

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TAVŞAN KAROTİD ARTER ANASTOMOZUNDA
SIĞIR SERUM ALBÜMİN-GLUTARALDEHİT VE
POLİETİLEN GLİKOL POLİMER'İN
NEOİNTİMAL HİPERPLAZİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ERTÜRK KARAAĞAÇ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. YÜKSEL BEŞİR

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2018-ÖNAP-TIPF-0005 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
ARALIK - 2019

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca, sadece cerrahiye değil hekimliğin temel değerlerinden olan meslek etiğini de öğrendiğim Sayın hocam Prof. Dr. Ali Gürbüz'e, bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan hocalarım Sayın Prof. Dr. Levent Yılık'a, Prof. Dr. Orhan Gökalp'e, Op. Dr. Tayfun Göktoğan'a, Doç. Dr. Mert Kestelli'ye, Doç. Dr. Banu Bahriye Lafçı'ya, Doç. Dr. İsmail Yürekli'ye, Doç. Dr. Habib Çakır'a ve ayrıca tezimi yöneten, tezimin gerçekleşmesinde büyük emeği olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Yüksel Beşir'e,

Tezimin gerçekleşmesinde büyük yardımlarını ve desteklerini gördüğüm fakültemiz Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Meltem Kuruş'a ve Arş. Görevlisi Erdi Keselik'e,

Eğitimim boyunca bana her anlamda yardımcı olan, bilgi ve görgülerini paylaşan, cerrahinin abi/kardeş ile usta/çırak ilişkisinden geçtiğini öğreten Abilerim Doç. Dr. Şahin İşcan'a, Op. Dr. Börteçin Eygi'ye, Op. Dr. Köksal Dönmez'e, Dr. Öğrt. Üyesi Hasan İner'e, Op. Dr. İhsan Peker'e, Op. Dr. Ersin Çelik'e, Ablam Dr. Öğrt. Üyesi Nihan Yeşilkaya'ya,

Uzun, yorucu ve bir o kadar da zevkli geçen asistanlığım boyunca iyi ve kötü günleri paylaştığım asistan arkadaşlarım Dr. Yaşar Gök Kurt'a, Dr. Hüseyin Durmaz'a, Dr. Nuri Utkan Tunca'ya, Dr. Çağrı Kandemir'e, Dr. Tahsin Murat Tellioğlu'na, servis ve yoğun bakımımızın hemşire ve personellerine, ameliyathanemizin hemşire ve personellerine, poliklinik çalışanlarımıza;

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

Asistanlık hayatım boyunca ona ayırabildiğim kısıtlı zamana rağmen; sonsuz sevgi ve desteğini benden hiç esirgemeyen, hayatı paylaştığım, hayatımı kolaylaştıran biricik eşim Merve'ye;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. ARTER TİPLERİ VE HİSTOLOJİSİ	4
2.1.1. Elastik Tip Arterler (Büyük Boy Arterler)	4
2.1.2. Musküler Tip Arterler (Orta Boy Arterler).....	6
2.1.3. Küçük Çaplı Arterler ve Arteriyoller.....	7
2.2. VASKÜLER ENDOTEL.....	8
2.2.1. Endotel Hücresinin Fonksiyonları	9
2.2.2. Endotel Hücre Hasarına Damarın Yanıtı	10
2.2.3. Balon Hasarına Arteriyel Yanıt	11
2.2.4. Arteriyel Akıma Ven Duvarı Adaptasyonu	11
2.2.5. Damar Duvarının Yapısı ve Anastomoz Hattının İyileşmesi	12
2.3. HEMOSTAZ.....	13
2.4. HEMOSTATİK AJANLAR.....	17
2.4.1. Polietilen Glikol Polimer	17
2.4.2. Sığır Serum Albümin-Glutaraldehit.....	19
III. MATERYAL VE METOD	22
3.1. ÇALIŞMA PLANI.....	22
3.2. DENEY PROTOKOLÜ	25
3.3. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	26
3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	29

IV. BULGULAR.....	30
4.1. İSTATİSTİKSEL SONUÇLAR	30
4.2. HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA SONUÇLARI.....	34
4.3. MASSON TRIKROM BOYAMA SONUÇLARI.....	43
4.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLAR	46
V. TARTIŞMA	53
VI. SONUÇ	61
ÖZET	62
İNGİLİZCE ÖZET.....	66
KAYNAKLAR	70

KISALTMALAR

SSA:	Sığır Serum Albümin
PEGP:	Polietilen glikol polimer
H&E:	Hematoksilen Eozin
PGE2:	Prostaglandin E2
ATIII:	Antitrombin 3
t-PA:	Doku plazminojen aktivatörü
NO:	Nitrik oksit
PGI2:	Prostasiklin
cGMP:	Siklik guanin monofosfat
bFGF:	Fibroblast büyüme faktörü
PDGF:	Trombosit türevi büyüme faktörü
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
TGF:	Dönüştürücü büyüme faktörü
VEGF:	Vasküler endotelial büyüme faktörü
PAF:	Trombosit aktive edici faktör
vWF:	von Willebrand faktör
Gp:	Glikopeptid
TxA2:	Tromboksan A2
ADP:	Adenozin difostat
TF:	Doku faktörü
u-PA:	Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü

iv:	Intravenöz
kg:	Kilogram
cc:	Santimetreküp
HOCl:	Hipokloröz asit
a-SMA:	alfa Düz kas aktin
PCNA:	Proliferatif hücre çekirdek antijeni
ADRF:	Adiposit türevi gevşetici faktör



I.GİRİŞ-AMAC

Koroner ve periferik arter hastalıkları, günümüzde yaşam kalitesi ve ortalama yaşam süresini belirleyen en önemli kronik hastalıklardandır ve bu hastalıkların tedavisinde vasküler cerrahi girişimler oldukça sık kullanılan girişimlerden biridir. Vasküler girişimler sonrası gelişebilen restenoz üzerinde, intimal hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonunun büyük etkisi vardır. Neointimal hiperplazi nedeniyle gelişen restenoz, günümüzde bu tarz işlemlerin uzun dönem başarısını olumsuz etkilemektedir (1).

Vasküler rekonstrüktif girişimlerden sonra akut trombüs oluşumunun önemli bir rol oynadığı ani tıkanmadan farklı şekilde, geç dönemdeki daralma veya restenozda düz kas hücre migrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks birikimi sonucu oluşan neointimal hiperplazi önemli rol oynamaktadır. Hayvan ve insanlarda yapılan arteriyel hasar modellerinde lümen daralmasının temel nedeni intimadaki düz kas hücre proliferasyonu ve konnektif doku birikiminin olduğu gösterilmiştir (2). Hiperplazik intimal kalınlaşma, arterlerin hemodinamik strese karşı normal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel hasarlanmanın iyileşmesinin de karakteristik bir özelliğidir (3).

Arteriyel hasar oluştuktan sonra, bu bölge trombositlerle kaplanır. Adhezyon sonrası trombositler granüllerindeki vazoaktif ve trombotik faktörleri (Serotonin, adenosin difosfat, fibrinojen, von Willebrand Faktör) ve ayrıca büyüme faktörlerini (trombosit kaynaklı büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, epidermal büyüme faktör) salgılar (4). Mitojenik özellikteki bu büyüme faktörleri düz kas hücre proliferasyonunu başlatır. Hasara cevap olarak media tabakasında çoğalmaya başlayan düz kas hücreleri, intimaya göç ederek intimal hiperplaziye neden olurlar. “Russel Ross” tarafından öne sürülen ve halen yaygın kabul gören “yaralanmaya cevap” (response-to-injury) hipotezine göre de intimal kalınlaşmayı başlatan mekanizma; hasar gören damar duvarına yapışan aktive trombositlerden ve endotel hücrelerinden salınan, düz kas hücreleri proliferasyonunu uyaran büyüme faktörleridir (4). Bypass greftlerinde ve balon anjiyoplasti uygulamalarında hiperplastik yanıtın engellenmesi damarın açık kalma süresinin belirgin olarak azatılmasını ve organ kayıplarının azaltılmasını sağlayabilir, yaşam süresinin arttırılmasında doğrudan etkili olabilir (5, 6).

Kalp damar cerrahisi uzmanlığı son 50 yıl içinde hızlı bir şekilde gelişim göstermiştir (7). Artan operasyon sayıları ve kompleks cerrahi girişimler sebebiyle, hemostaz sağlayarak kanamanın etkili tedavisi; cerrahi alanın daha iyi görülmesini, daha kısa ameliyat sürelerini, transfüzyon gereksiniminin azalmasını, yara iyileşme süresinin ve hastane yatış süresinin kısalmasını sağlayarak cerrahi operasyonlar sonrası olumlu sonuçlar alabilmek için kritik öneme sahiptir. Bu sebeple operasyon sırası ve sonrasındaki yetersiz hemostaz; mortalite ve morbiditenin önemli bir nedenidir. Son 15 yılda cerrahi operasyonlarda hemostaz sağlamak için çok çeşitli ajanlar geliştirilmiştir (8, 9). Bu ajanlar; etki mekanizmaları, bileşimleri, uygulama kolaylıkları, ıslak veya kuru dokuya yapışmaları, immünojenik özellikleri ve maliyetleri bakımından büyük ölçüde değişiklik gösterir. İdeal bir hemostatik ajan; minimal yan etkiyle hızlı bir şekilde etki ederek kanama kontrolünü sağlamalı ve biyoçözünebilir olmalıdır (10). Hemostatik ajanlar arasındaki; polimerizasyon ve etki süreleri, sitouyumluluk, biyoçözünebilirlik, patlama basıncı dayanımı, elastikiyet, çözülme süreleri, ıslak veya kuru dokuya yapışmaları gibi farklar kalp ve damar cerrahisinde kullanılan hemostatik ajanları sınırlamaktadır.

Sığır serum albümin-glutaraldehit (Bioglu®) etken maddesi %45 sığır albümini ve %10 glutaraldehit karışımından oluşan şeffaf sıvı bir çözeltilidir. Dokuyla temasından sonra, 20-30 saniye içinde polimerizasyon başlar ve 2 dakika içinde tamamlanır. Standart yöntemlere ek olarak doku yapıştırıcı, hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır (11).

Polietilen glikol polimer (Co-seal®) ise; 2 polietilen glikol polimer, bir seyreltik hidrojen klorür çözeltisi ve bir seyreltik sodyum fosfat/sodyum karbonat çözeltisinden oluşur. Uygulama sırasında bu bileşenler dokuya veya sentetik greftlere kovalent olarak bağlanan bir hidrojel oluşturur. Vasküler rekonstrüksiyon sonrası mekanik olarak ek hemostaz sağlamak için kullanılmaktadır (12).

Günümüzde vasküler rekonstrüksiyon sonrası hemostatik ajan olarak sıkça kullanılan polietilen glikol polimer (PEGP) ve sığır serum albümin-glutaraldehit (SSA-glutaraldehit)'in neointimal hiperplazi ve endotelial proliferasyon üzerine etkisi hakkında yeterli veri yoktur. Bu iki ajanın vasküler rekonstrüksiyonda güvenli kullanımının değerlendirilmesi ve diğer hemostatik ajanların da kullanılmadan önce

neointimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyona etkilerinin incelenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Bu amaçla küçük bir hayvan deneyi modeli oluşturmak istedik. Bu deneysel çalışmamızda deney hayvanı olarak tavşanı seçmemizin nedenleri arasında; tavşan karotid arterinin vasküler rekonstrüksiyona iyi belgelendirilmiş yanıtı, ateroskleroz ve neointimal hiperplazi geliştirme eğilimi, tavşan karotid arterinin insan koroner arterine kıyasla karşılaştırılabilir büyüklüğü, kafes muhafazasına uygunluğu sebebiyle çalışmalar için yeterli sayıdaki tavşanın kısa ve uzun süreli deneylerde kullanılabilmesi sayılabilir.

Bu yüzden biz de, tavşan karotid arter anastomozunda Polietilen glikol polimer ve Sığır serum albümin-glutaraldehit'in neointimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyon üzerine etkisini araştırmayı hedefledik.

