olup antijen bağımlı mekanizma HMGP-1 gibi endojen tehlike sinyallerine bağı(DAMPs) olarak geliştiğı düşünülmektedir (48).CD4<sup>+</sup> T lenfositlerin hepatik İRH'da antijen bağımsız aktivasyonu Kupfer hücrelerince ROS,TNF- $\alpha$  ve IL-6 salınımı sonucu gelişmektedir (49).

### 2.2.3 Mitokondriyal Hasar

İRH'da programlanmış hücre ölümünün majör sebebi mitokondriyal oksidatif hasardır(Elektron transport zinciri kaynaklı ROS üretimi artmakta).Programlanmış hücre ölümü nekroz veya apoptoz şeklinde gelişmektedir (50).

Hücre ölüm programlarına mitokondriler aracılık eder.BCL-2 protein ailesi mitokondriyal apoptoz düzenleyen temel proteinlerdir.BCL-2 ve BCL-XL proapoptotik üyeler olan BAX ve BAK'ı bloke ederek etki gösteren antiapoptotik üyelerdir. İkinci uyarın mitokondri dış membran geçirgenliğini arttırarak etki gösteren sitokrom c gibi proapoptotik proteinlerdir.'BH3 only' proteinler apoptozu direkt olarak BAX ve BAK aktivasyonu ve BCL-2 ve BCL-XL inaktivasyonu ile başlatırlar.ROS mitokondriyal por transition protein (MPTP) kanallarını açıp 'BH3 only' proteinleri aktive ederek sitokrom c salınımına yol açar ve mitokondriyal apoptozu başlatır(51).

Alternatif olarak mitokondri iç membranına spesifik olan ve sitokrom c'ye güçlü olarak bağlı bulunan fosfolipid yapıdaki kardiyolipinin ROS bağımlı peroksidasyonu sonucu da apoptoz gelişmektedir (52). Tüm bunlara rağmen iskemi reperfüzyon hasarında hücre ölümü genel olarak nekroz şeklinde izlenmektedir (53).

Programlanmış hücre ölümü TNF ölüm reseptörleri ve direkt olarak MPTP açılması ile olabilir.Her iki süreç te oksidatif stres ve kalsiyum gerektirmektedir (50). TNF'nin TNFR-1'e bağlanmasıyla nekrotik hücre ölümünü başlatan konformasyonel değişiklikler oluşur (54).

MPTP'nin direk açılması iskemi reperfüzyon hasarında gelişen nekrozun primer sebebidir.MPTP nonselektif bir protein kanalı olmakla birlikte iç ve dış mitokondri zarını kaplar.Açıldığında 1.5 kDa altındaki solütlerin ve suyun geçişine izin verir. Ve bu da mitokondirede ozmotik hasarla birlikte oksidatif fosforilasyon mekanizmasına zarar verir.

MPTP'nin direkt olarak açılması iskemi reperfüzyon hasarı kaynaklı doku hasarıyla oluşur (51). MPTP'nin bileşenleri henüz tam olarak bilinmemekle birlikte voltaj bağımlı anyon kanalı(VDAC),adenin nükleotid translokaz(ANT) ve mitokondriyal fosfat taşıyıcı(PiC) bileşenlerini içermektedir (55). Siklofilin-D(Cyp-D) mitokondriyal matrikste bir prolin izomeraz olup MPTP'nin açılmasındaki esas regülatördür(50).Por açılması yüksek kalsiyum düzeylerinde görülmektedir.Por açılma sensitivitesi IRH sürecindeki artmış oksidatif stres ilişkilidir (55). Oksidatif stres Cyp-D'nin ANT/PiC dimere bağlanmasını düzenler;bu

proteinlerde  $Ca^{+2}$ bağımlı konformasyonel değişikliğe yol açarak MPTP'nin açılmasına yol açar.Kanıtlar Cyp-D'nin p53'e bağlanarak(oksitatif strete p53 mitokondriyal matrikste artar) etki ettiğini göstermektedir(50).Düşük hücresele pH MPTP'yi inhibe etmekle birlikte reperfüzyon aşamasında artan hücresele pH MPTP'yi açar ve nekrotik hücre ölümüne sebep olur.(55)

### 2.3 Radikallere Karşı Savunma Sistemleri

*Oksidan strete karşı savumada beş mekanizma önemlidir:*

- 1-Metal iyonlarının bağlanması ile toksik radikal oluşumunun önlenmesi
- 2-Oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması
- 3-Radikal zincir reaksiyonlarının kırılması
- 4-Hedef molekülün hasar sonrası tamiri veya tamir edilemeyecek durumdaki moleküllerin uzaklaştırılması
- 5-Antioksidan kapasitenin arttırılması (56)

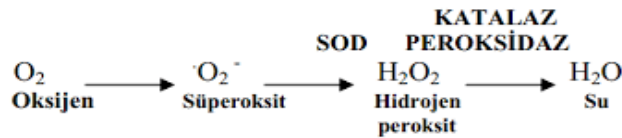
Antioksidanlar endojen ve eksojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır.

#### Endojen Antioksidanlar

#### Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSHPx), Glutasyon S-Transferaz (GST), Katalaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz(57).

*Süperoksit dismutaz:*Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalinin( $O_2^-$ ) hidrojen peroksid ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen major antioksidan enzimidir.

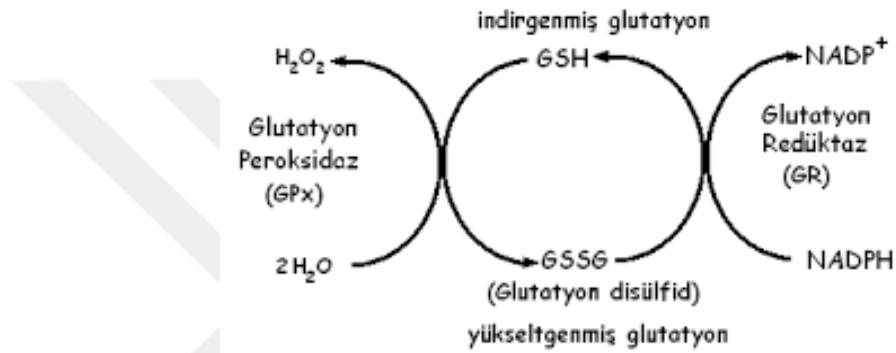


Şekil 10SOD ve Katalaz reaksiyonları



*Katalaz*:Esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur.  $H_2O_2$ 'yi oksijen ve suya parçalar (58).

*Glutasyon Peroksidaz*:Gerek  $H_2O_2$  ve gerekse  $LOOH$ 'leri metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi  $H_2O_2$  ve  $LOOH$ 'leri, selenyum-bağımsız tipi sadece  $LOOH$ 'leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından  $H_2O_2$  ve  $LOOH$  indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon ise NADPH bağımlı glutasyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir.



**Şekil 11** Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz reaksiyonu

*Glutasyon S-Transferaz (GST)*:Glutasyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder.

*Glutasyon(GSH)*:GSH hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde  $\gamma$ -glutamil sistein sentaz ve GSHsentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (59).

## **Non-Enzimatik Endojen Antioksidanlar**

Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Bilirubin, Glutasyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin(60).

## **Eksojen Antioksidanlar**

*Vitamin Eksojen Antioksidanlar:*

$\alpha$ -tokoferol (vitamin E),  $\beta$ -karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat).

*İlaç Yapıda Eksojen Antioksidanlar:*

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar), rekombinant süperoksit dismutaz trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin) nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1) (61).

## **2.5 Antikoagülanlar ve İskemi Reperfüzyon Hasarı**

Antikoagülanlar cerrahi veya endovasküler girişimler sonrası klinik tedavide önemli yer almaktadır.UFH veya DMAH'ler arteryel trombüsün ilerlemesini önlemek için klinik pratikte çok sık kullanılır ve bundan dolayı etkilenmiş organın vasküler akımını artırır.Deneysel çalışmalarda UFH'nin endotelial permeabiliteyi ve pH'ı modüle ettiği belirtilmiştir (62). Yakın zamanda yapılmış deneysel çalışmalarda alt ekstremitte iskemisi başladıktan hemen sonra verilen enoksaparin lokal tromboz markerlarında anlamlı azalmaya yol açtığı ancak ekstremitte kurtarmada anlamlı etkinliği olmadığı gösterilmiştir(63).Bu bulguların aksine bazı datalarda travmatik beyin hasarı başladıktan 30 saat sonra enoksaparin verilmesinin doku ödemi ve infarkt çapını azalttığı gösterilmiş olup bu bulgu iskemik beyin dokusunun akut hasarı sonrası DMAH verildiğinde fayda görebileceğini göstermektedir (64).

Yakın zamanda Aktive Protein C (APC)gibi ajanlar da İRH'da araştırılmaya başlandı.APC'nin etkisi trombomodüline bağlanma sonrası trombin inhibisyonu yoluyla olmaktadır (65). Deneysel çalışmalarda APC'nin İRH'da histolojik değişiklikleri ve

inflamasyonu azalttığı gösterilmiş ancak biyokimyasal belirteçlerde değişiklik saptanmamış (66).

## **2.6 Apiksaban**

Apiksaban oral kullanılan direkt FXa inhibitörü olup Vitamin K antagonistlerinde (VKA) görülen dar terapötik indeks,yakın monitörizasyon,yüksek ilaç ve yemek etkileşimi gibi sorunları önlemek için geliştirilmiştir (67).

Direkt etkili FXa inhibitörü olup birçok endikasyon açısından onay almıştır (68). Faz 3 klinik çalışmaların sonucunda Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin(DMAH) ve VKA'lerine önemli bir alternatif olduğu gösterilmiştir.Non-valvüler atriyal fibrilasyon (AF)'de günlük 2x5 mg dozun warfarin ile karşılaştırmalı çalışmasında sistemik emboli ve inme riskinde %21,majör kanamada %31 ve ölüm riskinde %11 azalma olduğu görülmüş(69).

Non-valvüler AF olan ve VKA tedavisine uyumsuz olan hastalarda apiksaban ile aspirin arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmada sistemik emboli ve inme riskinde majör kanama riskinde ciddi artış olmadan %50'den fazla azalma olduğu görülmüş (70).

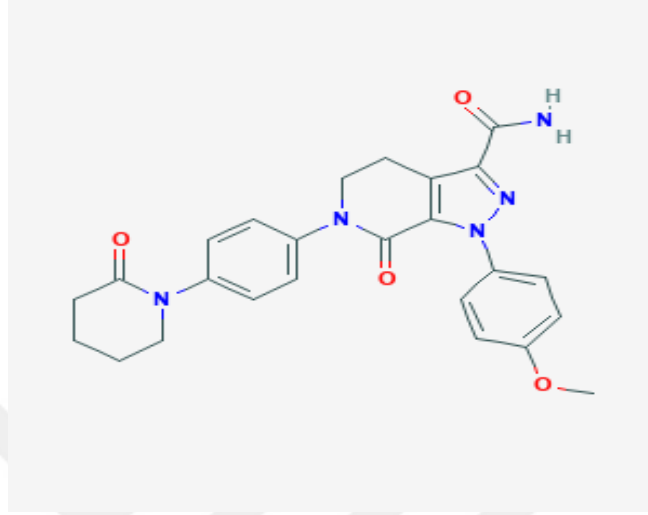
Venöz tromboemboli(VTE) profilaksisinde kalça ve diz cerrahisi sonrası günlük 2.5 mg çift doz apiksaban'ın 40 mg tek doz enoksaparine majör kanama riskini artırmadan etkinlik açısından üstün olduğu,30 mg çift doz enoksaparine farklılık olmadığı saptanmış (71). Ayrıca VTE tedavisinde 1 mg/kg enoksaparin ile birlikte başlanan VKA tedavisi ve yedi gün 10 mg çift doz apiksaban ve ardından 5 mg çift doz ile idame edilen 6 aylık tedavi karşılaştırmasında etkinlik farkı olmadığı,majör kanama komplikasyonlarında %69 azalma olduğu görülmüş (72). Ayrıca uzamış VTEtedavisinde(6 aydan uzun) günlük 2.5 mg çift doz apiksaban tedavisinin plaseboyla karşılaştırmasında rekürren DVT riskinin belirgin azaldığı ve kanama riskinin artmadığı gözlenmiş (73).

## **Farmakolojik Özellikler**

### **Etki Mekanizması**

Apiksaban potent,direkt,reversibl ve yüksek selektif bir FXa inhibitörüdür (74). Etkinliği için antitrombin III'e gerek duymaz (75). Serbest ve pıhtıya bağlı FXa'yı ve birlikte protrombinaz aktivitesini inhibe ederek pıhtı büyümesini önler.FXa inhibisyonu ile trombin oluşumunu ve trombüs gelişimini önler.Trombosit agregasyonu üzerine direkt etkisi yoktur

ancak trombin tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu dolaylı yoldan inhibe eder (76).



Şekil 12 Apiksaban'ın kimyasal formülü (C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>)

### Farmakokinetik Özellikler

Oral alım sonrası maksimum plazma konsantrasyonuna 3-4 saatte ulaşır(77). Absorbsiyonu primer olarak ince barsakta olup diğer gastrointestinal sistem boyunca giderek azalır (78). Yaklaşık biyoyararlanımı %50 civarı olup yemeklerle biyoyararlanım arasında bir ilişki yoktur (79). Plazma proteinlerine bağlanma oranı %87 olup temel protein albümindir (80). Son evre böbrek yetmezliği(CrCL<15ml/h) ve hafif-orta karaciğer yetmezliğinde proteinlere bağlanma oranı değişmemektedir (81,82).

Dağılım hacmi yaklaşık 21 litre olup esas olarak vasküler ve interstisyel sıvıyı içeren ekstrasellüler sıvıya dağılım gösterir. Apiksabanın total plazma klirensi 3.3 lt/h olup renal klirensi 0.9lt/h'dir (total klirensin yaklaşık %27'si) (68) . Eliminasyon yarı ömre yaklaşık 12 saattir (83). Günlük çift doz apiksaban kullanımı ile kararlı durum konsantrasyonuna üç günde ulaşılır (84).

Değişmeyen apiksaban plazmadaki majör komponenti oluşturup aktif metaboliti bulunmamaktadır. Metabolizması temel olarak CYP3A4 enzimi ile gerçekleşmekte olup eliminasyonu feçes, idrar ve az miktarda safra ile olmaktadır.

Yaş, cinsiyet, ağırlık ve etnisiteye göre doz ayarlaması gerekmemektedir. Renal hasar durumunda kreatinin klirensine göre apiksaban eğri altında kalan alan (AUC) değerleri yükselmektedir. Sağlıklı kişiler ile karşılaştırıldığında bu artış hafif böbrek yetmezliğinde %9, orta böbrek yetmezliğinde % 28 ve ciddi böbrek yetmezliğinde %44 civarında görülmektedir. Hemodiyaliz alan son evre böbrek yetmezliği hastalarında bu artış %36 olup hemodiyaliz apiksaban düzeyini %14 kadar azaltmaktadır. Ciddi böbrek yetmezliği (CrCl 15-29ml/dk) olan NVAF hastalarında günde çift doz 2.5 mg apiksaban dozuna düşülmelidir. Kreatinin klirensi <15 ml/dk olan veya hemodiyaliz alan hastalarda kullanımı önerilmemektedir.

Hafif ve orta karaciğer yetmezliğinde (Child Pugh Class A ve B) doz ayarlaması gerekmemekte olup ciddi karaciğer yetmezliğinde (Child Pugh Class C) kullanımı koagülopati durumu nedeniyle kontrendikedir (85).

### **Farmakodinamik Özellikler**

Apiksaban klasik pıhtılaşma testlerinde (PT, APTT gibi) uzama yapar ve bu testlerde doz bağımlı artış gösterir. Ancak bu değişiklikler daha az olması ve variabilite göstermesi nedeniyle klinik takipte efektif değildir.

