

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT YOĞUN SİGARA DUMANI SOLUTULAN RATLARDA
TESBİT EDİLEN TROMBOSİT AGREGASYON VE
SEKRESYON DEĞİŞİKLİKLERİ**

Dr. Neşe ATEŞ

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serdar YARDIMCI**

**ANKARA
2010**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT YOĞUN SİGARA DUMANI SOLUTULAN RATLARDA
TESBİT EDİLEN TROMBOSİT AGREGASYON VE
SEKRESYON DEĞİŞİKLİKLERİ**

Dr. Neşe ATEŞ

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Serdar YARDIMCI

**Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü
tarafından 96-09-00-05 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2010**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim/Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

“Akut Yoğun Sigara Dumanı Solutulan Ratlarda Tesbit Edilen Trombosit Agregasyon ve Sekresyon Değişiklikleri” başlıklı, Dr. Neşe Köksal’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/05/1997

Prof. Dr. Sema YAVUZER
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Serdar Yardımcı
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

Doç. Dr. Günseli YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fon Müdürlüğü tarafından 96-09-00-05 proje numarası ve Doç. Dr. Serdar YARDIMCI yöneticiliğinde sürdürülen “Deney Hayvanlarında Sigara İçiminin Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Hücre Dışı Antioksidan Düzeyleri, Trombosit Fonksiyonları, Plazma Lipid-Lipoprotein ve MDA Düzeyleri ile Aorta ve Koroner Arterler Üzerinde Yaptığı Değişiklikler” konulu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Şekiller Dizini	v
Tablolar Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Trombositler	2
2.1.1. Trombosit Morfolojisi	2
2.1.2. Trombosit Fonksiyonları	8
2.2. Ateroskleroz Etyopatogenezinde Sigaranın ve Trombosit Aktivasyonunun Rolü	16
2.2.1. Aterosklerozda Görülen Patolojik Değişiklikler	16
2.2.2. Ateroskleroz İçin Risk Faktörleri	17
2.2.3. Zedelenmeyi Takiben Damar Duvarında Artan Mitoz	19
2.2.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Aterosklerozdaki Rolü	20
2.2.5. Sigaranın Aterogeneze Etkisi	20
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Deneyin Yapılışı	23
3.2. Kan Sayımları	24
3.3. Trombosit Fonksiyonlarının Saptanması	24
4. BULGULAR	26
4.1. Kan Parametreleri Bulguları	26
4.2. Trombosit Agregasyon Bulguları	27
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇLAR	41
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

12-HETE	12-hidroksieikozatetraenoik asit
12-HPETE	12-hidroperoksieikozatetraenoik asit
AA	Araşidonik asit
DG	Diaçilgliserol
EDRF	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
EGF	Epidermal büyüme faktörü
eNOS	Endotelyal NO sentetaz
Eps	Endoperoksitler
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
IP ₃	İnositol 1,4,5 trifosfat
MCF-1	Makrofaj kemotaktik faktör
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MM-LDL	Hafif derecede okside olmuş LDL
OK-LDL	Okside LDL
OX-LDL	Okside olmuş düşük dansiteli lipoprotein
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PC	Fosfotidil kolin
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PF ₃	Trombosit Faktör 3
PGE ₂	Prostoglandin E ₂
PGI ₂	Prostosiklin
TxA ₂	Tromboksan A ₂
vWF	von Willebrand faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** Kapiller lumeni ve trombositlerin elektron mikroskopik görünümü. 3
- Şekil 2.2.** Dinlenme halindeki diskoid şekilli trombositlerin (A) ve ADP ile aktive olmuş trombositlerin (B) elektron mikroskopik görüntüleri. Aktive olmuş trombositler ince filiform uzantılara sahip olup düzensiz şekillerde görülmektedir. 4
- Şekil 2.3.** ADP (10^{-6} M) ile indüklenmiş trombositlerin damar endotel tabakası üzerinde adezyon ve agregasyonu. Üstteki şekilde yuvarlak ve oval çekirdekli hücrelerden oluşan kesintisiz bir endotel tabaka görülmektedir. Adeze olan trombositler psödopodlar oluşturarak küresel bir şekil almışlardır. Alttaki şekilde ise iki endotel hücrelerinin birleşim yerinde adeze olan trombosit görülmektedir. Trombosit ve endotel hücrelerinin plazma membranları arasındaki mesafe 10-15 nm kadardır. Hücre ve membranların ultrastrüktürel yapıları sağlam görülmektedir. 5
- Şekil 2.4.** Damarların subendotelyal tabakasındaki hasarı takiben açığa çıkan kollajen liflere trombositler yapışırlar (En üstte). Trombositlerden açığa çıkan ADP mikroagregat oluşumunu kolaylaştıran bir şekil değişikliğine neden olurken, trombositlerden salınan tromboksan A_2 , agregasyonun daha da ilerlemesine neden olur. Trombositlerin koagülasyon faktörleriyle etkileşimleri sonucu (Ortada) ekstremsel ve intrinsik koagülasyon yollarıyla üretilen trombin yüksek konsantrasyonlara ulaşır ve fibrin ağının oluşumunu başlatır. Trombinin sağlam endotel hücreleriyle etkileşimi sonucu oluşan prostasiklin ve aktive olmuş protein C, pıhtının boyutunu sınırlar (En altta). Prostasiklin trombosit agregasyonunu inhibe eder. Endotel hücrelerinden salınan plazminojen aktivatörleri de plazmin oluşumunu ve pıhtı erimesini gerçekleştirir. 7
- Şekil 2.5.** Trombosit aktivasyonu sırasında gelişen olaylar. Trombosit aktivasyonu agonistlerin trombosit yüzeyindeki reseptörlerine

bağlanmasıyla başlar ve inositol 1.4.5-trifosfat (IP₃), diaçilgliserol (DG) ve araşidonik asiti (AA) içeren ikincil habercileri aktive eder. IP₃, trombosit dens tübüler sisteminden Ca⁺² açığa çıkararak sitozolik serbest Ca⁺² konsantrasyonunu yükseltir. Diaçilgliserol, proteinkinaz C olarak bilinen Ca⁺² bağımlı serin/treonin kinaz ailesini aktive ederek granüler sekresyona ve glikoprotein IIb-IIIa kompleksi üzerinde bulunan fibrinojen reseptörlerinin açığa çıkmasına neden olur. Aynı zamanda, artan sitozolik serbest Ca⁺² konsantrasyonu fosfatidilkolin (PC) gibi membran lipidlerinden fosfolipaz A₂ aracılığıyla araşidonik asit salınımını kolaylaştırır. Bu işlem hem plazma membranında hem de dens tübüler sistemde gerçekleşir. Araşidonik asit, tromboksan A₂'ye dönüştükten sonra hücreden diffüze olarak ve trombositler üzerinde bulunan spesifik reseptörleriyle etkileşerek daha ileri trombosit aktivasyonuna neden olur. Trombositlerdeki G proteinlerinin; fosfoinozitid hidrolizi, araşidonik asit salınımı ve C-AMP oluşumunu regüle ettikleri gösterilmiştir. Farklı agonistler bu olayların farklı bölümlerini etkiler. Bunun nedeni muhtemelen trombosit reseptörlerinin farklı G proteinleri ile etkileşim içinde olmalarıdır. Örneğin trombin, fosfolipaz C'yi, fosfolipaz A₂'yi aktive eder ve adenilsiklaz tarafından C-AMP oluşumunu inhibe eder.

9

Şekil 2.6. Trombositlerdeki Ca⁺² konsantrasyonunun kontrol mekanizmaları. Sitoplazmik ionize kalsiyum konsantrasyonu; ATP bağımlı Ca⁺²-pompa ve sodyum-kalsiyum değişimi yoluyla hücre dışına Ca⁺² sekresyonu ve hücre içi depo bölgelerinde (dens tübüler sistem, mitokondri ve depo granüllerinde) Ca⁺² tutulumuyla azaltılmaktadır. Hücre içi tutulum bölgelerinden Ca⁺² salınımı veya hücre membranında bulunan spesifik iyon kanallarından hücre içine Ca⁺² girişi ile hücre içi ionize kalsiyum konsantrasyonu yükselmektedir.

10

Şekil 2.7. Trombosit sitozolündeki serbest kalsiyumun artması fosfolipaz A₂'yi aktive eder. Bu enzimin aktivasyonu, membran fosfolipidlerinden araşidonik asidin (AA) serbestleşmesine neden olur. Serbest AA siklooksijenaz tarafından endoperoksitler, PGG₂ ve PGH₂'ye

dönüştürülür. Endoperoksitler trombositlerde bulunan tromboksan sentetaz enzimi aracılığı ile tromboksan A₂'ye çevrilir. Bu metabolik yola ilaveten AA; lipoksijenaz tarafından hidroperoksieikozatetraenoik asit (12-HPETE) ve 12-hidroksieikozatetraenoik aside (12-HETE) dönüştürülür.

11

Şekil 2.8. Bir agregometre kaydı üzerinde trombinin çeşitli konsantrasyonlarının farklı trombosit fonksiyonları üzerine olan etkileri izlenmiştir. Osilasyonların kaybı trombositlerin diskoid şekillerinin küreye dönüşümlerini göstermektedir (1). Düşük dozlarda trombin ile elde edilen hafifçe yukarı doğru olan eğri yapışkanlığın ve reverzibl agregasyonun gelişimini gösterir (2). Trombinin optimum konsantrasyonları bifazik agregasyon oluşturur. İkinci agregasyon dalgası trombositlerden salınan prostaglandin, endoperoksitler/ tromboksanlar veya ADP'ye bağımlıdır (3). Yüksek konsantrasyonlarda trombin ise monofazik irreverzibl agregasyona neden olur.

12

Şekil 2.9. Ateroskleroz patogenezinin şematik anlatımı. Ateroskleroz biyolojik olarak kompleks ve çok yönlü olaylar ile gelişir. PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü.

18

Şekil 4.1. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon hızları (MAH) *(p<0,01)

28

Şekil 4.2. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon şiddetleri (MAŞ) *(p<0,05)

29

Şekil 4.3. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin ATP sekresyonları (ATP sek) *(p<0,01)

29

Şekil 5.1. Sigara içimine bağlı artmış kardiyovasküler hastalık riskinde rol alan mekanizmalar.

32

Şekil 5.2. Sigara içiminin trombojenik ve vazoaaktif etkilerinin hipotetik şeması.

33

Şekil 5.3. Bir hafta süreyle yüksek doz nikotine maruz bırakılan ratlarda aort endotelinin elektron mikroskopik görünümü. Bir interkostal dalın üzerinde küçük bir trombosit agregatı görülmektedir.

34

Şekil 5.4. Sigaranın Neden Olduğu Endotel Hasarında Rol Oynayan Mekanizmalar. A) Süperoksit (O_2^-) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) içeren sigara dumanı oksidan stres oluşturur ve *NO 'yu peroksinitrite dönüştürerek endotel bağımlı vazodilatasyonu bozar. Ayrıca trombosit ve makrofajların aktivasyonuna, lipid peroksidasyonuna neden olur. Vitamin-C ise süperoksiti yok ederek *NO yıkımını, lipid peroksidasyonu ve trombosit, nötrofil aktivasyonunu engeller, oksidan hasar sonucu gelişen damarların endotel bağımlı gevşeme fonksiyonundaki bozulmayı önler. Süperoksite bağlı lipid peroksidasyon LO^* (Lipid alkoksil radikali), LOO^* (lipid peroksil radikali) oluşumu ve eNOS (endotelial NO sentetaz enziminin) blokajı ile sonuçlanır.

35

Şekil 5.5. Okside olmuş düşük dansiteli lipoprotein (OX-LDL) doğal LDL'den daha kuvvetli bir aterojenik madde olduğunu pek çok yönüyle gösteren oksidatif değişim hipotezinin bir şeması. Köpük hücrelerin öncülleri olan monositler endotele yapışmakta ve sonra subendotelial aralığa penetre olmaktadır. OX-LDL bu olayı direkt olarak stimüle eder ve hafif derecede okside olmuş LDL (MM-LDL) endotel hücrelerinden makrofaj kemotaktik faktör (MCF-1) salınımını artırarak makrofaj migrasyonunu uyarır. OX-LDL doku makrofajlarının membranındaki reseptörlerine bağlanır. Reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınan lipoprotein molekülleri foam hücrelerinin oluşumuna neden olur. MM-LDL'nin etkisi ile endotel hücrelerden üretilen makrofaj koloni stimule edici faktör (M-CSF) monositlerin makrofajlara dönüşümünü kolaylaştırır. Sonuçta, OX-LDL endotel hasarını artırarak plazma proteinlerinin geçişini ve trombositlerin adezyonunu uyararak aterogenez gelişimini kolaylaştırır.

36

Şekil 5.6. Okside olmuş düşük dansiteli lipoproteinlerin (OX-LDL) aterogenez gelişimindeki rolünü tanımlayan bir şema.

37

Şekil 5.7. Kronik Sigara İçimi Karotid Arterlerde İntima Hiperplazisini Hızlandırır.

39

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1. Kontrol grubu ve akut sigara dumanı solutulan deney grubu ratların Hb, Hct, eritrosit sayısı, lökosit sayısı ve trombosit sayısı ortalama değerleri \pm standart hataları ile istatistiksel karşılaştırmaları	26
Tablo 4.2. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon hızları (ohm/dk)	27
Tablo 4.3. Kontrol grubu ve deney grubunda hesaplanan maksimum agregasyon şiddetleri (ohm)	27
Tablo 4.4. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerde ATP sekresyonları (nmol)	28

1. GİRİŞ

Sigara içenlerde aterosklerotik kalp damar hastalıkları insidansının yüksek olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (10,12,17,21,27,46,77,83). Kronik sigara içimine bağlı kalp damar hastalıkları insidansındaki artışta çeşitli etyolojik faktörlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Günümüze kadar elde edilen klinik ve epidemiyolojik çalışma sonuçları sigara içenlerin plazma lipoproteinlerinde kantitatif ve kalitatif çeşitli değişikliklerin olduğunu göstermiştir (13,44,60). Bu değişikliklerin aterogenezi hızlandırıcı bir etki yapabilecekleri vurgulanmaktadır. Ayrıca sigara dumanı içinde bulunan pek çok toksik ve irritan kimyasal maddenin damar endotelinde zedelenmeye yol açtığı ortaya konmuştur (3,32,47,48). Endotel zedelenmesinin görüldüğü bölgelerde trombositlerin aktive oldukları ve bu bölgelerde agregate olarak damar çapını daralttıkları ve sekrete ettikleri vazokonstriktör maddeler nedeni ile kan akımını azalttıkları bilinmektedir (85). Tüm bu etkiler sigara ve artmış kardiyovasküler hastalık riski arasındaki ilişkiyi açıklar niteliktedir. Bunlara ilaveten kronik sigara içicilerinden elde edilen veriler sigara içenlerin kanında trombosit sayısının arttığına, trombosit agregatlarının görüldüğüne ve bu kişilerde trombosit agregasyonunun uyarıldığına işaret etmektedir (2,4,34,35,50,58,65,81). Bu sonuçlar da sigara içiminin damar endotel hasarından bağımsız bir şekilde trombositleri aktive edebileceğini düşündürmüştür. Bu çalışma akut yoğun sigara dumanı solutulan ratlarda trombosit agregasyon ve sekresyon fonksiyonlarındaki değişiklikleri in vitro koşullarda test etmek amacıyla planlanmıştır. Elde edilecek sonuçların sigara içenleri kalp damar hastalıklarından korumak amacıyla antiagregan ajanların kullanımı konusunda da ipuçları getirebileceği düşünülmektedir (22).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Trombositler

Vasküler sisteme sahip organizmalar kan damarları zedelendiğinde benzer yanıtı verirler. Bu yanıt trombositlerin hasar bölgesinde toplanması ve bu kitlenin proteinden zengin bir pıhtı ile kuşatılarak stabilize edilmesi şeklinde gerçekleşir. Trombositler bu temel biyolojik reaksiyonların bir çoğunda rol alan başlıca kan elemanlarıdır (16,25,36,45).

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositlerden üretilen çekirdeksiz hücrelerdir. Bu hücreler protein ve yağ asitleri sentezleme yeteneğine sahiptirler. Ortalama yaşam süreleri insanda 8-10, ratlarda ise 4-5 gün kadardır (42).

