T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TAVŞAN KAROTİD ARTERLERİNDE YAPILAN ANASTOMOZLARDA TİKAGRELOR MADDESİNİN İNTİMAL HİPERPLAZİ VE ENDOTELYAL PROLİFERASYON ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. GÖKHAN KIZILTAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2014

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TAVŞAN KAROTİD ARTERLERİNDE YAPILAN ANASTOMOZLARDA TİKAGRELOR MADDESİNİN İNTİMAL HİPERPLAZİ VE ENDOTELYAL PROLİFERASYON ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. GÖKHAN KIZILTAN

DANIŞMAN ÖĞRETİM GÖREVLİSİ: PROF. DR. A. CENK ERDAL

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan hocalarım Sayın Prof. Dr. Öztekin Oto, Sayın Prof. Dr. Baran Uğurlu, Sayın Prof. Dr. O. Nejat Sarıosmanoğlu, Sayın Prof. Dr. Hüdai Çatalyürek, Sayın Prof. Dr.Erdem Silistreli, Sayın Prof. Dr. S. Kıvanç Metin ve ayrıca tezimi yöneten, tezimin gerçekleşmesinde büyük emeği olan Sayın hocam Prof. Dr. A. Cenk Erdal'a,

Tezimin gerçekleşmesinde büyük yardımlarını ve desteklerini gördüğüm fakültemiz Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Bekir Uğur Ergür'e,

Uzun, yorucu ve bir o kadar da zevkli geçen asistanlığım boyunca iyi ve kötü günlerimi paylaştığım asistan arkadaşlarıma, servis ve yoğun bakımımızın hemşire ve personellerine, ameliyathanemizin hemşire ve personellerine, poliklinik çalışanlarımıza;

Beni bugünüme getirene kadar her türlü zorluğa göğüs geren, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme;

Asistanlık hayatım boyunca ona ayırabildiğim kısıtlı zamana rağmen; sonsuz sevgi ve desteğini benden hiç esirgemeyen, hayatı paylaştığım biricik eşim Dilek'e;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR ……1
İÇİNDEKİLER ……2
TABLO VE ŞEKİL DİZİNİ ……3
RESİM VE GRAFİK DİZİNİ ……4
KISALTMALAR ……5
ÖZET ……7
İNGİLİZCE ÖZET ……9
1. GENEL BİLGİLER ……11
1.1. GİRİŞ VE AMAÇ ……11
1.2. ARTER TİPLERİ VE HİSTOLOJİSİ ……13
1.3. VASKÜLER ENDOTEL ……18
1.4. TİKAGRELOR ……34
2. MATERYAL VE METOD ……38
2.1. ÇALIŞMA PLANI ……38
2.2. DENEY PROTOKOLÜ ……39
2.3. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME ……42
2.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM ……43
3. BULGULAR ……43
3.1. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME ……44
4. SONUÇLAR ……47
4.1. LÜMEN ÇAPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ……47
4.2. LÜMEN ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ……49
4.3. İNTİMA KALINLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ……51
4.4. MEDİA KALINLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ……54
4.5. LÜMEN+MEDİA ALANLARI TOPLAMININ KARŞILAŞTIRILMASI ……55
4.6. MEDİA ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI……57
5. TARTIŞMA ……60
KAYNAKLAR ……68

TABLO VE ŞEKİL DİZİNİ

TABLO SAYFA

1.1. Endotel hücresinde sentezlenen ve salgılanan biyoaktif maddeler 21

4.1. Ortalama Lümen Çapı Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 48

4.2. Ortalama Lümen Alanı Kontrol Grupları ile Karşılaştırması 50

4.3. Ortalama İntimal Kalınlığın Kontrol Grupları ile Karşılaştırması 52

4.4. Ortalama Media Kalınlığının Kontrol Grupları ile Karşılaştırması 54

4.5. Ortalama Lümen+Media Alanları Toplamının Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 56

4.6. Ortalama Media Alanlarının Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 58

ŞEKİL

1.1. Damarın genel histolojik yapısı 17

1.2. Damar duvarının histolojik kesitinin mikroskobik görünümü 17

1.3. Damar endotelyum hücre iskeleti 20

1.4. Neointima hiperplaziyi önlemede farmakolojik yollar 33

1.5. Tikagrelorun kimyasal yapısı 35

RESİM VE GRAFİK DİZİNİ

RESİM SAYFA

2.1. Tavşan kulak arkası marginal veninden branül takılması 40

2.2. Tavşan sağ karotis arterinin eksplorasyonu 40

2.3. Karotis arterinin anastomoz öncesi buldog klemple oklüde edilmesi 41

2.4. Karotis arterinin transekte edilmiş görünümü 41

2.5. Karotis arterin anastomoz edilmesi 42

3.1. Lümen çapı ve lümen alanının ölçülmesi 44

3.2. Grup A,Grup B ve Grup BK ’ya ait histolojik kesitler

(H+E x 2x 4) 46

GRAFİK

4.1. Ortalama lümen çaplarının karşılaştırılması 49

4.2. Ortalama lümen alanlarının karşılaştırılması 51

4.3. Ortalama intima kalınlığının karşılaştırılması 53

4.4. Ortalama media kalınlığının karşılaştırılması 55

4.5. Ortalama lümen+media alanları toplamının karşılaştırılması 57

4.6. Ortalama media alanının karşılaştırılması 59

KISALTMALAR:

ADP : Adenozin di fosfat

ATP : Adenozin trifosfat

AMP : Adenozin monofosfat

c-AMP : siklik AMP

b-FGF : Temel fibroblast büyüme faktörü

PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

TGF-beta : Dönüştürücü büyüme faktör beta

EDRF : Endotel kaynaklı gevşetici faktör

PGI2 : Prostosiklin

PAI : Plazminojen aktivatör inhibitörü

TTPAI : Ekstrinsik sistem inhibitörü

t-PA : Doku plazminojen aktivatörü

H + E : Hemotoksilen Eozin

IL : İnterlökin

VSMC : Damar düz kas hücresi

NO : Nitrik oksit

NOS : Nitrik oksit sentetaz

MMP : Matriks metalloproteinaz

PTFE : Politetrafloretilen

PLA_2 : Fosfolipaz A_2

AA : Araşidonik asit

PG : Prostoglandin

TX : Tromboksan

PF_4 : Trombosit-factor-4

ROS : Reaktif oksijen ürünleri

$ONOO^-$: Peroksinitrit

ET-1 : Endotelin-1

cGMP : Siklik gunaozin monofosfat

RAS : Renin-Anjiotensin Sistemi

Tw : Shear stres

P_2Y_{12}: Trombosit ADP reseptörü

HO-1: Hem oksijenaz-1

PKA: Protein kinaz A

µm : Mikrometre

$µm^2$: Mikrometre kare

ÖZET:

Tavşan karotid arterinde yapılan anastomozlarda Tikagrelor maddesinin intimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyon üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması.

Gökhan Kızıltan, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir

Amaç: Vasküler girişimler sonrası gelişebilen restenoz üzerinde intima hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonun büyük etkisi vardır. Tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinde rekonstruksiyon oldukça sık kullanılan girişimlerden biridir. Günümüzde bu tarz girişimlerin başarısı spontan tromboz gelişimi veya stenoz oluşumu nedeni ile beklenenden daha azdır [1, 2]. Vasküler rekonstruktif girişimlerden sonra akut trombüs oluşumunun önemli bir rol oynadığı ani tıkanmanın tersine, geç dönemdeki daralma veya restenozda düz kas hücre migrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks birikimi sonucu oluşan neointima hiperplazi önemli rol oynamaktadır [1, 3, 5]. Hiperplazik intima kalınlaşma, arterlerin hemodinamik strese karşı normal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel injurilerin iyileşmesinin de karakteristik bir özelliğidir [3]. Bu yüzden biz de, tavşanlarda karotis arterinde yapılan anastomozda tikagrelorun intimal hiperplazi ve düz kas hücre (endotel) proliferasyonu üzerine etkisini araştırdık.

Materyal ve Metod: Çalışmamızda randomize olarak seçilen ortalama 2-3 kg ağırlığında 14 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar 2 gruba ayırıldı. Tüm gruplardaki tavşanlara uygun pozisyon verilerek, sağ vertikal boyun insizyonu yapıldı. Sağ karotis arterleri transekte edilerek 8/0 polipropilen sütür kullanılarak tek tek sütür tekniği ile anastomoz yapıldı. Grup A (7 adet) tavşanlara herhangi bir ilaç verilmedi. Grup B (7 adet) tavşanlara toplam 21 gün 60 mg/kg/gün dozunda günde 2 kez peroral olarak tikagrelor verildi. Tüm gruplardaki tavşanlar 21. günün sonunda anastomoz yapılan karotid arter segmenti ve sadece B grubundaki tavşanlarda

karşı taraf ve anostomoz yapılan karotid arter çıkartılarak incelenmek üzere histoloji laboratuarına gönderildi. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopisinde incelendi. Ayrıca elde edilen görüntüler digital görüntü analiz programı ile incelenerek lümen çapı, lümen alanı, intima kalınlığı, medial alan, media kalınlığı, lümen + media alan toplamları hesaplanarak sonuçlar değerlendirildi.

Bulgular: Yapılan seri kesitlerde lümen çapı açısından Grup B'in ortalama lümen çapı Grup A'ın ortalama lümen çapından daha büyük bulunmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır. (p = 0.086). Lümen alanı açısından değerlendirildiğinde Grup B'in ortalama lümen alanı Grup A'dan daha geniş bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır. (p= 0.475). Seri kesitler intima kalınlığı açısından değerlendirildiğinde Grup B'in ortalama intima kalınlığı Grup A'dan daha az bulunmuş olup bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yaratmamıştır (p =0.568). Media alanı açısından değerlendirildiğinde Grup B'in ortalama media alanı Grup A'dan daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel açıdan anlamlı fark yaratmamıştır (p = 0.153). Media kalınlığı açısından seriler değerlendirildiğinde Grup A'ın ortalama media kalınlığı Grup B'den daha küçük bulunmuş olup bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştur (p = 1.000). Lümen+Media alan toplamları açısından değerlendirildiğinde Grup B nin ortalama lümen+media alan toplamları Grup A dan daha geniş bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.199)

Sonuç: Çalışmamızdan çıkan sonuçlar doğrultusunda gerçek klinik izlemde çok daha uzun süre tikagrelor kullanımı gerektiğinden,zaman bir sınırlama oluşturmuş olabilir. Yapısal bir değişikliği oluşturacak kadar uzun sürede tikagrelor kullanımı sağlanarak hayvan deneylerinin tekrarlamasının doğru olacağı kanısındayız. Bunun yanısıra insanlardaki kullanımında ilacın alımının öncesi ve sonrasında noninvaziv olarak carotis intima kalınlıklarının ölçülmesinin de faydalı olabiliceği kanısındayız. Tikagrelor, vasküler girişimlerden sonra meydana gelen intimal hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesinde her ne kadar istatistiksel olarak

anlamlı bir fark yaratmasa da vasküler sistem üzerinde oluşturduğu olumlu etkiler (ortalama lümen çapında artma, ortalama lümen alanında artma, ortalama intima kalınlığında azalma vb.) düşünüldüğünde yararlı bir ajan olarak kullanılabileceğidir.

Anahtar Kelimeler: Tikagrelor, İntimal hiperplazi, Düz kas hücre proliferasyonu, Anastamoz, Tavşan.

SUMMARY:

The aim of this study is to assess inhibiting effect of ticagrelor on intima hyperplasia and smooth muscle cell (endothel) proliferation at the anastomosis site performed in rabbit carotid artery.

Gökhan Kızıltan, Department of Cardiovasculer Surgery, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

Objective: Intima hyperplasia and smooth muscle cell proliferation play an important role on the restenosis after the vascular interventions. Reconstruction is one of the most common intervention in the management of the obstructing artery diseases. Recently, the success of these kind of interventions are under expectations because of spontaneous thrombosis or restenosis. After vascular reconstructive interventions unlikely the acute obstruction in which acute thrombosis is important at the late stage intima hyperplasia caused by smooth muscle cell migration, proliferation and extracellular matrix deposition play an important role in narrowing or restenosis. Hyperplasic intima thickening is not only an adaptive progress against the hemodynamic stress but also a characteristic of arterial injury healing. We assess the effect of tikagrelor on intima hyperplasia and smooth muscle cell proliferation at anastomosis performed in rabbit carotid artery .

Materials and Method: In this study we planned to use 14 randomized New Zealand male rabbit weights 2 to 3 kilograms. Rabbits were seperated to 2 groups. A vertical neck insition was made in an appropriate position to all group rabbits and carotid artery was dissecated. The same artery transected and using 8/0 polypropylene an anastomosis was performed with by one by technique. Group A rabbits (7) assigned as control group. No medication was given to this group. Tikagrelor was administrated to group B(7) 60 mgr/kg/day twice a day peroral during 21 days. At the end of the day 21 the anostomosis performed carotid artery segments and the contralateral carotid artery of only Group B rabbits were sent to histology laboratory to analyze. The preperations were examined under light microscope. Images were analyzed via digital image analyze program and lumen diamater, lumen area, intimal and medial thickness, medial area and lumen+media total areas were estimated and results were evaluated.

Findings: In the serial sections the average lumen diamater of group B was found higher than the group A and this difference was statically insignificant between group B and group A. The lumen area of group B was found higher than the group A and this difference was insignificant between group B and group A. When the section series were evaluated for thickness of intima of group B was lesser than group A and the difference was statically insignificant between group B and group A. The evaluation of medial area of group B was higher than group A and the difference was statically insignificant between group B and group A. The evaluation of medial thickness showed that it was higher in group B compared with group A and the difference was insignificant. The evaluation of medial+lumen area of group B was higher than group A and the difference was statically insignificant between group B and group A.

Conclusion: In line with the results from our study in clinical follow the actual use of ticagrelor much longer than necessary, time limitations may have created. Long enough to create a structural change in the use of ticagrelor would be correct to conclude by providing repetition of animal experiments. Besides that in humans before and after intake of the drug and use noninvasive

measurement of carotid intima thickness may be useful . Ticagrelor, vascular intimal hyperplasia occurring after intervention and inhibition of smooth muscle cell proliferation, although the differences would not pose significant positive effects on induced vascular system(Lumen diameter, lumen area, intimal thickness, media thickness, the media area, the media + lumen thickness) may be used as an agent useful considering.

Key words: Tikagrelor, intima hyperplasia, smooth muscle cell proliferation, anastomosis, rabbit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. GİRİŞ ve AMAÇ

Restenoz oluşumunda intima hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonun büyük etkisi vardır. Bypass greftleme tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinde sık kullanılan girişimlerdendir. Bu tarz girişimlerin başarısı, spontan tromboz gelişimi veya stenoz oluşumu nedeni ile beklenenden daha azdır [1]. Damar yaralanması patolojik tamir ve remodelinge neden olur, bu da düz kas hücre migrasyonu ve proliferasyonu sonucu olarak neointima hiperplazi olarak sonuçlanır [2]. Yaralanan kan damarında patolojik tamirde endotel hücre kaybı majör katkısı olan faktördür [3]. Sonuç olarak neointima hiperplazi anjioplasti, stent ve bypass greftleme gibi revaskülarizasyon işlemleri sonrası restenozun patolojik temelidir [2, 3]. Hayvan ve insanlarda yapılan arteryel hasar modellerinde lümen daralmasının temel nedeninin intimadaki düz kas hücre proliferasyonu ve konnektif doku birikiminin olduğu gösterilmiştir [4]. Arteryel hasar oluştuktan sonra, bu bölge trombositlerle kaplanır. Adhezyon sonrası trombositler granüllerindeki vazoaktif ve trombotik faktörleri (Serotonin, ADP, Fibrinojen, von Willebrand Faktör) ve ayrıca büyüme faktörlerini (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, Dönüştürücü büyüme faktörü, Epidermal büyüme faktör)

salgılar [5]. Mitojenik özellikteki büyüme faktörleri düz kas hücre proliferasyonunu başlatırlar. Hasara cevap olarak media tabakasında çoğalmaya başlayan düz kas hücreleri, intimaya göç ederek intima hiperplaziye neden olurlar. Russel Ross tarafından öne sürülen ve halen yaygın kabul gören yaralanmaya cevap (response-to-injury) hipotezine göre de intima kalınlaşmayı başlatan mekanizma, hasar gören damar duvarına yapışan aktive trombositlerden ve endotel hücrelerinden salınan, düz kas hücreleri proliferasyonunu uyaran büyüme faktörleridir [5].

Tikagrelor, tineopiridin grubu (klopidogrel vb) antiplatelet ajanlara göre yeni bir kimyasal sınıf olan siklopentyl-triazolo-primidin grubunun ilk oral kullanımda olan ilacıdır. P2Y12 (ADP reseptörü) antagonistidir. Antiplatelet, vazodilatatör ve antitrombotik etkilidir. Adenozin difosfat (ADP); platelet aggregasyonunda önemli role sahip P2Y1 ve P2Y12 platelet hücre yüzey reseptörlerini aktive eder. Bu iki reseptörden herhangi birinin inhibisyonu etkili trombosit aktivasyon blokajı yapar. Tikagrelor; platelet hücre yüzeyinde ADP'den farklı bir alana tutunarak ADP aracılı trombosit aktivasyonunu non-competitif olarak inhibe eder. Sonuç olarak tikagrelor ortamdan ayrılana kadar reseptörü intact halde bırakır ve oluşturduğu etki reversible olup geri dönüşümü hızlıdır. P2Y12 aktivasyonu aracılı oluşan vazokonstriksiyonu engeller. Ayrıca P2Y12 reseptör aracılı inflamasyonu inhibe ederek restenozu önler. Tikagrelor ayrıca kırmızı kan, kas, endotel hücrelerinde ADENOZİN geri alımını inhibe ederek adenozin seviyesini arttırır ve sonuç olarak extracelluler ATP artışıyla vazodilatasyona sebep olur. Ayrıca artan adenozin ve ATP endotelden vazodilatatör maddelerin salınmasını da stimüle eder(NO, PGI2, endotelyal hiperpolarizing faktör). Tikagrelor platelet dışı vasküler düz kas hücrelerinde P2Y12 reseptörünü de inhibe ederek vazokontriksiyon inhibisyonuyla myokardiyal kan akımında artışa neden olur. Sonuç olarak periferik endotelyal disfonksiyonu düzeltip koroner micro dolaşımı önemli derecede artırır[31, 32]. Biz de tikagrelorun bu etkisinden yola çıkarak tavşan karotid arterinde yapılan anastamozlarda intima hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

1.2. ARTER TİPLERİ ve HİSTOLOJİSİ:

Vücudumuzun damar yapısını; arterler, arterioller, kapillerler ve venler olarak inceleyebiliriz. Arterler, organlarımızı kanlandıran yüksek basınçlı damarlardır. Arterioller, kapiller ağı direkt olarak besleyen ve kan akımının kontrolünü elinde tutan küçük çaplı damarlardır. Kapillerler, ince duvarlı damarlar olup; kan ve dokular arasındaki besin maddelerinin değişimi görevini üstlenirler.

a)Elastik (Büyük Boy-İletici) Arterler: Çapları en büyük olan bu arterlerde elastik doku çoğunlukta olup aorta, pulmoner arter gibi 7mm üzerinde olan arterleri ve büyük dallarını kapsar. Elastinden dolayı taze yapılarda sarı renkte izlenirler. Çaplarına göre duvarları incedir. Arterlerde en gelişmiş tabaka tunika mediadır. Kanın kalpten uzaklaştırılmasını ve kalp atımı sonucu basınç dalgalanmalarını yumuşatır. Sistolde elastik lamina gerilir ve basınç değişimini azaltır. Diyastolde, elastik sıkışma arteriyel basıncı düzenler. Kalpten uzaklaştıkça arter basıncı akım hızı, basınç değişkenlikleri azalır.