### **Endikasyonları**

**Tablo III: Apiksabanın Onaylanmış Endikasyonları**

Apiksaban Onaylanmış Endikasyonları	Önerilen Doz
<u>VTE Profilaksisi</u>	
Kalça cerrahisi sonrası 32-38 gün	2.5 mg 2x1
Diz cerrahisi sonrası 10-14 gün	2.5 mg 2x1
<u>Non-valvüler AF'de sistemik emboli ve inme profilaksisi</u>	5 mg 2x1
<u>Doz ayarlanması</u>	
>80 yaş, <60 kg veya kreatinin <1.5 mg/dl	2.5 mg 2x1
<u>VTE Tedavisi</u>	
ilk 7 gün	10 mg 2x1
6. aya kadar	5 mg 2x1
>6 ay ( uzatılmış tedavi )	2.5 mg 2x1

### **Kontrendikasyonları:**

- Hipersensitivite
- Aktif ve klinik olarak anlamlı kanama
- Koagülopatiye yol açan hepatik yetmezlik
- Son evre böbrek yetmezliği
- Antikoagülan başka ajan kullanımı
- Aktif veya yakın zamanlı gastrointestinal sistem ülserleri, kanama riski yüksek malign neoplazmlar, yakın zamanda geçirilmiş serebral veya spinal cerrahi, yakın zamanda geçirilmiş intraserebral kanama, özefagus varisleri, arteriovenöz malformasyonlar
- Major spinal veya serebral vasküler anomaliler (68)

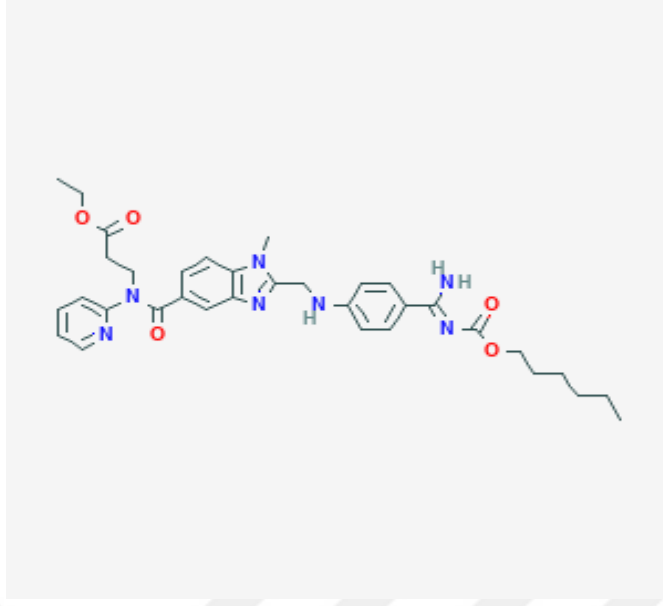
### **2.7 Dabigatran**

Warfarinin dar terapötik indeksi, hastalarda variabilite göstermesi, etkisinin geç başlayıp geç sonlanması, yemek ve ilaçlarla yüksek etkileşime girmesi kullanımını zorlaştırmaktadır (86). Direkt trombin inhibitörleri (DTI) antikoagülasyonda ayrı bir sınıf olarak günümüzde kullanılmaktadır. Üç intravenöz DTI seçeneği mevcut olup bunlardan lepirudin ve argatroban heparine bağlı immün trombositopenide bivaluridin ise peruktan koroner girişimlerde primer olarak kullanılmaktadır (87). Dabigatran 2010 yılında FDA onayı almış olan oral DTI olup VTE profilaksisi ve tedavisi ile non-valvüler AF'ye bağlı tromboemboli profilaksisinde kullanılmaktadır (88).

### **Farmakolojik Özellikler**

#### **Etki Mekanizması**

Dabigatran eteksilat bir ön ilaç olup KC'de aktif metaboliti olan dabigatrana dönüştürülür (89). Ön ilaç olması gereklidir çünkü dabigatran yüksek derecede hidrofilik olup oral biyoyararlanımı yoktur (90). Selektif trombin inhibitörü olup koagülasyon kaskatını da içeren diğer enzimlere karşı çok düşük affiniteye sahiptir. Direkt trombin inhibisyonu ile fibrinojenin fibrine dönüşümünü engelleyerek trombüs oluşumunu durdurur (89).



**Şekil 13**Dabigatran eteksilat kimyasal formülü(C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>)

### **Farmakokinetik Özellikler**

Dabigatranın oral biyoyararlanımı %7.2 olup absorbe olmayan kısmı feçes ile atılır.Kan dolaşımına geçen kısmı ise böbreklerden glomerüler filtrasyon ile elemine edilir.Maksimum plazma konsantrasyonuna iki saatte ulaşmakta olup yarılanma ömrü 8-10 saattir. Kararlı durum konsantrasyonuna üç günde ulaşır(91).Yemeklerle oral biyoyararlanımda değişiklik bulunmamaktadır(92).Plazma proteinlerine bağlanma oranı %35 olup sitokrom p450 enzimleri ile metabolize olmazlar ve bu enzim aktivitleri üzerine induksiyon veya inhibisyon şeklinde bir etkisi yoktur. Dabigatran eteksilat P-glikoprotein (P-gp)'in bir substratıdır ancak bunun üzerine induksiyon veya inhibisyon gibi bir etkisi yoktur. Aktif form olan dabigatran ise P-gp substratı değildir.

65 yaş üstü popülasyonda yarılanma ömrü 12-14 saate kadar artmış olup bu durumun yaşla birlikte azalmış olan renal klirens ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle yaşlı hastalarda yakın monitörizasyon önerilmekle birlikte doz ayarlamasına gerek yoktur.Cinsiyete bağlı da doz ayarlaması gerekmemektedir (92).

Orta derecede hepatik yetmezlikte (Child Pugh Class B) dabigatran eteksilatın dabigatrana dönüşümü daha yavaş olsa da ortalama AUC değerleri sağlıklı kişilerle benzerbulunmuştur. Bu yüzden hafif-orta karaciğer yetmezliğinde doz ayarlaması

gerekmemektedir(93). Hafif böbrek yetmezliği (CrCl 50-80ml/dk), orta derecede böbrek yetmezliği (CrCl 30-50ml/dk) ve ciddi böbrek yetmezliği (CrCl <30 ml/dk) olan hastalar sağlıklı kişilerle kıyaslandığında ortalama AUC değerlerinde sırasıyla 1.5 kat, 3.2 kat ve 6.3 kat artış olduğu saptanmıştır. Bu nedenle böbrek yetmezliği seviyesi arttıkça dabigatran düzeyleri artmaktadır. Ciddi renal yetmezlikte yarılanma ömrü de 28 saate kadar yükselmektedir. Hemodiyaliz ise dabigatran dozunun %62-68'ini temizler (94).

### Farmakodinamik

Kan koagülasyon parametelerindedoz bağımlı olarak plazma konsantrasyonu ile paralel artış görülmekte birlikte takipte kullanılmamaktadır. Pıhtılaşma testlerinden özellikle trombin zamanı (TT) ve ekarin pıhtılaşma zamanı (ECT) doz artışı ile daha yakın korelasyon ve sensitivite göstermektedir (92).

### Endikasyonları

**Tablo IV:**Dabigatranın Onaylanmış Endikasyonları

Dabigatranın Onaylanmış Endikasyonları	Önerilen Doz
<u>VTE Profilaksisi</u>	
Cerrahiden 1-4 saat sonra	110 mg 1x1
Diz cerrahisi ise 10 gün	220 mg 1x1
Kalça cerrahisi 28-35 gün	220 mg 1x1
<u>Doz Ayarlaması</u>	
Orta derecede böbrek yetmezliği	75 mg (başlangıç) 1x1
Verapamil, amiodaron, kinidin kullanımı	150 mg (devam dozu ) 1x1
>75 yaş	
<u>VTE Tedavisi</u>	
İlk 5 gün	Parenteral tedavi
Devam tedavisi	150 mg 2x1
<u>Non-valvüler AF'de tromboemboli profilaksisi</u>	
	150 mg 2x1
<u>Doz Ayarlanması</u>	
>80 yaş, Verapamil kullanımı	110 mg 2x1
75-80 yaş	
Orta derecede böbrek yetmezliği	Hastanın bireysel durumu ve tromboemboli riski göz önüne alınarak
Gastrit,Özefajit, Gastroözefageal reflü,	110 mg 2x1
Kanama riski artışı olan diğer hastalar	



## **Kontrendikasyonları**

- Hipersensitivite
- Ciddi renal yetmezlik
- Aktif ve klinik olarak anlamlı kanama
- Koagülopatiyeye yol açan hepatik yetmezlik
- Antikoagülan başka ajan kullanımı
- Aktif veya yakın zamanlı gastrointestinal sistem ülserleri, kanama riski yüksek malign neoplazmlar, yakın zamanda geçirilmiş serebral veya spinal cerrahi, yakın zamanda geçirilmiş intraserebral kanama, özefagus varisleri, arteriovenöz malformasyonlar
- P-gp inhibitörleri ile birlikte kullanım (Ketokonazol, siklosporin, itrokonazol, dronaderon)
- Antikoagülan kullanımı gerektiren prostetik kalp kapakları (95)

## **2.8 Rivaroksaban**

Spesifik olarak tek bir koagülasyon faktörünü inhibe eden (örneğin faktör Xa veya trombin) direk oral antikoagülanlar hâlihazırda var olan antikoagülanların zorluklarının üzerinden gelmek üzere son yıllarda geliştirilmişlerdir. Faktör Xa kanın pıhtılaşma sürecinde merkezi bir rol oynar ve hem intrinsik hem de ekstrinsik yolla aktive olur. Faktör Xa direk olarak protrombinaz kompleksi aracılığıyla protrombini trombine çevirir ve oluşan trombin aracılığıyla plateletlerin aktivasyonunu ve fibrin pıhtı oluşumunu sağlar. Hem prelinik hem de klinik çalışmalar efektif antikoagülasyon için faktör Xa ve trombinin geçerli hedefler olduğunu göstermiştir. Çeşitli tromboembolik endikasyonlarda yapılan çalışmalarda VKA (ör:warfarin) ve DMAH gibi konvansiyonel antikoagülanlarla karşılaştırıldığında direk faktör Xa veya direk trombin inhibitörlerinin kullanımının benzer veya daha iyi etkinlik ve güvenilirlik profilleri oluşturduğu gösterilmiştir (96).

VKA'lardan farklı olarak bu direk oral antikoagülanların daha tahmin edilebilir farmakokinetik ve farmakodinamik etkilerinin olduğu, daha düşük ilaç-ilaç etkileşim potansiyellerinin olduğu ve rutin koagülasyon monitörizasyonu gerektirmeden sabit dozlarda verilebileceği gösterilmiştir (97). Bu bileşiklerden birkaçının (örn: rivaroksaban, apiksaban, dabigatran etexilat) spesifik tromboembolik bozuklukların tedavisinde kullanılması düzenleyici kurullar tarafından faz 3 çalışmalar baz alınarak onaylanmıştır. Bu ilaçlardan



## Farmakokinetik

Rivaroksaban çok hızlı bir şekilde emilir ve tek doz (1,25 – 80mg) veya multipl doz şeklinde (30mg'a kadar günde 2 kez olacak şekilde) alındıktan sonra yaklaşık 2-4 saat içerisinde maksimum plazma konsantrasyonuna (Cmax) ulaşır. Rivaroksaban multiple dozlarla ilintili derecede birikim göstermez (99). Sağlıklı deneklerle yapılan diğer faz 1 çalışmalarından alınan veriler 10mg lık tablet alındıktan sonra aç veya tok karnına alınması fark etmeksizin absorpsiyonun neredeyse tamamen (oral biyoyararlanım %80-100'e yaklaşmakta) gerçekleştiğini göstermiştir. 10mg'lık rivaroksaban dozunun yemekle birlikte alınması Cmax'ı veya ortalama AUC düzeyini etkilememektedir. Aksine 20mg lık tablet'in biyoyararlanımı açlık durumunda %66'dır. 20mglık rivaroksaban tabletin yemeklerle birlikte alınmasıyla absorpsiyon derecesi neredeyse tamama yaklaşmıştır ve ortalama AUC değerinde %39'luk bir artış göstermiştir. Ek olarak rivaroksabanın farmakokinetiği üzerine hangi tür yiyeceğin yenilmesiyle ilgili (yüksek yağ içerikli veya yüksek KH içerikli) de bir etki yoktur (101).

İnsanlarda rivaroksabanın plazma proteinlerine bağlanma oranı yüksektir (in vitro yaklaşık olarak %92-95) ve geri dönüşlüdür. Ana bağlayıcı plazma protein serum albümindir. Yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanma özelliğinden dolayı rivaroksaban diyalizle elimine edilemez. Kararlı durumdaki dağılım volumü yaklaşık olarak 50litredir (0,62L/kg) ve bu perifer dokulara düşük-orta derecede bir affinitesi olduğunu gösterir (102).

Rivaroksabanın eliminasyonu iki yoldan gerçekleşir: Değişmemiş ilacın renal eliminasyonu ve ilacın metabolik olarak parçalanması. Yaklaşık olarak alınan dozun 1/3'ü (%36) değişmemiş aktif ilaç olarak renal yoldan idrarla elimine edilir. İdrarla elimine edilen %36 oranındaki rivaroksaban dozunun %30'u aktif renal sekresyon, %6'sı da glomerüler filtrasyonla sağlanır(103). İn vitro ve invivo olarak yapılan ilaç etkileşim çalışmalarında aktif renal sekresyona karışan taşıyıcıların P-gp ve meme kanseri rezistans protein [BCRP (ABCG2)] olduğu öne sürülmüştür (104).

Alınan dozun yaklaşık olarak 2/3'ü metabolik parçalanmayla elimine edilir. Rivaroksaban çeşitli sitokrom p450 enzimleri (CYP 3A4/5, CYP 2J2) ve CYP bağımsız mekanizmalarla metabolize edilir. Bu klerens yollarının payları niceliksel olarak hesaplandığında ortalama değerleri: CYP 3A4 yaklaşık olarak %18, CYP2J2 yaklaşık olarak %14 (total rivaroksaban eliminasyonu üzerinden). Bu oksidatif biyotransformasyona ek

olarak nonCYP olarak sağlanan amid bağarının hidrolizi de total rivaroksaban eliminasyonunun yaklaşık olarak %14'ünü oluşturur. Ortaya çıkan metabolitler de renal veya hepatobiliyer yollardan elimine edilir(105).

### Farmakodinamik

1.25-80 mg tek doz rivaroksaban oral alım sonrası maksimal FXa inhibisyon etkisi 1-4 saatte ortaya çıkar ve 24 saat boyunca bu etki izlenir. FXa inhibisyon etkisi doz bağımlı olarak artmaktadır. PT, APTT gibi klasik koagülasyon testlerinde doz bağımlı artışa sebep olmakla birlikte klinik takipte kullanılmamaktadır (100).

