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

TAVŞAN KAROTİD ARTERLERİNDE YAPILAN ANASTOMOZLARDA HİPERKOLESTEROLEMİNİN İNTİMAL HİPERPLAZİ VE ENDOTELYAL PROLİFERASYON ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR.NURSEL ÇAKIR TAHTA

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

TAVŞAN KAROTİD ARTERLERİNDE YAPILAN ANASTOMOZLARDA HİPERKOLESTEROLEMİNİN İNTİMAL HİPERPLAZİ VE ENDOTELYAL PROLİFERASYON ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR.NURSEL ÇAKIR TAHTA

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ:E.ERDEM SİLİSTRELİ

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan hocalarım Sayın Prof. Dr. Öztekin Oto, Sayın Prof. Dr. Eyüp Hazan, Sayın Prof. Dr. Baran Uğurlu, Sayın Prof. Dr. O. Nejat Sarıosmanoğlu, Sayın Prof. Dr. Hüdai Çatalyürek, Sayın Prof. Dr. Özalp Karabay, Sayın Prof.Cenk Erdal, Sayın Prof.Dr. S.Kıvanç Metin ve ayrıca tezimi yöneten, tezimin gerçekleşmesinde büyük emeği olan Sayın hocam Prof. Dr. E.ErdemSilistreli'ye,

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

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 esirgemeyenaileme;

Asistanlık hayatım boyunca ona ayırabildiğim kısıtlı zamana rağmen;sonsuz sevgi ve desteklerini benden hiç esirgemeyen, hayatı paylaştığım biricik eşim İlker Tahta ve canım çocuklarım Halil Efe ve Yiğit'ime

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 …….. 12

1.3. VASKÜLER ENDOTEL ……. 17

1.4. KOLESTEROL ……. 29

2. MATERYAL VE METOD …….. 35

2.1. ÇALIŞMA PLANI ……. 35

2.2. DENEY PROTOKOLÜ ……. 37

2.3. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME …… 40

2.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM …….. 42

3. BULGULAR ……. 42

3.1. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME ……. 42

4. SONUÇLAR ……. 46

4.1. LÜMEN ÇAPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI …… 46

4.2. LÜMEN ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ……. 48

4.3. İNTİMA ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ……. 50

4.4. MEDİA ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ……52

4.5. İNTİMA KALINLIĞI ORANININ KARŞILAŞTIRILMASI …… 55

5. TARTIŞMA ..…… 57

KAYNAKLAR ..…… 60

TABLO VE ŞEKİL DİZİNİ

TABLO SAYFA

1.1. Endotel hücresinde sentezlenen ve salgılanan biyoaktif maddeler 20

1.2. Kontrol ve kolesterol gruplarının istatistiksel analizi 45

1.3 Grupların deney öncesi lipid profilleri 36

1.4. Grup B tavşanların 8 haftalık kolesterol diyeti sonrası lipid profilleri 37

4.1. Ortalama Lümen Çaplarının Kontrol Grupları ile Karşılaştırması 46

4.2. Ortalama Lümen Alanının Kontrol Grupları ile Karşılaştırması 49

4.3. Ortalama İntima Alanının Kontrol Grupları ile Karşılaştırması 50

4.4. Ortalama Media Alanının Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 53

4.5. Ortalama İntima Kalınlığının Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 54

ŞEKİL

1.1. Damarın genel histolojik yapısı 15

1.2. Damar duvarının histolojik kesitinin mikroskobik görünümü 15

1.3. Damar endotelyum hücre iskeleti 19

1.4. Kolesterolün kimyasal yapısı 29

1.5. Sağlıklı ve aterosklerotik damar duvarının histolojik kesitinin ışık mikroskobik görünümü 41

RESİM VE GRAFİK DİZİNİ

RESİM

SAYFA

2.1. Tavşan kulak arkası marginalvenindenbranül takılması 38

2.2. Tavşan sağ karotis arterinin eksplorasyonu 38

2.3. Karotis arterinin anastomoz öncesi buldog klemple oklüde edilmesi 39

2.4. Karotis arterinin transekte edilmiş görünümü 39

2.5. Karotis arterin anastomoz edilmesi 40

3.1. Kontrol grubuna ait HE boyaması 43

3.2. Kontrol grubuna ait HE boyaması 44

3.3. Kontrol grubuna ait HE boyaması 48

3.4. Kolesterol grubuna ait HE boyaması 52

3.5. Kolesterol grubuna ait HE boyaması 56

GRAFİK

4.1. Ortalama lümen çaplarının karşılaştırılması 47

4.2. Ortalama lümen alanlarının karşılaştırılması 49

4.3. Ortalama intima alanlarının karşılaştırılması 51

4.4. Ortalama media alanlarının karşılaştırılması 53

4.5. İntima kalınlığı oranın karşılaştırılması 55

4.6. Ortalama intima alanı/media alanı karşılaştırması 57

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

PAS **:** Periyodik asit shift

EDRF **:** Endotel kaynaklı gevşetici faktör

PGI2 **:** Prostosiklin

PAF **:** Trombosit aktive edici faktör

PAI **:** Plazminojen aktivatör inhibitörü

TTPAI **:** Ekstrinsik sistem inhibitörü

t-PA **:** Doku plazminojen aktivatörü

H + E **:** Hemotoksilen Eozin

TGF-P **:** Dönüştürücü büyüme faktör P

IL **:** İnterlökin

VSMC **:** Damar düz kas hücresi

LDL **:**Düşük dansiteli lipoprotein

NO **:** Nitrik oksit

NOS **:** Nitrik oksit sentetaz

MMP **:** Matriks metalloproteinaz

PTFE **:** Politetrafloretilen

XDH **:** Ksantin dehidrogenaz

XO **:** Ksantin oksidaz

O_2^- **:** Süperoksit

H_2O_2 **:** Hidrojen peroksit

LTB_4 **:** Lökotrien B_4

HOCl **:** Hipokloroz asit

MPO **:** Miyeloperoksidaz

PLA_2 **:** Fosfolipaz A_2

AA **:** Araşidonik asit

COX **:** Siklooksijenaz

PG **:** Prostoglandin

TX **:** Tromboksan

VCAM-1 **:** Vascular cell adhesion molecule

PF_4 **:** Trombosit-factor-4

SOD **:** Süperoksit dismutaz

ROS **:** Reaktif oksijen ürünleri

$ONOO^-$ **:** Peroksinitrit

MIP-2 **:** Makrofaj inflamatuar protein 2

MCP-1 **:** Monosit kemoattraktan protein 1

TNF-α **:** Tumor Necrosis Factor- α

ET-1 **:** Endotelin-1

NMDA **:** N-methyl-D-aspartate

cGMP **:** Siklik gunaozin monofosfat

AT1 **:** Anjiotensin I reseptör alttipi

RAS **:** Renin-Anjiotensin Sistemi

NFκB **:** Nuclear factor κB

NADH **:** Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NADPH **:** Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

ICAM-1 **:** Intercellular adhesion molecule-1

Tw **:** Shear stres

Ahr **:** Aril hidrokarbon reseptörü

µm **:** Mikrometre

$µm^2$ **:** Mikrometre kare

ÖZET:

Tavşan karotid arterinde yapılan anastomozlardahiperkolesterolemininintimalhiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması.

Nursel Çakır Tahta Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir.

Amaç: İntimalhiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonu, vasküler girişim sonrası meydana gelen restenozda önemli rol alır. Tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinderekonstruksiyonişlemlerinde başarı şansı stenoz oluşumu nedeni ile beklenenden daha azdır.(1,2). Vaskülerrekonstruktif girişimlerden sonra akut trombüs oluşumunun önemli bir roloynadığı ani tıkanmanın tersine, geç dönemdeki daralma veya restenozda düz kas hücremigrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellülermatriks birikimi sonucu oluşan neointimalhiperplazi önemli rol oynamaktadır (1,3,5).Bu sebepten ötürü biz de, tavşanlarda karotisarterinde yapılan anastomozdahiperkolesterolemininintimalhiperplazi ve düz kas hücreproliferasyonu üzerine etkisini araştırdık.

Materyal ve Metod: Çalışmamızdarandomizeolarak seçilen ortalama 2-3 kg ağırlığında 14adet 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 polipropilensütür kullanılarak tek tek sütür tekniği ile anastomoz yapıldı. Grup A (7 adet) tavşanlar standart tavşan yemi ile beslendiler.

Grup B (7 adet) tavşanlar toplam 8 hafta süresince(anastomoz öncesi 4 hafta,anastomoz sonrası 4 hafta) %2'lik hiperkolesterolemi(900gr yem,20gr kolesterol,30gr zeytinyağı) diyeti ile beslendiler.Tüm gruplardaki tavşanlardan deneyin başlangıcında ve Grup B'deki tavşanlardan 8 haftalık kolesterol diyeti sonunda venöz kan örnekleri alınarak DEÜ Hastanesi Biyokimya laboratuarındalipid profilleri(LDL,HDL,TRİGLİSERİD,TOTAL KOLESTEROL DÜZEYLERİ) incelendi.Tüm gruplardaki tavşanlar 28. günün sonunda anastomoz yapılan karotid arter segmentiçıkartılarak incelenmek üzere histoloji laboratuarına gönderildi.Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopisinde incelendi. Ayrıca elde edilen görüntüler digital görüntü analiz programı ile incelenerek lümen çapı, lümen alanı,intimal alan, medial alan ve intima-media alanı oranı hesaplanarak sonuçlar değerlendirildi. Hazırlanan parafin dokulardan seri kesitler alındı. Bu seri kesitler fotoğraflanarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

Bulgular: Yapılan seri kesitlerde lümen çapı açısından Grup B'nin ortalama intima kalınlığı Grup A'ın ortalama intima kalınlığından daha fazla bulunmuş ve bu da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmıştır (p= 0.006). İntima alanı açısından değerlendirildiğinde Grup B'nin ortalama intima alanı Grup A'dan daha geniş bulunmuş olup bu da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmıştır (p=0.009). Seri kesitler lümen çapı,lümen alanı,media alanı ve media kalınlığı açısından da değerlendirilmiş olup her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç: Hiperkolesterolemi tedavisinin, vasküler girişimlerden sonra meydana gelen intimalhiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesinde etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceğidir.

Anahtar Kelimeler: Hiperkolesterolemi, İntimalhiperplazi, düz kas hücre proliferasyonu, anastomoz, tavşan

SUMMARY:

Conclusion: The **Theaim of thisstudy is toassesseffect of hypercholesterolemiaon intimalhyperplasiaandsmoothmusclecellproliferation at theanastomosis site performed inrabbitcarotidartery.**

Nursel Çakır Tahta , Department of CardiovasculerSurgery, School of Medicine,Dokuz EylulUniversity, Izmir, Turkey

Objective: Intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation play an important role on the restenosis after the vascular interventions. The success of reconstruction is under expecteations because of restenosis in the obstructing artery diseases. Recently, the success ofthese kind of interventions are under expectations because of spontaneous thrombosis orrestenosis. After vascular reconstructive interventions unlikely the acute obstruction in which acute thrombosis is important at the late stage intimal hyperplasia caused by smooth muscle cell migration, proliferation and extracellular matrix deposition play an important role in narrowing or restenosis. We assess the effect of hypercholesterolemia on intimal hyperplasia and smooth muscle cellproliferation 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.The rabbits in these groups were fed standard rabbit chow.Group B (7) rabbits a total of 8 weeks(4 weeks prior to anastomosis, anastomosis after 4 weeks) were fed a 2% hypercholesterolemia diet(900gr bait,20gr cholesterol,30gr olive oil).At the beginning of the experiment in all groups of rabbits and rabbits in Group B at the end of the 8-week dietary cholesterol venous blood samples in the laboratory of Dokuz Eylul University Hospital Biochemistry lipid profile (LDL, HDL, triglycerides and total cholesterol levels) were examined. At the end of the day 28 the anostomosis performed carotid artery segments of all 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 area, medial area

and intima-media area ratio were estimated and results were evaluated. Serial cross-sections taken from paraffin tissues were photographed and transferred to computer environment.

Findings: In the serial sections the average ıntımal thickness of group B was found higher than the group A and this difference was statically significant between group B and group A. The area of intima of group B was found higher than the group A and this difference was significant between group B and group A. When the section series were evaluated for luminal diameter,luminal area,medial area and medial thickness and no statistical significance was observed.

treatment of Hypercholesterolemia, intimal hyperplasia occurring after vascular interventions and in the inhibition of smooth muscle cell proliferation could be used as an effective treatment.

Key words: Hypercholesterolemia, intimal hyperplasia, smooth muscle cell proliferation, anastomosis, rabbit.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vasküler rekonstrüktif girişimlerden sonra geç dönemdeki daralma veya restenozda; düz kas hücre migrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks birikimi sonucu oluşan neointimal hiperplazi önemli rol oynamaktadır (1,2).

İntimal hiperplazi; intimal alanda düz kas hücresi ve ekstrasellüler matriks birikimidir.Vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu restenoz gelişimi ve ateroskleroz oluşumunda öncü rol oynar (1,2,3).

Bypass greftleme, tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinde sık kullanılan girişimlerdir. Bu tarz girişimlerin başarısı, spontan tromboz gelişimi veya stenoz oluşumu nedeni ile beklenenden daha azdır (1,2,3). Damar yaralanması patolojik tamir ve remodelinge neden olur, bu da düz kas hücre migrasyonu ve proliferasyonu sonucu olarak neointimal hiperplazi olarak sonuçlanır (2,3,4). Yaralanan kan damarında patolojik tamirde endotel hücre kaybı majör katkısı olan faktördür (3,4,5). Sonuç olan neointimal hiperplazi anjioplasti, stent ve bypass greftleme gibi revaskülarizasyon işlemleri sonrası restenozun patolojik temelidir (3,4). Hayvan ve insanlarda yapılan arteryel hasar modellerinde lümen daralmasının temel nedeninin intimadaki düz kas hücre proliferasyonu ve konnektif doku birikiminin olduğu gösterilmiştir (6).

