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

TAVŞAN KAROTİS ARTER ANASTOMOZ MODELİNDE GELİŞEN NEOİNTİMAL HİPERPLAZİ VE ENDOTELYAL PROLİFERASYON ÜZERİNE ORAL YOLLA VERİLEN FAKTÖR Xa İNHİBİTÖRÜ RİVAROKSABIN ETKİLERİ

GÖKMEN AKKAYA

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2016

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

TAVŞAN KAROTİS ARTER ANASTOMOZ MODELİNDE GELİŞEN NEOİNTİMAL HİPERPLAZİ VE ENDOTELYAL PROLİFERASYON ÜZERİNE ORAL YOLLA VERİLEN FAKTÖR Xa İNHİBİTÖRÜ RİVAROKSABIN ETKİLERİ

GÖKMEN AKKAYA

UZMANLIK TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şevket Baran Uğurlu

İÇİNDEKİLER

TABLO VE GRAFİK LİSTESİ III

ŞEKİL VE RESİMLER LİSTESİ IV

KISALTMALAR V

TEŞEKKÜR VII

1. ÖZET 1

2. SUMMARY 3

3. GİRİŞ VE AMAÇ 5

4. GENEL BİLGİLER 7

4.1. Arter Tipleri ve Histolojisi 7

4.1.1. Elastik (Büyük - İletici) Arterler 7

4.1.2. Muskuler (Orta Boy-Dağıtıcı) Tip Arterler 9

4.1.3. Küçük Çaplı Arterler ve Arterioller 10

4.2. Vasküler Endotel 12

4.2.1. Endotel hücre yapsı ve fonksiyonları 12

4.2.2. Endotelle İlişkili Vazoaktif Mediatörler 14

4.2.3. Vasküler Hastalıklarla İlişkili Düzenleyici Mekanizmalar 15

4.2.4. Endotel Hasarı ve İntimal Hiperplazi 16

4.2.5. Endotel ve Koagülasyon 18

4.3. Rivaroksaban 20

5. MATERYAL-METOD 23

5.1. Çalışma Planı 25

5.2. Deney Protokolü 26

5.2.1. Histokimyasal İnceleme 26

5.2.2 Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü 26

5.2.3. Masson Trikrom Boyama Protokolü 27

5.3. İstatistiksel Yöntem 28

6. BULGULAR 29

6.1. Hematoksilen-Eosin ve Masson Trikrom Boyama Değerlendirmeleri 31

6.2. Lümen Çaplarının Karşılaştırılması 36

6.3. Lümen Alanlarının Karşılaştırılması 37

6.4. İntima Kalınlıklarının Karşılaştırılması 38

6.5. Media Kalınlıklarının Karşılaştırılması 39

7. TARTIŞMA 40

8. SONUÇ 43

9. KAYNAKLAR 44

10. EK 51

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Arterlerin genel özellikleri
Tablo 2: Endotel hücresinde sentezlenen ve salgılanan biyoaktif maddeler.
Tablo 3: Endotel kaynaklı vazoaktif mediyatörler
Tablo 4: Doku takip protokolü
Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boya protokolü.
Tablo 6: Masson Trikrom boya protokolü**.**
Tablo 7: Çalışma gruplarının sınanan değişkenler açısından ortanca ± standart sapma ve minimum-maksimum değerleri.
Tablo 8: Tüm deney hayvanlarında NPar test ile istatistiksel veri analizi
Tablo 9: Gruplar arası Mann-Whitney testi ile veri analiz

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1. Grupların lümen çapı açısından karşılaştırılması.
Grafik 2. Grupların lümen alanı açısından karşılaştırılması.
Grafik 3. Grupların intima kalınlıkları açısından karşılaştırılması.
Grafik 4. Grupların media kalınlıkları açısından karşılaştırılması.

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Büyük tip arter (enine kesit). Şematik çizim
Şekil 2: Büyük tip arter. Aort duvarı enine kesit. Orsein boyası-Büyük büyütme
Şekil 3: Müsküler tip arter (enine kesit). Elastin boyası-Küçük büyültme
Şekil 4: Kan ve lenf damarları. Hematoksilen boyama-orta büyütme
Şekil 5: Koagülasyon kaskadı şeması
Şekil 6: Rivaroksabanın biyokimyasal yapısı
Şekil 7: Rivaroksaban'ın farmakokinetiği
Şekil 8: Tavşanda intramusküler anestezi uygulaması
Şekil 9: Süturasyon sonrası carotis arter görünümü
Şekil 10: İşlem sonrası insizyon hattı
Şekil 11: Histolojik preparatlarda initmal hiperlazi ve lümen değerlendirilmesi
Şekil 12: İntimal hiperplazi ve membrana elastika internaya ait görünüm
Şekil 13: İnitmal hiperplazi ve lümen ilişkisi
Şekil 14: Kontrol grubuna ait kesit. Medial hipertrofi incelemesi görünümü
Şekil 15: Olgu grubuna ait kesit. Medial hipertrofi ve intimal hiperplazi görünümü
Şekil 16: Kontrol grubuna ait kesit
Şekil 17: Olgu grubuna ait kesit
Şekil 18: Masson Trikrom boyama ile olgu grubuna ait kesitte intimal hiperplazi görünümü

KISALTMALAR

YOAK: Yeni Nesil Oral Antikoagülan

NVAF: Non Valvuler Atriyel Fibrilasyon

VTE: Venöz Tromboemboli

PTE: Pulmoner tromboemboli

PAR: Protease Aktif Reseptör

TİA: Geçici İskemik Atak

LDL: Low Density Lipoprotein

EDRF: Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör

NO: Nitrik Oksit

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

VCAM : Vaskülar Hücre Adhezyon Molekülü

ICAM : İnterselluler Hücre Molekülü

M-CSF: Makrofaj Kemotaktik Protein

MCP-I : Makrofaj Kemotaktik Protein 1

DNA: Deoksiribonükleik Asit

TNFa: Tümör Nekroz Faktör-a

IL-1b: İnterlökin 1b

TGF: Transforming Büyüme Faktör

ONOO: Peroksinitrit

EDHF: Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör

B FGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

AT-III : Antitrombin-III

TF: Doku Faktörü

TFPI: Doku Faktör Yolu İnhibitörü

APC: Edimsel Protein C

DEÜ: Dokuz Eylül Üniversitesi

PC: Protein C

PS: Protein S

TAFI: Trombinle Aktive Fibrinoliz İnhibitörü

VWF: Von Willebrand Faktör

ET: Endotelin

PAF: Platelet Aktive Edici Faktör

PAI-1: Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1

GFR: Glomerüler Filtrasyon Hızı

KAH: Koroner Arter Hastalığı

VKA: Vitamin K Antagonisti

IM: İntramüskuler

ACE: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim

PTCA : Perkütan Translüminal Anjiyoplasti

APO-E: Apolipoprotein E

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve katkıda bulunan hocalarıma; başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Şevket Baran Uğurlu olmak üzere Sayın Prof.Dr. Öztekin Oto, Sayın Prof.Dr. Hüdai Çatalyürek, Sayın Prof. Dr. Özalp Karabay, Sayın Prof.Dr. E.Erdem Silistreli, Sayın Prof. Dr. A.Cenk Erdal, Prof. Dr. S.Kıvanç Metin ve Sayın Yard. Doç. Dr. Tuğra Gençpınar'a teşekkür ediyorum.

Tezimin gerçekleşmesinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen fakültemiz Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Bekir Uğur Ergür ve Dr. Pınar Akokay'a, teşekkür ederim.

Çalışmamda bana destek olan Dr. Çağatay Bilen başta olmak üzere asistanlık eğitimim boyunca kalp ve damar cerrahisinde birlikte çalıştığım herkese şükranlarımı sunarım.

1. ÖZET

Tavşan karotis arter anastomoz modelinde gelişen neointimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyon üzerine oral yolla alınan faktör Xa inhibitörü rivarokrabanın etkilerinin araştırılması

Gökmen Akkaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı-İzmir.

Amaç: Arteryel cerrahi girişimlerden sonra vasküler duvarda düz kas proliferasyonu ve intimal hiperplazi restenozun gelişiminde önemli rol oynar. Arterlerde yapılan onarımların başarısızlığındaki en önemli nedenlerden biri; intimal hiperplaziye bağlı olarak gelişen restenozdur. Hiperplazik intima kalınlaşma, arterlerin hemodinamik strese karşı normal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel injurilerin iyileşmesinin de karakteristik bir özelliğidir. Tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinde cerrahi oldukça sık kullanılan tedavi yöntemidir. Bu tarz girişimlerin başarısı spontan tromboz gelişimi veya stenoz oluşumu nedeni ile beklenenden daha azdır. Bu sebeple çalışmamızda tavşan karotis arterinde yapılan anastomozda yeni nesil oral yolla alınan antikoagülan, faktör Xa inhibitörü rivaroksabanın intimal hiperplazi ve düz kas hücre (endotel) proliferasyonu üzerine etkisini araştırdık.

Materyal ve metod: Çalışmamızda randomize olarak seçilen 14 adet ortalama 3-3,5 kg ağırlığında Yeni Zelenda tipi erkek tavşanlar kullanıldı. Tavşanlar iki gruba ayrıldı. Anestezi olarak 50 mg/kg intramuskuler Ketamin ve 5 mg/kg intramuskuler Ksilazin uygulandı. Anastomoz için sağ taraf karotid arteri kullanıldı. Tüm grup tavşanlara sağ vertikal boyun insizyonu yapılarak karotid arter eksplore edildi. 100 IU/kg dozda IV Heparin uygulandı. Karotid arter proksimal ve distalinden buldog klemple klemplendikten sonra transekte edildi ve 8/0 polipropilen sütür ile tek tek dikilerek anastomoz tamamlandı. Tavşanlar iki gruba ayrıldı.Grup A (7adet) tavşanlar kontrol grubunu oluşturdu. Grup B (7 adet) tavşanlara preoperatif 7 gün postoperatif 28 gün süreyle 3 mg/kg rivaroksaban, 2'şer ml sıvıda çözülerek oral yoldan verildi. Postoperatif tüm gruplardaki tavşanlar 28. günün sonunda 5 mg/kg dan intramuskuler ksilazin ve 50mg/kg dozunda intramuskuler ketamin ile anestezileri sağlandıktan sonra anastomoz yapılan karotid arter segmenti çıkarılarak incelenmek üzere Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji Laboratuvarı'na gönderildi.

Mikroskobik örnekler parafin bloklar halinde 5 μm kalınlığında kesildi ve Hematoxylen-Eosin ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

Bulgular: Yapılan seri kesitlerde lümen çapı karşılaştırıldığında Grup B'nin ortalama lümen çapı, Grup A'in ortalama lümen çapından daha büyük bulunmuş ve bu fark Grup A ile Grup B arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmıştır (p:0,001). Lümen alanları değerlendirildiğinde Grup B'nin ortalama lümen alanı Grup A'dan daha geniş bulunmuş olup bu fark Grup A ile Grup B arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmıştır (p:0,004). Seri kesitler intima kalınlığı açısından değerlendirildiğinde Grup B'nin intimal kalınlığı Grup 1'den daha ince bulunmuş olup bu fark Grup A ile Grup B arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yaratmıştır (p:0,001). Media kalınlığı açısından seriler değerlendirildiğinde Grup A'nın media kalınlığı Grup B'den daha büyük bulunmuş olup bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p:0,002).

Sonuç: Çalışmamızda rivaroksabanın cerrahi anastomoz sonrası tavşan karotis arterlerinde kontrol grubuna göre lümen çapı ve alanında artışa ve intimal hiperplazi ve medial hipertrofiyi oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Bu çalışma ile bundan sonraki süreçte cerrahi sonrası kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için ilaç seçiminde rivaroksabanın antikoagülan etkisinin yanında restenoz gelişiminin engellenmesine de olumlu katkılarının varlığı göz önüne alınmalıdır.

Anahtar kelimeler: Rivaroksaban, initmal hiperplazi, düz kas hücre proliferasyonu, karotis arter, anastomoz, tavşan

2.SUMMARY

The aim of this study is to assess effect of new generation oral factor Xa inhibator rivaroksaban on intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation at the anastomosis site performed carotid artery in rabbits .

Gökmen Akkaya Department of Cardiovasculer Surgery, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

.

Purpose: Intima hyperplasia and smooth muscle cell proliferation both have an important role on the restenosis after the vascular interventions. The success or failure of reconstruction depends on acute thrombosis and restenosis. Late stage intima hyperplasia caused by smooth muscle cell migration, proliferation and extracellular matrix deposition play an important role in restenosis. Hyperplasic intima thickening is not only an adaptive process against the hemodynamic stresses but also a characteristic of arterial injury healing. Rivaroxaban is a novel oral anticoagulant which inhibits activated factor X. Its use following arterial reconstruction may decrease intimal hyperplasia associated with arterial healing.
In this study we assessed the effect of rivaroxaban on intima hyperplasia and smooth muscle cell proliferation in a rabbit carotid artery anastomosis model.

Methods: 14 New Zealand male rabbit weighing 3-3,5 kilograms were randomized in to 2 groups. Group A rabbits (7) served as the control group and received no medication. Rivaroxaban was administrated to group B (7) 3mgr/kg/day once a day peroral during 28 days. In both groups the surgical protocol was same: for anesthesia 50mg/kg ketamine IM and 5mg/kg xylasin IM was administered. A vertical neck insition was made and the carotid arteries were dissecated. A vertical full thickness cut performed and using 8/0 polypropylene an anastomosis was performed with continious technique.

At day 28, all rabbits were sacrificed and the anastomosed carotid artery segments were analyzed with light microcopy. Hematoxylen-Eosin stained images were analyzed via a digital image analysis program and lumen diamater, lumen area, intimal and medial thickness and media areas were measured and results were compared.

Results: In the serial sections the average lumen diamater of group B was found higher than the group A and this difference was statistical significant between group A and

group B (p:0,001). The lumen diameter of group B was higher than group A and the difference was statistical significant (p:0,004). The lumen area of group B was found lower than the group A and this difference was significant between group A and group B (p:0,001). When the section series were evaluated for media thickness, thickness of group B was lesser than group A and the difference was statistically significant between group A and group B (p:0,002).

Conclusion: This study indicates that rivaroxaban causes a statistically significant improvement in luminal diameter area and reduces intimal hyperplasia and medial thicknening following carotid artery anastomosis in rabbits. This may suggest a beneficial effect in patients undergoing vascular surgery procedures.

Keywords: Rivaroksaban, intimal hyperplasia, smooth muscle cell proliferation, carotis artery, anastomosis, rabbit.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler kaynaklı hastalıklara bağlı ölümler dünyada genel ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2012 yılında dünyada gerçekleşen tüm ölümlerin % 31 'i (17,5 milyon) arteriyel kaynaklı hastalıklara bağlı gerçekleşmiştir (2).

Arteryel cerrahi girişimlerden sonra vasküler duvarda düz kas proliferasyonu ve intimal hiperplazi restenozun gelişiminde önemli rol oynar. Arterlerde yapılan onarımların başarısızlığındaki en önemli nedenlerden biri; intimal hiperplaziye bağlı olarak gelişen restenozdur (3). Neointimal hiperplazi gelişimi ateroskleroz , restenoz ve tranplant vaskülopatisi gibi pek çok vasküler hastalıkta ortak etiyolojide bulunmaktadır (4,5). Arter yaralanması sonrası sütur hattında gelişen vazoaktif süreçlerde intimal hiperplazi gelişimi artmaktadır (6).

Yeni nesil oral antikoagülanların (YOAK) üretimine kadar warfarin tek oral kullanılan preparattı. K vitamini antagonisti olan warfarin sodyum faktör II-VII-IV ve X inhibisyonu ile antitrombotik etki oluşturmaktadır (7). Fakat doz ayarlanmasının yanısıra takibindeki zorluklar ve major kanama komplikasyonları nedeniyle kullanımı sınırlanmaktaydı. Bu sebeplerle YOAK'lar kullanıma girmelerinin ardından geniş bir kullanım alanı buldu ve son yıllarda yapılmış warfarin ve YOAK'ları karşılaştıran pek çok randomize çalışma mevcuttur. REL-Y, ROCKET-AF, ARISTOTLE dünya çapında geniş seriler sunmuşlardır. Özellikle non valvuler atriyal fibrilasyonlu (NVAF) , venöz tromboembolili (VTE) ve pulmoner tromboemboli (PTE) hasta popülasyonlarında yapılan araştırmalarda YOAK lehine kanama komplikasyonlarında azalma izlenmiştir (7-9).

Koagülasyon kaskadının farklı basamaklarına etki eden YOAK'lar mevcuttur. Dabigatran direkt faktör IIa inhibitörü etki gösterirken; edoksaban, rivaroksaban ve apiksaban direkt Xa inhibitörülerdir (10). Faktör Xa ve trombin uygun antikoagülan tedavi için, koagülasyon kaskadı ve diger biyolojik ve patofizyolojik yolakların önemli mediatörleridir (11). Yeni kanıtlar aynı zamanda faktör Xa nın proteaz aktif reseptör (PAR) aracılı hücresel yanıtın önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermiştir.Bu inflamatuar yanıta bağlı gelişen (PAR) inflamasyon ve lökosit migrasyonu sonucunda intimal hiperplazi , düz kas proliferasyonu ve ateroskleroz oluşumu gelişmektedir. Hasarlı damar endoteli , trombositler, proinflamatuar sitokinler ve kemokinler ve tissue factor (TF), factor Xa, thrombin gibi birkaç serin proteaz modülatörleri bu oluşumun major komponentleridir (11-14).