Tunika intima: Tek katlı yassı hücrelerden oluşan endothelium ile bunun altında açık renkli ince bir subendotelial tabakadan oluşmuştur. Söz konusu tabaka, longutidinal yönde ince elastik ağlardan zengindir. Bunların arasında az miktarda kollajen lifler, fibrositler ve düz kas hücreleri yer alırlar. Endotel hücreleri 10-15 m genişliğinde 25-50 m uzunluğundadır. Hücreler birbirlerine sıkı bağlantılarla ve gap-junctionlarla bağlanır ve bariyer oluşturur. Bol pinositotik veziküllleri vardır. Endotel hücrelerinde 0, 1 m çapında ve 3 m uzunluğunda Weibel-Palade Cisimcikleri (von Willebrand Faktörü) olarak bilinen membranla çevrili elektron-dens cisimcikler vardır. Bunlar çoğu endotel hücrelerince sentezlenirler ancak sadece arterlerde depolanırlar. Kana verilen faktör VIII içeren yapılardır. Subendotelyal tabaka kalındır. Ritmik kasılma ve gevşemelere yardımcı

olan lifler uzunlamasına dizilirler. Düz kas hücreleri de bu tabakada yer alır. Hem kasılır hem de ekstraselüler ara madde ve fibrilleri sentezler. T.Media'ya yaklaştıkça elastik lif miktarı artar. Media sınırında yoğunlaşan elastik lifler membrana elastica interna'yı oluşturur. Ancak mediaya benzediğinden ayırt etmek zordur.

Tunika media: Yaşla birlikte sayısı artan konsantrik yerleşimli 40-70 elastik lamina bulunur. Laminalar arasında pencere adı verilen açıklıklar bulunur. Elastik membranlar arasında düz kas, retiküler lifler, vaso vasorumlar ve kondroitin sülfat (metakromazi +) bulunur. Belirgin bir membrana elastica eksterna yoktur.

Tunika adventisya: Oldukça incedir ve media kalınlığının yaklaşık yarısı kadardır. Kesin bir sınır yapmaksızın çevre bağ dokusu ile karışır. Elastik, kollajen lifler, vaso vasorumlar ve sinirleri içeren fibroelastik bağ dokusudur.

b)Muskuler (Orta Boy-Dağıtıcı) Tip Arterler: Çapları 2, 5-7mm arasında olan, kanı organlara dağıtan ve en çok görülen arter tipidir. Tunika mediadaki düz kaslara bağlı olarak kan akışı lokal hormon ve nörojenik uyarılarla ayarlanabilir. Elastik arterlerden muskuler arterlere geçerken, elastik materyel azalır, düz kas artar. Çok belirgin membrana elastica interna ve eksternaları vardır.

Damarların genel histolojik yapısına uygun olarak, duvarları 3 tabakadan yapılmıştır. Lümenden dışa doğru tabakalar aşağıdaki tarzda sıralanır (Şekil 1.1, 1.2):

Tunika intima: Elastik arterlere göre daha incedir fakat subendotelyal tabaka az sayıda düz kas hücresi bulunurken membrana elastica interna çok belirgindir. Pencereli elastik membran özelliğindedir. Bu ve mediadaki düz kasların ölüm sonrası kasılması nedeni ile endotel yüzeyi kıvrımlı izlenir. Nadiren 2 membrana elastica interna bulunur (bifid internal elastik lamina). Elastik arterlerde olduğu gibi endotel, internal elastik membranları geçen uzantılara sahiptir. Bu

uzantılar intimaya yakın yerleşik mediadaki düz kaslarla gap-junctionlarla bağlanır. Bu gap-junctionların endotel ve düz kas hücreleri ile metabolik olarak çift olduklarına inanılır [7].

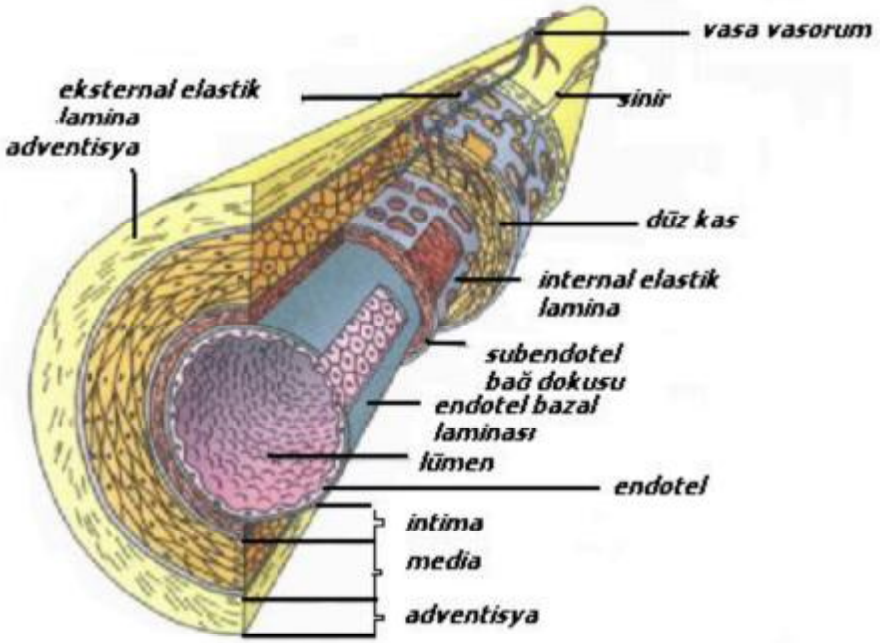
Tunika media: Başlıca düz kas hücrelerinden oluşur. Düz kas hücreleri iç organ duvarındaki düz kaslardan daha küçüktür. İntimaya bakan yüzdeki birkaç düz kas bantı longitidünal seyirlidir. Küçük muskuler arterlerde 3-4 tabaka düz kas varken büyük muskuler arterlerde 40 tabaka konsantrik yerleşimli düz kas tabakası bulunur. Damar dallandıkça tabaka sayısı azalır. Her düz kas hücresi bazal laminaya benzer bir eksternal lamina ile çevrilidir. Matriks, PAS+ reaksiyon gösterir. Proteoglikan tabiatındaki matrikste düz kaslar arasında elastik, retiküler lifler ve az miktarda kollajen, fibriller ve kondroitin sülfat yer alır. Düz kaslar, matriks ve liflerin üretilmesinde de fonksiyon görürler. Kas hücreleri arasında vaso vasorumlar yer alır. Birkaç ince elastik tabakadan oluşan belirgin bir membrana elastica internaları vardır ancak iç elastik membrandan daha incedir. Tabakalar arasında pencereler de yer alır [8].

Tunika adventisya: Bağ dokusu fibrilleri, fibroblastlar, yağ hücreleri, vaso vasorumlar, lenfatik damarlar, miyelinsiz sinir sonlanmaları yer alır. Sinir sonlanmalarından salınan nörotransmiterler dış elastik membranın pencerelerinden geçerek mediaya gelerek üstteki bazı düz kas hücrelerini depolarize ederler. Uyarı diğer düz kas hücrelerine gap-junctionlarla aktarılır. Vasomotor sinirler yer alır. Ara madde çoğunlukla dermatan sülfat ve heparan sülfattan oluşur. Kollajen ve elastik lifler, kesilen arterin büzülmesini kolaylaştıracak şekilde longitidünal seyirlidir [8].

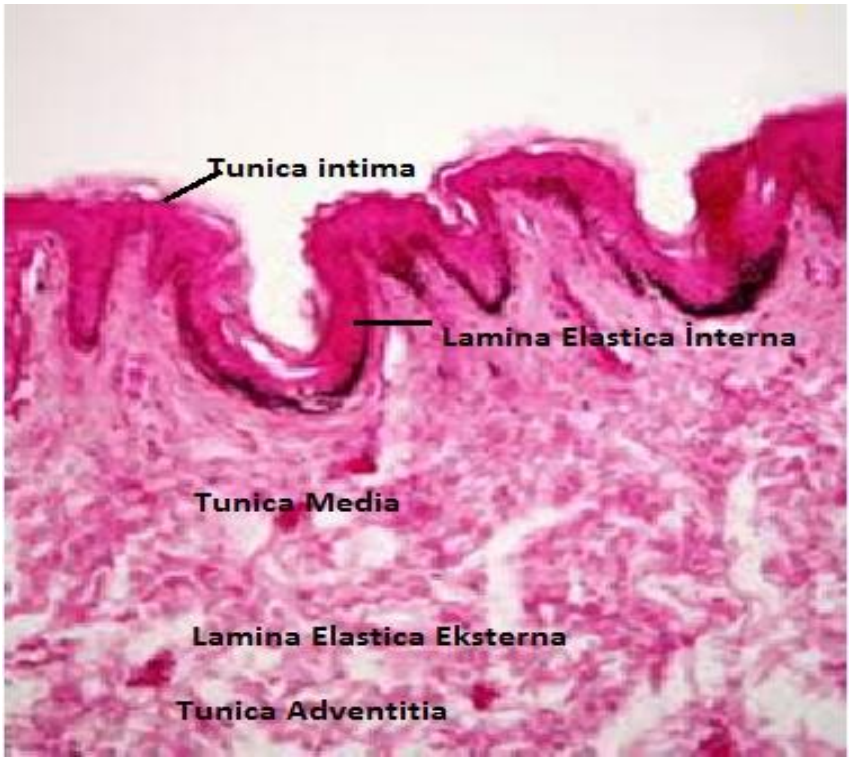
c)Küçük Çaplı Arterler ve Arterioller: Çapları 100 mikrometreden az olan arterlerin tunika intiması endotel ve membrana elastika internadan oluşur. Bu membran endotel altında ince parlak bir çizgi olarak gözlenir. Tunika media küçük çaplı arterlerde en çok sekiz sıralı, arteriyollerde ise bir-iki sıralı düz kas tabakasıdır. Membrana elastika interna görülmeyebilir. Tunika adventisya

longitudinal seyirli kollojen ve elastik lifler içeren gevşek bir bağ dokusu tabakasıdır. Membrana elastika eksterna bulunmaz. Çapı genellikle 0, 5mm'den dar, lümenlerinin çapı kadar duvar genişliği olan arteriyoller, kapiller ağdaki kan akımını kontrol eden önemli damarlardır. Düz kasları kesintilidir. Arteriyolden kapillerin ayrıldığı yerde arteriyol duvarındaki düz kaslarda hafif bir kalınlaşma, prekapiller sfinkteri oluşturur. Bu sfinkterin kasılması kapillere kan geçişini engeller.

Arterioller kapillerlere kan akışını düzenleyen terminal arteriyal damarlardır. Endotel, tip III kollajen ve birkaç elastik lif içeren subendotelyal bağ dokusu ile desteklenir. Büyük arteriyollerde ince ve pencereli internal elastik membran yer alırken daha küçük ve terminal arteriyollerde bulunmaz. Küçük arteriyollerde tek düz kas tabakası varken büyük arteriyollerde 2-3 kat düz kas tabakası bulunur. Adventisya tabakası az sayıda fibroblast içeren ince fibroelastik bağ dokusudur [8, 9].



Şekil 1.1. Damarın genel histolojik yapısı



Şekil 1.2. Damar duvarının histolojik kesitinin mikroskobik görünümü **(H+E x 20).**

1.3. VASKÜLER ENDOTEL:

Normal endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir skuamoz epitel tabakasıdır. Kan ve interstisyel dokular arasındaki stratejik yerleşiminden dolayı endotelin, intravasküler ve ekstravasküler olayları düzenleyici bir rolü vardır. Normal endotel kan akımına karşı hem tromborezistan bir yüzey görevi görürken hem de kan ve damar duvarı arasında makromoleküler bir bariyer görevi görür. Vasküler endotel sanıldığı gibi dokularla kan arasında basit bir engel değil; tam tersine salgıladığı mediatörlerle vasküler tonusu, kan pıhtılaşmasını, hücre proliferasyonunu, inflamasyonu, damar geçirgenliğini düzenleyen ve vücudun her tarafına yayılmış bir organ olarak kabul edilir.

Endotel hücreleri 10-15 μm² genişliğinde, 20-25 μm uzunluğunda olup, uzamış nükleuslara sahip hücrelerdir. Endotel, damar uzun ekseni boyunca bir bazal lamina üzerinde yan yana dizilerek tekli bir tabaka oluşturan, poligonal hücrelerden oluşmuştur. Endotel hücrelerinin yüzeylerinde bazen mikrovilllus, bazen de kıvrımlar şeklinde uzantıların bulunması işlevsel yüzey alanını artırmaktadır. Yetişkin bir insanda endotelin kapladığı ortalama alan 6000 m² ve ağırlığı 2, 5 kg civarındadır. Endotel hücreleri birbirlerine iki tipte bağlantı yaparlar [10, 11]:

1. Sıkı bağlantı birimleri (Tight Junction)
2. Aralıklı bağlantı birimleri (Gap Junction)

Sıkı bağlantı birimleri intrasellüler aralık boyunca permabilite kontrolünü sağlarken, aralıklı bağlantı birimleri ise hücreler arası etkileşmeyi gerçekleştirir. Bu bağlantılar her damarın işlevine göre farklı oranda bulunurlar. Örneğin; arteriollerde kuvvetli bağlantılar, venüllerde ise daha gevşek bağlantılar bulunmaktadır. Endotel hücrelerlerinin birbirine aralıklı bağlantı birimleri ile bağlandığı yerlerde subendotele geçirgenlik fazladır. Sıkı bağlantı birimleri ile bağlandığı yerlerde ise, geçirgenlik endotel hücre membranı tarafından kontrol edilmektedir. Endotel hücrelerinin

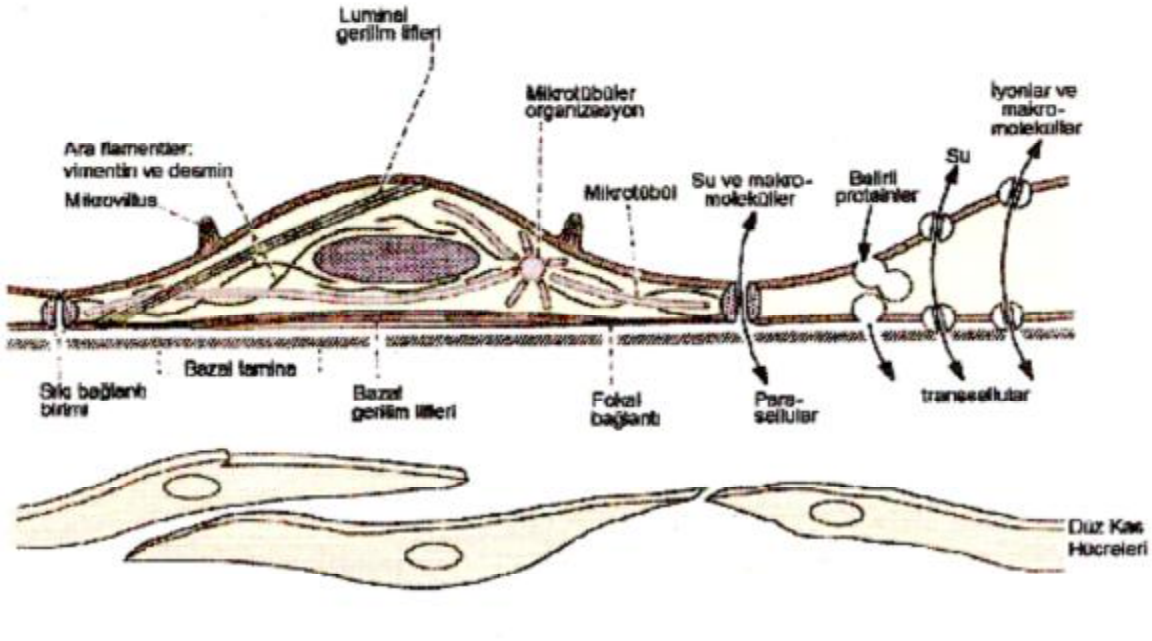
farklı vasküler yataklarda farklı karakteristikler göstermesi, bazı işlevsel birimlerin oluşmasına neden olmaktadır. Örneğin; serebral damarlarda sıkı bağlantı birimleri kan beyin bariyerini oluşturmaktadır. Endotel hücre katmanı, kan ile dokular arasında selektif bir bariyer oluşturmaktadır [10, 12]. Büyük arterleri, venleri, kapilleri ve lenf yüzeyini döşeyen endotel hücrelerinde önemli yapısal ve işlevsel farklılıklar olmasına karşın temel fonksiyonları benzerlik göstermektedir. Bu hücrelerin vasküler lümene ve düz kas dokusuna bakan yüzeyleri de birbirinden farklıdır. Lümene bakan yüzeyleri, ince bir proteoglikan proteoglikan (Dermatansülfat, Heparansülfat, Heparin) tabaka oluşturur. Endotel hücreleri tarafından sentez edilen bu proteoglikanlar antitrombotik yüzeyi oluşturmaktadır [10].

Endotelyumun altında iyi gelişmiş endoplazmik retikuluma sahip düz kas hücrelerinden oluşan bir neointimanın varlığı saptanmıştır. Neointimanın hücreler arası boşluklarının proteoglikan ve bazal lamina benzeri maddeler içerdiği gözlemlenmiştir. F-aktin için yapılan boyama intima düz kas hücrelerinin, mediadaki sirküler düz kas hücrelerine dik ve endotel hücreleri ile aynı yönde uzandığını ortaya koymuştur [11, 13]. Hücresel iskelet endotel hücrelerinin biçimlerini korumada önemli rol oynar (Şekil 1.3). Ultrastrüktürel incelemeler endotel hücre iskeletinin üç farklı tipte sitoplazmik liflerden oluştuğunu göstermiştir.

Bunlar:

- Gerilim Lifleri (Stres Fibre)
- Mikroborucuklar (Microtubules)
- Ara Filamentler (İntermediate Filamentler) dir.

Bütün bu lifler hücreye biçim veren dinamik bir çatıyı oluşturmakla beraber hücrenin üç boyutlu yapısında hızlı değişmelere de olanak vermektedir. Endotelyumu oluşturan hücrelerin yapısı ve dış etkilere karşı reorganize olma yeteneği, onun endotel bütünlüğünün devam ettrilmesinde kritik ve önemli görevlere sahip olduğunu göstermektedir [14, 15].



Şekil 1.3. Damar endotelyum hücre iskeleti.

1.3.1. Endotelyum hücre fonksiyonları:

Endotel hücreleri, salgıladıkları medyatörler ile koagülasyonu, fibrinolizisi, damar tonusunu, dolayısıyla kan akışı ve kan basıncını etkileyip çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynayan aktif hücrelerdir [16].

Endotelyum hücre fonksyonlarını beş bölüm altında özetleyebiliriz [13];

1. Kontrol edilemeyen makromoleküllü protein ve lipoproteinlerin çevre dokuya infiltrasyonuna karşı seçici bariyer görevi görmesi.

2. Dolaşımda bulunan lipoproteinlerin metabolizmasına katılıp, subendotelyal bölgeye geçecek lipoproteinlerin tipine karar vermesi.

3. Trombosit agregasyonu ve trombolizi önlemek

4. Gevşetici ve kastırıcı maddeler salarak vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunmak.

5. İmmünkompetan hücrelerle birlikte savunma mekanizmalarına katılma görevi.

Eskiden sanıldığı gibi endotelyum, dokularla kan arasında bulunan basit bir bariyer değil, tam aksine sentezlediği ve salgıladığı mediyatörlerle vasküler hemostasizte çok önemli rol oynayan ve vücudun her tarafına yayılmış bir organ niteliğinde olduğu artık bilinmektedir.

Gaz geçirgenliği oldukça fazla olan endotel katmanının sıvı geçirgenliği ise oldukça azdır. Fizyolojik koşullarda solunum gazları, su, glikoz, yağ asitleri, aminoasitler ve aterojenik olmayan küçük lipoprotein molekülleri arter endotelinden geçerler. Makromoleküller, intrasellüler taşıyıcı vezikülleri ile geçer. Bunun için endotel membranında transendotelyal kanallar mevcuttur.