### Endikasyonları

**Tablo V:Rivaroksabanın onaylanmış endikasyonları**

<b>Rivaroksabanın Onaylanmış Endikasyonları</b>	<b>Önerilen Doz(a,b,c)</b>
Elektif Kalça ve Diz Replasman Cerrahisi Sonrası VTE'nin Önlenmesi	
- 5 hafta (Elektif Kalça Replasmanı Cerrahisi)	10 mg (Günde 1 kez)
- 2 hafta (Elektif Diz Replasmanı Cerrahisi)	10 mg (Günde 1 kez)
DVT ile PE Tedavisi, Rekürren DVT Önlenmesi	
- İlk 21 gün	15 mg (Günde 2 kez)
- 22.gün ve sonrası	20 mg (Günde 1 kez)
Non-Valvuler AF'si olan Hastalarda İnmenin Önlenmesi (b)	
- Kreatinin Klerensi $\geq$ 50ml/min	20 mg (Günde 1 kez)
- Kreatinin Klerensi 15-49 ml/min	15 mg (Günde 1 kez)
Eleve Kardiyak Biyomarkerleri olan AKS'lu Hastalarda Aterotrombotik Olayların Önlenmesi ©	2,5 mg (Günde 2 kez)
a) Rivaroksabanın tüm önerilen dozları Kre-Kle 15-29ml/min olanlarda dikkatli kullanılmalıdır. Rivaroksaban Kre-Kle <15ml/min olan hastalarda önerilmez	
b) KKY, HT, yaş $\geq$ 75, DM , geçirilmiş inme ve TİA gibi 1 veya daha fazla risk faktörü ile birlikte	
c) Rivaroksaban aspirin, klopidogrel veya tiklopidin ile birlikte kullanılır. (Avrupa Birliğinde)	

### **Kontrendikasyonları**

- Hipersensitivite
- Aktif ve klinik olarak anlamlı kanama
- Antikoagölan başka ajan kullanımı
- Aktif veya yakın zamanlı gastrointestinal sistem ülserleri, kanama riski yüksek malign neoplazmlar, yakın zamanda geçirilmiş serebral veya spinal cerrahi, yakın zamanda geçirilmiş intraserebral kanama, özefagus varisleri, arteriovenöz malformasyonlar
- Geçici iskemik atak (TIA) veya inme öyküsü olan akut koroner sendrom(AKS) hastalarında antitrombosit tedavi ile birlikte kullanım
- Son bir ay içinde inme, hemorajik veya laküner serebral infarkt öyküsü olan koroner arter ve periferik arter hastalığı olgularında asetilsalisilik asit (ASA) ile birlikte kullanım
- Child Pugh sınıf B ve C hepatik yetmezlik
- Gebelik ve laktasyon (98)

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Araştırmanın Tipi**

Deneysel olarak planlanan çalışmada infrarenal iskemi reperfüzyon hasarı öncesi gavaj ile uygulanan yeni nesil oral antikoagülanların (rivaroksaban, apiksaban, dabigatran) iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkileri araştırıldı.

#### **3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı**

Çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde Şubat 2019 tarihinde gerçekleştirildi.

#### **3.3 Etik Kurul Onayı**

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK)'nun 29/06/2018 tarih,2018/082 kayıt numaralı onayı alındı.

#### **3.4 Kullanılan Deney Materyali**

Bu çalışmada kullanılan ratlar Adnan Menderes Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş olup çalışmada 40 adet Wistar-Albino cinsi, 6–8 haftalık dişi (210– 300 g) ratlar kullanıldı. Bakım ve beslemeleri çalışma boyunca 24° çevre sıcaklığı, % 55–60 nem ve 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü şartlarında gerçekleştirildi. Kuru pellet yemle ve musluk suyuna serbest erişimi sağlandı.

#### **3.5 Deney Grupları ve Uygulama Protokolü**

Daha önceden temin edilen 40 adet sıçan rasgele 5 gruba ayrıldıktan sonra iskemi reperfüzyon hasarı çalışması öncesi daha önce planlanmış olan çalışmalarda belirtilen dozlarda rivaroksaban, apikasan ve dabigatran oral gavaj ile 1 hafta boyunca verilerek hazırlık yapıldı. İlaçlar distile su içinde çözülerek verildi. Apiksaban dozu günde 2 kere olması nedeniyle apiksaban grubunda verilen distile su miktarı kadar distile su gavaj ile diğer gruplara da günde 2 kere olmak üzere verildi.1 hafta süre sonrası iskemi reperfüzyon hasarı amaçlı ratlar hazırlandı.

Ketamin ve ksilazin ile anestezi sağlanmasını takiben median laparotomi ile abdominal aortaya ulaşılarak infrarenal seviyeden abdominal aorta klempe edildi. Abdominal

aort klemp süresi 60 dakika olup ardından klemp kaldırılarak 120 dakika beklendi.120 dakika sonrası kardiyak ponksiyon ile yaklaşık 1cc kan ve alt ekstremite kas dokusu örnekleri alındı. Kas dokusu ve kanda TAS-TOS ve TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$  ve IL-6 seviyelerine bakıldı. Kas dokusu örnekleri patolojide daha öncelikli çalışma örneklerinde olduğu gibi direkt mikroskopik incelemeye alındı. İşlem sonrası hayvanlar sakrifiye edildi.

**Tablo VI:**Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler

Çalışma Grupları	Uygulanan İşlemler
Kontrol Grubu	Sadece diğer gruplardaki kadar oral gavaj ile distile su verilip bu gruba iskemi-reperfüzyon hasarı prosedürü uygulanmadı.Median laparotomi sonrası hemen kas dokusu ve kan örnekleri alındı.
Sham Grubu	Bu gruba herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamış olup iskemi reperfüzyon hasarı prosedürü uygulandı.Ardından kas dokusu ve kan örnekleri alındı.
Grup 1	Bir hafta süre ile Rivaroksaban oral gavaj ile 3 mg/kg dozunda günde bir kere verildi. Ardından iskemi reperfüzyon hasarı prosedürü uygulandı.
Grup 2	Bir hafta süre ile Dabigatran oral gavaj ile 15 mg/kg dozunda günde bir kere uygulup ardından iskemi reperfüzyon hasarı prosedürü uygulandı.
Grup 3	Bir hafta süre ile Apiksaban 10 mg/kg dozunda günde iki kere uygulanıp ardından iskemi reperfüzyon hasarı prosedürü uygulandı (Apiksaban dozu günde iki kere olması nedeniyle her gruba günde iki kere gavaj ile eşit miktarda distile su verildi)

### 3.5.1İlaçların Hazırlanması

Rivaroksaban(3 mg/kg),apiksaban(10 mg/kg) ve dabigatran(15 mg/kg) 2 cc distile su içinde homojen dağılım sağlanacak şekilde 1 hafta süre boyunca gavaj ile ratlara verildi.Apiksaban dozu günde 2 kere olması nedeniyle diğer ilaç grupları ile sham ve kontrol grubuna da günlük 2 cc ek distile su dozu gavaj ile uygulandı.

**Resim 3.1**Gavaj ile ilaç uygulaması



### **3.5.2 Cerrahi Yöntem**

Çalışma öncesinde sıçanlar 12 saat süreyle aç bırakıldı. Bu süre içinde su içmelerine izin verildi. Anestezi için intraperitoneal yoldan 50 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulandı. Bu dozun 1/3' ü gerektiğinde intramuskuler olarak tekrarlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Supin pozisyonda yatırılıp cerrahi sahaları tıraş edildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılmasının ardından infrarenal abdominal aorta eksplore edildi. Abdominal aortaya atravmatik bir mikrovasküler klemp konularak iskemi yapıldı. Klemp 1 saat süreyle burada



tutuldu. Klemp kaldırılmasından iki saat sonra tüm ratlardan intrakardiyak ponksiyonla 1 cc kan örneği alındı. Ardından gastrocnemius kası blok olarak çıkarıldı. Anestezi altında dekapitasyonla ötanazi uygulandı. Çıkarılan dokular -80° de derin dondurucuda (SANYO MDF-U2086S®) eppendorf tüpüne alınarak saklandı.

**Resim 3.2** İntraperitoneal anestezi uygulanması



**Resim 3.3** İnfrarenal abdominal aorta



**Resim 3.4** Buldog klemp ile infrarenal aortanın klemplenmesi



### **3.6 Biyokimyasal Analiz**

#### **3.6.1 Kan örnekleri:**

Kan örnekleri katkı maddesi içermeyen biyokimya tüplerine alındı. 2 saat içerisinde 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Serum, mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak çalışma gününe kadar -85 derecede donduruldu.

#### **3.6.2 Doku örnekleri:**

Kas dokusu alındıktan sonra içerisine herhangi bir katkı maddesi eklenmeden -85 derecede donduruldu. Dokular derin dondurucudan çıkarılarak çözünmesi sağlandıktan sonra pH:7,4 olan fosfat tampon ile 1/10 hacim oranında karıştırılarak bir homojenizatör (PRO 250 scientologyinc. Monreo, CT USA) ile homojenize edildi. Homejenata 20000 g'de 15 dakikalık bir santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen süpernatanttan aynı gün TNF-a, IL-1b, IL-6, TAS, TOS ve protein ölçümleri yapıldı.

#### **Serum ve doku homojenatı Örneklerinde TAS Düzeylerinin Saptanması**

Örneklerde TAS realassay kolorimetrik kiti (Mega tıp sanayi ve tic. Limited şirketi, mücahitler mah. 52012 nolu cadde, Şehitkamil, Gaziantep, Türkiye) ile ölçüldü. Mikroplak kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde spektrofotometrik olarak (DAR 800, DiagnosticAutomation, CA 91302, USA) 660 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Hesaplamalar ise kit içeriğindeki 1 mmol/L stok standart çözelti kullanılarak yapıldı. Kit içeriğine göre testin çalışma aralığı 0.1 – 3.5 mmol Trolox Equiv. /L, deney içi CV: %3,3 ve deneyler arası CV: % 2,8 olarak verilmiştir.

#### **Serum ve doku homojenatı Örneklerinde TOS Düzeylerinin Saptanması**

Örneklerde TOS relassay kolorimetrik kiti (Mega tıp sanayi ve tic. Limited şirketi, mücahitler mah. 52012 nolu cadde, Şehitkamil, Gaziantep, Türkiye) ile ölçüldü. Mikroplak kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde spektrofotometrik olarak (DAR 800, DiagnosticAutomation, CA 91302, USA) 530 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Hesaplamalar ise kit içeriğindeki 10 umol/L stok standart çözelti kullanılarak yapıldı. Kit içeriğine göre testin çalışma aralığı 0.2 – 80 µmol H2O2 Equiv. /L, deney içi CV: %3,9 ve deneyler arası CV: % 3,2 olarak verilmiştir.

### **Serum ve doku homojenatında TNF-a düzeyi tayini**

Örneklerde TNF-a düzeyleri Elabscience rat ELISA kiti (katalog. No: E-EL-R0019, Elabscience Biotechnology Co.,ltd. Guandong science and teknogy park, WuHan, PRC) ile saptandı. Antikor kaplı 96 kuyucuklu plak kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçları ELISA (DAR 800, Diagnostic Automation, CA 91302, USA) mikropalak okuyucu kullanılarak daha önce hazırlanan standart çözeltiler yardımıyla, 450 nm'de otomatik olarak hesaplandı. Kit içeriğine göre testin hassasiyeti 46.88 pg/mL, çalışma aralığı 78.13-5000 pg/ml, deney içi ve deneyler arası CV<%10 olarak verilmiştir.

### **Serum ve doku homojenatında IL 1β düzeyi tayini**

Örneklerde IL 1β (Interleukin 1 Beta) düzeyleri Elabscience rat ELISA kiti (katalog. No: E-EL-R0012, Elabscience Biotechnology Co.,ltd. Guandong science and teknogy park, WuHan, PRC) ile saptandı. Antikor kaplı 96 kuyucuklu plak kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçları ELISA (DAR 800, Diagnostic Automation, CA 91302, USA) mikropalak okuyucu kullanılarak daha önce hazırlanan standart çözeltiler yardımıyla, 450 nm'de otomatik olarak hesaplandı. Kit içeriğine göre testin hassasiyeti 18.75 pg/mL, çalışma aralığı 31.25-2000 pg/mL, deney içi ve deneyler arası CV<%10 olarak verilmiştir.

### **Serum ve doku homojenatında IL-6 düzeyi tayini**

Örneklerde IL 6 (Interleukin 6) düzeyleri Elabscience rat ELISA kiti (katalog. No: E-EL-R0015, Elabscience Biotechnology Co.,ltd. Guandong science and teknogy park, WuHan, PRC) ile saptandı. Antikor kaplı 96 kuyucuklu plak kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçları ELISA (DAR 800, Diagnostic Automation, CA 91302, USA) mikropalak okuyucu kullanılarak daha önce hazırlanan standart çözeltiler yardımıyla, 450 nm'de otomatik olarak hesaplandı. Kit içeriğine göre testin hassasiyeti 7.5 pg/mL, çalışma aralığı 12.5-800 pg/mL, deney içi ve deneyler arası CV<%10 olarak verilmiştir (106).

### **3.7 Kas Dokularının Histopatolojik İncelemesi**

Histopatolojik incelemeler için alınan doku örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Daha sonra otomatik doku takip cihazında (Leica TP1020, Leica Microsystems, Nussloch, Germany) alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan tüm kesitler Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyandı. Boyamaları yapılan preparatlar, binoküler başlıklı ışık mikroskopunda (Olympus BX51,

Tokyo, Japan) incelendi. Gerekli görülen olgulardan fotoğraflar çekildi (Olympus DP12, microscopic digital camera systems, Tokyo, Japan)

### **Histopatolojik Skorumlama**

Kas dokusu örneklerinin histopatolojik değerdendirilmesinde bakılan parametreler konjesyon, nekroz, atrofi, fibrozis ve enflamasyon olarak belirlendi. Bakılan her parametre için 0 ile 3 arası skorumlama yapıldı.

#### Skorumlamada değerdler:

0: Yok

1: Hafif

2: Orta

3: Şiddetli

### **3.8 İstatistiksel Analiz**

Bu çalışmanın verileri SPSS 26.0 MacOS versiyonu paket programı ile analiz edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık şekilleri) ve analitik yöntemler (Shapiro-Wilk testi) ile değerdendirildi. Araştırmanın tanımlayıcı istatistikleri ortalama  $\pm$  standart sapma (SS), ortanca (minimum, maksimum), sayı (n), yüzde (%) olarak sunuldu. Niceliksel verilerin analitik değerdendirmesinde; normal dağılıma uyan veriler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA, Analysis of Variance) kullanıldı, istatistiksel olarak anlamlı olan verilerin ikili karşılaştırılması için post-hoc değerdendirilmesinde varyanslar homojen dağılmadığı (Levene istatistiği) için Tamhane's T2 testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan veriler için Kruskal Wallis Testi kullanıldı, istatistiksel olarak anlamlı olan verilerin ikili karşılaştırılması için post-hoc değerdendirilmesinde Mann-Whitney U Testi (Bonferoni düzeltmesi ile) kullanıldı. Normal dağılım gösteren niceliksel veriler hata grafiği (error bar, %95 GA) ile, normal dağılım göstermeyen niceliksel veriler ise boks torbası (box plot) grafiği ile gösterildi. Niteliksel veriler, analize uygun olmadığı için analitik değerdendirilme yapılmayıp sayı ve yüzde olarak sunuldu. Tip-1 hata ( $\alpha$ ), 0,05 olarak kabul edildi (107).