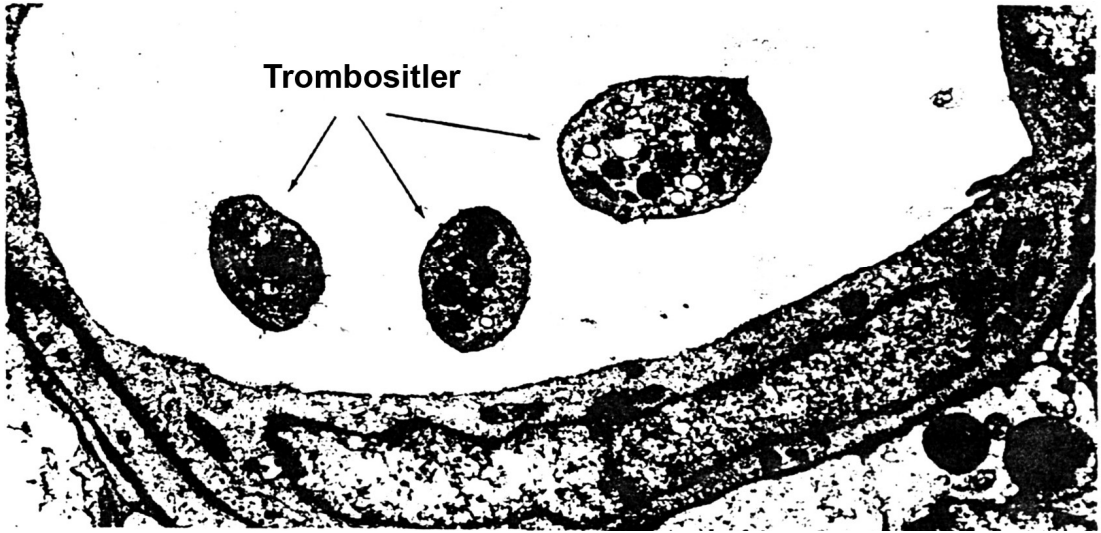
Önceleri trombositlerin primer olarak trombüs oluşumuyla ilgili oldukları düşünülmeye rağmen giderek hemostazın hemen hemen tüm reaksiyonlarında kritik rol oynadıkları güçlü bir şekilde kanıtlanmıştır (25).

Trombositlerin hemostaz dışında organizma için diğer bazı yararlı etkileri olabileceği de düşünülmektedir. Virus ile enfekte hücrelerin ve bakteriler gibi kana geçen yabancı organizmaların çevresinin kuşatılarak toksik etkilerinin engellenmesi ve fagositoz için elverişli hale getirilmeleri buna örnek olarak verilebilir. Diğer taraftan trombosit agregasyonu bazı koşullarda organizma için zararlı da olabilir. Örneğin; damar içinde kan akımını engelleyen trombüs oluşumu, tıkanmış damarların beslediği dokularda ölüme yol açabilir (45).

2.1.1. Trombosit Morfolojisi

Trombositler boyutlarının küçük olmaları nedeniyle ışık mikroskopunda ayrıntılı biçimde gözlenemezler. Ortalama çapları 2-4 μ kadardır. Elektron mikroskopik inceleme tekniklerinin gelişimiyle ve uygun preparasyonların sağlanmasıyla morfolojileri hakkında daha detaylı bilgi sağlanabilmiştir.

Trombositler pürüzlü yüzeylere temas ettiklerinde psödopod oluşturmaları, üst üste birikmeleri ve içeriklerini salıvermeleri nedeniyle yapı ve görünümünü değiştirirler. Elektron mikroskopik incelemelerde aktive olmamış trombositler genellikle disk şeklinde görünürler (Şekil 2.1). Bu disk yapının boyu $\sim 1,5-5 \mu$, eni ise $\sim 0,5-2 \mu$ arasında değişir. Trombosit aktivatörlerine maruz kalmayan trombositler nadiren sitoplazmik uzantılar veya psödopodlara sahiptirler (Şekil 2.2 ve 2.3). Trombositlerin sitoplazmik matriksi bir membranla çevrilidir ve organellere sahiptir. Trombositler mitokondriler, alfa granüller, elektron dens granüller, vakuoller, veziküller, mikrotübüller, mikrofilamentler, glikojen ve lipid inklüzyonları, endoplazmik retikulum, golgi kompleks artıkları ve muhtemelen ribozomlar içerirler (5,85).

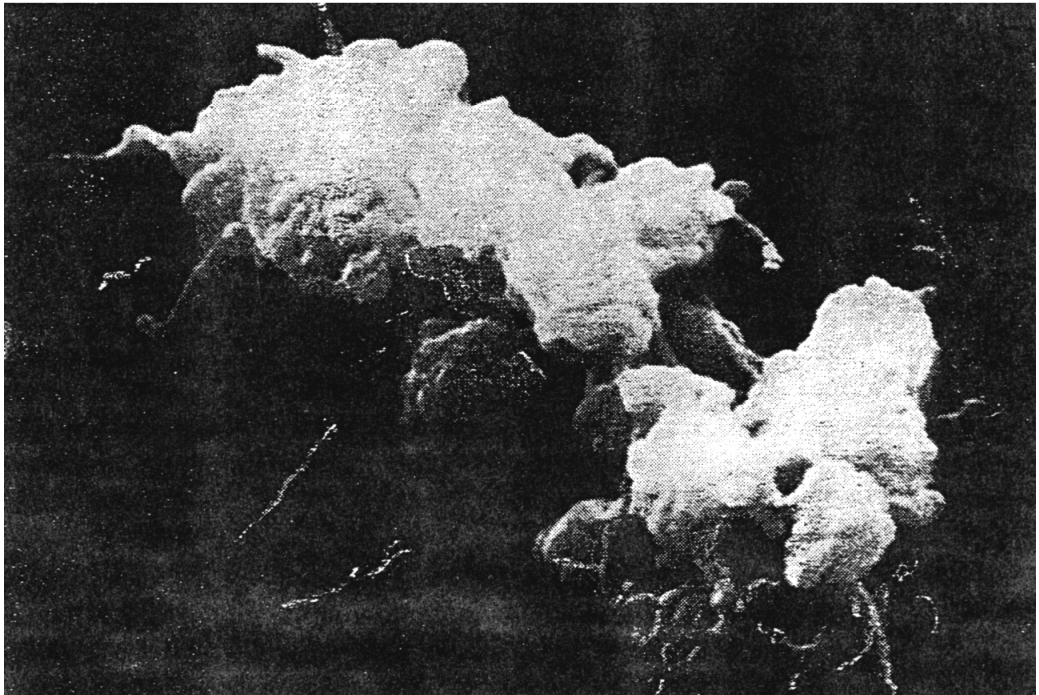


Şekil 2.1. Kapiller lumeni ve trombositlerin elektron mikroskopik görünümü (Bloom W ve ark. *A Textbook of Histology* 1982, 115-117).

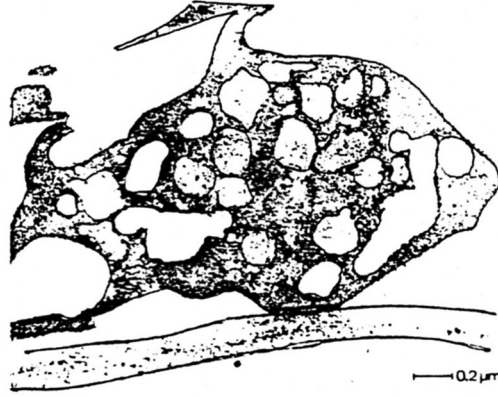
A



B



Şekil 2.2. Dinlenim halindeki diskoid şekilli trombositlerin (A) ve ADP ile aktive olmuş trombositlerin (B) elektron mikroskopik görüntüleri. Aktive olmuş trombositler ince filiform uzantılara sahip olup düzensiz şekillerde görülmektedir (Zucker MB ve ark. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 2-18).

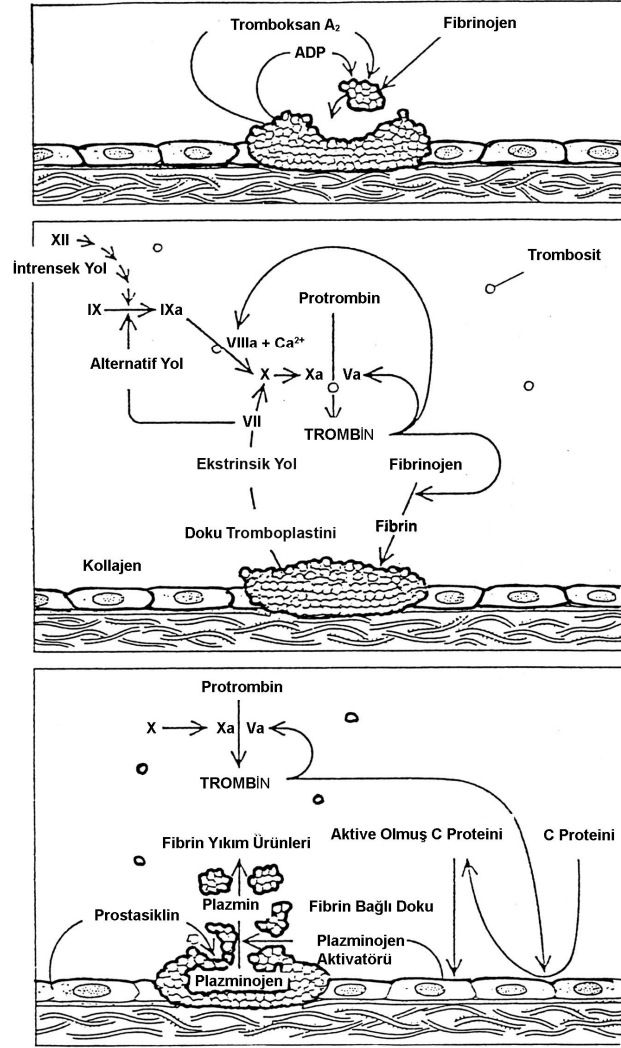


Şekil 2.3. ADP (10^{-6} M) ile indüklenmiş trombositlerin damar endotel tabakası üzerinde adezyon ve agregasyonu. Üstteki şekilde yuvarlak ve oval çekirdekli hücrelerden oluşan kesintisiz bir endotel tabaka görülmektedir. Adeze olan trombositler psödopodlar oluşturarak küresel bir şekil almışlardır. Altteki şekilde ise iki endotel hücrelerinin birleşim yerinde adeze olan trombosit görülmektedir. Trombosit ve endotel hücrelerinin plazma membranları arasındaki mesafe 10-15 nm kadardır. Hücre ve membranların ultrastrüktürel yapıları sağlam görülmektedir (Reininger AJ. *Thrombosis Research* 1993; 71: 245-249).

Trombositlerin dış membranı 70-90 Å kalınlığındadır ve yapısı diğer hücrelerinkine benzer (25,42). Yüzey membranlarının megakaryositlerin plazma membranlarından oluştuğu kabul edilmektedir. Trombosit yüzeyi plazmada bulunan bazı proteinleri de içerir. Bunlardan bazıları koagülasyon

faktörleri olan Fibrinojen, FVI ve FXI'dir. İlaveten trombosit yüzeyinde glikoprotein yapısında reseptörler, lipoproteinler veya fosfolipidler bulunur (9,25). Trombositler ADP veya diğer stimulanlarla aktive olduklarında pıhtılaşma reaksiyonlarını hızlandırıcı bir etki yaparlar (Şekil 2.4). Trombosit mitokondrileri az sayıda bulunmalarına ve morfolojik olarak az gelişmiş olmalarına rağmen trombosit fonksiyonları için gerekli olan metabolik enerjinin sağlanmasında görev alırlar. Glikoliz ve oksidatif fosforilasyon yollarının her ikisi de bloke edildiğinde trombosit adezyonu, agregasyonu, sekresyonu ve pıhtı retraksiyonu gibi pek çok trombosit fonksiyonunun tamamıyla inhibe olduğu görülmektedir (25).

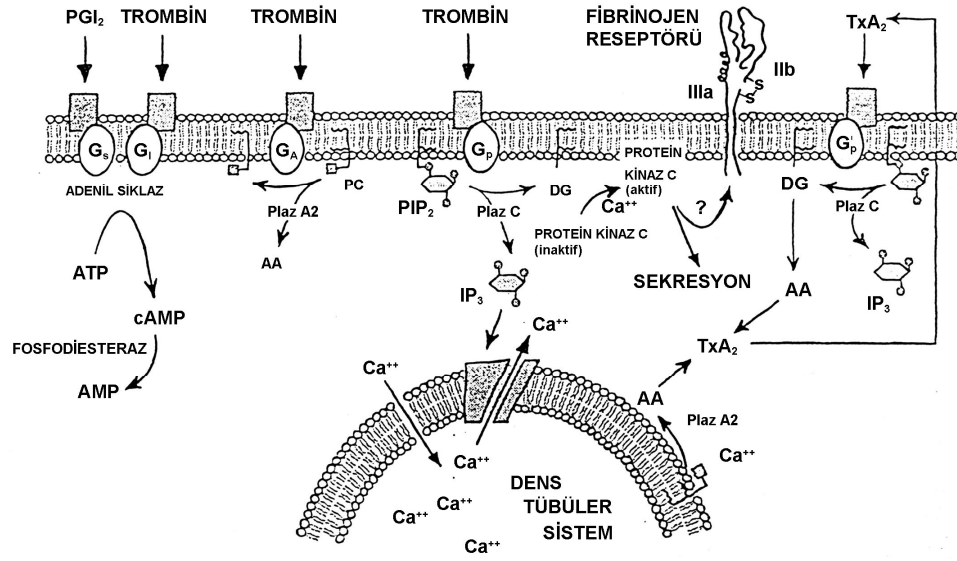
Trombositlerde iki tip granülün varlığı bilinmektedir. Bunlar dens granüller ve alfa granüllerdir. Elektron dens granüllerde başlıca serotonin, ADP ve ATP depolanır (53). Alfa granüller ise çeşitli lizozomal enzimleri içerir (25). Pıhtılaşma reaksiyonlarında rol alan trombosit faktör 3'ün (PF₃) kaynağının ise membran lipoproteinleri olduğu kabul edilmektedir. Trombositlerde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentlerin trombosit kontraktilesi ve şekil değişikliğinin sağlanması için gerekli olduğuna inanılmaktadır. Zucker-Franklin ve arkadaşları mikrofilamentlerin trombastenine denilen maddeyi içerdiklerini göstermişlerdir. Trombastenin aktin ve miyozin karakterinde proteinlerden oluşmuştur (25). Trombositlerin ribozom içerip içermedikleri tartışmalıdır; ancak megakaryositlerde ribozomların bulunması ve trombositlerin bir miktar protein sentezleme yeteneğine sahip olmaları ribozom içerebilecekleri görüşünü desteklemektedir (25).



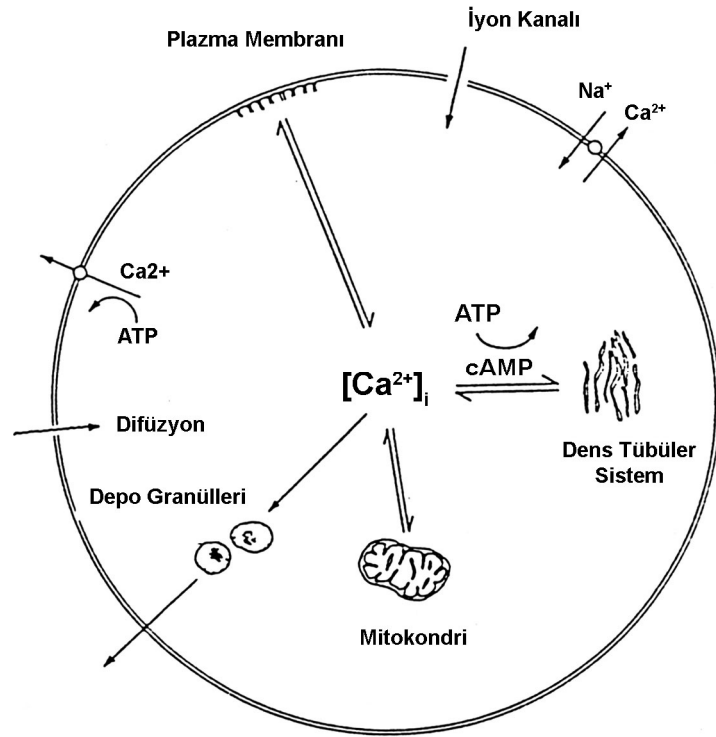
Şekil 2.4. Damarların subendotelyal tabakasındaki hasarı takiben açığa çıkan kollajen liflere trombositler yapışırlar (En üstte). Trombositlerden açığa çıkan ADP mikroagregat oluşumunu kolaylaştıran bir şekil değişikliğine neden olurken, trombositlerden salınan tromboksan A₂, agregasyonun daha da ilerlemesine neden olur. Trombositlerin koagülasyon faktörleriyle etkileşimleri sonucu (Ortada) ekstrinsek ve intrinsek koagülasyon yollarıyla üretilen trombin yüksek konsantrasyonlara ulaşır ve fibrin ağının oluşumunu başlatır. Trombinin sağlam endotel hücreleriyle etkileşimi sonucu oluşan prostasiklin ve aktive olmuş protein C, pıhtının boyutunu sınırlar (En altta). Prostasiklin trombosit agregasyonunu inhibe eder. Endotel hücrelerinden salınan plazminojen aktivatörleri de plazmin oluşumunu ve pıhtı erimesini gerçekleştirir (Gerrard JM. *Hospital Practice* 1988, 89-104).