Vasküler endotelial hasar sonrası, damar duvarında trombosit adezyonu görülür.Trombosit, makrofaj ve aktive endotel hücreleri tarafından salınan birçok vazoaktif ve trombotik faktörler(Serotonin,ADP,Fibrinojen,von Wiilebrand Faktör) ve büyüme faktörleri (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, Dönüştürücü büyüme faktörü, Epidermal büyüme faktörü)vasküler düz kas hücrelerinin invivo ve invitro proliferasyonunu sağlar. Mitojenik özellikteki büyüme faktörleri düz kas hücre proliferasyonunu başlatırlar. Media tabakasındaki prolifere olan düz kas hücreleri intimaya göç ederler ve proliferasyona devam ederler.

İntimal kompartmanda vasküler düz kas hücresi proliferasyonu, extrasellüler matriks sentezi ve depolanması sonucunda restenoza neden olan intimal kalınlaşma meydana gelir.

Russel Ross tarafından öne sürülen ve halen yaygın kabul gören yaralanmaya cevap (response-to-injury) hipotezine göre de intimal kalınlaşmayı başlatan mekanizma, hasar gören damar duvarına yapışan aktive trombositlerden ve endotel hücrelerinden salınan, düz kas hücreleri proliferasyonunu uyaran büyüme faktörleridir (7).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hızlanmış aterosklerozda,restenoz benzeri apoptotik aktivite tespit edilmiştir.Hiperkolesterolemi'nin ,vasküler yaralanma sonrası hem proliferatif ve apoptotik aktiviteyi etkileyebileceği görülmüştür. Sonuç olarak, hiperkolesterolemi'nin neointimal hiperplazi gelişimini hızlandırdığı saptanmıştır(8).Biz de buradan yola çıkarak hiperkolesteroleminin;tavşan karotis arterinde yapılan anastomozlarda intimal 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 μm genişliğinde 25-50 μm uzunluğundadır. Hücreler birbirlerine sıkı bağlantılarla ve gap-junctionlarla bağlanır ve bariyer oluşturur. Bol pinositotik vezikülleri vardır. Endotel hücrelerinde 0,1 μm çapında ve 3 μm uzunluğunda Weibel-Palade Cisimcikleri(vonwillebrand 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 laminabulunur. Laminalar arasında pencere adı verilen açıklıklar bulunur. Elastik membranlararasında 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 (11).

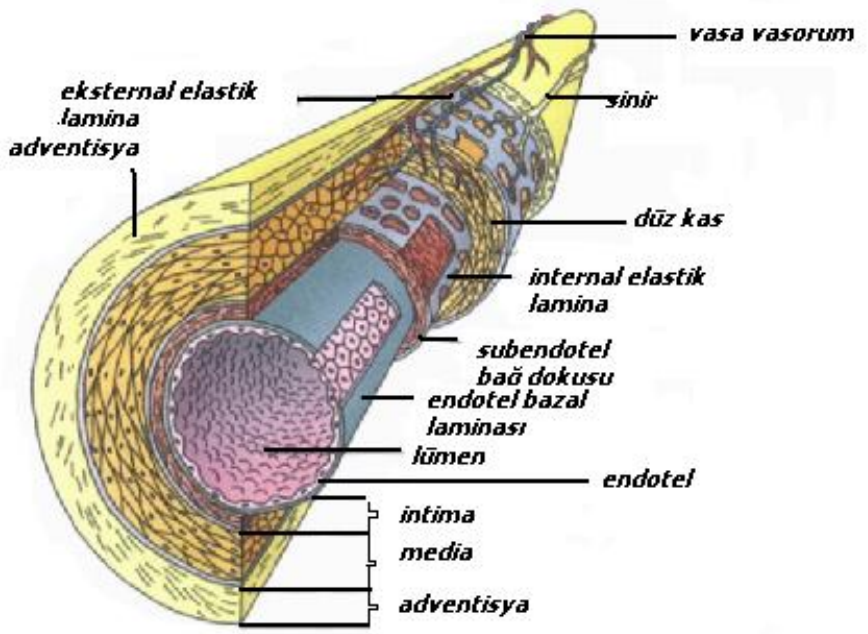
Tunika media: Başlıca düz kas hücrelerinden oluşur. Düz kas hücreleri iç organ duvarındaki düz kaslardan daha küçüktür. İntimaya bakan yüzdeki birkaç düz kas bantılongitidünal seyirlidir. Küçük muskuler arterlerde 3-4 tabaka düz kas varken büyük muskuler arterlerde 40 tabaka konsantrik yerleşimli düz 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 (9).

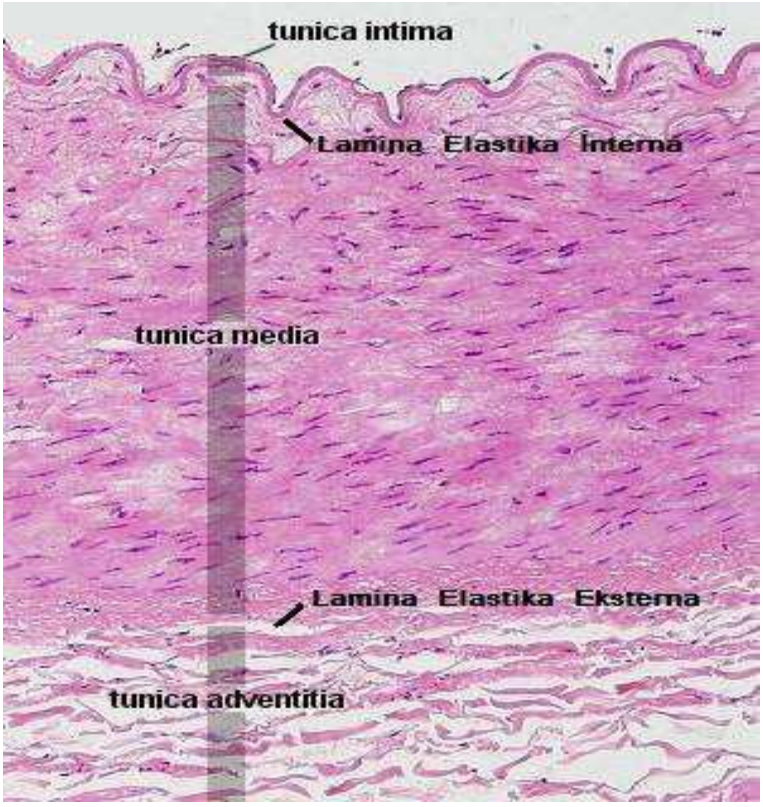
Tunika adventisya: Bağ dokusu fibrilleri, fibroblastlar, yağ hücreleri, vaso vasorumlar, lenfatik damarlar, miyelinsiz sinir sonlanmaları yer alır. Sinir sonlanmalarından salınan nörotransmiterler dış elastik membranın pencerelerinden geçerek mediaya gelerek üstteki bazı düz kas hücrelerini depolarize 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 (9).

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 (9,10).



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[12,13]:

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 (13,14).

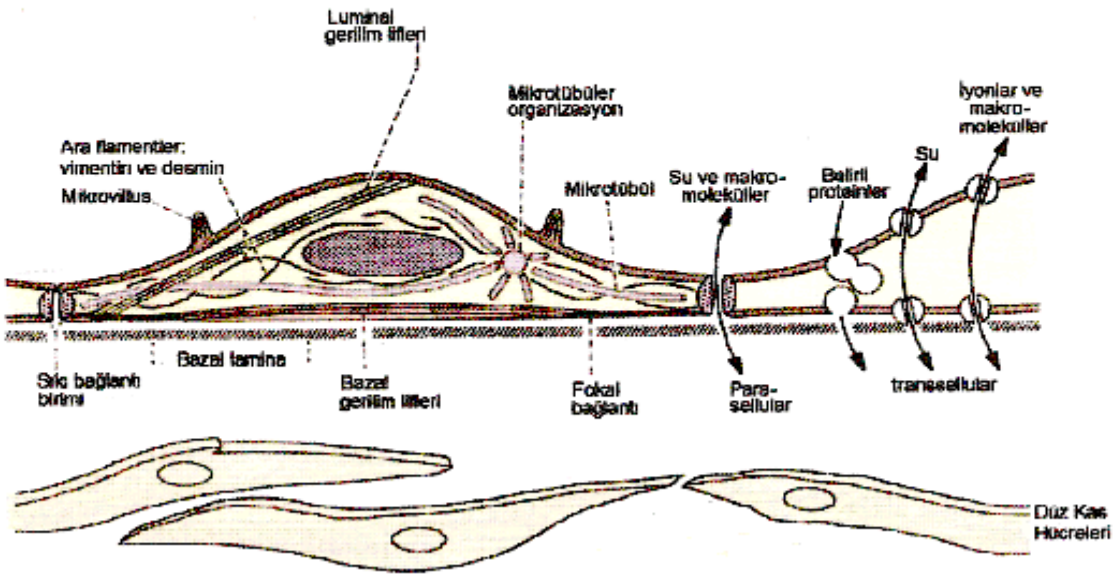
Büyük arterleri, venleri, kapilleri ve lenf yüzeyini döşeyen endotel hücrelerinde önemli yapısal ve işlevsel farklılıklar olmasına karşın temel fonksiyonları benzerlik göstermektedir. Bu hücrelerin vasküler lümene ve düz kas dokusuna bakan yüzeyleri de birbirinden farklıdır. Lümene bakan yüzeyleri, ince bir proteoglikan (dermatansülfat, heparansülfat, heparin)

tabaka oluşturur. Endotel hücreleri tarafından sentez edilen bu proteoglikanlar antitrombotik yüzeyi oluşturmaktadır (15).

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 intimal düz kas hücrelerinin, mediadaki sirküler düz kas hücrelerine dik ve endotel hücreleri ile aynı yönde uzandığını ortaya koymuştur (12,15). 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 (Mikrotubules)
- 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 (16,17).



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 (18).

Endotelyum hücre fonksyonlarını beş bölüm altında özetleyebiliriz (15);

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.)(19,20).

Tablo 1.1. Endotel hücresinde sentezlenen ve salgılanan biyoaktif maddeler.

VAZOAKTİF PROTEİNLER	BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE STOKİNLER
• Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör [(EDRF (NO)] • Endotelin • Proktasiklin (PGI_2)	• Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) • Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör • Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) • İnterlökin 1, 6, 8 • Trombosit Büyüme Faktörü (TGF)
PROKOAGÜLANLAR	**ANTİTOMBOTİK VE ANTİKOAGÜLAN FAKTÖRLER**
• Plazminojen Aktivatör İnhibitörü (PAI) (PAI, PAI_2, PAI_3 ve Proteaz Neksin) • Fibronektin • F IX Bağlayıcı Protein • F V ve F XII Aktivatörü	• Doku Plasminojen 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) (21).

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 (22).

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 hücreleri ile hızla ve lümeni daraltacak bir tabaka oluşması ise 3. aşamada olur (23,24).

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(23).

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 (25).

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 intimal kalınlaşmayı 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 intimal hiperplazi kontrolünde önemli olduğunu göstermektedir (21).

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 (26).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 intimal kalınlaşma oluştuğunu rapor etmişlerdir. Ekstrasellüler matriks birikimine bağlı olarak 1. ayda intimal kalınlaşmanın maksimum seviyeye ulaştığı ve 3 ay içinde azalma olduğu tespit edilmiştir (27). 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 intimal kalınlaşma göstererek lümeni yaklaşık %25 daraltırlar. Bu nadiren belirgin stenoza neden olur. Fakat intimal hiperplazi ileride greftte ateroma oluşmasına neden olur. Venöz bypasslarda intimal hiperplazinin esas nedeni hemodinamik stresdir. Greftin venöz yoldan arteryel yola geçisinde (arteryalizasyonda) adaptasyon mekanizması ile intimal kalınlaşma oluşur. Ven greftleri yeniden venöz yola dönerse oluşan değişikliklerde gerilme meydana gelir. Bu remodilig sırasında TGF-alfa salınımı artmaktadır (22).

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 intimal kalınlaşma 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 (28).

1.3.5. Sentetik greftlerde intimal 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 intimal hiperplazi kalınlığı azalır (29). 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 intimal kitle; düz kas hücreleri ortadan kalkması ve ekstrasellüler matriksin lizise uğraması nedeniyle azalır.

Yapılan çalışmalarda prostetik greft kullanılan olgularda otolog ven kullanılanlara göre intimal hiperplazi gelişme oranı daha yüksek bulunmuştur. Arter duvarı ve greftin mekaniksel özellikleri arasındaki farkların anastomozdaki intimal 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 intimal hiperplazi oluşum oranının azaldığı gösterilmiştir (30,31).

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 intimal 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 çap 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 intimal hiperplaziyi başlatacaktır. Sonuç olarak; arterlerin adaptif cevapları:

♦ Lümen çapının shear stres regülasyonu.

*Shear stres azalmış ise intimal 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 intimal hiperplazi olur (29,31).