Yapılan preklinik bazı çalışmalarda faktör Xa ya da trombin inhibisyonunun koagülasyon kaskadı dışında antiinflamatuar etkileri de gözlenmiştir.Aterosklerotik plak gelişimini önlediği ve stabilizasyonunu arttırdığı yönünde veriler mevcuttur (15-18). Apolipoprotein E defektli fare modelli çalışmada endotel hasarı ve plak formasyonunu önleyici etkileri gözlenmiştir (15-16). Ayrıca femoral arter anjioplasti sonrası tavşan femoral arterlerinde restenoz oranını azalttığı bildirilmiştir (17).

Karotis arterde ateresklerozа bağlı plak gelişimi ve oluşan stenoz iskemik inmenin önemli bir sebebidir. Stenoz en sık endotel hasarının yoğun olduğu arteriyel bifurkasyon bölgesinde gelişmektedir. Etiyopatogenezinde ateroskleroz %90 ile ilk sıradadır. Fibromuskuler displazi, düz kas hücre migrasyonu ve sitokinlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Hasarlı endotel kaynaklı mediatörlerle gelişen vazoaktif süreçler sonrası fazla miktarda konnektif doku matriksi oluşturur. Son nokta fibröz plak oluşumudur (19,20). Sadece Avrupa'da her yıl bir kısmı daha sonra sekelsiz iyileşecek olan geçici iskemik atak (TİA) ve minor stroke olsa da bir milyon yeni inme vakası gerçekleşmektedir (19). TİA geçiren % 22-62'sinde takip eden 2-3 yıl içerisinde serebral infarkt gelişir ve %57'sinde iskemik ataklar tekrarlar. Karotis damar lümen alanında %50 ve üzeri darlıklar ciddi darlıklar olarak kabul edilir ve semptom gelişmesi halinde cerrahi endikasyon mevcuttur (19-21). Endarterektomi sonrası restenoz gelişimi; yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda %6–36 oranlarında tespit edilmiştir (22). İlk 24 ay içerisinde gelişen restenozlarda intimal hiperplazi, geç dönem restenozda tekrarlayan aterom plağının varlığı ön plandadır (23).

Karotis arter lezyonu olan hastalarda gerek cerrahi sonrası tedavi izleminde , gerek medikal takipte komplikasyon oluşumunu önleme amacı ile antiplatelet ajanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Henüz YOAK'lar karotis arter diseksiyonu tedavisi dışında karotis arter hastalıklarında kullanımına dair yeterli veri yoktur ve endikasyona sahip değildir (24).

Tüm bu veriler dahilinde intimal hiperplaziye bağlı restenozun önemli bir komplikasyon olduğu karotis cerrahisinde kalp ve damar hastalıklarında kullanımı sıklıkla artan rivaroksabanın intimal hiperplazi ve düz kas hücreproliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemek üzere tavsan karotis arterinde model oluşturarak etkilerini araştırmayı amaçladık.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. ARTER TİPLERİ VE HİSTOLOJİSİ

İnsana ait vasküler yapıları arterler, arteriolller, kapiller, venüller ve venler olarak sınıflandırabiliriz. Arterler kardiyak basıncı kompanse eden ana damarlardır.Distal vasküler yatağa doğru arteriol yapısı kazanarak kapiller ağa ulaşırlar. Kapillerler, ince duvarlı damarlar olup; kan ve dokular arasındaki besin maddelerinin değişimi görevini üstlenirler.

4.1.1. Elastik (Büyük - İletici) Arterler

Vücuttaki en geniş damarsal yapılar bu arterler elastik dokudan zengindir ve bu sebeple iç yüzeyleri sarı renkte izlenir. Aorta ve pulmoner arter gibi çapı 7mm den büyük damarlar bu sınıftandır. Damar duvar kalınlıkları çaplarını göre nisbi ölçüde az olmasına karşın gelişmiş bir tunika mediaya sahiptirler. Kardiyak basınç değişimlerine maruz kalan ve kompanse eden ana yapılardır. Sistolde elastik lamina elongasyonu ile basınç azaltılırken, diastolde elastik sıkışma basıncı regüle eder. Distal arterlerde bu değişkenlik azalır.

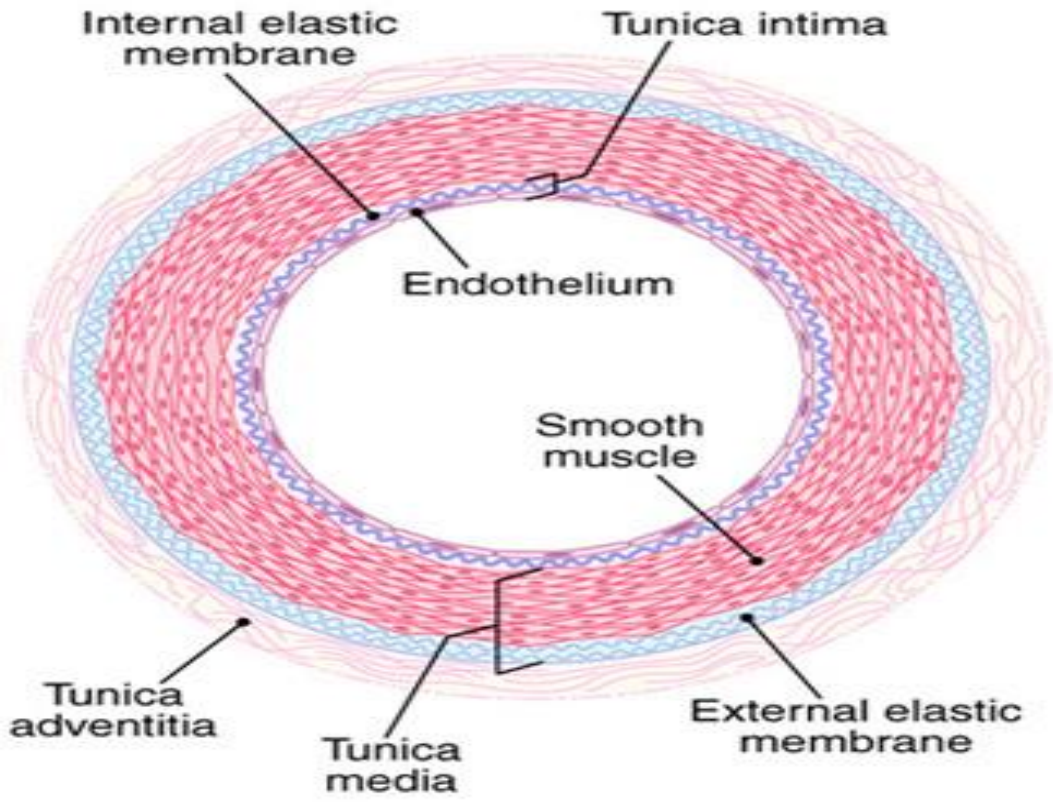
Tunika İntima: Tek katlı yassı hücrelerden oluşan endotelyum ile longutidinal yönde elastik ağlardan zengin açık renkli ince bir subendotelial tabakadan oluşmuştur.İki tabaka arasında kollajen lifler, fibrositler ve düz kas hücreleri bulunur. Endoteli oluşturan hücreler lümeni sınırlar ve kan ile temas halindedir. 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 (3). Endotel hücrelerinde 0,1 µm çapında ve 3 µm uzunluğunda Weibel-Palade Cisimcikleri (Von Willebrand Faktörü-VWF) olarak bilinen membranla çevrili elektron-dens cisimcikler vardır.Koagülasyon kaskadında rolu olan ve faktör 8 içeren bu cisimcik tüm endoteliel yapılarda üretilmesine karşın arterlerde rezerve edilir. Subendotelyal tabakada düz kas hücreleri bulunur ve intimaya göre daha kalın bir dokudur. Ekstraselüler ara madde ve fibrilleri sentezler. Membrana elastika interna intimaya ait bir yapı iken içerdiği yaygın eliastik lif miktarı sebebi ile tunica mediadan kolaylıkla ayırt edilemezler (25).

İntimal hasar sonrası düz kas hücreleri dediferasiasyona uğrar ve kontraksiyon yeteneklerini kaybederken bölünme yeteneği kazanırlar. Akut zedelenme sonrası değişimler üstteki endotel katı yeniden oluştuğu zaman ya da kronik stimulasyon ortamdan çekildiğinde nonproliferatif duruma dönebilir. Buna karşın abartılı bir iyileşme cevabı küçük ve orta çaplı damarlarda stenoz, darlık veya oklüzyona-tıkanmaya neden olabilen intimal kalınlaşmaya yol açar (3).

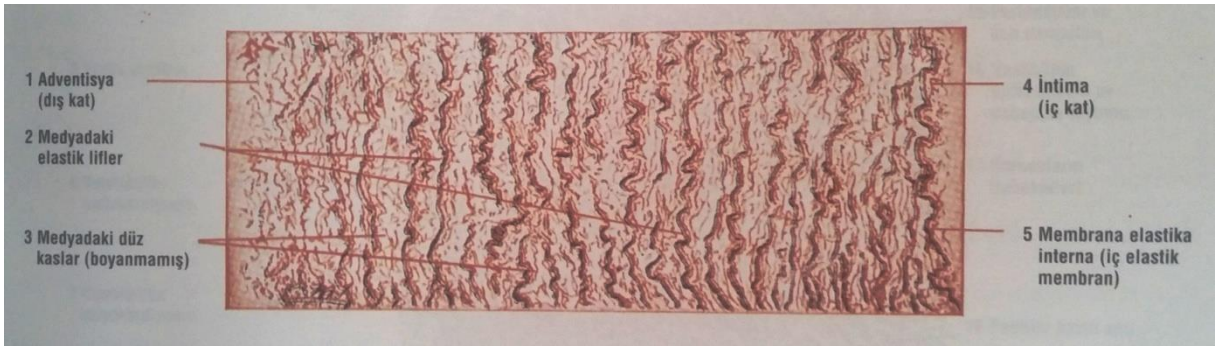
Tunika Media: Damara ait en geniş tabakadır. İçerdiği konsanstrik tarzda yerleşmiş elastik lameller sayesinde elastik tip arter olarak adlandırılırlar. Bu liflerin arası kollajen lifler ve bağ dokusu elemanları ile doldurulmuştur. Tunika medianın dış sınırında membrana elastica eksterna izlenmez. Elastik membranlar arasında düz kas, retiküler lifler, vaso vasorumlar ve kondroitin sülfat (metakromazi +) bulunur. Laminalar arasında pencere adı verilen açıklıklar bulunur.

Histokimyasal incelemede kollajen lifler açık pembe-kırmızı olarak elastik lif ve bağ dokusu hücre nükleusları açık veya koyu renkte siyah boyanırlar. Diğer hücre elemanları sarı renkte refle verirler.

Tunika Adventisya: Damara ait en dış katmandır. Ana elastik yapılı arterlerde bulunurlar. Media tabakasına göre oldukça ince yapıdadırlar. Damarın beslenmesini sağlayan vaso vasorumları içerirler. Elastik lif, sinir ve kollajen liflerden zengin bir bağ dokusudur. (Şekil 1,2).



Şekil 1: Büyük tip arter (enine kesit). Şematik çizim



Şekil 2: Büyük tip arter. Aort duvarı enine kesit. Orsein boyası-Büyük büyütme

4.1.2. Muskuler (Orta Boy-Dağıtıcı) Tip Arterler

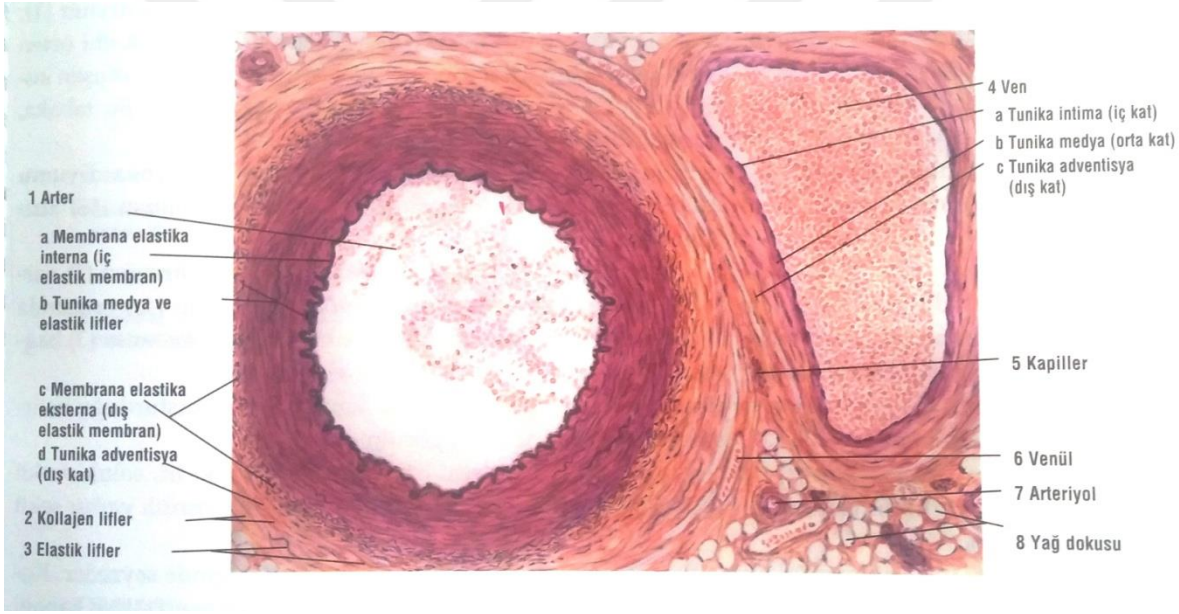
Elastik artere göre belirgin histolojik farklılıklar içerirler. Elastik komponent azalırken düz kas kitlesi artar. Belirgin membrana elastika interna ve ekstra izlenir. Çapları 2,5-7 mm arasındadır. Tunika media düz kas açısından zengindir. Bu yapılar kan akışı, lokal hormon ve nörojenik uyarıları gibi sistemik veya lokal faktörler doğrultusunda kan basıncı regülasyonunda önemli rol oynarlar.

Tunika İntima: 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 çift 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 (21).

Tunika Media: Düz kas açısından zengin kalın bir tabakadır. İntimal yüzeydeki kas tabakası longitudinal yerleşimlidir. Daha içeride yer alan düz kas tabakaları konsantrik yerleşimli olup damar çapına oranla farklı sayıda olabilir. Bu tabakayı oluşturan düz kas hücreleri visseral organdakilere göre daha küçük yapıdadır. Başlıca düz kas hücrelerinden oluşur. Düz kas hücreleri iç organ duvarındaki düz kaslardan daha küçüktür. 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 (27) (Şekil 3).

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 (28).



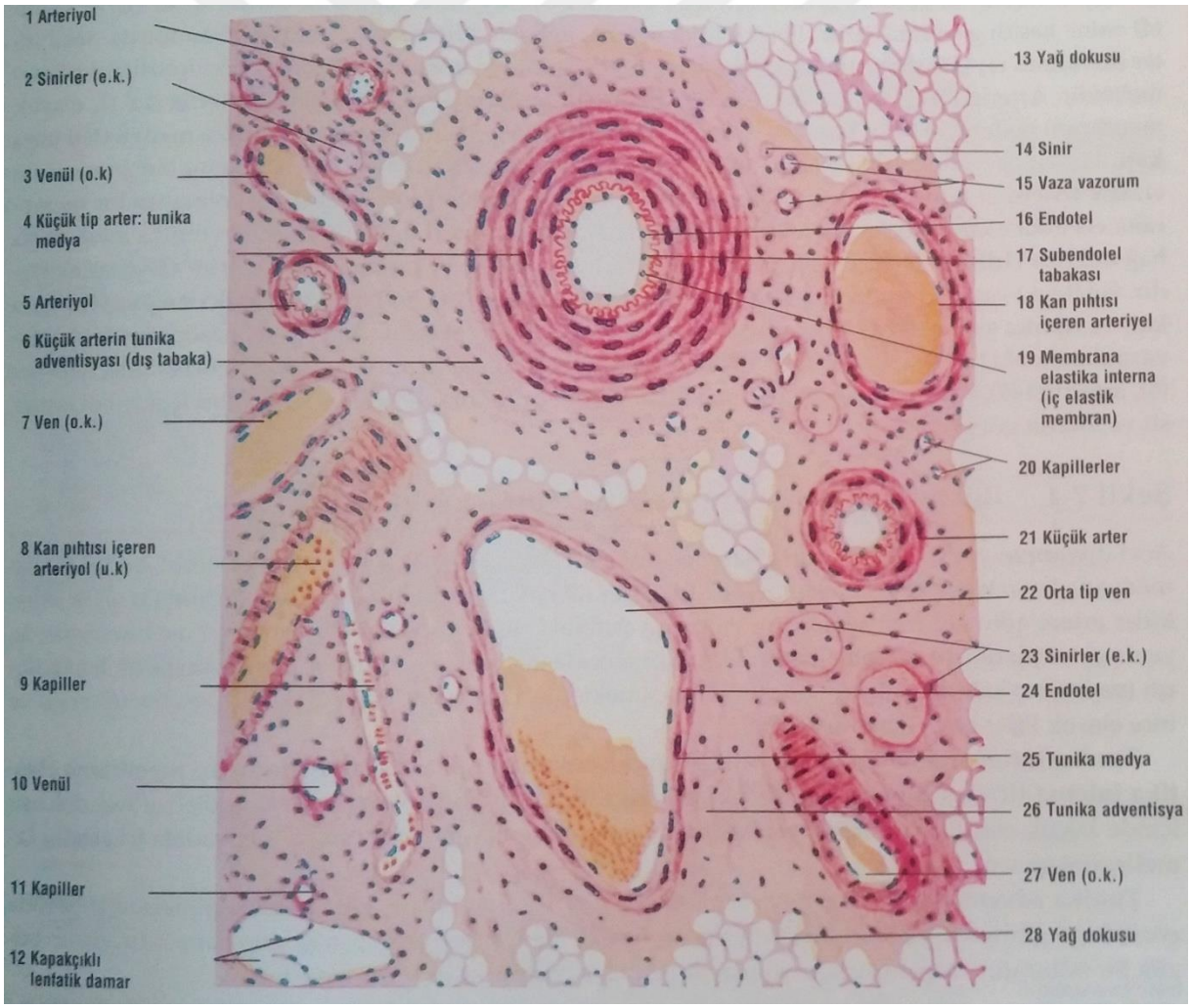
ŞEKİL 3: Müsküler tip arter (enine kesit). Elastin boyası-Küçük büyültme

4.1.3 Küçük Çaplı Arterler ve Arterioller

Distale doğru arter çapları giderek azalır. 100 mikrometreden az olan arterler küçük çaplı arter olarak adlandırılır. Bu arterlerin endotel ve çoğu zaman ayırt edilemeyen membrana elastika interna'dan oluşan basit bir intima tabakası vardır. Tunika mediada ise konsantrik dağılım göstermeyen bir-iki sıralı düz kas tabakaları bulunmaktadır. Daha küçük çaplı terminal arteriollerde ise bu tabaka tek katlıdır. Bu tabakaya yansıyan duvar gelişimine

bağlı oluşan nörohormonal etkiler ile damar çapı basınç değişimlerine karşı değişkenlik gösterir. Tunika adventisya gevşek bir bağ dokusu tabakasıdır. Membrana elastika eksterna bulunmamaktadır. Longitudinal seyirli kollojen ve elastik lifler içerir. Arterioller ise genellikle 0,5mm den az çapa sahip olup kapiller yatak öncesi arteriel yapı gösteren son damarlardır. Kesintili bir düz kas tabakası vardır. Bu yapı prekapiller genişleme göstererek prekapiller sfinkter görevi üstlenir ve basınç kontrolünü sağlar (29).