2.1.2. Trombosit Fonksiyonları

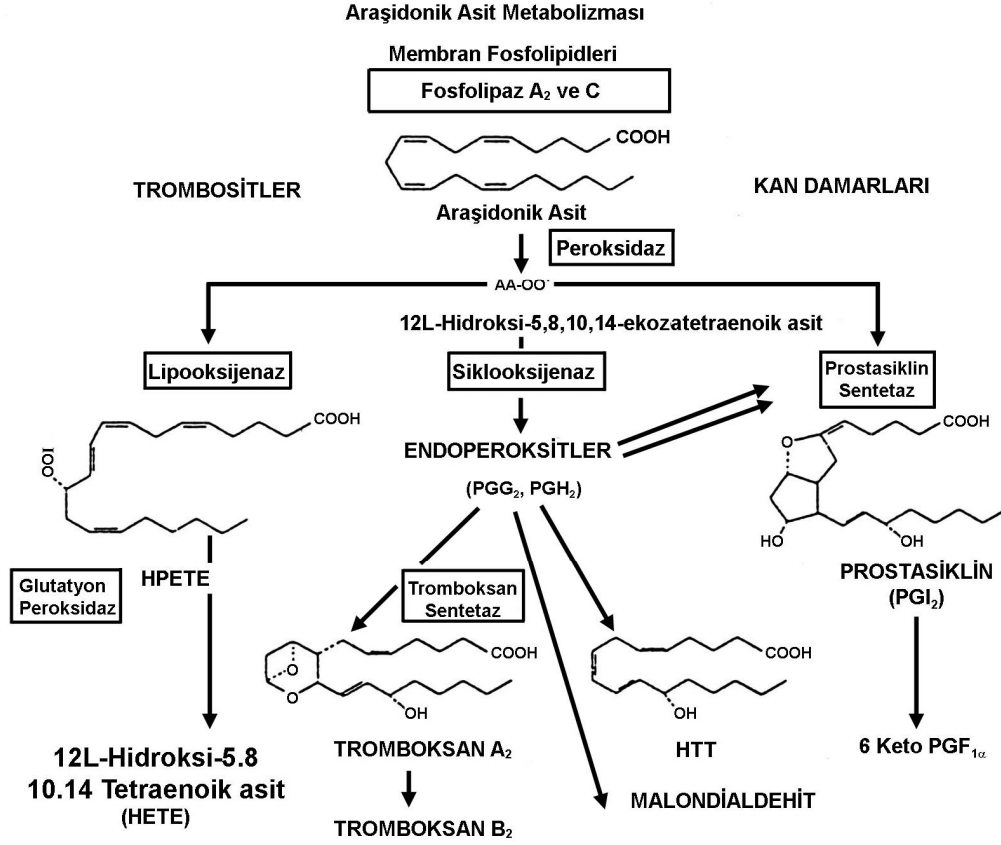
Trombositler hemostazın çeşitli aşamalarında görev alırlar (5,63). Pek çok madde trombositleri aktive edebilir. Trombositler herhangi bir şekilde aktive oldukları zaman saniyeler ve dakikalar içinde fonksiyonlarını yerine getirmeye başlarlar (36). Aktive olmuş trombositlerin in vitro olarak ayrı ayrı incelenebilen değişik fonksiyonları vardır. İn vivo koşullarda hemostaz sırasında bu fonksiyonel cevaplar birbirleriyle yakından ilişkilidir. Bunlar; adezyon, şekil değişikliği, agregasyon ve sekresyon şeklinde sıralanabilir (5). Fizyolojik trombosit aktivatörlerinin büyük çoğunluğu trombositlerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar (Şekil 2.5). Reseptörler aracılığı ile hücre içi ikincil haberci sistem uyarılır. Sinyal GTP bağlayan proteinler tarafından plazma membranı boyunca yayılır (6,37,63). Bu transdüser mekanizmalar fosfolipaz C ile indüklenen fosfoinozimid hidrolizi ve iyon kanalları gibi spesifik efektör sistemleri stimule ve regüle eder. Efektör sistemler inositol 1.4.5-trifosfat, Ca^{+2} ve diaçilgliserol gibi hücre içi habercilerin düzeylerini değiştirerek etkili olurlar (45,63,78) (Şekil 2.6). Bu değişiklikler fosforilasyona neden olarak enzim aktiviteleri ve proteinlerin yapısal özelliklerini değiştirerek fizyolojik yanıtı başlatırlar. İlave olarak trombositler iki büyük pozitif-feedback regülasyon mekanizmasına sahiptirler. Bunlar endoperoksitler (Eps) / tromboksan A_2 (TxA_2) oluşumu ve ADP sekresyonudur (6-8,37,45,52) (Şekil 2.7). Aktive olmuş trombositlerden açığa çıkan bu maddeler, lokal hormonlar olarak görev yaparlar ve spesifik reseptörlere bağlanarak diğer trombosit aktivatörlerine benzer şekilde moleküler olaylar zincirini başlatır veya sürdürürler.



Şekil 2.5. Trombosit aktivasyonu sırasında gelişen olaylar. Trombosit aktivasyonu agonistlerin trombosit yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmasıyla başlar ve inositol 1.4.5-trifosfat (IP₃), diaçilgliserol (DG) ve araşidonik asiti (AA) içeren ikincil habercileri aktive eder. IP₃, trombosit dens tübüler sisteminden Ca⁺² açığa çıkararak sitozolik serbest Ca⁺² konsantrasyonunu yükseltir. Diaçilgliserol, proteinkinaz C olarak bilinen Ca⁺² bağımlı serin/treonin kinaz ailesini aktive ederek granüler sekresyona ve glikoprotein IIb-IIIa kompleksi üzerinde bulunan fibrinojen reseptörlerinin açığa çıkmasına neden olur. Aynı zamanda, artan sitozolik serbest Ca⁺² konsantrasyonu fosfatidilkolin (PC) gibi membran lipidlerinden fosfolipaz A₂ aracılığıyla araşidonik asit salınımını kolaylaştırır. Bu işlem hem plazma membranında hem de dens tübüler sistemde gerçekleşir. Araşidonik asit, tromboksan A₂'ye dönüştükten sonra hücreden diffüze olarak ve trombositler üzerinde bulunan spesifik reseptörleriyle etkileşerek daha ileri trombosit aktivasyonuna neden olur. Trombositlerdeki G proteinlerinin; fosfoinozotid hidrolizi, araşidonik asit salınımı ve C-AMP oluşumunu regüle ettikleri gösterilmiştir. Farklı agonistler bu olayların farklı bölümlerini etkiler. Bunun nedeni muhtemelen trombosit reseptörlerinin farklı G proteinleri ile etkileşim içinde olmalarıdır. Örneğin trombin, fosfolipaz C'yi, fosfolipaz A₂'yi aktive eder ve adenilsiklaz tarafından C-AMP oluşumunu inhibe eder (Manning DR ve ark. *Thrombosis and Haemostasis* 1991; 66: 393-399).



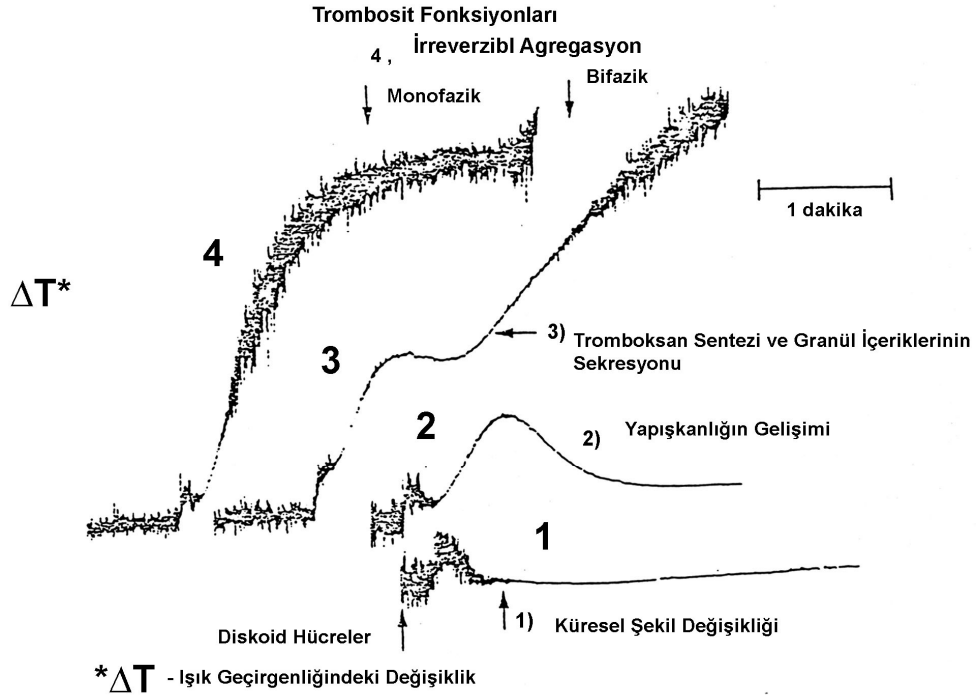
Şekil 2.6. Trombositlerdeki Ca^{+2} konsantrasyonunun kontrol mekanizmaları. Sitoplazmik iyonize kalsiyum konsantrasyonu; ATP bağımlı Ca^{+2} -pomпасı ve sodyum-kalsiyum değişimi yoluyla hücre dışına Ca^{+2} sekresyonu ve hücre içi depo bölgelerinde (dens túbüler sistem, mitokondri ve depo granüllerinde) Ca^{+2} tutulumuyla azaltılmaktadır. Hücre içi tutulum bölgelerinden Ca^{+2} salınımı veya hücre membranında bulunan spesifik iyon kanallarından hücre içine Ca^{+2} girişi ile hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonu yükselmektedir (Salzman EW ve ark. *Prog Hemost Thromb* 1989; 9: 177-202).



Şekil 2.7. Trombosit sitozolündeki serbest kalsiyumun artması fosfolipaz A₂'yi aktive eder. Bu enzimin aktivasyonu, membran fosfolipidlerinden araşidonik asidin (AA) serbestleşmesine neden olur. Serbest AA siklooksijenaz tarafından endoperoksitler, PGG₂ ve PGH₂'ye dönüştürülür. Endoperoksitler trombositlerde bulunan tromboksan sentetaz enzimi aracılığı ile tromboksan A₂'ye çevrilir. Bu metabolik yola ilaveten AA; lipooksijenaz tarafından hidroperoksieikozatetraenoik asit (12-HPETE) ve 12-hidroksieikozatetraenoik aside (12-HETE) dönüştürülür (Rao GHR. *Indian J Physiol Pharmacol* 1993; 37: 263-275).

Trombosit fonksiyonları başlıca iki grupta incelenmektedir. Birinci olarak reverzibl trombosit fonksiyonları (adezyon, şekil değişikliği ve primer yani reverzibl agregasyon), ikincisi ise irreverzibl trombosit yanıtları (sekresyon ve sekonder yani irreverzibl agregasyon) (5) (Şekil 2.8). Reverzibl trombosit yanıtlarının trombositlerin endotel hücre tabakasında hücreler arasında oluşabilecek aralıkları kapatmak, alfa-granüllerden büyüme faktörlerinin

salınma ve subendotelial dokudaki küçük defektlerin tamir edilmesi gibi fonksiyonlarla ilgili olabileceği, irreverzibl yanıtların ise trombositlerin hemostatik fonksiyonlarıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (52,63).



Şekil 2.8. Bir agregometre kaydı üzerinde trombinin çeşitli konsantrasyonlarının farklı trombosit fonksiyonları üzerine olan etkileri izlenmiştir. Osilasyonların kaybı trombositlerin diskoid şekillerinin küreye dönüşümlerini göstermektedir (1). Düşük dozlarda trombin ile elde edilen hafifçe yukarı doğru olan eğri yapışkanlığın ve reverzibl agregasyonun gelişimini gösterir (2). Trombinin optimum konsantrasyonları bifazik agregasyon oluşturur. İkinci agregasyon dalgası trombositlerden salınan prostaglandin, endoperoksitler/tromboksanlar veya ADP'ye bağımlıdır (3). Yüksek konsantrasyonlarda trombin ise monofazik irreverzibl agregasyona neden olur (Rao GHR. *Indian Physiol Pharmacol* 1993; 37: 263-275).

Dinlenim halindeki trombositler diskoid yapıdadır ve düzgün bir yüzeye sahiptirler. Stimulasyona ilk fizyolojik yanıt trombosit adezyonu ve şekil değişikliğidir (25). Damar endotel tabakalarında aralıkların oluşumuna neden

olan fizyolojik vazodilatasyon veya patofizyolojik damar hasarı subendotelyal dokunun açığa çıkmasına neden olur (63). Trombositler iki spesifik makromoleküler protein ile; kollajen ve vonWillebrand faktörle (vWF) etkileşerek subendotelyal materyale tutunurlar (31,61).

Trombosit adezyonu iki fazda gerçekleşir: Başlangıçtaki kontakt fazda bir trombosit damar duvarına küçük bir membran parçası veya psödopodlar yoluyla bağlanır. Bunu takip eden yayılma fazında ise trombosit subendotelyal dokuya geniş bir membran alanıyla daha sıkı bir şekilde bağlanır. İn vitro koşullarda trombositler kollajen liflere veya cam gibi yabancı yüzeylere de yapışabilirler (23).

Süspansiyon halindeki trombositler stimule edildiğinde ilk yanıtlardan biri şekil değişiklidir. Bu iki farklı morfolojik olayla gerçekleşir: Önce trombosit gövdesi sertleşir ve psödopodlar oluşur (5). İlâveten membran yüzeyleri düzensiz ve katlantılı bir görünüm alır. Adrenalin ve forbolester dışındaki tüm trombosit stimulanları tam bir trombosit şekil değişikliğine neden olurlar (63). Adrenalin ve forbolester ise trombosit küreselleşmesine yol açmadan birkaç psödopod oluşumuna neden olabilir. Bu durum, trombosit küreselleşmesi ve psödopod oluşumunun birbirinden bağımsız olaylar olduğunu göstermektedir. Psödopod formasyonu olmadan trombosit küreselleşmesi granüllerin merkezde toplanması ile sonuçlanır (25,85). Fizyolojik koşullarda şekil değişikliği; agregasyon ve sekresyondan önce oluşur. Trombosit agregasyonunun oluşumu için psödopod formasyonunun gerekli olduğu ileri sürülmüştür (85). Trombosit küreleşmesi sırasında granüllerin merkezde toplanması ise sekresyon yanıtının gerçekleşebilmesi için gereklidir. Diğer taraftan prokoagulan aktivite trombositlerin şekil değişikliği sırasında artmaktadır. Örneğin; aktive olan trombositlerin yüzeyinde trombin oluşumunun kolaylaştığı gösterilmiştir (23,45).

İn vitro koşullarda 2 tip agregasyon yanıtı ayırt edilebilmektedir: Reverzibl olan ve sekresyon reaksiyonu oluşmadan gerçekleşen primer agregasyon ile irreverzibl olan ve sekresyon yanıtıyla birlikte oluşan sekonder agregasyon (52). Primer agregasyon, trombosit süspansiyonunda Ca^{+2} iyonunun ve düşük konsantrasyonlarda trombosit stimulanlarının varlığında

indüklenir (23,45). Trombosit agregasyonuna yol açan olaylardan biri fibrinojenin reseptörüne bağlanması ile gerçekleşir. Yüksek konsantrasyonlarda agonist varlığında gözlemlenen irreverzibl agregasyon ise sekresyon yanıtı ile birlikte gerçekleşir (63).

Araşidonik asitten sentezlenen TxA_2 , dens granüllerden sekrete edilen ADP ve Ca^{+2} ile alfa granüllerden sekrete edilen adeziv proteinler, büyük irreverzibl trombosit agregatlarının oluşumuna neden olabilir. Fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve vWF'ün trombosit yüzeyinde yüksek konsantrasyonlarda varlığı alfa granüllerin sekresyonunu uyarır (14,23,25). Trombositlerin sekresyon fonksiyonu aktive olduğu zaman araşidonik asit metabolitlerinin, özellikle TxA_2 'nin oluşumu uyarılır. Dens granüllerden ADP, ATP, Ca^{+2} serotonin, alfa granüllerden adeziv proteinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü, trombosit faktör 4 ve lizozomal içerikler salınır (7,14,23,63). Alfa ve dens granüllerin sekresyonu yüksek dozda hemen hemen tüm trombosit agonistleriyle olan stimülasyon sonucu gözlenir. Lizozomal sekresyon yalnızca trombin veya kollajenin yüksek konsantrasyonlarıyla gözlenebilir (14,36).