II. GENEL BİLGİLER

Sistemik damar ağı; fonksiyonel olarak arterler, arteriyoller, kapillerler ve venler olarak ayrılabilir. Arterler, çeşitli organların kanlanması sağlayan yüksek basınçlı damarlardır. Arteriyoller; kapiller yatağı doğrudan besleyen ve kan akımını kontrol eden küçük damarlardır. Kapillerler, ince duvarlı damarlar olup kan ve dokular arasında besin maddelerinin değişimine izin verirler (13).

2.1. ARTER TİPLERİ VE HİSTOLOJİSİ

2.1.1 Elastik Tip Arterler (Büyük Boy Arterler)

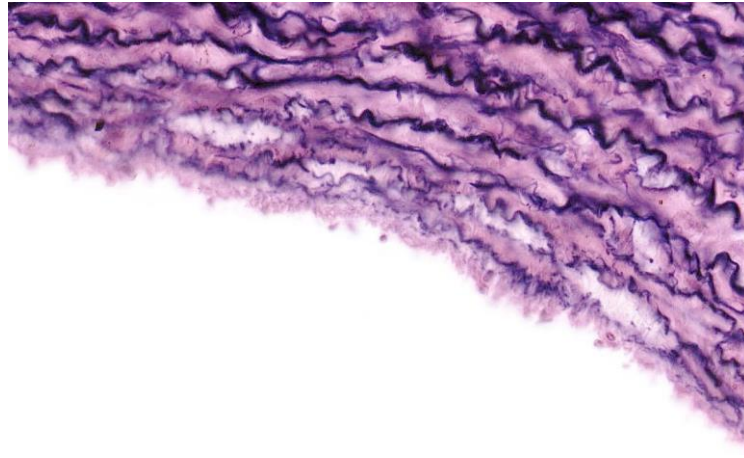
En büyük çaplı bu arterlerde elastik doku çoğunlukta olup; aorta, a.pulmonalis ve a.carotis communis gibi lümen çapı 7 mm'nin üzerinde olan arterleri kapsar. Elastinden dolayı taze yapılarda sarı renkte izlenirler. Damarların genel histolojik yapısına uygun olarak, duvarları 3 tabakadan oluşmuştur. İçten dışa doğru bu tabakalar; tunika interna (tunika intima), tunika media, tunika eksterna (tunika adventisya) şeklinde sıralanır. Arterlerde en gelişmiş tabaka tunika mediadır. Kanın uzaklaştırılmasını ve kalp atımı sonucu basınç dalgalanmalarını yumuşatır. Sistolde elastik lamina gerilir ve basınç değişimini azaltır. Diyastolde ise elastik sıkışma arteriyel basıncı düzenler. Kalpten uzaklaştıkça arter basıncı, akım hızı, basınç değişkenlikleri azalır.



(Üç ana tabakadan oluşan elastik arter yapısı)

Tunika Interna

Tek katlı yassı hücrelerden oluşan endotel ile bunun altında açık renkli ince bir subendotel tabakadan oluşmuştur. Söz konusu tabaka, longitudinal yönde ince elastik ağlardan zengindir. Bunların arasında az miktarda kollajen lifler, fibrositler ve düz kas hücreleri yer alırlar. Çapı çok geniş olmayan elastik tip arterlerde subendotelyal tabakanın elastik lifleri, tunika media sınırında yoğunlaşarak ince pencereci elastik bir membran oluştururlar. Bu yapıya membrana elastica interna-fenestrata adı verilir. Aorta ve a.pulmonalis'te bu membran her zaman net bir şekilde ayırt edilemez (13, 14).

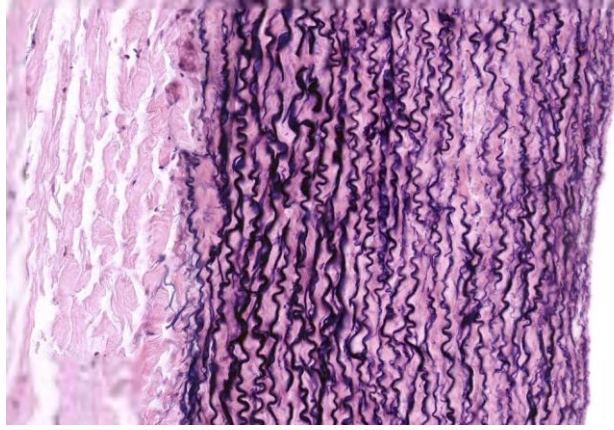


(Tunika interna)

Tunika Media

En geniş tabakayı oluşturur. Esas yapı, sayıları 50–60 arasında değişen konsantrik elastik lamellerden oluşmuştur. Bu nedenle bu tip arterlere elastik tip arter adı verilir. Bağ dokusunun elastik liflerini gösterebilmek için elastik lif boyası ile boyanmış preparatlardan faydalanılır. Bu tip özel boya ile boyanmış preparatlarda elastik lifler gerginliklerini kaybettiklerinden ondüle tarzında bir görünüş verirler. Bu elastik liflerin sayıları kalbe yaklaştıkça artar. Tunika media'nın dış sınırında membrana elastica eksterna görülmez. Elastik liflerin aralarını kollajen lifler, bağ dokusu elemanları doldurur. Az sayıda düz kas hücrelerine de rastlanır. Elastik tip özel boyamada elastik lifler ve bağ dokusu hücrelerinin çekirdekleri açık veya koyu

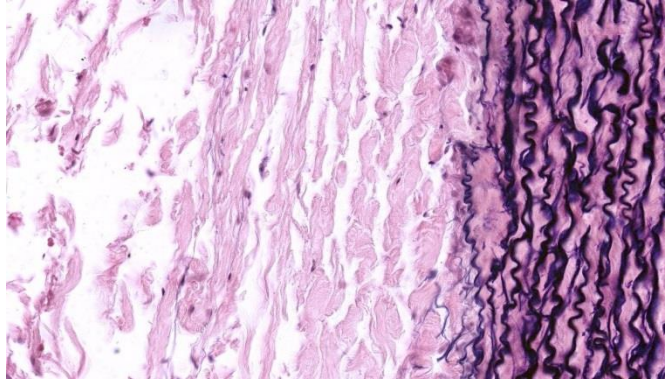
siyah renkte boyanırlar. Az sayıdaki kollajen lifler ise pembe-kırmızı renkte, diğer doku elemanları sarı renkte bir görünüm verirler (15).



(Tunika media)

Tunika Eksterna

Oldukça ince olup gevşek bağ dokusundan yapılmıştır. Kesin bir sınır yapmaksızın çevre bağ dokusu ile karışır. Kollajen lifler arasında az miktarda elastik lifler, düz kas hücreleri bulunur. Ayrıca vasa vasorum ve vaso motor sinirlere de rastlanır (20).

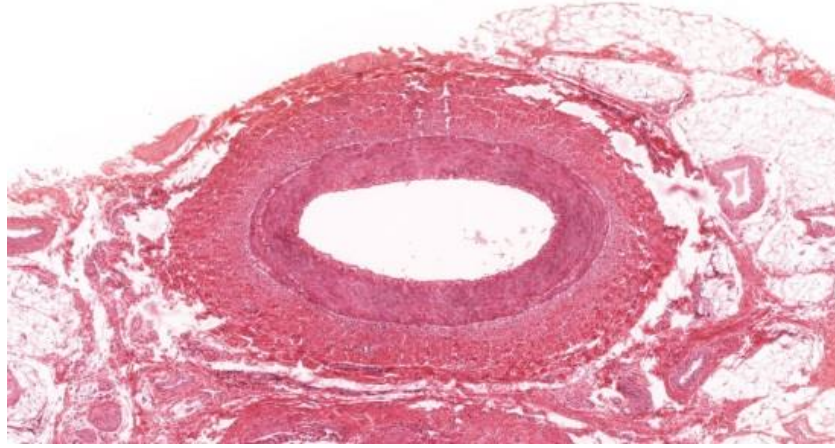


(Tunika adventisya-eksterna)

2.1.2. Musküler Tip Arterler (Orta Boy Arterler)

Çapları 2,5-7mm arasındaki arterlerdir. Bir arter yapısında olduğu gibi tunika intima; endotel ve subendotelyal tabakalardan oluşmuştur. Musküler tip arterlerde tunika media ile tunika interna arasında, bir ayırıcı tanı özelliği olarak, H&E ile

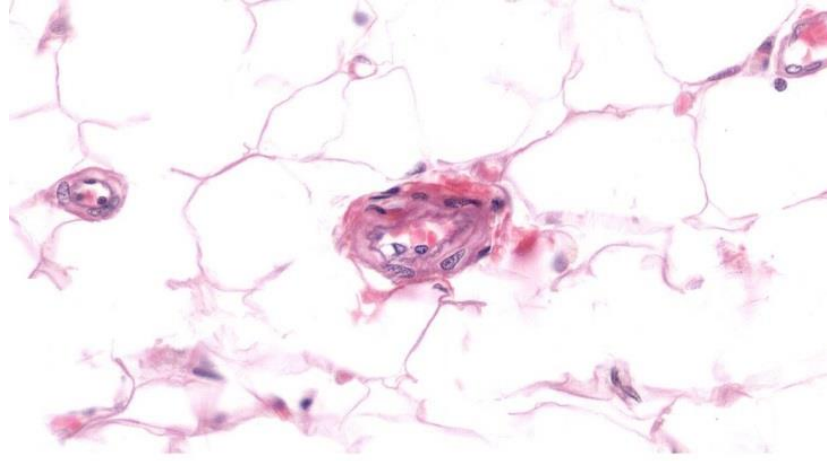
boyanmış preparatlarda ondüleli parlak pembe renkli belirgin membrana elastika interna seçilir. Yer yer oval açıklıklar içeren söz konusu tabaka membrana fenestra olarak da adlandırılır. Tunika media, musküler arterlerin en kalın tabakası olup sirküler seyreden birçok düz kas hücre tabakalarından oluşmuştur. Tunika mediadaki düz kas hücreleri arasında kollajen ve ince elastik lifler bulunur. Tunika eksterna, gevşek bağ dokusu içerir ve oldukça kalındır. Bu yapı içinde vasa vasorum ile vaso motor sinirlere rastlanır. Tunika eksternanın belirli bir sınırı olmayıp komşu yapıların bağ dokusu ile karışır. Tunika media ile tunika eksterna arasında, bazı preparatlarda çok güzel seçilebilen membrana elastika eksterna bulunur (15).



(Musküler arter katmanları)

2.1.3. Küçük Çaplı Arterler ve Arteriyoller

Çapları 100 mikrometreden az olan bu arterlerin tunika intiması, endotel ve membrana elastika internadan oluşur. Bu membran endotel altında ince parlak bir çizgi olarak gözlenir. Tunika media küçük çaplı arterlerde en çok sekiz sıralı, arteriyollerde ise bir-iki sıralı düz kas tabakasıdır. Membrana elastika interna görülmeyebilir. Tunika adventisya, longitudinal seyirli kollojen ve elastik lifler içeren gevşek bir bağ dokusu tabakasıdır. Membrana elastika eksterna bulunmaz. Çapı genellikle 0,5mm'den dar olan arteriyoller, kapiller ağdaki kan akımını kontrol eden önemli damarlardır. Arteriyolden kapillerin ayrıldığı yerde, arteriyol duvarındaki düz kaslarda hafif bir kalınlaşma prekapiller sfinkteri oluşturur. Bu sfinkterin kasılması kapillere kan geçişini engeller (15, 16).