Arteriollerin kapiller ile devamlılığı ve sfinkter yapısı sayesinde ödem gelişiminin önlenmesi ve kan basıncı ayarlanmasında önemli bir görev üstlenir. Subendotelyal bağ dokusu tip III kollajen ve birkaç elastik lif içeren içerir. Büyük arteriyollerde görülen ince ve pencereli internal elastik membran görülürken bu yapı terminal arteriyollerde bulunmamaktadır. Adventisya tabakası, az sayıda fibroblast içeren fibroelastik yapıda bir bağ dokusudur (27-29).



Şekil 4: Kan ve lenf damarları. Hematoksilen boyama-orta büyütme

Arterlerin Genel Özellikleri

Arter Tipi	Çapı	T.İntima	T.Media	T.Adventisya
Elastik Arter	>1cm	Endotel Düz kas Bağ Doku	Elastik lameller Düz kas	Bağ Doku Vaza vazorum Nervi vazorum Lenfatikler
Muskuler Arter	2-10mm	Endotel Düz kas Bağ Doku Belirgin iç elastik membran	Elastik doku az Kollajen Çok miktarda düz kas	Bağ doku
Küçük Arter	0.1-2mm	Endotel Düz kas Bağ Doku İç elastik membran	8-10sıra düz kas hücresi Kollajen lif	Bağ doku
Arteriol	10-100µm	Endotel Düz kas Bağ Doku	1-2sıra düz kas hücreleri	İnce bağ dokusu
Kapiller	4-10µm	Endotel Perisit	(--------)	(--------)

Tablo 1: Arterlerin genel özellikleri

4.2. VASKÜLER ENDOTEL

4.2.1. Endotel hücre yapsı ve fonksiyonları

Endotel tüm damar yapılarında lümeni çevreyelen tek katlı skuamoz epitel hücrelerinde oluşan yapıdır. Erişkinlerde, tüm endotelin $1.6x10^{13}$ hücreden oluştuğu, yüzölçümünün 1-7 m^2 arasında değiştiği ve ağırlığının da 1 kg kadar olduğu düşünülmektedir (30). Endotel hücreleri çok köşeli olup damar duvarında tek kat olarak dizilirler ve çapları da 10-50 mikron, genişlikleri 10-15 mikron ve derinlikleride 5 mikron arasında değişir. Yapı ve kalınlık olarak farklılık gösterse de tüm vasküler yatakta benzer etki ve fonksiyonlara sahiptir.

Kan ve komponentleri ile temas halinde olan endotel aynı zamanda çevre doku ve hücrelerle de iletişimi sağlar. Endotel bütünlüğünün sağlandığı durumunda genellikle proinflamatuar, protrombotik gibi vazoaktif süreçler inaktif durumdadır. Endotel hücre

tabakası bir taraftan kontraktiliteyi inhibe ederken diğer taraftan vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını düzenler ve fizyolojik devamlılığı sağlar. Aynı zamanda önemli bir anti inflamatuar role sahip olup damarların yüzeyine ve damar dışına inflamatuar hücrelerin adezyonunu ve migrasyonunu düzenler; fibrinolitik aktivitenin devamlılığını sağlar böylelikle intravasküler hemostazdan korunulur. Bu fonksiyonlar mediatör salınımı ve metabolizması yolu ile gerçekleştirir. Endotelin, angiotensin, bradikinin, serotoin, katekolamin, adenozin ve ATP gibi dolaşan ve lokal olarak oluşan mediatörlerin etkilerinde de önemli rol oynar. Ayrıca, myokard kasılması, renal fonksiyonlar gibi endotelle ilişkili medatörlerin direk olarak etkileşimlerinde de aktif bir rol üstlenir. Endotel hücreleri fonksiyonel ve morfolojik bir şekilde aterosklerotik lezyonların gelişiminde etkilidir. Normal endotel low density lipoprotein (LDL) oksidasyonu yapar ve okside LDL'nin makrofajlarca fagositozu ile köpük hücreleri oluşur. Bu hücreler düz kasların tosununu ve çoğalmasını uyarır. Modifiye endotel hücrelerin artık koruyucu rol üstlenemezler ve aterosklerozun gelişimine yol açarlar. Endotelin değişimi¸ bu durumu, disfonksiyone veya aktive olmuş endotel olarak adlandırılır. Benzer ¸şekilde aktif terimi ekstrasellüler agonistler yoluyla hücre içinde Ca^{++} seviyesinin artışıyla ilgili olarak da ortaya çıkan durumu tanımlamak için de kullanılmaktadır.

VAZOAKTİF PROTEİNLER • Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör [(EDRF (NO)] • Endotelin • Proktasiklin (PGI2)	**BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE STOKİNLER** • 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 • Plazminojen Aktivatör İnhibitörü (PAI) • (PAI, PAI2, PAI3 ve Proteaz Neksin) • Fibronektin • F IX Bağlayıcı Protein • F V ve F XII Aktivatörü	**ANTİTOMBOTİK VE ANTİKOAGÜLAN FAKTÖRLER** • Doku Plasminojen Aktivatörü (t-PA) • Trombomodulin • Protein – S • EDRF (NO) • Ekstrinsik Sistem İnhibitörü (TTPAI) • Antitrombin III • PGI-2

Tablo 2. Endotel hücresinde sentezlenen ve salgılanan biyoaktif maddeler.

Endotel hemeostaz sürecinde hem koagülan hem de fibrinolitik süreçlerde kritik öneme sahiptir. Disfonksyone endotel sebebi ile kanama veya tromboz gibi pek çok vasküler klinik sorunla karşılaşılabilir. Aynı zamanda anjiogenesis ve fibroz doku gelişimi de endotel kaynaklı mediatörlerle gerçekleşen vazoaktif süreçlerdir. Bu biyoaktif süreçlerle lokal ve sistemik etkiler oluşturabilmektedir. Endotel hasarı prokoagülan, fibrotik ve inflamatuar yanıtın bir arada olduğu kompleks bir süreci başlatmaktadır.

4.2.2. Endotelle İlişkili Vazoaktif Mediatörler

Endotel hücreleri aktive halde iken pek çok mediatör salgı ve metabolizmasını gerçekleştirebilir. Vazodilatatör etkili endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ve prostasiklinler istirahat halinde endotelden başlıca salınan vasküler tonus inhibitörleridir.. Prostasiklinler siklik adenozin monofosfat (cAMP) , Nitrik oksit (NO) ise siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden vazodilatatör etki gösterir. Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) de düz kas hücrelerinde belirgin relaksasyon yaratır. Aynı zamanda trombosit agregasyonu ve trombosit adhezyonunu inhibe edici özellikleri de vardır. Endotelyal hücreler kendi ürettiği mediyatörlerin yanı sıra dolaşımda bulunan trombin, bradikinin, ADP ve ATP gibi vazodilatör ve vazokonstriktörlerce de fonksiyonları kontrol edilir (31). Bu etmenler vazomotor tonüs kontrolüne etkir. Platelet aktive edici faktör (PAF) tromboz oluşumunda etken iken, anjiotensin II güçlü vazkonstriktör yapısının dışında güçlü antidiüretik ve fibrotik etkileri vardır (32).

ENDOTELDEN SALINAN MEDİYATÖRLER
Vazodilatör mediyatörler
Adenozin
Nitrik Oksit
Endotel Kaynaklı Relaksan Faktör (EKRF)
Prostasiklin (PGI_2)
Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör (EKHF)
Vazokonstrüktör mediyatörler
Endotelin-1 (ET-1)
Anjiyotensin II
Endotel Kökenli Konstrüktör Faktör (EKKF)
Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

Tablo 3: Endotel kaynaklı vazoaktif mediyatörler

4.2.3 Vasküler Hastalıklarla İlişkili Düzenleyici Mekanizmalar

Ateroskleroz gelişiminin başlangıç safhasında endoteliel aralığa LDL'nin oksidasyon ve yerleşimi ile karakterizedir (31). Hasarlı dokudan salınan kemotaktik faktörler sayesinde kan içerisindeki monositler subendotelyal aralığa gelirler ve bu lipidleri fagosite ederler.Aynı sekilde düz kas hücreleri de bölgeye göç ederek burada prolifere olur ve sekretuar özellik kazanır. Fibrotik süreç bu hücrelerden salınan kollajen, elastin ve proteoglikan sentezi ile başlar (33,34). Endotel hücreleri aktif bir şekilde adezyon molekellerini (vasküler hücre adhezyon molekülü -VCAM- , interselluler hücre molekülü -ICAM-) eksprese ederek, makrofaj kemotaktik protein (M-CSF) salgılayarak monosit ve makrofajların migrasyonunu, proliferasyonunu, differansiyasyonunu ve metabolizmasını düzenler. Bu ekspresyon sırasında serbest oksijen radikalleri de oluşur (34). Nitrik oksit (NO) ise endotel yüzeyine monositlerin ve nötrofillerin adhezyonunu inhibe ederek antiinflamatuar etki gösterir. NO, LDL'nin oskidatif metabolizmasını önleyerek aterojenik potansiyel kazanmasını önler (35). Bu radikaller damar duvarında oksidatif stres oluştururken LDL oksidatif değişikliklere yol açar. Minimal modifiye LDL monositlerin endotel yüzeye adezyonunu artırır ve makrofaj kemotaktik protein 1(MCP-I), M-CSF ve GM-CSF ínin ekspresyonuna neden olur (34,35). Aktive nötrofil ve makrofajlarlar tarafından güçlü vazodilatatör etkili NO salınır. Sitotoksik etkili bu molekül hücre büyümesini durdurur. Çeşitli bakteri, mantar ve protozoaya karşı önleyici etki gösterir. Sepsiste aşırı salgınımı şok gelişiminde rol alır. Süperoksitler ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit (ONOO) hidroksil radikalleri oluşumuna yol açaral sağlıklı dokulara da zarar vermektedir. Endotoksik şok tablosunda gelişen humoral yetmezlik kontraktil disfonksiyonda ONOO'nun rol oynadığı düşünülmektedir (35). Ayrıca deoksiribonükleik asit (DNA) üzerindeki etkileriyle genotoksik ve sitotoksik etkili olduğu interferon γ, tümör nekroz faktör-a (TNFa), interlökin 1b (IL-1b) v G-CSF gibi sitokinler NO oksitlenmesini indükler. Sonuç olarak NO'nun artması ile aşağıdaki olaylar gelişir (36):

- 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

.

4.2.4. Endotel Hasarı ve İntimal Hiperplazi

Arter duvarında farklı iki mekanizma ile hasar gelişimi gerçekleşir. İlki artere yönelik girişime bağlı mekanik hasar ile oluşur (edarterektomi, trombektomi, diseksiyon…). İkicisi ise non-arteriyel yapıların damar endoteli ile teması sonrası görülür (sentetik greftler, stentler, otolog ven greftleri) (37).

Her invaziv endotelde değişen oranda hasara neden olmaktadır.Travmaya sekonder gelişen subendotelyal fibroproliferasyon ve neointima oluşması endotel hasara karşı intimal yanıt kaynaklıdır. 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 (38).

Arteriyel hasara intimal yanıt üç aşamada oluşur. İlk 24 saat içindeki reaksiyon mediada düz kas hücre proliferasyonudur. Endotel hasarı sonrası açığa çıkan faktörler ile trombositler adhezyon ve agregasyonu oluşmaktadır. Damar duvarına yapışan aktive olmuş trombositlerden büyüme faktörleri gibi mitogenler salgılanmakta bu da düz kas hücrelerinin intimaya migrasyonuna neden olmaktadır. İkinci aşama takip eden 72 saat içersinde başlar ve böylece neointima şekillenir. Neointima bir kez oluşunca düz kas hücreleri ile hızla prolifere olur, ardından lümeni daraltacak bir tabaka oluşması yaklaşık 14 gün sonra ise 3. aşamada olur (39,40).

Media tabakasında düz kas hücre proliferasyonu ve intimaya migrasyonunun iki farklı büyüme faktörü tarafından tetiklendiği gösterilmiştir. Bunlar temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)'dir. 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 (40).

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 (41).

İntimaya ulaşabilen hücrelerin sayısı hasar sonrası mediada sağ kalabilen hücre sayısı ile ilişkilidir. Normalde hücreler, arteriyel 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 sağ kalımını 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 (41).

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 tüketimini de azaltmaktadır (42).

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).

İntimal hiperplazi gelişiminde iki temel teori vardır. Bunlar endotel hasarına cevap ve remodeling oluşumudur. Kan basıncındaki dalgalanmalara karşı adaptasyon amaçlı arteriyel çap değişimi ve kronik zeminde damar duvarında adaptif değişimler gözlenir.

Damarda çap değişimi duvar stresine bağlı olmaktadır. Shear stress olarak adlandırılan bu kuvvet longıtudinal doğrultuda olup çap ile ters ve akım ile doğru orantılıdır.

$$\text{Shear stress (Tw)} = \text{viskozite} \times \text{akım} / \text{çap}$$

Böylece çaptaki küçük azalmalar bile duvar shear stresinde büyük artışlara neden olabilir. İnjüriden sonra trombositler adhere ve degranüle olurlar. Shear stresin normal değeri 15 dyne/cm^2 dir. Kan akımındaki artışın neden olduğu Tw artışına engel olmak için damar çapı artar. Deneysel AV fistüllerde; kan akımı 10 kat artarken, shear stres üç 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 (43).

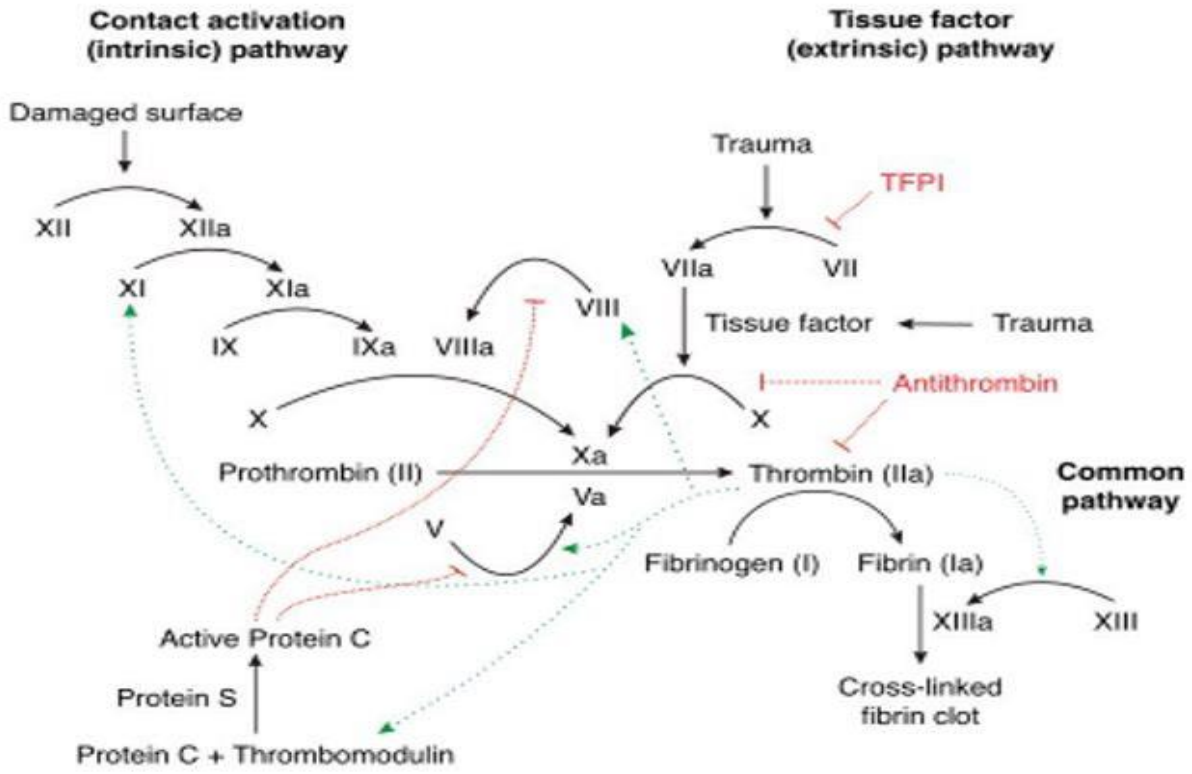
24 saat sonra mediada düz kas hücresi proliferasyonu başlar. Düz kas hücre sayısındaki artış günde normaldeki %0.06'dan %10-30'a çıkar. Dört gün sonra mediadan intimaya göç başlar. Bazı hücreler intimaya geldikten sonrada proliferasyon devam eder. Ekstrasellüler matrikste (kollajen, elastin, proteoglikan) 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), PDGF-AA (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 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 guanozin monofosfatı (cGMP) arttrarak NO oluşumunu arttırır (44).