Endotel hücresi bulunduğu yere göre değişik yapı ve etkide hemostaz vazoaktivite immun reaksiyon ve iltihabi olaylarda görev alır. Bu görevleri ile ilgili çok sayıda medyatör salgılayıp sentezlemektedir. Adeta çok fonksiyonlu bir salgı hücresi olarak iş yapmaktadır. Endotel hücresi, salgıladığını bildiğimiz birçok biyoaktif madde ile vasküler tonus, hücre proliferasyonu, kan pıhtılaşması, inflamasyon ve damar geçirgenliğini düzenlenmektedir (Tablo 1.1.) [17, 18].

Tablo 1.1. Endotel hücresinde sentezlenen ve salgılanan biyoaktif maddeler.

VAZOAKTİF PROTEİNLER	BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE SİTOKİNLER
• Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör[EDRF(NO)] • Endotelin • Progtasiklin(PGI_2)	• Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü(PDGF) • Gronülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör • Platelet Aktive Edici Faktör • İnterlökin 1, 6, 8 • Trombosit Büyüme Faktörü(TGF)
PROKOAGÜLANLAR • Plazminojen Aktivatör İnhibitörü(PAI) (PAI_1, PAI_2, PAI_3 ve Proteaz Neksin) • Fibronektin • F IX Bağlayıcı Protein • F V ve F XII Aktivatörü	**ANTİTROMBOTİK VE ANTİKOAGÜLAN FAKTÖRLER** • Doku Plazminojen Aktivatörü(t-PA) • Trombomodulin • Protein – S • EDRF(NO) • Ekstrinsik Sistem İnhibitörü(TTPAI) • Antitrombin III • PGI-2

1.3.2. Endotel hücre hasarına damarın yanıtı:

Endotel hücreleri vasküler tonusu kontrol eden pek çok vazoaktif maddeler salgılamaktadır. Bu hücreler, gerek lümen içi basınç ve sürtünmedeki değişikliklerden, gerekse kanın şekilli elemanlarından kaynaklanan uyarılar ile vazokonstriktör veya vasodilatasyon şeklinde dengeli bir cevabı intakt endotelde oluştururlarken, aterosklerotik bir damarda bir dizi fizyopatalojik olayın gelişmesine yol açarlar. Arter duvarında iki tip hasar meydana gelir. Birincisi mekanik hasardır. Arterin diseksiyonu, sütürasyonu, endarterektomisi, trombektomisi ve luminal anjioplastisi sonrası meydana gelir. İkicisi ise arteriel olmayan yapıların implantasyonu sonrası görülür (Sentetik greftler, stentler, otolog ven greftleri) [19].

Her arteriyel rekonstrüksiyon işlemi bir miktar endotel hasarına neden olmaktadır. Bu hasarın en yaygın nedeni greftin çıkarılma işlemi ve anastomoz sırasında çeşitli derecede travmatize olmasıdır. Endotel hasarına intimanın yanıtı subendotelyal fibroproliferasyon ve neointima oluşması şeklindedir. Bu intima neoplastik yanıt; travma sonrası damar onarımının bir parçası olmakla beraber, bazı durumlarda gereğinden şiddetli olabilmektedir. Aşırı neointima proliferasyonu, endotelin antikoagülan özelliğinde bozulma, lümende daralma sonucu, kan akımı azalmakta ve bazı vakalarda trombozis oluşabilmektedir [20].

Arteriyel hasara intima yanıt üç aşamada oluşur. İlk 24 saat içindeki reaksiyon mediada düz kas hücre proliferasyonudur. Endotel hasarı ile birlikte trombositler damar duvarına yapışmakta ve giderek çoğalmaktadır. Damar duvarına yapışan aktive olmuş trombositlerden büyüme faktörleri gibi mitogenler salgılanmakta bu da düz kas hücrelerinin intimaya migrasyonuna neden olmaktadır. İkinci aşama 3-14 gün sonra başlar ve böylece neointima şekillenir. Neointima bir kez oluşunca düz kas hücreleri ile hızla ve lümeni daraltacak bir tabaka oluşması ise 3. aşamada olur [21, 22].

Media tabakasında düz kas hücre proliferasyonu ve intimaya migrasyonunun iki farklı büyüme faktörü tarafından tetiklendiği gösterilmiştir. Bunlar temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor; bFGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet derivated growth factor; PDGF)'dür. bFGF hasarlanmış düz kas hücrelerinden ve endotel hücrelerinden salgılanır, düz kas hücre proliferasyonunu regüle eder. PDGF ise trombosit ve vasküler hücrelerden salgılanır, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunu sağlar [21].

Düz kas hücresinin büyümesini damar duvarında ya da dolaşımda bulunan bir grup otokrin ve parakrin faktörler ve basınç gibi fiziksel kuvvetler stimule eder. Normal damarda NO, Adenozin,

gibi büyüme inhibitörleri; PDGF, FGF, insülin benzeri büyüme faktörü, TGF-beta, anjiotensin 2 ve endotelin gibi büyüme faktörleri bir denge halindedir. Bu dengenin bozulması düz kas hücre proliferasyonuna neden olur. Düz kas hücrelerinin anormal büyümesinin, büyüme faktörleri üretiminde artma veya inhibitörlerin azalması sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir [23].

İntimaya ulaşabilen hücrelerin sayısı hasar sonrası mediada sağ kalabilen hücre sayısı ile ilişkilidir. Normalde hücreler, arteriel ekstraselüler matriks ile sıkı ilişki halindedirler. Bu sıkı ilişki integrinler gibi sellüler membran reseptörleri ile sağlanır. Bu temas hücre reseptörlerinden nukleusa sinyali iletir ve hücre sağkalımını sağlar. Hücre kaybı sonucu kontakt durunca sinyal durur ve hücre ölümü olur. Bu olay sonunda büyüme faktörleri intima kalınlaşmasını uyarır. Endotelde oluşan hasar bölgesi 3 cm'den büyük ise kenarlardan başlayan endotel repopulasyonu hiçbir zaman hasarlı arteriel segmentin orta bölgesine ulaşamamaktadır. Bu alanda düz kas hücre proliferasyonu devam etmektedir. Bu sonuçlar; endotelin tekrar sağlanması ve korunmasının intima hiperplazi kontrolünde önemli olduğunu göstermektedir [19].

Kronik endotel travmalarında endotel hasarı özellikle damarların bifurkasyon ve dallanma bölgelerinde olmaktadır. Dallanma yerlerinde ya da hemen ötesinde oluşan mekanik stresler endotel ve damar düz kas davranışlarını belirleyen en önemli stimuluslardır. Kanın damar duvarına uyguladığı basınç ve shear stres tetikleyici karakter taşımaktadır. Shear stres ateroskleroz oluşumuna yol açması yanında endotelden prostosiklin ve NO (Nitrik Oksit) tüketimini de azaltmaktadır.

1.3.3. Balon hasarına arteriyel cevap:

İnsanlarda balon hasarı sonrası endotel ile ilişkili patofizyolojik cevaplar otopsi uygulamaları dışında mümkün olmadığından in vivo araştırmaların hepsi hayvan modellerinde araştırılmıştır. Vasküler duvarın yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin sürdürülmesinde düz kas hücreleri ve endotelyal hücrelerin bütünlüğü kritik rol oynamaktadır. Hasar sonrası gelişen histopatalojik

olaylar incelendiğinde 3 evre görülür: inisial (hasar-24saat), migratuar (3-7gün) ve proliferatif (7gün-3, 4hafta). Balon kateterizasyonu ile oluşturulan arteriyel hasarlanma, müsküler arterlerin intimasında trombosit adezyonunu ve progresif düz kas hücre proliferasyonunu uyarmaktadır [24]. Vasküler yüzey deendotelize edildiğinde bir dizi olay birbirini takip eder. Deendotelize edilmiş bölgeler derhal trombosit kümesi ile kaplanır. Bu trombüsler rezorbe olur ve inflamatuar hücreler erkenden infiltre olurlar. Trombositler, daha sonraki günler içinde damar lümenine doğru ilerleyen rejenere endotelyum ile yer değiştirir. Aynı zamanda media içinde yer alan düz kas hücreleri prolifere olmaya başlar. Bu olaylar trombosit kaynaklı faktörlere değil, direkt olarak endotelin deendotelizasyonuna bağlıdır. Bu hücreler intimaya doğru göç eder ve bir yandan proliferasyona devam ederken, aynı zamanda büyük miktarlarda da ekstrasellüler matriks sentezleyip sekrete ederler [1, 24]. Bu süreçte endotelyal tekrar büyüme tamamlanır ve düz neointima 2-3 hafta içinde hasarlı bölgeyi kaplar. More ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, tavşanlarda balon ile oluşan hasardan 3 gün sonra reendotelizasyonun başladığını ve 14. günde bu sürecin tamamlanarak eksantrik intima kalınlaşma oluştuğunu rapor etmişlerdir. Ekstrasellüler matriks birikimine bağlı olarak 1. ayda intima kalınlaşmanın maksimum seviyeye ulaştığı ve 3 ay içinde azalma olduğu tespit edilmiştir [25]. Hasara cevapta endotel iki önemli noktada hayati rol oynar: Birincisi endotelin ortadan kalkması; mitojenik cevabın oluşmasına izin verir, ikincisi normal endotelin tekrar oluşması; daha ileri proliferasyonu inhibe eder.

1.3.4. Arteriyel akıma ven duvarı adaptasyonu:

Arteriel sisteme implante edilen tüm venler implantasyon sonrası dört–altı hafta içinde intima kalınlaşma göstererek lümeni yaklaşık %25 daraltırlar. Bu nadiren belirgin stenoza neden olur. Fakat intima hiperplazi ileride greftte ateroma oluşmasına neden olur. Venöz bypasslarda intima hiperplazinin esas nedeni hemodinamik stresdir. Greftin venöz yoldan arteryel yola geçisinde (arteryalizasyonda) adaptasyon mekanizması ile intima kalınlaşma oluşur. Ven greftleri yeniden venöz yola dönerse oluşan değişikliklerde gerilme meydana gelir. Bu remodilig sırasında TGF-alfa salınımı artmaktadır [20].

Venöz bypasslardan hemen sonra endotele (çoğunlukla anastomoz hattında ve ven endotelinin mekanik hasara uğradığı bölgelerde) trombosit, lökosit yapışır ve mikrotrombüsler oluşur. İki hafta içinde ven greftlerindeki ve anastomozdaki endotelin döküldüğü yerler tamamen reendotelizasyonla yenilenir. Bu dönemde düz kas hücrelerinin uyarılması ile intima kalınlaşması başlar ve 4 haftada maksimal düzeye ulaşır. İlk 4 haftadan sonra düz kas hücre proliferasyonu durur ve ekstrasellüler matriks artmaya başlar. Onikinci haftada duvar kalınlığı maksimal olur. İntimal hücrelerinin proliferasyonu ven lümeninin arter lümenine uygun hale geldiği dönemde durur [26].

1.3.5. Sentetik greftlerde intima kalınlaşma:

60 mm porları olan poröz sentetik protezlerin (PTFE v.b) luminal yüzlerinde intimal kalınlaşma gözlenmektedir. Damar duvarına transvers olarak uygulanan shear stresler; arteriel akıma poröz protezlerin adaptasyonunda belirleyicidirler. İntimal hiperplazi geliştiği zaman grefte uygulanan shear stres arttırılırsa intima hiperplazi kalınlığı azalır [27]. Artmış shear strese yanıt olarak endotel hücreleri artmış düzeyde NO sentez ederler. NO akut damar dilatasyonundan sorumludur. Düz kas hücresi ölümünü indükler ve MMP (Matriksmetalloproteinaz) gibi proteolitik enzimleri aktive eder. Sonuç olarak intima kitle; düz kas hücreleri ortadan kalkması ve ekstrasellüler matriksin lizise uğraması nedeniyle azalır.

Yapılan çalışmalarda prostetik greft kullanılan olgularda otolog ven kullanılanlara göre intima hiperplazi gelişme oranı daha yüksek bulunmuştur. Arter duvarı ve greftin mekaniksel özellikleri arasındaki farkların anastomozdaki intima hiperplaziyi artırdığı düşünülmektedir. İntimal kalınlaşma en sık olarak sütür hattında ve ayrılma yüzeyinde meydana gelmektedir. Nedeni bu bölgedeki laminar akım durağan bölge ve hiperkompliyans alanları olarak gösterilmiştir. Anastomoz modellerinde egzersizi stimüle etmek için akım oranları ve pulsatil

frekansları artırılmıştır. Bu sayede intima hiperplazi oluşum oranının azaldığı gösterilmiştir [28, 29].

1.3.6. İntimal hiperplazi etiyolojisi:

İki teori vardır.

♦ *İnjuriye cevap teorisi*

♦ *Reaktif-adaptif remodeling teorisidir.*

Kan akımında veya kan basıncındaki değişikliklere arterlerin adaptif cevapları; genişleme, arter duvarının yapısal ve kompozisyon değişiklikleri şeklinde olur.

Duvar shear stress: Endotelyal yüzeye shear stress kan akımı ile direkt, lümen çapının üçüncü kuvveti ile ters orantılıdır. Shear stress (Tw) = viskozite x akım / çap3 tır. Böylece çaptaki küçük azalmalar bile duvar shear stresinde büyük artışlara neden olabilir. Shear stresdeki artış nedeniyle endotelden akut cevap olarak nitrik oksit (NO) salgılanır. Shear stresin normal değeri 15 dyne/cm2 dir. Kan akımındaki artışın neden olduğu Tw artışına engel olmak için damar çapı artar. Deneysel AV fistüllerde; kan akımı 10 kat artarken, shear stres 3 kat artar ve adaptif cevap olarak 24 saat içerisinde damar çapı genişler. Dördüncü haftanın sonunda damar genişlemesi iki kata ulaşır ve böylece shear stres normale döner. Buna karşılık; kan akımı ve shear streste kronik azalmaya cevap olarakta lümen çapı azalır ve Tw normale döner. Damar çapındaki bu azalma intima hiperplazi ile olmaktadır. İntimal hiperplaziyi aktive eden faktörler ise:

♦ *Tw azalması*

♦ *Akım dallanması*

♦ *Ossilasyon (kardiak dp/dt, nabız basıncı) dur.*

Duvar tensile stress: Damar duvar kalınlaşması duvar tensile stres ile ters orantılıdır. Duvar tensile stres kan basıncı ve çap ile direkt orantılıdır. Ts= P x r / d (duvar kalınlığı) dir. Arter kan basıncındaki artış Ts'yi artırır. Adaptif cevap olarak (Ts'nin artması sonucu) duvar kalınlığında artış ortaya çıkar ve damar duvarının yapı ve kompozisyonunda değişiklikler gözlenir. Damar içindeki basıncın değişmesi sonucu Ts'de oluşacak değişikliklerin adaptasyon olarak oluşan duvar kalınlaşmasındaki değişikliğe en iyi örnek postpartum pulmoner ve aort değişiklikleridir. Doğumdan sonra aort basıncı yükselir ve aort duvarı kalınlaşır. Pulmoner basınç düşer ve pulmoner duvar çapı değişmeden ince kalır. Arteriyel yatağa konan ven greftlerdede; hem basınç artışına cevap olarak tensile stress arttığından duvar kalınlığı artacaktır, hem de shear stresin düşmesine (çünkü safen çapı artere göre büyüktür) sekonder olarak çap azalacaktır. Bu iki mekanizmada intima hiperplaziyi başlatacaktır. Sonuç olarak; arterlerin adaptif cevapları:

♦ Lümen çapının shear stres regülasyonu.

*Shear stres azalmış ise intima hiperplazi olur

*Shear stres artmış ise dilatasyon olur

♦ Tensile stres regülasyonu ile dir.

Basınç artması (ven greftin arteriyel yatağa konması) ve lümen çapı artması (küçük artere büyük ven) durumlarında intima hiperplazi olur. [27, 29].

İntimal hiperplazinin gelişmesindeki adaptif mekanizmanın amaçları;

1. Shear stresi artırmak (Tw = akım / wt, akımı arttırmalı)

2. Duvar tensile stresi azaltmak (Ts = P x r / WT, basıncı ve greft çapını azaltmalı).

Yani; arter yatağa konan ven greftlerde akım iyi, çap arter çapına yakın olmalıdır.

İntimal hiperplastik cevap: Kan ve damar duvarının etkileşiminde endotel arter duvarı homeostazda potansiyel düzenleyici olarak görev yapar. Endotelden; vasküler tonusu, antikoagülasyonu ve inflamatuar cevabı düzenleyen faktörler salgılanır. Endotelyal hücreler; düz kas hücrelerinin proliferasyonu, büyümesi, migrasyonu ve ölümünü kontrol eden faktörler salgılar. Aynı zamanda intima ve ekstrasellüler matriksin kontrolünü de yapar. İntimal kalınlaşmayı oluşturan komponentler; düz kas hücreleri ve ekstrasellüler matriks (kollajen, elastin, proteoglikan) tir. İntrauterin kan damarlarının oluşumunda düz kas hücrelerinin oluşumu ve organizasyonunu endotelin oluşması takip eder. Eğer endotel oluşması engellenirse damar gelişmesi olmaz.

Endotel hücrelerinin yokluğunda damar duvarı adaptasyonu: İnjüriden sonra trombositler adhere ve degranüle olurlar. 24 saat sonra mediada düz kas hücresi proliferasyonu başlar. Düz kas hücre sayısındaki artış günde normaldeki %0.06 dan %10-30'a çıkar. Dört gün sonra mediadan intimaya göç başlar. Bazı hücreler intimaya geldikten sonrada proliferasyon devam eder. Ekstrasellüler matriksde (kollajen, elastin, proteoglikan) artış başlar ve 3 ay sonra intimanın %20'si hücreden, %80'i ekstrasellüler matriksten oluşur. İntimal hiperplazinin endotelle örtülmesi düz kas hücrelerindeki proliferasyonu inhibe eder. Eğer hasarlı bölge 3 cm.den fazla ise; tümüyle neointima gelişemeyeceği için hasarın santral bölgelerinde düz kas hücreleri kanla direkt temas eder ve proliferasyon uyarılır. İntimal hiperplazinin ilk basamağı düz kas hücresi proliferasyonu, ikinci basamağı migrasyondur. Bu basamakları uyaran faktörler; fibroblast büyüme faktörü (FGF) (hasarlı endotelden ve düz kas hücrelerinden salgılanır ve esas olarak düz kas hücrelerinin proliferasyonunu yapar), platelet kaynaklı büyüme faktör (PDGF) (trombosit α granüllerinden ve endotelden salgılanır), PDGF-BB (düz kas hücresi migrasyonu), PDGFAA (düz kas hücre proliferasyonu) dır. Transforming büyüme faktör (TGF) ve angiotensin-II migrasyona etki ederler. Proteazlar proliferasyon ve migrasyon üzerine etkilidirler. İki tip proteaz bildirilmiş olup,

bunlardan *Plasminojen aktivatörler olan;* doku plazminojen aktivatör (tPA) ve ürokinaz düz kas hücrelerini prolifere ederlerken, ayni zamanda PDGF ve FGF plasminojen aktivatörlerini aktive ederek intima kalınlaşmayı da artırırlar. tPA üretiminde azalma kalınlaşmayı geriletir. *Metalloproteinaz ise;* migrasyonu artırmaktadır. Böylece proteolitik ve antiproteolitik dengenin endotel tarafından kontrolü intima hiperplazide önemli rol oynar. İnsülin benzeri büyüme faktör (IGF) ve TGF de migrasyona etkilidir. T lenfositlerinden salgılanan interferon-γ proliferasyonu inhibe eder. Endotel rejenerasyonu ise proliferasyonu inhibe eder. Endotel hücreleri büyüme faktörlerinin (BF) düz kaslara girişine karşı bariyer oluşturur. Endotel ayrıca düz kas hücre proliferasyonunu inhibe eden maddeleri (heparan sulfat, NO vs. gibi) sentez edip salgılar.