## 4.BULGULAR

### 4.1 Biyokimyasal Bulgular

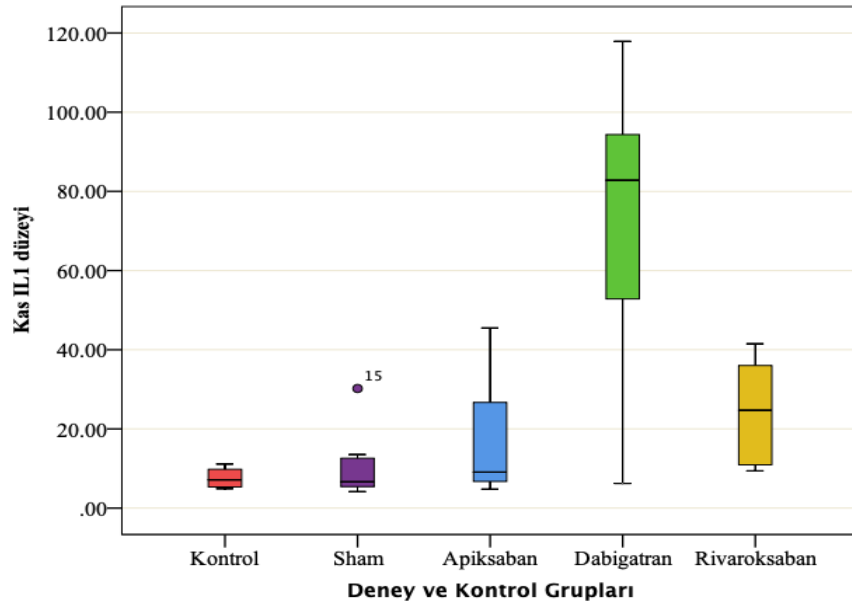
#### 4.1.1 IL-1(Kas Dokusu)

Tablo VII’de kas dokusu IL-1 düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında IL-1 düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,001). İkili alt grup analizlerde bu farkın, kontrol – dabigatran (p=0,002) ve sham – dabigatran (p=0,007) arasında olduğu saptanmıştır. Şekil 15’te de şekilsel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo VII:**Deney ve kontrol grupları iskelet kası IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması

	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri	
Kas IL1	Kontrol	7,57 $\pm$ 2,57	7,13 (4,91 - 11,13)	<b>0,001*</b>
	Sham	10,45 $\pm$ 8,62	6,64 (4,18 - 30,20)	
	Apiksaban	16,91 $\pm$ 15,26	9,08 (4,81 - 45,48)	
	Dabigatran	73,01 $\pm$ 34,95	82,83 (6,22 - 117,88)	
	Rivaroksaban	24,27 $\pm$ 12,86	24,70 (9,40 - 41,49)	

\*Kruskal Wallis Testi



**Şekil 15:** Deney ve kontrol grupları ortanca kas IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması

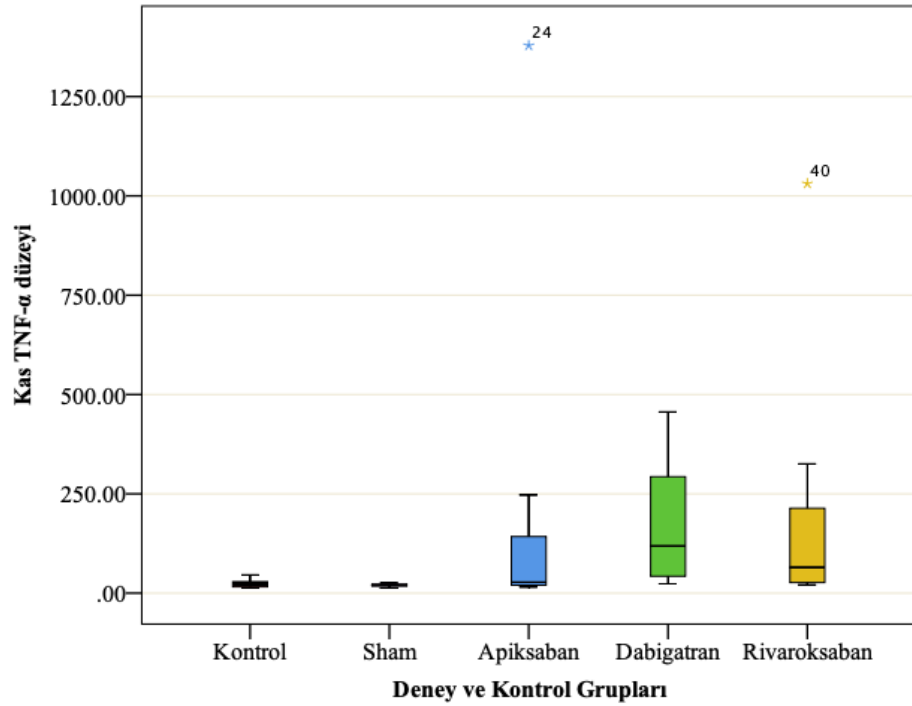
#### 4.1.2 TNF- $\alpha$ (Kas dokusu)

Tablo VIII'de kas dokusu TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında TNF- $\alpha$  düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,003). İkili alt grup analizinde bu farkın sham-dabigatran (p=0,009) ve sham-rivaroksaban (p=0,039) grupları arasında olduğu saptanmıştır. Şekil 16'da da şekilsel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo VIII:**Deney ve kontrol grupları iskelet kası TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Kas TNF $\alpha$	Kontrol	24,47 $\pm$ 10,90	23,69 (12,99 - 45,64)	<b>0,003*</b>
	Sham	19,93 $\pm$ 3,87	20,12 (13,23 - 25,25)	
	Apiksaban	221,67 $\pm$ 473,90	27,57 (15,25 - 1378,43)	
	Dabigatran	173,59 $\pm$ 167,99	119,04 (23,49 - 450,08)	
	Rivaroksaban	207,84 $\pm$ 347,19	64,90 (20,99 - 1030,85)	

\*Kruskal Wallis Testi



**Şekil 16:** Deney ve kontrol grupları ortanca iskelet kası TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırılması



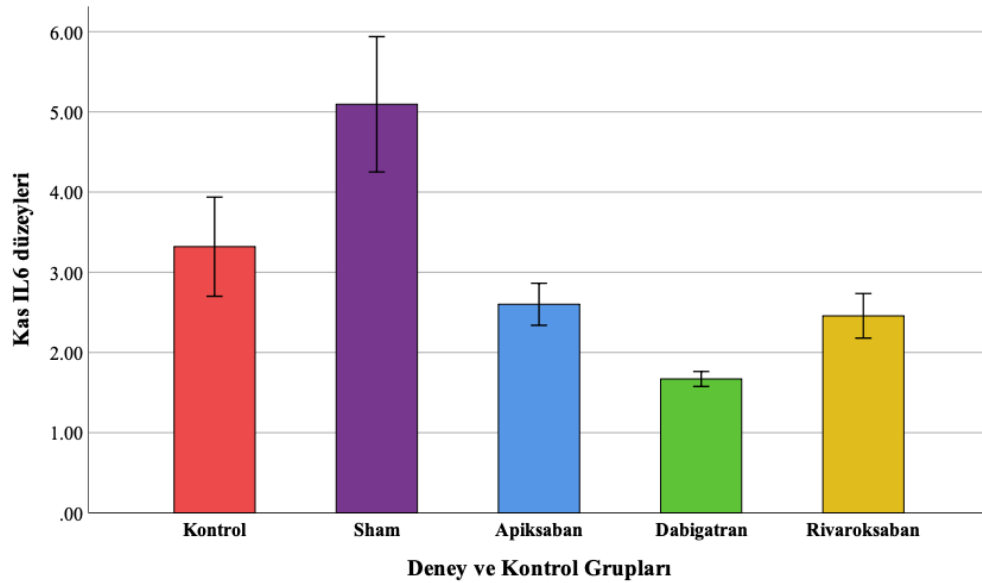
#### 4.1.3 IL-6(Kas dokusu)

Tablo IX'te kas dokusu IL-6 düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında IL-6 düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). İkili alt grup analizinde bu farkın kontrol-sham ( $p = 0,015$ ), kontrol-dabigatran ( $p = 0,004$ ), sham-apiksaban ( $p = 0,001$ ), sham-dabigatran ( $p < 0,001$ ), sham-rivaroksaban ( $p = 0,001$ ), dabigatran-apiksaban ( $p < 0,001$ ) ve dabigatran-rivaroksaban ( $p = 0,002$ ) grupları arasında olduğu saptanmıştır. Şekil 17'de de şekilsel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo IX:** Deney ve kontrol grupları iskelet kası IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Kas IL-6	Kontrol	3,32 $\pm$ 0,74	3,16 (2,58 - 4,87)	<0,001**
	Sham	5,09 $\pm$ 1,00	5,10 (3,33 - 6,92)	
	Apiksaban	2,60 $\pm$ 0,31	2,51 (2,27 - 3,08)	
	Dabigatran	1,66 $\pm$ 0,11	1,71 (1,51 - 1,81)	
	Rivaroksaban	2,45 $\pm$ 0,33	2,35 (2,11 - 2,93)	

\*\*Anova Testi



**Şekil 17:** Deney ve kontrol grupları ortanca kas IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması



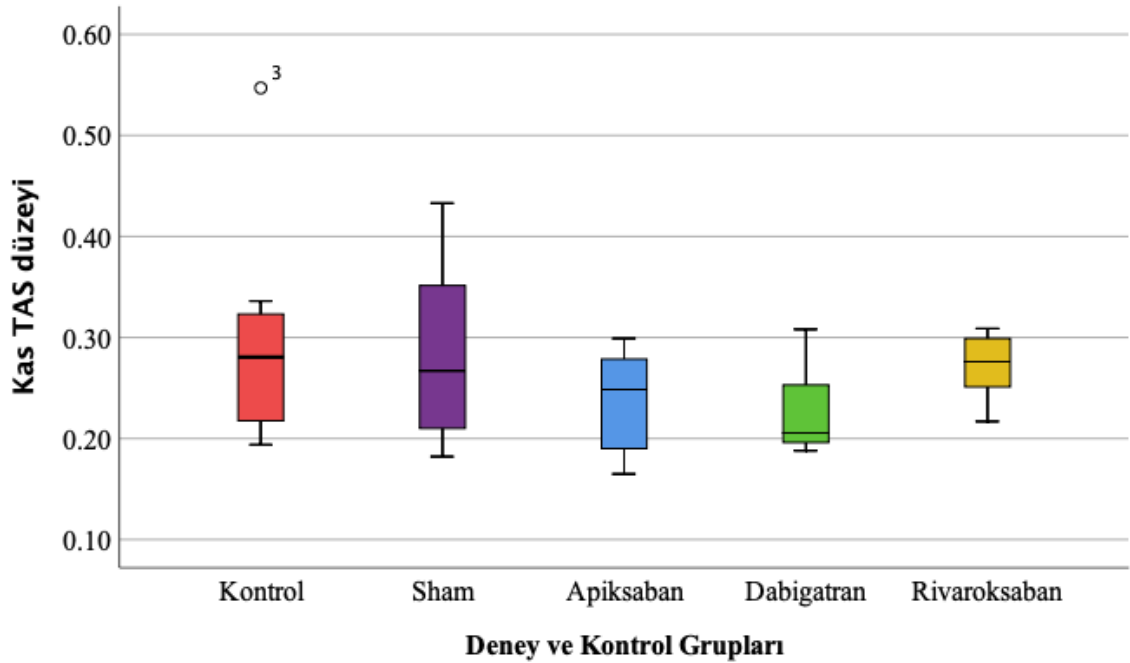
#### 4.1.4 TAS(Kas Dokusu)

Tablo X'tekas dokusu TAS düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında TAS düzeyleriistatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.(p=0,245). Şekil 18'de de grafiksel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo X:**Deney ve kontrol grupları iskelet kası TAS düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Kas TAS	Kontrol	0,30 $\pm$ 0,11	0,28 (0,19 - 0,55)	0,245*
	Sham	0,28 $\pm$ 0,09	0,27 (0,18 - 0,43)	
	Apiksaban	0,23 $\pm$ 0,05	0,24 (0,17 - 0,30)	
	Dabigatran	0,22 $\pm$ 0,04	0,20 (0,19 - 0,31)	
	Rivaroksaban	0,27 $\pm$ 0,03	0,27 (0,22 - 0,31)	

\*Kruskal Wallis Testi



**Şekil 18:** Deney ve kontrol grupları ortancakas TAS düzeylerinin karşılaştırılması

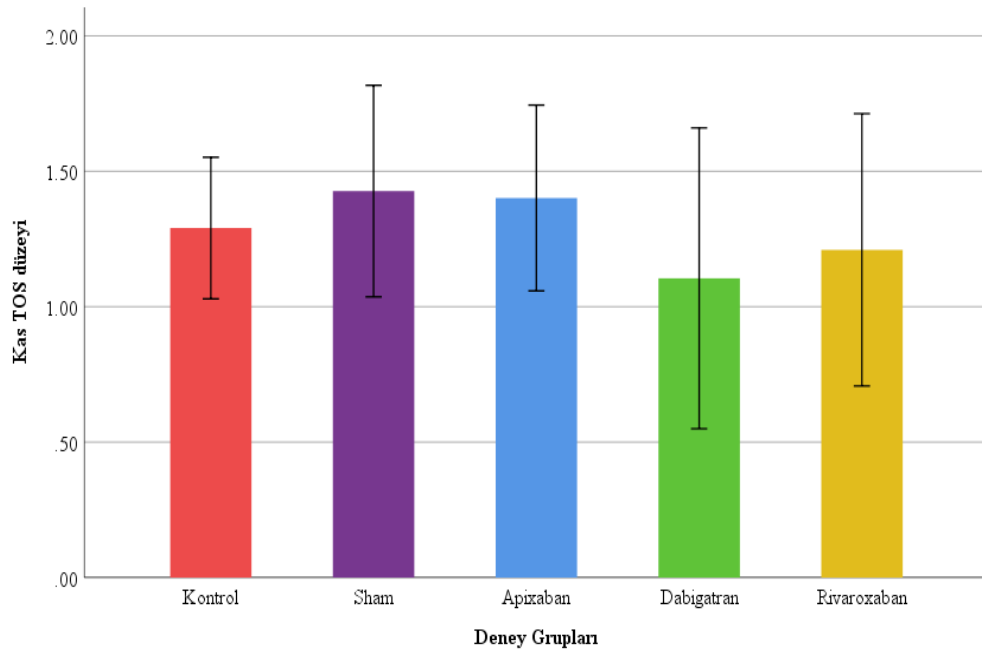
#### 4.1.5 TOS(Kas dokusu)

Tablo XI'de kas dokusu TOS düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.(p=0,694). Şekil 19'de de grafiksel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo XI:**Deney ve kontrol grupları iskelet kası TOS düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Kas TOS	Kontrol	1,29 $\pm$ 0,31	1,34 (0,83 - 1,81)	0,694**
	Sham	1,42 $\pm$ 0,46	1,43 (0,80 - 2,05)	
	Apiksaban	1,40 $\pm$ 0,41	1,25 (1,00 - 2,05)	
	Dabigatran	1,10 $\pm$ 0,66	0,90 (0,08 - 2,11)	
	Rivaroksaban	1,20 $\pm$ 0,60	1,27 (0,11 - 2,02)	

\*\*Anova Testi



**Şekil 19:** Deney ve kontrol grupları ortalamakas TOS düzeylerinin karşılaştırılması

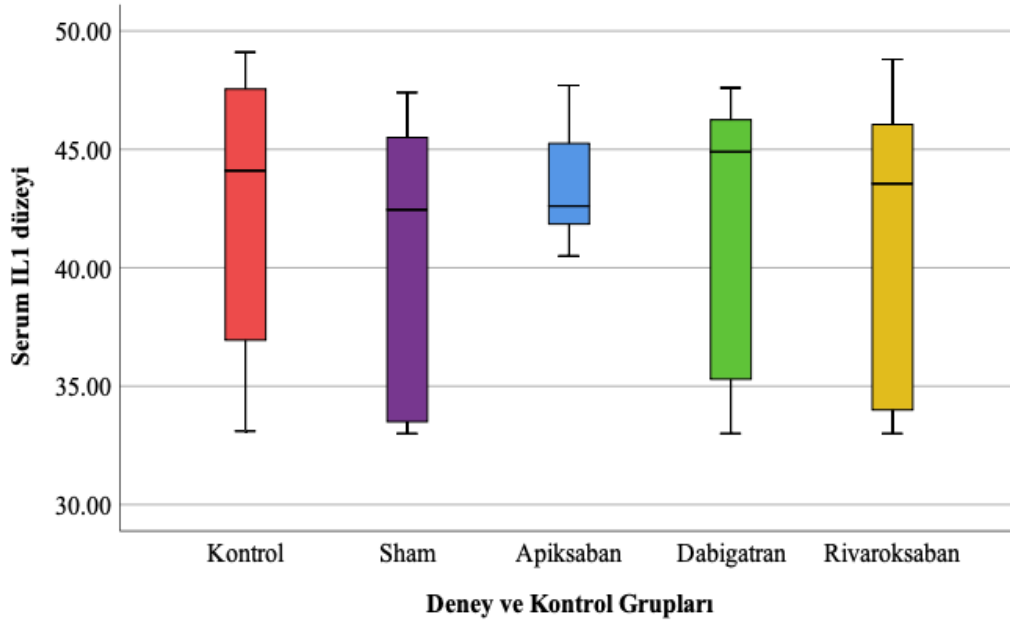
#### 4.1.6 IL-1(Serum)