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 matriks de (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

aktivatörlerolan;doku plazminojen aktivatör (tPA) ve ürokinaz düz kas hücrelerini prolifere ederlerken, ayni zamanda PDGF ve FGF plasminojen aktivatörlerini aktive ederek intimal kalınlaşmayı da artırırlar. tPA üretiminde azalma kalınlaşmayı geriletir. Metalloproteinaz ise;migrasyonu artırmaktadır. Böylece proteolitik ve antiproteolitik dengeninn endotel tarafından kontrolü intimal 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 intimal 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 intimal 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 intimal 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 intimal hiperplazidir. Tanjansiyal (tensile) stresi azaltmak için ven greftleri eksternal olarak rijit sentetik greftlerle desteklenirse intimal 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) intimal kalınlaşmayı uyarır. Shear stresteki artış damar endotelinde NO sentazın uyarılması ile arter duvarında siklik guanosinemonofosfatı (cGMP) arttrarak NO oluşumunu arttırır. Sonuç olarak NO'nun artması ile aşağıdaki olaylar gelişir: (29).

♦ 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 (29). Sonuç olarak neointimal hiperplaziyi önlemede kullanılan farmakolojik yaklaşımları yukarıdaki bilgiler ışığında aşağıda sıralanan temel mekanizmalar üzerinden özetleyebiliriz (32) .

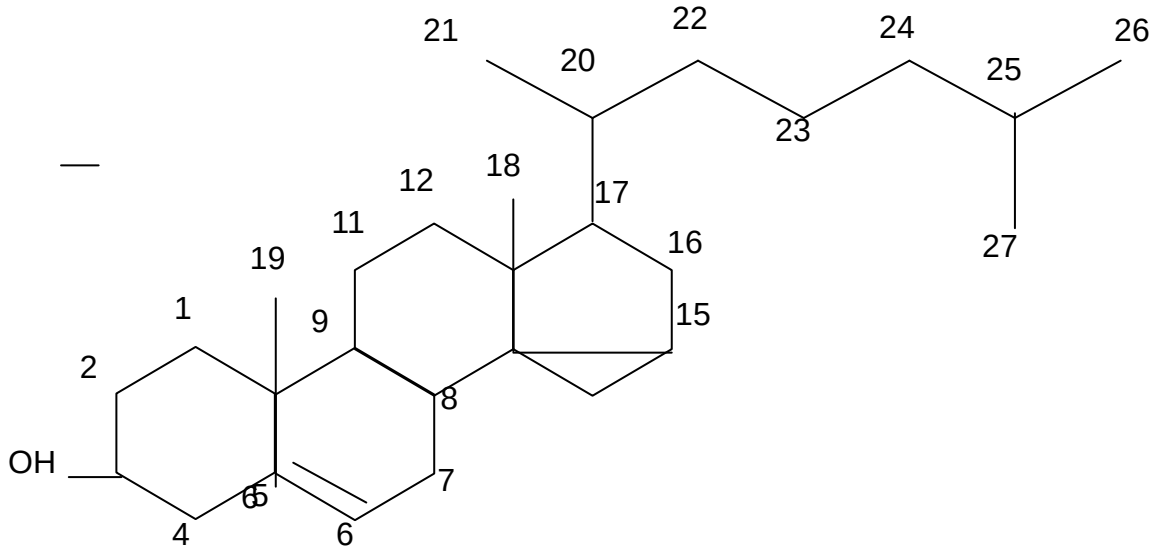
1. Reaktif oksijen ürünleri
2. Nitrik oksit ve prostasiklin
3. Endotelin
4. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
5. Angiotensin
6. Matriks metallaproteinazlar
7. Kalsiyum
8. G proteinleri
9. Mitojen aktive eden proteinkinazlar

1.4.HİPERKOLESTEROLEMİ

1.4.1.Kolesterolün Farmakokinetiği

Kolesterol amfipatik bir lipiddir .Vücuttaki kolesterolün yarıdan fazlası sentezle, geri kalanı ise ortalama bir diyetten sağlanır. İnsanda total sentezin %10'u KC'de ,diğer %10'u da barsaklarda gerçekleşmektedir.KC; vücudun kolesterol dengesinin düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir.

Steroidler perhidrosiklopentanofenantren halka sisteminin deriveleridir. 4 halkadan oluşur, halkalardan 3'ü 6 C'lu, 1 tanesi 5 C'ludur. Steroller steroidlerin bir sınıfı olup, C3'de bir OH grubu, C17'de 8-10 C'lu bir hidrokarbon yan zincir içerirler. Kolesterol insandaki başlıca steroldür.



Şekil1.4. Kolesterolün kimyasal yapısı

Kolesterol biyosentezi 6 evreye bölünebilir:

1-Asetil KoA'nın HMG KoA'ya çevrilmesi

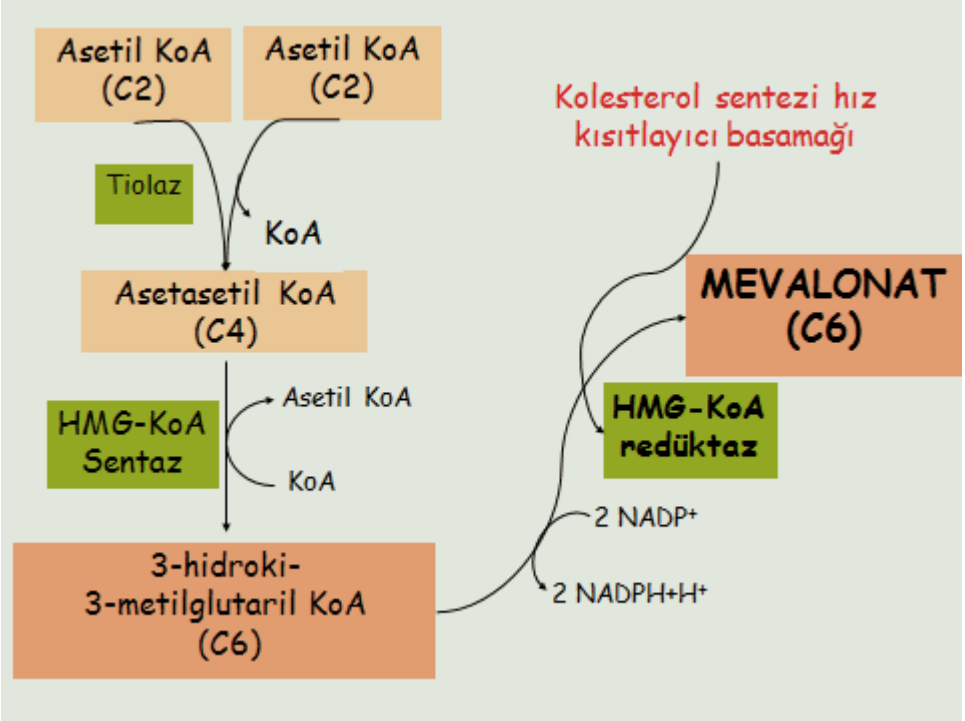
2-6 C'lu bir bileşik olan mevalonatın HMG KoA'dan sentezlenmesi (NADPH kullanılır) (Hız kısıtlayıcı basamaktır).

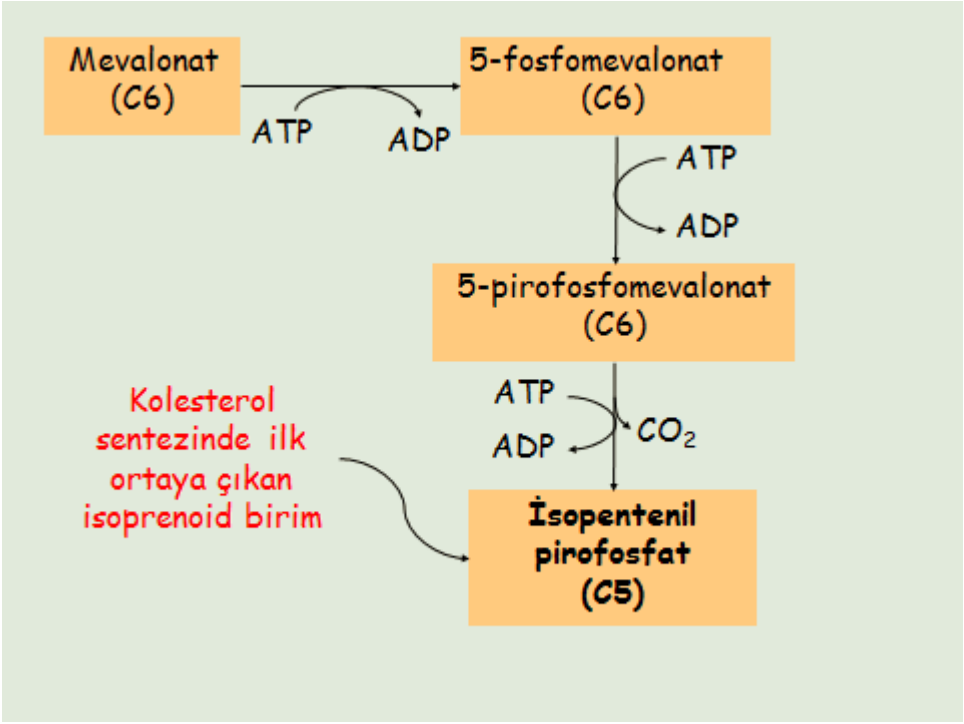
3-Mevalonattan CO2 kaybedilmesi ile izoprenoid birimlerin (isopentenil pirofosfat) oluşumu (Mg, ATP kullanılır).

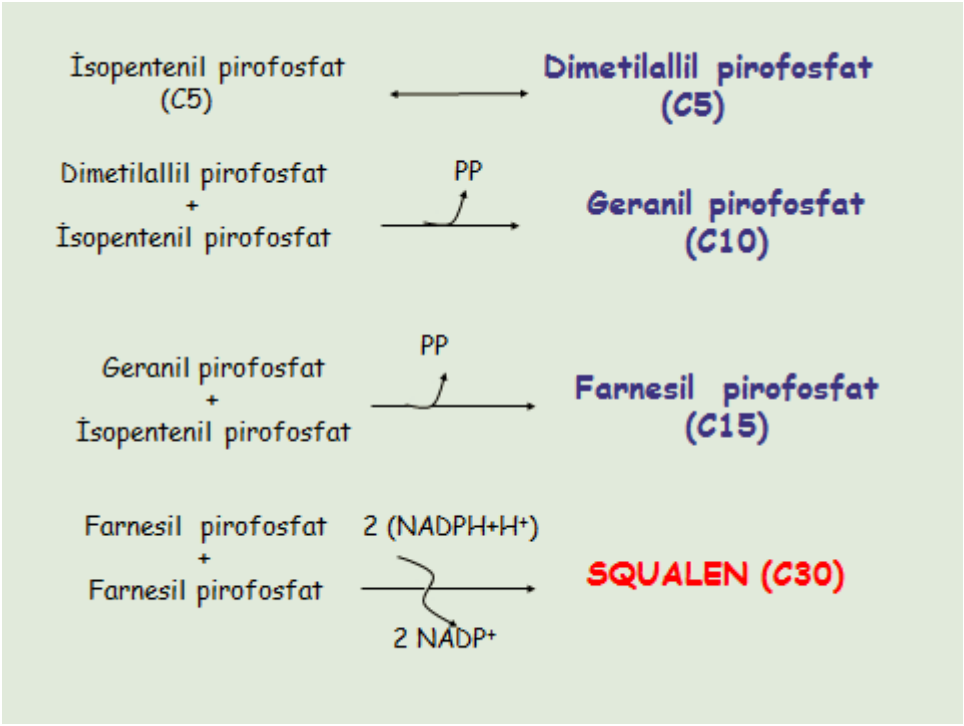
4-Altı tane izoprenoid birimin bir ara ürün olan skualen yapmak üzere kondansasyona uğraması.

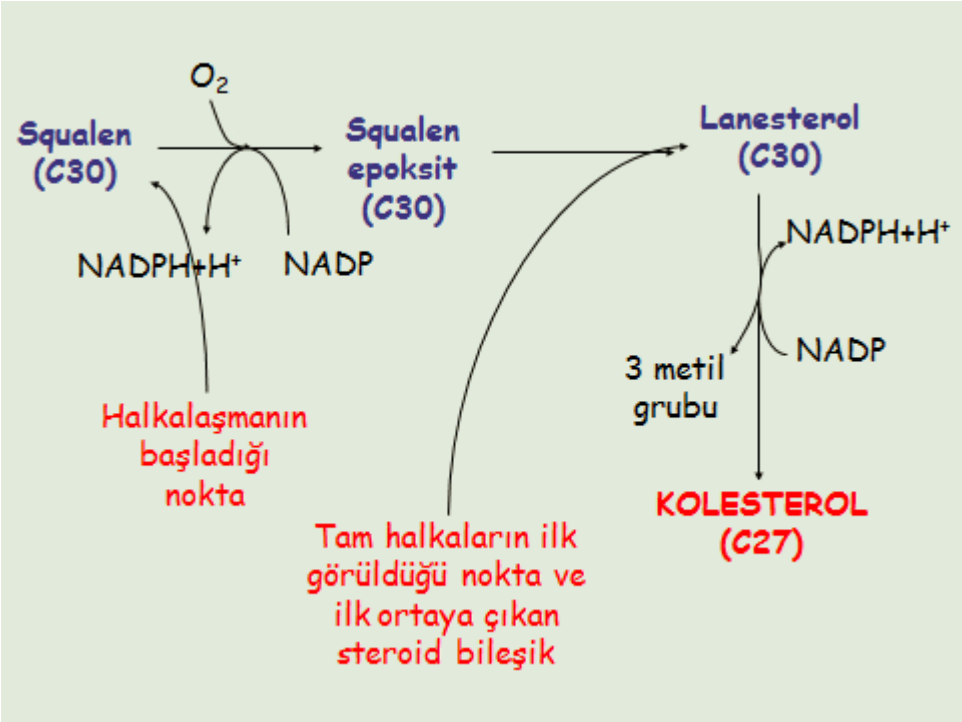
5-Skualen, ata steroid olan lanosterole çevrilmesi (NADPH,FADH2 ve O2 kullanılır ve lanesterol kolesterol sentezinde ilk ortaya çıkan steroid bileşiktir).