Endotel hücrelerinin varlığında damar duvarı adaptasyonu: Venöz bypasslarda intima hiperplazinin esas nedeni hemodinamik stress dir. Greftin venöz yoldan arteryel yola geçişinde (arteryalizasyonda) adaptasyon mekanizması ile intimal kalınlaşma oluşur. Ven greftleri yeniden venöz yola dönerse oluşan değişikliklerde gerileme meydana gelir. Venöz bypasslardan hemen sonra endotele (çoğunlukla anastomoz hattında ve ven endotelinin mekanik hasara uğradığı bölgelerde) trombosit, lökosit yapışır ve mikrotrombüsler oluşur. İki hafta içinde ven greftlerindeki ve anastomozdaki endotelin döküldüğü yerler tamamen reendotelizasyonla yenilenir. Bu dönemde düz kas hücrelerinin uyarılması ile intima kalınlaşma da başlar ve 4 haftada maksimal düzeye ulaşır. İlk 4 haftadan sonra düz kas hücrelerinin proliferasyonu durur ve ekstrasellüler matriks artmaya başlar. Onikinci haftada duvar kalınlığı maksimal olur. İntimal düz kas hücrelerinin proliferasyonu ven lümeninin arter lümenine uygun hale geldiği dönemde durur.

Diğer taraftan intima hiperplaziyi idare eden hemodinamik faktörler ise:

- ♦ Damar tensile stres (tanjansiyal stres); arter duvarına transvers gelen basınç yükü
- ♦ Damar shear stres; (arter duvarına longitudinal gelen stres) dir.

Tanjansiyal (tensile) stres; damarın çevresinde artışa neden olan basınç yüklenmesidir. Bu stres'i oluşturan komponentler: Basınç x çap/duvar kalınlığıdır. Tanjansiyal (tensile) stresi azaltmak için vasküler adaptasyon damar duvar kalınlığını artırmaktır, yani intima hiperplazidir. Tanjansiyal (tensile) stresi azaltmak için ven greftleri eksternal olarak rijit sentetik greftlerle desteklenirse intima hiperplastik cevap azalır. Shear stres'i oluşturan komponentler: Akım x vizkozite/çap tır. Kan akımının artması shear stressi artırırken, duvar kalınlığını azaltır. Shear stresin azalması (çapın artması ve akımın azalması gibi geniş çaplı safenin run-off'u iyi olmayan arter yatağa konması) intima kalınlaşmayı uyarır. Shear stresteki artış damar endotelinde NO sentazın uyarılması ile arter duvarında siklik guanosine monofosfatı (cGMP) arttrarak NO oluşumunu arttırır. Sonuç olarak NO'nun artması ile aşağıdaki olaylar gelişir: [27].

- ♦ *İntimal kalınlaşma azalır*
- ♦ *İntimadaki hücre sayısı azalır*
- ♦ *Düz kas hücreleri proliferasyonu inhibe olur*
- ♦ *Hücre ölümüne yol açar*
- ♦ *Endotel hücrelerindeki adezyon moleküllerinin salınmasını ve inflamasyonu azaltır.*
- ♦ *Fibroblastlardan kollajen salınımı azalır.*

Ven greftindeki endotel asla arter endoteli gibi fonksiyon görmez. Bu endotelin prostasiklin, EDRF ve NO salınımı daha az, TxA2 üretimi daha çoktur. PTFE protezler 3 hafta içinde komple endotelize olurlar [27]. Sonuç olarak neointima hiperplaziyi önlemede kullanılan farmakolojik yaklaşımları yukarıdaki bilgiler ışığında aşağıda sıralanan temel mekanizmalar üzerinden özetleyebiliriz [30] .

1. Reaktif oksijen ürünleri

2. Nitrik oksit ve prostasiklin

3. Endotelin

4. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

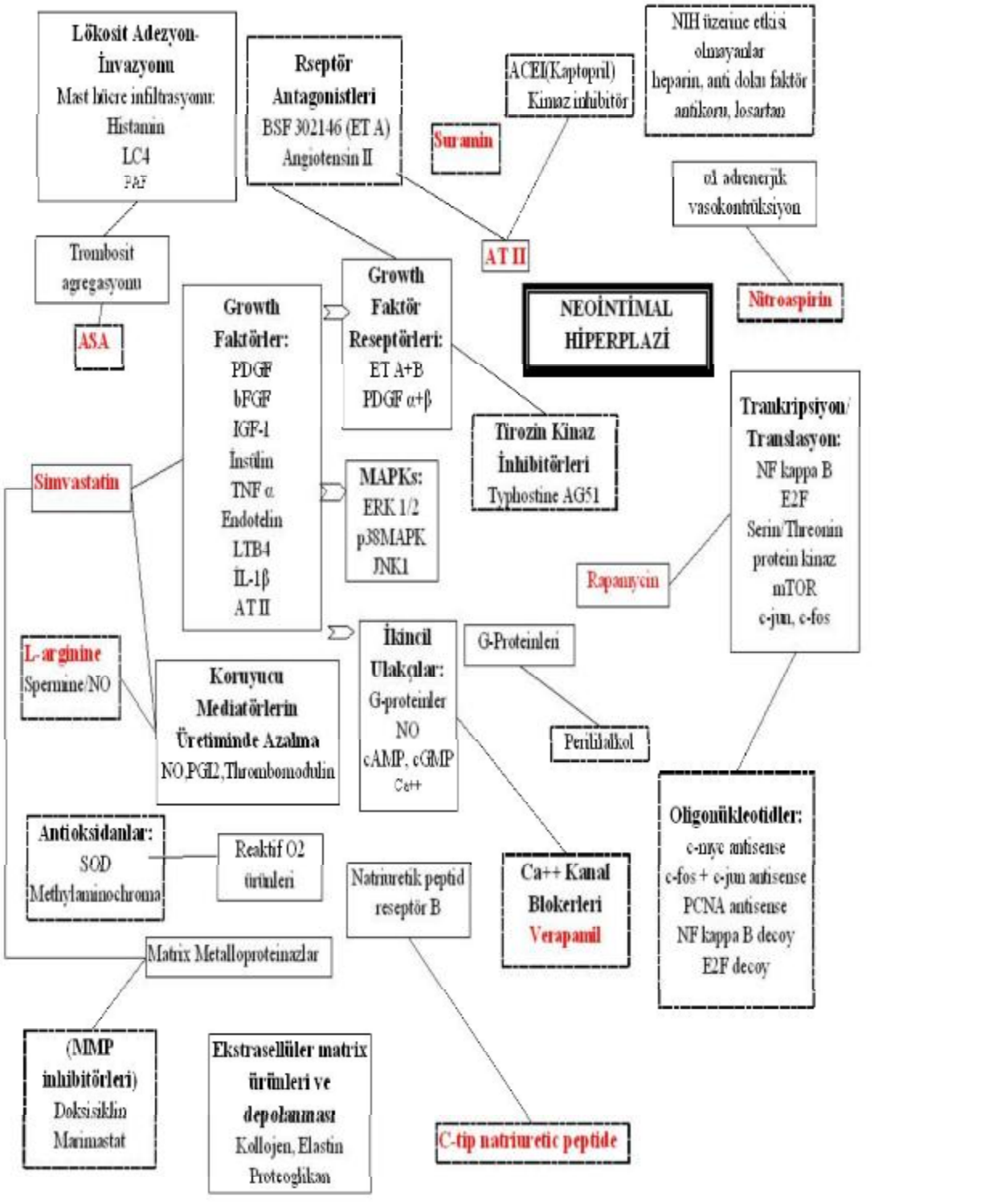
5. Angiotensin

6. Matriks metallaproteinazlar

7. Kalsiyum

8. G proteinleri

9. Mitojen aktive eden proteinkinazlar



ERK: extracellular signal-regulated kinase; JNK: c-jun N-terminal kinase; MAPK: mitogen activated protein kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; NIH: neointimal hiperolazi

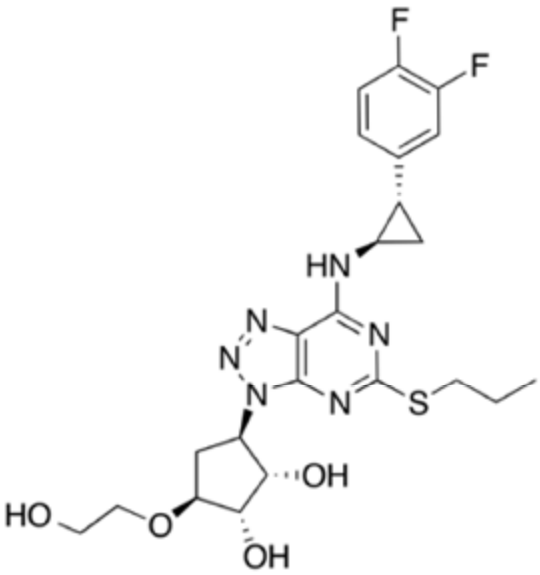
Şekil 1.4 Neointima hiperplaziyi önlemede farmakolojik yollar [30]

1.4. TİKAGRELOR

Tikagrelor, tineopiridin grubu (klopidogrel vb) antiplatelet ajanlara göre yeni bir kimyasal sınıf olan siklopentyl-triazolo-primidin grubunun ilk oral kullanımda olan ilacıdır. P2Y12 (ADP reseptörü) antagonistidir. Antiplatelet, vazodilatatör ve antitrombotik etkilidir. Adenozin difosfat (ADP); platelet aggregasyonunda önemli role sahip P2Y1 ve P2Y12 platelet hücre yüzey reseptörlerini aktive eder. Bu iki reseptörden herhangi birinin inhibisyonu etkili trombosit aktivasyon blokajı yapar. Tikagrelor; platelet hücre yüzeyinde ADP'den farklı bir alana tutunarak ADP aracılı trombosit aktivasyonunu non-competitif olarak inhibe eder. Sonuç olarak tikagrelor ortamdan ayrılana kadar reseptörü intact halde bırakır ve oluşturduğu etki reversible olup geri dönüşümü hızlıdır. P2Y12 aktivasyonu aracılı oluşan vazokonstriksiyonu engeller. Ayrıca P2Y12 reseptör aracılı inflamasyonu inhibe ederek restenozu önler[31, 32].

Tikagrelor ayrıca kırmızı kan, kas, endotel hücrelerinde adenozin geri alımını inhibe ederek adenozin seviyesini arttırır ve sonuç olarak extracelluler ATP artışıyla vazodilatasyona sebep olur. Ayrıca artan adenozin ve ATP endotelden vazodilatatör maddelerin salınmasını da stimüle eder(NO, PGI2, endotelyal hiperpolarizing faktör). Tikagrelor platelet dışı vasküler düz kas hücrelerinde P2Y12 reseptörünü de inhibe ederek vazokontriksiyon inhibisyonuyla myokardiyal kan akımında artışa neden olur. Sonuç olarak periferik endotelyal disfonksiyonu düzeltip koroner micro dolaşımı önemli derecede artırır[31, 32].

Açık formülü (1 S , 2 S , 3 R , 5 S) -3 - [7 - [(1 R , 2 S) -2 - (3, 4-Difluorofenil) siklopropilamino] -5 - (propiltiyo) - 3H-[1 , 2, 3] triazolo [4, 5-d] pirimidin-3-il] -5 - (2-hidroksietoksi)-siklopentan-1 , 2-diol'dür[31, 32].



1.5. Tikagrelor'un kimyasal yapısı

1.4.1. Tikagrelor'un Farmakokinetiği

Tikagrelor oral alım sonrası bağırsaktan hızla absorbe olur. Yaklaşık 1, 5 saatte pik plazma düzeyine ulaşır. Biyoyararlanmı %36 civarındadır. Sitokrom P450 enzim sistemiyle metabolize edilir. Aktif metaboliti, tikagrelor'un yaklaşık %30-40'ına denk gelir. Tikagrelor ve aktif metabolitinin %99.7 den fazlası plazma proteinlerine bağlanır ve safra-dışkı ile atılır.[31, 32]

1.4.2. Tikagrelor'un Endotelyal Sistem Üzerine Etkileri :

Tikagrelor, tineopiridin grubu (klopidogrel vb) antiplatelet ajanlara göre yeni bir kimyasal sınıf olan siklopentyl-triazolo-primidin grubunun ilk oral kullanımda olan ilacıdır. P2Y12 (ADP reseptörü) antagonistidir. Antiplatelet, vazodilatatör ve antitrombotik etkilidir. Adenozin difosfat (ADP); platelet aggregasyonunda önemli role sahip P2Y1 ve P2Y12 platelet hücre yüzey reseptörlerini aktive eder. Bu iki reseptörden herhangi birinin inhibisyonu etkili trombosit aktivasyon blokajı yapar. Tikagrelor; platelet hücre yüzeyinde ADP'den farklı bir alana tutunarak ADP aracılı trombosit aktivasyonunu non-competitif olarak inhibe eder[6].

Mekanik hasara maruz kalan intima tabakaya salınan birçok faktör mekanik hasar sonrası vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonunu uyarır, bu faktörler; plateletlerden köken alan granüller, fibrinojen, lokal intramural trombin, faktör Xa ve bu alana infiltre olmuş monosit ve makrofaj kökenli olan ve aynı zamanda bu hücrelerin plazmalarından salınan diğer kemotaktik ve mitojenik faktörlerdir. Hayvanlardaki çalışmalar arteryal hasara cevap olarak oxidan salındığı kanıtını ve rejenere olan endotel hücrelerine lökositlerin adezyonunun regulasyonuna katkıda bulunduğunu gösterdi[6].

PDGF(trombosit kaynaklı büyüme faktörü); VSMC(vasküler düz kas hücreleri), vasküler endoteliyal hücreler, trombositler veya makrofajlar tarafından indüklenen bir büyüme faktörüdür ve intima proliferasyonda önemli bir rol oynar. PDGF(trombosit kaynaklı büyüme faktörü) hücre büyümesini uyardıktan sonra vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu indükler[6].

ROS(reaktif oksijen ürünleri)'un aterosklerozdaki intimal kalınlaşmanın patogenezinde önemli olan hücre proliferasyonu gibi birçok biyolojik olayda görev alan önemli bir molekül olduğuna inanılmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri hücreiçi serbest kalsiyum düzeyini arttırarak vasküler tonusu arttırmaktadır[6].

Hem oksijenaz-1(HO-1) oksidatif hasara karşı sitoprotektif etkisi ile bilinir. HO-1'in aktivasyonu VSMC(vasküler düz kas hücreleri) proliferasyonu nedeniyle olan vasküler daralmada tedavi edici davranış göstermektedir. Vasküler düz kas hücre kültürlerinde hücreiçi cAMP(siklik adenozin monofosfat) artışının ve PKA(protein kinaz A) aktivasyonunun HO-1(hem oksijenaz-1) gen ekspresyonunu indüklediği görülmüştür[6].

Tikagrelor kırmızı kan, kas, endotel hücrelerinde adenozin geri alımını inhibe ederek adenozin seviyesini arttırır ve sonuç olarak extracelluler ATP artışıyla vazodilatasyona sebep olur. Ayrıca artan adenozin ve ATP endotelden vazodilatatör maddelerin salınmasını da stimüle eder(NO, PGI2, endotelyal hiperpolarizing faktör). Tikagrelor, platelet dışı vasküler düz kas hücrelerinde P2Y12 reseptörünü de inhibe ederek vazokontriksiyon inhibisyonuyla myokardiyal

kan akımında artışa neden olur. Sonuç olarak periferik endotelyal disfonksiyonu düzeltip koroner micro dolaşımı önemli derecede artırır[33].

Grzegorz Grze´sk ve arkadaşlarının RAT kuyruk arteri düz kas hücrelerinde yaptığı çalışmada yüksek doz ASA ile beraber tikagrelor kullanımının ADP bağımlı vasküler düz kas hücrelerinde vazodilatatör etkisinin arttırdığı gözlenmiştir[34].

F . Guenther ve arkadaşları, C57BL/6 farelerinde infrarenal venacava inferior klemplenmesi ile oluşturulan Derin Ven Trombozu modelinde enoksaparin ile tikagrelor etkileri araştırılmış ve ultrason ile ölçülen trombüs çapları tikagrelor ve enoksaparinde benzer ölçüde küçük izlenmiştir[35].

J. J. J. van Giezen ve arkadaşları, canine cinsi köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada intraoperatif olarak bir dakika boyunca sol ön inen arter (LAD) oklüzyonu oluşturmuş ve eritrositlerdeki tikagrelor'e bağlı adenozin uptake inhibisyonu sonucu LAD kan akımında belirgin artış izlenmiş ve bu da tikagrelor'un platelet aggregasyon inhibisyonunun yanında AKS hastalarında, bu yönüyle ek faydalar sağlayacağı öngörülmüştür[36].

Grzegorz Grze'sk ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada da winstar cinsi RATlarda fenilefrin, vazopressin, 2-mes-ADP ile kasılması indüklenen kuyruk arteriyel vasküler düz kas hücrelerinin kontraksiyonunda ne klopidogrel ne de prasugrelin tikagrelor kadar etkili kontraksiyon inhibasyonu yapmadığı izlenmiştir[37].

Buna bağlı olarak biz bu çalışmada tikagrelor'un normal karotid arterin anostomoz sonrası elde edilen hasarını takip eden intima hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisini belirlemeyi amaçladık. Bu yolla dolaylı da olsa kalp-damar derrahisinde can alıcı noktalar olan gerek periferik arteriyel rekonstrüksiyonlarda gerekse koroner arter bypass

cerrahisinde tikagrelor kullanımının anostomoz hattında gelişen neointima hiperplaziyi azaltarak tromboz gelişimi olasılığını düşürebileceğini de önerebiliriz.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. ÇALIŞMA PLANI:

Randomize, kontrollü, deneysel bir araştırma olan çalışmamıza; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 20.11.2013 tarihinde 87/2013 protokol numarası ile izin alındıktan sonra başlanmış ve deney hayvanları laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda randomize olarak seçilen, ortalama 2-3 kg ağırlığında 14 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanıldı. Çalışma süresi boyunca tüm denekler aynı yerde (20±2C° sıcaklıkta, havalandırma tertibatı olan ve güneş ışığı alabilen bir oda) bakıldılar ve tavşan yemi ile beslendiler. Tavşanlara preoperatif kulak arkasında bulunan marginal venden branül takıldı (Resim 2.1). Deney günü tavşanlara anestezi olarak 50 mg/kg intramüsküler ketamin ve 5 mg/kg intramüsküler ksilazin uygulandı. Enfeksiyondan korunmak için preoperatif olarak tavşanlara 50mg/kg dozunda sefazolin intravenöz yol ile antibiyoterapi uygulandı. Cerrahi sırasında daha iyi görüş sağlamak amacıyla deneklerin insizyon yapılacak bölgeleri tıraş edildi ve batikonla dezenfeksiyon sağlandı. Çalışmadaki tüm anastomozlar aynı araştırıcı tarafından yapıldı. Bütün deneklerde anastomoz için sağ taraf karotis arteri, kontrol için ise sadece grup B de sol taraf karotis arteri kullanıldı. Sterilizasyon sağlanarak uygun pozisyon verildi ve tüm grup tavşanlara vertikal sağ taraf boyun insizyonu yapılarak karotid arter eksplore edildi (Resim 2.2). Daha sonra karotid arter diseke edilerek, 100 IU/kg dozda İ.V heparinizasyon yapıldı. Karotis arteri proksimal ve distalinden buldog klemple klemplendi (Resim 2.3). Aynı arter transekte edildi (Resim 2.4).