Tablo XII'de serum IL-1 düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında serum IL-1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.(p=0,926). Şekil 20'de de grafiksel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo XII:**Deney ve kontrol grupları serum IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Serum IL1	Kontrol	42,43 $\pm$ 6,11	44,10 (33,10 - 49,10)	0,926*
	Sham	40,41 $\pm$ 6,20	42,45 (33,00 - 47,40)	
	Apiksaban	43,45 $\pm$ 2,44	42,60 (40,50 - 47,70)	
	Dabigatran	41,68 $\pm$ 6,13	44,90 (33,00 - 47,60)	
	Rivaroksaban	41,12 $\pm$ 6,45	43,55 (33,00 - 48,80)	

\*Kruskal Wallis Testi



**Şekil 20:** Deney ve kontrol grupları ortanca serum IL-1 düzeylerinin karşılaştırılması

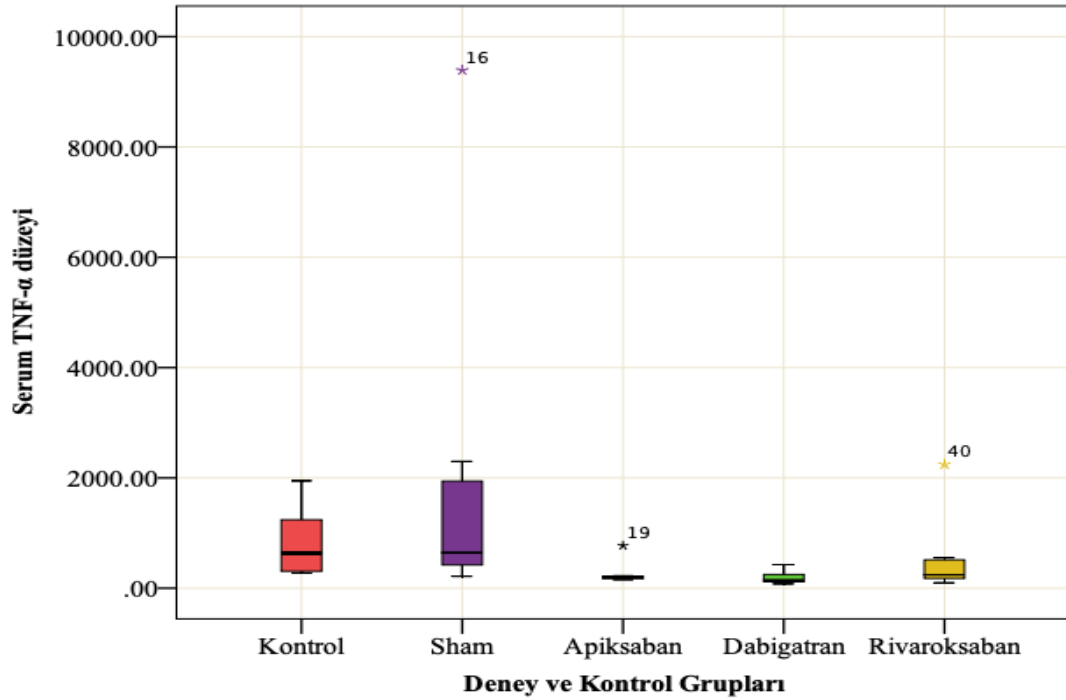
#### 4.1.7 TNF- $\alpha$ (Serum)

Tablo XIII'te serum TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında TNF- $\alpha$  düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,010). İkili alt grup analizinde bu farkın kontrol-dabigatran (p=0,011) ve sham-dabigatran (p=0,005) grupları arasında olduğu saptanmıştır. Şekil 21'de de grafiksel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo XIII:** Deney ve kontrol grupları serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Serum TNF $\alpha$	Kontrol	823,55 $\pm$ 675,85	635,75 (274,10 - 1946,70)	<b>0,010*</b>
	Sham	1953,06 $\pm$ 3088,31	645,45 (216,80 - 9391,50)	
	Apiksaban	264,63 $\pm$ 206,23	203,65 (157,00 - 771,70)	
	Dabigatran	191,90 $\pm$ 120,46	149,40 (79,00 - 427,00)	
	Rivaroksaban	526,28 $\pm$ 711,50	243,05 (95,90 - 2243,90)	

\*Kruskal Wallis Testi



**Şekil 21:** Deney ve kontrol grupları ortanca serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırılması

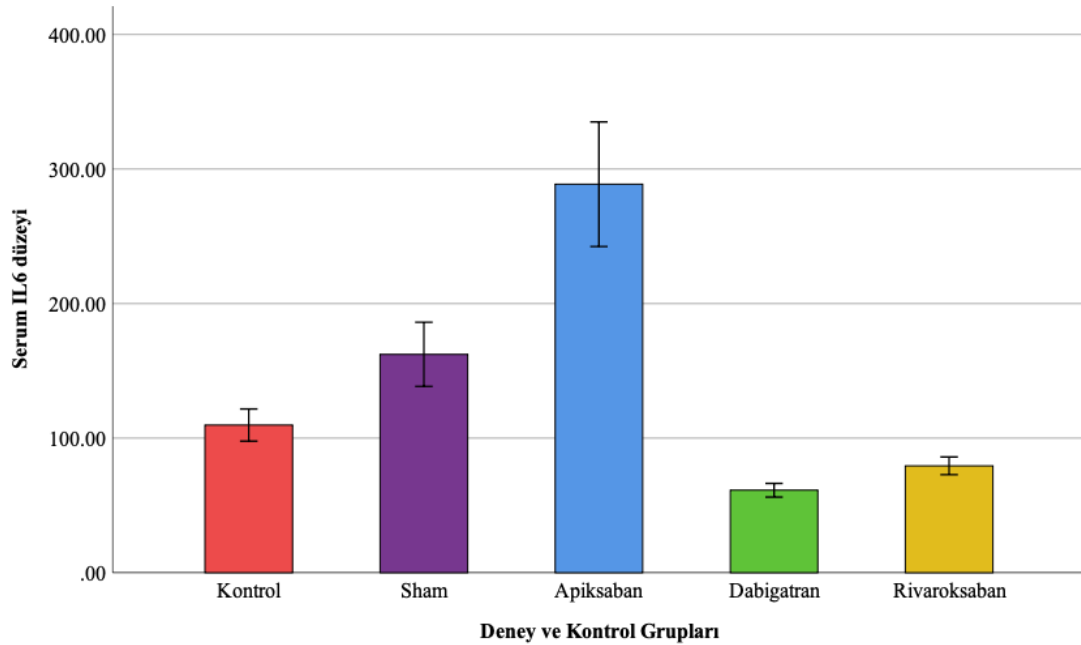
#### 4.1.8 IL-6(Serum)

Tablo XIV’de serum IL-6 düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında IL-6 düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). İkili alt grup analizinde bu farkın kontrol-sham ( $p=0,008$ ), kontrol-rivaroksaban ( $p=0,003$ ), sham-apiksaban ( $p=0,002$ ), dabigatran-rivaroksaban ( $p=0,002$ ) ve geri kalan bütün ikili karşılaştırmalarda  $p < 0,001$  olduğu saptanmıştır. Şekil 22’de de grafiksel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo XIV:**Deney ve kontrol grupları serum IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Serum IL6	Kontrol	109,73 $\pm$ 14,28	104,45 (91,40 - 132,70)	<b>&lt;0,001**</b>
	Sham	162,28 $\pm$ 28,50	153,10 (135,20 - 206,20)	
	Apiksaban	288,71 $\pm$ 55,39	289,05 (225,20 - 391,70)	
	Dabigatran	61,28 $\pm$ 6,09	63,10 (50,50 - 66,80)	
	Rivaroksaban	79,43 $\pm$ 7,88	79,90 (70,40 - 89,90)	

\*\*Anova Testi



**Şekil 22:** Deney ve kontrol grupları ortancaserum IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması

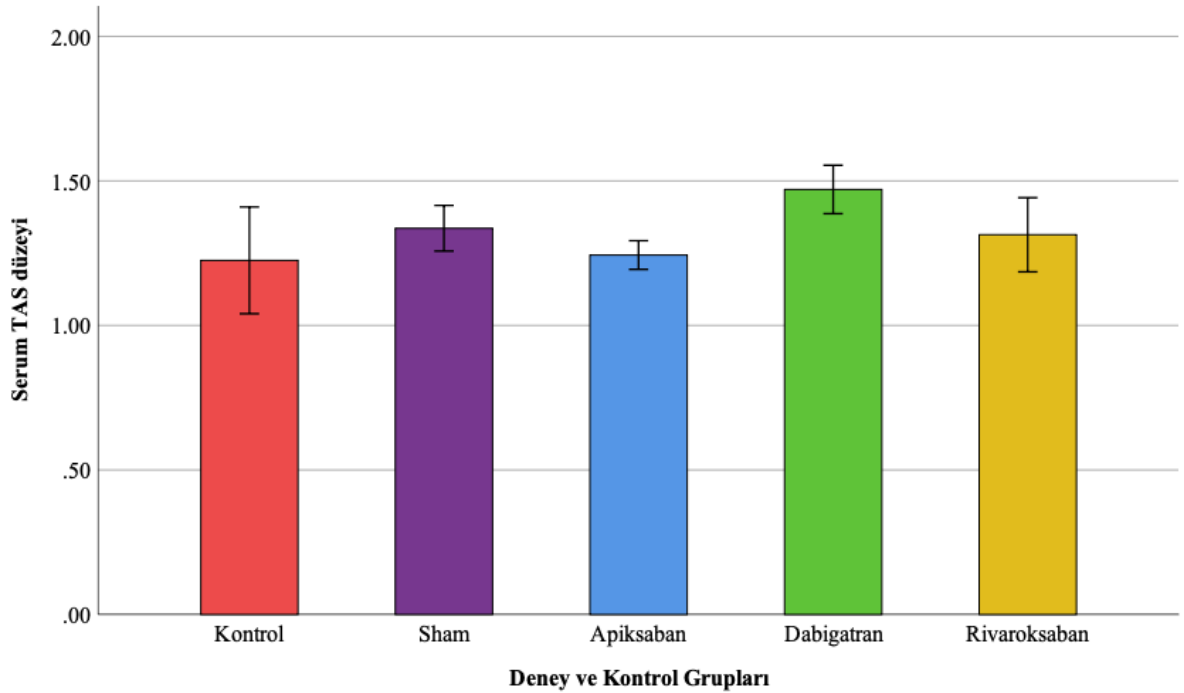
#### 4.1.9 TAS(Serum)

Tablo XV'te serum TAS düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında TAS düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,009). İkili alt grup analizinde bu farkın apiksaban-dabigatran (p=0,002) grupları arasında olduğu saptanmıştır. Şekil 23'te de grafiksel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo XV:**Deney ve kontrol grupları serum TAS düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Serum TAS	Kontrol	1,22 $\pm$ 0,22	1,23 (0,88 - 1,57)	<b>0,009**</b>
	Sham	1,33 $\pm$ 0,09	1,33 (1,16 - 1,45)	
	Apiksaban	1,24 $\pm$ 0,05	1,24 (1,15 - 1,33)	
	Dabigatran	1,47 $\pm$ 0,10	1,46 (1,29 - 1,61)	
	Rivaroksaban	1,31 $\pm$ 0,15	1,33 (1,06 - 1,49)	

\*\*Anova testi



**Şekil 23** Deney ve kontrol grupları ortanca serum TAS düzeylerinin karşılaştırılması

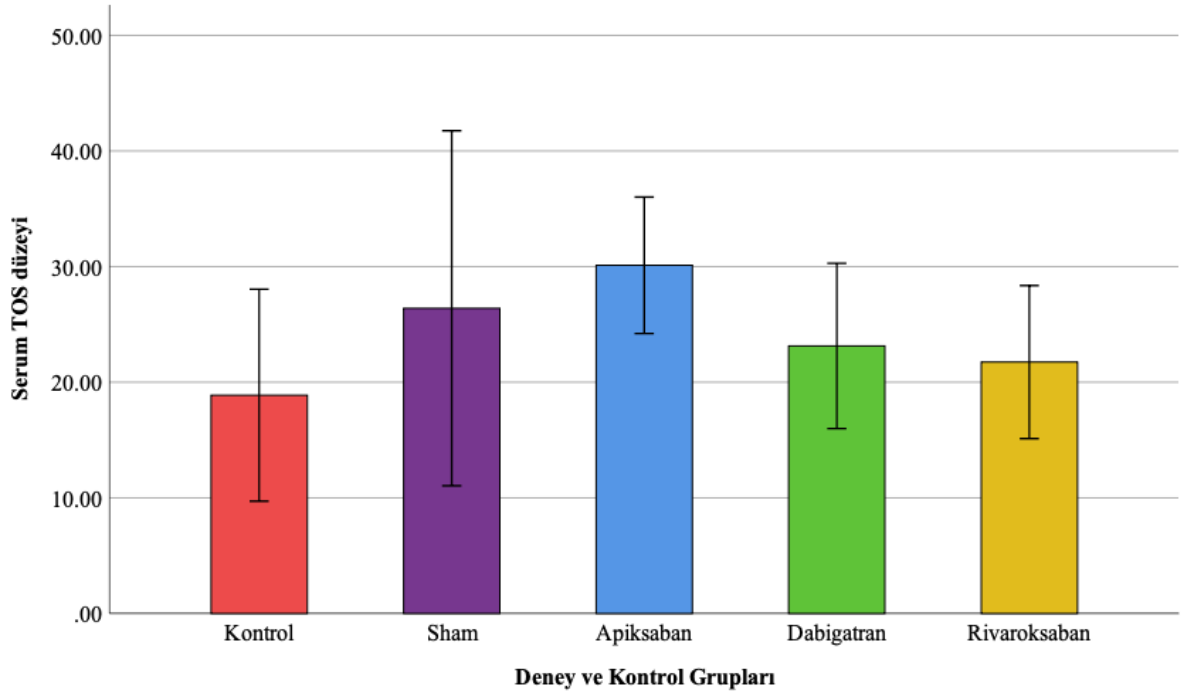
#### 4.1.10TOS(Serum)

Tablo XVI'da serum TOS düzeyi kontrol, sham, apiksaban, dabigatran ve rivaroksaban gruplarında ortalama, standart sapma, ortanca ve minimum maksimum değerler olarak verilmiş olup, deney grupları arasında serum TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.(p=0,341). Şekil 24te degrafiksel olarak grupların karşılaştırması verilmiştir.

**Tablo XVI:** Deney ve kontrol grupları serumTOS düzeylerinin karşılaştırılması

		Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Serum TOS	Kontrol	18,87 $\pm$ 10,96	17,51 (5,52 - 38,62)	0,341**
	Sham	26,39 $\pm$ 18,36	18,41 (5,38 - 60,55)	
	Apiksaban	30,11 $\pm$ 7,05	29,33 (20,22 - 41,25)	
	Dabigatran	23,13 $\pm$ 8,55	26,48 (6,62 - 32,00)	
	Rivaroksaban	21,74 $\pm$ 7,91	21,10 (8,55 - 32,55)	

\*\* Anova Testi



**Şekil 24**Deney ve kontrol grupları serum ortalamaTOS düzeylerinin karşılaştırılması

#### 4.2 Patolojik Bulgular

Deney grupları konjesyon durumuna göre karşılaştırıldığında; kontrol grubunun 8'inde (%100), apiksaban grubunun 4'ünde (%50), dabigatran grubunun 7'sinde (%87,5), rivaroksaban grubunun 5'inde (%62,5) konjesyon saptanmamıştır. Sham grubunun 5'inde (%62,5) orta düzeyde konjesyon saptanmıştır (Tablo XVII).