(Arteriyol yapısı)

2.2. VASKÜLER ENDOTEL

Normal endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir skuamöz epitel tabakasıdır. Kan ve interstisyel dokular arasındaki stratejik yerleşiminden dolayı vasküler endotelin, intravasküler ve ekstravasküler olayları düzenleyici bir rolü vardır. Vasküler endotel hücre zarı geçirgenliğini, lipid transportunu, vazomotor tonusu, koagülasyonu, fibrinolizi ve inflamasyonu etkileyerek normal kardiyovasküler hemostazın korunmasında aktif olarak rol alır. Normal endotel kan akımına karşı hem trombozistans bir yüzey görevi görürken, hem de kan ve damar duvarı arasında makromoleküler bir bariyer vazifesi yapar (17). Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve stratejik anatomik pozisyonları dolayısı ile vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının komponentleri arasında (trombosit, monosit, enzimler, hormonlar v.d) selektif “geçirgen” bir bariyer oluşturur. Bunun için endotel hücreleri luminal yüzeyde dolaşım için nonadheziv bir yapıda bulunmalıdır. Bu görevi yanında endotel hücrelerinin damar tonusunun düzenlemesi, koagülasyon, hücre büyümesi ve ölümü, lökosit migrasyonu gibi çeşitli olaylarda rolü vardır (17).

Vasküler endotelin, antikoagülan yüzey oluşturmasında birçok mekanizma etkilidir:

1. Prostaglandin E2 (PGE2) ve adenozin gibi vazoaktif maddeler vasküler endotelden salgılanarak ve trombosit agregasyonu engellenir.

2. Endotel yüzeyinin heparin gibi maddelerle etkileşmesi sonucu antitrombin III (ATIII)'ün aktive edilmesi ile fibrin oluşumu engellenir.

3. Vasküler endotel kaynaklı doku plazminojen aktivatörü (t-PA) fibrinolizis de rol alır.

4. Trombomodulin salgılayarak protein C'yi bağlar. Faktör V ve VIII inhibe edilmiş olur (17).

Vasküler endotel, kan basıncının ve akımının kontrolünde önemli rol oynayan maddelerin salınmasında veya modifiye edilmesinde metabolik olarak aktif bir rol oynar. Bu tip maddeler arasında; nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI2), vazokonstriktörler, antikoagülanlar (trombomodulin, protein-C), fibrinolitikler (t-PA) ve trombosit agregasyonunu inhibe eden faktörler (NO ve PGI2) yer alır. Nitrik oksit, nitrik oksit sentetaz ile argininden sentez edilir. Bu maddenin pek çok fonksiyonu bulunmaktadır. Dolaşımda patent bir vazodilatör olan guanilat siklazı bağlar, cGMP düzeyini arttırarak vazodilatasyona neden olur. Endotel kaynaklı vazokonstriktörler ve endotelin de trombin ve epinefrine cevaben salgılanırlar (17, 18).

2.2.1. Endotel Hücresinin Fonksiyonları

Endotel hücresinin başlıca fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir:

1. Dolaşım ve damar duvarı arasında selektif geçirgen bir bariyer oluştururlar.
2. Dolaşımda trombojenik olmayan bir yüzey vazifesi görürler.
3. Çeşitli vazoaktif maddeler yaparlar.
4. Damar düz kas hücresi proliferasyon ve migrasyonunu düzenlerler.
5. Koagülasyon ve fibrinolitik olaylarda modülatör rol oynar.
6. İnflamatuar ve immünolojik olaylarda rol oynar.
7. Metabolik aktivitesi vardır (lipid oksidasyonundaki rolü) (18, 19).

2.2.2. Endotel Hücre Hasarına Damarın Yanıtı

Arter duvarında iki tip hasar meydana gelir. Birincisi mekanik hasardır; arterin diseksiyonu, süturu, endarterektomisi, trombektomisi ve luminal anjioplastisi sonrası meydana gelir. İkicisi ise; arteriyel olmayan yapıların (sentetik greftler, stentler, otolog ven greftleri) implantasyonu sonrası görülür (20). 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 proliferolurlar. 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 proliferolun düz kas hücrelerinin intimaya göçüdür (21-23).

Media tabakasında düz kas hücre proliferasyonu ve intimaya migrasyonunun iki farklı büyüme faktörü tarafından tetiklendiğı gösterilmiştir. Bunlar fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF)'dür. bFGF hasarlanmış düz kas hücrelerinden ve endotel hücrelerinden salgılanır, düz kas hücre proliferasyonunu regüle eder. PDGF ise trombosit ve vasküler hücrelerden salgılanır, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunu sağlar (16).

İntimaya ulaşabilen hücrelerin sayısı hasar sonrası mediada sağ kalabilen hücre sayısı ile ilişkilidir. Normalde hücreler, arteriyel ekstrasellüler matriks ile sıkı ilişki halindedirler. Bu ilişki integrinler gibi sellüler membran reseptörleri ile sağlanır. Bu kontakt hücre reseptörlerinden hücre çekirdeğine sinyali iletilir ve hücre sağ kalımını sağlar. 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 arteriyel segmentin orta bölgesine ulaşmamaktadır. Bu alanda düz kas hücre proliferasyonu devam etmektedir. Bu sonuçlar; endotelin tekrar sağlanması ve korunmasının intimal hiperplazi kontrolünde önemli olduğunu göstermektedir (19, 23).

Düz kas hücrelerinin büyümesini, damar duvarında ya da dolaşımda bulunan bir grup otkrin-parakrin faktörler ve basınç gibi fiziksel kuvvetler uyarır. Normal

damarda NO, adenosin, prostasiklinler gibi büyüme inhibitörleri ile PDGF, bFGF, epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü, dönüştürücü 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 (24).

Buraya kadar anlaşıldığı üzere düz kas hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve ekstrasellüler matriksin artması intimal hiperplazi oluşumunda önemli rol alır. İntimal hiperplazinin patofizyolojisini anlamak için daha çok intima ve media üzerinde durulmuştur. Fakat damarın adventisyasının olaya katkısının ne olduğu üzerine çok fazla çalışma yapılmamıştır (25). Ancak sınırlı sayıdaki hayvan deneyi çalışmaları; fibroblast türevli vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin, makrofaj göçü ve neointima oluşumunda rol oynayan adventisyal vasa vasorum sayısındaki artışta önemli bir rol oynadığını göstermektedir (26).

2.2.3. Balon Hasarına Arteriyel Yanıt

Balon uygulaması sırasında aterosklerotik plak yırtılarak ayrılır ve sıklıkla tunika media hasarına bağlı olarak diseksiyon görülür. Hasardan hemen sonra damar duvarına trombositler yapışır ve degranülasyon olur. Hasardan 24 saat sonra düz kas hücreleri media tabakasında proliferasyona başlar. Dört gün sonra düz kas hücreleri intimaya göç eder ve proliferasyona devam eder. Daha sonra intimal hücreler etrafında ekstrasellüler matriksin birikmesi ile intimal kalınlaşma artar. Üçüncü ay sonunda sabit bir durum elde edilir. Bu durumda intimanın %20'si hücreler, %80'i ekstrasellüler matriksden oluşur (27, 28).

2.2.4. Arteriyel Akıma Ven Duvarı Adaptasyonu

Arteriyel akıma implante edilen damarlar yeni hemodinamik duruma adapte olmak için yapısal değişiklik gösterirler. Venöz sisteme implante edilen venede ise; değişiklik gözlenmemektedir. Arterdeki hemodinamik duruma bağlı olarak ven duvarında kalınlık artmakta, intimal hiperplazi oluşmakta, düz kas hücre proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks depolanması sonucunda medial hipertrofi görülmektedir (29). Arteriyel sisteme implante edilen tüm venler implantasyon

sonrası dört–altı hafta içinde intimal kalınlaşma göstererek lümeni yaklaşık %25 daraltırlar. Bu nadiren belirgin stenoza neden olur. Fakat intimal hiperplazi ileride greftte aterom oluşmasına neden olur (27).

Ven greftlerinde intimal düz kas hücre proliferasyonu, greftteki duvar kalınlığı ve yarıçap oranı arterlerdeki orana ulaştığı zaman durmaktadır. İlginç olarak ven greftlerde endotel sağlam olmasına rağmen hiperplazi, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu gözlenmektedir. Arteriyelize olmuş bir ven, tekrar venöz sisteme implante edilirse duvarı büzüşmekte ve tekrar bir ven görünümü almaktadır. Bu yeniden düzenlenme sırasında TGF-alfa salınımı artmaktadır. Araştırmalarda, tavşanlarda ven duvar kalınlığının temel olarak transvers olarak uygulanan tanjansiyal duvar stresi (damar tensile stres) tarafından regüle edildiği gösterilmiştir (20).

Venöz sisteme implante edilen vendede greftleme sonrasında, geçici iskemi meydana gelir. Bu iskemi-reperfüzyon siklusu hem prostosiklin, NO ve adenosin gibi antiproliferatif mediatörlerin salınımını azaltır hem de düz kas hücrelerinin proliferasyonunu doğrudan tetikleyen süperoksit radikallerini artırır. Vazo vasorumdan beslenmenin kaybı, iskemi ve fibroziste rol alır (29).

2.2.5. Damar Duvarının Yapısı ve Anastomoz Hattının İyileşmesi

Endotel bütünlüğünün bozulmasıyla kan akımındaki trombositler, derin tabakalardaki kollajen ile temas ederek agregasyona uğrarlar (30). Uygun bir anastomoz neticesinde bazal membran ve internal elastik laminanın devamlılığının sağlanması ile endotel bütünlüğü korunarak trombositlerin subendotelial alanla teması azaltılır. Bu şekilde trombositler anastomoz hattı üzerinde sadece ince bir tabaka şeklinde dizilirler. Bu ince tabaka eğer belirgin bir staz yoksa ve endotel bütünlüğü korunmuşsa çok az miktarda fibrin ve eritrosit içerir. Internal elastik tabaka venlerde belirgin olmadığı için oluşan örtü arterlere oranla daha kalındır ve lümenin tıkanma eğilimi daha fazladır. Trombosit adhezyonu ve agregasyonu ilk 4-6 saat boyunca devam eder ve daha sonra trombosit sayısı azalmaya başlar. 3-7. günlerde trombositler belirgin olarak azalır ve duvar yapısında görülemezler. Yine bu dönemde fibrinoliz belirgin olarak gözlenir. Nötrofiller onarımı takip eden saatlerde anastomoz bölgesinde çoğalmaya başlarlar ve 3. günden sonra yerlerini makrofajlara

bırakırlar. Makrofajlar 3.-7.günler arasında belirgin olarak gözlenirler ve daha sonra giderek sayıca azalır. 5. günde anastomoz hattı trombosit, fibrin ve lökositlerden oluşan psödointima ile kaplıdır. 3 günden sonra endotelizasyon belirgin hale gelir. Endotelizasyon psödointima tabakasının altında ilerler ve 14 günde tamamlanır. Bu dönemde fibrin ve trombüs artıklarının tamamına yakını uzaklaştırılmıştır. Başlangıçta endotel tabakası düzensiz yapıda olup 8 haftada remodelasyonunu tamamlayarak düz hale gelir. Bu süreç sebebiyle iyi yapılmış mikrocerrahi anastomozda trombüs gelişmesi olasılığı çok azdır (31). Endotel iyileşmesi tamamlana kadar kullanılan antikoagülan ve antiagregan ilaçlar sayesinde trombüs oluşumu baskılanabilmektedir.

2.3. HEMOSTAZ

Kanamayı durdurma olarak tanımlanan hemostaz terimi, köken olarak Yunanca'dır ve "haeme" kan anlamına "stasis" ise durma anlamına gelir (32). Hemostaz kavramı; Davie, Ratnoff ve Macfarlane'nin 1960'larda tanımladığı, prokoagulan maddeler ve zimojenlerin aktivasyonuna yol açan proenzimlerin kaskad prensibini ana hatlarıyla açıklayan "şelale" ve "kaskad" teorilerine dayanmaktadır (33). Bu teoriye göre pıhtılaşma mekanizması, pıhtı oluşumunu sınırlayan ve böylece trombüs yayılmasını önleyen çeşitli inhibitörlerin inhibe edici kontrolü altındadır. Bu trombohemorajik denge, vücutta pıhtılaşma ve fibrinolitik sistem, trombositler ve damar duvarı arasındaki karmaşık etkileşimlerle korunur.