4.2.5 Endotel ve Koagülasyon

Glikokaliks olarak adlandırılan endotel hücrelerinin iç yüzü normal koşullarda trombojenik değildir ve bu nedenle de pıhtı oluşumuna direnç gösterirler. Sakin ve istirahat halinde bulunan damar endoteli, temelde antikoagülan bir aktivite içerir. Endotelin en önemli fonksiyonu, damar içinde anti-trombotik bir yüzey oluşturarak koagülasyon kaskadını inhibe etmektir. Endotel hücrelerinin bu görevi yerine getirebilmeleri için zorunlu olan olay ise trombin aktivasyonunu ve onun oluşumunu önlemektir. Aksi halde trombin, birçok koagülasyon faktörü aracılığı ile koagülasyon kaskadını ve trombositleri kolayca aktive eder. Endotel hücreleri heparan sulfat salgılayarak antitrombin-III (AT-III)'ü stimüle ederler. AT-

III, bir plazma glikoproteini olup; thrombin (IIa), VIIa, IXa, Xa, XIa ve XIIa gibi koagülasyon faktörleri ile kovalan bir bağ oluşturak onları nötralize etmektedir.



Şekil 5. Koagülasyon kaskadı

Endotel koagülasyon kaskadını klasik olarak hem intrensek hem de eksternsek yolak üzerinden başlamasında sorumludur. Herhangibir nedenle endotel hücrelerinden salınan doku faktörü (TF), Faktör VII'yi, onun edimsel şekli olan VIIa'ya dönüşür. İntrensek yolak hasarlı endotel hasarı sonucu faktör XII (Hageman Faktör-HF) etkileşimi ile başlar.Ancak doku faktörünün karşıtı olan doku faktör yolu inhibitörü (TFPI) de, doku faktörü (TF)'nün salınmasından hemen sonra vasküler endotelden salınır ve trombini (IIa) bağlıyarak onu inaktive eder (45,46). TFPI, tek zincirli bir polipeptid olup revesibl olarak trombin (IIa)'nın yanı sıra faktör Xa'yı da inhibe etmektedir. Xa'ya bağlanan TFPI (Xa+TFPI kompleksi), daha sonra VIIa+doku faktörü (TF) kompleksini inhibe etmektedir. Bilindiği üzere, VIIa; hem faktör X'nu Xa'ya ve hemde faktör IX'u, IXa'ya çevirerek koagülasyon sisteminin intrensek, ektrensek ve anayol'dan uyarılmasına ve bu nedenle de tromboz oluşmasına neden olur, ancak bu reaksiyon TFPI tarafından yukarıda açıklandığı üzere inhibe edilir (47). Tromboz oluşumuna engel olan diğer bir mekanizmada thrombin-thrombomodulin kompleksidir. Endotel hücreleri aktive olduklarında hücre yüzeyinde trombomodulin oluştururlar ki bu

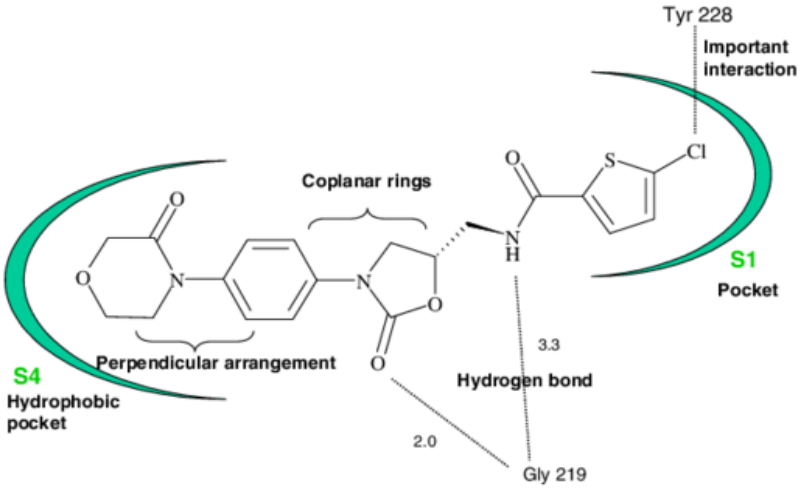
trombinin spesifik resöptörü olarak bilinir (48,49). Trombomodulin (CD 141), trombinin (IIa) protein C (PC)'yi aktivasyonu sırasında kofaktör olarak rol oynar. Trombin-trombomodulin kompleksinin herhangi bir prokoagülan etkisi yoktur ancak karaciğer tarafından sentez edilen PC'yi, edimsel Protein C (APC) şekline dönüştürür ve daha sonra da APC, önceden aktive olmuş faktör V ve VIII (Va, VIIIa)'i etkisiz hale getirir. Gerek karaciğer ve gereksede endotelde sentez edilen protein S (PS), bu reaksiyonda kofaktör olarak rol oynar (50). Trombin-trombomodulin kompleksi, aynı zamanda trombinle aktive fibrinoliz inhibitörü (TAFI)'nü bölerek onu edimsel şekline (TAFIa) dönüştürür ve böylelikle de fibrinolitik aktiviteyi inhibe eder (51). Tüm bu açıklamalardan anlaşıldığı üzere, sağlıklı endotel, normal koşullarda dengeyi antikoagülan faktörler yönüne doğru çekmektedir. Ancak bu denge endotel zedelenmesi durumlarında kolaylıkla prokoagülan aktivite yönüne de çekilebilir. Aktive olan endotel, tromboza kolaylıkla eğilim gösterir. Bakteryel endotoksinler, inflamatuar sitokinler (ör. IL-1, IL-6, TNFa) ve glikolize olmuş proteinler endoteli aktive ederek prokoagülan bir ortam oluştururlar. Bu süreçte, endotel hücrelerinin antikoagülan ortamdan prokoagülan ortama dönüşmesi söz konusudur ve bu durum sonuçta doku faktörü (TF)'nün salınımına neden olur. Normalde endotel üzerinde doku faktörü bulunmaz ancak bazı koşullarda (ör. trombin jenerasyonu, endotoksin, sitokin, hipoksi, okside olmuş lipoproteinler ve duvar stresi) ile doku faktörü yapımı aktive olabilir. Daha önce de tartışıldığı üzere doku faktörü, faktör IX ve faktör X'u aktive eder (IXa, Xa) ve sonuçta protrombinaz aktivitesi oluşturarak fibrinojenin fibrine dönüşümüne neden olur (52,53). Açığa çıkan trombin, endotel yüzeyinde bulunan trombin reseptörlerine (proteaz edimsel reseptör-1, PAR-1) bağlanır. Bu bağlanış endotel yüzeyinde değişiklikler oluşmasına; doku faktörü (TF), nitrik oksit (NO), endotelin (ET), platelet aktive edici faktör (PAF) ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) gibi faktörlerin endotel yüzeyinden salınımına neden olur.

4.3 RİVAROKSABAN

Tromboemboli profilaksi ve tedavisinde uzun yıllar oral vitamin K antagonisti (VKA) warfarin tek ilaç olarak kullanılmaktaydı. Efektif olmasına karşın dar teröpatik aralığı, yoğun ilaç ve besin etkileşimi olması ve major kanama komplikasyonlarının gözlenmesi kullanımını sınırlamaktaydı. Bu sebeple VKA'ya oranla daha az yan etki profiline sahip ilaçlar üzerinde çalışmalar yapılmaktaydı. İntrensek ve ekstrensek yolağın birlieştiği faktör X üzerinden direkt etki gösterecek preperatlar son yıllarda bu ihtiyaç doğrultusunda geliştirildi (54).

Rivaroksaban direkt, spesifik, yarışmalı Faktör Xa inhibitörüdür. Serbest ve fibrine bağlı Faktör Xa aktivitesini ve protrombinaz aktivitesini inhibe ederek antikoagülan etki

sağlar. Böylelikle yeni trombin oluşumunu inhibe eder. Buna karşın trombinle uyarılan platelet agregasyonu üzerinde doğrudan etkisi bulunmamaktadır. Etken metabolite dönüşmeden direkt etkili antikoagülandır.



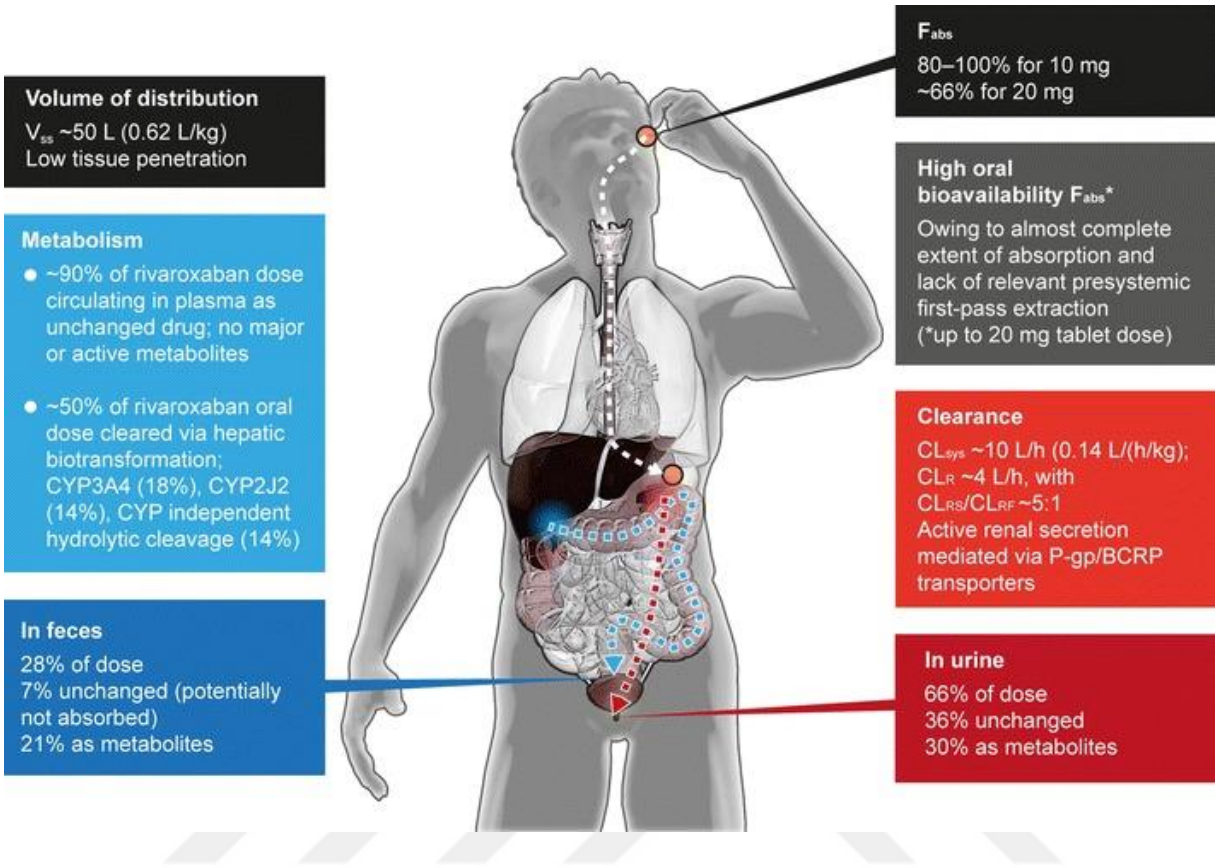
Şekil 6. Rivaroksabanın biyokimyasal yapısı

Rivaroksaban oral uygulamayı tabiden hızlı emilir. Oral biyoyararlanımı 10 mg'lık doz için %80-100'dür. Artan dozlarda düşmektedir. Plazma proteinlerine %92-95 civarında bağlanır. Hızlı emilim sonra kanda pik seviyeye 2-4 saat sonra ulaşır. Rivaroksaban yarı ömrü oral alımın ardından genç hastalarda 5-9 saat arasında iken yaşlı hastalarda bu süre 11-13 saate çıkabilmektedir. Farmakodinamik etkileri plazma kontrasyonu ile sıkı korelasyon gösterir. Faktör Xa aktivite inhibisyonu için farmakodinamik ve farmakokinetik etkileri Emax modeli ile uyumludur. Protrombin zamanına ise lineer etkinlik gösterir (55).

Rivaroksaban, birden fazla yolak ile elemine olduğundan belirgin sitokrom P450 gibi veya bilinen diğer enzimatik aktivasyonlarla hızlı metabolize edilmez. Belirgin ilaç etkileşimi yoktur. Çoğunlukla aktif metabolit idrarla atılır. Yaklaşık 1/3'ü ise inaktif metabolit oluşumu ardından itrah edilir. Kalan dozun önemli kısmı karaciğer eleminasyonu sonucu feçesle atılır.

435.88 kD ağırlıklı kompleks bir moleküldür. Düşük çözünürlüklü yüksek permabiliteli ilaç olarak sınıflandırılmaktadır (class II). Rivaroksaban suda çözünürlüğü zayıftır (5–7 mg/L; pH1–9), fakat polietilen glikolde oldukça iyi çözünmektedir (2,431 mg/L). Lipid çözünürlüğü ise orta seviyededir. Tüm bu hidrofobik ve lipofilik özellikler onun periferal dokulara affinitesini düşürmektedir (56).

Etkisini kompetetif gösterir ve diğer serin proteazlara karşı faktör Xa selektivitesi oldukça yüksektir. Herhangi bir kofaktör gereksinimi olmadan direkt etkilidir (56,57).



Şekil 7. Rivaroksaban'ın farmakokinetiği

İlaç biyoyararlanımı ve etkin doz konusunda çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. İlaç etkin dozunun yaş, cinsiyet, ırk ve beden kitle indeksi değişimlerinden fazla miktarda etkilenmediği belirlenmiştir (58-61). Düşük renal klirens hastalarında ise glomerüler filtrasyon hızına (GFR) göre doz ayarlaması yapılması ve uzun süreli kullanımda GFR takibi önerilmektedir (62). Gebe ve çocuklar ile ilgili veri bulunmamakta olup bu hasta popülasyonlarında kullanımı sakıncalıdır.

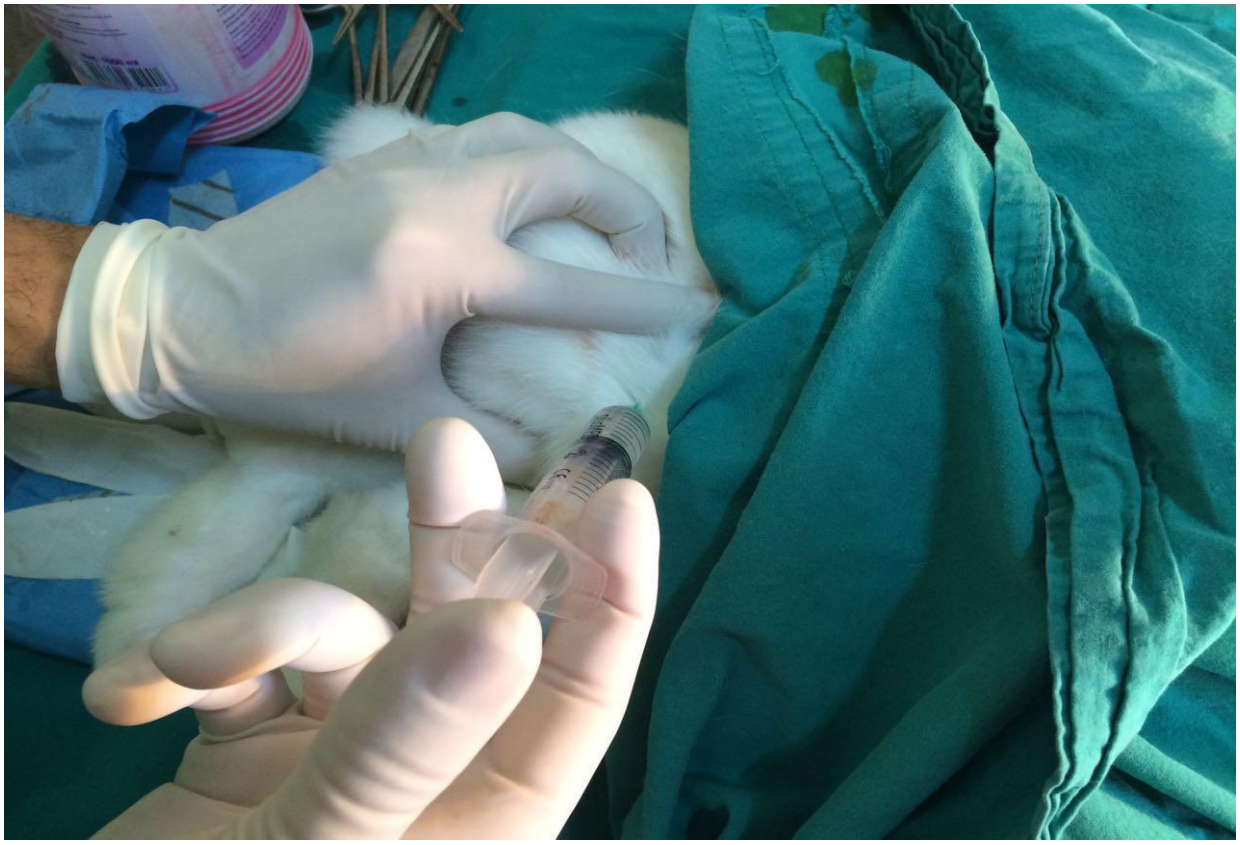
İlaç şu anda NVAF, PTE ve VTE tanılı hastaların tedavi ve takibinde endikasyon almıştır. Fakat yakın zamanda koroner arter hastalığının (KAH) sekonder korumasında etkilerini araştıran çalışmalar yapılmıştır (63).