6-Lanosterolün üç metil grubunun yitirilmesi dahil daha ileri bir çok basamaktan geçmesiyle kolesterolün oluşması (NADPH kullanılır).




Mevalonat
(C6)
ATP
ADP
5-fosfomevalonat
(C6)
ATP
ADP
5-pirofosfomevalonat
(C6)
ATP
ADP
CO_2
Kolesterol sentezinde ilk ortaya çıkan isoprenoid birim
İsopentenil pirofosfat
(C5)


İsopentenil pirofosfat
(C5)
Dimetilallil pirofosfat
(C5)
Dimetilallil pirofosfat
+
İsopentenil pirofosfat
PP
Geranil pirofosfat
(C10)
Geranil pirofosfat
+
İsopentenil pirofosfat
PP
Farnesil pirofosfat
(C15)
Farnesil pirofosfat
+
Farnesil pirofosfat
2 (NADPH+H+)
2 NADP+
SQUALEN (C30)



Plazmadaki kolesterolün 2/3'ü yağ asitleriyle esterleşmiştir, 1/3'ü serbest haldedir.Serum total kolesterolünün genel olarak 200 mg/dL'den düşük olması aterosklerotik kalp hastalığı için düşük riski, 200-240 mg/dL arasında olması orta riski, 250 mg/dL'den yüksek olması yüksek riski ifade eder.Yağlı diyet kolesterol emilimini artırır.Serum LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeylerindeki değişmeler, aterosklerotik kalp hastalığı riski bakımından serum total kolesterol düzeylerinden önemlidir.

1.4.2.Hiperkolesteroleminin Endotelyal Sistem Üzerine Etkileri :

Ateroskleroz ; modern toplumlarda mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir. Ateroskleroz; geniş çaplı arterlerde damar duvarlarına lipid birikimi, inflamatuar hücrelerde artış ve neointima ve fibrotik plak oluşumu ile seyreden ilerleyici bir hastalıktır(34).

Ateroskleroz Amerikan Kalp Derneği (AHA) tarafından sınıflandırılmıştır:

Tip 0: intimal kalınlaşma yok

Tip1:okside lipid amlacıkları içeren makrofajların (köpükhücreleri)izole edildiği plak oluşumları

Tip 2:yağlı çizgilenme;sudan 3 boyama ile ciddi derecede belirgin lipid içeren köpük ve düz kas hücreleri

Tip 3: preaterom :lipid içeren köpük hücreleri ve düz kas hücre sayısında ciddi artış

Tip 4:aterom ;tek büyük bir lipid çekirdeği olan proteoglikandan zengin bir tabak ile çevrilmiş lezyon

Tip 5a: fibroaterom ;ciddi kollajen birikimi ile karakterize fibrotik aterom plağı

Tip 5 b: kalsifiye plak ;ciddi kalsifikasyonlar içeren fibrotik aterom plağı

Tip 5 c :fibrotik plak ;lipid çekirdeği olmayan sadece fibrozisin olduğu plak

Tip 6 a ;yaygın hemoraji

Tip 6 b:tromboz

Neredeyse 100 yıl önce Ignatowski; süt, et ve yumurta içeren diyetlerin ateroskleroza yol açtığını göstermiştir.1913 yılında Anitschkow veChalatov diyetin en aterojenik bileşenininkolesterol oduğunu göstermiştir.Bugün hala onların öncü deneylerinin ışığında deneysel hiperkolesterolemi modeli geliştirmede tavşanlar kullanılmaktadır.

Tavşanlarınçeşitli karakteristik özellikleri onu insan ateroskleroz araştırmalarında mükemmel bir model yapar.

Tavşanların içerdiği apolipoprotein B içeriği kimyasal komponenti açısından insanlardaki ile çok benzerdir.Tavşan karaciğeri apoB mRNA üretemez fakat;insan karaciğer tarafından üretilen VLDL içeren apoB-100 üretir.

Ateroskleroz sürecinde merkezi bir rol oynayan kolesterol ester transfer proteini hem insan hem de tavşan kanında yüksek oranlarda saptanır.Tavşanlarda lezyon morfolojisi;diyete kolesterol ilavesine çok duyarlıdır(34).

İskemik kalp hastalığı olan hastalarda koroner anjioplasti sonrası başarılı sonuç sağlamak için çözülmesi gereken en önemli sorunlardan biri anjioplasti sonrası restenoz gelişimini önlemektir. Restenozun ana nedenlerinden biri neointimal ve medial hiperplazi olarak bilinir.

Hızlanmış aterosklerozda,restenoz benzeri apoptotik aktivite tespit edilmiştir.Apoptotik odaklar daha ziyade restenotik lezyonlarda saptanmıştır.Apopitoz'un vasküler yaralanmaya önemli bir yanıt olduğu bir gerçektir.Vasküler yaralanma sonrası apopitozu tetikleyen mekanizmalar arasında p53 gen expresyonu,oksidatif stres sayılabilir.

P53;aterosklerotik lezyonlarda rapor edilmiştir.İnsan aterosklerotik plak düz kas hücrelerinde meydana gelen apoptosiste en önemli faktör olduğu saptanmıştır. P53 ekspresyonunun balon hasarından hemen sonra belirgin olduğu ve daha sonra vasküler hücrelerin proliferasyonu ile azaldığı görülmüştür.Hiperkolesterolemi ile erken dönemde mediada p53 expreyonunda değişiklik olmadığı görülmüştür.Daha sonraki aşamada düşük seviyelerde p53 sekresyonunun arttığı görülmüştür(33).

Hiperkolesterolemi ile birlikte oksidatif strese neden olan pek çok üründen en iyi bilineni;düşük-yoğunluklu lipoprotein(LDL)'dir.Hiperkolesterolemi,vasküler yaralanma sonrası hem proliferatif ve apoptotik aktiviteyi etkileyebilir(33).

Hiperkolesterolemi yaralanma sonrası erken dönemdeki apoptosisi etkileyemez ama daha sonraki evrede gelişen apoptosis ve proliferasyonu etkileyebileceği saptanmıştır.Hiperkolesterolemi'nin proliferasyon üzerine olan etkisi daha fazla olduğu için bu da medial ve neointimal hiperplazi olarak sonuçlanır(33).

Vasküler yaralanma sonrası apoptotik aktivitenin iki bileşenden oluştuğu saptanmıştır; yaralanma ile ilişkili erken dönenmde görülen masif apoptosis ve geç dönemdeki proliferasyonla bağlantılı olan düşük seviyeli apoptosis.
Medya içinde en yüksek apoptotik aktivitenin 1.günolduğu gözlemlenmiştir.Bu erken dönemde görülen masif apoptosise mekanik yaralanmanın neden olduğu saptanmıştır.Hiperkolesteroleminin erken medial apoptozise etkisinin olmadığı ve proliferasyonla ilşkili olarak 7 ile 14.günler arasında meydana gelen geç apoptosisi etkilediği saptanmıştır.Hiperkolesteroleminin tavşanlarda geç apoptosis'ten sorumlu en önemli faktör

olan makrofaj infitrasyonunu arttırarak neointimal hiperplazi gelişimini arttırdığı saptanmıştır (33).

İntimal hiperplazi ve ateroskleroz benzer bulgular içerir. Her iki patolojide görev alan hücreler; vasküler düz kas hüsreleri, endotelyel hücreler, lipid yüklü makrofajlar, trombositler, aktive edilmiş T-lenfositlerdir. Her ikisinde de mekanizma hem inflamatuar yolaklar hem de otokrin ve parakrin sistemler tarafından yürütülmektedir.Her iki patolojide de endotel hücreleri temel rol aynar.Hiperkolesterolemi ve mekanik yaralanma intimal hiperplazi üzerinde sinerjistik etkilere sahiptir(35).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. ÇALIŞMA PLANI:

Randomize, kontrollü, deneysel bir araştırma olan çalışmamıza; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 16.12.2011 tarihinde 75/2013 protokol numarası ile izin alındıktan sonra başlanmış ve deney hayvanları laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda randomize olarak seçilen, ortalama 2-3kg 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.

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 arterikullanıldı. 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 buldogklemple 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 sekiz hafta süresince(anastomoz öncesi 4 hafta ve anastomoz sonrası 4 hafta) %2'lik hiperkolesterolemi diyeti uygulandı(36). (Diyet; her 900 gr yem için 20gr kolesterol ve 30 gr zeytinyağı içermektedir.Diet için kullanılmış olan kolesterol preparatı Darmstadt/Almanya-Applichem biochemica firması vasıtası ile temin edilmiştir).Yirmisekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ taraf karotid arter segmenti çıkarılarak incelenmek üzere histoloji laboratuvarına gönderildi.Yüksek doz pentotal ile hayvanların yaşamına son verildi.Tüm gruplardaki tavşanlardan deneyin başlangıcında ve Grup B'deki tavşanlardan 8 haftalık kolesterol diyeti sonunda venöz kan örnekleri alınarak DEÜ Hastanesi Biyokimya laboratuarındalipid profilleri(LDL,HDL,TRİGLİSERİD,TOTAL KOLESTEROL DÜZEYLERİ) incelendi(36).

Sütun1	TOTAL KOLESTEROL	TRİGLİSERİD	HDL	LDL
Grup A1	66	352	21	20
A2	57	239	15	18
A3	71	107	35	15
A4	65	266	23	11
A5	57	286	22	13
A6	57	140	27	2
A7	45	192	21	9
Grup B1	67	130	28	13
B2	73	99	36	17
B3	50	160	20	9
B4	71	103	37	13
B5	65	278	21	17
B6	78	118	31	23
B7	81	78	45	20

Tablo 1.3. Grupların deney öncesi lipid profilleri

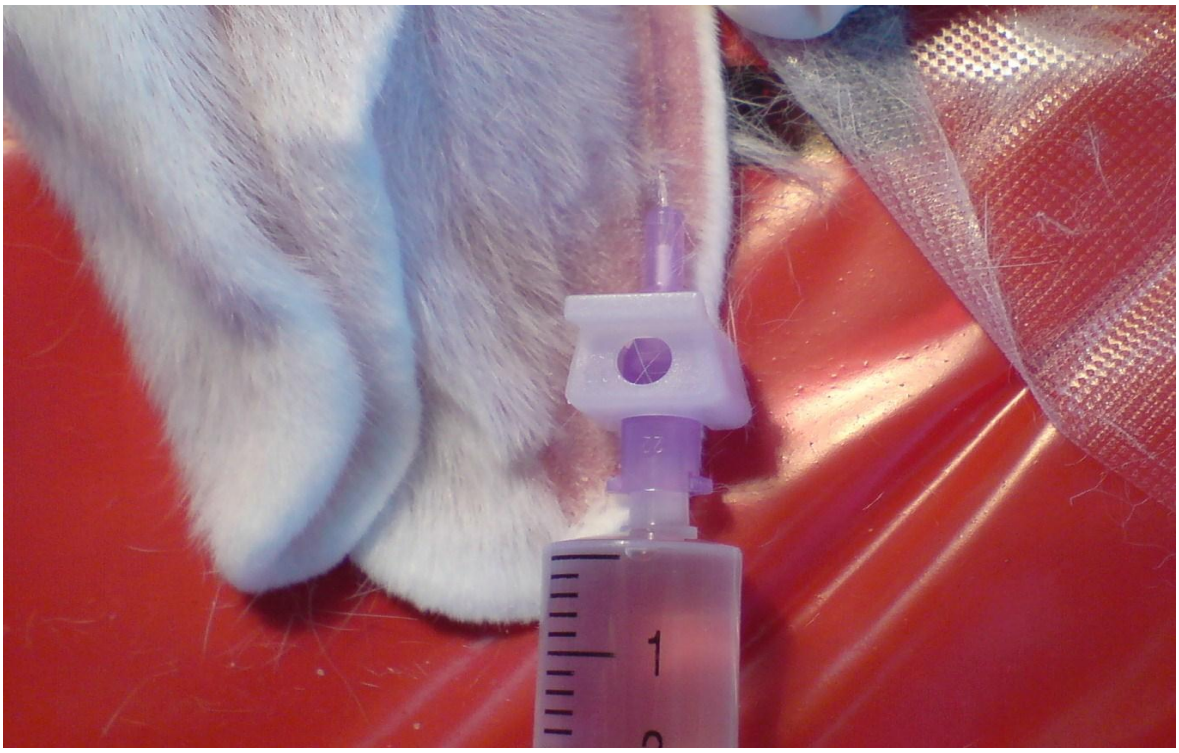
Sütun1	TOTAL KOLESTEROL	TRİGLİSERİD	HDL	LDL
Grup B1	1235	201	135	1060
B2	1061	113	112	926
B3	1319	397	152	1026
B4	1341	234	147	1147
B5	1178	213	141	994
B6	1061	94	129	913
B7	1228	170	162	1032

Tablo 1.4. Grup B tavşanların 8 haftalık kolesterol diyeti sonrası lipid profilleri