Damar hasarından hemen sonra hemostaz süreci başlar. Normal hemostaz; vasküler endotel yanıtı, trombosit tıkaçının oluşması ve koagülasyon olmak üzere 3 aşamada gelişir. Hemostazın normal olarak sürdürülebilmesi için bu aşamalar uygun biçimde çalışmalıdır. Vasküler yanıt ve trombosit tıkaçının oluşması primer hemostaz, koagülasyon sistemi ise sekonder hemostaz olarak tanımlanır. Çünkü vasküler yanıt ve trombosit tıkaçın oluşum mekanizmaları günlük yaşamda basit endotel hasarının onarımı için yeterli olurken; daha geniş hasarlarda kan kaybını engellemede koagülasyon sürecine gereksinim vardır (34, 35).

Başlangıç hasarından sonra çoğunlukla refleks nörolojik mekanizma ve endotelin (güçlü bir endotel kaynaklı vazokonstrüktör) gibi faktörlerin lokal

sekresyonu ile kısa bir arteriyolar vazokonstriksiyon periyodu oluşur ve bu etki geçicidir. Vazospazm, hasarlanan bölgedeki kan akımını ve dolayısıyla kanamayı azaltarak koagülasyon için gerekli hücreler ve kimyasal maddelerin birikimini teşvik eder. Dokudaki hasar aynı anda kandaki Hageman faktörü (faktör XII)'nü aktive ederek de pıhtılaşma sistemini uyarır (33, 35). Ancak trombosit ve koagülasyon sistemleri aktive edilmeden de bu etkiyle kanama durdurulabilir (34, 36).

Endotel hücreleri, subendotelyal alanda hemostazda rol oynayan fakat normalde endotel yüzeyinde bulunmayan kolajen, fibronektin, vitronektin, trombosit aktive edici faktör (PAF), von Willebrand faktör ve fibrinojen gibi pek çok adheziv glikoprotein bulundurur. Endotel bütünlüğünü bozan herhangi bir olayda açığa çıkan bu maddeler; kan ile trombosit, koagülasyon faktörleri ve lökositler arasında bağlantı sağlarlar (34, 35).

Pıhtının oluşumunda üç temel aşama söz konusudur: Trombosit adhezyonu, sekresyonu ve agregasyonu. Endotel hasarı ile açığa çıkan kollajenden zengin subendotelyal ekstrasellüler matriks, trombositlerin yapışacağı bir zemin oluşturur. Endotelden serbestleşen vWF de trombositlerin hasarlı bölgeye yapışmasını (adhezyon) kolaylaştırır ve sağlamlaştırır. Subendotelyal dokuya yapışarak aktive olan trombositlerdeki α ve δ granüller ortama salınır (sekresyon) ve normalde trombosit membran iç yüzeyinde bulunan fosfolipidlerle, agregasyon için gerekli olan glikopeptit (Gp) IIb/IIIa reseptörleri açığa çıkar. Granüllerden salgılanan tromboksan A2 (TXA2), endotelin ile başlayan vazokonstriksiyonun devam etmesini sağlar. Adenozin difosfat (ADP) trombosit agregasyonunu uyarır, kalsiyum ise faktör XII ile başlayan koagülasyon sistemini aktifleştirir. Trombosit granüllerinin salınması daha fazla trombositin ortama gelmesini uyararak aktive olmasını sağlar. Fibrinojen, aktive olan trombosit yüzeyindeki Gp IIb/IIIa reseptörlerine bağlanarak trombositlerin arasına köprü kurar. Trombositler birbirine yapışarak birikir (agregasyon) ve endotel hasarı üzerinde tıkaç oluşturur ve bu durum primer hemostaz olarak adlandırılır (34, 37).

Koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu ise; inaktif proenzimlerin aktive enzimlere dönüştüğü bir süreçtir. Her reaksiyon basamağı bir enzim, substrat ve kofaktörden oluşur. Bu komponentler fosfolipid kompleksinde toplanır ve kalsiyum

iyonuna gereksinim duyar bu nedenle tüm reaksiyonlar yalnızca etkilenen bölgede lokalize kalır (34, 38). Koagülasyon faktörlerinin faktör IV (Ca²⁺) dışında hepsi proteindir ve çoğu inaktif proenzim (zimojen) olarak kanda bulunur. Faktör V ve VIII ise enzim yapısında değildir, kemik iliğinde megakaryositler tarafından oluşturulur. Trombositlerde granüller içinde depolanarak trombosit aktivasyonu ile salınır. Faktör V ve VIII trombinin yapısını güçlendirir (39). Faktör II, VII, IX, X, protein C ve S sentez ve fonksiyonları için K vitamini gerekmektedir (40). Dolaşımda olmayan tek koagülasyon faktörü subendotelial alanda bulunan doku faktörüdür (TF-Faktör III).

Koagülasyon sistemi, pıhtılaşma faktörlerinin birbirini aktive ettiği ardışık reaksiyonlar zinciridir. Koagülasyon sisteminin klasik olarak ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere 2 yoldan başladığı bilinmektedir. İntrensik yol Hageman faktör (faktör XII) aktivasyonu ile, ekstrensik yol ise doku faktörleri ile başlar. Sonuçta her iki yol da faktör X'u aktive ederek ortak yoldan stabil pıhtı oluşumunu sağlar. Koagülasyon sistemi pek çok noktada birbirini tetikleyen ve inhibe eden tek bir sistem şeklinde çalışır. Gerçekten koagülasyon olası bir reaksiyonlar zincirinden çok bir patlama şeklinde gerçekleşir. Sistemin pek çok noktada birbiriyle olan bu bağlantısı, aynı zamanda onun daha iyi kontrol edilebilmesini de sağlar (39-41).

Endotel hasarı veya enflamasyon ile açığa çıkan doku faktörü veya kollajenin aktiflediği faktör XII ile koagülasyon sistemi tetiklenir. Faktör III daha sonra faktör VIIa ile etkileşime girerek faktör IX ve X'u aktive eder. Faktör Xa da protrombinden az miktarda trombin oluşturur. Koagülasyonun yayılması; trombinin tekrar tekrar faktör XI, IX, V ve VIII'i aktive etmesiyle gerçekleşir. Trombin ayrıca trombositlerin agregasyonunu ve aktivasyonunu da uyarır. Her seferinde sistemde tekrar tekrar aktiflenen ve çoğalan koagülasyon faktörleri, çok fazla miktarda protrombinden trombin oluşturur. Sonuç olarak, trombin plazma proteinlerinden fibrinojeni fibrine dönüştürür. Ayrıca bu sırada trombin faktör XIII'ü aktifleştirerek fibrin lifçikleri ağı ile istenen stabil pıhtıyı oluşturur ve bu durum sekonder hemostaz olarak adlandırılır (42, 43).

Sağlam endotel, koagülasyon sisteminin durdurulmasında en önemli role sahiptir. Sağlam endotel pıhtı oluşumunun durdurulmasını ve endotel tamiri tamamlanmışsa fibrinin fibrinolizis ile yıkılmasını sağlar. Pıhtı oluşumu sağlam

endotele ulaştığında endotel yüzeyine çıkan heparan benzeri molekül ATIII'ü aktive eder. Antitrombin III; karaciğerde üretilen ve vücut sıvılarında yaygın olarak bulunan güçlü bir antikoagölan maddedir ve koagölasyon sırasında oluşan serin proteazların başlıca inhibitörüdür (13). Antitrombin III tüm aktif faktörleri; faktör Xa, XIa, XIIa,IXa, trombin ve TF-VIIa kompleksini inaktive eder. Diğer yandan trombin endotel yüzeyinde bulunan ve spesifik trombin (IIa) reseptörü olan trombomodölüne bağlanır, protein C ve protein S'yi aktive eder. Aktive protein C de faktör Va ve VIIa gibi yardımcı faktörleri etkisizleştirir. Böylece tüm aktif ve yardımcı faktörlerin inaktive edilmesi ile koagölasyon sistemi durdurulmuş olur (44, 45).

Fibrinoliz olayı; plazminojenden oluşan plazmin ile fibrini bir arada tutan fibrin iplikçiklerinin parçalanmasıdır. Plazminojen pıhtı oluşumu sırasında fibrine bağlanan inaktif bir dolaşım proteimidir. Plazminojen, endotelin ürettiği doku plazminojen aktivatörü (t-PA), ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) ve temas faktörleri olan faktör XIa, XIIa, kinin ve kallikrein tarafından aktive edilerek plazmine dönüştürölür. Fibrine bağlı plazminojeni aktive etmede en etkili olan tPA'dır. tPA aynı zamanda fibrinolizin pıhtı oluşum yerinin ötesine geçmesini de önler (46, 47). Pıhtı fibrinoliz ile fibrin yıkım ürünlerine parçalanır.

Sonuç olarak, hemostatik sistem normal şartlarda bir taraftan damar içinde kanın akışkanlığını sağlayan koruyucu mekanizmalarla tromboz oluşumunu önlerken, diğer taraftan herhangi bir yaralanma durumunda koagölasyonu başlatan mekanizmalar ile hızla sağlam stabil pıhtı oluşturur. Pıhtılaşma ve akışkanlık arasındaki hassas denge antikoagölan ve prokoagölan maddelerin dengesiyle sağlanır.

Kalıtsal veya edinsel koagölasyon faktör eksiklikleri, trombositlerin sayıca azalması ya da bozulmuş fonksiyonları sık olarak kanama nedeni olurken, pek çok kalıtsal hastalık (AT III, protein C veya protein S eksikliği, faktör V Leiden mutasyonu), predispozan faktörler (sigara, oral kontraseptif kullanımı) ve/veya edinsel patolojiler (şiddetli infeksiyon, kanser, kemoterapi, cerrahi) tromboz riskini artırabilir (48, 49). Ayrıca şiddetli travma, büyük cerrahi operasyonlar ya da kardiyopulmoner bypass sistemik plazmin aktivasyonu ile fibrinolizi aktive edebilir (50).

2.4. HEMOSTATİK AJANLAR

Genel olarak, cerrahi sızdırmazlık maddeleri 3 kategoriden birine ayrılır:

1. Doğal polimer bazlı sızdırmazlık maddeleri (fibrin, kollajen ve albümin esaslı)
2. Sentetik polimer bazlı sızdırmazlık maddeleri (poliüretan, polietilen glikol ve polyester bazlı)
3. Siyanoakrilat sızdırmazlık maddeleri (51)

2.4.1. Polietilen Glikol Polimer

PEGP; 2 polietilen glikol polimer, bir seyreltik hidrojen klorür çözeltisi ve bir seyreltik sodyum fosfat/sodyum karbonat çözeltisinden oluşur. Bu bileşenler, aplikatör içeren bir kit içinde gelir. Uygulama sırasında bu bileşenler dokuya veya sentetik greftlere kovalent olarak bağlanan bir hidrojel oluşturur. Vasküler rekonstrüksiyon sonrası mekanik olarak ek hemostaz sağlamak için kullanılmaktadır. 60 saniye içinde polimerize olur ve uygulama sonrası 30 gün içinde emilir (12). PEGP gibi cerrahi sızdırmazlık maddeleri, kardiyak ve vasküler cerrahi anastomozlarında yüksek basınçlı suture hatlarındaki kanamayı kontrol etmek için kullanılmaktadır (52, 53). Çeşitli klinik ve klinik öncesi çalışmalarda, PEGP'nin esnekliği ve elastikiyeti korunurken hızlı ve güçlü bir sızdırmazlık sağladığı ve yara iyileşmesine olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir (53, 54).