Rivaroksaban'ın etkilerinin akut kanama gibi komplikasyonlarda ya da major cerrahi öncesi geri döndürülebilmesi için spesifik bir antidot şimdilik bulunmamaktadır. Andexanet alfa ile yapılan çalışmalar sonucunda henüz yeterli veri yoktur. Taze donmuş plazma ya da kriyoprepisitat gibi kogülasyon faktörleri içeren kan ürünleri replasmanı önerilmektedir.

5. MATERYAL VE METOD

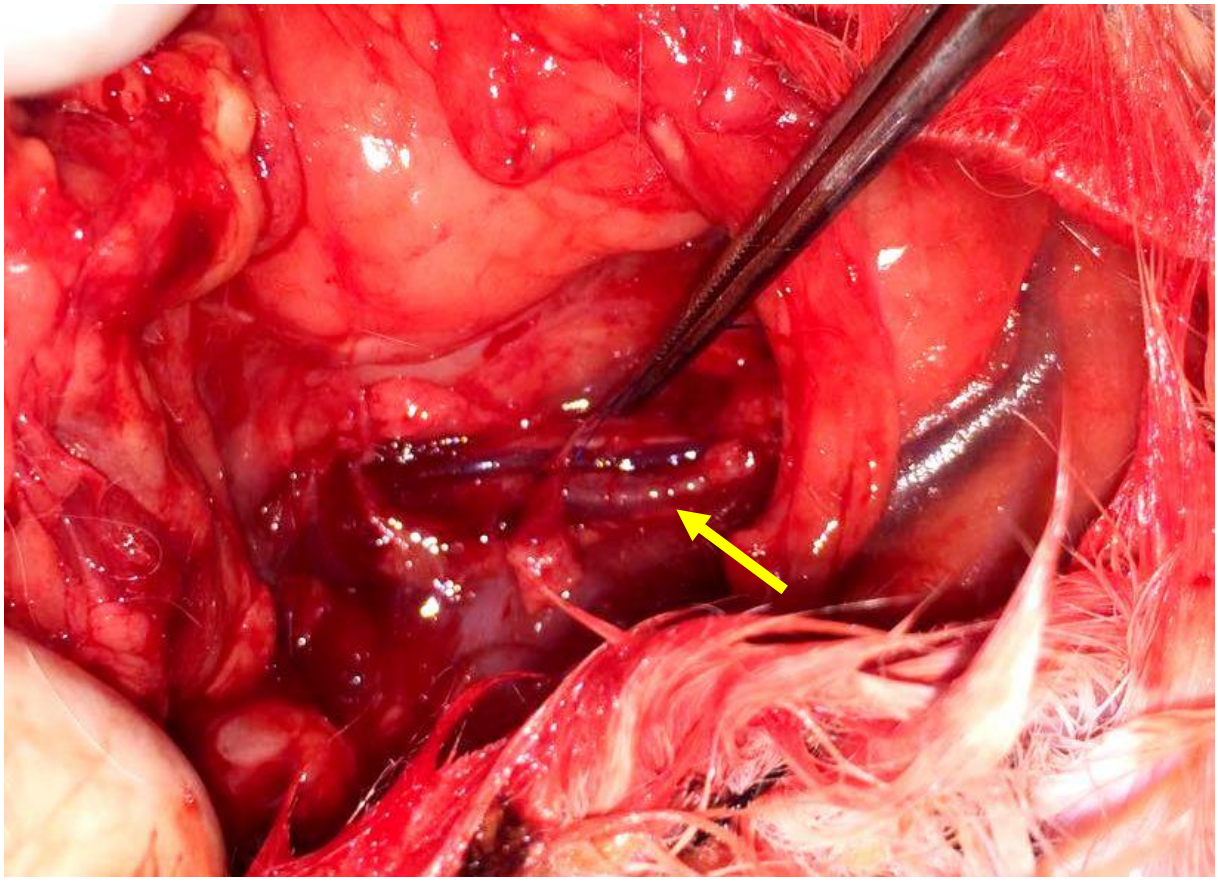
5.1. ÇALIŞMA PLANI

Çalışmamızda randomize olarak seçilen, ortalama 3-3.5 kg ağırlığında 14 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanıldı. Çalışma süresi boyunca tüm denekler aynı ortamda (20±2C° sıcaklıkta, havalandırma tertibatı olan ve güneş ışığı alabilen bir oda) bakıldılar ve tavşan yemi ile beslendiler. Tavşanlara anestezi olarak gluteal kasa 50 mg/kg intramuskuler (IM) Ketamin (Ketalar, Pfizer, Türkiye) ve 5 mg/kg intramuskuler Ksilazin (Alfazyne, Alfasan, Hollanda) IM uygulandı.



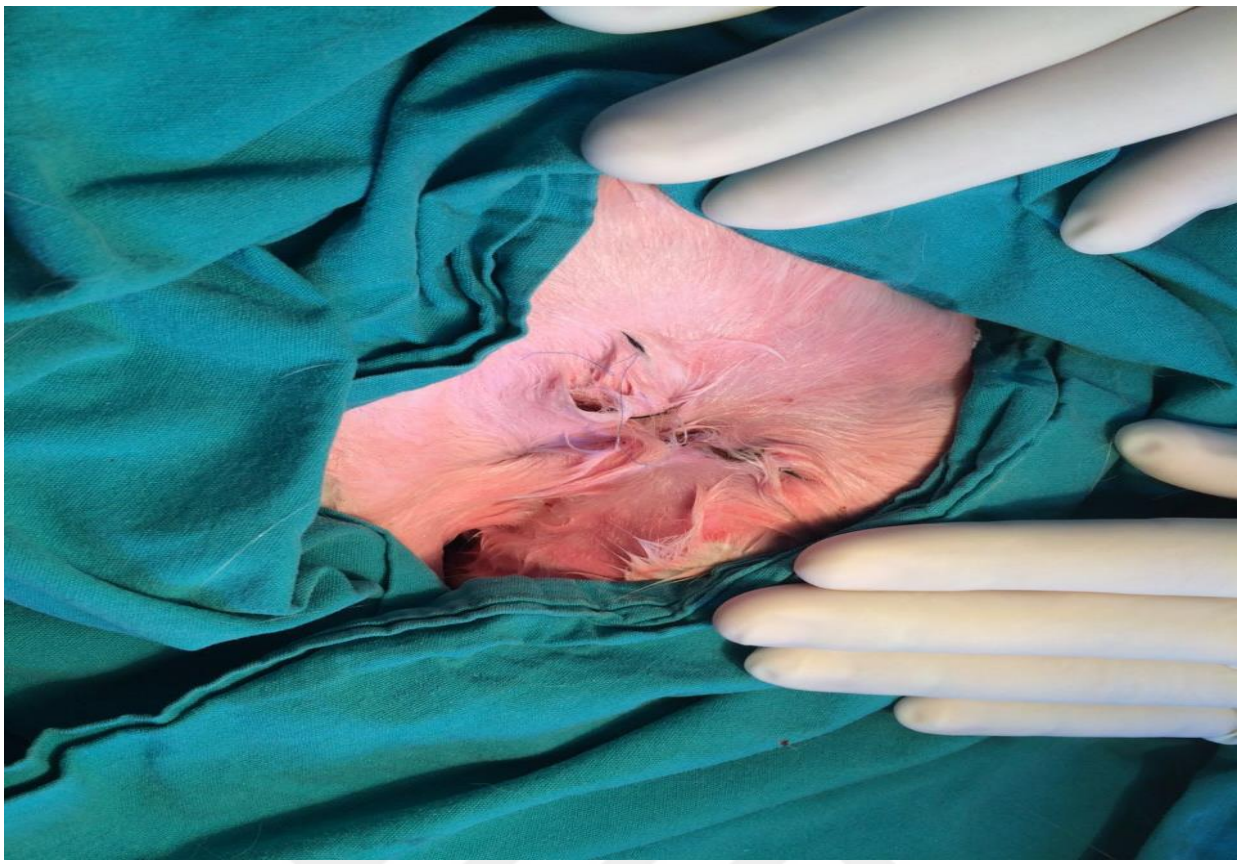
Şekil 8. Tavşanda intramusküler anestezi uygulaması

Cerrahi sırasında daha enfeksiyon koruması ve daha iyi görüntü sağlaması amacı ile bistüri ile traşlamanın ardından hibitanol ile yıkama yapıldı. Çalışmadaki tüm anastomozlar aynı araştırmacı tarafından yapıldı. Cerrahi sırasında 3.5x loupe (Design For Vision-Yeoman) kullanıldı. Bütün deneklerin anastomoz için sağ taraf karotis arteri tercih edildi. Sterilizasyon sağlanarak uygun pozisyon verildi. Tavşanlara vertikal kesi yapılmasının ardından derin diseksiyon ile ana karotis artere ulaşıldı.



Şekil.9 Süturasyon sonrası karotis arter görünümü

100 IU/kg dozda IV Heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat, Türkiye) uygulandı. Heparin uygulamasından bir dakika sonra karotid arter proksimal ve distalinden buldog klemple klemplendi. Karotid arterlerde yaklaşık 1cm uzunluğunda vertikal tam kat kesi yapıldı. Daha sonra 8/0 polipropilen sütür ile continue teknikle dikilerek onarım tamamlandı ve sonrasında dokular anatomik planda kapatılarak işlem sonlandırıldı.



Şekil.10 İşlem sonrası insizyon hattı

Postoperatif tüm gruplardaki tavşanlar 28. günün sonunda aynı cerrahi protokol izlenerek opere edildi. 5 mg/kg'dan IM ksilazin ve 50mg/kg dozunda IM ketamin ile anestezileri sağlandıktan sonra anastomoz yapılan karotid arter segmenti çıkarılarak incelenmek üzere DEÜ Histoloji Laboratuvarı'na gönderildi.

Tavşanlar 150 mg/kg pentotal ile sakrifiye edildi. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopisinde incelenecek olup ayrıca elde edilen görüntüler digital görüntü analiz programı ile kesitler incelenerek lümen çapı, lümen alanı, intima kalınlığı, media kalınlığı hesaplanarak sonuçlar değerlendirilecektir.

5.2 DENEY PROTOKOLÜ

Grup A: Bu gruptaki tavşanlar kontrol grubunu oluşturmaktadır. Herhangi bir ilaç uygulanmamıştır. Yirmi sekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ taraf karotis arter segmenti çıkarılarak histoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

Grup B: Bu gruba, grup A ile aynı protokol uygulanmıştır. Farklı olarak tavşanlara preoperatif 7 gün postoperatif 28 gün süreyle 3mg/kg rivaroksaban, 2'şer ml sıvıda

çözülerek oral yoldan verilmiştir. Yirmi sekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ karotid arter segmenti çıkarılarak histoloji laboratuarına gönderilmiştir.

5.2.1. Histokimyasal İnceleme

Damar dokusu histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fiske edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 4)

İşlem	**Madde**	**Süre**
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

Tablo 4: Doku takip protokolü.

5.2.2. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 5).

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boya protokolü.

5.2.3. Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60˚C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçiridi. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinden dokular üzerine 4 damla weigert hematoksilen boyası ile 4 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi 4 dakika sonra uzaklaştırıldı. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı 4 dakika bekletilen kesitler distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 10 dakika muamele edildikten sonra uzaklaştırıldı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın

ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 6).,

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda Isısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda Isısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:1 + No:2 solüsyonu	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:3	4 dakika
Boyama	No:4	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:5	10 dakika
Boyama	No:6	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 6: Masson Trikrom boya protokolü**.**

5.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Veriler Statistical Package for the Social Sciences for Windows Evaluation v. 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, ortanca ± standart sapma (minimum - maksimum değer) değeri olarak verilmiştir. Grupların 7'şer denekten oluşması dolayısıyla sınamalarda parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Çoklu grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, iki grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U sınama yöntemi kullanılmıştır. Sınamalarda %95 güven aralığı ile p değeri 0.05'in altında olan değerler istatistiksel olara anlamlı kabul edilmiştir.

6. 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 veya nörolojik komplikasyon gelişmemiştir. Alınan dokulardan yapılan kesitlerde lümen çapı, lümen alanı, intima kalınlığı, intima alanlarının oranı değerlendirilmiştir (Şekil 13). Ölçülen parametrelerin ortanca ± standart sapma değerleri ile birlikte minimum ve maksimum değerleri özetlenmiştir. (Tablo 7)

			Valid N	Mean	Standard Deviation	Median	Minimum	Maximum	P value
GRUP	A	LÜMEN ÇAPI (µm)	7	527,45	116,14	513,04	476,49	779,62	
	B	LÜMEN ÇAPI (µm)	7	710,55	88,33	783,89	725,947	860,82	P=0,001
GRUP	A	LÜMEN ALANI (µm²)	7	258.616,93	164,53	231.363,07	171504	447.037,55	
	B	LÜMEN ALANI (µm²)	7	243.505,33	580.22	513.384,90	402.420,90	726.744,20	P=0,004
GRUP	A	İNTİMA KALINLIĞI (µm)	7	33,286	5,14	37,626	22,6133	69,946	
	B	İNTİMA KALINLIĞI (µm)	7	12,415	3,25	13,016	10,54	15,2366	P=0,001
GRUP	A	MEDİA KALINLIĞI (µm)	7	142,6533	32.14	133,806	108,956	161,5033	
	B	MEDİA KALINLIĞI (µm)	7	104,965	29,766	101,5866	86.99	115,976	P=0,002

Tablo 7. Çalışma gruplarının sınanan değişkenler açısından ortanca ± standart sapma ve minimum-maksimum değerleri

NPar Tests

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Lümen alanı	14	362179,61	152291,29158	92819,61	529784,35
Lümen çapı	14	679,9562	144,73360	476,49	860,82
İntima kalınlığı	14	28,1345	21,46461	10,54	69,946
Media kalınlığı	14	123,8774	53679,89578	86,99	161,5033
Grup	14	1,5000	,51887	1,00	2,00

Tablo 8: Tüm deney hayvanlarında NPar test ile istatistiksel veri analizi

Mann-Whitney Test

	Grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Lümen alanı	A	7	4,00	28,00
	B	7	11,00	77,00
	Total	14		
Lümen Çapı	A	7	4,43	31,00
	B	7	10,57	74,00
	Total	14		
İntima Kalınlığı	A	7	11,00	77,00
	B	7	4,00	28,00
	Total	14		
Media kalınlığı	A	7	10,66	75,00
	B	7	5,00	36,00
	Total	14		

Tablo 9: Gruplar arası Mann-Whitney testi ile veri analiz

6.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi

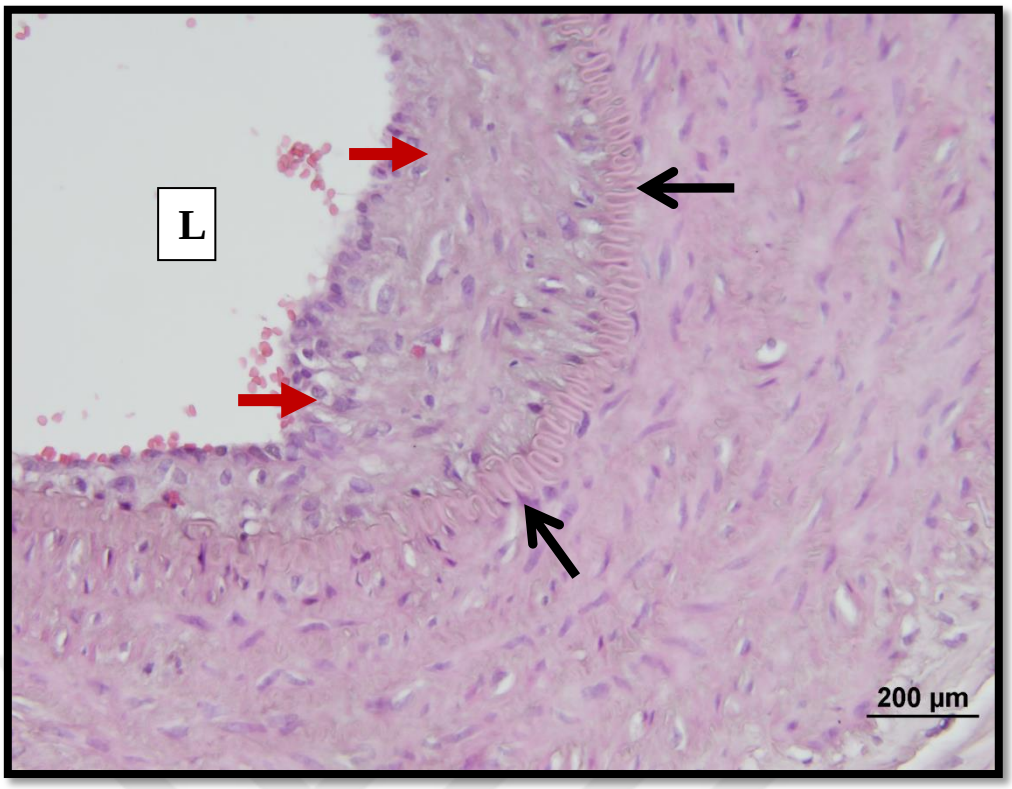
Kontrol grubu:

Uçuca anastomoz oluşturulan deneklere ait hematoksilen- eozin boyalı damar doku kesitleri incelendiğinde, özellikle intimal alanda hiperplazi gözlendi. İntimal hiperplazi tüm lümende aynı oranda değildi. Bazı damar dokusuna ait intimal bölgelerde daha yoğun gözlenirken, bazı bölgelerde daha az göze çarptı. Ayrıca lümen alanındaki daralmada dikkati çekti. Yapılan steorolojik incelemelerde lümen alanı, lümen çapı ve intima kalınlığı dikkate alındığında ilaç verilen gruba göre; lümen alanı, lümen çapının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, intima kalınlığın ise istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı (p=0,002) saptanmıştır (Resim 12,14).