Büyük trombosit agregatlarının hızla oluşumu için etkin amplifikasyon mekanizmalarına gereksinim vardır. Bunlar pozitif feed-back mekanizmaların ve agonistlerin birlikte etkileşimi sonucu gerçekleşir (55). Ekstrasellüler ortama salınan TxA_2 ve ADP, trombosit yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak, fosfoinozid hidrolizini, Ca^{+2} mobilizasyonunu ve protein fosforilasyonunu stimüle ederler ve fibrinojen reseptörlerini açığa çıkararak trombosit yanıtlarının büyümesine neden olurlar (23,30,55,63,85).

İkinci ve çok etkin bir amplifikasyon mekanizması trombosit agonistlerinin sinerjistik etkileşimleridir. Trombosit agonistlerinin tek başlarına eklendiklerinde etkin olmayan eşik altı konsantrasyonları trombosit süspansiyonlarına birlikte ilave edildiklerinde güçlü bir şekilde trombosit yanıtına sebep olurlar. Trombosit agonistlerinin etkinlikleri sırasında açığa çıkan ADP ve TxA_2 de birbirleriyle sinerjistik etkileşim gösterirler (23).

Koagülasyon sisteminin aktivasyonu sonucu oluşan trombin, aktive olmuş trombositlerden açığa çıkan TxA_2 ve ADP, dolaşımdaki miktarı artan

adrenalin ve vazopressin, aktive olmuş nötrofil ve makrofajlardan açığa çıkan trombosit aktive edici faktör (PAF) birer trombosit aktivatörüdürler (30). Bu trombosit stimulanları irreverzibl trombosit agregasyonunu ve sekresyonunu indükleyebilmek için ekstrasellüler Ca^{+2} ve trombosit siklooksijenazına gereksinim duyarlar.

Zayıf stimulanların (ADP, adrenalin) sekresyon ve irreverzibl agregasyonu güçlü şekilde indükleyebilmesi için siklooksijenaz aktivitesine gereksinim vardır (39,63). Orta derecede güçlü stimulanlar (PAF, vazopressin) TxA_2 oluşumu ve agregasyon gerçekleşmeden sekresyonu indükleyebilirler. Buna karşın, siklooksijenazın inhibisyonu ve ADP'nin ortamdan uzaklaştırılması büyük ölçüde sekresyonu azaltır, PAF ve vazopressin ile indüklenen irreverzibl agregasyonu engeller. Güçlü stimulanlar (trombin, kollajen) yüksek konsantrasyonlarda, siklooksijenaz bloke ediciler veya ekstrasellüler Ca^{+2} şelatörleri ile azaltılamayacak şekilde trombosit agregasyon ve sekresyonunu indüklerler (63). Buna karşın, trombin ve kollajen düşük konsantrasyonlarda, tamamıyla siklooksijenaz aktivitesi ve açığa çıkan ADP'ye bağımlı mekanizmalarla trombosit agregasyon ve sekresyonunu uyarırlar (30,38). Trombositten zengin plazma veya yıkanmış trombosit süspansiyonlarına eklenen düşük konsantrasyonlarda kollajen bir gecikme dönemini takiben şekil değişikliği ve agregasyonu indükler. Bu yanıtlar kollajen liflere yapışan trombositlerden açığa çıkan TxA_2 tarafından oluşturulur.

Dinlenme halindeki trombositlerin enerji kullanımı $3-6 \mu\text{mol ATP eq min}^{-1} 10^{-11}$ trombositir. Trombinle indüklenen maksimal agregasyon ve sekresyon sonrası enerji kullanımı $18 \mu\text{mol ATP eq min}^{-1} 10^{-11}$ düzeyine yükselir. Farklı trombosit yanıtları farklı enerji gereksinimlerine ihtiyaç duyar. Enerji gereksinimi; şekil değişikliği < agregasyon < dens granül sekresyonu < α granül sekresyonu << lizozomal sekresyon şeklinde sıralanır. Küçük agregatların erken dönemde oluşumu enerji tüketimi hızıyla yakın bir şekilde ilişkilidir (63). Sekresyon için agregasyondan çok daha fazla enerjiye gereksinim vardır. Enerji tüketimi ve sekresyon hızı arasında lineer bir ilişki vardır. Ca^{+2} ionoforları ile stimule edilen trombositler, agregasyon ve

sekresyon için fizyolojik agonistler ile stimule edildiklerine oranla çok daha fazla enerji tüketirler. Bu durum, reseptör aktivasyonunun trombosit fonksiyonlarını ekonomik bir yolla indüklediğinin göstergesidir (63).

2.2. Ateroskleroz Etyopatogenezinde Sigaranın ve Trombosit Aktivasyonunun Rolü

Ateroskleroz; damar duvarında kolesterol, lipid birikimi ve bağ doku artımı ile gelişen bir patolojidir. Ateroskleroz ve komplikasyonları, batı toplumlarındaki gibi yaşlı nüfusun yoğun olduğu ülkelerde en önemli ölüm nedenidir. Yaşlanma ile birlikte, arter duvarında ilerleyici bir kalınlaşma olmakta, damarların iç çapı daralmakta ve hemodinamik-tromboembolik komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Altmışbeş yaşından sonra ölümlerin yaklaşık %85'i ateroskleroza bağlı kalp-damar hastalıklarından ileri gelmektedir (79).

2.2.1. Aterosklerozda Görülen Patolojik Değişiklikler

Aterosklerotik lezyonlarda dejeneratif ve proliferatif değişiklikler birlikte ve yaygın olarak görülür (82) (Şekil 2.9). Aterosklerotik lezyonların erken dönemlerinde, intima ve mediada, hücreler arası mesafede lipid-kolesterol molekülleri birikmektedir (79). Damar duvarına göç eden makrofajlar, burada biriken lipidleri fagosite ederek köpük (foam) hücrelerine dönüşmektedirler. Endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar da; damar duvarında biriken lipidleri fagosite ederek veziküller içinde depolayabilmekte, böylece yağ vakuelleri oluşturmaktadırlar. Aterosklerotik değişikliklerin bulunduğu bölgelerde, bazal membran bütünlüğünü kaybetmekte, kollajen distrofisi gelişmekte, elastik dokuda yırtılma ve parçalanma olmakta, bazal membran, endotel ve düz kas hücrelerinden ayrılmakta, böylece intima ile diğer dokular arası bağlantılar zayıflamakta ve kaybolmaktadır. İntimanın bütünlüğünü kaybettiği bölgelerde ise trombüs oluşabilmektedir. Ayrıca endotel, düz kas

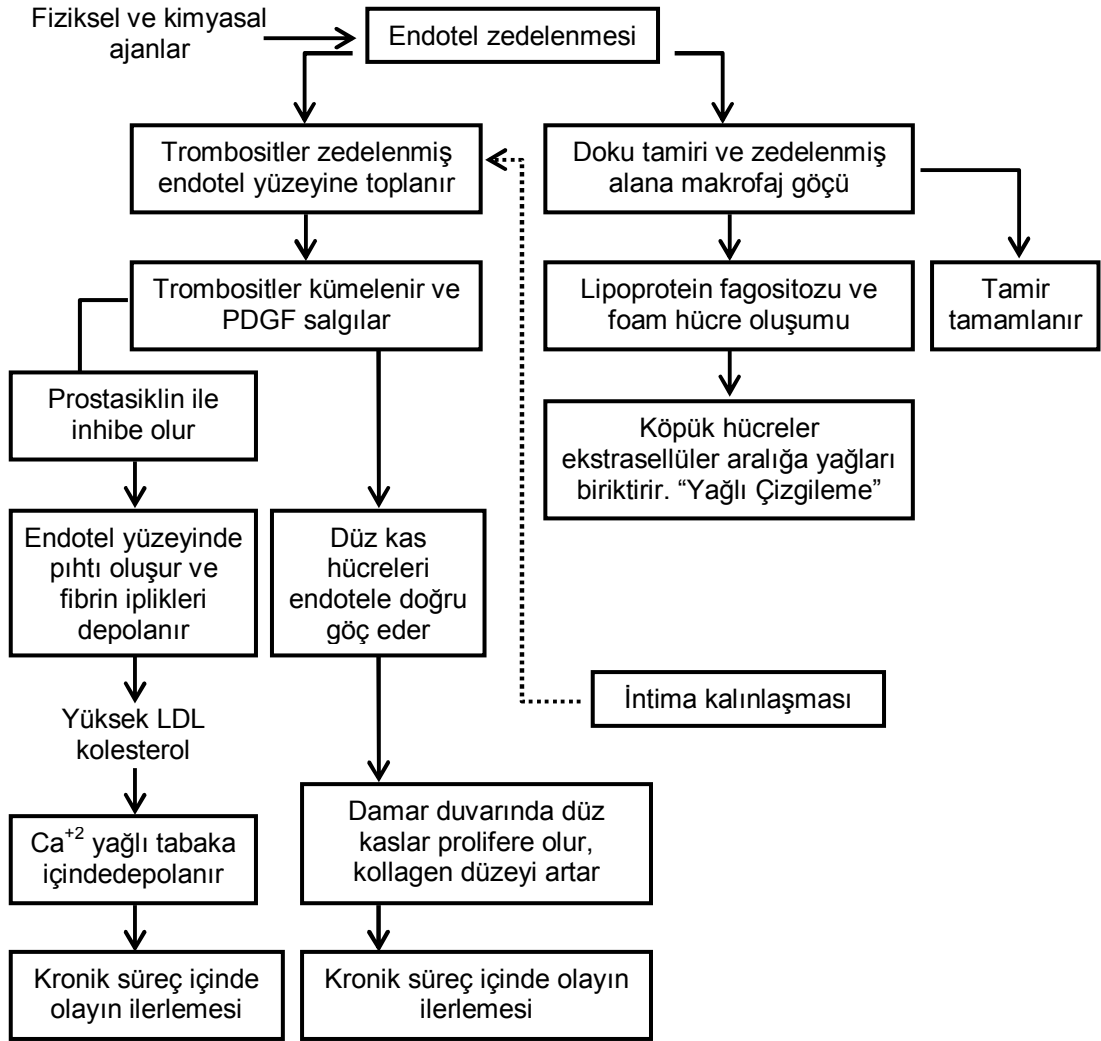
hücreleri ve fibroblastlarda mitotik aktivite artmaktadır. Bunun sonucunda proliferatif değışiklikler ortaya çıkmaktadır (79,82).

Aterosklerozun en belirgin tutulum bölgeleri; aorta, serebral arterler, koroner, karotid ve renal arterler gibi sistemik arterlerdir. Büyük sistemik arterlerin dallanma bölgeleri, ateroskleroz gelişimine en elverişli bölgelerdir (79).

2.2.2. Ateroskleroz İçin Risk Faktörleri

Kalıtım, yaş, hiperkolesterolemi ve hiperlipidemi, hipertansiyon, hiperglisemi, şişmanlık, sigara kullanımı, sağlıksız beslenme alışkanlıkları, stres olarak belirlenmiştir (79). Risk faktörlerinin birden fazla oluşu; aterosklerozun etyolojisinde birçok farklı mekanizmanın rol aldığı görüşünü desteklemektedir (16,79).

Hemodinamik etkilerin şiddetli olduğu bölgelerde görülen intima ve media zedelenmesi aterosklerozu başlatan en önemli faktördür. Kandaki yüksek kolesterol ve lipid seviyesi, serbest oksijen radikalleri, proteazlar, lipazlar, immün kompleksler, mikrobik toksinler, histamin, kininler ve sigara dumanı damar duvarında, mekanik yolla başlayan zedelenmeyi artıran diğer etkenlerdir (79) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Ateroskleroz patogenezinin şematik anlatımı. Ateroskleroz biyolojik olarak kompleks ve çok yönlü olaylar ile gelişir. PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Diana JN. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis* 1990, 1-7).

Endotel zedelenmesini takiben damar kan akımı aşağıdaki etkenlere bağlı olarak azalmaktadır:

- Endotel zedelenmesi oluşan bölgelerde trombositler uyarılmakta, adezyona uğramakta ve granüllerini boşaltmaktadırlar (41,64,75). Trombositten salınan serotonin, tromboksan A₂ gibi vazokonstriktör ajanlar damarlarda spazma neden olmaktadır. Trombüs ve ondan kopan emboliler de damarları tıkayarak ciddi, hatta ölümcül komplikasyonların gelişimine aracılık etmektedirler.

b) Sağlam endotel, prostosiklin (PGI_2) ve endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF veya nitrik oksit) gibi damar genişleticilerin üretim yeridir. EDRF ve PGI_2 , trombosit adezyon ve agregasyonunu da güçlü bir şekilde engellemektedir. Zedelenen damar duvarından EDRF, PGI_2 , gibi damar genişleticiler ve antiagreganların salınımı azalmaktadır. Bütün bu etkilerin sonucunda vazokonstriksiyon gelişmekte, zedelenmiş damardan geçen kan akımı azalmakta ve dokuların beslenmesi bozulabilmektedir (79).

2.2.3. Zedelenmeyi Takiben Damar Duvarında Artan Mitoz

Zedelenmiş damar bölgesine yapışan trombositler; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) fibroblast büyüme faktörü (FGF) epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi mitojenik faktörleri salgılamaktadırlar (41). Yine zedelenmiş damar bölgelerinde biriken makrofajlar da PDGF'ün ve FGF'ün önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar. PDGF, damar düz kası hücrelerinde Ca^{++} birikimine sebep olmaktadır. Hücre içi Ca^{++} miktarının artması da, düz kas hücrelerinde kasılmaya ve zedelenmiş damar lümeninde daralmaya yol açmaktadır. EGF ve FGF'ün de vazokonstriktör etkileri olduğu bilinmektedir. PDGF ve FGF'ün etkisi ile zedelenmiş damar bölgesinde tamir olayları başlamaktadır. PDGF'ün aterogenezde önemli bir role sahip olabileceği iddia edilmektedir. PDGF; fibroblast, düz kas hücreleri gibi bağ doku hücrelerinde ve damar endotel hücrelerinde çoğalmaya sebep olmaktadır. Ayrıca bağ doku hücrelerinde kollajen, elastin ve proteoglikanları içeren bağ doku matriks proteinlerinin üretimini artırmaktadır. Zedeleyici etki uzun süre devam ettiği zaman, intima ve media kalınlaşmakta ve ateroskleroz gelişmektedir (79).

Mekanik ve kimyasal zedelenme sonucu damar duvarında kollajen ve elastinden peptid parçaları ayrılmakta, plazminojen aktivatörleri ve kallikrein de açığa çıkmaktadır. Bu maddeler monositleri uyarmakta ve damar duvarına geçmelerine sebep olmaktadır. Zedelenmiş damar bölgesinde biriken monositler güçlü kemotaktik faktörleri (kompleman 5A, lökotrien B4, interlökin 1, tümör nekroz faktör gibi), proteazları ve oksijen radikallerini üretip salarlar

ve diğ er monosit / makrofajların da bölgeye birikmesine yol açarlar. Monosit / makrofajlar da kolesterolü, lipidleri ve lipoproteinleri fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşmektedirler (79).

2.2.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Aterosklerozdaki Rolü

Aterosklerozun ilerlemesinde, mekanik zedelenmenin olduğu bölgede açığa çıkan oksijen radikalleri önemli bir role sahiptirler. Komplemanın 5A kesimi, nötrofil ve monosit / makrofajlardan oksijen radikallerinin üretimine neden olmaktadır (79). Serbest oksijen radikalleri, yeni üretilen endotel ve bağ doku hücreleri ile proteoglikan ve kollajen gibi bağ doku proteinleri üzerine zararlı etkiler yapmaktadırlar. Damar endoteli de, oksijen radikallerine ve lipid hidroperoksitlere karşı çok duyarlıdır. Serbest oksijen radikalleri, hücre zarlarında zedelenmeye yol açmakta, damar geçirgenliğini artırabilmektedir. Böylece başta albümin olmak üzere plazma proteinleri ve lipoproteinler intimaya geçmekte, bu da monosit / makrofajların damar duvarına geçişini daha da artırarak aterogenezi hızlandırmaktadır (79).