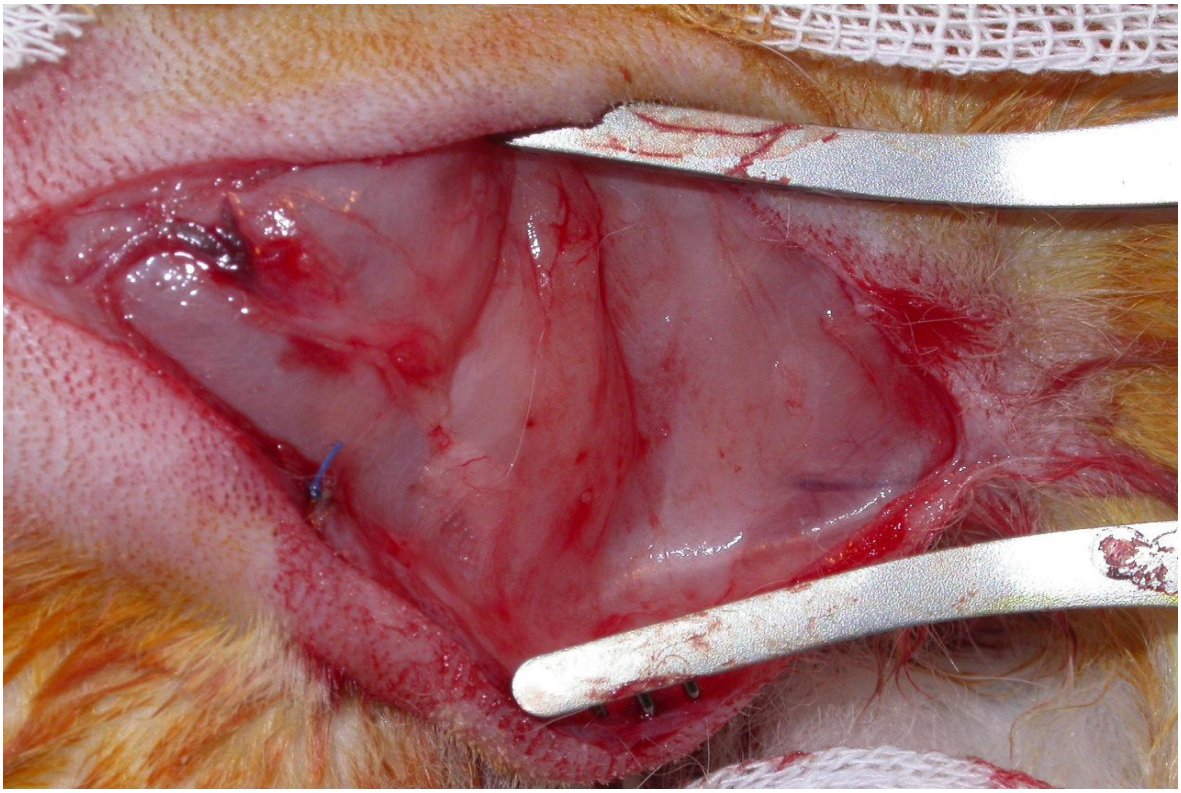
2.2. DENEY PROTOKOLÜ:

Grup A: Tavşanlar kontrol grubunu oluşturdu. Herhangi bir ilaç ve ya diet uygulaması yapılmadı.Tavşanlar standart tavşan yemi ile beslendiler.Yirmisekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ taraf karotid segmenti çıkarılarak histoloji laboratuvarına gönderildi.

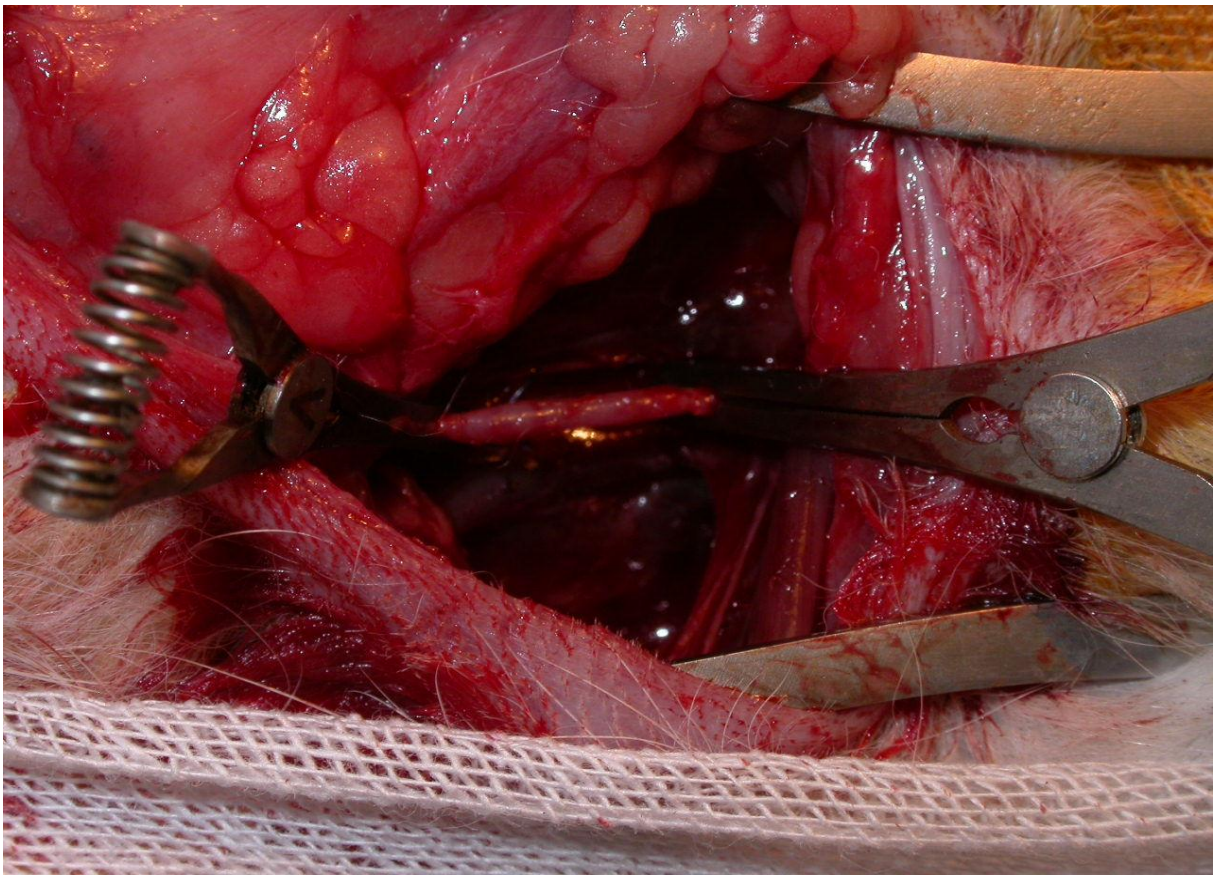
Grup B: Grup A ile aynı protokol uygulandı. Farklı olaraktavşanlara anostomoz öncesi ve anostomoz sonrası 4 hafta , toplam sekiz hafta süresince %2'lik hiperkolesterolemi diyeti uygulandı.Anostomoz sonrası yirmisekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ taraf karotid arter segmenti çıkarılarak histoloji laboratuvarına gönderildi.



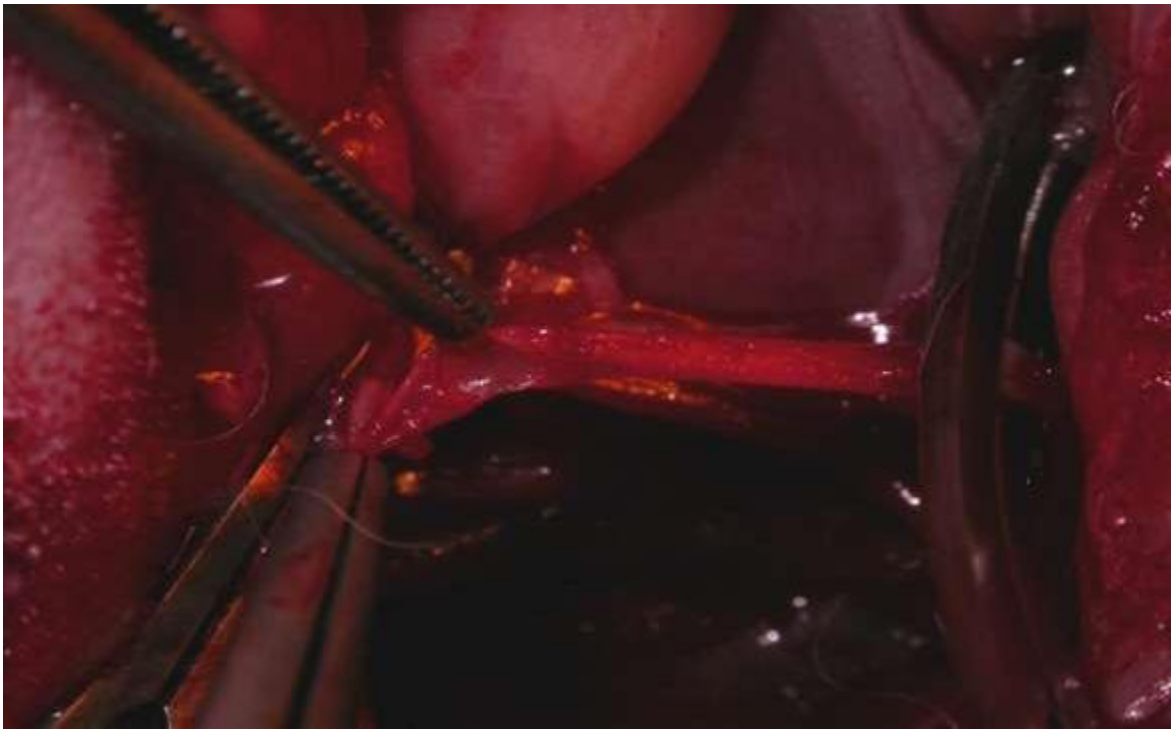
Resim 2.1. Tavşan kulak arkası marginal veninden branül takılması.



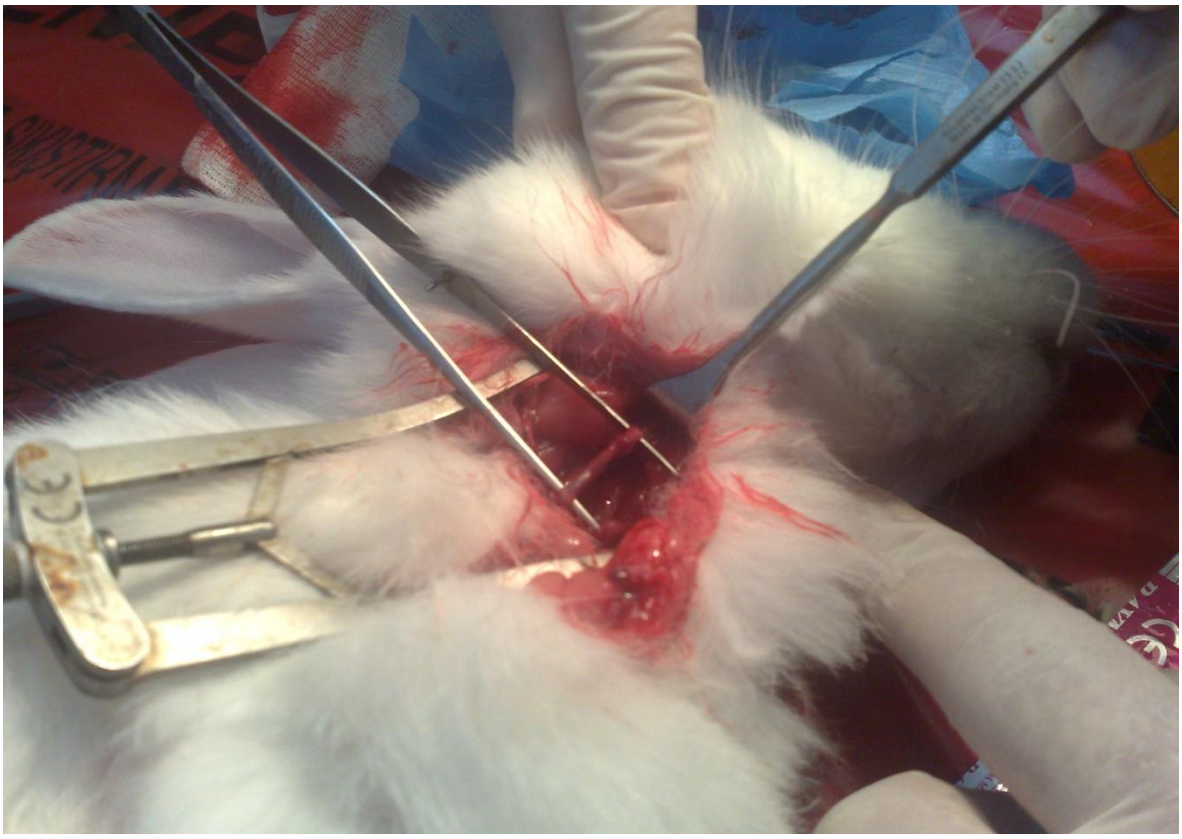
Resim 2.2 Tavşan sağ karotis arterinin eksplorasyonu



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.

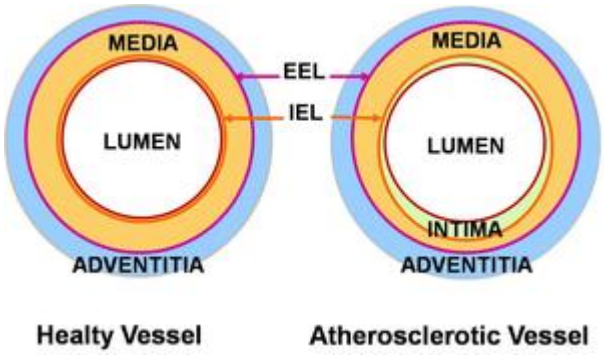
2.3. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME:

Işık Mikroskobik Doku Takip Protokolü

%10'luk formaldehit ile tespit edilen damar doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60˚C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik seri kesitler alındı.