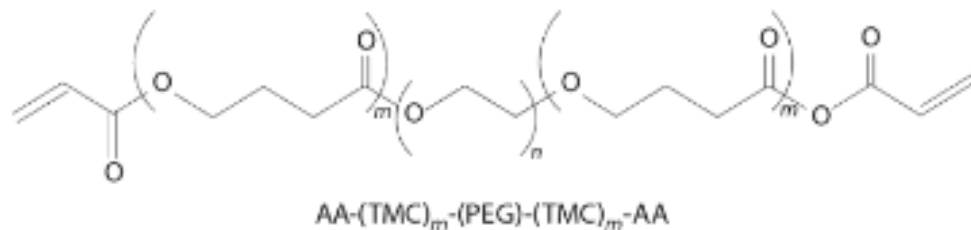
PEGP, insan/hayvan proteini veya glüteraldehit içermeyen tamamen sentetik bir sızdırmazlık maddesidir ve herhangi bir olumsuz doku yanıtını indüklemeyebilir. Minimum düzeyde toksitesi olduğu ve dört hafta içinde tamamen emilebildiği gösterilmiştir (12, 53). PEGP ticari formu; aplikatör ucu, polietilen glikol içeren toz bileşen ve sıvı bileşenlerin olduğu tek kullanımlık iki şıngal sistemden oluşur, oda sıcaklığında (yaklaşık 25 ° C) saklanabilmektedir ve hazırlandıktan sonra 2 saat içinde kullanılmalıdır. Ek bir sızdırmazlık maddesi olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır ve dikiş, mekanik kapatma yerine kullanılmamalıdır. PEGP uygulama sonrası, 24 saat içinde hacminin dört katına kadar şişer ve oluşan hidrojel tekrar emildiğinde ilave şişlik meydana gelir. Bu şişme sebebiyle mekanik basıya potansiyel olarak duyarlı olan anatomik yapılar üzerindeki olası etkisi dikkate

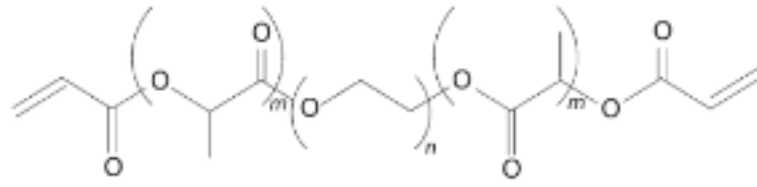
alınmalıdır. Basıya duyarlı boşluklarda veya artmış bir kompresyon riski olan hastalarda (örneğin konjenital kalp cerrahisi) şişmeye bağlı oluşabilecek basınç etkisinin önlenmesi için, püskürtme formu kullanılarak ince bir tabaka halinde uygulanması önerilir. PEGP tamamen polimerize olana kadar uygulama bölgesine temas edilmemesi ve intravasküler olarak uygulanmaması önerilmektedir (12). PEGP, arteriyel ve venöz rekonstrüksiyonlarda hemostat olarak kullanılmak üzere Avrupa'da Şubat 2000'de onaylanmıştır. Güvenliği veya etkinliği ile ilgili herhangi bir nedenden dolayı geri çekilmemiştir (12).

Yapılan klinik öncesi çalışmalarda; PEGP'in sitotoksik, mutajenik ve klastojenik olmadığı gösterilmiş ve hemostaz etkinliği üç hayvan modelinde değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda; PEGP'nin biyolojik olarak uyumlu olduğu, kontrol gruplarına kıyasla hemostaz süresini ve kan kaybı miktarını azaltmada etkili olduğu, tamamen emilebilir olduğu ve vasküler anastomoz hattında hemostazı sağladığı gösterilmiştir. In vitro çalışmalarda, PEGP'in <3 saniye içinde hidrojel form oluşturduğu, dikiş deliklerini etkili bir şekilde kapattığı ve <30 gün içinde emildiği saptanmıştır (53).

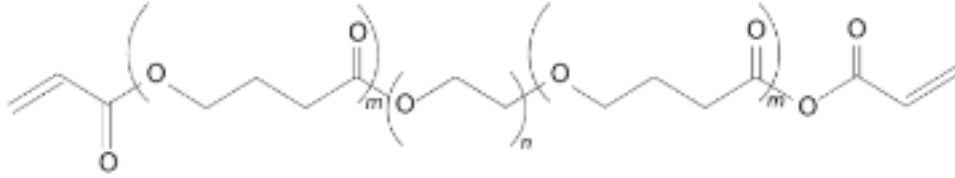
Klinik öncesi çalışmalarda gösterildiği üzere; uygulama yerinde şişme veya ödem gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları, PEGP'nin dokuya tam olarak yapışmaması, tromboz ve tromboembolizm gibi durumlar açısından dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir.

148 hastayı içeren prospektif, randomize, kontrollü çok merkezli klinik çalışmada, PEGP kullanılan grupta beklenmeyen olumsuz bir olayla karşılaşılma ve hemostaz sağlamadaki etkinliği istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı saptanmıştır (55). 131 hasta içeren Almanya ve Hollanda merkezli, randomize olmayan bir klinik çalışmada ise; çeşitli greft materyalleri kullanılarak vasküler greft anastomozundaki hemostatik etkinliği gösterilmiş ve PEGP kullanımıyla ilişkili olumsuz bir durumla karşılaşılma (12).





AA-(LA)_m-(PEG)-(LA)_m-AA
Primer macromer



AA-(TMC)_m-(PEG)-(TMC)_m-AA
Sealant macromer

(Klinik kullanım sırasında, makromerler hedef dokuya iki parça halinde uygulanır: Doku bağı sağlamak için bir primer çözelti ve istenen mekanik özellikleri sağlamak için bir sızdırmazlık maddesi çözeltisi. Her iki bileşen de hedef bölgeye sulu çözeltiler halinde eklenir ve bu şekilde etki gösterir.)

2.4.2. Sığır Serum Albumin-Glutaraldehit

Sığır serum albumin-glutaraldehit, saflaştırılmış %45 sığır serum albümini(SSA) ve %10 glutaraldehyitten oluşan iki bileşenli bir cerrahi yapıştırıcıdır (11). SSA-glutaraldehit, erişkin hastalardaki büyük damarların (aort, femoral ve karotid arter gibi) cerrahi onarımında standart yöntemlere yardımcı olarak hemostaz sağlamada endikedir. İçeriğindeki SSA, spongiformensefalopatinin sığırlarda rastlanmadığı ülkelerden elde edilir ve virüsleri azaltan veya etkisiz hale getiren işlemlerden geçirilir. Bileşenler yeniden kullanılabilir bir dağıtım cihazı, aplikatör uçları ve aplikatör uç uzatıcılarından oluşan kontrollü bir sistem tarafından uygulanır. Uygulama sırasında bileşenler, önceden tanımlanmış bir oranda çapraz bağlanmanın başladığı aplikatör ucunda karıştırılır. Dağıtım cihazı, bileşenlerin in vitro olarak tekrar kullanılabilir şekilde karıştırılmasını sağlamak için tasarlanmıştır. Glutaraldehit molekülleri, önce SSA moleküllerini birbirine kovalent olarak bağlar ve sonra uygulama bölgesindeki doku proteinlerine bağlanır. Bu sayede vücudun pıhtılaşma mekanizmasından bağımsız olarak esnek bir mekanik sızdırmazlık

oluşturur. SSA-glutaraldehit, 20 ila 30 saniye içinde polimerleşmeye başlar ve 2 dakika içinde hedeflenen bağlanma kuvvetine ulaşır. SSA-glutaraldehit ayrıca, sentetik greft uygulamalarında mekanik olarak sentetik greft materyaline yapışır. 25 °C'de saklanırsa 3 yıl raf ömrüne sahiptir. Uygulama sonrasında 3-6 ay içerisinde çözünerek kaybolur. SSA-glutaraldehit'in kullanımı FDA onayında da belirtildiği üzere, sığır kökenli materyallere duyarlılığı bilinen hastalarda kullanımı, intravasküler olarak kullanımı ve serebrovasküler tamirlerde kullanımı kontrendikedir (11). SSA-glutaraldehit'in ticari formu, Amerika Birleşik Devletleri'nde Aralık 1999'da akut torasik aort diseksiyonunun onarımında kullanılmak üzere onaylandı ve o zamandan beri ABD'de kullanılmaktadır. SSA-glutaraldehit'in ABD dışındaki ticari dağıtımı Nisan 1998'de başlamıştır. SSA-glutaraldehit, güvenliği veya etkinliği ile ilgili herhangi bir nedenden dolayı geri çekilmemiştir (11).

Yapılan klinik öncesi çalışmalarda SSA-glutaraldehit ve uygulama cihazı; biyouyumluluk, sitotoksisite, sistemik ve intrakutanöz toksisite, duyarlılık ve pirojenite açısından değerlendirilmiş ve sonuçlar “olumlu/toksik olmayan” şeklinde gösterilmiştir. Ayrıca klinik öncesi analitik fonksiyonel değerlendirmede; SSA-glutaraldehit'in yeterli bağlanma kuvvetine sahip olduğu ve tekrar kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (56, 57).

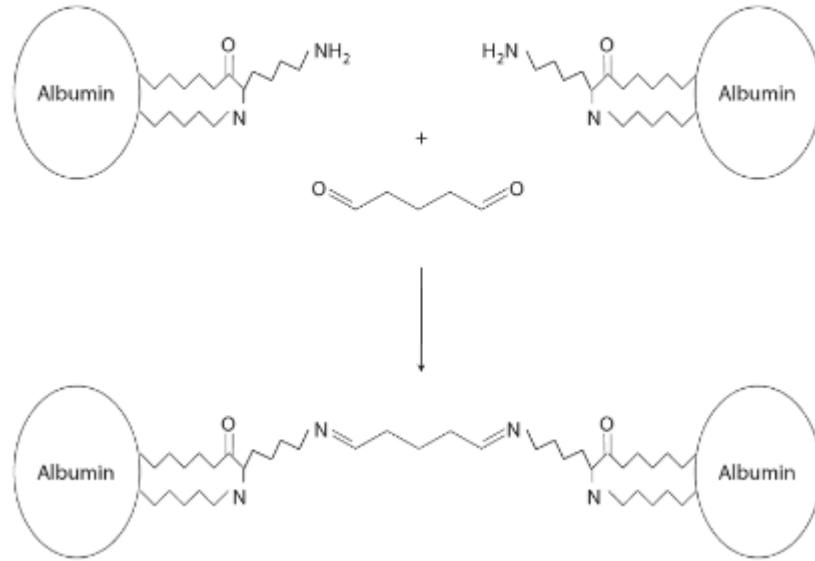
Bu çalışmalar sonucunda ise;

- 1.SSA-glutaraldehit'in sinire doğrudan uygulanmasının akut sinir hasarına neden olabileceği,
- 2.Kalbin yüzeyine doğrudan SSA-glutaraldehit uygulaması, ileti sistemine ulaşabilen ve akut fokal sinoatriyal düğüm dejenerasyonuna neden olabilen, miyokardiyuma uzanan pıhtılaşma nekrozuna neden olabileceği,
- 3.Polimerize haldeki SSA-glutaraldehit'in, dolaşımdaki kanla teması lokal veya sistemik embolilere neden olabileceği gösterilmiştir(11).

Ayrıca SSA-glutaraldehit'in enfeksiyonvarlığında ve aşırı duyarlılık reaksiyonu sebebiyle aynı hastada tekrar tekrar kullanımı önerilmemektedir.

Eddy CA ve ark. tarafından yapılan ve kuzularda akut torasik aort diseksiyonunda SSA-glutaraldehit'in etkinliğinin değerlendirildiği deneysel çalışmada; SSA-glutaraldehit kullanımının operasyon sonrası üçüncü ayda aortun

akut onarımı sonrası yırtılma insidansını, distal cerrahi onarım bölgesinde yeniden diseksiyon insidansını, diseksiyon ilerleme insidansını, kronik diseksiyon oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (56). Gundry SR ve ark. tarafından yapılan deneysel çalışmada, 12 sığır kalbi üzerinde in vitro koroner arter anastomozu yapılmış ve tüm greftlerdeki anastomozun 300 mm-Hg basınç altında sızıntı olmadan korunduğu ve intraluminal materyale rastlanmadığı gösterilmiştir (57). 151 hastayı kapsayan prospektif, çok merkezli, randomize kontrollü çalışmada SSA-glutaraldehit kardiyak, aortik ve periferik vasküler cerrahide kullanılmış; SSA-glutaraldehit grubunun, hem hasta başına hem de anastomoz bazında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksek bir intraoperatif hemostaz oranına sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca SSA-glutaraldehit kullanılan hastalarda, hemostaz sağlamak için primer tamirlerde daha az oranda plejit kullanıldığı gösterilmiştir. SSA-glutaraldehit ve kontrol grubu arasında olumsuz olaylarda ise istatistiksel farka rastlanmamıştır (58).