2.2.5. Sigaranın Aterogeneze Etkisi

Sigara, damar duvarını zedelemekte, trombosit agregasyonuna yol açmakta, permeabiliteyi artırarak kan lipoproteinlerinin, lipidlerin ve diğ er büyük moleküllerin damar duvarına geçişine neden olmaktadır (16,33). Damar duvarına geçen lipoproteinler ve lipidler, monosit / makrofajlardan inflamasyon cevabına aracılık eden prostaglandin E₂ (PGE₂) ve lökotrienler gibi araş idonik asit metabolitlerinin üretimine neden olmakta; serbest radikallerin oluş umunu ve proteolitik enzimlerin salınımını artırmaktadırlar. Sigaranın iç erdiği aromatik maddelerin arilhidrokarbon hidroksilaz enzimi ile endotel ve dü z kas hücreleri tarafından metabolize edilmeleri sırasında da serbest oksijen radikalleri üretilmektedir. Monosit / makrofajların ve endotel hücrelerinin ürettikleri serbest radikaller de ateroskleroz geliş imini uyarmaktadırlar (79).

Sigara kan lipid, kolesterol ve lipoprotein yoğunluğu üzerine de etki yaparak aterogenezi hızlandırmaktadır. Sigara içenlerde plazma trigliserid, total-kolesterol, LDL, VLDL yoğunluğu artmakta, HDL seviyesi düşmektedir. Sigara LDL'nin oksidasyonuna da neden olmakta ayrıca makrofajlara LDL'nin alınımını uyarmaktadır (79).

Plazma LDL seviyesi arttığı zaman, zedelenen arter duvarında LDL molekülüleri birikmektedir. Aterosklerotik lezyonlarda bu yol aşırı kullanılmakta ve foam hücreleri oluşmaktadır.

Yüksek kan kolesterol ve trigliserid seviyesinin damarlar üzerindeki zararlı etkileri çok genç yaşlardan itibaren görülmektedir. Hiperkolesterolemili kişilerde damar endotelinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler görülmekte, damar duvarında kolesterol ve lipid birikimi olmakta ve erken yaşlarda ateroskleroz gelişmektedir (62).

Damar duvarında biriken lipidler ve kolesterol burada okside olarak kolesterol oksidasyon ürünlerine (oksisterollere), LDL de okside-LDL (OK-LDL)'ye dönüşmektedir (79). Monosit / makrofaj ve düz kas hücreleri, üzerlerindeki LDL reseptörleri aracılığı ile OK-LDL'yi almakta ve köpük hücrelerine dönüşmektedirler. OK-LDL, lipoksijenaz enzimini uyararak makrofajlardan O_2^- salınımına yol açmakta ve oksidatif zedelenmenin ilerlemesine neden olmaktadır. Böylece OK-LDL, inflamasyon cevabının yanı sıra damar endotelinin zedelenmesine ve tromboza da yol açabilmektedir (79).

Sigara içenlerde plazma fibrinojen miktarı artmış ve fibrinolitik aktivite azalmış olarak bulunmuştur.

Yukarıda sayılan tüm bu etkiler, sigara içenlerde damar duvarında lipoproteinlerin, lipidlerin ve fibrin moleküllerinin depolanmasını artırıcı bir etkiye yol açmakta ve damar yaşlanmasını hızlandırmaktadır (79). Sigara içenlerde insidansı artan aterosklerotik kalp damar hastalıkları ve bu hastalıklara bağlı komplikasyonlar dikkate alındığında, bu etkilere aracılık eden mekanizmalar da önem kazanmaktadır. Mevcut veriler, sigaranın indüklediği aterosklerotik kalp damar hastalıklarındaki etyolojik faktörler içinde trombositlerin de önemli bir yeri olduğuna dikkat çekmektedir.

Sigaranın trombosit fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar genellikle subakut ve kronik sigara iicilerinden elde edilen verilere dayandırılmıştır. Bu alışma deney hayvanları üzerinde 4 saat sureyle akut, yoğun, pasif sigara dumanı solutmanın trombosit fonksiyonları üzerinde etkili olup olmayacaklarını araştırmak amacıyla planlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma akut sigara içiminin trombosit fonksiyonları üzerine etkisini araştırmak amacıyla planlandı. Çalışma kontrol (n:12) ve deney (n:12) olmak üzere iki grup halinde yapıldı. İnsanlarda sigara içme alışkanlığının bireysel farklılıkları göz önüne alınarak, deney hayvanlarında bir günde dört saat süreyle ortalama birbuçuk paket (~30) sigara içimini taklit etmek üzere oluşturulan modelden elde edilecek sonuçların daha sağlıklı bir değerlendirmeye yardımcı olacağı düşünöldü. Deney hayvanlarına 1/10 oranında dilue edilmiş sigara dumanı içeren havayı solutma olanağı sağlayan bir sürekli sigara solutma sistemi kullanıldı (15).

Çalışmada 24 adet ortalama 300 g ağırlığında erkek Wistar rat kullanıldı. Deney hayvanları Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hayvan Yetiřtirme ve Temin Laboratuvarından sağlandı. Gerek deney grubu, gerekse kontrol grubu hayvanlarının deney süresince beslenme ve ortam şartları bakımından benzer koşullarda tutulmalarına özen gösterildi. Ayrıca seçilen hayvanların önceden trombosit fonksiyonlarını etkileyebilecek herhangi bir ajanla karşılaşmamalarına dikkat edildi.

3.1. Deneyin Yapılışı

Deney grubundaki ratlar dört saat süreyle 1/10 oranında dilue edilmiş sigara dumanına maruz bırakıldılar. Kontrol grubunda ise sigara dumanı dışındaki tüm koşulların benzer olmasını sağlamak amacıyla deney hayvanlarının aynı düzenek içine konularak oda havasını solumaları sağlandı. İşlemden hemen sonra ratlardan ether anestezisi altında intrakardiyak yolla 4'er cc kan alındı.

Kontrol ve deney grubundaki ratlarda trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek amacı ile trombositlerin agregasyon ve ATP sekresyonları incelendi. Alınan kan örneklerinin 3 cc'si trombosit fonksiyonlarını incelemek için 1/10 oranında %3,8'lik trisodyum sitrat içeren propilen tüplere konurken,

1 cc'si EDTA'lı tüplere (Prelevesang – Biotube) konularak tam kan sayımı için ayrıldı.

3.2. Kan Sayımları

Kan sayımları Medonic Cell Analyzer (Model No: 160) kullanılarak elektronik yöntemle Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. Kontrol ve deney gruplarında eritrosit (/mm³), lökosit (/mm³), trombosit (/mm³) sayıları ile hemoglobin (Hb g/dl) ve hematokrit (Hct %) değerleri tayin edildi.

3.3. Trombosit Fonksiyonlarının Saptanması

Trombositlerin refrakter dönemlerini geçirmeleri amacı ile kan örnekleri, oda sıcaklığında, 30 dakika kadar bekletildikten sonra, trombosit agregasyon ve ATP sekresyonu tayini işlemine geçildi. Trombosit agregasyonu Chrono log (560-VS) marka agregometrede impedans tekniği ile değerlendirildi (1,18). Bu teknik, kan örnekleri içine yerleştirilen bir çift platin elektroda aktive olan trombositlerin yapışması sonucu elektrodlar arası impedansın artması ve impedansta meydana gelen değişikliğin yazdırılması esasına dayanmaktadır. Özel silikonize tüpler içine konan 450 µl kan, 450 µl serum fizyolojik ile sulandırıldı. Kaydedicinin kalibrasyonu, 20 ohm'luk bir impedans değişikliği ile kalem 8 cm yer değiştirecek şekilde ayarlandı. Trombositlerin ATP sekresyonunun incelenmesinde ise biyoluminesan tekniği kullanıldı. Kan örneklerine eklenen lusiferinin ATP ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan ışığın, şiddetinin ölçülmesi esasına dayanan bu teknik gereğince, her kan örneğine 100 µl lusiferin-lusiferaz (Chrono-Lume Reagent 395) eklendi. Hazırlanan örneklerle 1000 rpm hız ile kanın karıştırılmasını sağlayan teflon kaplı manyetik karıştırıcılar konuldu. Önce bilinen konsantrasyonlarda standart ATP solüsyonu (Chrono-Lume 387) ile açığa çıkan ışık şiddeti saptandı (2 nM). Daha sonraki örneklere kollajen agreganından (Chrono-Par Reagent 385) 5 µl konularak 5 µg/ml final konsantrasyonunda trombositlerin

aktivasyonu sağlandı ve 2 cm/dk'lık kağıt hızında agregasyon ve sekresyon eğrileri yazdırıldı (70).

Trombosit agregasyonu, impedans değişikliğinin maksimum olduğu noktada, maksimum agregasyon Şiddeti (ohm), maksimum agregasyon hızı (ohm/dk) olarak değerlendirildi (31).

Trombosit ATP sekresyonunun değerlendirilmesi, bilinen konsantrasyonda standart ATP solüsyonu ile elde edilen eğrilerle karŐılaŐtırılarak, kollajen ile indüklenen trombositlerden sekrete edilen ATP miktarının saptanması yolu ile gerŐekleŐtirildi. SonuÇlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen bulgular Mann Whitney-U testi kullanılarak istatistiksel olarak karŐılaŐtırıldı ve değerlendirildi. İstatistik değerlendirme A.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Kan Parametreleri Bulguları

Tablo 4.1'de kontrol ve deney grubu hayvanların Hb, Hct, eritrosit, lökosit ve trombosit sayıları ortalama değerleri \pm standart hataları verilmiştir.

Tablo 4.1. Kontrol grubu ve akut sigara dumanı solutulan deney grubu ratların Hb, Hct, eritrosit sayısı, lökosit sayısı ve trombosit sayısı ortalama değerleri \pm standart hataları ile istatistiksel karşılaştırmaları

	Kontrol Grubu (ort\pmSH)	Deney Grubu (ort\pmSH)	P
Hb değeri (g/dl)	14,3 \pm 0,5	14 \pm 0,5	p>0,05
Hct değeri (g/dl)	40,9 \pm 1,3	39,4 \pm 1,4	p>0,05
Eritrosit sayısı (/mm ³)	7740833 \pm 283434	7988333 \pm 250000	p>0,05
Lökosit sayısı (/mm ³)	14058 \pm 249	8783 \pm 176	p>0,05
Trombosit sayısı (/mm ³)	862750 \pm 479	842917 \pm 445	p>0,05

Tablo 4.1'de görüldüğü üzere kontrol ve deney grubu hayvanlarının uygulama sonrası lökosit sayısı dışında ölçülen kan parametrelerinde istatistiksel açıdan önemli fark bulunmamaktadır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman ise sigara içirilen deney grubunun lökosit sayılarının anlamlı derecede düşük olduğu saptandı. Periferik kandaki trombosit sayısı kontrol grubunda ortalama 862750 \pm 479 / mm³ iken deney grubunda ortalama 842916 \pm 445 / mm³ olarak hesaplandı. Bu sonuçlar akut sigara dumanı

solutulan ratların ortalama trombosit sayısı ile kontrol grubu ratların ortalama trombosit sayıları arasında önemli bir farklılık olmadığını gösterdi.

4.2. Trombosit Agregasyon Bulguları

Kollajen ile indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon hızı kontrol grubunda ortalama $9,32\pm0,89$ ohm/dk; deney grubunda ise $13,27\pm1,05$ ohm/dk olarak bulundu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon hızları (ohm/dk)

	Kontrol Grubu (ort±SH)	Deney Grubu (ort±SH)	P
Kollajen (5 µg/ml)	9,32±0,89	13,27±1,05	p<0,01

Buna göre akut yoğun sigara solutulan grupta maksimum agregasyon hızının anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (p<0,01).

Maksimum agregasyon şiddeti ise kontrol grubunda ortalama $15,82\pm1,41$ ohm, deney grubunda ise $20,68\pm1,53$ olarak hesaplandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kontrol grubu ve deney grubunda hesaplanan maksimum agregasyon şiddetleri (ohm)

	Kontrol Grubu (ort±SH)	Deney Grubu (ort±SH)	P
Kollajen (5 µg/ml)	15,82±1,41	20,68±1,53	p<0,05

Bu sonuçlar, deney grubunda agregasyon şiddetinin anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdi (p<0,05).

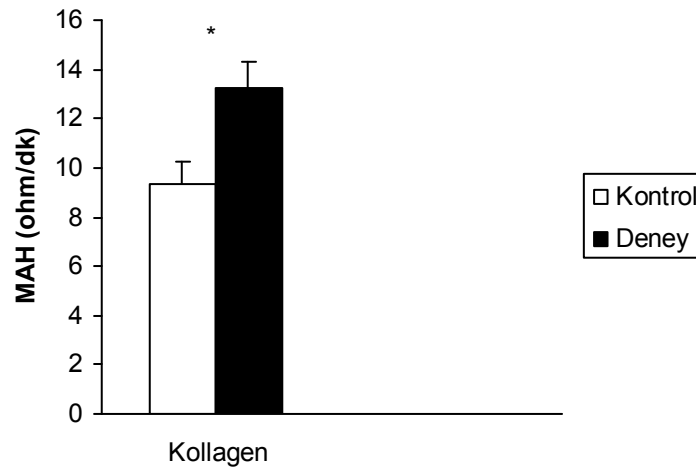
Kollajen ile indüklenen trombosit ATP sekresyonu kontrol grubunda $2,28 \pm 0,21$ nmol deney grubunda ise $4,08 \pm 0,44$ nmol olarak saptandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerde ATP sekresyonları (nmol)

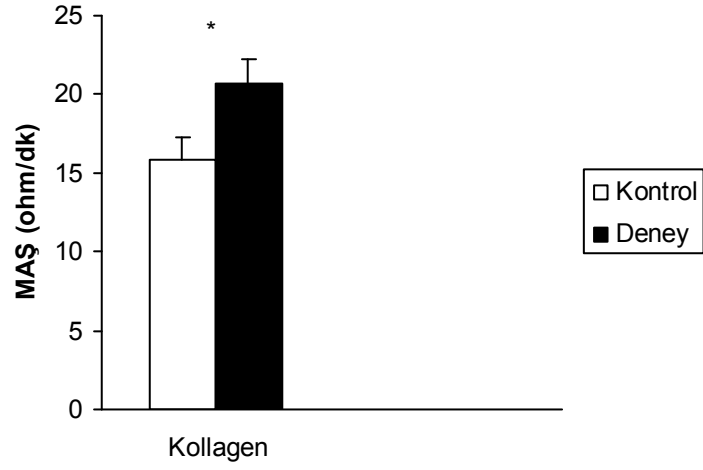
	Kontrol Grubu (ort \pm SH)	Deney Grubu (ort \pm SH)	P
Kollajen (5 μ g/ml)	$2,28 \pm 0,21$	$4,08 \pm 0,44$	$p < 0,01$

Sigara dumanına maruz bırakılan deney grubunda trombosit sekresyon cevabının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($p < 0,01$).

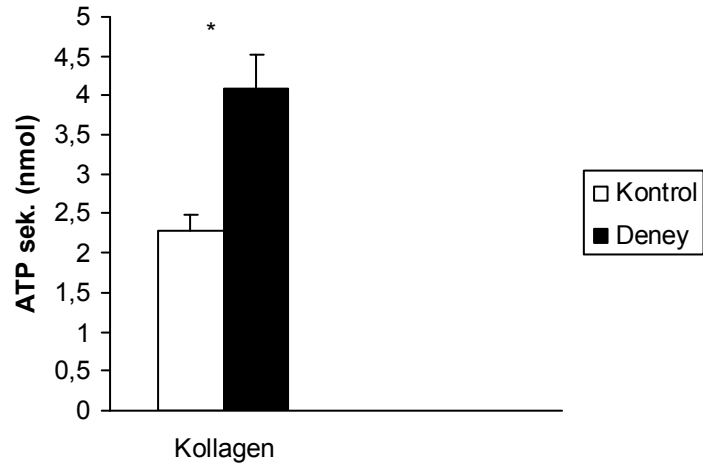
Sonuç olarak; 4 saat süreyle akut yoğun sigara dumanı ortamında tutulan deney grubu ratlarda, kollajene karşı trombosit agregasyon hızı ve şiddeti ile ATP sekresyon cevaplarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu (Şekil 4.1, 4.2, 4.3) yani sigara dumanına maruz kalmanın trombositleri aktive ettiği saptandı.



Şekil 4.1. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon hızları (MAH) $*(p < 0,01)$



Şekil 4.2. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon şiddetleri (MAŞ) *($p < 0,05$)



Şekil 4.3. Kontrol grubu ve deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin ATP sekresyonları (ATP sek) *($p < 0,01$)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar akut sigara içiminin kan hb. hct değerleri ve eritrosit, trombosit sayılarında önemli bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir.

Kollajen ile indüklenen trombosit maksimum agregasyon hızı sigara içen deney grubunda önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bu yükseklik sigara içiminin trombosit agregasyonunu akut olarak artırıcı bir etki yaptığına işaret etmektedir.