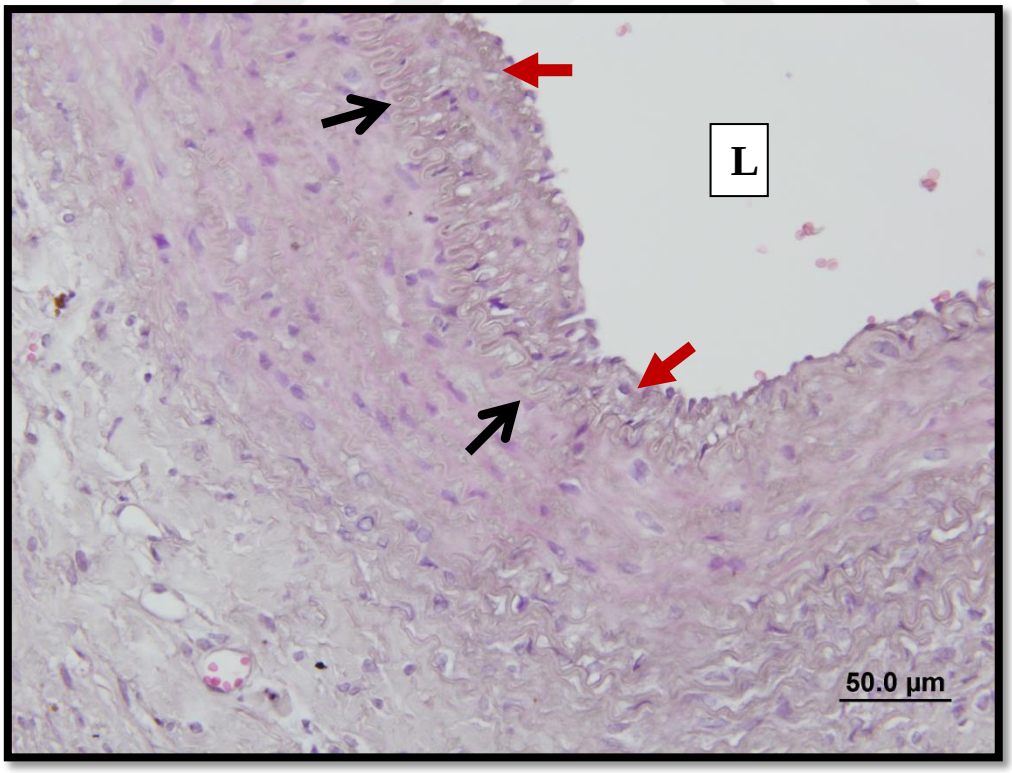
Kontrol grubunun morfometrik ölçüm değerleri (Tablo 7) , (Tablo 8)



Şekil 11: Kontrol grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazi (➔) görülmektedir. H&E x10 büyütme. Bar 200µm.



Şekil 12: Kontrol grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazi kırmızı ok (➔), siyah ok (➔) internal elastik membran görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50µm.



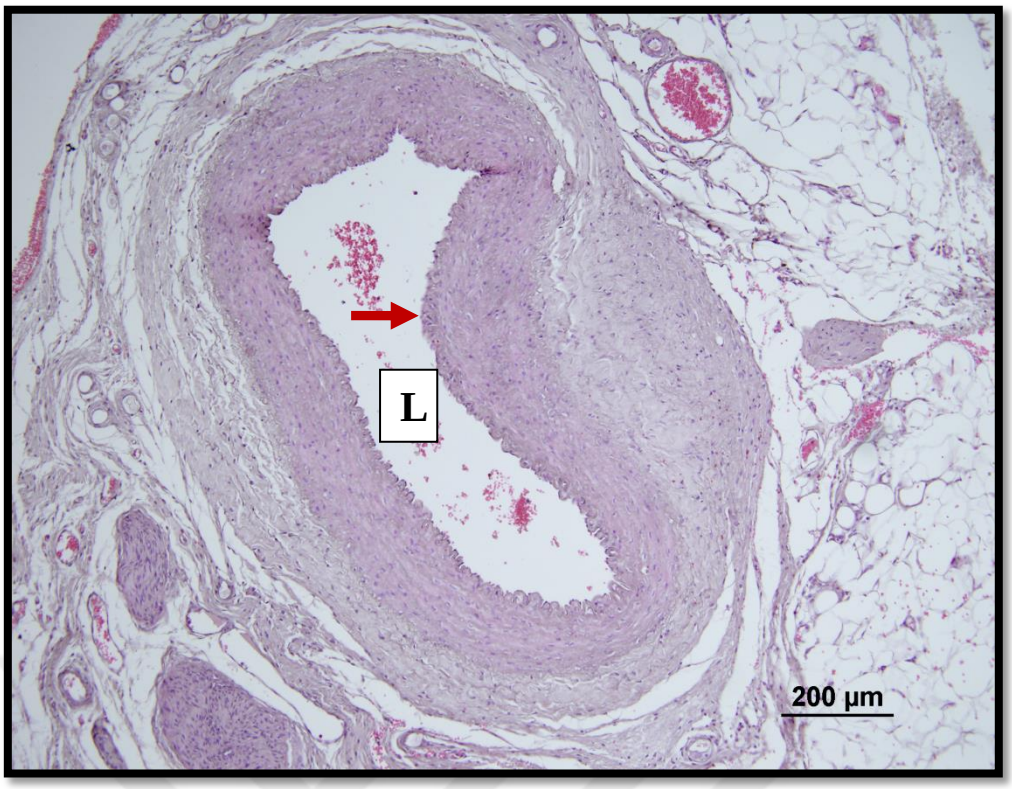
Şekil 13:Olgu grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazi kırmızı ok (➔), siyah ok (➔) internal elastik membran görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50µm.

İlaç grubu:

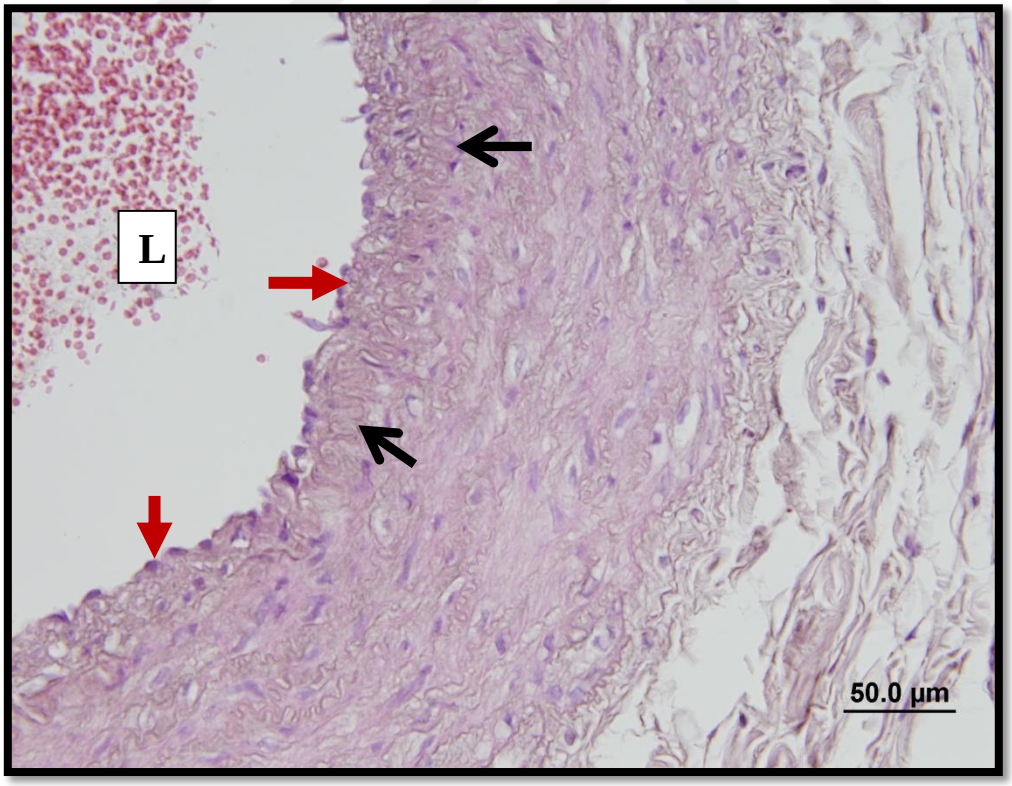
Uçuca anastomoz oluşturulan ve ilaç verilen deneklere ait hematoksilen- eozin boyalı damar doku kesitleri incelendiğinde, özellikle intimal alanda hiperplazinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlendi. İntimal hiperplazi tüm lümende aynı oranda değildi. Ayrıca kontrol grubuna göre lümen alanındaki genişleme dikkati çekti. Yapılan morfometrik incelemelerde lümen alanı, lümen çapı ve intima kalınlığı dikkate alındığında kontrol grubuna göre; lümen alanı, lümen çapının istatistiksel olarak anlamlı derecede genişlediği, intima kalınlığın ise istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($p< 0,05$) saptanmıştır. (Resim 13,15,17) (Grafik 1-4). İlaç verilen grubun morfometrik ölçüm değerleri (Tablo 7), (Tablo 9)



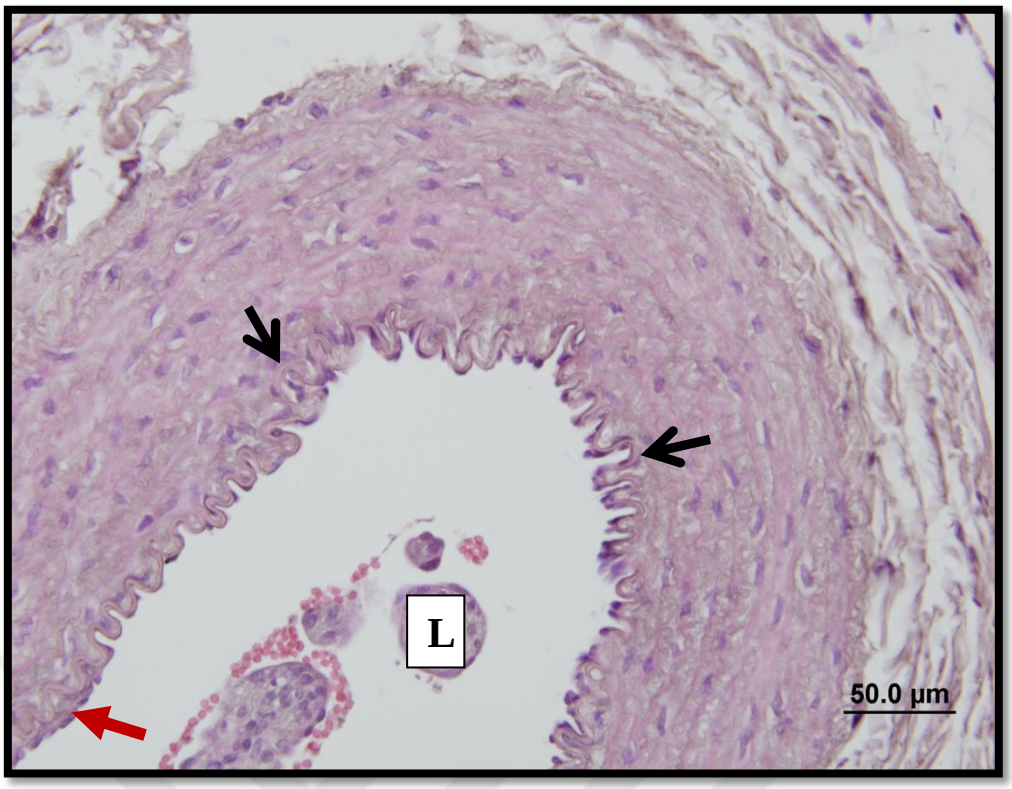
Şekil 14: Olgu grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazioku (➔) görülmektedir. H&E x10 büyütme. Bar 200µm.



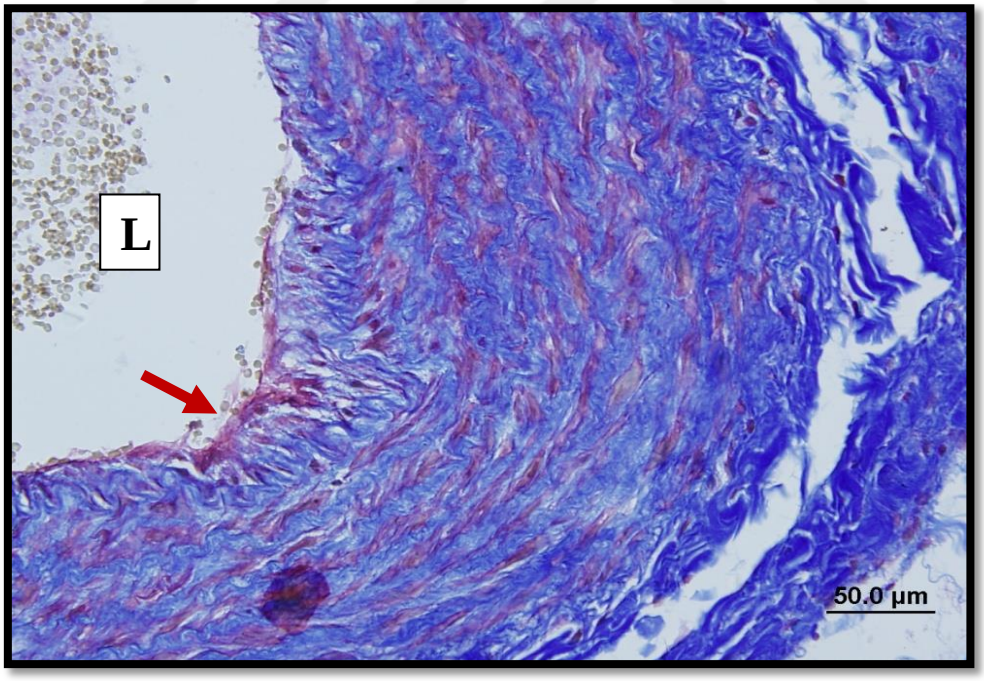
Şekil 15: Olgu grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazioku (➔) görülmektedir. H&E x10 büyütme. Bar 200µm.



Şekil 16: Kontrol grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazi kırmızı ok (➔), siyah ok (➔) internal elastik membran görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50µm.



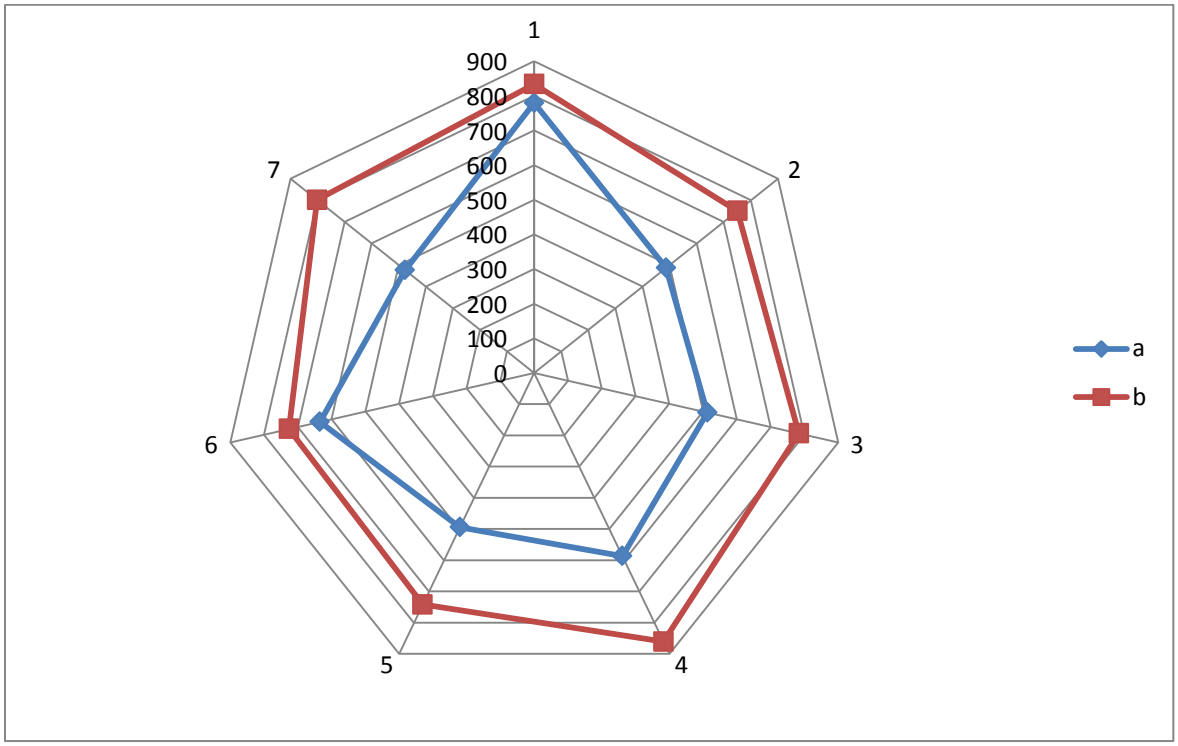
Şekil 17: Olgu grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazi kırmızı ok (➔), siyah ok (➔) internal elastik membran görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50µm.