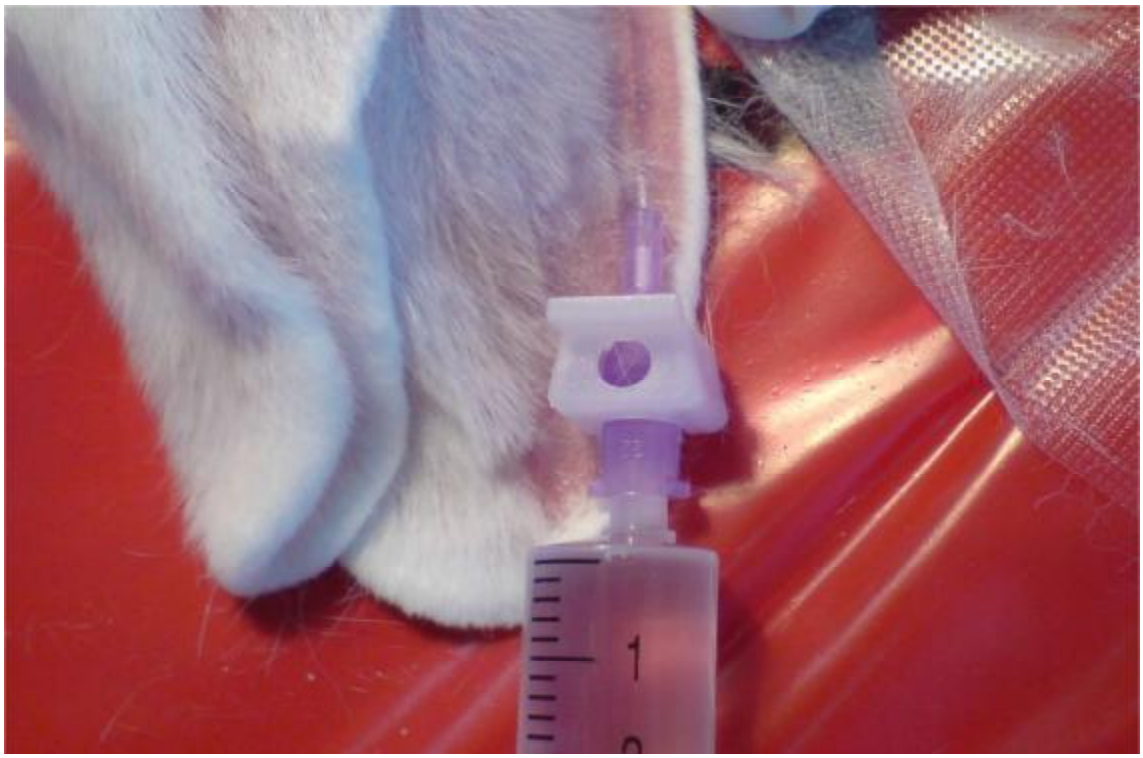
Daha sonra 8/0 polipropilen sütür ile continu teknikle anastomoz tamamlandı (Resim 2.5) ve dokular anatomik planda kapatıldı. Tavşanlar 2 gruba ayrıldı. Grup A tavşanlar kontrol grubuydu. Grup B'deki deneklere yirmibir gün 60 mg /kg/gün dozunda günde 2 kez peroral olarak tikagrelor verildi. Yirmibirinci gün sonunda anastomoz yapılan taraf ve grup B de anastomoz yapılmayan karşı taraf karotid arter segmenti çıkarılarak incelenmek üzere histoloji laboratuvarına gönderildi. Yüksek doz pentotal ile hayvanların yaşamına son verildi.

2.2. DENEY PROTOKOLÜ:

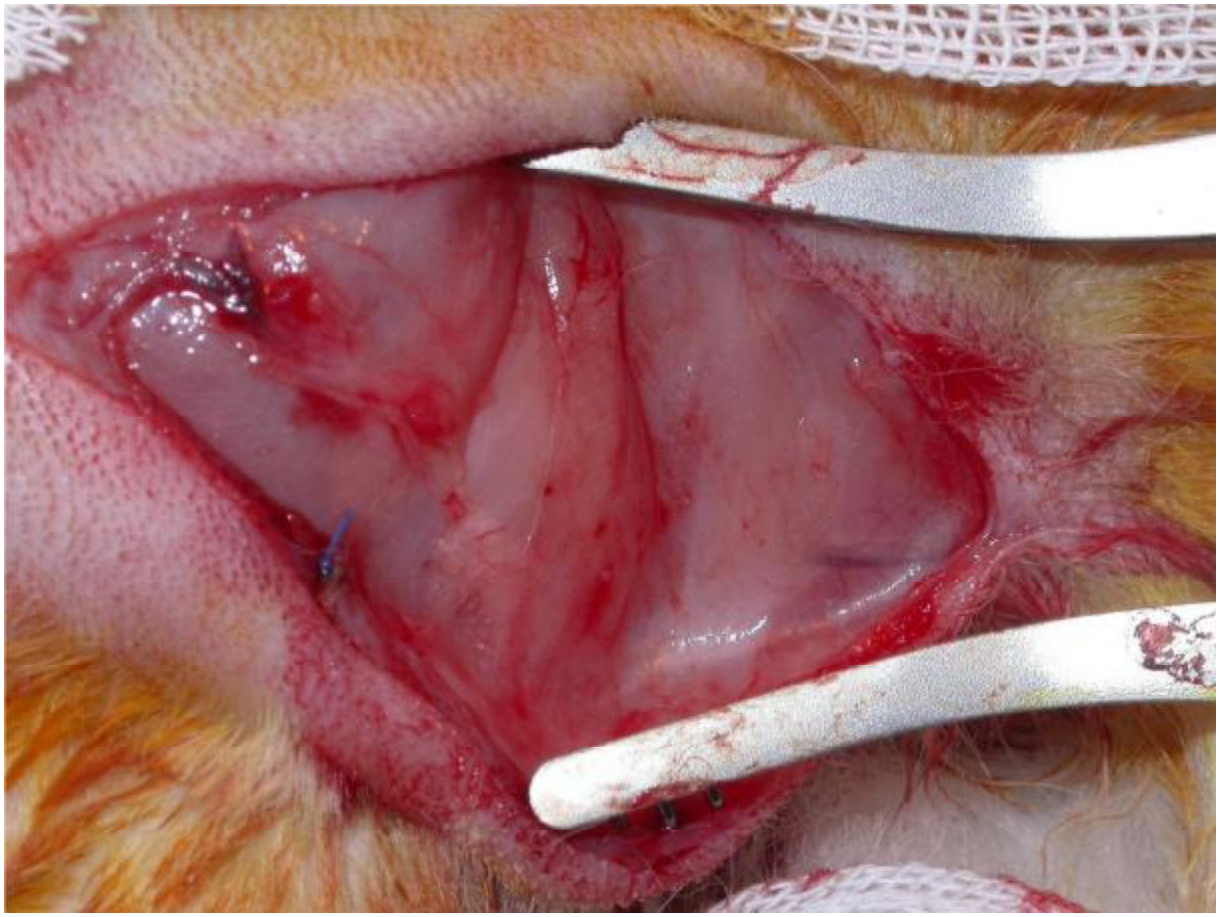
Grup A: Tavşanlar kontrol grubunu oluşturdu. Herhangi bir ilaç uygulanmadı. Yirmibirinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ taraf karotid segmenti çıkarılarak histoloji laboratuvarına gönderildi.

Grup B: Grup A ile aynı protokol uygulandı. Farklı olarak tavşanlara yirmibir gün süre ile 60 mg/kg/gün dozunda günde 2 kez peroral tikagrelor verildi. Yirmibirinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ taraf ve yapılmayan sol karotid segmenti çıkarılarak histoloji laboratuvarına gönderildi.

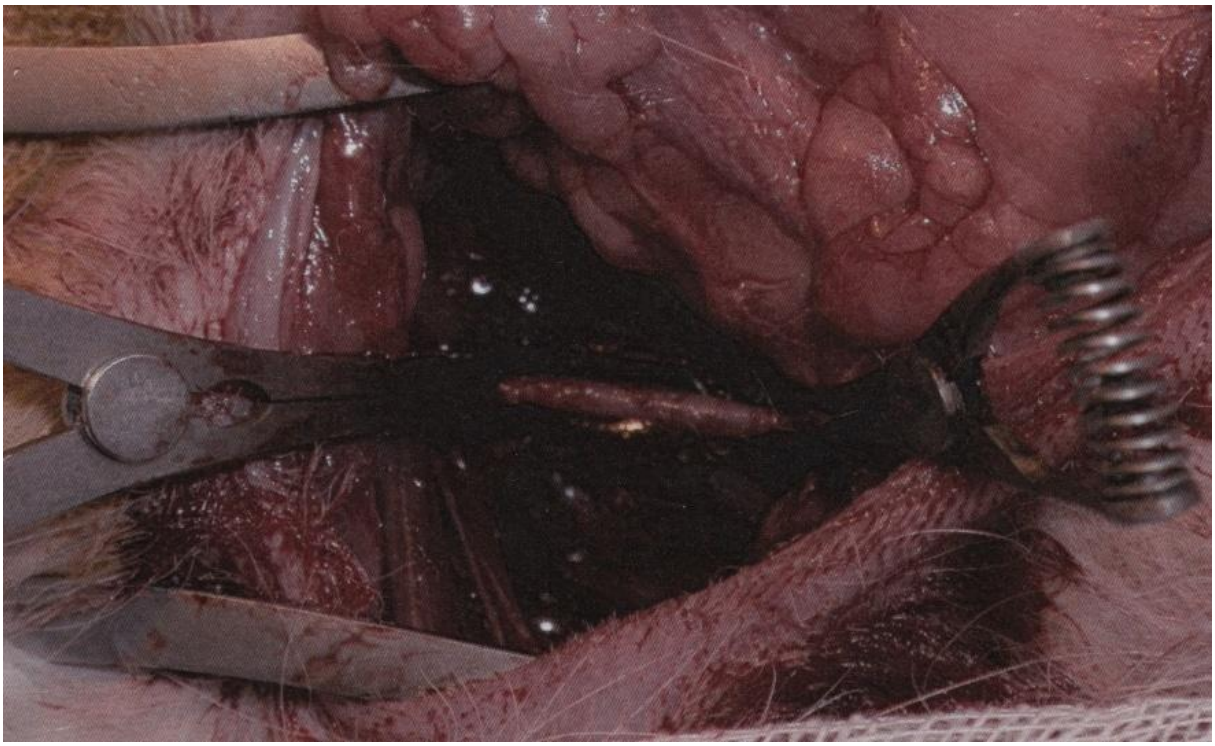
Grup BK: Grup B'deki anastomoz yapılmayan sol karotis arterin histopatolojik incelemesinin yapıldığı grup.



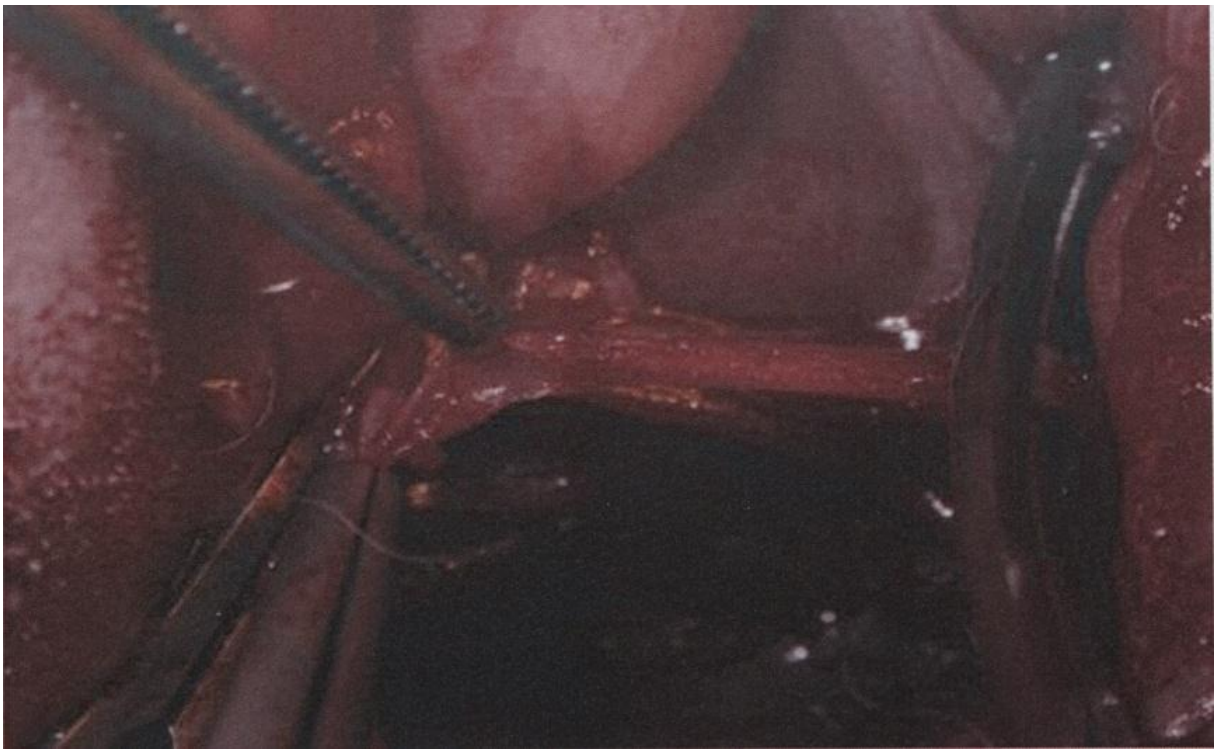
Resim 2.1. Tavşan kulak arkası marginal veninden branül takılması



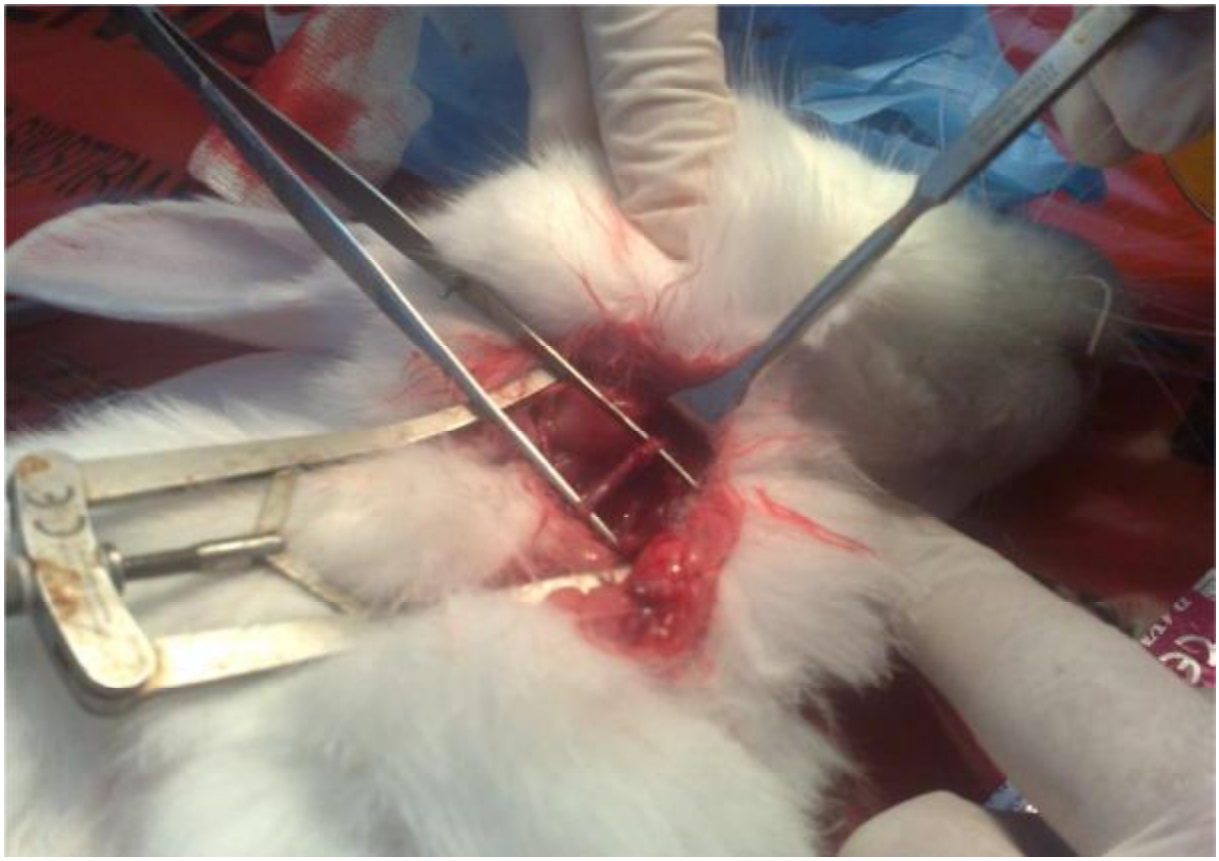
Resim 2.2 Tavşan sağ karotis arterinin eksplorasyonu



Resim 2.3. Karotis arterinin anastomoz öncesi buldog klemple oklüde edilmesi.



Resim 2.4. Karotis arterinin transekte edilmiş görünümü.



Resim 2.5. Karotis arterin anastomoz edilmesi.

2.3. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME:

Histolojik inceleme için tavşanlardan elde edilen damar dokuları, %10'luk tamponlu formaldehid içinde fikse edilip parafine gömüldükten sonra hazırlanan parafin bloklardan 5µm kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitler, Hematoksilen-eozin, Masson-Trikrom ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Olympus BH-2 (Tokyo, Japan) ışık mikroskobunda incelendi. Anastomoz yapılan ve karşı taraf sağlam damar dokusu kesitleri ışık mikroskopik düzeyinde karşılaştırmalı olarak incelendi. Ayrıca elde edilen görüntüler (JVC TK-890E, Japan) digital görüntü analiz programı ile değerlendirildi (UTSCSA; Image tool version 3.0 University of Texas, San Antonio, Texas.). Çalışma sırasında damar dokusu incelenirken, tunica intima ile tunica media'nın kalınlıkları, tunica media ile tunica lümen+media'nın alanları, damar çapları ve damar lümen alanları

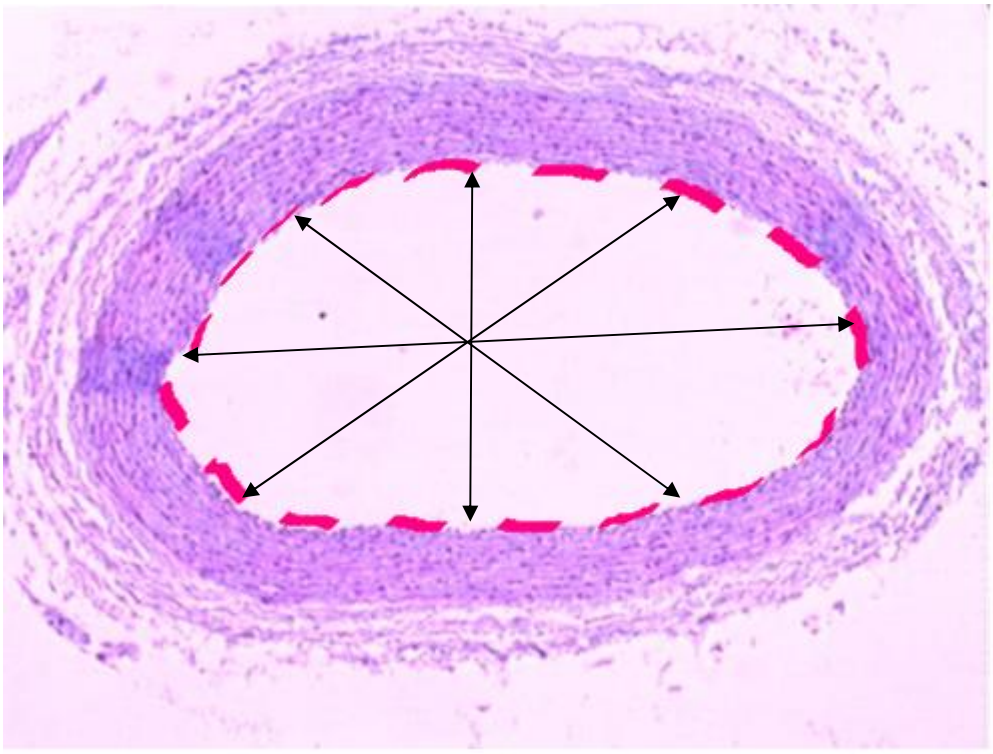
steorolojik yöntemlerle gruplar arasında karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki damar lümen çapı, lümen alanı, lümen+media alanı, media alanı ve intima ve media kalınlıkları arasındaki farklar değerlendirildi.