Kontrol ve sigara solutulan deney grubundan elde edilen maksimum agregasyon şiddeti sonuçları da sigaranın trombosit agregasyonunu uyarıcı bir etkisi olduğunu desteklemektedir.

Kollajen ile indüklenen trombosit ATP sekresyonu da yine sigara solutulan deney grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Trombosit sekresyon bulguları da sigaranın trombositlerde sekresyon fonksiyonu üzerinde uyarıcı bir etkiye neden olabildiğini ortaya koymaktadır.

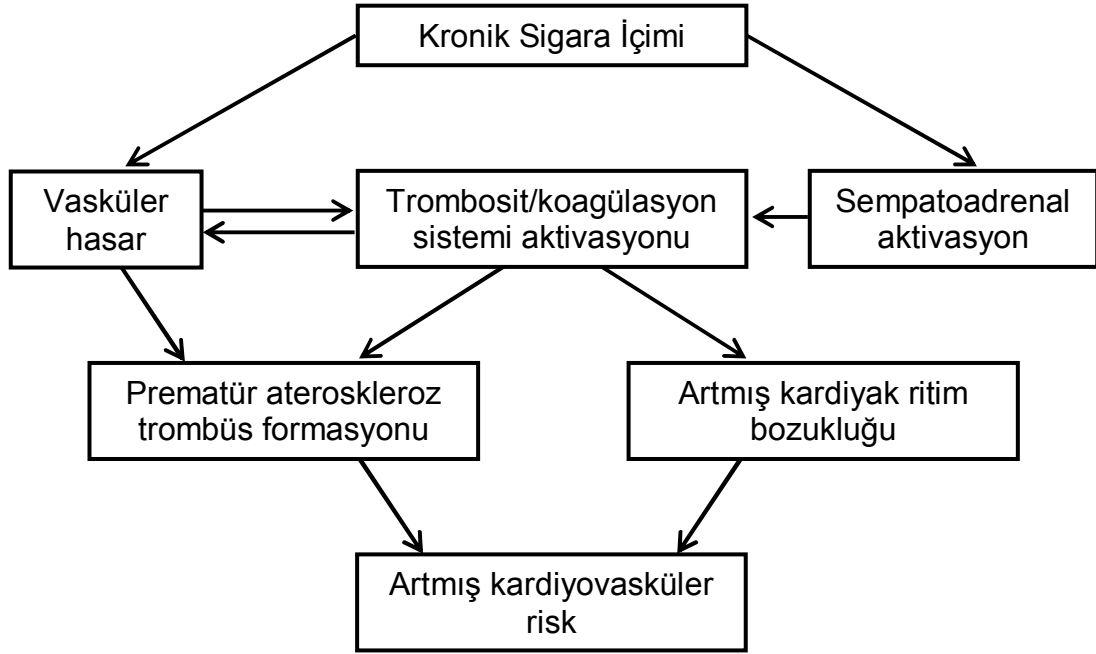
Bizim sonuçlarımız, klinik ve epidemiyolojik çalışmalar ile kronik sigara içicilerinde tespit edilen trombosit aktivasyonundaki artışın 4 saatlik akut yoğun sigara soluma sonrasında dahi görülebildiğini ortaya koymuştur. Bu etki özellikle aterosklerotik kalp damar hastalığı bulunan kişilerde sigara içimi sonrası görülen arteriyel kan akımındaki belirgin azalma ve diğer komplikasyonların ortaya çıkmasına aracılık edebilir (29).

Kontrol grubu ve sigara solutulan deney grubunun lökosit sayıları karşılaştırıldığında; deney grubu lökosit sayısının anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Lökosit sayısındaki bu önemli düşüklük sigaranın lökosit aktivasyonuna yol açıp lökosit adezyonu ve migrasyonunu uyararak zedelenen damar bölgelerine tutunmalarına ve dokulara geçişlerinin artışına neden olmasına bağlı olabilir (35). Ancak elimizde bu etkiyi değerlendirebilecek bir veri bulunmamaktadır.

Günümüze kadar biriken retrospektif çalışma sonuçları kronik sigara içicilerinde aterosklerotik koroner ve periferik damar hastalıkları ile miyokard enfarktüsü riskinin çok daha yüksek olduğunu göstermektedir (21,51,67,74,77,80). Yine genç yaşlardan itibaren yoğun şekilde sigara içen kişilerde ani ölüm riskinin çok daha yüksek olduğu da bilinmektedir (20,26,25,35,67). Bu nedenle günümüzde sigara içimi en önemli önlenbilir kardiyovasküler hastalık risklerinden biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar genellikle kronik sigara içicileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmaların sonuçları dikkate alındığında sigara ve aterosklerotik kalp damar hastalıkları arasındaki ilişkilerin multifaktöriyel bir etyolojiye sahip olduğu sonucuna varılmaktadır (79).

Sigaranın aterosklerotik hastalıkların gelişimi ve bu hastalıklara bağlı komplikasyonların ortaya çıkmasındaki rolü göz önüne alındığında bu etkilerin başlıca birkaç sistem üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Sigara dumanı içinde bulunan maddelerin çoğu toksik, iritan, mutajenik etkilere sahiptirler (16). Sigara dumanı içinde bulunan toksik maddelere; oksijen serbest radikalleri, kadmiyum, kurşun gibi ağır metaller veya demir gibi geçiş metalleri, NO, NO₂, peroksinitrit, nitrozaminler gibi oksidan nitrojen bileşikler, SO, SO₂ gibi sülfür içeren bileşikler, fenoller, epoksitler, kuinonlar ve birçok aromatik hidrokarbonlar örnek verilebilir (3,27,29,32). Bu veriler sigara dumanında tespit edilen oksijen serbest radikalleri dışındaki diğer birçok maddenin de oksidan hasarı başlatan veya ilerleten bir etkiye sahip olabileceklerini ortaya koymaktadır (28).

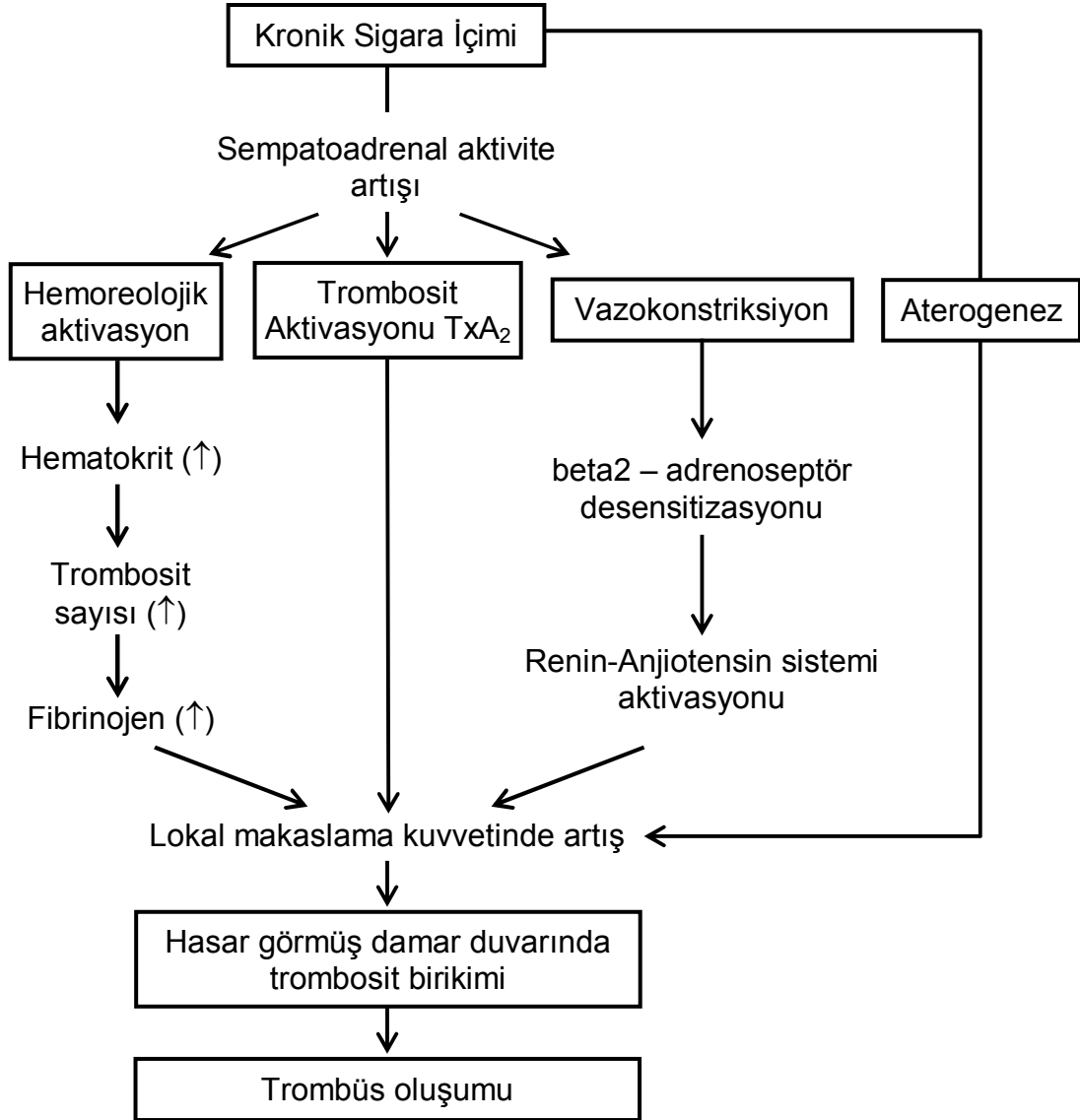
Sigara içimini takiben akut dönemde orta ve büyük çaplı arterlerde kan akımının azaldığı gösterilmiştir (29,74). Bu azalışta çeşitli faktörler etkili olabilir. Örneğin sigara dumanı ile inhale edilen nikotin sempatoadrenal aktivasyona neden olmaktadır (2,12,20,21,27,35,40,54,81) (Şekil 5.1). Sempatik aktivite artışı orta ve küçük çaplı arterlerde vazokonstriksiyonu uyarırken diğer taraftan trombositler üzerindeki adrenalın reseptörleri aracılığıyla da trombosit aktivasyonuna yol açmaktadır (35,50,54,58,65,69,73).



Şekil 5.1. Sigara içimine bağlı artmış kardiyovasküler hastalık riskinde rol alan mekanizmalar (Murray JJ ve ark. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis* 1990: 189-198).

Sempatoadrenal aktivite artışına bağlı koroner vazokonstriksiyon koroner kan akımını azaltarak kalp kası perfüzyonu üzerine olumsuz etki yaparken yine sempatoadrenal aktivite artışına bağlı olarak miyokardın metabolik aktivitesi ve oksijen kullanım hızı da artmaktadır (40,83,84). Bu etkiler sonucunda özellikle aterosklerotik damar bölgelerinde gelişebilen kan akımı azalışı ve akut, subakut veya kronik olarak gelişebilen trombüs formasyonu normal şartlarda dahi aterosklerotik damar bölgesinde azalmış olan kan akımını daha da azaltarak akut miyokard enfarktüsü riskini artırmaktadır (22,81,83,84).

Sigara içiminin trombositlerde tromboksan A_2 üretimini de uyardığı bilinmektedir (40,59,73,80) (Şekil 5.2). TxA_2 inaktif durumda olan trombositleri aktive eder; ayrıca damarlar üzerinde kuvvetli vazokonstriktör etki gösterir (10,22,77). Bu nedenle sigara içimine bağlı TxA_2 sentezindeki artış da sigara içimi sonrası arteriyel kan akımında görülen akut azalmanın bir nedeni olabilir.



Şekil 5.2. Sigara içiminin trombojenik ve vazoaktif etkilerinin hipotetik şeması (Lassila R ve ark. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1992; 46: 81-86).

1991 yılında Glantz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, pasif ve aktif sigara içicilerinde kandaki trombosit agregatlarının önemli derecede arttığı gösterilmiştir (27). Trombosit agregatlarında görülen bu artışların kronik sigara içiminin trombositleri aktive ettiğine dair bir işaret olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, yine pasif ve aktif kronik sigara içicilerinde kandaki ölü endotel hücre sayısında içmeyenlere göre belirgin bir yükseklik

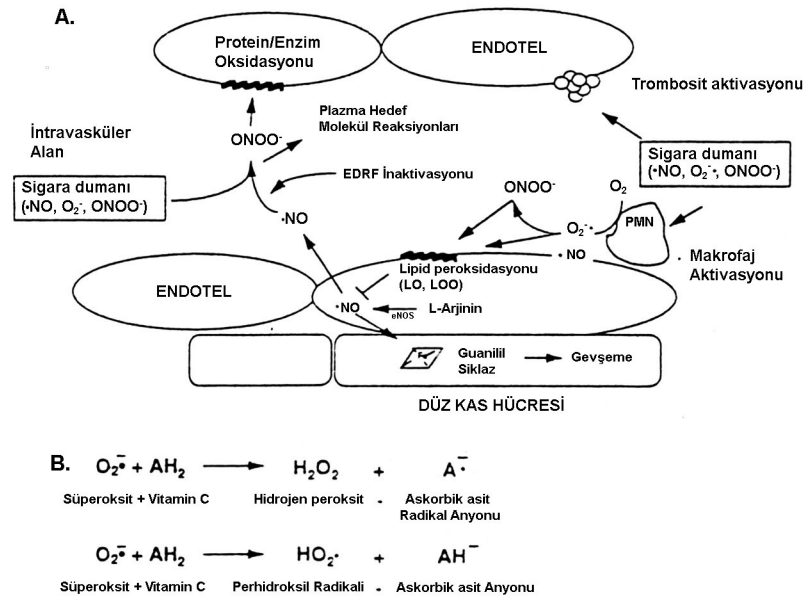
olduğu da tespit edilmiştir (16,27). Yine subakut nikotin uygulamasının ratlarda aort endoteli üzerinde küçük trombosit agregatlarının oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (47,49,65) (Şekil 5.3). Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ise 4 saatlik pasif, yoğun sigara solumanın bile ratlarda trombosit agregasyon ve sekresyonunu uyardığını ortaya koymuştur.



Şekil 5.3. Bir hafta süreyle yüksek doz nikotine maruz bırakılan ratlarda aort endotelinin elektron mikroskopik görünümü. Bir interkostal dalın üzerinde küçük bir trombosit agregatı görülmektedir (Pittilo RM. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis* 1990: 61-78).

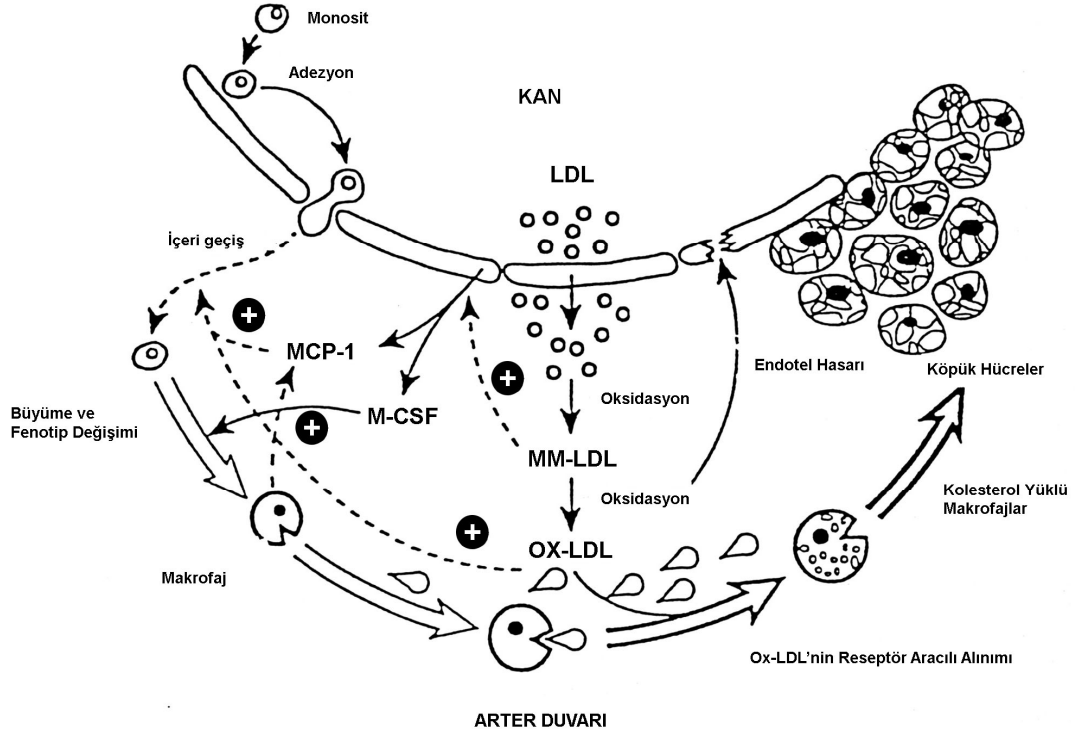
Günümüze kadar elde edilen çalışmaların pek çoğunda subakut ya da kronik sigara içimine bağlı endotel zedelenmesinin in vivo koşullarda tespit edilen artmış trombosit agregasyonunun başlıca nedenlerinden biri olduğu bildirilmiştir (10,33,47,49). Gerçekten, sigara içenlerde görülen endotel hasarı gerek aterosklerotik kalp hastalıkları ve komplikasyonlarında, gerekse in vivo koşullarda gelişebilecek trombosit aktivasyonunda önemli bir etken olabilir (4,67) (Şekil 5.4). Sigara dumanı içinde bulunan birçok maddenin başlıca oksidan hasara yol açarak damar endotelinde zedelenmeye yol açtığı bilinmektedir (49). Bu zedelenmede sigara dumanı içinde bulunan oksijen serbest radikalleri, azotlu ve kükürlü oksidan ajanlar, kadmiyum, kurşun gibi

toksik metaller ve demir iyonu gibi geçiş metalleri direkt toksik etkiyle endotel zedelenmesine aracılık edebilirler. Diğer taraftan bu maddelerin etkisiyle aktive olan fagositer hücreler de yüksek konsantrasyonlarda ürettikleri peroksinitrit gibi serbest radikallerle endotel üzerindeki zedeleyici etkiyi artırabilirler (40). Sigara dumanı içinde bulunan oksidan maddelerin endotel membranındaki lipidlerde peroksidasyona yol açtığı gösterilmiştir. Lipid peroksidasyon ürünlerinin de yine endotel hücrelerine toksik etki yaptıkları bilinmektedir (35,66).