**Tablo XVII:**Deney gruplarında patolojik incelemede konjesyon skorlaması

	Konjesyon yok		Hafif		Orta		Şiddetli	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Kontrol	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sham	0,0	0,0	1,0	12,5	<b>5,0</b>	<b>62,5</b>	2,0	25,0
Apiksaban	<b>4,0</b>	<b>50,0</b>	3,0	37,5	1,0	12,5	0,0	0,0
Dabigatran	<b>7,0</b>	<b>87,5</b>	1,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Rivaroksaban	<b>5,0</b>	<b>62,5</b>	3,0	37,5	0,0	0,0	0,0	0,0

Deney grupları enflamasyon açısından incelendiğinde kontrol grubunun 8'inde(%100), apiksaban grubunun 1'inde(%12,5), dabigatran grubunun 1'inde(%12,5) ve rivaroksaban grubunun 1'inde(%12,5) enflamasyon görülmemiştir. Sham grubunun 6'sında(%75) orta düzeyde enflamasyon görülmüş olup dabigatran grubunun 5'inde (%62,5) hafif düzeyde enflamasyon görülmüştür(Tablo XVIII) .

**Tablo XVIII:**Deney gruplarında patolojik incelemede enflamasyon skorlaması

	Enflamasyon yok		Hafif		Orta		Şiddetli	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Kontrol	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sham	0,0	0,0	1,0	12,5	<b>6,0</b>	<b>75,0</b>	1,0	12,5
Apiksaban	1,0	12,5	<b>3,0</b>	<b>37,5</b>	2,0	25,0	2,0	25,0
Dabigatran	1,0	12,5	<b>5,0</b>	<b>62,5</b>	2,0	25,0	0,0	0,0
Rivaroksaban	1,0	12,5	<b>3,0</b>	<b>37,5</b>	4,0	50,0	0,0	0,0

Deney grupları atrofi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 8'inde(%100),sham grubunun 8'inde(%100),apiksaban grubunun 4'ünde(%50), dabigatran grubunun 6'sında



(%75) ve rivaroksaban grubunun 4'ünde(%50) atrofi görülmemiştir. Apiksaban grubunun 4'ünde(%50), rivaroksaban grubunun 4'ünde (%50) hafif düzeyde atrofi görülmüştür (Tablo XIX).

**Tablo XIX:** Deney gruplarında patolojik incelemede atrofi skorlaması

	Atrofi yok		Hafif		Orta		Şiddetli	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Kontrol	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sham	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Apiksaban	<b>4,0</b>	<b>50,0</b>	<b>4,0</b>	<b>50,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
Dabigatran	<b>6,0</b>	<b>75</b>	2,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rivaroksaban	<b>4,0</b>	<b>50,0</b>	<b>4,0</b>	<b>50,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0

Deney grupları nekroz açısından incelendiğinde kontrol grubunun 8'inde (%100), sham grubunun 1'inde(%12.5), apiksaban grubunun 3'ünde(%37.5), dabigatran grubunun 6'sında(%75) ve rivaroksaban grubunun 2'sinde(%25) nekroz görülmemiştir. Sham grubunun 6'sında(%75), apiksaban grubunun 4'ünde (%50) ve rivaroksaban grubunun 5'inde (62.5) hafif derecede nekroz izlenmiştir (Tablo XX).

**Tablo XX:** Deney gruplarında patolojik incelemede nekroz skorlaması

	Nekroz yok		Hafif		Orta		Şiddetli	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Kontrol	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sham	1,0	12,5	<b>6,0</b>	<b>75,0</b>	1,0	12,5	0,0	0,0
Apiksaban	3,0	37,5	<b>4,0</b>	<b>50,0</b>	1,0	12,5	0,0	0,0
Dabigatran	<b>6,0</b>	<b>75,0</b>	2,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rivaroksaban	2,0	25,0	<b>5,0</b>	<b>62,5</b>	1,0	12,5	0,0	0,0

Deney grupların fibrozis açısından incelendiğinde gruplar içerisinde fibrozis saptanmamıştır (Tablo XXI).

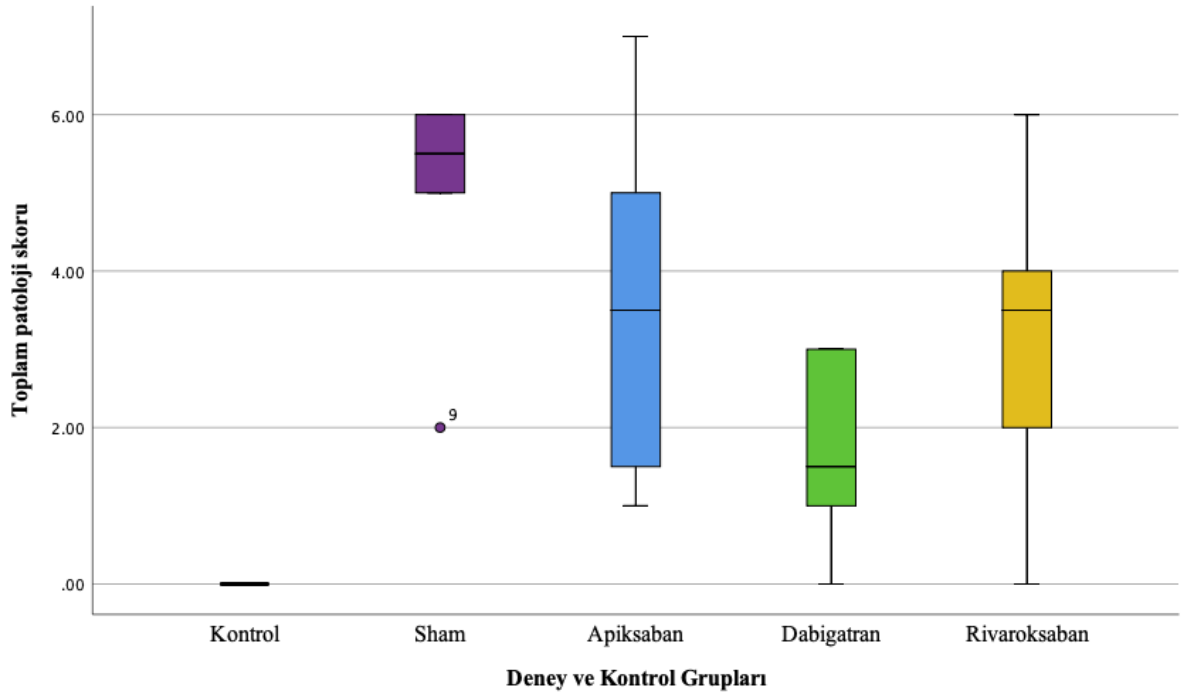
**Tablo XXI:**Deney gruplarında patolojik incelemede fibrozis skorlaması

	Fibrosis yok		Hafif		Orta		Şiddetli	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Kontrol	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sham	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Apiksaban	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dabigatran	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rivaroksaban	<b>8,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

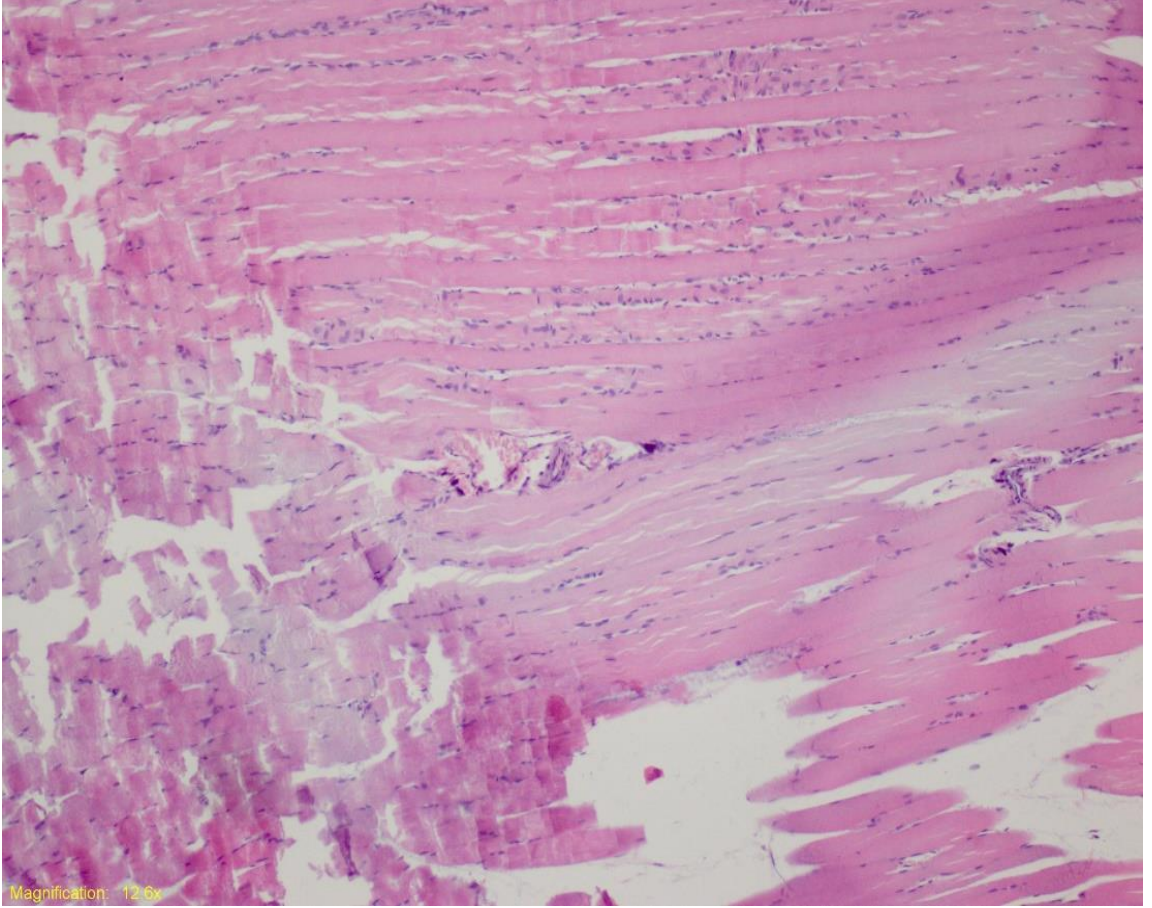
Tablo XXII’datoplam patolojik skor değerleri kontrol,sham,apiksaban,dabigatran ve rivaroksaban gruplarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri olarak verilmiş olup deney grupları arasında toplam skor arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur(p<0,001). İkili alt grup analizlerinde bu farkın kontrol-sham(p<0,001), kontrol-apiksaban (p=0,008), kontrol-rivaroksaban(p=0,025) ve sham-dabigatran(p=0,047) grupları arasında olduğu saptanmıştır.Şekil 25’teşekilsel olarak grupların karşılaştırılması verilmiştir.

**Tablo XXII:**Deney ve kontrol grupları toplam patoloji skorlarının karşılaştırılması

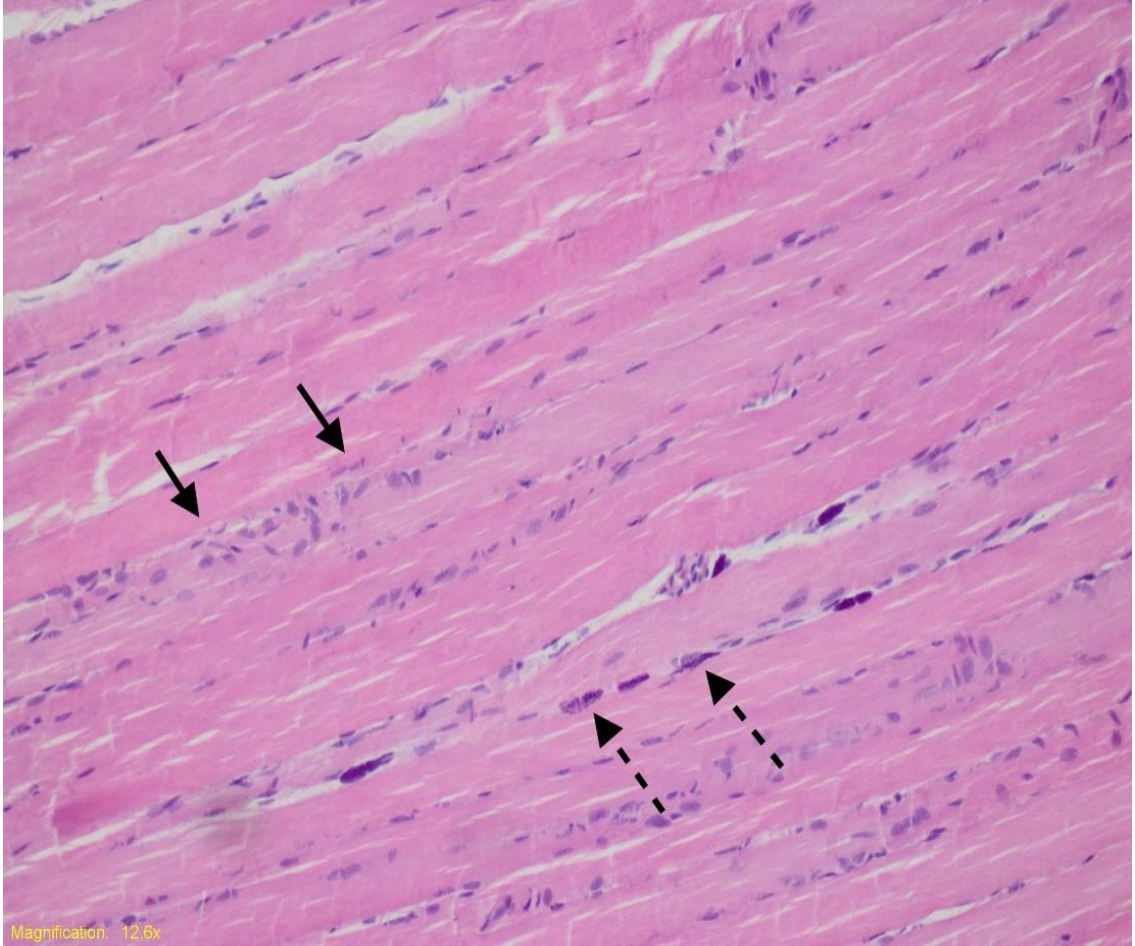
		Ortalama ± SS	Ortanca (Min - Maks)	p değeri
Toplam Patoloji Skoru	Kontrol	0,00 ± 0,00	0,00 (0,00 - 0,00)	<b>&lt;0,001</b>
	Sham	5,12 ± 1,35	5,50 (2,00 - 6,00)	
	Apiksaban	3,50 ± 2,13	3,50 (1,00 - 7,00)	
	Dabigatran	1,75 ± 1,16	1,50 (0,00 - 3,00)	
	Rivaroksaban	3,12 ± 1,88	3,50 (0,00 - 6,00)	



Şekil 25 Deney ve kontrol grupları ortanca toplam patoloji skorlarının karşılaştırılması