2.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM:

Elde edilen sonuçlar, ortalama +/- standart hata olarak verildi. Veriler SPSS 15.0 evaluation version (SPSS, Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak ikili grupların verilerinin karşılaştırmaları Mann-Whitney U, gruplar arasındaki farkların karşılaştırılmaları Kruskal Vallis varyans analiz testleri ile değerlendirildi, $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmamızda Yeni Zelanda tipi 14 adet erkek tavşan kullanılmıştır. Tüm denekler çalışma süresi boyunca yaşamışlardır. 21 gün sonunda tavşanların hiç birinde yara yeri enfeksiyonu ve nörolojik problem gelişmemiştir. Çalışma süresi bitiminde tüm tavşanların anastomoz yapılan sağ taraf karotis arteri ve ayrıca B grubunun anastomoz yapılmayan sol taraf karotis arteri çıkarılarak incelenmek üzere histoloji laboratuvarına gönderildi. Alınan dokulardan yapılan kesitlerde lümen çapı, lümen alanı, media kalınlığı, intima kalınlığı, lümen+media alanı, media alanına bakıldı. (Resim 3.1.).



Resim 3.1. Lümen çapı (⟷) ve lümen alanının (— —) ölçülmesi.

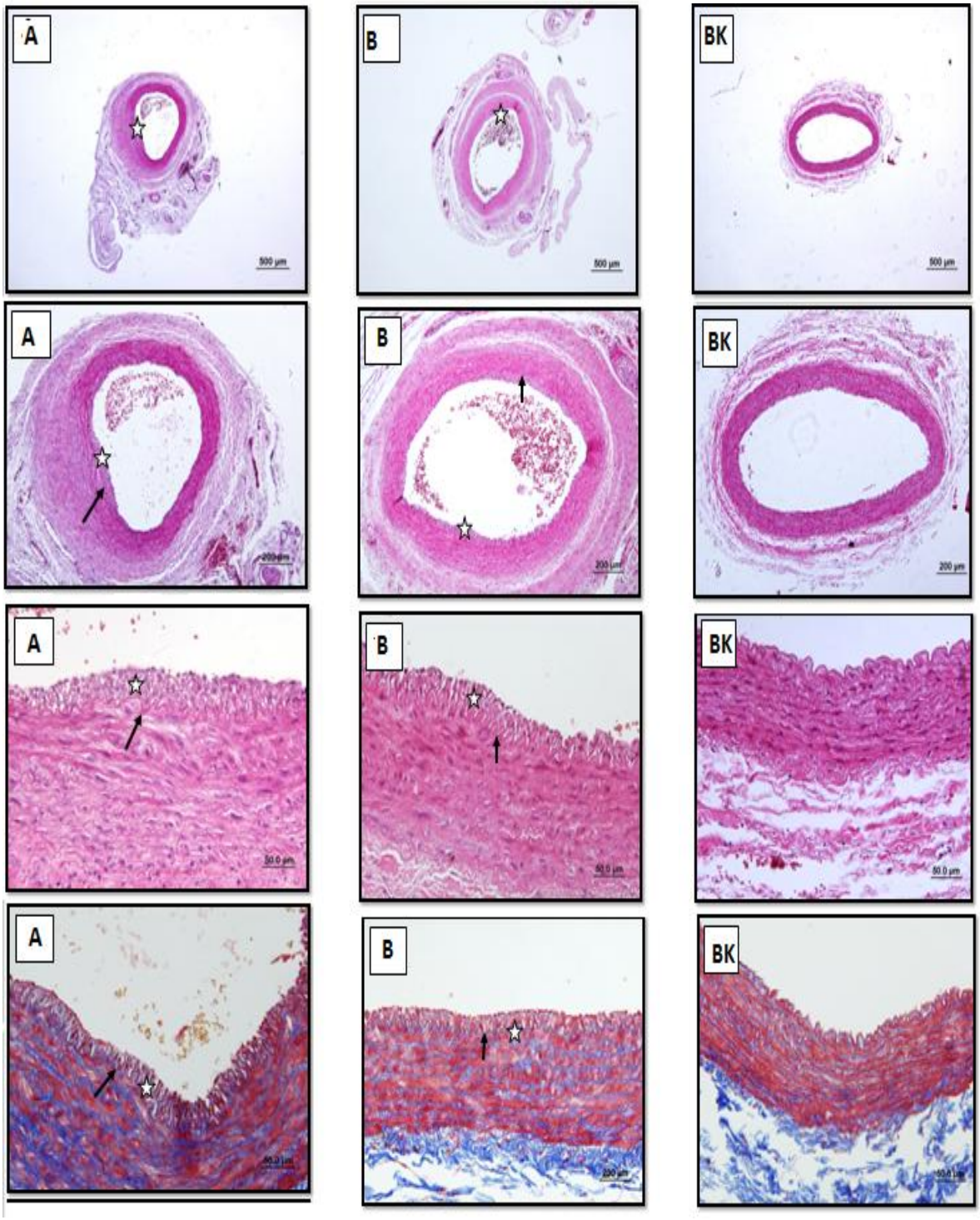
3.1. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME:

3.1.1. Grup A:

Tikagrelor verilmeyen tavşanlardan elde edilen kesitlerde anastomoz yapılan sağ taraf karotis arterin, grup B'deki anastomoz yapılmayan sol taraf karotis arter ile karşılaştırıldığında; damar lümeninin kısmen daraldığı, lümenin düzgün dairesel şeklinin kısmen bozulduğu görüldü. İntimal alanda ise düz kas hücre proliferasyonun olduğu görüldü. Hücresel dizilimlerin dağınık olduğu ve bir miktar bağ dokusu artışı ile intima hiperplazinin olduğu görüldü. Anastomoz uygulanan Grup A'da Grup BK'ya oranla lümen alanının kısmen daha dar olduğu görülmektedir. Grup A' da intima hiperplazinin Grup B ile kıyaslandığında biraz daha fazla olduğu görülmektedir. Grup A' da görülen media hipertrofisinin Grup B ile kıyaslandığında biraz daha fazla olduğu görülmektedir.

3.1.2. Grup B:

Bu grupta çalışmaya alınan tavşanların anastomoz yapılan sağ karotis arter segmentlerinden elde edilen kesitlerden yapılan incelemede; hem anastomoz yapılan hem de anastomoz yapılmayan gruplarda damar lümenlerinin biraz daha genişlemiş ve düzgün olduğu, lümen çapının Grup A'ya oranla daha geniş kaldığı tespit edildi. Lümen geometrisinin Grup A'ya göre daha düzgün olduğu görüldü. Ortalama tunika intima kalınlığına bakıldığında Tikagrelor alan grupta azalma olduğu tespit edildi. Her iki taraf media tabakalarında Grup A aleyhine bir artma olduğu görüldü



Resim 3.2. Damar kesitlerinde A:Kontrol anostomoz grubu, B:Tikagrelor anostomoz grubu, BK:Tikagrelor kontrol grubu, Ave B gruplarına ait.(⟶) internal elastik lamina,(☆) intimal hiperplaziyi göstermektedir.

.

4. SONUÇLAR

4.1. LÜMEN ÇAPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası lümen çapı karşılaştırmasında; tikagrelor almayan ve anastomoz yapılan Grup A'ın ortalama lümen çapı 1183, 63 ± 150, 96 μm olarak tespit edildi.

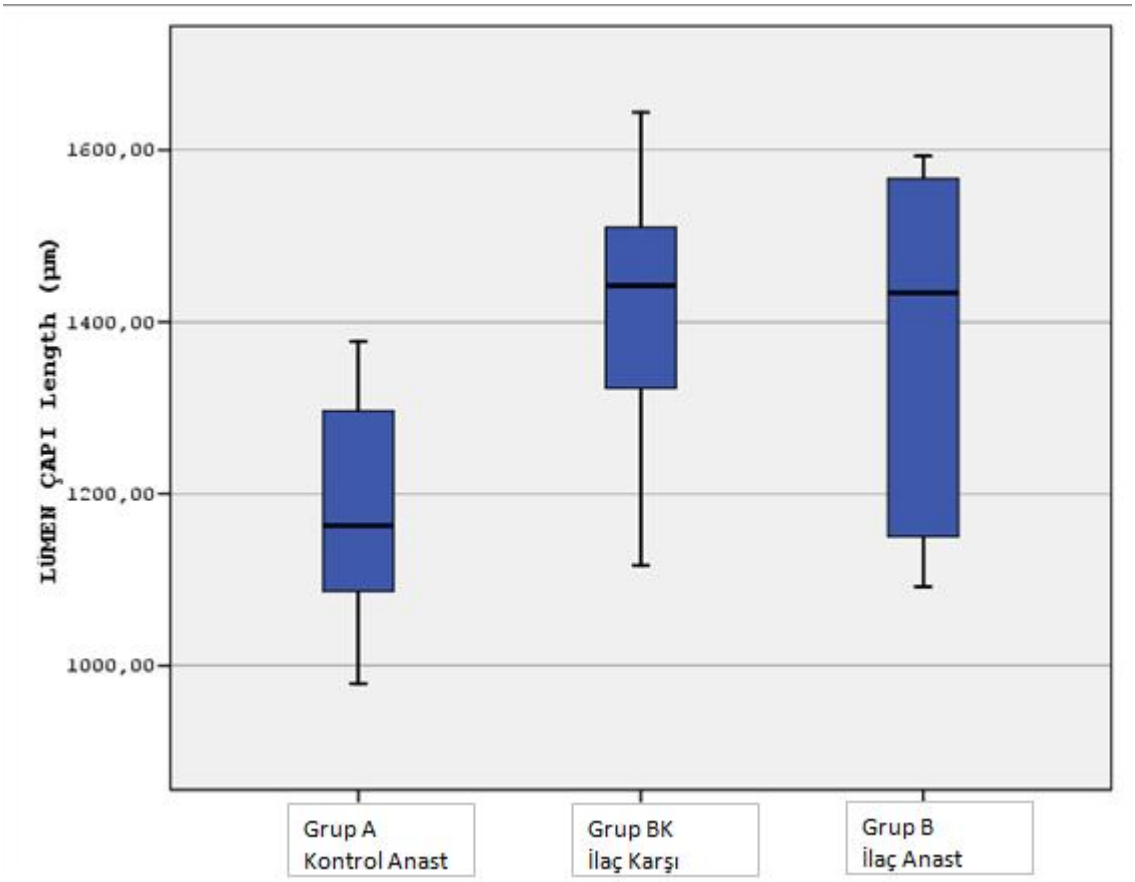
Grup A'ın ortalama lümen çapının (1183, 63 ± 150, 96 μm) Grup BK ve diğer tikagrelor alan ve anastomoz yapılan gruba (Grup B) göre daha az olduğu görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p = 0.092).

Tikagrelor alan ve anastomoz yapılmayan karşı taraf karotis grubunun(Grup BK) ortalama lümen çapı 1409, 95 ± 172 μm olarak tespit edildi. Tikagrelor alan ve anastomoz yapılan Grup B'nin ortalama lümen çapının (1378, 25± 212, 84 μm) tikagrelor almayan ve anastomoz yapılan Grup A'dan daha geniş olduğu (1183, 63 ± 150, 96 μm) ancak bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p = 0.086).

Grup B'nin ortalama lümen çapının grup BK'nın ortalama lümen çapına göre daha az ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (p = 0, 886).

Anastomoz Yapılmayan Kontrol Grupları		Anastomoz Grupları	
Grup	*Ortalama lümen çapı (μm) ± SE*	Grup	*Ortalama lümen çapı (μm) ± SE*
Grup BK	1409, 95 ± 172	Grup A	1183, 63 ± 150, 96 (p=0.092)
		Grup B	1378, 25± 212, 84 (p=0.886)

Tablo 4.1. Ortalama lümen çapı kontrol grupları ile karşılaştırılması.



Grafik 4.1. Ortalama lümen çaplarının karşılaştırılması. Grup A; Tikagrelor almayan anastomoz yapılan grup(kontrol anast), Grup B; 21 gün tikagrelor alan anastomoz yapılan grup(ilaç anast), Grup BK; 21 gün tikagrelor alan anastomoz yapılmayan karşı taraf grup(ilaç karşı).

4.2. LÜMEN ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI:

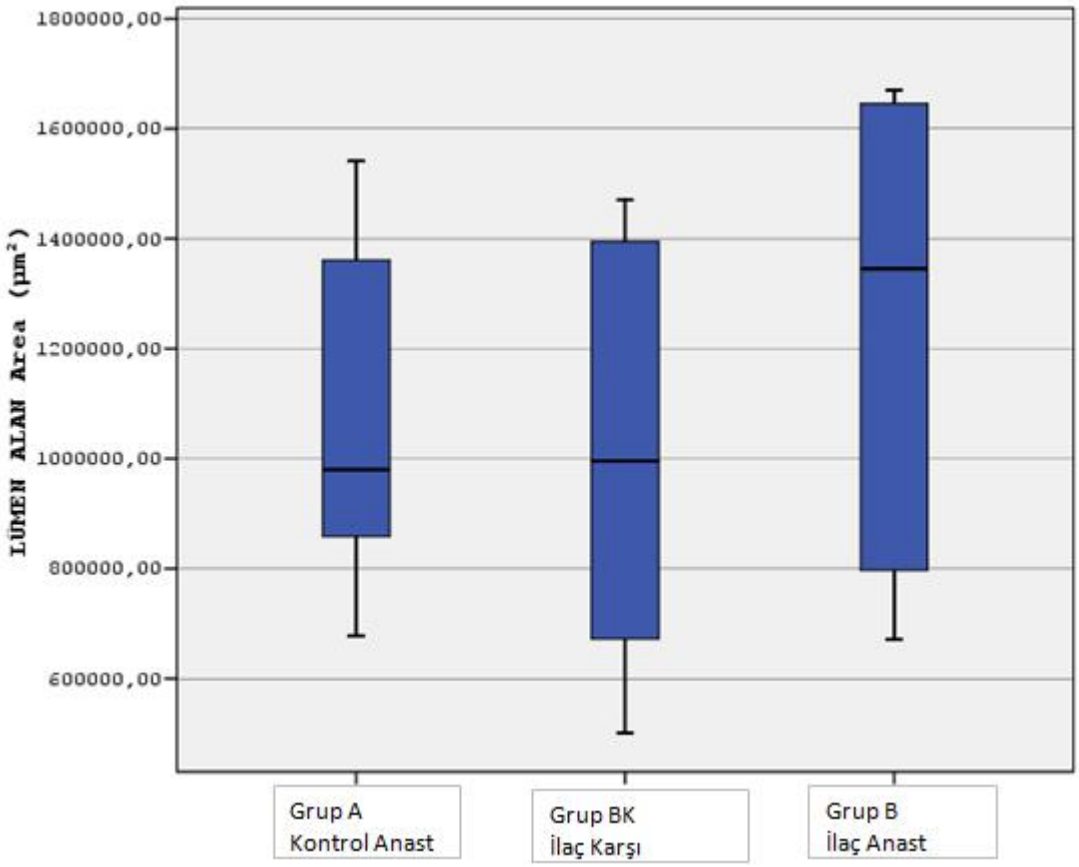
Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası lümen alanı karşılaştırmasında; tikagrelor almayan ve anastomoz yapılan Grup A'nın ortalama lümen alanı (1.091.073, 45± 336.723, 49 µm2) tikagrelor alan ve anastomoz yapılmayan karşı taraf grubunun (Grup BK) ortalama lümen alanına (1.014.295, 81± 407.928, 74µm2) oranla ilginç olarak bir miktar daha fazla bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0.655).

Grup A'ın (tikagrelor almayan ve anastomoz yapılan grup) ortalama lümen alanının (1.091.073, 45± 336.723, 49 μm2) tikagrelor alan ve anastomoz yapılan B grubunun ortalama lümen alanına göre (1.245.855, 38± 422.359, 83μm2) azalmış olduğu görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p= 0.475).

Grup B'nin ortalama lümen alanı(1.245.855, 38± 422.359, 83 μm2) Grup BK'nın ortalama lümen alanına göre (1.014.295, 81± 407.928, 74 μm2) rakamsal olarak fazla bulunmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.391).

Anastomoz Yapılmayan Kontrol Grupları		Anastomoz Grupları	
Grup	*Ortalama lümen alanı (μm2) ± SE*	Grup	*Ortalama lümen alanı (μm2) ± SE*
Grup BK	1.014.295, 81± 407.928, 74	Grup A	1.091.073, 45± 336.723, 49 (p=0.655)
		Grup B	1.245.855, 38± 422.359, 83 (p=0.391)

Tablo 4.2. Ortalama lümen alanı kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.2. Ortalama lümen alanlarının karşılaştırılması. Grup A; tikagrelor almayan anastomoz yapılan grup(kontrol anast), Grup B; 21 gün tikagrelor alan anastomoz yapılan grup(ilaç anast), Grup BK; 21 gün tikagrelor alan anastomoz yapılmayan karşı taraf grup(ilaç karşı).

4.3. İNTİMA KALINLIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası intima kalınlığının karşılaştırmasında; Grup A'ın ortalama intima kalınlığı (183, 32, ± 166, 87 µm) Grup BK'nın ortalama intima kalınlığına

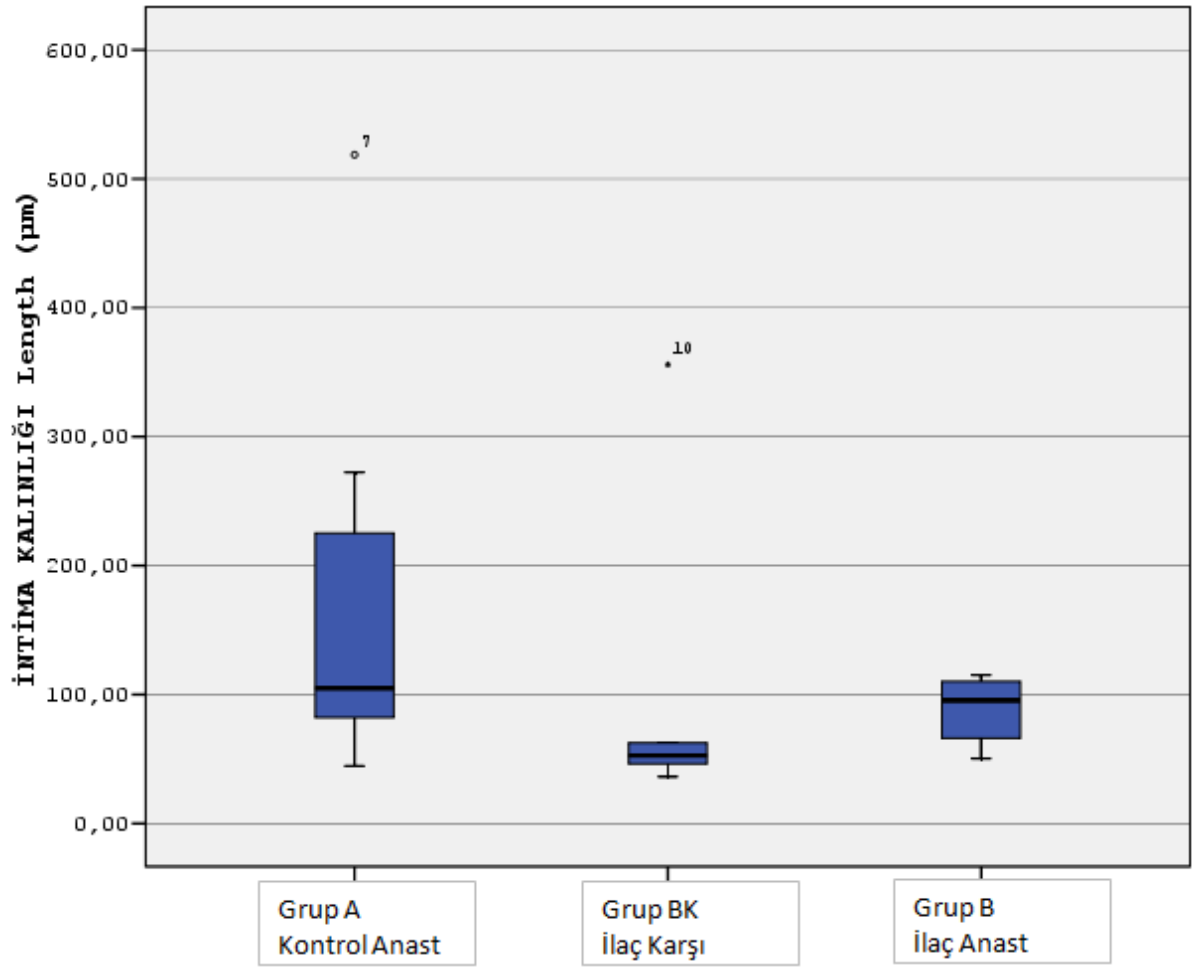
(94, 68 ±115, 59 μm) oranla daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p =0.142).