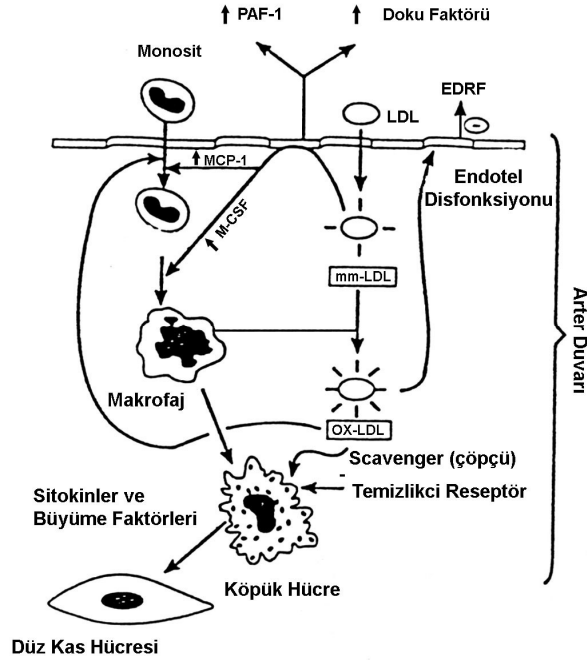
Şekil 5.4. Sigaranın Neden Olduğu Endotel Hasarında Rol Oynayan Mekanizmalar. A) Süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve peroksinitrit ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) içeren sigara dumanı oksidan stres oluşturur ve $\cdot\text{NO}$ 'yu peroksinitrite dönüştürerek endotel bağımlı vazodilatasyonu bozar. Ayrıca trombosit ve makrofajların aktivasyonuna, lipid peroksidasyonuna neden olur. Vitamin-C ise süperoksiti yok ederek $\cdot\text{NO}$ yıkımını, lipid peroksidasyonu ve trombosit, nötrofil aktivasyonunu engeller, oksidan hasar sonucu gelişen damarların endotel bağımlı gevşeme fonksiyonundaki bozulmayı önler. Süperoksite bağlı lipid peroksidasyon LO^{\cdot} (Lipid alkoksil radikali), LOO^{\cdot} (lipid peroksil radikali) oluşumu ve eNOS (endotelyal NO sentetaz enziminin) blokajı ile sonuçlanır (Heitzer T ve ark. *Circulation* 1996; 94: 6-9).

Sigara dumanı içindeki oksidan ajanların plazma lipidlerinin de oksidasyonuna yol açtıkları bilinmektedir (27,44,60,71) (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. Okside olmuş düşük dansiteli lipoprotein (OX-LDL) doğal LDL'den daha kuvvetli bir aterojenik madde olduğunu pek çok yönüyle gösteren oksidatif değişim hipotezinin bir şeması. Köpük hücrelerin öncülleri olan monositler endotele yapışmakta ve sonra subendotelyal aralığa penetre olmaktadır. OX-LDL bu olayı direkt olarak stimüle eder ve hafif derecede okside olmuş LDL (MM-LDL) endotel hücrelerinden makrofaj kemotaktik faktör (MCF-1) salgınını artırarak makrofaj migrasyonunu uyarır. OX-LDL doku makrofajlarının membranındaki reseptörlerine bağlanır. Reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınan lipoprotein molekülleri foam hücrelerinin oluşumuna neden olur. MM-LDL'nin etkisi ile endotel hücrelerden üretilen makrofaj koloni stimule edici faktör (M-CSF) monositlerin makrofajlara dönüşümünü kolaylaştırır. Sonuçta, OX-LDL endotel hasarını artırarak plazma proteinlerinin geçişini ve trombositlerin adezyonunu uyararak aterogenez gelişimini kolaylaştırır (Steinberg D. *Circulation* 1991; 84: 1420-1425).

Sigara içenlerin plazmasında artan okside olmuş lipoproteinler; özellikle okside olmuş düşük dansiteli lipoproteinler, damar duvarında birikme eğilimi göstermekte ve endotel hücreleri üzerinde zedeleyici etki yapmaktadır (19,29,60,62) (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. Okside olmuş düşük dansiteli lipoproteinlerin (OX-LDL) aterogenez gelişimindeki rolünü tanımlayan bir şema (Jialal I ve ark. *Clin Chem* 1996; 42: 498-506).

- MCF-1 : Makrofaj kemotaktik faktör
- EDRF : Endotel kaynaklı gevşeme faktörü
- MM-LDL : Orta derecede okside olmuş LDL
- M-CSF : Makrofaj koloni stimüle edici faktör
- PAF-1 : Platelet aktive edici faktör-1

Artan veriler ile, günümüzde sigara içiminin membran lipidlerinde ve plazma lipoproteinlerinde neden olduğu oksidatif değişikliklerin sigara içimine bağlı endotel hasarına aracılık ettiği kabul edilmektedir (4,16,35,43,66,68).

Sigara içiminin neden olduğu plazma lipidlerindeki oksidasyona bağlı kalitatif değişikliklerin yanı sıra plazma lipid profilinde de kantitatif değişikliklere yol açtığı çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (13,44). Bu çalışmalarda değerlendirmeye alınan gruplar arasındaki yaş, cinsiyet, sigara

içme alışkanlığı, beslenme ve genetik yapıya bağlı farklılıklar nedeniyle elde edilen sonuçlar da farklılıklar gösterebilmektedir. Buna rağmen sigara içimine bağlı plazma lipid profili değişiklikleri konusunda genel bir fikir birliğine varılmış durumdadır. Mevcut verilere dayanılarak sigaranın plazma çok düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol, düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol, total kolesterol ve trigliserid düzeylerinde artırıcı etki yaptığı, plazma yüksek dansiteli lipoprotein düzeyinde ise azalmaya neden olduğu kabul edilmektedir (13,16,44,77). Sigara içenlerin kan lipid profilinde görülebilen bu değişiklikler arter duvarındaki subendotelyal tabakada lipoprotein, kolesterol ve lipid birikimini hızlandırarak zaman içinde endotelyumun bu tabakadan koparak ayrılmasına neden olabilir (66). Endotel tabakasını kaybeden damarda açığa çıkan subendotelyal tabaka trombositleri kendine çekerek ve makrofaj migrasyonunu uyararak bu bölgede trombüs gelişiminin ve inflamatuvar olayların artarak ilerlemesine yol açacaktır (66).

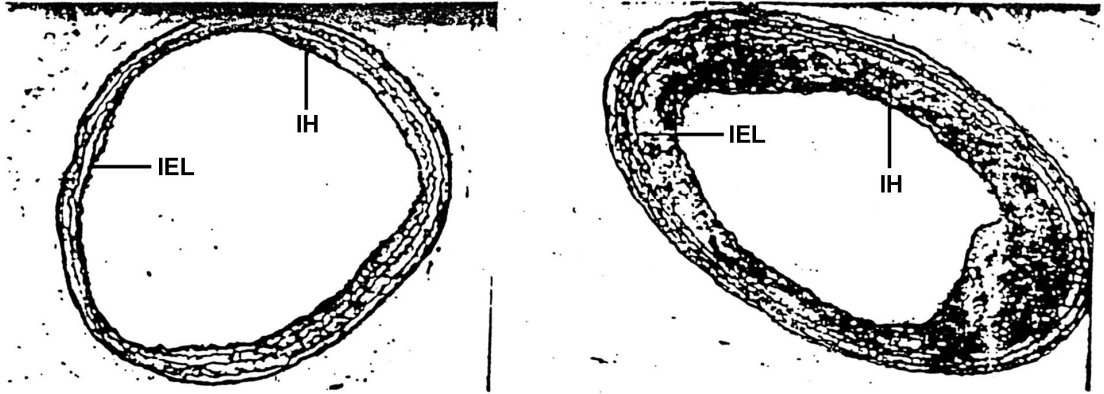
Yukarıdaki bilgilere dayanılarak arter sisteminde gelişen damar endotel hasarının aterosklerotik hastalıkların başlamasında ve/veya ilerlemesinde en önemli etkenlerden biri olduğu ileri sürülmüştür. Sigara içenlerin damar endotel hücrelerinde gelişen hasar, erken dönemlerde dahi bu hücrelerde PGI₂ ve NO üretiminin de azalmasına neden olmaktadır (29,43,59) (Şekil 5.4). Ayrıca yine sigara içiminin NO'nun peroksinitritlere dönüşümünü artırarak da fizyolojik etkilerini azalttığı ortaya konmuştur. Endotel zedelenmesi sonucunda gelişen PGI₂ ve NO sentezindeki azalma bu bölgelerde trombosit agregasyonunu uyarırken, diğer taraftan plazmanın pıhtılaşması yönünde prokoagulan aktiviteyi de uyarır (29).

Kronik sigara içicileri üzerinde yapılan çalışmalar bu kişilerdeki plazma fibrinojen ve fibrin yıkım ürünleri düzeylerinin içmeyenlere göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (20,34,35). Bu bulgular sigara içenlerde artan prokoagulan aktiviteyi işaret etmektedir. Plazmada artan fibrinojen ve fibrin yıkım ürünleri, trombosit aktivatörleri ile aktive olan trombositlerdeki fibrinojen reseptörlerine de (in vivo koşullarda) uyarıcı etki yapabilir (20).

Kronik sigara içicilerinde sigara içme süresine bağlı olarak devam eden endotel hasarı sonucunda bu bölgelerde aktive olan trombositler granüler

içeriklerini sekrete etmektedirler. Trombositlerden sekrete edilen trombosit kaynaklı büyüme faktörü damar duvarı düz kasları ve fibroblastlarda proliferasyona yol açarak proteoglikanlar ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimini artırarak bu bölgelerde damar duvarının kalınlaşmasına yol açarlar (46,66,79) (Şekil 5.7). Bu nedenle uzun süre devam eden endotel hasarı kronik süreç içinde damar lumeni daralmasının bir nedeni olarak kabul edilmektedir (46).

Damar duvarında biriken okside olmuş lipoprotein, lipid ve kolesterol moleküllerinin makrofajlar tarafından fagositozu ve sindirimi yavaş işleyen bir mekanizmadır (66). Bu nedenle doku makrofajları aterom plağının uzaklaştırılmasında çoğu kez etkin bir fonksiyon gösteremezler. Diğer taraftan aterosklerotik damar duvarında aktive olarak ve köpük hücrelerine dönüşen fagositer hücreler de trombosit kaynaklı büyüme faktörünü üreterek aterogenezi hızlandırıcı etkiye aracılık ederler (66).



Şekil 5.7. Kronik Sigara İçimi Karotid Arterlerde İntima Hiperplazisini Hızlandırır.

Şekil a. Kontrol grubu ratların karotid arter fotomikrografisi

IEL: İnternal elastik lamina

IH: İntimal hiperplazi

(Pekrik PV ve ark. *Stroke* 1993; 26:

1409-1414)

Şekil b. Dört hafta süreyle yüksek

dozda (3-6 sigara / gün) sigara

dumanına maruz bırakılan ratların

karotid arterlerindeki intimal

hiperplazi.

Biriken veriler ateroskleroz etyopatogenezinde rol oynayan damar endotel hasarı, subendotelyal tabakada lipoprotein, lipid, kolesterol birikimi, monosit, makrofaj migrasyonu, trombosit agregasyonu, damar duvarı kalınlaşması ve kan akımı azalmasında sigara içiminin etkili olabildiğini göstermektedir. Sunulan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise akut yoğun sigara solutma sonrası deney hayvanlarından alınan kanda in vitro trombosit agregasyon ve sekresyonunun aktive olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular sigara içiminin endotel zedelenmesinden bağımsız bir yolla da trombositleri aktive edebildiğini göstermektedir. Bu etkiye sigara dumanında bulunan oksidan ajanlar kısmen de olsa katkıda bulunuyor olabilirler. İki farklı araştırmacı grubu tarafından yapılan çalışmalarda superoksit radikali ve hidrojen peroksidin in vitro koşullarda trombosit adezyon ve agregasyonunu artırdığı gösterilmiştir (11,57). Bu veriler yukarıdaki görüşü destekler niteliktedir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmadan elde edilen veriler ile aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Akut, yoğun, pasif sigara içimi trombosit agregasyon ve sekresyonunu uyaran önemli bir ekzojen faktördür.
2. Yoğun sigara içicilerinde akut miyokard enfarktüsü ve ani ölüm riskinin yüksek olduğu bilinmektedir (64,76). Bu etkide in vivo koşullarda akut olarak gelişebilecek trombüs formasyonunun önemli bir rolü olabilir. Bu nedenle en azından özellikle yüksek aterosklerotik kalp damar hastalığı riski taşıyan kişilerin kısa sürelerle dahi olsa, yoğun sigara dumanına maruz kalmaları trombosit aktivasyonuna yol açarak kardiyovasküler komplikasyon riskini artırabilir.

Bu sonuçlara ilave olarak akut yoğun sigara içiminin in vivo koşullarda trombosit aktivasyonu ve trombosit agregatlarının oluşumunu uyarıcı etkilerinin olup olmadığını araştırmak için daha ileri fizyolojik, biyokimyasal ve elektromikroskopik çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Akut Yoğun Sigara Dumanı Solutulan Ratlarda Tesbit Edilen Trombosit Agregasyon ve Sekresyon Değişiklikleri

Bu deneysel çalışmada akut sigara içiminin trombosit fonksiyonları üzerine etkisini araştırmak amaçlandı. Bu amaçla Chen ve arkadaşları tarafından tarif edilen bir sürekli sigara içme modeli kullanılarak deney grubu hayvanlarına sigara solutuldu. Bu sistem içinde deney grubu hayvanları 1/10 oranında dilue edilmiş sigara dumanına bir gün içinde 4 saat süreyle maruz bırakıldı. Kontrol grubu hayvanları ise aynı düzenek içinde ve aynı sürede sigara dumanı içermeyen oda havası soludular. Uygulamaları takiben her iki gruptan alınan kan örneklerinden kan hemoglobin, hematokrit değerleri, eritrosit, lökosit ve trombosit sayımları yapıldı. Ayrıca trombosit agregasyonu ve sekresyonu tam kanda Chrono-Log Model 560-VB Agregometre kullanılarak, impedans ve biyoluminesan teknikleriyle ölçüldü. Sigara solutulan gruptan elde edilen kan hemoglobin, hematokrit değerleri ve eritrosit, trombosit sayıları kontrol grubundan elde edilenler ile karşılaştırıldığında aralarında önemli farklar olmadığı gözlemlendi. Deney grubundan elde edilen ortalama lökosit sayısı ise önemli derecede düşük bulundu. Deney grubunda kollajenle indüklenen trombositlerin maksimum agregasyon hızı, maksimum agregasyon şiddeti ve ATP sekresyon değerleri kontrol grubu hayvanlarından anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu sonuçlar akut, yüksek yoğunlukta sigara içiminin in vitro koşullarda değerlendirilen trombosit agregasyon ve sekresyon fonksiyonları üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Günümüze kadar yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda genellikle kronik sigara içicilerinde kandaki trombosit agregatlarının sayıca arttığı ve yine bu kişilerde in vitro koşullarda değerlendirilen trombosit fonksiyonlarının uyarıldığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ise yüksek yoğunlukta solutulduğu zaman akut, pasif sigara içiminin trombosit agregasyon ve sekresyon fonksiyonlarını aktive ettiğini göstermiştir. Bu etkinin in vivo koşullarda da gerçekleşebileceği düşünüldü. Özellikle aterosklerotik koroner ve periferik arter hastalığı olan kişilerde akut olarak gelişebilecek ve/veya ilerleyebilecek tromboembolik olaylar kan akımında akut olarak değişiklik yapabilir. Böylece sigara içimi zaten bozulmuş olan doku perfüzyonunu daha da azaltır ve dolaşım sistemi ile ilgili komplikasyonların ortaya çıkmasında etkili olabilir.