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksilen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.



Şekil 1.5. Sağlıklı ve aterosklerotik damar duvarının histolojik kesitinin ışık mikroskobik görünümü

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. Çalışma sırasında damar dokusu incelenirken, tunica intima ile tunica media'nın kalınlıkları, tunica intima ile tunica media'nın alanları, damar çapları ve damar lümen alanları steorolojik yöntemlerle gruplar arasında karşılaştırıldı.

Gruplar arasındaki damar lümen çapı, lümen alanı, intima alanı,intima kalınlığı, media alanı,media kalınlığı ve intima/media alan oranı arasındaki farklar değerlendirildi.

2.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM:

Elde edilen sonuçlar, ortalama +/- standart hata olarak verildi. Veriler SPSS 15.0 evaluation version (SPSS, CHİCAGO, IL, USA) istatistik programı kullanılarakikiligrupların verilerinin karşılaştırmaları Mann-Whitney U, Wilcoxon V analiz testleri iledeğerlendirildi, $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

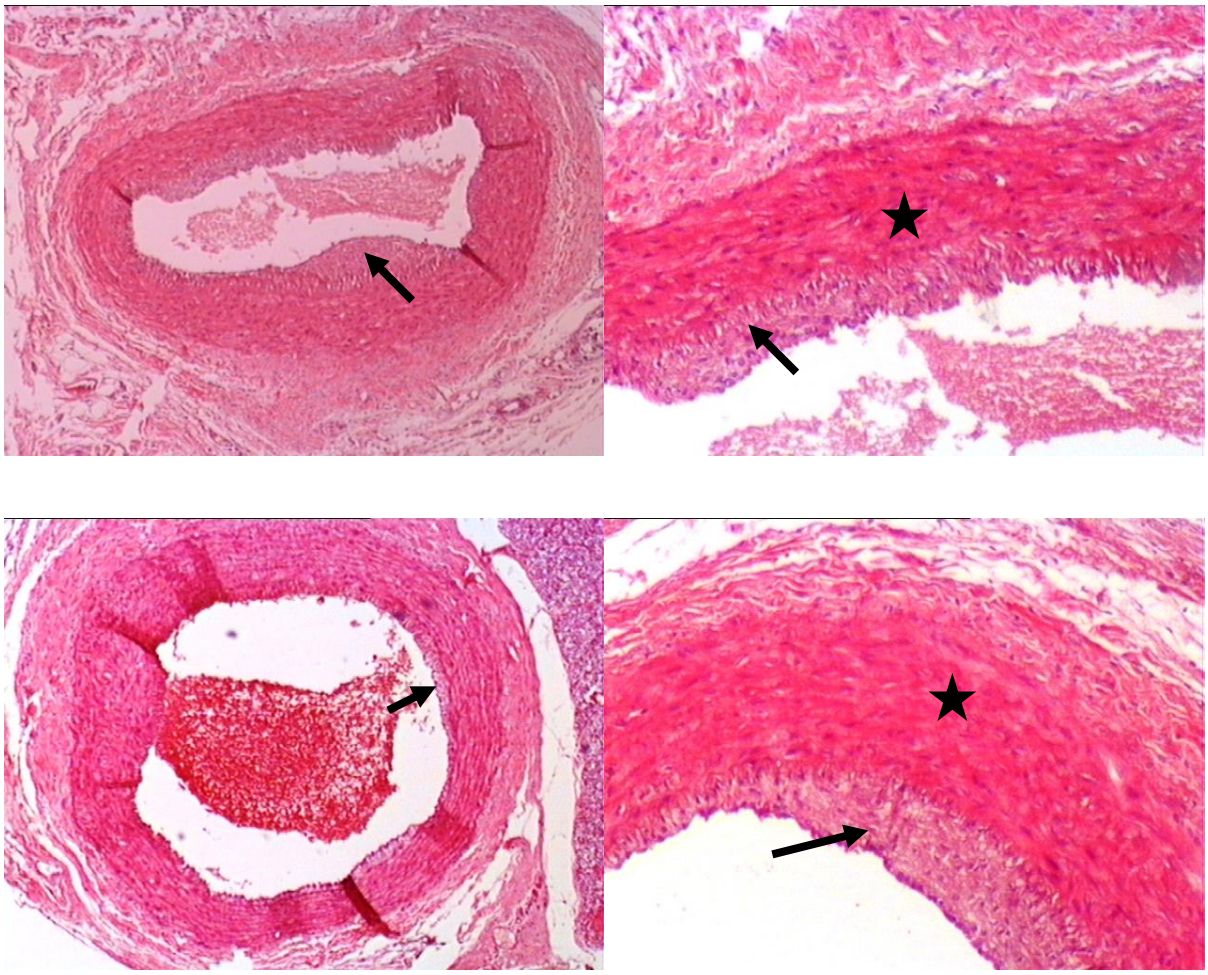
3. BULGULAR

Çalışmamızda Yeni Zelanda tipi 14 adet erkek tavşan kullanılmıştır. Tüm denekler çalışma süresi boyunca yaşamışlardır. 28 gün sonunda tavşanların hiç birinde yara yeri enfeksiyonu ve nörolojik problem gelişmemiştir. Çalışma süresi bitiminde tüm tavşanların anastomoz yapılan sağ taraf karotis arterleri çıkarılarak incelenmek üzere histoloji laboratuvarına gönderildi. Alınan dokulardan yapılan kesitlerde lümen çapı, lümen alanı, intima alanı,intima kalınlığı, media alanı,madia kalınlığı, intima-media alanları oranına bakıldı .

3.1. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME:

3.1.1.Grup A:

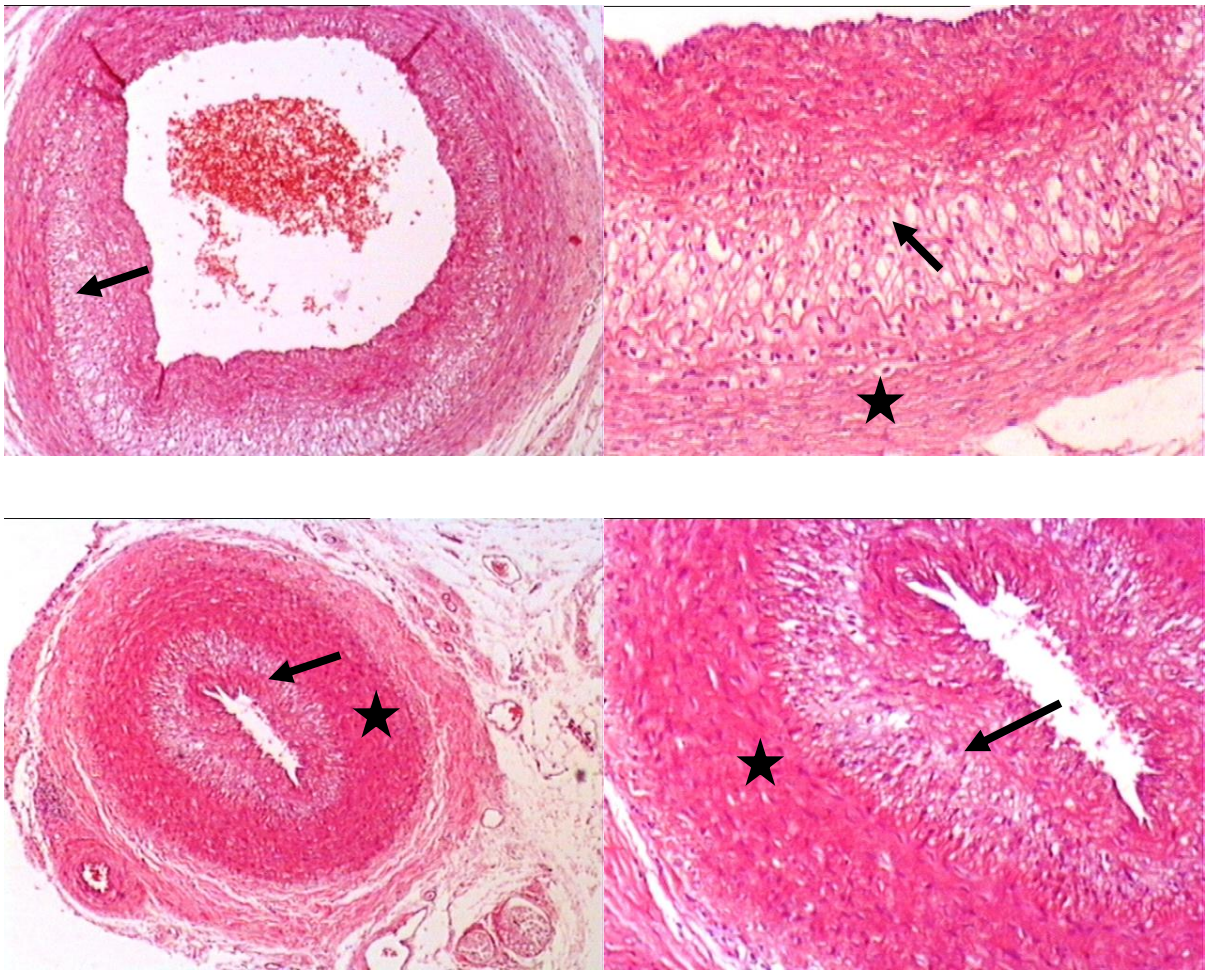
Standart tavşan yemi ile beslenen tavşanlardan elde edilen kesitlerde anastomoz yapılan sağ taraf karotid damar lümeninin daraldığı, lümenin düzgün dairesel şeklinin bozulduğu görüldü. İntimal alanda ise düz kas hücre proliferasyonun olduğu görüldü. Hücresel dizilimlerin dağınık olduğu ve yoğun bağ dokusu artışı ile intimal hiperplazinin olduğu görüldü. Resim 3.1' de Grup A'deki tavşanlardan yapılan kesit örnekleri verilmiştir. Anastomoz uygulanan Grup A'da Grup B'ye oranla lümen alanının daha geniş olduğu görülmektedir. Grup A' da intimal hiperplazinin Grup B ile kıyaslandığında çok daha azoranda olduğu görülmektedir. Grup A' da görülen media hipertrofisinin Grup B ile kıyaslandığında daha az oranda olduğu görülmektedir (Resim 3.1).



Resim3.1 . Kontrol grubuna ait HE boyaması.: ➡ :İntimal hiperplazi, ★ : tunica media.Scale bar: 200 µm.

3.1.2.Grup B:

Bu grupta çalışmaya alınan tavşanların anastomoz yapılan sağ karotis arter segmentlerinden elde edilen kesitlerden yapılan incelemede; damar lümenlerinin daha daralmış ve daha bozulmuş olduğu tespit edildi. Lümen geometrisinin Grup A'ya göre daha bozuk olduğu, intimal hiperplazinin lümen düzgünlüğünü bozacak şekilde lümene çıkıntı yaptığı görüldü. Ortalama tunika intima kalınlığına bakıldığında grup A'ya oranla artma olduğu tespit edildi. Her iki taraf media tabakalarında Grup A aleyhine bir artma olduğu görüldü (Resim 3.2).



Resim 3.2. Kolesterol grubuna ait HE boyaması. HE boyaması.: ➡ :İntimal hiperplazi, ★ : tunica media. Scale bar: 200 µm. , Scale bar: 500 µm, 200 µm.

Grup A = kontrol

Statistics(a)

		Lunemcapı	İntima kalınlığı	Media kalınlığı	Lümenalanı	İntima alanı	Mediaalanı
N	Valid	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0
Mean		857,6733	58,8902	161,9492	447792,8629	93570,9429	392929,5286
Std. Deviation		162,49470	30,45609	14,59838	157796,50349	41121,15474	23146,58411

a grup = kontrol

grup B= kolesterol

Statistics(a)

		Lunemcapı	İntima kalınlığı	Media kalınlığı	Lümenalanı	İntima alanı	Mediaalanı
N	Valid	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0
Mean		743,9010	207,6932	179,2054	445428,7829	294434,5100	368268,9143
Std. Deviation		295,39277	92,50223	39,96530	275200,97363	173544,34235	51937,62713

Tablo 1.2 Kontrol ve kolesterol gruplarının istatistiksel analizi

Mann-Whitney Test

Test Statistics(b)