Grup A'ın ortalama intima kalınlığı (183, 32, ± 166, 87 μm) Grup B'nin ortalama intima kalınlığına (88, 81± 26, 15 μm) oranla daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p =0.568).

Grup B'nin ortalama intima kalınlığı (88, 81± 26, 15 μm) Grup BK'nın ortalama intima kalınlığına (94, 68 ±115, 59 μm) oranla kısmen daha az veya birbirine çok benzer uzunluklarda bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p = 0.086).

Anastomoz Yapılmayan Kontrol Grupları		Anastomoz Grupları		
Grup	*Ortalama intima kalınlık (μm) ± SE*	Grup	*Ortalama intima kalınlık (μm) ± SE*	
Grup BK	94, 68 ±115, 59	Grup A	183, 32, ± 166, 87	(p=0.142)
		Grup B	88, 81± 26, 15	(p=0.086)

Tablo 4.3. Ortalama intima kalınlığının kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.3. Ortalama intima kalınlığının karşılaştırılması. Grup A; Tikagrelor almayan anastomoz yapılan grup(kontrol anast), Grup B; 21 gün Tikagrelor alan anastomoz yapılan grup(ilaç anast), Grup BK; 21 gün Tikagrelor alan anastomoz yapılmayan karşı taraf grup(ilaç karşı).

4.4 MEDİA KALINLIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI:

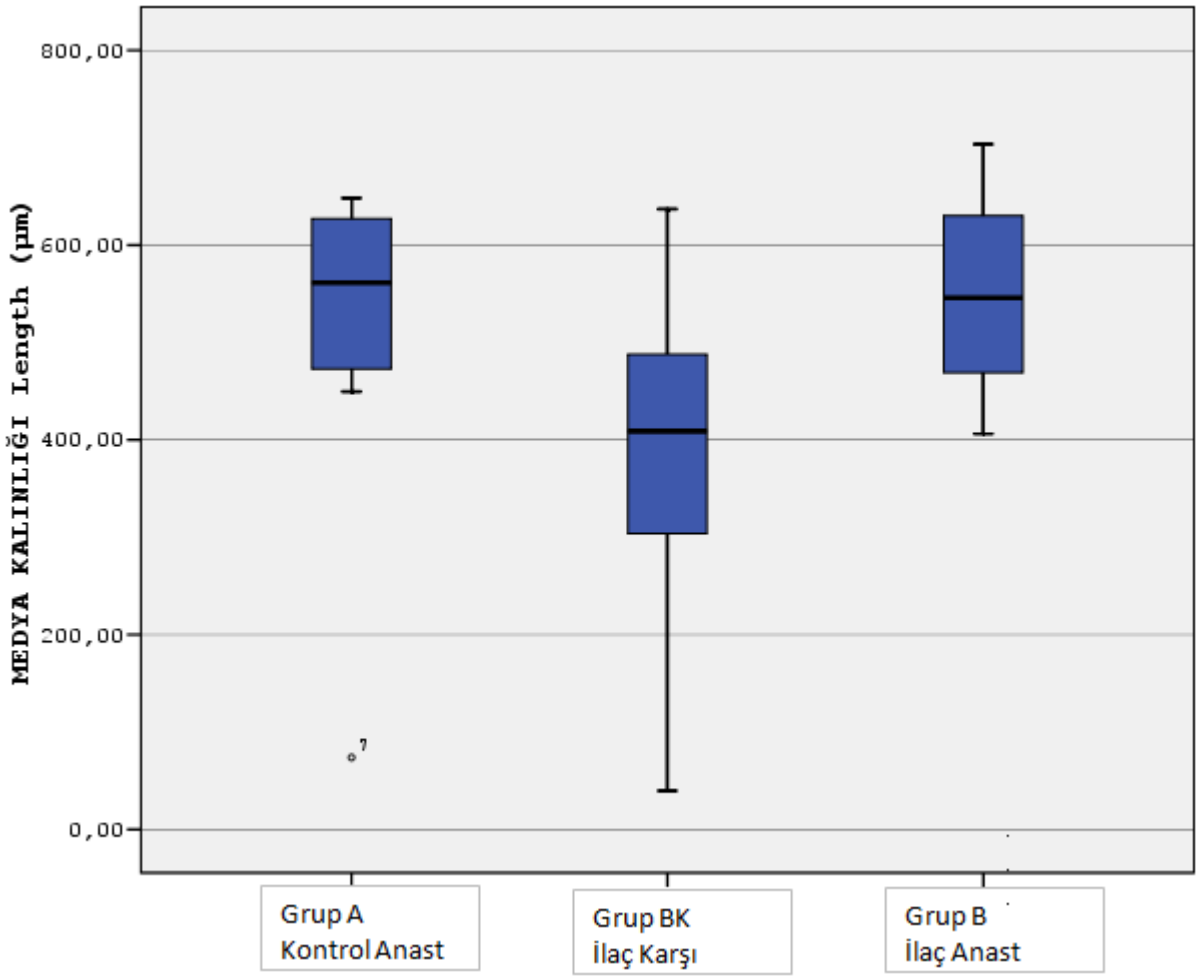
Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası media kalınlığının karşılaştırmasında; Grup A'ın ortalama media kalınlığı (497, 64 ± 200, 9 μm) Grup BK'nın ortalama media kalınlığına (381, 28 ± 194, 58 μm) oranla daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p = 0.142).

Grup A'ın ortalama media kalınlığı (497, 64 ± 200, 9 μm) Grup B'nin ortalama media kalınlığına (550, 17 ± 112 μm) oranla daha az bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (p = 1.000).

Grup B'nin ortalama media kalınlığı (550, 17 ± 112 μm) Grup BK'nin ortalama media kalınlığına (381, 28 ± 194, 58 μm) oranla daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p =0.116).

Anastomoz Yapılmayan Kontrol Grupları		Anastomoz Grupları		
Grup	*Ortalama media kalınlık (μm) ± SE*	Grup	*Ortalama media kalınlık (μm) ± SE*	
Grup BK	381, 28 ± 194, 58	Grup A	497, 64 ± 200, 9	(p=0.142)
		Grup B	550, 17 ± 112	(p=0.116)

Tablo 4.4. Ortalama media kalınlığının kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.4. Ortalama media kalınlığının karşılaştırılması. Grup A; Tikagrelor almayan anastomoz yapılan grup(kontrol anast), Grup B; 21 gün tikagrelor alan anastomoz yapılan grup(ilaç anast), Grup BK; 21 gün tikagrelor alan anastomoz yapılmayan karşı taraf grup(ilaç karşı).

4.5. LÜMEN+MEDİA ALAN TOPLAMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası lümen+media alan toplamlarının karşılaştırmasında; Grup A'ın ortalama lümen+media alan toplamı (2.338.542, 05 ± 492.775, 32 µm2) Grup BK'nın ortalama lümen+media alan toplamı (1.879.459, 97 ± 461.295, 22 µm2) ile

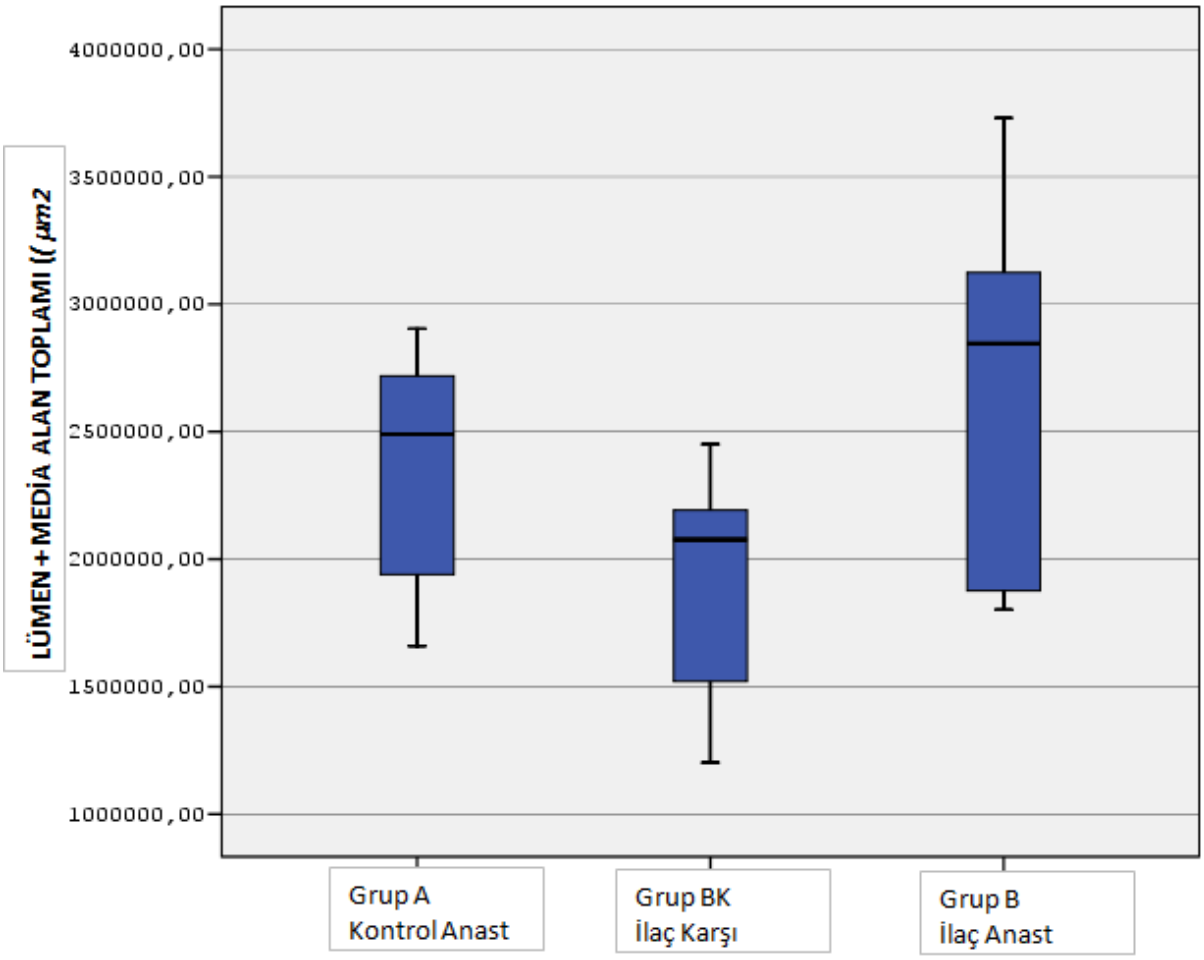
karşılaştırıldığında daha büyük bulunmuş ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.085).

Grup A'ın ortalama lümen+media alan toplamı (2.338.542, 05 ± 492.775, 32 μm2) Grup B'nın ortalama lümen+media alan toplamı (2.703.790, 41 ± 744.106, 61 μm2) ile karşılaştırıldığında daha az bulunmuş ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.199).

Grup B'nin ortalama lümen+media alan toplamı (2.703.790, 41 ± 744.106, 61 μm2) Grup BK'nın ortalama lümen+media alan toplamı (1.879.459, 97 ± 461.295, 22 μm2) ile karşılaştırıldığında daha fazla bulunmuş ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.063).

Anastomoz Yapılmayan Kontrol Grupları		Anastomoz Grupları	
Grup	*Ortalama lümen+media alan toplamı (μm2) ± SE*		*Ortalama lümen+media alan toplamı (μm2) ± SE*
Grup BK	1.879.459, 97 ± 461.295, 22	Grup A	2.338.542, 05 ± 492.775, 32 (p=0.085)
		Grup B	2.703.790, 41 ± 744.106, 61 (p=0.063)

Tablo 4.5. Ortalama lümen+media alan toplamının kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.5. Ortalama lümen+media alan toplamının gruplar arası karşılaştırılması. Grup A; Tikagrelor almayan anastomoz yapılan grup(kontrol anast), Grup B; 21 gün Tikagrelor alan anastomoz yapılan grup(ilaç anast), Grup BK; 21 gün Tikagrelor alan anastomoz yapılmayan karşı taraf grup(ilaç karşı).

4.6. MEDİA ALANI KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası media alanının karşılaştırmasında; Grup A'ın ortalama media alanı (1.247.468, 6 ± 416.935, 44 µm2) Grup BK'nın ortalama media alanına

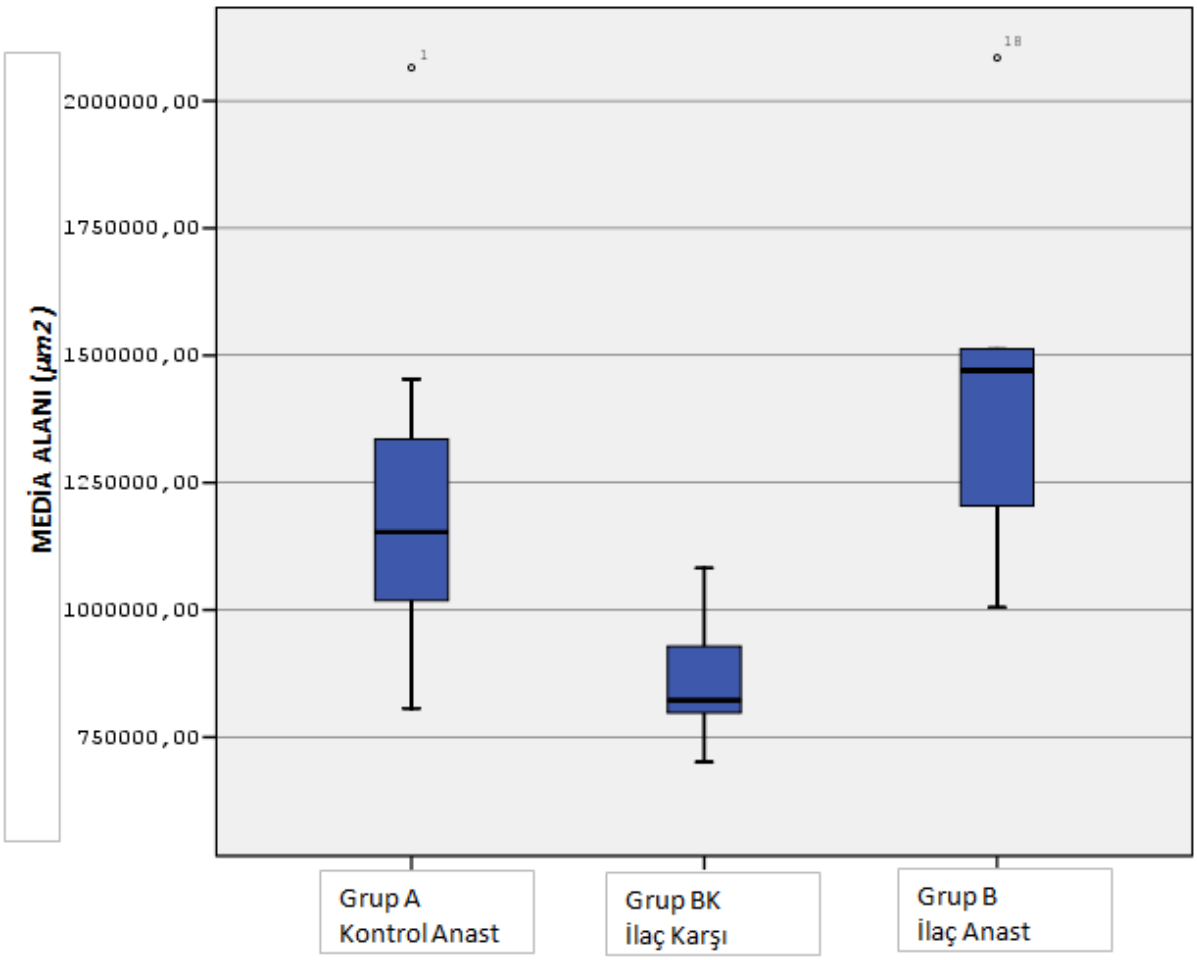
(865.164, 16 ± 127.984, 06 μm2) oranla daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p = 0.018).

Grup A'ın ortalama media alanı (1.247.468, 6 ± 416.935, 44 μm2) Grup B'nin ortalama media alanına (1.457.935, 03 ± 364.970, 15 μm2) oranla daha az bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p = 0.153).

Grup B'nin ortalama media alanı (1.457.935, 03 ± 364.970, 15 μm2) Grup BK'nin ortalama media alanına (865.164, 16 ± 127.984, 06 μm2) oranla daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p =0.004).

Anastomoz Yapılmayan Kontrol Grupları		Anastomoz Grupları		
Grup	*Ortalama media alanı (μm2) ± SE*	Grup	*Ortalama media alanı (μm2) ± SE*	
Grup BK	865.164, 16 ± 127.984, 06	GrupA	1.247.468, 6 ± 416.935, 44	(p=0.018)
		Grup B	1.457.935, 03 ± 364.970, 15	(p=0.004)

Tablo 4.6. Ortalama media alanının kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.6. Ortalama media alanının karşılaştırılması. Grup A; Tikagrelor almayan anastomoz yapılan grup(kontrol anast), Grup B; 21 gün Tikagrelor alan anastomoz yapılan grup(ilaç anast), Grup BK; 21 gün Tikagrelor alan anastomoz yapılmayan karşı taraf grup(ilaç karşı).

5. TARTIŞMA

Tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinde rekonstrüksiyon oldukça sık kullanılan girişimlerden biridir. Günümüzde bu girişimlerin başarısı, spontan tromboz gelişimi veya stenoz oluşumu nedeni ile beklenenden daha azdır [1, 4]. Vasküler rekonstrüktif girişimlerden sonra akut trombüs oluşumunun önemli bir rol oynadığı ani tıkanmanın tersine, geç dönemdeki daralma veya restenozda düz kas hücre migrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks birikimi sonucu oluşan neointimal hiperplazi önemli rol oynamaktadır [1, 4]. Hiperplazik intimal kalınlaşma, arterlerin hemodinamik strese karşı normal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel hasarın iyileşmesinin de karakteristik bir özelliğidir [2]. Birçok cerrahi girişim normal vasküler yapıyı bozar. Şişirilmiş bir balon embolektomi kateterinin damar boyunca çekilmesi, endotelyal yüzeyde soyulmaya, damar duvarında gerilmeye ve mediada bazı düz kas hücrelerinin hasarına yol açar [1].

Endarterektomi, PTCA, vasküler bypass-greft anastomoz bölgelerinde görülen intimal hiperplazi, vasküler rekonstrüktif girişimlerin uzun sürede yetersiz hale gelmesinde en önemli etkenlerden biridir [4]. Hiperplastik yanıtın engellenmesi bypass greftlerinde ve balon anjiyoplasti uygulamalarında; damarın açık kalma süresinin belirgin olarak uzatılmasını, organ kayıplarının azaltılmasını sağlayabilir ve yaşam süresinin artırılmasında doğrudan etkili olabilir [4]. İki yıl içinde otolog safen ven greftlerle yapılan femoropopliteal bypasslarda %30, sentetik greftlerle yapılan bypasslarda %40–50, periferik arterlerin anjioplastisinden sonra da %20–50 oranında tıkanma meydana gelebilir [19].

Arter duvarında iki tip hasar meydana gelebilir. Birincisi arterin diseksiyonu, sütürasyonu, endarterektomisi, trombektomisi ve luminal anjioplastisi sonrası meydana gelen mekanik hasardır.