Şekil 18:Olgu grubuna ait kesit. Damar lümeni (L), intimal hiperplazi kırmızı ok (➔) görülmektedir. Masson Trikrom Boyama x40 büyütme. Bar 50µm.

6.2 LÜMEN ÇAPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası lümen çapı karşılaştırmasında (Grafik 1); Grup A'nın lümen çapı ortanca değeri 513,04 ± 106,14 µm (476,49-779,62), Grup B'nin lümen çapı ortanca değeri 783,89 ± 88,33 µm (725,947-860,82) olarak tespit edilmiştir.

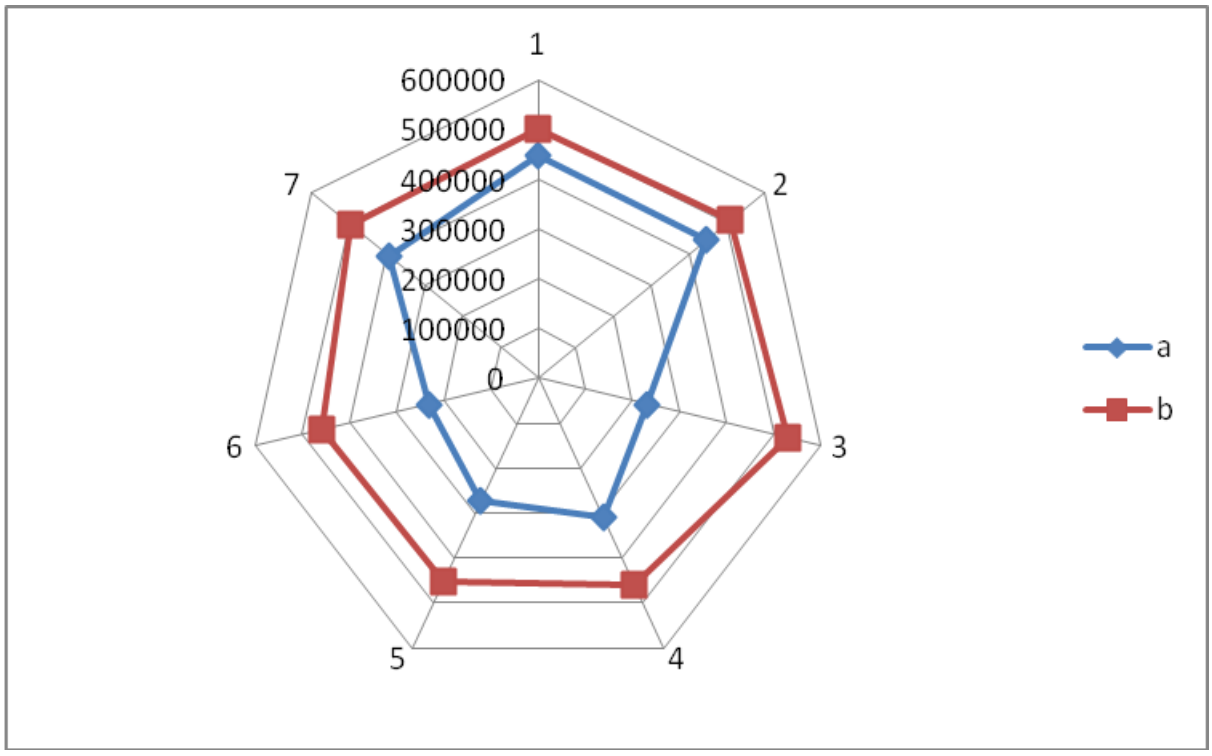


Grafik 1. Grupların lümen çapı açısından karşılaştırılması.
(İlaç: Grup B Kontrol: Grup A)

Grupların lümen çapı ortanca değerlerinin karşılaştırılması sonucu anlamlı fark saptanmıştır. Grup A ile Grup B'nin karşılaştırılmasında lümen çapının Grup B'de anlamlı olarak daha fazla olduğu [z=-3,130, p=0,001] saptanmıştır.

6.3 LÜMEN ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Yapılan seri kesit incelemelerinde gruplar arası lümen alanı ortanca değerlerinin karşılaştırmasında (Grafik 2); Grup A'nın lümen alanı ortanca değeri 231363,07± 164,53 (171504- 447037,55) μm^2, Grup B'nin 513.384,90± 243.505,33 (402.420,90 -726.744,20) μm^2 olarak hesaplanmıştır.

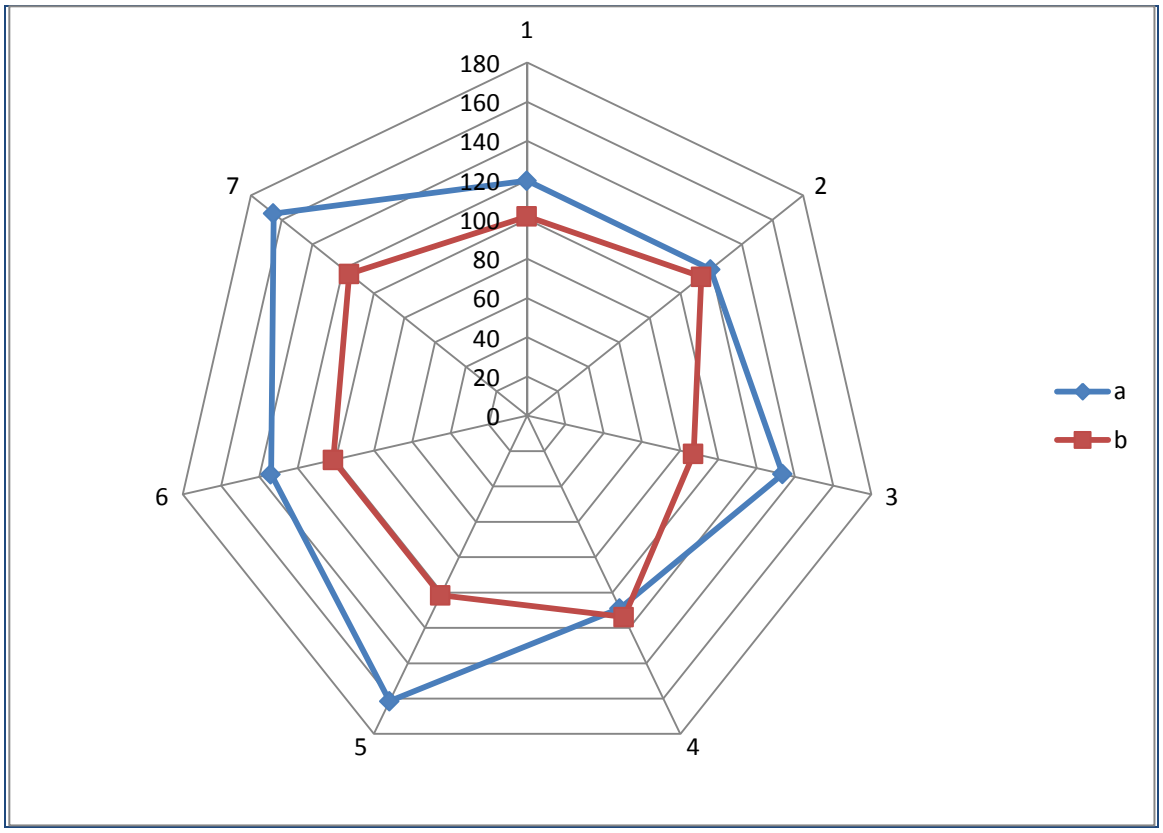


Grafik 2. Grupların lümen alanı açısından karşılaştırılması.
(İlaç: Grup B Kontrol: Grup A)

Grupların lümen alanı ortanca değerlerinin karşılaştırılması sonucu anlamlı fark saptanmıştır. Grup A ile Grup B'nin karşılaştırılmasında lümen alanının Grup B'de anlamlı olarak daha fazla olduğu [z=-2,747, p=0,004] saptanmıştır.

6.4 İNTİMA KALINLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Yapılan seri kesit incelemelerinde grupların intima kalınlıkları ortanca değerlerinin karşılaştırmasında (Grafik 3); Grup A'nın 37,626± 5,14 (22,6133– 69,946) µm, Grup B'nin 13,016± 3,25 (10,54– 15,2366) µm olarak hesaplanmıştır.

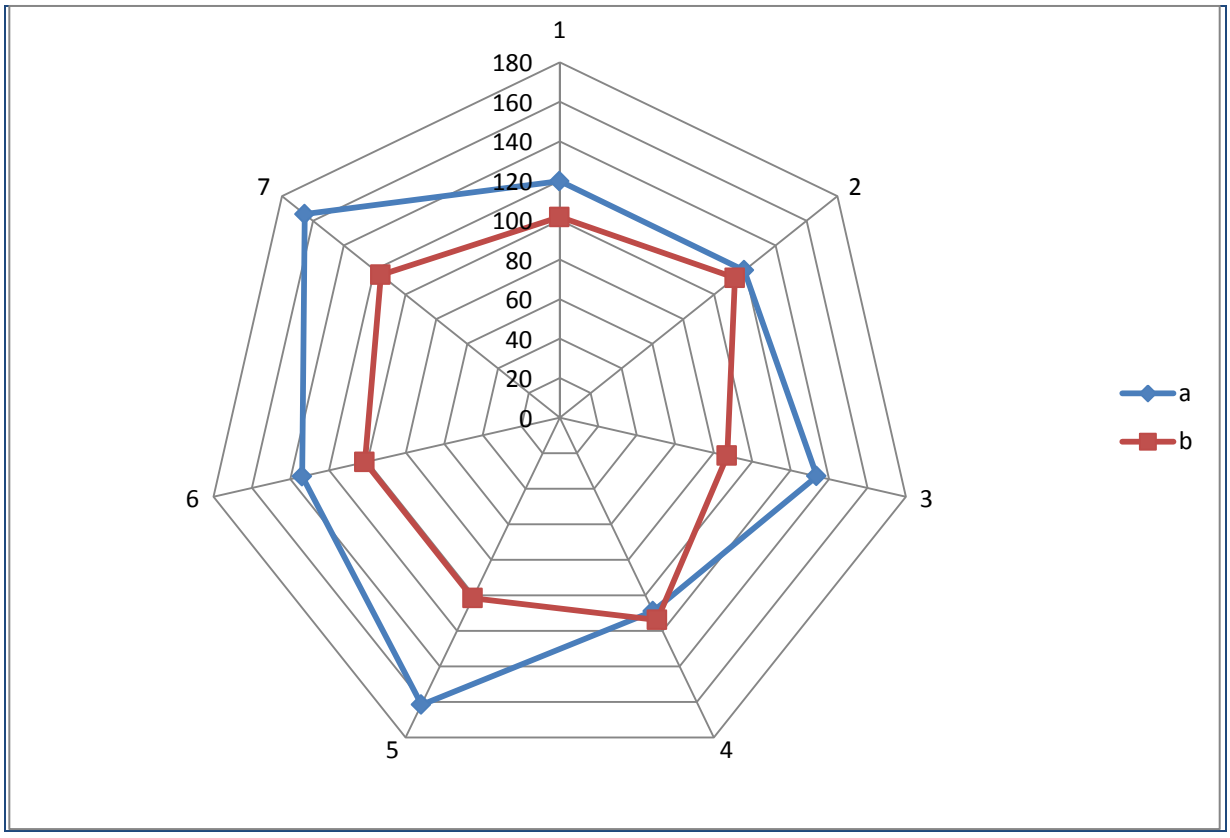


Grafik 3. Grupların intima kalınlıkları açısından karşılaştırılması.
(İlaç: Grup B Kontrol: Grup A)

Grupların intima kalınlıkları ortanca değerlerinin karşılaştırılması sonucu anlamlı fark saptanmıştır. Grup A ile Grup B'nin karşılaştırılmasında intima kalınlıklarının Grup B'de anlamlı olarak daha az olduğu [z=-3,134, p=0,001] saptanmıştır.

6.5 MEDİA KALINLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Yapılan seri kesit incelemelerinde grupların tunica media kalınlıkları ortanca değerlerinin karşılaştırmasında (Grafik 4); Grup A'nın 133,806± 32,16 (108.956-161,5033) µm, Grup B'nin 101,5866 ± 29,76 (101,5866 – 115,976) µm olarak hesaplanmıştır..



Grafik 4. Grupların media kalınlıkları açısından karşılaştırılması. .
(İlaç: Grup B Kontrol: Grup A)

Grupların media kalınlıkları ortanca değerlerinin karşılaştırılması sonucu anlamlı fark saptanmıştır. Grup A ile Grup B'nin karşılaştırılmasında media kalınlıklarının Grup B'de anlamlı olarak daha az olduğu [z=-3.026, p=0,002] saptanmıştır.

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 (64,65). 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 (64,65). Hiperplazik intimal kalınlaşma, arterlerin hemodinamik strese karşı normal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel hasarın iyileşmesinin de karakteristik bir özelliğidir (6).

İntimal hiperplazi anjiyoplasti, stent veya cerrahi müdahale gibi bir yaralanma sonrasında arteriyel intima tabakasında gelişen kalınlaşma olarak ifade edilmektedir. Bu terim ayrıca venöz ve prostetik greftlerdeki hiperplaziyi de kapsamaktadır (66). Hiperplastik intimal kalınlaşma, arterlerin hemodinamik strese karşı normal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel hasarın iyileşmesinin de karakteristik bir özelliğidir (67).

Endarterektomi, perkütan translüminal anjiyoplasti (PTCA), vasküler bypass-greft anastomoz bölgelerinde görülen intimal hiperplazi, vasküler rekonstrüktif girişimlerin uzun sürede yetersiz hale gelmesinde en önemli etkenlerden biridir (65). 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 (65). Uzun süre içerisinde kısmı veya total restenoza yol açan intimal hiperplazi gelişimi endotel hasarlanması sonucu başlayan vazoaktif bir süreçtir.

Endotelyal disfonsiyon, özellikle NO olmak, üzere vazodilatörlerin bioaktivitesinde, endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulma veya endotel kaynaklı kontraksiyon faktörlerinin artması ile karekterizedir. Geniş açıdan bakıldığında endotelyal disfonksiyon, endotelyal aktivasyon ile birliktebirçok proinflamatuar ve prokoagülan değişiklikleri kapsar (68). Endotelyal disfonksiyon geniş kapsamlı bir terimdir ve NO üretiminde bozulma ve / veya endotel-kaynaklı Endotelin1 (ET-1), anjiyotensin ve oksidanlar gibi gevşeme ve kasılma faktörlerinde dengesizliği ifade eder (69).

Endotelin hemostaz ve tromboz mekanizmasında önemli bir yeri vardır. Salgılanan Prostaglandin I2 (PGI2) veya prostasiklin trombosit aktivasyonunu, sekresyonunu ve agregasyonunu ayrıca monositlerin endotel ile etkileşimini inhibe eder. NO da benzer şekilde

trombosit adhezyon, aktivasyon ve agregasyonunu inhibe eder (70,71). Bir kısım NO ise lümene geçerek trombositleri etkiler. Prostasiklin ve NO trombosit agregasyonunu geriye çevirmek için sinerjik rol oynarlar (72).

Damar endotel hasarından sonra hasar bölgesinde trombosit adezyonu ve agregasyonu meydana gelir. Trombosit, makrofaj ve aktive endotel hücreleri tarafından salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkisi ile medial düz kas hücreleri prolifere olurlar. Prolifere olan düz kas hücreleri intimaya göç ederler. İntimal bölgede düz kas hücre proliferasyonu, ekstrasellüler matriks sentezi ve depolanması sonucunda intimal hiperplazi meydana gelir. Kısacası intimal hiperplazinin birinci basamağı düz kas hücre proliferasyonu, ikinci basamağı ise prolifere olan düz kas hücrelerinin intimaya göçüdür (40,73).

İntimal hiperplazi, tüm arteriyel girişimlerin %15-30'unu etkilemekle birlikte, hasara karşı oluşan bu cevabın kontrolüne yönelik geliştirilen yaklaşımlar, klinik olarak büyük öneme sahiptir (74). Bugüne kadar ister anastomoz sonrası ister PTCA veya stent sonrası olsun intimal hiperplazinin ve düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (75). Bu amaçla büyüme faktörü inhibitörleri, selektif A2a adenozin reseptör agonistleri, immunsupresif ilaçlar, kalsiyum kanal blokerleri, statinler, aspirin, iloprost, heparinler, pentoksifilin, ADP reseptör antagonistleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri gibi çeşitli ilaçlar denenmiştir (38).

Rivaroksaban oral yolla alınan yeni nesil direkt etkili faktör Xa inhibitörüdür. Başlıca venöz tromboemboli ve non valvuler atriyal fibrilasyon tedavi ve profilaksisinde kullanım alanı bulmuştur (55).

Iba T. ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları bir deneyde düşük molekül ağırlıklı heparinin (DMAH) endotel hasarı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları deney modelinde 6'şar sıçandan oluşan 3 grup oluşturmuşlardır. Gruplara mezenter arter ponksiyonu öncesi DMAH (enoksaparin) ve faktör Xa inhibitörü (fundaparinux) ve placebo uygulanmıştır. Sonrasında ponksyon sahasında alınan kesitler incelenmiştir. Çalışmalarında antikoagülan uygulanan her iki grupta kanama sahası daha büyük izlenmiştir. Histokimyasal incelemede ise mezenter arter örneklerinde lökosit adhezyonu ve endotel hasarında belirgin azalma izlenmiştir (76).