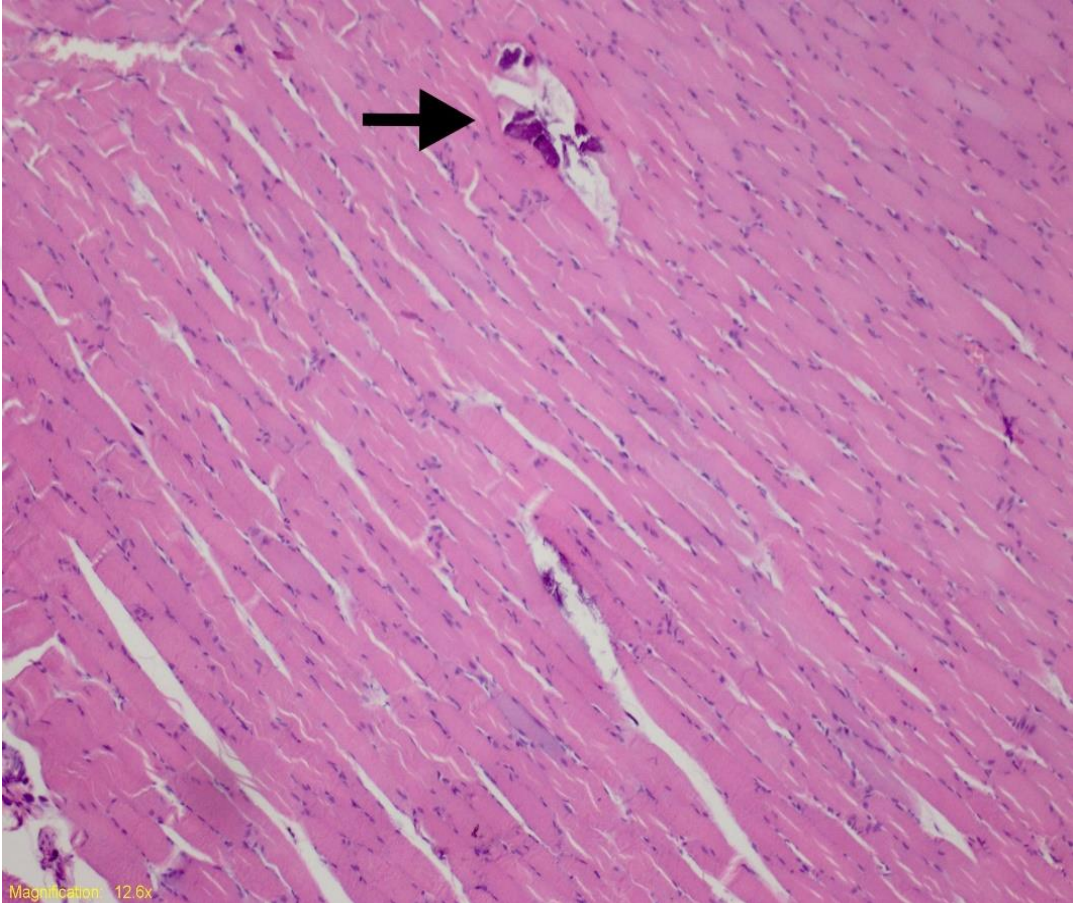


**Resim4.1** Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede sham grubunda görülen yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve konjesyon

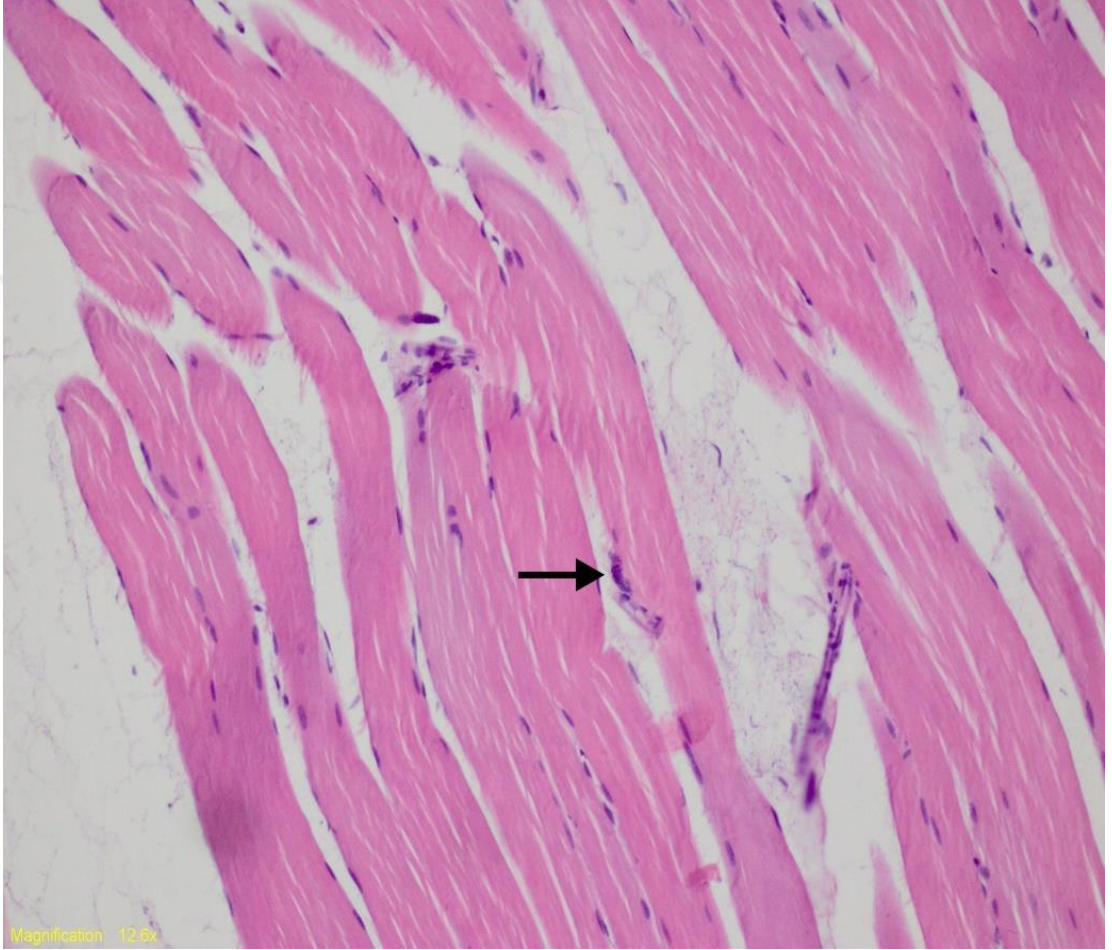


**Resim 4.2** Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x200 büyütmede apiksaban grubunda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekrotik hücreler(kesikli oklar nekrotik hücreleri,düz ok ise inflamatuvar hücre infiltrasyonunu göstermektedir)





**Resim 4.3** Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede rivaroksaban grubunda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekrotik hücreler ve kalsifikasyon alanı(ok ile gösterilen kalsifikasyon alanı)



**Resim 4.4** Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x200 büyütmede dabigatran grubunda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ok ile gösterilen bölgede saptanan mast hücresi

## 5. TARTIŞMA

Sunduğumuz çalışma reperfüzyon safhasında görülen hasar sonucu mikrovasküler düzeydeki tromboza yönelik yeni nesil oral antikoagülanların karşılaştırmalı olarak koruyucu etkinliğini araştıran literatürdeki ilk çalışmadır. Kalp-Damar Cerrahisi uygulamalarının arasında yer alan koroner arter cerrahisi, kardiyopulmoner bypass, akut/kronik oklüziv periferik arter hastalıkları cerrahisi, aortik veya periferik vasküler klempleme, turnike uygulaması gibi birçok klinik müdahale esnasında dokulara sunulan kan akımı geçici olarak durdurulmaktadır. Müdahaleler sonrasında kan akımının tekrar sağlanması ile dokuda beklenmedik hasar oluşabilmektedir. Bu fenomen İskemi-Reperfüzyon Hasarı olarak adlandırılmaktadır(2). Son yıllarda bu sorunun önlenmesine yönelik deneysel çalışmalar yaygın olarak yapılmaktadır(5,108).

IRH dokuya sunulan kan akımının dakikalar veya saatler boyunca durması sonrasında tekrar kan akımı sağlanması ile oluşmaktadır. Temel patoloji dokunun ihtiyacı olan kaynakların sunulmaması sonucunda gelişen anaerobik glikoliz ve hipoksi sonucunda ATP depolarının tükenmesi, serbest oksijen radikallerinin artışı, hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeylerinin artışı sonrası hücre zarı ve nükleer yapılarda hasarlanmaz. Bununla birlikte iskemik dokuya kan akımı sağlanması(reperfüzyon) sonrası tetiklenen lokal ve sistemik enflamasyon ve enflamatuar hücrelerle birlikte trombosit aktivasyonu izlenmektedir (1).

Antikoagülanlar klinik tedavide hem kardiyak hem de periferik vasküler cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. UFH veya DMAH'ler kapiller düzeyde trombüsün ilerlemesini önlemek için kullanılır ve etkilenen organın kan akımını artırır. Hobson ve ark. yaptığı deneysel çalışmada UFH'nin endotelial permeability ve pH'ı modüle ettiği belirtilmiş (62). Literatürde, travmatik beyin hasarı başladıktan 30 saat sonra enoksaparin verilmesinin doku ödemi ve infarkt çapını azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgu iskemik beyin dokusunun akut hasarı sonrası DMAH verildiğinde fayda görebileceğini göstermektedir (64). Bizim çalışmamızda ise son yıllarda kullanıma giren yeni nesil oral antikoagülan olan ilaçların alt ekstremité iskemik modelinin histopatolojik incelemesinde sham kontrol grubuna göre inflamasyon, konjesyon, nekroz ve atrofi skorlarını azalttığı gözlenmiştir. Total patolojik skorun rivaroksaban ve apiksaban gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen dabigatran grubunda istatistiksel olarak anlamlı koruyucu etki ortaya çıkmıştır. Literatürdeki farklı dokulara ait IRH çalışmaları, trombin inhibisyonu ile IRH derecesi arasındaki ilişki hakkında



faydalı olduğu ve olmadığı çalışmaları içermektedir. Deneyimizdeki ilaçlardan dabigatranın rivaroksaban ve apiksabandan farkı direkt trombin inhibisyonu etkisi olup patolojik olarak faydasının bu durumla ilişkilendirilebileceği dşnlmştr (109-112). Kontrol ve sham grubu dhil hiçbir grupta fibrozis görülmemiştir. Bu durum deney süresi göz önüne alındığında fibrozis gelişmesi için srenin yeterli olmadığını dşndrmektedir (3).

IRH patogenezinde yer alan serbest oksijen radikallerine bağlı oksidan stres ve antioksidan savuma mekanizmaları, enflamasyon belirteçleri olan TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 düzeyleri dokunun iskemi-reperfüzyona karşı verdiği yanıtı göstermesi açısından değerlidir(113-115). Yeni nesil oral antikoagülanların hem kas dokusu hem de serumdaki TAS düzeyleri açısından gruplar arasında sadece dabigatran ve apiksaban alt grup analizinde anlamlı farklılık görülmüş olup TAS düzeyi dabigatran grubunda daha yüksek saptanmıştır. Literatür incelendiğinde dabigatranın total antioksidan duruma etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. TAS düzeylerinin kas dokusunda ki değerlerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark görülmemesi kasın iskemi reperfüzyon hasarına karşı diğer dokulardan daha dayanıklı olması ile ilişkili olabilir (116).

Oksidatif stres iskemi-reperfüzyon sürecinin her aşamasında değişken derecelerde doku hasarına yol açmaktadır. Yeni nesil oral antikoagülanların TOS düzeyini hem serum hem kas dokusunda incelediğimizde TOS değerlerinin sham grubunda kontrol grubuna göre artış gösterdiği görülmüştür. Ancak gruplar arası incelemede istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. Bununla birlikte Stutzmann ve ark. yaptığı bir çalışmada parenteral antikoaglan kullanımı ile serbest oksijen radikallerinin oluşumu arasında olası bir etkileşim olabileceğini belirtmiştir (117).

Enflamasyon IRH patogenezinde temel rol alan mekanizmalardan biri olup proinflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 düzeyleri deneysel çalışmalarda yaygın olarak incelenmektedir. Bu deneysel çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde enflamatuvar yanıtın olduğa değerliken olduğu görülmektedir. Enflamasyon oluşumu aynı zamanda aktif pıhtılaşma faktörleri ile daha da kötüleşmektedir (118). Bu durumun önüne geçebilmek için antikoaglan tedavi sıklıkla klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan klinikte son dekatta kullanıma giren antikoaglan ajanların serum ve kas dokusundaki proinflamatuvar belirteçlere olan etkisi tek başlarına ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Kas dokusu TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırmalı analizinde sham grubunda kontrol grubuna göre

TNF- $\alpha$  düzeyinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum beklenenin aksine gerçekleşmiştir. Deneyimizde histopatolojik inceleme ve diğer inflamasyon markerlarına bakıldığında kas TNF- $\alpha$  sonuçlarında varyasyon ve sonuçlar arası uç değerler olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda bir kısıtlılık olarak yorumlanmıştır. Serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin kontrol ve deney grupları arasındaki karşılaştırmalı analizinde istatistiksel olarak anlamlı farkın sadece sham ve dabigatran grupları arasında olduğu saptanmıştır. Bu etkinin dabigatranın diğer antikoagölan ajanlardan farklı olarak direk trombin inhibisyonu etkisi ile gerçekleşmiş olabileceği düşünölmüştür.

Bir diğer enflamasyon belirteci olan IL-1 ve IL-6 serum düzeyleri incelendiğinde IL-6 düzeylerinin apiksaban hariç diğer gruplarda anlamlı olarak düşük bulunması rivaroksaban ve dabigatranın inflamasyonun sistemik etkilerini azalttığı düşünölmüştür. Kas IL-6 düzeylerinin apiksaban, rivaroksaban ve dabigatran grubu ile sham grubu arasında anlamlı istatistiksel farklılık görülmesi lokal enflamatuvar etkileri olabileceğini de düşöndürmektedir. Ancak IL-1 düzeyleri incelendiğinde benzer sonuçlar bulunamamıştır. Son zamanlarda UFH,DMAH ve diğer antikoagölan ajanlarınIRH'da araştırılmaya başlanması IRH'nın patolojik süreçlerinin anlaşılması yolunda ilerlemeler sağlamaktadır. Trombin inhibisyonu yoluyla IRH'nı değerlendiren deneysel çalışmalar incelendiğinde çalışmalarda histolojik değişiklikleri ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiş ancak biyokimyasal belirteçlerde değişikliğe yol açmadığı saptanmıştır (66).

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

İRH patogeneğinde rol oynayan tromboz ve koagülasyon kaskadını engellemek amacıyla klinik uygulamada kullanılan rivaroksaban, apiksaban ve dabigatran etken maddesine sahip ilaçların karşılaştırıldığı çalışmamızda dabigatranın diğer etken maddelere kıyasla İRH'ni azaltmada daha etkili olduğu saptanmıştır. Ancak bu yararlı etkinin mekanizmasının belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



## ÖZET

### YENİ NESİL ORAL ANTİKOAGÜLANLARIN SIÇANLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda deneysel alt ekstremite hayvan İR modelinde amacımız yeni nesil oral antikoagülanların koruyucu etkisini araştırmaktır.

40 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçan randomize olarak beş ayrı gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece anestezi ve medyan laparotomi yapıldı. Sham grubuna İR prosedürü uygulandı. Apiksaban grubuna bir hafta boyunca günde iki kere 10mg/kg, dabigatran grubuna günde bir kere 15mg/kg, rivaroksaban grubuna ise günde bir kere 3mg/kg dozunda ilaç İR prosedürü öncesi bir hafta boyunca gavaj yoluyla uygulandı.

İR prosedürü 60 dakika infrarenal aorta klemplenmesini takiben 120 dakika reperfüzyon süreci olarak uygulandı. Prosedür sonrası her gruptan intrakardiyak 2-3 cc kan ve bilateral gastroknemius kas örnekleri alındı, takiben sıçanlar dekapitasyonla kurban edildi. Kas dokusu ve kanda biyokimyasal belirteçler olan TAS, TOS, IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri incelendi. Histopatolojik incelemede kas dokusunda enflamasyon, nekroz, konjesyon, fibrozis ve atrofi düzeylerine bakıldı.

Histopatolojik total skor incelemesinde dabigatran grubunda sham grubuna göre patolojik skor anlamlı düşük bulundu. Kas dokusu IL-1 düzeylerin dabigatran grubunda anlamlı yüksek bulunmuş olup serumda gruplar arası anlamlı farklılık görülmedi. Kas dokusu TNF- $\alpha$  düzeyleri rivaroksaban ve dabigatran grubunda sham grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuş olup serumda dabigatran grubunda anlamlı düşük bulunmuştur. Kas dokusu ve serumda IL-6 düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmış olup özellikle dabigatran grubunda azalma görülmüştür. Kas ve serum TAS-TOS düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak İRH'nı engellemede özellikle dabigatranın etkili olduğu görülmüş olup histopatolojik inceleme ve biyokimyasal belirteçleri içeren ileri çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler; İskemi, Reperfüzyon, Apiksaban, Dabigatran, Rivaroksaban

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE EFFECTS OF NOVEL ORAL ANTICOAGULANTS ON LOWER EXTREMITY ISCHEMIA REPERFUSION INJURY IN RATS

In our study we aimed to evaluate the protective effect of novel oral anticoagulants on IRI in an experimental animal lower extremity model.