İkicisi ise arteriel olmayan yapıların implantasyonu sonrası görülür (sentetik greftler, otolog ven greftleri, stentler).

Her arteriyel rekonstrüksiyon işlemi bir miktar endotel hasarına neden olmaktadır. Bu hasarın en yaygın nedeni greftin çıkarılma işlemi ve anastomoz sırasında çeşitli derecede travmatize olmasıdır. Endotel hasarına intimanın yanıtı subendotelyal fibroproliferasyon ve neointima oluşması şeklindedir. Bu intimal neoplastik yanıt travma sonrası damar onarımının bir parçası olmakla beraber, bazı durumlarda gereğinden şiddetli olabilmektedir. Aşırı neointima proliferasyonu, endotelin antikoagülan özelliğinde bozulma, lümende daralma sonucu, kan akımı azalmakta ve bazı vakalarda trombozis oluşabilmektedir.

Arteriyel hasara intimal yanıt üç aşamada oluşur. İlk 24 saat içindeki reaksiyon mediada düz kas hücre proliferasyonudur. Endotel hasarı ile birlikte trombositler damar duvarına yapışmakta ve giderek çoğalmaktadır. Damar duvarına yapışan aktive olmuş trombositlerden büyüme faktörleri gibi mitogenler salgılanmakta bu da düz kas hücrelerinin intimaya migrasyonuna neden olmaktadır. İkinci aşama 3-14 gün sonra başlar ve böylece neointima şekillenir. Neointima bir kez oluşunca düz kas hücrelerinin hızla ve lümeni daraltacak bir tabaka oluşturması ise 3. aşamada olur [22, 23].

Arteryel hasar oluştuktan sonra, bu bölge trombositlerle kaplanır. Adhezyon sonrası trombositler granüllerindeki vazoaktif ve trombotik faktörleri (serotonin, ADP, fibrinojen, von Willebrand faktör) ve ayrıca büyüme faktörlerini (trombosit kaynaklı büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, Epidermal büyüme faktör) salgılar [5]. Mitojenik özellikteki büyüme faktörleri düz kas hücre proliferasyonunu başlatırlar. Hasara cevap olarak media tabakasında çoğalmaya başlayan düz kas hücreleri, intimaya göç ederek intimal hiperplaziye neden olurlar. İntimal kalınlaşmayı başlatan mekanizma, hasar gören damar duvarına yapışan

aktive trombositlerden ve endotel hücrelerinden salınan, düz kas hücreleri proliferasyonunu uyaran büyüme faktörleridir [5].

Düz kas hücresinin büyümesini damar duvarında ya da dolaşımda bulunan bir grup otokrin ve parakrin faktörler ve basınç gibi fiziksel kuvvetler stimule eder. Normal damarda NO, Adenozin gibi büyüme inhibitörleri, PDGF, FGF, insülin benzeri büyüme faktörü, TGF beta, anjiotensin 2, ve endotelin gibi büyüme faktörleri bir denge halindedir. Bu dengenin bozulması düz kas hücre proliferasyonuna neden olur. Düz kas hücrelerinin anormal büyümesinin, büyüme faktörleri üretiminde artma veya inhibitörlerin azalması sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir. İntimal hiperplazinin birinci basamağı düz kas hücre proliferasyonu, ikinci basamağı ise prolifere olan düz kas hücrelerinin intimaya göçüdür [22].

Bugüne kadar anastomoz sonrası, PTCA veya stent sonrasında; intimal hiperplazinin ve düz kas hücre proliferasyonunun engellemesi üzerine birçok ilaç denenmiş ve çalışma yapılmıştır. Bu amaçla büyüme faktörü inhibitörleri, selektif A2a adenozin reseptör agonistleri, immunsupresif ilaçlar, kalsiyum kanal blokerleri, statinler, aspirin, iloprost, heparinler, pentoksifilin,silostazol, ACE inhibitörleri başta olmak üzere çeşitli ilaçlar denenmiştir [20].

Tikagrelor, tineopiridin grubu (klopidogrel vb) antiplatelet ajanlara göre yeni bir kimyasal sınıf olan siklopentyl-triazolo-primidin grubunun ilk oral kullanımda olan ilacıdır. P2Y12 (ADP reseptörü) antagonistidir. Antiplatelet, vazodilatatör ve antitrombotik etkilidir. Adenozin difosfat (ADP); platelet aggregasyonunda önemli role sahip P2Y1 ve P2Y12 platelet hücre yüzey reseptörlerini aktive eder[31].

Grzegorz GrzeVk ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 14 adet Wistar ratları 4 grupta incelenmiş (n=7), tikagrelor (10mg/kg) ve/veya ASA (2 veya 10 mg/kg) veya plasebo

(n=9) cerrahi öncesi 12. ve 2. Saatlerde verilmiştir. ADP ve fenilefrin ile indüklenmiş damar kontraksiyonları,pompa ile arttırılmış perfüzyon basıncıyla birlikte ölçülmüştür. Yüksek doz ASA+ Tikagrelorun rat arteryal vasküler düz kas hücrelerinde,2-MES-ADP ile indüklenmiş kontraksiyonu, hem endotelize hem de endotelize olmayan arterlerde inhibe ettiği izlenmiştir. Düşük doz ASA grubunda ise endotelizasyonu sürdürülebilen arterlerde bu durumun söz konusu olduğu izlenmiştir[34].

F . Guenther ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 16 adet 11 haftalık erkek C57BL/6 vahşi tip fareye (n=4) 4 grup olacak şekilde 1. Gruba Enoksaparin Sodyum (4mg/kg) cerrahiden 2 saat önce, 2. Gruba normal Salin (100µg/kg) solüsyonu sc cerrahiden 2 saat önce, 3.Gruba Tikagrelor peroral (100mg/kg) cerrahiden 18 ve 6 saat önce iki kez, 4. Gruba (P2Y12 reseptör defekte olan fare grubu) herhangi bir şey uygulanmamıştır. Hayvanlara 37 C derecede laparatomi uygulanmış, VCI'a ulaşılmış ve %10luk FeCl3 5 dakika boyunca direkt olarak infrarenal VCI'a enjekte edilmiş ve daha sonra 15-25 dakika içinde her grupta oluşan non okluzıv trombosit içerikli trombüs çapları USG altında incelenmiştir. 25. Dakika sonunda trombüs çapı Enoksaparin grubunda (0, 3 ±0, 1 mm2), tikagrelor grubunda (0, 5 ± 0, 1 mm2) ve P2Y12 reseptör defektli grupta (0, 4 ± 0, 1 mm2), Normal Salin verilen (Sham grubu) gruba göre (2, 00±0, 3 mm2) belirgin daha küçük izlenmiştir. Bu da Tikagrelor ve P2Y12 reseptörlerinin erken DVT oluşum sürecinde çok önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir [35].

J. J. J. van Giezen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 24 adet Beagle cinsi köpek(n=8) 3 grup olacak şekilde ayrılıp, sağ safen arterleri kan basıncı kaydı ve sağ juguler venleri CVP ölçüm amaçlı kateterize edildi. LAD ve CX intrakoroner infüzyon kanülü invivo yerleştirildi. Tikagrelor (210µg/kg bolus+ 30 µg/kg/dakika infüzyon) , dipiridamol (10 µg/kg bolus+ 0, 17 µg/kg/dakika), ve salin (kontrol) grubu artan dozlarda verildikten sonra LAD'nin 1 dakika iskemik bırakılmasının ardından, 10 dakika dinlenme sonrası 5 dakika boyunca 15 ve 30

µg/kg/dakika adenozin 2 dozda verildi. Tikagrelor dozu max. P2Y12 inhibisyonu olacak şekilde uygulandı.Tikagrelorun adenozin uptake'ini doz bağımlı inhibe ettiği ve adenozin ile indüklenen doz bağımlı koroner flow arttırıcı etkisi gösterildi[36].

Grzegorz Grze'sk ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada da winstar cinsi ratlarda fenilefrin, vazopressin, 2-mes-ADP ile kasılması indüklenen kuyruk arteriyel vasküler düz kas hücrelerinin kontraksiyonunda, ne klopidogrel ne de prasugrelin tikagrelor kadar etkili kontraksiyon inhibasyonu yapmadığı izlendi[37].

Biz de Tikagrelorun anastomoz sonrası intimal hiperplaziye etkisini araştırdık. Balon anjioplasti sonrası damarda soyulmaya bağlı sadece intima tabakasında hasar meydana gelmektedir. Anastomoz sonrası damarın intima, media ve intimal hiperplaziye olan katkısı genellikle göz ardı edilen adventisya tabakası dahil damarın tüm katları etkilenmektedir. Bizim çalışma modelimizin hem vasküler rekonstrüksiyon sonrası görülen intimal hiperplaziye benzerliği, hem de anastomoz sonrası damarın tüm katlarının etkileniyor olmasından dolayı balon ile oluşturulan hasar modeline göre daha üstün olduğu kanısındayız. Yaptığımız bu çalışmanın sonucunda tikagrelorun izlenen olumlu etkilerinin, cerrahi uygulanmış hastalarda da oluşturacak olduğu olumlu etkiler açısından benzer bir model olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Tikagreloru anastomoz sonrası 21 gün boyunca peroral olarak uyguladık.

Çalışmamızın sonucunda lümen çapı olarak; anastomoz yapılan ve Tikagrelor alan Grup B'deki ortalama lümen çapının anastomoz yapılan ve Tikagrelor almayan Grup A'dakinden daha geniş olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Anastomoz yapılmayan ve ilaç verilen karşı taraf karotis arterlerinin alındığı Grup BK ile Grup B'nin değerlendirmelerinde Grup BK daki Lümen çapının Grup B dekinden daha geniş olduğu tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.Buradan tikagrelorun, intimal kalınlığı

anastomoz yapılan ve ilaç alan tarafta ilaç almayan gruba göre bir miktar daha fazla azaltarak lümen çapını arttırdığı sonucu çıkabilir.

Grup B deki ortalama lümen alanının, A Grubundaki ortalama lümen alanına göre artmış olduğu görüldü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Grup BK daki lümen alanının Grup B dekinden daha az olduğu izlendi ancak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. Burada Tikagrelorun damar lümen çapını kısmen arttırdığı ve lümende kısmen genişleme yaptığı söylenebilir.

Lümen alanlarının karşılaştırılmasında, Grup BK daki ortalama lümen alanının Grup B dekine göre rakamsal olarak daha fazla çıkması beklenirken , daha düşük çıkmasını tavşan karotid arterlerinin çaplarının farklı olmasına bağlı olabileceği kanısındayız.

Grup B deki ortalama intima kalınlığı, Grup A daki ortalama intima kalınlığına oranla daha az bulunmuş olup ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.Grup BK daki ortalama intima kalınlığı ise Grup B ye göre daha fazla olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Grup B deki ortalama media alanı, Grup A daki ortalama media alanına oranla daha fazla bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.Grup BK daki ortalama media alanı ise Grup A ve B dekine göre daha az saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

Grup B deki ortalama media alanının Grup A dakine göre daha az olması beklenirken daha fazla çıkmasının nedeni olarak ilaç almayan gruptaki(Grup A) intimal hiperplazinin düz kas

hücre proliferasyonuna oranla daha fazla olabileceği ve media tabakasını baskılayabileceği düşünülebilir. (Tablo ve grafik 4.6.)

Grup B deki ortalama media kalınlığı, Grup A dakine göre daha fazla bulunmuştur. Bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve bunun nedeni olarak ilaç almayan gruptaki(Grup A) intimal hiperplazinin düz kas hücre proliferasyonuna oranla daha fazla olabileceği ve media tabakasını baskılayabileceği düşünülebilir.(Tablo ve grafik 4.4.)Grup BK daki ortalama media kalınlığı Grup B dekine göre daha az saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Grup B deki ortalama lümen+media alanı toplamı Grup A dakine göre daha fazla bulunmuştur. Bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.Grup BK daki ortalama lümen+media alanı toplamı Grup B dekine göre daha az saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Tikagrelorun rat arteryal vasküler düz kas hücrelerinde , 2-MES-ADP ile indüklenmiş kontraksiyonu hem endotelize hem de endotelize olmayan arterlerde inhibe etmesine benzer şekilde,lümen çapı ve lümen alanındaki genişleme, intima kalınlığındaki azalma ile vazodilatasyon yapıcı etkisi bizim çalışmamızda da paralellik göstermiştir.

Tikagrelor, köpeklerde adenozin ile indüklenen doz bağımlı koroner flow arttırıcı etkisinde gösterildiği gibi vazodilatatördür.Farelerde de trombosit agregasyonu inhibisyonu yoluyla erken DVT gelişimini önlediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.Bu iki çalışmanın vazodilatasyon ve trombosit agregasyonunu inhibe edici etkisine paralel olarak bizim çalışmamızda da tikagrelor verdiğimiz grupların lümen çaplarında diğer gruplara göre bir miktar

artış bulunmuştur. Bunun sadece intima üzerindeki etkilerinden değil vazodilatasyon yapıcı etkisinden de kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Özetle tikagrelorun neointimal hiperplaziyi trombosit aggregasyonunu azaltarak vazodilatasyon regülasyonu üzerinden ve intimadaki düz kas proliferasyonunu inhibe ederek önlediğini düşünmekteyiz.Çalışmamızdan çıkan sonuçlar doğrultusunda gerçek klinik izlemde çok daha uzun süre tikagrelor kullanımı gerektiğinden,zaman bir sınırlama oluşturmuş olabilir. Yapısal bir değişikliği oluşturacak kadar uzun sürede tikagrelor kullanımı sağlanarak hayvan deneylerinin tekrarlamasının doğru olacağı kanısındayız. Bunun yanısıra insanlardaki kullanımında ilacın alımının öncesi ve sonrasında noninvaziv olarak carotis intima kalınlıklarının ölçülmesinin de faydalı olabiliceği kanısındayız. Vasküler girişimlerden sonra meydana gelen intimal hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesinde rakamsal olarak her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmasa da vasküler sistem üzerinde oluşturduğu olumlu etkiler (lümen çapında ve lümen alanında artma, intima kalınlığında azalma vb.) düşünüldüğünde yararlı bir ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Clowes, A., Pathologic intimal hyperplasia as a response to vascular injury and reconstruction. Rutherford RB, ed. Vascular Surgery, 1995: p. 285-93.

2. Pauleto P, Sartore S, Pessina AC. Smooth muscle proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. Clin Sci. 1994: (87): p.467–479.

3. Schwartz RS. Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia and/or remodeling. Am J Cardiol. 1998 : (81): p.14–17..

4.Galt G, Z.Z., Differential response of arteries and vein grafts to blood flow reduction. J Vasc Surg, 1993. 17(3): p. 563-570.

5. Donohoe., S., Myointimal thickening in experimental vein grafts is dependent on wall tension. J Vasc Surg 1992. 15(1): p. 176-186.

6. Jung Eun Kim, Jin Young Sung, Chang-Hoon. Cilostazol Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Reactive Oxygen Species Production through Activation of AMP-activated Protein Kinase Induced by Heme Oxygenase-1Korean PhysioPharmacol. 2011 August; 15(4): 203–210.

7 . Gartner, L., Hiatt James, L. , Circulatuar system. Color Textbook of Histology, 2001. second edition: p. 251-270.

8. Ross, M., Circulatuar system. Circulatuar system In; Ross MH. Histology A Text and Atlas., 1995. Third edition(Williams& Wilkins Maryland): p. 302-314.

9. Cones, M., Connective Tissue and stains. In; Bancroft J.D, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques, 2002. Fifth edition(Churchill Livingstone Toronto): p. 125-163.

10. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 1980.288(5789):p. 373-6.

11. Panza, J.A., et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. N Engl J Med, 1990. 323(1): p. 22-7.

12. Kilbourn, R.G., et al. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. Biochem Biophys Res Commun, 1990. 172(3): p. 1132-8.

13. Michiels, C., Endothelial cell functions. J Cell Physiol, 2003. 196(3): p. 430-43.

14. Shirk, R.A., F.C. Church, and W.D. Wagner, Arterial smooth muscle cell heparan sulfate proteoglycans accelerate thrombin inhibition by heparin cofactor II. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. 16(9): p. 1138-46.

15. Shalaby, F., et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature, 1995. 376(6535): p. 62-6. 60

16. Schiffrin, E.L. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. Am J Hypertens, 2001. 14(6 Pt 2): p. 83S-89S.

17. DeSouza, C.A., et al. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. Circulation, 2000. 102(12): p. 1351-7.

18. Verhaar, M.C., et al. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia. A randomized placebo-controlled trial. Circulation, 1999. 100(4): p. 335-8.

19. Zubilewicz, T., et al. Injury in vascular surgery--the intimal hyperplastic response. Med Sci Monit, 2001. 7(2): p. 316-24.

20. Doğan., D.E., *N.* İntimal hiperplazi nedenleri, önleme ve tedavi yöntemleri. Kalp ve damar cerrahisi, 2004. I.baskı(İstanbul, Çapa tıp kitapevi): 2004: p.639-647.

21. Takahashi, A., et al. Tranilast inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia by induction of p21(waf1/cip1/sdi1) and p53. Circ Res, 1999. 84(5): p. 543-50.

22. Peyot, M.L., et al. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor. Circ Res, 2000. 86(1): p. 76-85.

23. Dubey, R.K., et al. Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A2b receptor. Hypertension, 1996. 27(3 Pt 2): p. 786-93.

24. De Meyer, G.R. and H. Bult, Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. Vasc Med, 1997. 2(3): p. 179-89.

25. More, R.S., et al. A time sequence of vessel wall changes in an experimental model of angioplasty. J Pathol, 1994. 172(3): p. 287-92.

26. Zou, Y., et al. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. Am J Pathol, 1998. 153(4): p. 1301-10.

27. Mattsson E., et al. Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1997.17: p.2245–2249 61

28. Tiwari, A., et al. Improving the patency of vascular bypass grafts: the role of suture materials and surgical techniques on reducing anastomotic compliance mismatch. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2003. 25(4): p. 287-95.

29. Mason, R.A., et al. The early and late responses of the arterial wall to graft placement. J Surg Res, 1989. 47(5): p. 383-8.

30. Schachner T. Pharmacologic inhibition of vein graft neointimal hyperplasia. JThorac Cardiovasc Surg. 2006.131(5): p.1065-72.

31.Goel D. Ticagrelor:The first approved reversible oral antiplatelet agent. Int J Appl Basic Med Res, 2013 Jan;3(1):19-21

32.Juneja S, Gupta K, Kaushal S.Ticagrelor: An emerging oral antiplatelet agent. J Pharmacol Pharmacother, 2013 Jan;4(1):78-80.

33.Nilsen D.W.T.Potential benefits of ticagrelor beyond platelet inhibition. Cardiology, 2013;125:31–33

34.GrzeVk G, Kozinski M, Tantry U, Wicinski M, Fabiszak F, Navarese E, Grzesk E, Jeong Y, Gurbel P, Kubica J. High-Dose, but not low-dose, aspirin impairs anticontractile effect of

ticagrelor following ADP stimulation in rat tail artery smooth muscle cells. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International , Volume 2013; Article ID 928271: 8 pages

35.Guenther F, Herr N, Mauler M, Witsch T, Roming F, Hein L, Boeynaems J.-M, Robaye B, Idzko M, Bode C, von Zur Muhlen C, Duerschmied D. Contrast ultrasound for the quantification of deep vein thrombosis in living mice: effects of enoxaparin and P2Y12 receptor inhibition. J Thromb Haemost 2013; 11: 1154–62.

36.Giezen J.J.J, Sidaway J, Glaves P, Kirk I, Björkman J. Ticagrelor inhibits adenosine uptake in vitro and enhances adenosine-mediated hyperemia responses in a canine model.J.Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 2012; 17(2) :164-172.

37.Grzesk G , Kozinski M, Navarese E, Krzyzanowski M, Grzesk E , Kubica A, Matula J , Castriota F, Kubica J. Ticagrelor, but not clopidogrel and prasugrel, prevents ADP-induced vascular smooth muscle cell contraction: A placebo-controlled study in rats. Thrombosis Research, 2012;130: 65–69