	Lümen capı	İntima kalınlığı	Media kaınlığı	Lümenalanı	İntima alanı	Mediaalanı
Mann-Whitney U	21,000	3,000	24,000	22,000	4,000	19,000
Wilcoxon W	49,000	31,000	52,000	50,000	32,000	47,000
Z	-,447	-2,747	-,064	-,319	-2,619	-,703
Asymp. Sig. (2-tailed)	,655	,006	,949	,749	,009	,482
ExactSig. [2*(1-tailed Sig.)]	,710(a)	,004(a)	1,000(a)	,805(a)	,007(a)	,535(a)

a Notcorrectedforties.
b GroupingVariable: grup

4. SONUÇLAR

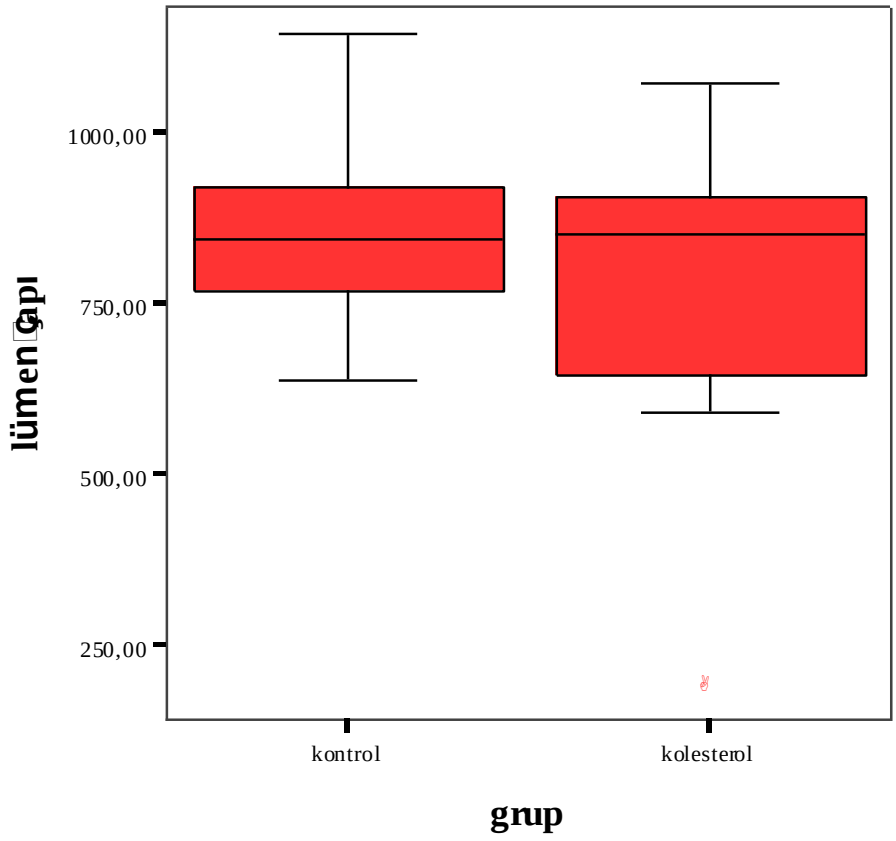
4.1. LÜMEN ÇAPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası lümen çapı karşılaştırmasında;standart tavşan yemi ile beslenen ve anastomoz yapılan Grup A'ın ortalama lümen çapı 857,6733± 162,49470 µm olarak tespit edildi.

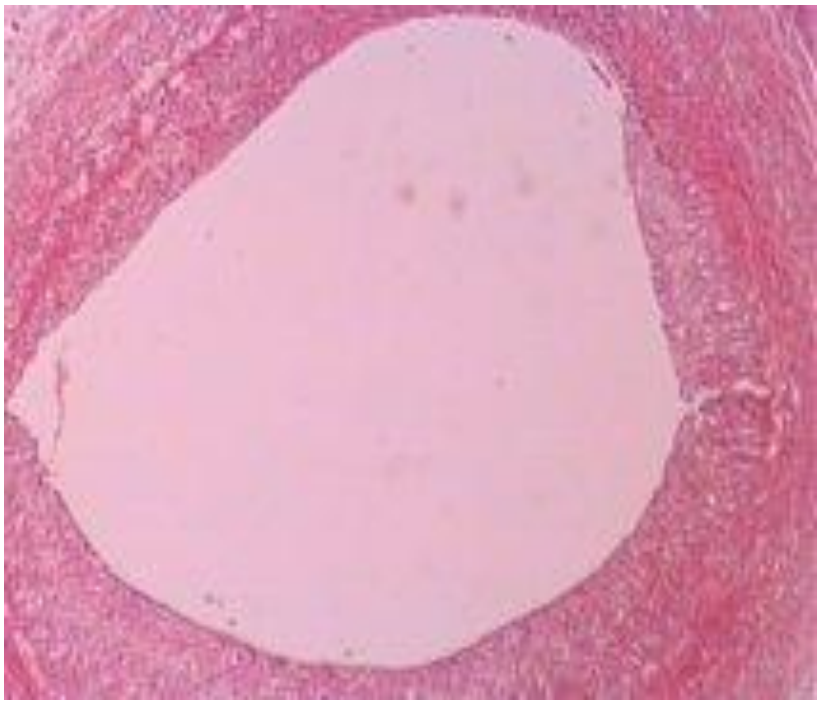
Grup A'nın ortalama lümen çapının (857,6733 ± 162,49470 µm), %'2'lik hiperkolesterol diyeti ile beslenen gruba(Grup B) (743,9010 ±295,39277) göre daha fazla olduğu görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı(p = 0.655).

	Anastomoz Grupları
Grup	**Ortalama lümen çapı (µm) ± SE**
Grup A	857,6733 ± 162,49470
Grup B	743,9010±295,39277

Tablo 4.1. Gruplar arasındaki ortalama lümen çapı karşılaştırılması



Grafik 4.1. Ortalama lümen çaplarının karşılaştırılması. Grup A; Standart tavşan yemi ile beslenen grup (kontrol anast), Grup B; 8 hafta süre ile %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen grup (ilaç anast).



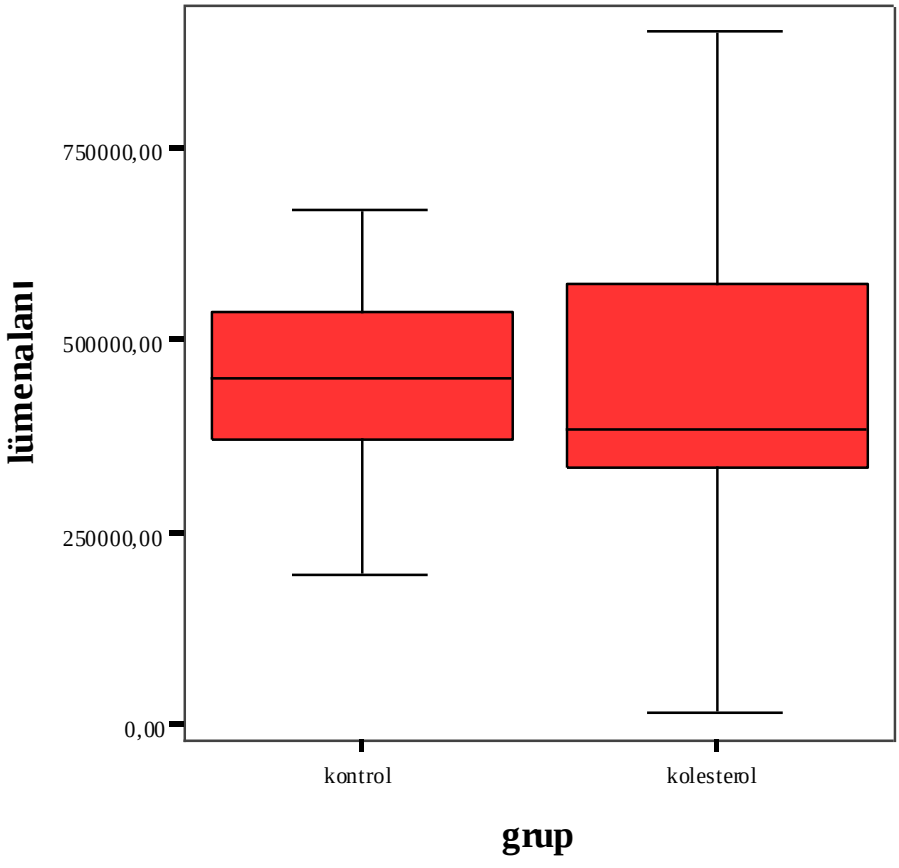
Resim 3.3 Kontrol grubuna ait HE boyaması

4.2. LÜMEN ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası lümen alanı karşılaştırmasında;standart tavşan yemi ile beslenen ve anastomoz yapılan Grup A'nınortalama lümen alanının (447792,8629 ± 157796,5034) , %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen ve anostomoz yapılan gruba (Grup B) (445428,7829± 275200,97363) göre daha fazla olduğu görüldü.Bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmadı (p = 0.749).

Anastomoz Grupları	
Grup	**Ortalama lümen alanı(µm) ± SE**
Grup A	447792,8629 ± 157796,5034
Grup B	445428,7829± 275200,97363

Tablo 4.2. Ortalama lümen alanı kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.2. Ortalama lümen alanlarının karşılaştırılması. Grup A;Standart tavşan yemi ile beslenen grup (kontrol anast), Grup B; 8 hafta süre ile %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen grup (ilaç anast).

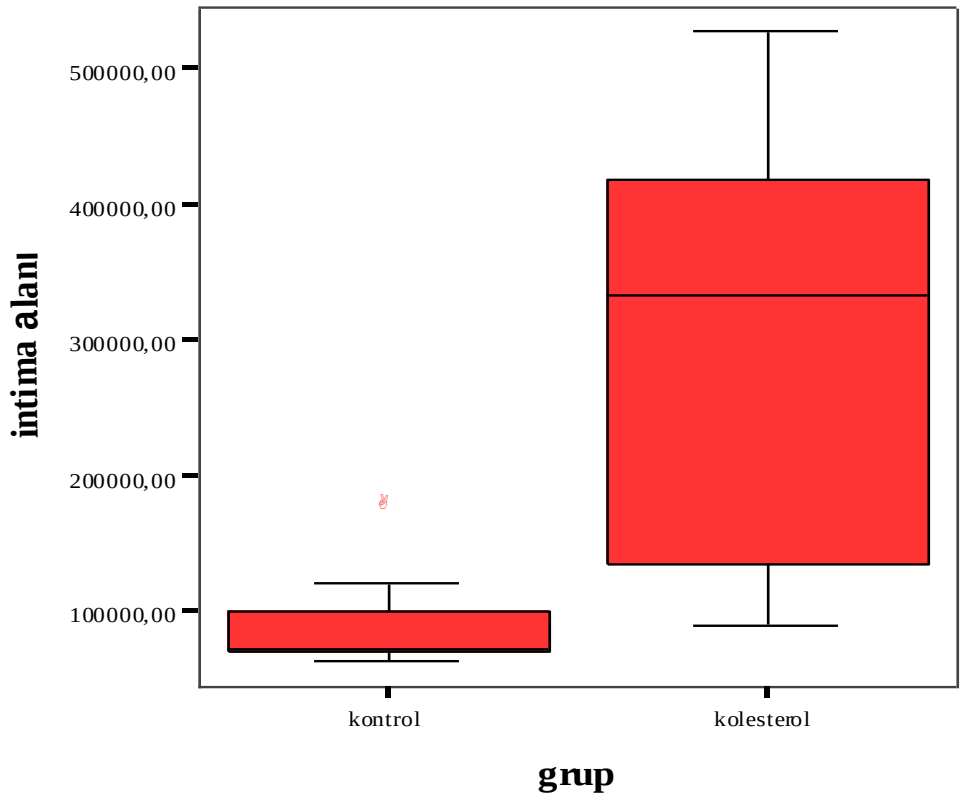
4.3. İNTİMA ALANININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası intima alanının(internal elastik lamina ile lümen arasındakialan) karşılaştırmasında;standart tavşan yemi ile beslenen ve anastomoz yapılan Grup A'ın ortalama intimal alanı(93570,9429±41121,15474),%2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen ve anostomoz yapılan gruba (Grup B) (294434,5100±173544,34235) göre daha az bulunmuş olup bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur(p = 0.009).

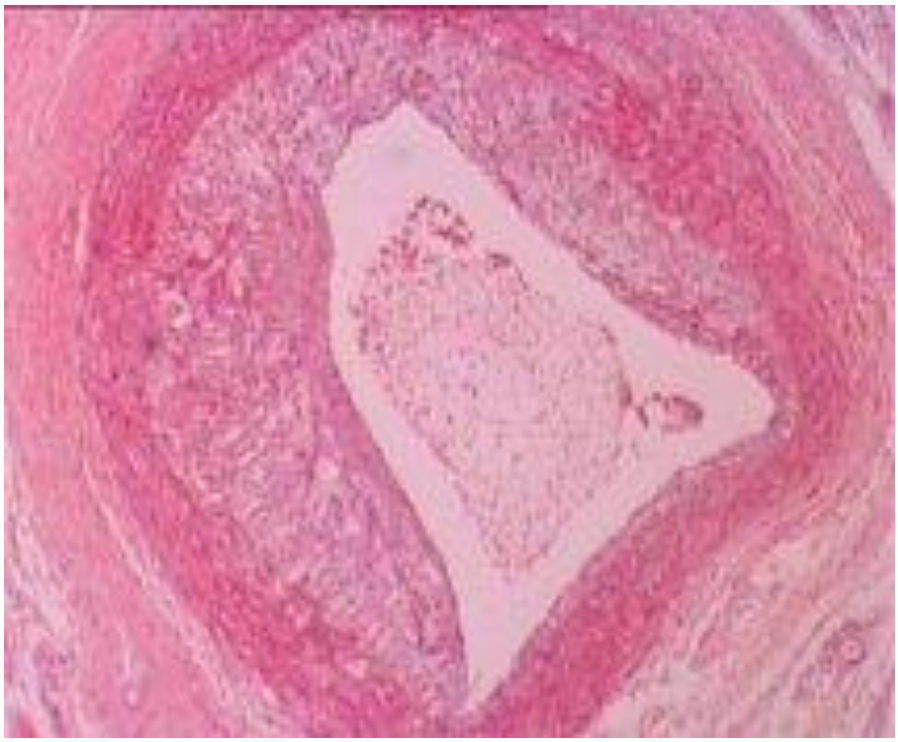
Anastomoz Grupları

Grup	Ortalama intimal alan(µm) ± SE
Grup A	93570,9429±41121,15474
Grup B	294434,5100±173544,34235

Tablo 4.3. Ortalama intimaalanının kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.3. Ortalama intima alanlarının karşılaştırılması. Grup A;Standart tavşan yemi ile beslenen grup (kontrol anast), Grup B; 8 hafta süre ile %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen grup (ilaç anast).