Forty female Wistar Albino rats were randomly divided into five groups. Only anesthesia and median laparotomy were performed in the control group. IR procedure was applied to sham group. Theapiksaban group we used a 10 mg/kg doz twice daily, 15mg/kg once daily was used for the dabigatran group and 3mg/kg once daily for rivaroxaban group dose were administred orally via gavage for one week before the ischemia reperfusion procedure.

The IR procedure was performed after 60 minutes of infrarenal aorta clamping followed by 120 minutes of reperfusion. After the procedure 2-3 cc intracardiac blood sample and bilateral gastrocnemius muscle tissue samples were taken from each group. Rats were sacrificed by decapitation after the samples were taken. The biochemical markers of muscle tissue and blood (TAS, TOS, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) levels were assessed. Inflammation, necrosis, congestion, fibrosis and atrophy in the muscle tissue were assessed histopathologically.

Histopathologic total score was significantly lower in the dabigatran group than in the sham group. IL-1 levels of muscle tissue were significantly higher in dabigatran group, but there were no significant difference in serum IL-1 levels between the groups. TNF levels in muscle tissue were significantly higher in rivaroxiban and dabigatran groups than in sham group, and lower in dabigatran group in serum levels. There was a significant difference between IL-6 levels in muscle tissue and serum and a significant lower level was observed in dabigatran group. No significant difference was found between muscle tissue and serum levels in TAS and TOS.

In conclusion, dabigatran was found to be effective in preventing IRI, further studies are required including histopathological examination and biochemical markers.

Key words: Ischemia, Reperfusion, Apixaban, Dabigatran, Rivaroxaban

## 9.KAYNAKLAR

1. Rutherford's vascular surgery / [edited by] Jack L. Cronenwett, K. Wayne Johnston.—Eighth edition
2. Cell Injury, Cell Death and Adaptations. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 9th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014
3. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull. 2004; Oct 19;70:71-86. Print 2004. Review. Erratum in: Br Med Bull. 2005;73-74:139.
4. Chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. Stéphanie Paradis, Anne-Laure Charles, Alain Meyer, Anne Lejay, James W. Scholey, Nabil Chakfé, Joffrey Zoll, and Bernard Geny/Am J Physiol Cell Physiol. 2016 Jun 1; 310(11)
5. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. Redox Biol. 2015 Dec;6:524-551.
6. D.J. Hearse, S.M. Humphrey, E.B. Chain, Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release, J. Mol. Cell. Cardiol. 5 (1973) 395–407
7. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. Klinik Gelişim Derg. Klinik Fiziopatoloji 2009;22(3):5-14
8. Lejay A, Meyer A, Schlagowski AI, Charles AL, Singh F, Bouitbir J, Pottecher J, Chakfé N, Zoll J, Geny B. Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. Int J Biochem Cell Biol 50: 101–105, 2014
9. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E (Editör).Kalp ve damar cerrahisi. Birinci baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004. s.197-215
10. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. Am J Physiol. 1988 May;254(5 Pt 1):G768-74.
11. M.C.Lee, M. Velayutham, T. Komatsu, R. Hille, J.L. Zweier, Measurement and characterization of superoxide generation from xanthine dehydrogenase: a redox-regulated pathway of radical generation in ischemic tissues, Biochemistry 53(2014)6615–6623.

12. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161-208
13. Wang, Ying et al "Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling." *The Journal of Cell Biology* 217.6 (2018)
14. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* 2005;390:377–94.
15. Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabó R, Giorgio M. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66 (Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol* 2009;104:131–9.
16. Kviety PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med* 2012;52:556–92
17. Serracino-Inglott F, Habib NA, and Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160–6.
18. Parks DA, Granger DN. Xanthineoxidase: biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986;548:87–99.
19. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012;298:229-317
20. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009;22:46-55
21. Ozcan, O , Erdal, H , Yonden, Z . "İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI VE OKSİDATİF STRES İLİŞKİSİNE BİYOKİMYASAL BAKIŞ". *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi* 6 (2015)
22. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys* 2004;23:265-95.
23. Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J* 2003;17:2328–30.
24. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:294–8.

25. Vaghasiya JD, Sheth NR, Bhalodia YS, Jivani NP. Exaggerated liver injury produced by renal ischemia reperfusion in diabetes: effect of exenatide. *Saudi J Gastroenterol* 2010;16:174–180.
26. Jones AW, Durante W, Korthuis RJ. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010; 335:85–91
27. Gute, D.; Korthuis, RJ. Role of leukocyte adherence in reperfusion-induced micro-vascular dysfunction and tissue injury. In: Granger, DN.; Schmid-Schönbein, GW., editors. *Leukocyte Adhesion*. New York, NY: Oxford University Press; 1995.
28. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2002; 53:31–47
29. Miller YI, et al: Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res* 108(2):235–248, 2011
30. Ha T, et al: Toll-like receptors: new players in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal* 15(7):1875–1893, 2011.
31. Arslan F, et al: Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol* 8(5):292–300, 2011
32. Eltzschig HK, et al: Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 17(11):1391–1401, 2011
33. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301–314.
34. Lindemann S, Klingel B, Fisch A, Meyer J, Darius H. Increased platelet sensitivity toward platelet inhibitors during physical exercise in patients with coronary artery disease. *Thromb. Res.* 1999;93:51–59.
35. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9(Suppl. 1):92–104
36. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386
37. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007;



38. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008;48:109-114.
39. Esch JS, Jurk K, Knoefel WT, Roeder G, Voss H, Tustas RY, et al. Platelet activation and increased tissue factor expression on monocytes in reperfusion injury following orthotopic liver transplantation. *Platelets.* 2010; 21:348–359.
40. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb. Res.* 2004; 114:447–453.
41. Lam FW, Burns AR, Smith CW, Rumbaut RE. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011; 300:H468–H475
42. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hatter J, Messmer K, et al. Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation.* 2002; 74:681–688
43. Cooper D, Russell J, Chitman KD, Williams MC, Wolf RE, Granger DN. Leukocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. *Am. J. Physiol.* 2004;
44. Yilmaz G, Granger DN. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med.* 2010
45. Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Anselmo D, Lassman CR, et al. Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection. *Hepatology.* 2003
46. Yokota N, Burne-Taney M, Racusen L, Rabb H. Contrasting roles for STAT4 and STAT6 signal transduction pathways in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 2003
47. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takeda I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* 2009;
48. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Takao A, Fink MP, Lotze MT, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* 2005
49. Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4<sup>+</sup> T cells and Kupffer cells during hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 2008

50. Vaseva AV, et al: p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149(7):1536–1548, 2012
51. Kubli DA, et al: Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 111(9):1208–1221, 2012
52. Nomura K, et al: Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia induced apoptosis. *Biochem J* 351(Pt 1):183–193, 2000
53. Jaeschke H, et al: Current strategies to minimize hepatic ischemia reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando)* 26(2):103–114, 2012.
54. Vandenameele P, et al: The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 3(115):re4, 2010
55. Halestrap AP: A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 38(4):841–860, 2010.
56. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2002 Nov;86(1):41-59. Review.
57. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;
58. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004
59. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995;
60. Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001
61. Akkuş İ, 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, s.1-60
62. Hobson RW, 2nd, et al: Heparinization reduces endothelial permeability and hydrogen ion accumulation in a canine skeletal muscle ischemia-reperfusion model. *J Vasc Surg* 7:585–591, 1988

63. Abbruzzese TA, et al: Enoxaparin does not ameliorate limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 147:260–266, 2008
64. Stutzmann JM, et al: Neuroprotective profile of enoxaparin, a low molecular weight heparin, in in vivo models of cerebral ischemia or traumatic brain injury in rats: a review. *CNS Drug Rev* 8:1–30, 2002
65. Laszik Z, et al: Lack of suppressed renal thrombomodulin expression in a septic rat model with glomerular thrombotic microangiopathy. *Lab Invest* 70:862–867, 1994.
66. Duru S, et al: Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand* 49:1142–1148, 2005
67. Lip GYH, Banerjee A, Boriani G, Chiang CE, Fargo R, Freedman B, et al. Antithrombotic therapy for atrial fibrillation: CHEST guideline and expert panel report. *Chest*. 2018;154(5):1121–201
68. Bristol-Myers Squibb Company PI. Eliquis (apixaban) prescribing information. 2018. [http://packageinserts.bms.com/pi/pi\\_eliquis.pdf](http://packageinserts.bms.com/pi/pi_eliquis.pdf). Accessed 14 Jun 2018
69. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek E, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;365(11):981–92.
70. Connolly SJ, Eikelboom J, Joyner C, Diener HC, Hart R, Golitsyn S, et al. Apixaban in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;364(9):806–17.
71. Lassen MR, Raskob GE, Gallus A, Pineo G, Chen D, Hornick P. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement (ADVANCE-2): a randomised double-blind trial. *Lancet*. 2010;
72. Agnelli G, Buller HR, Cohen A, Curto M, Gallus AS, Johnson M et al. Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2013;369(9):799–808
73. Agnelli G, Buller HR, Cohen A, Curto M, Gallus AS, Johnson M, et al. Apixaban for extended treatment of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2013;368(8):699–708.
74. Luetzgen JM, Knabb RM, He K, Pinto DJ, Rendina AR. Apixaban inhibition of factor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in

- purified protein systems and in human plasma. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2011
75. Ansell J. Factor Xa or thrombin: is factor Xa a better target? *J Thromb Haemost*. 2007
76. Wong PC, Pinto DJ, Zhang D. Preclinical discovery of apixaban, a direct and orally bioavailable factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombolysis*. 2011
77. Frost C, Nepal S, Wang J, Schuster A, Byon W, Boyd RA, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor Xa inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2013
78. Byon W, Nepal S, Schuster AE, Shenker A, Frost CE. Regional gastrointestinal absorption of apixaban in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*. 2018
79. Song Y, Wang X, Perlstein I, Wang J, Badawy S, Frost C, et al. Relative bioavailability of apixaban solution or crushed tablet formulations administered by mouth or nasogastric tube in healthy subjects. *Clin Ther*. 2015
80. He K, Luetzgen JM, Zhang D, He B, Grace JE Jr, Xin B, et al. Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban, a potent and selective factor Xa inhibitor. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2011
81. Wang X, Tirucherai G, Marbury TC, Wang J, Chang M, Zhang D, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of apixaban in subjects with end-stage renal disease on hemodialysis. *J Clin Pharmacol*. 2016;56(5):628–36.
82. Frost C, Yu Z, Wang J, Li T, Ziegler C, Schuster A, et al. Single dose safety and pharmacokinetics of apixaban in subjects with mild or moderate hepatic impairment. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;85(Suppl. 1):S34.
83. Frost C, Wang J, Nepal S, Schuster A, Barrett YC, Mosqueda-Garcia R, et al. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(2):476–87.
84. Frost C, Nepal S, Wang J, Schuster A, Byon W, Boyd RA, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor Xa inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76(5):776–86

85. Byon W, Garonzik S, Boyd RA, Frost CE. Apixaban: A Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Review. *Clin Pharmacokinet.* 2019 May 14
86. Hirsh J, O'Donnell M, Eikelboom JW. Beyond unfractionated heparin and warfarin: current and future advances. *Circulation.* 2007;116:552–560.
87. DiNisio M, Middeldorp S, Buller HR. Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med.* 2005;353:1028–1040
88. US Food and Drug Administration FDA News Release: FDA approves Pradaxa to prevent stroke in people with atrial fibrillation. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm230241.htm>. Accessed May 3, 2011.
89. Eriksson B, Quinlan D. Oral anticoagulants in development, focus on thromboprophylaxis in patients undergoing orthopaedic surgery. *Drugs.* 2006;66:1411–1429.
90. Huel N, Nar H, Priepe H, et al. Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem.* 2002;45:1757–1766
91. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwelling E, et al. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:386–399.
92. Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clin Pharmacokinet.* 2008
93. Stangier J, Stahle H, Rathgen K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor, are not affected by moderate hepatic impairment. *J Clin Pharmacol.* 2008;48:1411–1419.
94. Stangier J, Rathgen K, Stahle H, Mazur D. Influence of renal impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral dabigatran etexilate: an open-label parallel group, single-center study. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49:259–268
95. Boehringer Ingelheim. Dabigatran Etexilate Advisory Committee Briefing Document. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/CardiovascularandRenalDrugsAdvisoryCommittee/UCM226009.pdf>. Accessed May 4, 2011.
96. Weitz JI, Bates SM. New anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1843–53.

97. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, et al. Oral anticoagulant therapy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2012;141:e44S–88S
98. Bayer Pharma AG. Xarelto (rivaroxaban) Summary of Product Characteristics; 2013. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000944/WC500057108.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf) (Accessed 23 Jul 2013)
99. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, et al. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2005;3:514–21
100. Kubitz D, Becka M, Voith B, et al. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78:412–21
101. Stampfuss J, Kubitz D, Becka M, et al. The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2013;51:549–61
102. Weinz C, Buetehorn U, Daehler HP, et al. Pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor—in rats and dogs. *Xenobiotica*. 2005;35:891–910
103. Weinz C, Schwarz T, Kubitz D, et al. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor, in rats, dogs and humans. *Drug Metab Dispos*. 2009;37:1056–64
104. Gnoth MJ, Buetehorn U, Muenster U, et al. In vitro and in vivo P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338:372–80.
105. Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee. FDA Advisory Committee Briefing Document; 2009. [http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee/UCM181524.pdf](http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/Cardiovascular%20and%20Renal%20Drugs%20AdvisoryCommittee/UCM181524.pdf) (Accessed 23 Jul 2013)
106. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275

107. [www.ibm.com/tr-tr/analytics/spss-statistics-software](http://www.ibm.com/tr-tr/analytics/spss-statistics-software)
108. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, Vahl CF. Ischemia-Reperfusion Injury : Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2007 Dec;33(6):600-12.
109. Hale SL, Kloner RA. Dabigatran treatment: effects on infarct size and the no-reflow phenomenon in a model of acute myocardial ischemia/reperfusion. *J Thromb Thrombolysis.* 2015
110. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Fertmann JM, Jauch KW, Menger MD. Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis: effects of activated protein C and thrombin inhibition. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S33-7. Epub 2005 Aug 25. Review
111. Tanaka K. [Specific inhibition of thrombin activity during cardiopulmonary bypass reduces ischemia-reperfusion injury of the lung]. *Fukuoka Igaku Zasshi.*2001 Jan;92(1):7-20. Japanese
112. Nitescu N, Grimberg E, Ricksten SE, Marcussen N, Guron G. Thrombin inhibition with melagatran does not attenuate renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Aug;22
113. Garbaisz, David et al. “Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811.” *PloS one* vol. 9,6 e101067. 26 Jun. 2014
114. Peng, Tangming et al. “Anti-inflammatory Effects of Traditional Chinese Medicines on Preclinical in vivo Models of Brain Ischemia-Reperfusion-Injury: Prospects for Neuroprotective Drug Discovery and Therapy.” *Frontiers in pharmacology* vol. 10 204. 7 Mar. 2019
115. Ross, Jessica L et al. “Interleukin 1 $\beta$  inhibition contributes to the antinociceptive effects of voluntary exercise on ischemia/reperfusion-induced hypersensitivity.” *Pain* vol. 159,2 (2018)
116. Gulmen S, Kiris I, Kocyigit A, Dogus DK, Ceylan BG, Meteoglu I.  $\beta$ -Glucan protects against lung injury induced by abdominal aortic ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2010 Dec;164(2):e325-32. doi: 10.1016/j.jss.2010.08.013. Epub 2010 Sep 8

117. Stutzmann JM, Mary V, Wahl F, Grosjean-Piot O, Uzan A, Pratt J. Neuroprotective profile of enoxaparin, a low molecular weight heparin, in in vivomodels of cerebral ischemia or traumatic brain injury in rats: a review. *CNS DrugRev.* 2002 Spring;8(1):1-30. Review.
118. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and thereperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg.* 2002 Dec;10(6):620-30. Review.