Çalışma faktör Xa inhibisyonuna yol açan her iki ilacın da endetol hasarlanmasında ve inflamatuar yanıtta azalmaya yol açtığını göstermiştir.

Hara ve arkadaşları benzer şekilde faktör Xa inhibisyonunun makrofaj aktivasyonunu baskılayarak aterom plağı oluşumunu baskılamaya yönelik hipotez geliştirmişlerdir. Yaptıkları deney modelinde oluşturdukları apolipoprotein E (APO-E) defektli farelere 20

hafta süre ile hiperkolesterolemik diyet uygulamışlardır. Olgu grubuna 5mg/kg rivaroksaban verilmiş ve daha sonra aortik arkta aterom plakları incelenmiştir.

Deney sonunda APO-E defektli farelerde rivaroksaban grubunda daha ince ve damar duvarında stabil plak formasyonu izlenmiştir. Sonuçlar rivaroksabanın antikoagülan etkilerine ek olarak influmatuar süreçlerde inhibisyon yaptığı yönünde yorumlanmıştır (77).

Wong ve arkadaşları tavşanlarda tromboemboli tedavisinde faktör Xa inhibitörü apixaban and rivaroxabanı, direk trobin inhibitörü dabigatran ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada fare veya sıçan yerine tavşanların tercih edilmesi tavşanların insanlara benzer faktör X patensi olması olarak belirtilmiştir (78).

Kim ve arkadaşları planladıkları randomize prospektif çalışmalarında AF'li hastalarda dabigatran ve rivaroksabanın karotid arterlerde endotelyal intima , medial kalınlığı ve aterom plağı üzerine etkilerini incelemeyi planlanmışlardır. Kontrol grubunu ise warfarin ile tedavi edilen hastalar oluşturmaktadır. Çalışma benzer anti-inflamatuar etkilerin insanlarda gözlenimini amaçlamaktadır. Sonlanım tarihi 2018 olarak planlanmaktadır (79).

Biz de çalışmamızda rivaroksabanın tavşan karotid arterinde postoperatif sütur hattında intimal hiperplazi üzerine etkinliğini araştırdık.

PTCA yerine 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 rivaroksaban cerrahi sonrası 28 gün boyunca peroral olarak uygulandı.

Çalışmamızın sonucunda lümen çapı; Grup B'nin lümen çapı ve lümen alanı Grup A'dan daha geniş olduğu tespit edilmiş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızın sonucunda intima kalınlığı; Grup B'nin intima ve media kalınlıkları Grup A'dan daha küçük olduğu tespit edilmiş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızda, rivaroksaban anastomoz gruplarında daha geniş lümen çapı ve alanı oluştururken intimal ve medial kalınlıklarda istatistiksel olarak anlamlı düşüşe yol açmıştır. Sonuçlar intimal hiperplazi ve inflamatuar yanıta bağlı medial hipertrofiyi azalttığı yönünde düşünülebilir.Buna sekonder lümen alanı ve çapında artış restenoza protektif etki olarak değerlendirilebilir.

9. SONUÇ

Rivaroksaban etkin bir faktör Xa inhibitörü olarak sıklıkla venöz emboli ve atriyal fibrilasyonlu hasta popülasyonunda kullanılmaktadır. Arteriyel hastalıklarda ise kullanım alanı sınırlıdır. Kardiyovasküler hastalıklar bir bütün olarak değerlendirildiğinde ateroskleroz ve sistemik inflamatuar yanıt bunların etiyopatogenezinde önemli rol oynar. Arteriyel hastalıklar da bu sistemin bir parçasıdır ve bunlara bağlı pek çok cerrahi işlem yapılmaktadır. Tedavide sıklıkla antitrombotik ve antikoagülan ajanlar kullanılmaktadır. Etkin tedaviye karşın restenoz önemli bir sorundur.

Bu sebeplerle yapılan çalışmamızda, rivaroksabanın intimal hiperplazi ve medial proliferasyon gelişimini azalttığı yönünde istatistiksel olarak anlamlı veriler elde ettik. İnsan üzerinde daha fazla randomize prospektif çalışmalar yapılması halinde gelecekte rivaroksabanın antikoagülan etkisi yanında kardiyovasküler hastalıklarda sekonder etkileri de gözönüne alınarak daha yaygın bir kullanım alanı bulabileceği düşünülebilir.

KAYNAKLAR:

1. Kalp ve damar hastalıklarını önleme ve kontrol programı , Birincil, İkincil ve Üçüncül Korumaya Yönelik Stratejik Plan ve Eylem Planı -2010

2. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/

3. Basic Pathology, Kumar, Cotran, Robbins Türkcesi, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Eylül 2003 . Sayfa 326-328.

4. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR Physiol Rev. 2004 Jul; 84(3):767-801.

5. Cortistatin inhibits migration and proliferation of human vascular smooth muscle cells and decreases neointimal formation on carotid artery ligation.
Duran-Prado M, Morell M, Delgado-Maroto V, Castaño JP, Aneiros-Fernandez J ve ark. Circ Res. 2013 May 24; 112(11):1444-55.

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

7. De Caterina R, Andersson U, Alexander JH, Al-Khatib SM, Bahit MC, Goto S, Hanna M, Held C, Hohnloser S, Hylek EM, Lanas F, Lopes RD, López-Sendón J, Renda G, Horowitz J, Granger CB, Wallentin L; ARISTOTLE Investigators.
Am Heart J. 2016 May;175:175-83. doi: 10.1016/j.ahj.2016.01.005. Epub 2016 Jan 19.

8. Efficacy and Safety of Rivaroxaban and Warfarin in the Perioperative Period of Catheter Ablation for Atrial Fibrillation - Outcome Analysis From a Prospective Multicenter Registry Study in Japan.
Okumura K, Aonuma K, Kumagai K, Hirao K, Inoue K, Kimura M, Miyauchi Y, Tsushima E; JACRE Investigators. Circ J. 2016 Sep 29. [Epub ahead of print] PMID: 27681011

9. Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial.
Cohen H, Hunt BJ, Efthymiou M, Arachchillage DR, Mackie IJ, Clawson S, Sylvestre Y, Machin SJ, Bertolaccini ML, Ruiz-Castellano M, Muirhead N, Doré CJ, Khamashta M, Isenberg DA; RAPS trial investigators.
Lancet Haematol. 2016 Sep;3(9):e426-36. doi: 10.1016/S2352-3026(16)30079-5.

10. Direct oral anticoagulants in the elderly: systematic review and meta-analysis of evidence, current and future directions. Sadlon AH, Tsakiris DA.
Swiss Med Wkly. 2016 Sep 28;146:w14356. doi: 10.4414/smw.2016.14356. eCollection 2016.

11. Novel oral factor Xa and thrombin inhibitors in the management of thromboembolism. Eriksson BI, Quinlan DJ, Eikelboom JW Annu Rev Med. 2011; 62():41-57.
12. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis.
Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H N Engl J Med. 2011 May 5; 364(18):1746-60.
13. Spronk HM, de Jong AM, Crijns HJ, Schotten U, Van Gelder IC, Ten Cate H. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. Cardiovasc Res. 2014;101(3):344–51. doi: 10.1093/cvr/cvt343
14. Yoshino S, Yoshikawa A, Hamasaki S, Ishida S, Oketani N, Saihara K, et al. Atrial fibrillation-induced endothelial dysfunction improves after restoration of sinus rhythm. Int J Cardiol. 2013;168(2):1280–5. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.12.006.
15. Lee IO, Kratz MT, Schirmer SH, Baumhakel M, Bohm M. The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice. J Pharmacol Exp Ther. 2012;343(2):253–7. doi: 10.1124/jpet.112.194837.
16. Borissoff JI, Otten JJ, Heeneman S, Leenders P, van Oerle R, Soehnlein O, et al. Genetic and pharmacological modifications of thrombin formation in apolipoprotein e-deficient mice determine atherosclerosis severity and atherothrombosis onset in a neutrophil-dependent manner. PLoS One. 2013;8(2) doi: 10.1371/journal.pone.0055784
17. Ragosta M, Gimple LW, Gertz SD, Dunwiddie CT, Vlasuk GP, Haber HL, et al. Specific factor Xa inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. Circulation. 1994;89(3):1262–71. doi: 10.1161/01.CIR.89.3.1262.
18. Borissoff JI, Heeneman S, Kilinc E, Kassak P, Van Oerle R, Winckers K, et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. Circulation. 2010;122(8):821–30. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.907121.
19. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). Lancet 1998;351:1379–87.
20. Foulkes MA, Wolf PA, Price TR,et al: The Stoke Data Bank: Design, methods, and baseline characteristics. Stoke 19:547-554, 198
21. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, et al. Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. Lancet 2003;361:107–16
22. Callow AD. Recurrent stenosis after carotid endarterectomy.
Arch Surg 1982;117:1082- 1085

23. Moore WS, Kempezinski RF, Nelson JJ, Toole JF. Recurrent carotid stenosis. Stoke 1998;29:2018-2025
24. Engelter, S. T., T. Brandt, S. Debette, V. Caso, ve ark.. 2007. Antiplatelets versus anticoagulation in cervical artery dissection. Stroke 38:2605–2611
25. Michiels C. Endothelial cell functions. J Cell Physiol. 2003 Sep; 196(3):430-43.
26. Gartner L, Hiatt James, L. . Circulatuar system. Color Textbook of Histology. 2001;s econd edition:251-70.
27. Ross M. Circulatuar system. Circulatuar system In; Ross MH Histology A Text and Atlas. 1995; Third edition(Williams& Wilkins Maryland):302-14.
28 . Paker Ş. Dolaşım sistemi. Paker Ş in Dolaşım sistemi Histoloji, Bursa,. 1990(Uludağ Üniversitesi Basımevi):516-25.
29. Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology.
Scallan J, Huxley VH, Korthuis RJ. San Rafael (CA):
Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
30. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endotheliel cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. Bioassays 1994;16:901-6.
31. Witzium JL. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. BR Heart J 1993; 69:12-8.
32.Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesiss of the lesions of artherosclerosis. Br Heart J 1993; 69: 30-7.
33.Andries LJ, Kaluza G. Endocardial endothelial dysfunction and heart failure. L Card-Fail 1996; 2:195-202.
34. Baykal Y,Özet G, Kocabalkan F:Endotel Fonksiyonları Ve Hastalıklardaki Rolü; Turkiye Klinikleri J Med Sci 1998;18(3):150-8
35. Zingareli B, Day B, Crapo JD. The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile. Br. J Pharmacol 1997; 120(2):259-67
36. Bath PM, Hassel DG, Gladwin AM, et al. Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxics and adhesion to endothelium in vitro. Arterioscl Thromb 1991; 11: 254-60.
37. Zubilewicz, T., et al., Injury in vascular surgery--the intimal hyperplastic response. Med Sci Monit, 2001. 7(2): p. 316-24.
38. Doğan DE.N. İntimal hiperplazi nedenleri, önleme ve tedavi yöntemleri. Kalp ve damar cerrahisi, 2004. I. baskı (İstanbul, Çapa tıp kitapevi): 2004: p.639-647.

39. Peyot ML, Gadeau AP, Dandre F, Belloc I et all. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A2b-purinoceptor. Circ Res. 2000; 86; 76–85
40. 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.
41. 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.
42. De Meyer GRY,Bult H. Mechanisms of neointima formation- lessons from experimental models. Vasc Medicine.1997;2:179-89.
43. Kanai AJ, Strauss HC, Truskey GA, Crews AL, Grunfeld S, Malinsky T. Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porfirinic microsensor. Circ Res. 1995; 77(2):284-293.
44. Mattsson E., et al. Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1997.17: p.2245–2249.
45. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA et al. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. Thromb Haemost 2002;86:959-72.
46. Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor, biology and involvement in disease. J Pathol 2006;208:327-39.
factor expression under physiologic and pathologic conditions. On behalf of the Subcommittee on Tissue Factor Pathway inhibitor (TFPI) of Scientific and Standdardızation Comittee of the ISTH. Thromb Haemost 1995;73:873.
47. Wen DZ, Dittman WA, Ye RD, et al. Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. Biochemistry 1987:26:4350- 7.
48. Jakubowski HV, Owen WG. Macromolecular specificity determinants on thrombin for fibrinogen and thrombomodulin. J Biol Chem 1989;264 :11117-2.
49. Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. "Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 2005;24:1374-83.
50. Bajzar, L; Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. J. Biol. Chem 1996;271:16603-8.
51. Konigsberg W, Kirchhofer D, Riederer MA, Nemerson Y. The TF:VIIa complex: clinical significance, structure-function relationships and its role in signaling and metastasis. Thromb Haemost. 2002;86:757-71

52. Wiiger MT, Prydz H. The changing faces of tissue factor biology. A personal tribute to the understanding of the extrinsic coagulation activation. Thromb Haemost. 2007;98: 38
53. Tsurupa, G; Medved L. Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains. Biochemistry 2001;40:801-8.
54. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, ve ark. American College of Chest Physicians . 2012 Feb; 141(2 Suppl):e44S-88S.
55. Wolfgang Mueck, Jan Stampfuss, Dagmar Kubitza, Michael Becka Clin Pharmacokinet. 2014; 53(1): 1–16. Published online 2013 Sep 3. doi: 10.1007/s40262-013-0100-7
56. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, et al. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor. J Thromb Haemost. 2005;3:514–521. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01166.x.
57. Samama MM. The mechanism of action of rivaroxaban—an oral, direct Factor Xa inhibitor—compared with other anticoagulants. Thromb Res. 2011;127:497–504. doi: 10.1016/j.thromres.2010.09.008
58.Kubitza D, Becka M, Roth A, ve ark. The influence of age and gender on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban—an oral, direct Factor Xa inhibitor. J Clin Pharmacol. 2013;53:249–255.
59. Kubitza D, Becka M, Zuehlsdorf M, ve ark.. Body weight has limited influence on the safety, tolerability, pharmacokinetics, or pharmacodynamics of rivaroxaban (BAY 59-7939) in healthy subjects. J Clin Pharmacol. 2007;47:218–226
60. Tanigawa T, Kaneko M, Hashizume K, ve ark. Model-based dose selection for phase III rivaroxaban study in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation. Drug Metab Pharmacokinet. 2013;28:59–70. doi: 10.213345.
61. Jiang J, Hu Y, Zhang J, ve ark. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single doses of rivaroxaban—an oral, direct Factor Xa inhibitor—in elderly Chinese subjects. Thromb Haemost.2010;103:234–241.
62. Kubitza D, Becka M, Mueck W, et al. Effects of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. Br J Clin Pharmacol.2010;70:703–712.

63. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with acute coronary syndromes. *Xu XS, Moore K, Burton P, Stuyckens K, ve ark. Pharmacol. 2012 Jul; 74(1):86-97*

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

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

66. Ascher E.Haimovici's vascular surgery.2012.6th edition(New York).p:178-196.

67. Davies MG. Intimal hyperplasia: basic response to arterial and vein graft injury and reconstruction. In: Rutherford RB, editor. Vascular Surgery. 6 ed. Philedelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 149-72.

68. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Feb 1;23(2):168-75.

69. Cohn JN. Arterial compliance to stratify cardiovascular risk: more precision in therapeutic decision making. Am J Hypertens. 2001;14:258-263.

70. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, et al. The endothelial cell ecto -ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. J Clin Invest. 1997; 99:1351-1360.

71. Yaylalı YT,Küçükaslan M.Endotel disfonksiyonu. Pamukkale Tıp Dergisi 2011;4(3):152-157

72. Lauth M,Cattaruzza M,Hecker M. ACE inhibitor and AT1 antagonist blockade of deformation-induced gene expression in the rabbit jugular vein through B2 receptor activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Jan;21(1):61-6.

73.Takiguchi. Y,Nagano. M,Ikeda. Y,Nakashima. M.Early administration of YT–146, an adenosine A2 receptor agonist, inhibits neointimal thickening after rat femoral artery endothelium injury. Eur J Pharm.1995;205–207. 74)

74.Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, et al. Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. N Engl J Med. 2001 Jan 25;344(4):250-6.

75. Ghigliotti G, Mereto E, Eisenberg PR, Martelli A, Orsi P, Sini D, Spallarossa P, Olivotti L, Brunelli C. N-acetyl-cysteine Reduces Neointimal Thickening and Procoagulant Activity after Balloon-induced Injury in Abdominal Aortae of New Zealand White Rabbits. Thrombosis and Haemostasis 2001 85 4: 724-9.

76.Enoxaparin and fondaparinux attenuates endothelial damage in endotoxemic rats.
Iba T, Okamoto K, Ohike T, Tajirika T, Aihara K, Watanabe S, Kayhanian H.
J Trauma Acute Care Surg. 2012 Jan;72(1):177-82. doi: 10.1097/TA.0b013e31821a83f0.
77. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M.
78. Favorable therapeutic index of the direct factor Xa inhibitors, apixaban and rivaroxaban, compared with the thrombin inhibitor dabigatran in rabbits.
Wong PC, Crain EJ, Watson CA, Xin B. J Thromb Haemost. 2009 Aug;7(8):1313-20. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03503.x. Epub 2009 Jun 3.
79. Evaluation of the vascular protective effects of new oral anticoagulants in high-risk patients with atrial fibrillation (PREFER-AF): study protocol for a randomized controlled trial. Kim JB, Joung HJ, Lee JM, Woo JS, Kim WS, Kim KS, Lee KH, Kim W.
Trials. 2016 Aug 24;17(1):422. doi: 10.1186/s13063-016-1541-8.

EK 1:

53/2015 protokol numaralı "Tavşan karotis arter anastomoz modelinde gelişen neointimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyon üzerinl oral yolla alınan faktör Xa inhibitörü rivarokrabanın etkileri "çalışması 01/12/2015 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş olup uygulmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.