(Glutaraldehit; albümin proteinindeki amin gruplarıyla, özellikle lizin amino asit kalıntılarındaki aminlerle reaksiyona girer ve çapraz bağlı bir albümin ağı oluşturarak etki gösterir.)

III. MATERYAL VE METOD

3.1. ÇALIŞMA PLANI

Randomize, kontrollü, deneysel bir araştırma olan çalışmamıza; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan izin alındıktan sonra başlanmış ve çalışmamız Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda randomize olarak seçilen, ortalama 2-3 kg ağırlığında 21 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanıldı. Çalışma süresi boyunca tüm denekler aynı yerde ($20\pm 2C^{\circ}$ sıcaklıkta, havalandırma tertibatı olan, 12 saat gece 12 saat gündüz koşullarının sağlandığı bir odada) bakıldı ve pelet tipi tavşan yemi ile ad libitum beslendi. Tavşanlara preoperatif kulak arkasında bulunan marginal venden branül takıldı. Deney günü tavşanlara anestezi olarak 50 mg/kg intramüsküler ketamin ve 5 mg/kg intramüsküler ksilazin uygulandı. Profilaktik antibiyoterapi amacıyla preoperatif olarak tavşanlara 50mg/kg dozunda sefazolin intravenöz yol ile uygulandı. Cerrahi sırasında daha iyi görüş sağlamak amacıyla deneklerin insizyon yapılacak boyun orta hattı tıraş edilip povidon iyodür ile dezenfeksiyon sağlandı. (Fotoğraf 1) Çalışmadaki tüm anastomozlar aynı araştırmacı tarafından yapıldı. Bütün deneklerde anastomoz için sağ ana karotid arter kullanıldı. Sterilizasyon sağlanarak uygun pozisyon verildi ve tüm grup tavşanlara vertikal orta hat boyun insizyonu yapıldı ve sağ ana karotid arter eksplore edildi. (Fotoğraf 2) Daha sonra ana karotid arter diseke edilerek, 100 IU/kg dozda iv. heparinizasyon yapıldı. Ana karotid arter, proksimal ve distalinden bulldog klempkle klempklenip ve transekte edildi. (Fotoğraf 3) Ağırlığı 2-3 kg arasındaki Yeni Zelanda tipi erkek tavşanlarda ortalama karotid arter çapının 1,5-2 mm arasında değişiklik göstermesi üzerine anastomoz alanını daraltmamak için; 8/0 polipropilen suture ile tek tek suture tekniği kullanılarak uç uca anastomoz tamamlandı. Anastomoz sonrasında akım duplex ultrasonografi ile değerlendirildi. Anastomoz sonrasında Grup 1 (7 adet) tavşanların sağ ana karotid arter anastomoz sahasına lokal olarak herhangi bir hemostatik ajan uygulanmadı. Grup 2 (7 adet) tavşanların sağ ana karotid arter anastomoz sahasına lokal olarak 0,5cc SSA-glutaraldehit anastomoz hattını tam olarak kapatacak şekilde uygulandı. (Fotoğraf 4) Grup 3 (7 adet) tavşanların sağ ana karotid arter anastomoz sahasına lokal olarak 0,5cc PEGP anastomoz hattını tam olarak kapatacak şekilde uygulandı.

(Fotoğraf 5) Kanama kontrolünün ardından tüm gruptaki tavşanların boyun insizyonları anatomik planda katlarına uygun olarak kapatıldı.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınırken belirttiğimiz üzere; operasyon sonrası bakım için azami tedbirler alındı.

- 1) Operasyon sonrası dönemde ilk 7 gün boyunca, birinci haftanın sonunda ise; yara yerine ve genel duruma bağlı olarak haftada 3 kez hipokloröz asit (HOCl) ile pansuman, yara yeri takibi ve gözlem yapıldı. Deneysel hayvanlarının tamamında yara iyileşmesi sağlandı ve herhangi bir debrütman, ek müdahaleye gerek duyulmadı.
- 2) Deneysel hayvanları; enfeksiyon/apse gelişimi, genel güçsüzlük, konvülsiyon, koma hali, parezi/paralizi, ataksi, inkontinans yönünden yakın izleme alındı ve veteriner hekim tarafından düzenli olarak değerlendirildi. Yüksek doz sodyum pentotal ile ötanazi uygulanmasını gerektirecek ve hayvan refahını engelleyecek herhangi bir durum saptanmadı.
- 3) Operasyon sırasında uygun dezenfeksiyon/sterilizasyon önlemleri alındı, profilaktik antibiyoterapi uygulandı, uygun cerrahi teknik ve yakın operasyon sonrası takip eşliğinde olası komplikasyonlar engellendi.

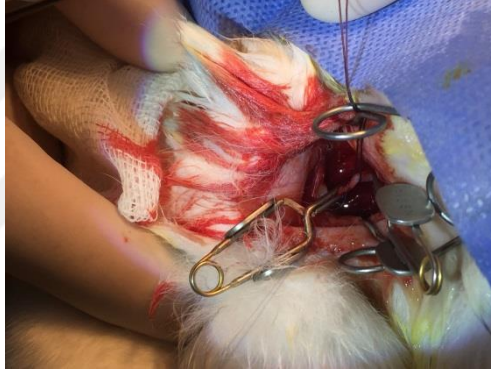
Çalışmamız sırasında deneysel hayvanı kaybı yaşanmadı. Tüm gruptaki tavşanların 28 günün sonunda anastomoz yapılan sağ ana karotid arter segmenti çıkarılarak histolojik inceleme amacıyla tespit edildi, incelenmek üzere histoloji laboratuvarına gönderildi. Daha sonra yüksek doz sodyum pentotal ile hayvanların yaşamına son verildi.



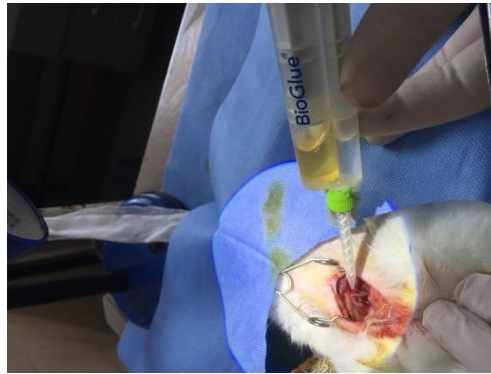
Fotoğraf 1: Uygun pozisyon sonrası sonrası povidon iyodür ile sağlanan dezenfeksiyon



Fotoğraf 2: Vertikal orta hat boyun diseksiyonu ve sağ ana karotid arter eksplorasyonu



Fotoğraf 3: Bulldog klemp uygulanmasının ardından sağ ana karotid arter transeksiyonu



Fotoğraf 4: Grup 2 tavşanlara, anastomoz sonrası lokal olarak 0,5cc uygulanan SSA-glutaraldehit



Fotoğraf 5: Grup 3 tavşanlara, anastomoz sonrası lokal olarak 0,5cc uygulanan PEGP

3.2. DENEY PROTOKOLÜ

Deneysel çalışmamızda karşılaştırılabilir sonuçlar elde edebilmek için kontrol grubu (Grup 1) tanımlandı. Kontrol grubunda anastomozlar herhangi bir hemostatik ajan kullanılmadan yapıldı. Vasküler anastomozlar tüm deneklerde, tek bir cerrah tarafından aynı teknikle, altı adet 8/0 polipropilen suture atılarak yapıldı. Anastomoz sonrasında akım duplex ultrasonografi ile doğrulandı ve deney süresi sonunda histolojik örnekleme yapılmadan önce de; anastomoz sonrası karotid arter segmenti distali klemplenerek transekte edildi ve anastomoz açıklığı proksimal pulsatil kan akımının görülmesi ile teyit edilerek doğrulandı. Çalışmamızda koagülopati varlığı ve neointimal hiperplaziye neden olabilecek diğer durumlar dışlanarak, anastomoz sahasına lokal olarak uygulanan hemostatik ajanların anastomoz sonrası neointimal hiperplazi üzerindeki etkisi araştırıldı. Kullanılan her iki hemostatik ajanın tromboembolik komplikasyonlar sebebiyle dikkatli kullanımı önerilmekte ve damar içi uygulaması kesinlikle önerilmemektedir. Bu sebeple deney sırasında hemostatik ajanların kullanımı 0,5cc ve sadece periadventisyal olarak sınırlandırıldı.

Grup 1 (7 Adet):

Grup 1 tavşanlar kontrol grubunu oluşturdu. Anastomoz sırasında herhangi bir hemostatik ajan uygulanmadı. Yirmi sekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ

ana karotid arter segmenti çıkarılarak tespit edildi ve histoloji laboratuvarına gönderildi.

Grup 2 (7 Adet):

Grup 2 tavşanlara, Grup 1'den farklı olarak operasyon sırasında sağ ana karotid arter anastomozuna lokal olarak 0,5cc SSA-glutaraldehit anastomoz hattını tam olarak kapatacak şekilde uygulandı. Yirmi sekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ ana karotid arter segmenti çıkarılarak tespit edildi ve histoloji laboratuvarına gönderildi.

Grup 3 (7 Adet):

Grup 3 tavşanlara, Grup 1'den farklı olarak operasyon sırasında sağ ana karotid arter anastomozuna lokal olarak 0,5cc PEGP anastomoz hattını tam olarak kapatacak şekilde uygulandı. Yirmi sekizinci gün sonunda anastomoz yapılan sağ ana karotid arter segmenti çıkarılarak tespit edildi ve histoloji laboratuvarına gönderildi.

3.3. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

3.3.1. Rutin Doku Takibi

Alınan örnekler %10'luk formolde 24-48 saat bekletilerek fiksasyon gerçekleştirildi. Daha sonra 1 gece akarsuda bekletildi. Ardından %70, %80, %96'lık alkol serilerinden yirmişer dakika olarak geçirildi. Ardından 4 farklı aseton serisinden yirmişer dakika geçirilerek şeffaflaştırma için otuzar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. İmmersiyonu sağlamak amacıyla 2 farklı sıvı parafine (bire saat) tabi tutulup, dokular etiketlenerek bloklandı (Doku gömme cihazı Leica EG 1150 H). Parafin bloklardan Rotary mikrotom (Leica RM 2245)'da 5 µm kalınlığındaki kesitler poly-L lysine kaplı lamlar (Isotherm) üzerine alındı.

3.3.2. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde (Etüv Nüve EN 055) bırakıldı. Ardından ilki yirmi dakika, diğer ikisi onar dakikalık üç

farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için %100-100-96-80-70'lik alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su (Distile su cihazı Nüve ND 8) ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80,%96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla yirmişer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (Merck) ile kapatıldı. Bu yöntem karotid arter dokusundaki lümen çapının, intimal alanın ve medial alanın oranlarının (BX 43 Olympus) ölçülmesine olanak sağladı. Vasküler histolojik tabakalardaki normal ve/veya anormal durumların gözlenebilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesine olanak tanır.