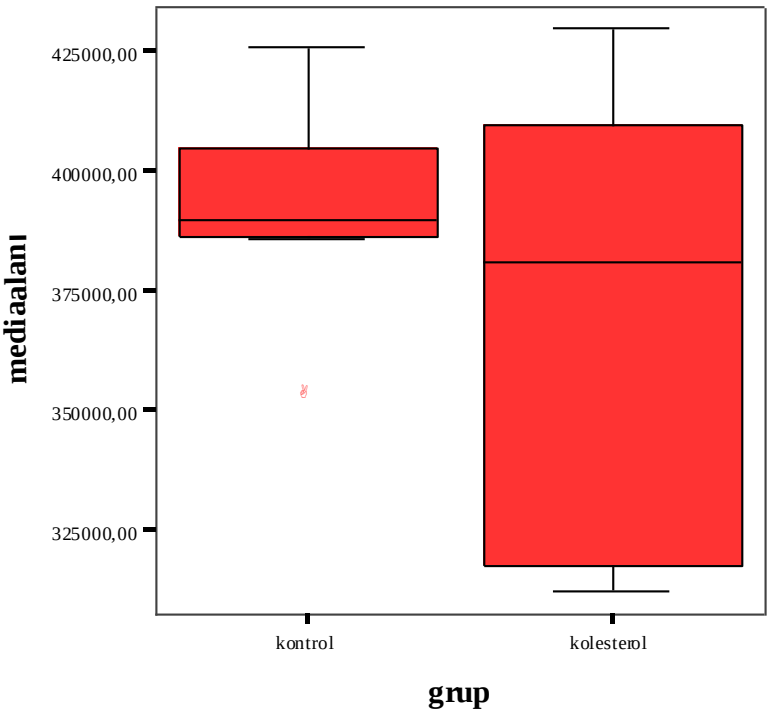
Resim 3.4. Kolesterol grubuna ait HE boyaması

4.4 MEDİA ALANININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası media alanının(İEL ile düz kas hücrelerinin en dış kısmı arasındaki alan) karşılaştırmasında; standart tavşan yemi ile beslenen ve anastomoz yapılanGrup A'ın ortalama media alanı(392929,5286 ±23146,58411)2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen ve anostomoz yapılan gruba (Grup B) (368268,9143± 51937,62713) oranla daha az bulunmuş olup bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır(p = 0.482).

Anastomoz Grupları	
Grup	**Ortalama medial alan(µm) ± SE**
Grup A	392929,5286 ± 23146,58411
Grup B	368268,9143± 51937,62713

Tablo 4.2. Ortalamamediaalanının kontrol grupları ile karşılaştırması



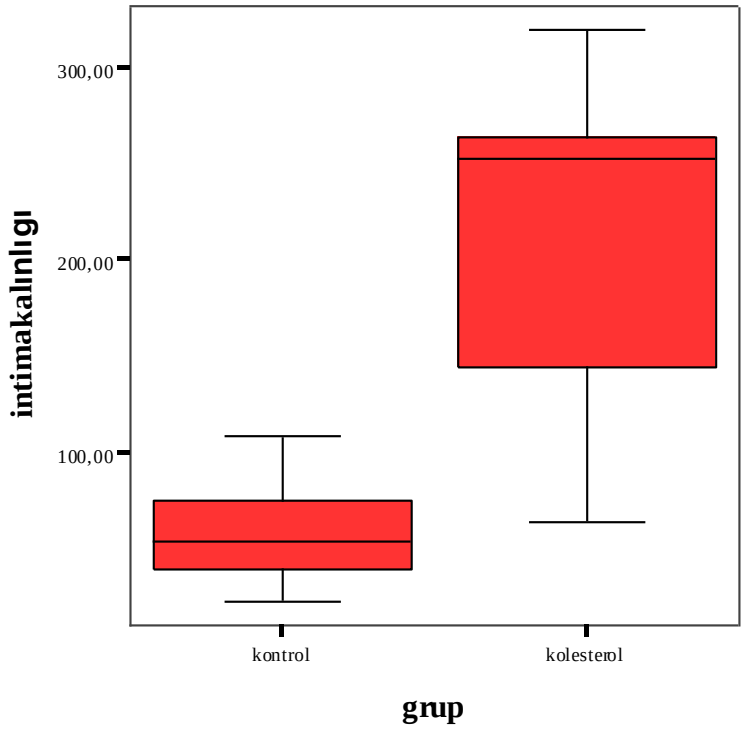
Grafik 4.4. Ortalama media alanlarının karşılaştırılması. Grup A;Standart tavşan yemi ile beslenen grup (kontrol anast), Grup B; 8 hafta süre ile %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen grup (ilaç anast).

4.4 İNTİMA KALINLIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası intima kalınlığının karşılaştırmasında; standart tavşan yemi ile beslenen ve anastomoz yapılanGrup A'ın ortalama intima kalınlığı (58,8902± 30,45609),2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen ve anostomoz yapılan gruba (Grup B) (207,6932± 92,50223) oranla daha az bulunmuş olup bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p = 0.006).

	Anastomoz Grupları
Grup	**Ortalama intima kalınlığı(µm) ± SE**
Grup A	58,8902±30,45609
Grup B	207,6932± 92,50223

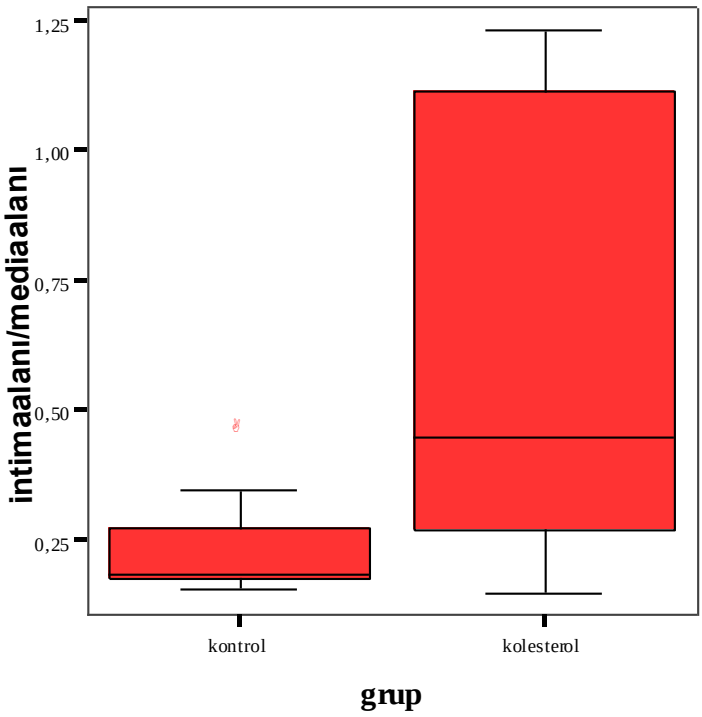
Tablo 4.2. Ortalamaintimakalınlığının kontrol grupları ile karşılaştırması



Grafik 4.5. Ortalama intima kalınlığının karşılaştırılması. Grup A;Standart tavşan yemi ile beslenen grup (kontrol anast), Grup B; 8 hafta süre ile %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen grup (ilaç anast).



Resim 3.5. Kolesterol grubuna ait HE boyaması



Grafik 4.6. Ortalama intima alanı/mediaalanı karşılaştırması

5. TARTIŞMA

Tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinde uygulanan girişimlerin başarı şansı, spontan tromboz gelişimi veya stenoz oluşumu nedeni ile beklenenden daha azdır (3,6). Vasküler rekonstrüktif girişimlerden sonra geç dönemdeki daralma veya restenozda; düz kas hücre migrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks birikimi sonucu oluşan neointimal hiperplazi önemli rol oynamaktadır(1,2).Hiperplazik intimal kalınlaşma, arterlerin hemodinamik strese karşınormal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel hasarın iyilemesinin de karakteristik birözelliğidir (4).

Endarterektomi, PTCA, vasküler bypass-greft anastomoz bölgelerinde görülenintimal hiperplazi, vasküler rekonstrüktif girişimlerin uzun sürede yetersiz hale gelmesindeen önemli etkenlerden biridir (6). İki yıl içinde otolog safen ven greftlerle yapılan femoropoplitealbypasslarda %30, sentetik greftlerle yapılan bypasslarda %40–50,

periferikarterlerin anjioplastisinden sonra da %20–50 oranında tıkanma meydana gelebilir [23].

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.

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 (24,25).

Arteryel hasar oluştuktan sonra, bu bölge trombositlerle kaplanır. Adhezyon sonrası trombositler granüllerindeki vazoaktif ve trombotik faktörleri (serotonin,fibrinojen,von villebrand faktör) ve ayrıca büyüme faktörlerini (trombosit kaynaklı büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, epidermal büyüme faktör) salgılar (7). 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. Russel Ross tarafından öne sürülen ve halen yaygın kabul gören yaralanmaya cevap (response-to-injury) hipotezine göre de intimal kalınlaşmayı başlatan mekanizma, hasar gören damar duvarına yapışan aktive trombositlerden ve endotel hücrelerinden salınan, düz kas hücreleri proliferasyonunu uyaran büyüme faktörleridir (7).

Düz kas hücresinin büyümesini damar duvarında ya da dolaşımda bulunan bir grup otokrin ve parakrin faktörler ve basınç gibi fiziksel kuvvetler stimule eder. Normal damardaNO, Adenozin gibi büyüme inhibitörleri; PDGF, FGF, insülin benzeri büyüme faktörü, TGF beta, anjiotensin 2, ve endotelin gibi büyüme faktörleri bir denge halindedir. Budengenin bozulması düz kas hücre proliferasyonuna neden olur. Düz kas hücrelerininanormal

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 (24).

Bu güne kadar ister anastomoz sonrası ister PTCA veya stent sonrası olsun 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, ACE inhibitörleri gibi çeşitli ilaçlar denenmiştir (22).

Biz de tüm bu çalışmalardan yola çıkarak hiperkolesteroleminin,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.

Çalışmamızda %2'lik hiperkolesterol diyetini anastomoz öncesi 4 hafta ve anastomoz sonrası 4 hafta olmak üzere toplam 8 hafta süresince tavşanlara uyguladık.

Çalışmamızın sonucunda lümen çapı olarak; anastomoz yapılan ve %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen Grup B'nin ortalama lümen çapının anastomoz yapılan ve standart tavşan yemi ile beslenenGrup A'dan daha dar olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.Lümen alanı olarak; anastomoz yapılan ve %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen Grup B'nin ortalama lümen alanının, anastomoz yapılan ve standart tavşan yemi ile beslenenGrup A'dan daha dar olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Anastomoz yapılan ve standart tavşan yemi ile beslenen Grup A'ın ortalama intima alanı ve intima kalınlığı, %2'lik hiperkolesterolemi diyeti ile beslenen ve anastomoz yapılan Grup B'nin intima alanı ve intima kalınlığına oranla daha az oranda artmış olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.Media alanı ve media kalınlıkları açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Çalışmamızdan çıkan sonuçlar, balon anjioplasti vaya anastomoz sonrası hiperkolesterolemi dieti uygulanan çalışmalarda çıkan lümen çapı ve alanındaki daralma, intima alanında veintima/ media oranında artma ile paralellik göstermiştir.

Çalışmamızdan çıkan sonuçlar doğrultusunda damar anastomozu sonrası intimal hiperplazinin azaltılması açısından hiperkolesterolemi tedavisinin kullanılabileceği kanısındayız.Ancak ileriye dönük yapılcak ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1) Göncü T, Yavuz Ş, Çekirdekçi A, Karaca I. Vasküler injüri sonrası oluşan hiperplazi üzerine perindoprilin etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg, 2001;9:109–114

2)Oğuz Kayaalp Tıbbi Farmakoloji Hacettepe Taş yayınları 10. baskı 695-696

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

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

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

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

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

8)Scott L. Stevens, MD, Klaus Hilgarth, BS, Una S. Ryan, PhD, Jeffrey Trachtenberg, MD, Eric Choi, MD, Allan D. Callow, MD, PhD,St. Louis, Missouri
The Synergistic Effect of Hypercholesterolemia and Mechanical Injury on Intimal Hyperplasia

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

10) 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.

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

12) .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.

13) 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.

14) 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.

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

16) 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.

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

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

19) 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.

20) 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.

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

22) 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.

23) 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.

24) 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.

25) 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.

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

27) 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.

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

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

30) 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.

31) 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.

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

33) Effect of hypercholesterolemia on the sequential changes of apoptosis and proliferation after balloon injury to rabbit iliac artery

34)Hossein Mehrad,Manijhe Mokhtari-Dizaji, Hossein Ghanaati, Amir-Ali Shahbazfar, Afshin Mohsenifar.
Developing a Rabbit Model of Neointimal Stenosis and Atherosclerotic Fibrous Plaque Rupture,2012

35) The Synergistic Effect of Hypercholesterolemia and Mechanical Injury on Intimal Hyperplasia
Scott L. Stevens, MD, Klaus Hilgarth, BS, Una S. Ryan, PhD, Jeffrey Trachtenberg, MD, Eric Choi, MD, Allan D. Callow, MD, PhD,St. Louis, Missouri

36) Evaluation of vascular smooth muscle and corpus cavernosum on hypercholesterolemia. Is resveratrol promising on erectile dysfunction?
BC Soner, N Murat, O Demir, H Guven1, A Esen and S Gidener
Department of Pharmacology, Medical Faculty, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey; Advanced Professional School of