Anahtar Sözcükler: Sigara içimi; Trombosit agregasyonu; Trombosit sekresyonu

SUMMARY

Platelet Secretion and Aggregation Changes Found in Rats Inhaled Acute Heavy Cigarette Smoke

In this experimental study, it was planned to investigate the effects of acute cigarette smoking on the platelet functions. For this purpose cigarette was smoked to the experimental animals by using a cigarette smoking machine which was described by Chen et al. In that system experimental animals were exposed to cigarette smoke during 4 hours daily. Control group animals inhaled room air in the same system during the same period of time. Following the applications, in blood samples taken from both groups, blood hemoglobin, hematocrit values, erythrocyte, leukocyte and platelet numbers were counted. Additionally in the same blood samples platelet aggregation and secretion functions were measured with Impedance and Bioluminescence techniques by using Chronolog Model 560-VB Aggregometer. When compared with the values of control groups, there were no significant differences between the blood hemoglobin, hematocrit, erythrocyte, platelet counts of the animals inhaled cigarette smoke. The leukocyte count of the experimental group was significantly low. Compared with the values of control group, maximal aggregation rate, maximal intensity and ATP secretion values of the platelets induced with collagen were significantly high. Those results showed that acute heavy cigarette smoking had stimulatory effect on the platelet aggregation and secretion functions that were measured in vitro conditions. In clinical and epidemiological studies made until today generally have been shown that in chronic smokers the number of platelet aggregates in blood increases and again in these people the platelet functions examined in vitro conditions are stimulated. The results obtained from our study showed that when smoked heavily, acute, passive cigarette smoking activated platelet aggregation and secretion functions. This effect may occur also in vivo conditions. Especially in people with atherosclerotic coronary and peripheral artery diseases the thromboembolic events developing and/or progressing acutely may cause acute changes in blood flow. So cigarette smoking decreases the tissue perfusion much more which is already destroyed and may have effects on development of the complications related with circulatory system.

Key Words: Cigarette smoking; Platelet aggregation; Platelet secretion

KAYNAKLAR

1. Abbate R, Boddi N, Prisco D, Gensini GF. Ability of whole blood aggregometer to detect platelet hyperaggregability. *Am J Clin Pathol.* 1989; 91: 159-164.
2. Aghaji M, Nabuko R, Cuzuegbunam, Oyeka I. The relationship of white blood cell and platelet counts to cigarette smoking in adult Nigerians. *Central African Journal of Medicine* 1990; 36(11): 273-278.
3. Bao-lu Z, Liang-Jun Y, Jing-wutt, Wen-juan X. ESR spin trapping studies on the free radicals in gas phase of cigarette smoking. *Chinese-Medical Journal* 1991; 104(7): 591-594.
4. Blanche D. Involvement of hydrogen and lipid peroxides in acute tobacco smoking-induced platelet hyperactivity. *Am J Physiol.* 1995; 268: 679-685.
5. Bloom W, Fawcett DW. Blood platelets. *A Textbook of Histology*, 1982: 139-144.
6. Brass LF, Hoxie JA, Kieber-Emmons T, Manning DR, Poncz M, Woolkalis M. Agonist receptors and G proteins as mediators. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*, 1993: 17-36.
7. Born GVR. Adenosine diphosphate as a mediator of platelet aggregation in vivo: an editorial view. 1985; 72: 741-746.
8. Burch EA, Kadowitz PJ, Kotler-Cope S, McNamara DB. The effects of alcoholism and smoking on platelet eicosanoid production in vitro. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty. *Acids* 1991; 42: 39-44.
9. Burckhardt JJ, Anderson WHK, Kearney JF, Cooper MD. Human blood monocytes and platelets share a cell surface component. *Blood* 1982; 60: 767-771.
10. Caro CG. Cigarette smoking causes acute changes in arterial wall mechanics and the pattern of arterial blood flow in healthy subjects: Possible insight into mechanisms of atherogenesis. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 273-280.

11. Clark RA, Klebanoff SJ. Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. *The Journal of Immunology* 1980; 124(1): 399-405.
12. Colditz GA. Cigarette smoking and coronary artery disease. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 311-326.
13. Craig WY, Palomaki GE, Johnson AM, Haddow JE. Cigarette smoking-associated changes in blood lipid and lipoprotein levels in the 8- to 19-year-old age group: A Meta-Analysis. *Pediatrics* 1990; 85(2): 155-158.
14. Cerrito F, Lazzaro MP, Gaudio E, Arminio P, Aloisi G. 5H₂-receptors and serotonin release: Their role in human platelet aggregation. *Life Sciences* 1993; 53: 209-215.
15. Chen BT, Weber RE, Yeh HC, Lundgren DL, Sinipes MB, Mauderly JL. Deposition of cigarette smoke particles in the rat. *Fundam Appl Toxicol.* 1989; 13: 429-438.
16. Davis JW. Some acute effects of smoking on endothelial cells and platelets. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 107-118.
17. Diana JN. Tobacco smoking and atherosclerosis: overview. In: Diana JN, ed. New York: Plenum Press, 1990: 1-7.
18. Falcon C, Arnout J, Vermeylen J. Platelet aggregation in whole blood-studies with a platelet counting technique-methodological aspects and some applications. *Thrombosis R.* 1989; 423-428.
19. Feuerstein G, Goldstein RE. Lipid peroxides and the coronary circulation. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136: 485-487.
20. Fitz Gerald GA, Oates JA, Nowak J. Cigarette smoking and hemostatic function. *Am Heart J.* 1988; 115: 267-271.
21. Folts JD, Gering SA, Laibly SW, Bertha BG, Bonebrake FC, Keller JW. Effects of cigarette smoke and nicotine on platelets and experimental coronary artery thrombosis. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 339-358.

22. Fuster V, Adams PC, Badimon JJ, Chesebro JH. Platelet-inhibitor drugs' role in coronary artery disease. *Progress in Cardiovascular Diseases* 1987; 24(5): 325-346.
23. Gachet C, Cazenave JP. ADP induced blood platelet activation: a review. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1991; 33: 347-358.
24. Gèrald L, Fruchart JC. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53: 206-209.
25. Gerrard JM. Platelet aggregation: cellular regulation and physiologic role. *Hospital Practice* 1988; 89-104.
26. Gering SA, Folts JD. Exacerbation of acute platelet thrombus formation in stenosed dog coronary arteries with smoke from a non-tobacco-burning cigarette. *J Lab Clin Med.* 1990; 116: 728-736.
27. Glantz SA, Parmley WW. Passive smoking and heart disease. *Circulation* 1991; 83(1): 1-12.
28. Halliwell B. Current Status Review: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Path.* 1989; 70: 737-757.
29. Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidants vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94: 6-9.
30. Huzoor-Akbar, Kundu N, Kornhauser R. Normal thrombin binding leads to greater fibrinogen binding and increased platelet aggregation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 1993; 53(26): 1967-1974.
31. Kakishita E, Higuchi M, Suehiro A, Nagai K. A new index for collagen induced platelet aggregation. *Thrombosis Research* 1989; 56: 465-475.
32. Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Path.* 1991; 72: 1-7.
33. Kjaeldgaard A, Larsson B. The influence of cigarette smoke and treatment with contraceptive hormones on the fibrinolytic activity in the rat. *Thrombosis Research* 1984; 36: 571-578.

34. Kutti T. Smoking, platelet reactivity and fibrinogen. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 129-134.
35. Lassila R, Laustiola KE. Cigarette smoking and platelet-vessel wall interactions. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1992; 46: 81-86.
36. Magro A, Bizios R, Catalfamo J, Blumenstock F, Rudofsky V. Collagen-induced rat platelet reactivity is enhanced in whole blood in both the presence and absence of dense granule secretion. *Platelet Reactivity* 1992; 68: 345-356.
37. Manning DR, Brass LF. The role of GTP-binding proteins in platelet activation. 1991; 66(4): 393-399.
38. Mikkola T, Ristimäki A, Viinikka L, Ylikorkala O. Human serum, plasma and platelets stimulate prostacyclin and endothelin-1 synthesis in human vascular endothelial cells. *Life Sciences* 1993; 53: 283-289.
39. Mores N, Hartire M, Pistritto G, Candillo C, Folli G. A discrepancy between platelet α_2 -receptor density and functional circulatory changes in hypertensives. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1990; 16: 411-416.
40. Murray JF, Nowak J, Oates JA, Fitz Gerald GA. Platelet-vessel wall interactions in individuals who smoke cigarettes. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 189-198.
41. Mustard JF, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL. Platelets, blood flow, and the vessel wall. *Circulation* 1990; 81 (suppl I): 24-27.
42. Mustard JF, Packham MA. Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation. *Pharmacological Reviews* 1970; 22(2): 97-187.
43. Niki E, Minanisawa S, Oikawa M, Kamuro E. Membrane damage from lipid oxidation induced by free radicals and cigarette smoke. *Annals New York Academy of Sciences* 1992.

44. Pan X, Staprans I, Read TE, Rapp JH. Cigarette smoke alters chylomicron metabolism in rats. *J Vasc Surg.* 1993; 18: 161-169.
45. Peterson SN, Lapentina EG. Platelet activation and inhibition. *Annals New York Academy of Sciences* 1993; 53-63.
46. Petrik PV, Gelabert HA, Moore WS, Quinones-Baldrich W, Law MM. Cigarette smoking accelerates carotid artery intimal hyperplasia in a dose-dependent manner. *Stroke* 1995; 26: 1409-1414.
47. Pittilo RM. Cigarette smoking and endothelial injury: a review. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 61-78.
48. Pittilo RM, Bull HA, Gulati S, Rowles PM, Blow CM, Machin SJ, Woolf N. Nicotine and cigarette smoking: Effects on the ultrastructure of aortic endothelium. *Int J Exp Path.* 1990; 71; 573-586.
49. Pittilo RM, Mackie IJ, Rowles PM, Machin SJ, Woolf N. Effects of cigarette smoking on the ultrastructure of rat thoracic aorta and its ability to produce prostacyclin. *Thromb Haemostas.* 1982; 48(2): 173-176.
50. Pletscher A, Reply to Zatta and Prosdocimi: "Platelet aggregation in male and female smokers". *Thromb Haemostas.* 1989; 63(1): 141.
51. Rangemark C, Wennmalm A. Cigarette smoking and urinary excretion of markers for platelet/vascular wall interaction in healthy women. *Clinical Science* 1991; 81: 11-15.
52. Rao GHR. Physiology of blood platelet activation. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1993; 37(4): 263-275.
53. Rausch JL, Fefferman M, Ladisich-Rogers DG, Menard M. Effect of nicotine on human blood platelet serotonin uptake and efflux. *Prog Neuro-Psychopharmacol and Biol Psychiat.* 1989; 13: 907-916.
54. Renaud S. Cigarette smoking and platelet function: Relation to nicotine, carbon monoxide and saturated fat. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 161-171.

55. Reininger AJ, Reininger CB, Wurzinger LJ. The influence of fluid dynamics upon adhesion of ADP-stimulated human platelets to endothelial cells. *Thrombosis Research* 1993; 71: 245-249.
56. Salzman EW, Ware JA. Ionized calcium as an intracellular messenger in blood platelets. *Prog Hemost Thromb.* 1989; 9: 177-202.
57. Salvemini D, de Nucci G, Sneddon JM, Vane JR. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol.* 1989; 97: 1145-1150.
58. Schmidt KG, Rasmussen JW, Nielsen-Bonnevie V. Acute platelet activation induced by smoking cigarettes: in vivo and ex vivo studies in humans. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 199-209.
59. Sherratt AJ, Culpepper BT, Lubawy WC. Alterations in prostacyclin and thromboxane formation following chronic exposure to high and low nicotine cigarettes in rats.
60. Siekmeier R, Wülfroth P, Wieland H, Gross W, März W. Low-density lipoprotein susceptibility to in vitro oxidation in healthy smokers and nonsmokers. *Clinical Chemistry* 1996; 42(4): 524-530.
61. Sixma JJ, de Groot PG. Regulation of platelet adhesion to the vessel wall. *Annals New York Academy of Sciences* 1994; 190-199.
62. Sigal E, Laughton CW, Mulkins MA. Oxidation, lipoxygenase, and atherogenesis. *Annals New York Academy of Sciences* 1994; 211-225.
63. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews* 1989; 69(1): 58-178.
64. Siess W. Platelets in the pathogenesis of atherosclerosis. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 119-127.
65. Stein PD, Rival J, Riddle JM. Platelets in chronic "smokers" show a hyperactive response in vitro to a foreign surface. In: Diana JN, ed. *Tobacco Smoking and Atherosclerosis*. New York: Plenum Press, 1990: 181-187.

66. Steinberg D. Antioxidants and Atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84: 142-145.
67. Sturm MT, Strophair JM, Kendrew PJ, Vandogen R, Beilin LJ, Taylor RR. Whole blood aggregation and plasma lyso-paf related to smoking and atherosclerosis. *Clinical and Experimental Pharmacology* 1989; 16: 597-605.
68. Surya II, Akkerman JWN. The influence of lipoproteins on blood platelets. *American Heart Journal* 1993; 125(1): 272-275.
69. Swart SS, Pearson D, Wood JK, Barnett DB. Effects of adrenaline and alpha adrenergic antagonists on platelet aggregation in whole blood. *Thrombosis Research* 1984; 36: 411-418.
70. Sweeney JD, Hoernig LA, Michnik A, Fitzpatrick JE. Whole blood aggregometry. *Am J Clin Pathol.* 1989; 92: 676-679.
71. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: A clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry* 1996; 42(4): 498-506.
72. Takiguchi Y, Wada K, Nakashima M. Hemodynamic effects on thrombogenesis and platelet aggregation in spontaneously hypertensive rats. *Clin and Exper Hypertension* 1993; 15(1): 197-208.
73. Terres W, Becker BF, Schrödl W, Gerlach E. Inhibition of platelet aggregation following chronic in vivo treatment of rats with nicotine: Prevention by simultaneous application of propranolol. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1989; 13: 233-237.
74. Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn PF. Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* 191; 84: 613-617.
75. Thompson WD, Smith EB. Atherosclerosis and the coagulation system. *J Pathol.* 1989; 159: 97-106.
76. Van Jaarsveld H, Kuyl JM, Alberts DW. Exposure of rats to low concentration of cigarette smoke increases myocardial sensitivity to ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 1992; 87: 393-399.

77. Venner T. Smoking and coronary artery disease. *Chest* 1988; 94(3): 449-452.
78. Vickers JD, Kinlough-Rathbone RL, Packman MA, Mustard JF. Inositol phospholipid metabolism in human platelets stimulated by ADP. *Eur J Biochem.* 1990; 193: 521-528.
79. Yardımcı S. Damar sisteminin yaşlanması, aterosklerozun etyopatogenezi ve korunma önlemleri. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergisi* 1993; 6: 217-222.
80. Wennmalm A, Benthin G, Granström EF, Persson L, Petersson AS, Winell S. Relation between tobacco use and urinary excretion of thromboxane A₂ and prostacyclin metabolites in young men. *Circulation* 1991; 83: 1698-1704.
81. Zatta A, Prosdociami M. Platelet aggregation in male and female smokers. *Thromb Haemostas.* 1989; 63(1): 140.
82. Zimmerman M, McGeachie J. The effect of nicotine on aortic endothelium. *Atherosclerosis* 1987; 63: 33-41.
83. Zhu B, Sun Y, Sievers RE, Glantz SA, Parmley WW, Wolfe CL. Exposure to environmental tobacco smoke increases myocardial infarct size in rats. *Circulation* 1994; 89: 1282-1290.
84. Zhu B, Sun Y, Sievers RE, Shuman TL, Glantz SA, Chatterjee K, Parmley WW, Wolfe CL. L-arginine decreases infarct size in rats exposed to environmental tobacco smoke. *Am Heart J.* 1996; 132: 91-100.
85. Zucker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Atherosclerosis* 1985; 5: 2-18.