3.3.3. Masson-Trikrom Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde (Etüv Nüve EN 055) bekletildi. Ardından ilki yirmi dakika diğer ikisi onar dakika üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için tablo 1'deki azalan alkol serilerinden geçirildi, daha sonra distile su ile çalkalanarak boyanacak olan alan PapPen (DAKOPEN) ile sınırlandırıldı. Sınırlanan alan MassonTrikrom boyama malzemeleri içerisinde 6 damla Weigert's demirli hematoksilende 10 dakika bekletildi. Kesitler yıkanmadan direk olarak 10 damla pikrik asit solüsyonunda 4 dakika bekletildi. Distile su ile yıkanan kesitlere 10 damla ponceau asit fuksin solüsyonundan damlatılarak 4 dakika bekletildi. Ardından distile su ile yıkanan kesitlere 10 damla fosfomolibdik asit solüsyonundan damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama olmadan kesitlere 10 damla masson anilin mavisi damlatılıp 5 dakika bekletildi. Distile su ile iyice yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi için tablo 1'deki artan alkol serilerinden geçirilen kesitler, şeffaflaştırma için yirmişer dakika 3 değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 1). Bu yöntem ile karotid arterin intima tabakasındaki intimal hiperplaziye bağlı gelişen bağ doku alanları değerlendirildi.

Tablo 1: MassonTrikrom Boya Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	10'ar dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol serileri	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Weigert's demirli hematoksilen	10 dakika
Boyama	Pikrik asit solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Ponceau asit fuksin solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Fosfomolibdik asit solüsyonu	10 dakika
Boyama	Masson anilin mavisi	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	-

3.3.4. İmmünohistokimya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde (Etüv Nüve EN 055) bırakılacaktır. Ardından ilki yirmi dakika diğer ikisi onar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için %100-100-96-80-70'lik alkol serilerinden geçirildi, daha sonra distile su ile 2x5 dk şeklinde yıkandı. Fazla su peçete ile silinerek dokunun etrafı PapPen (Dakopen) ile çizildi. Sonra

kesitler 3x5 dk PBS ile yıkandı. Tripsin (0.25%), koyularak proteinlerin arasındaki çapraz bağlar koparıldı ve proteinlerin görünür hale gelmesi sağlandı. Bu işlem için kesitler 15 dk 37°C de etüv (Etüv Nüve EN 055) içinde bekletildi. Sonra tekrar 3x5 dk PBS ile yıkandı. Kesitlere yıkamadan sonra %3'lük H₂O₂ ile 5 dk muamele edildi. Bu sayede hücrelerdeki endojen peroksit aktivasyonunu inhibe etmiş olduk. Sonra tekrar 3x5 dk PBS ile yıkandı. Bloking koyularak 1 saat bekletildi. Bu sayede spesifik olmayan antijenler bloklanmış oldu. Primer antikor (a smooth muscle actin ve VEGF) ayrı ayrı önceden etiketlenmiş lamlardaki kesitlere koyuldu ve bir gece +4°C'de buzdolabında bekletildi.

Ertesi gün işe başlarken tekrar kesitler 3x5 PBS ile yıkandı. Biotinlenmiş sekonder antikorlar ile 30 dk muamele edilerek primer antikorlar daha görünür hale getirildi. Sonra tekrar 3x5 dk PBS ile yıkandı. Streptavidin ile 30 dk muamele edildi ve bu da biotin ile kompleks oluşturmuş oldu. Sonra tekrar 3x5 dk PBS ile yıkandı. DAB dediğimiz bir kromojen vasıtasıyla (5dk) sekonder antikor görünür hale getirildi. 5 dk PBS ile işlem durduruldu. 3x5 distile su ile yıkanarak mayers hematoksilen ile 1-5 dk hücrenin çekirdek boyaması yapıldı. Sonra kesitlerden fazla boyayı uzaklaştırmak için 3x 5 distile su ile yıkandı. %80 alkolde 1 dk tutulduktan sonra biraz kurutma yaparak ksilende şeffaflaşma için 30 dk bekletildi. Entellan ile de kapama yapıldı. Bu yöntem arter örneklerinde kullanılan antikorların eksprese olup olmadıklarını görüntüleyerek intimal hiperplazinin yoğunluğunun tespitine yönelik yorum yapılmasına olanak sağladı.

Hazırlanan preparatlar binoküler Olympus BX 43 ışık mikroskopunda görüntülenerek fotoğraflandı ve ImageJ fotoğraf analiz programı ile incelenerek ve lümen çapı, lümen alanı, intima kalınlığı, media kalınlığı, intima-media kalınlık oranı, intima alanı, media alanı, intima-media alanları oranı hesaplanarak sonuçlar değerlendirildi.

3.4 İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde Kruskal-

Wallis, Mann-Whitney u test kullanıldı. Analizlerde SPSS 26.0 programı kullanılmıştır.

IV. BULGULAR

4.1. İSTATİSTİKSEL SONUÇLAR

Grup 1’de intima kalınlığı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1’de media kalınlığı Grup 2’de anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Grup 1 İ/M kalınlık oranı Grup2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 2 intima alanı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1’de media alanı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 2 İ/M alan oranı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1’de lümen çapı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1’de lümen alanı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. (Tablo 2)

Tablo 2: Grup 1 ve Grup 2 Verilerinin İstatistiksel Analizi

	Grup 1		Grup 2		p
	Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan	
İntima Kalınlığı	140,64 ± 70,00	118,40	82,39 ± 44,49	85,18	0,011 ^m
Media Kalınlığı	163,7 ± 82,6	134,3	223,8 ± 77,3	215,3	0,022 ^m
İ/M Kalınlık Oranı	0,97 ± 0,53	0,78	0,38 ± 0,27	0,37	0,000 ^m
İntima Alan	78026 ± 64186	57490	46427 ± 24252	40258	0,176 ^m
Media Alan	189574 ± 113408	164191	128374 ± 27052	120568	0,008 ^m
İ/M Alan Oranı	0,39 ± 0,14	0,44	0,36 ± 0,18	0,32	0,573 ^m
Lümen Çapı	634,0 ± 221,8	573,0	447,4 ± 66,6	456,0	0,005 ^m
Lümen Alan	227703 ± 139427	179756	134220 ± 33942	129764	0,002 ^m

^mMann-whitney u test

Grup 1’de intima kalınlığı Grup 3’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 media kalınlığı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1 İ/M kalınlık oranı Grup 3’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 intima alanı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir.

Grup 1 ve Grup 3 media alanı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1 ve Grup 3 İ/M alan oranı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1 ve Grup 3 lümen çapı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1 ve Grup 3 lümen alanı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 3)

Tablo 3: Grup 1 ve Grup 3 Verilerinin İstatistiksel Analizi

	Grup 1		Grup 3		p
	Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan	
İntima Kalınlığı	140,64 ± 70,00	118,40	70,67 ± 38,77	62,52	0,001 ^m
Media Kalınlığı	163,7 ± 82,6	134,3	188,8 ± 59,1	179,8	0,185 ^m
İ/M Kalınlık Oranı	0,97 ± 0,53	0,78	0,37 ± 0,15	0,42	0,000 ^m
İntima Alan	78026 ± 64186	57490	56923 ± 12660	59689	0,789 ^m
Media Alan	189574 ± 113408	164191	189742 ± 68615	167874	0,735 ^m
İ/M Alan Oranı	0,39 ± 0,14	0,44	0,32 ± 0,10	0,29	0,151 ^m
Lümen Çapı	634,0 ± 221,8	573,0	660,2 ± 138,1	659,0	0,632 ^m
Lümen Alan	227703 ± 139427	179756	236592 ± 189017	200256	0,652 ^m

^mMann-whitney u test

Grup 1 intima kalınlığı Grup 2 ve Grup 3'den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 2 ve Grup 3 intima kalınlığı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 4-Grafik 1)

Grup 1'de media kalınlığı Grup 2'den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Grup 1 ve Grup 3 media kalınlığı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 2 ve Grup 3 media kalınlığı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 4-Grafik 2)

Grup 1'de İ/M kalınlık oranı Grup 2 ve Grup 3'den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 2 ve Grup 3 İ/M kalınlık oranı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 4-Grafik 3)

Grup 1, Grup 2, Grup 3 intima alanı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 4-Grafik 4)

Grup 1’de media alanı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 media alanı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 3’de media alanı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. (Tablo 4-Grafik 5)

Grup 1, Grup 2, Grup 3 İ/M alan oranı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 4-Grafik 6)

Grup 1’de lümen çapı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 lümen çapı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 3’de lümen çapı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti.(Tablo 4-Grafik 7)

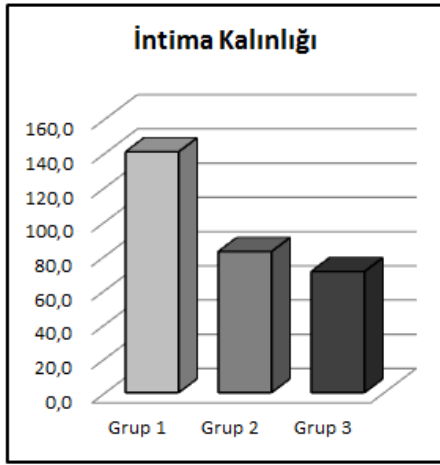
Grup 1’de lümen alanı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 lümen alanı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 3’de lümen alanı Grup 2’den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. (Tablo 4-Grafik 8)

Tablo 4: Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 Verilerinin İstatistiksel Analizi

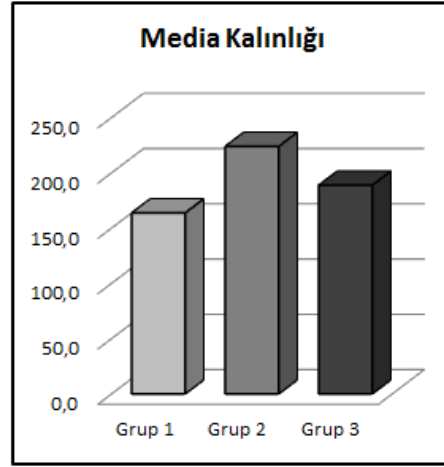
	Grup 1		Grup 2		Grup 3		P
	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
İntima Kalınlığı	140,6 ± 70,0	118,4	82,4 ± 44,5	85,2	70,7 ± 38,8	62,5	^K 0,003
Media Kalınlığı	163,7 ± 82,6	134,3	223,8 ± 77,3	215,3	188,8 ± 59,1	179,8	^K 0,048
İ/M Kalınlık Oranı	0,97 ± 0,53	0,78	0,38 ± 0,27	0,37	0,37 ± 0,15	0,42	^K 0,000
İntima Alan (x10 ³)	78,0 ± 64,2	57,5	46,4 ± 24,3	40,3	56,9 ± 12,7	59,7	^K 0,153
Media Alan (x10 ³)	189,6 ± 113,4	164,2	128,4 ± 27,1	120,6	189,7 ± 68,6	167,9	^K 0,001
İ/M Alan Oranı	0,39 ± 0,14	0,44	0,36 ± 0,18	0,32	0,32 ± 0,10	0,29	^K 0,471
Lümen Çapı	634,0 ± 221,8	573,0	447,4 ± 66,6	456,0	660,2 ± 138,1	659,0	^K 0,000
Lümen Alan(x10 ³)	227,7 ± 139,4	179,8	134,2 ± 33,9	129,8	236,6 ± 189,0	200,3	^K 0,003

^KKruskal-wallis (Mann-whitney u test)

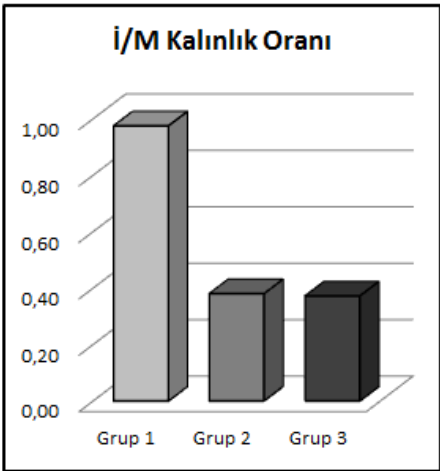
Grafik 1:



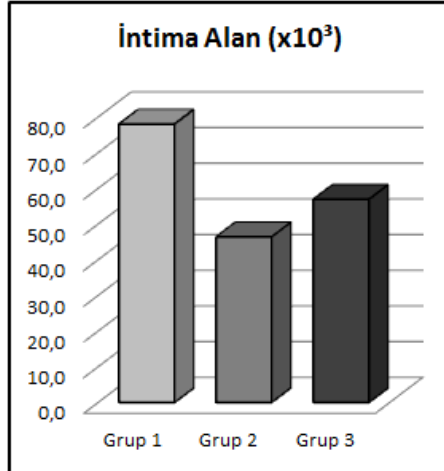
Grafik 2:



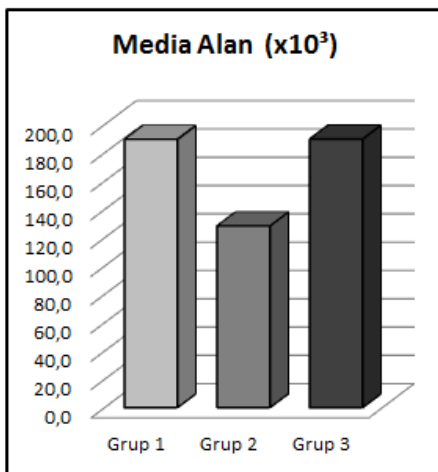
Grafik 3:



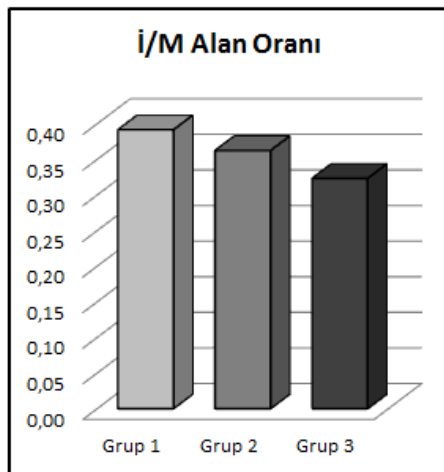
Grafik 4:



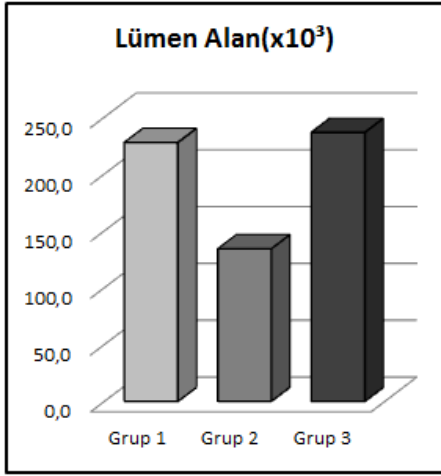
Grafik 5:



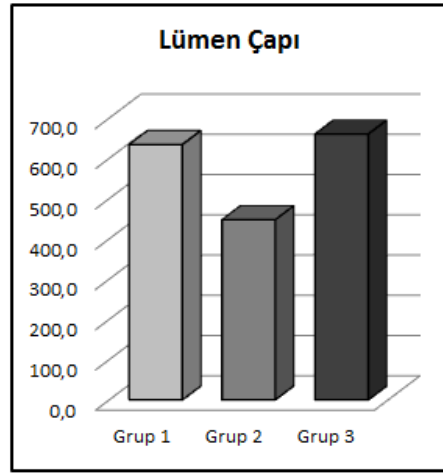
Grafik 6:



Grafik 7:



Grafik 8:

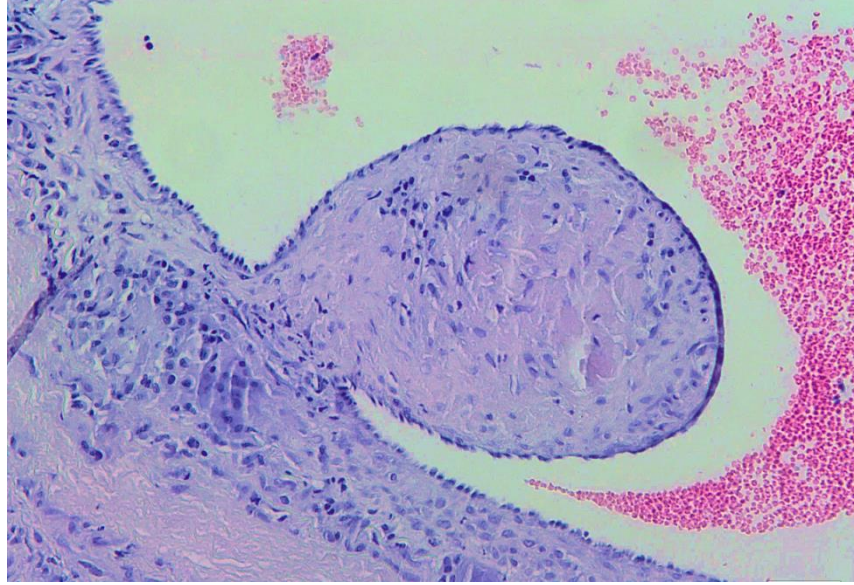


4.2. HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA SONUÇLARI

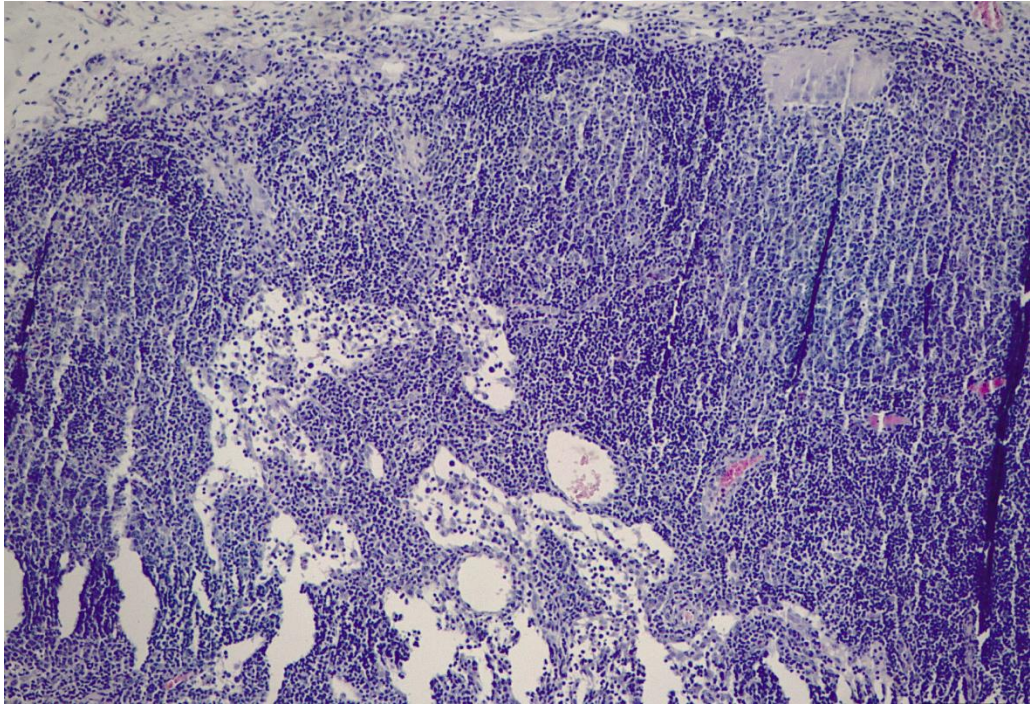
4.2.1. Grup 1 H&E boyama sonuçları



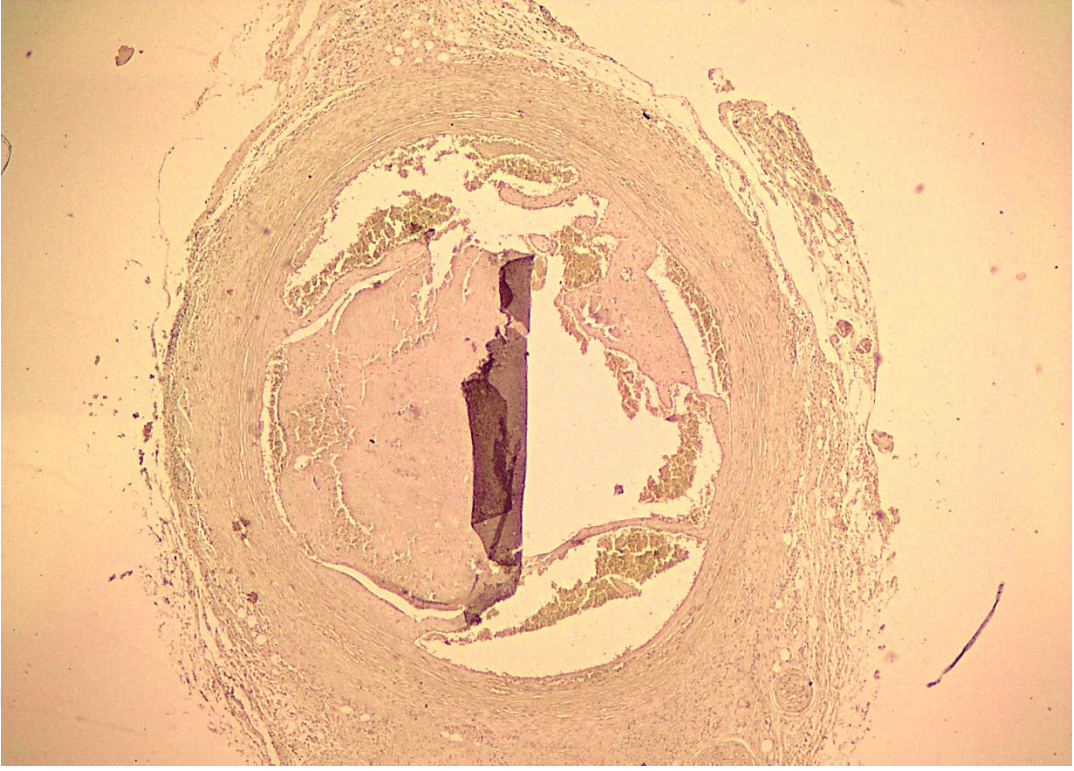
Resim 1: Grup 1'e ait örneklerde kesi ve sütür işlemine cevaben oluşan skar dokusu ve lenfosit infiltrasyonu (siyah yıldız) 4x



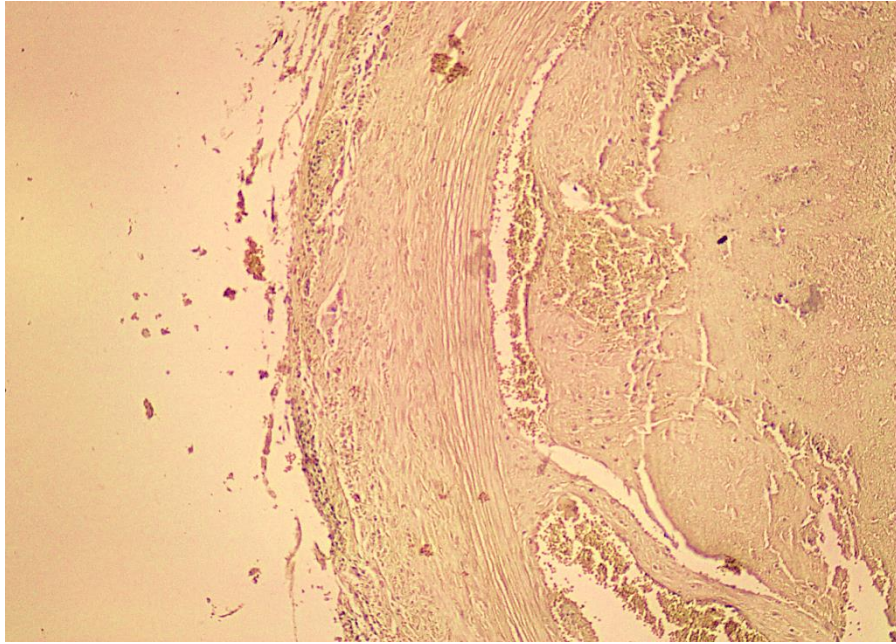
Resim 2: Grup 1'e ait örneklerde gelişen intimal hiperplazi ve intima tabakasının lümeneye doğru uzanışı 20x



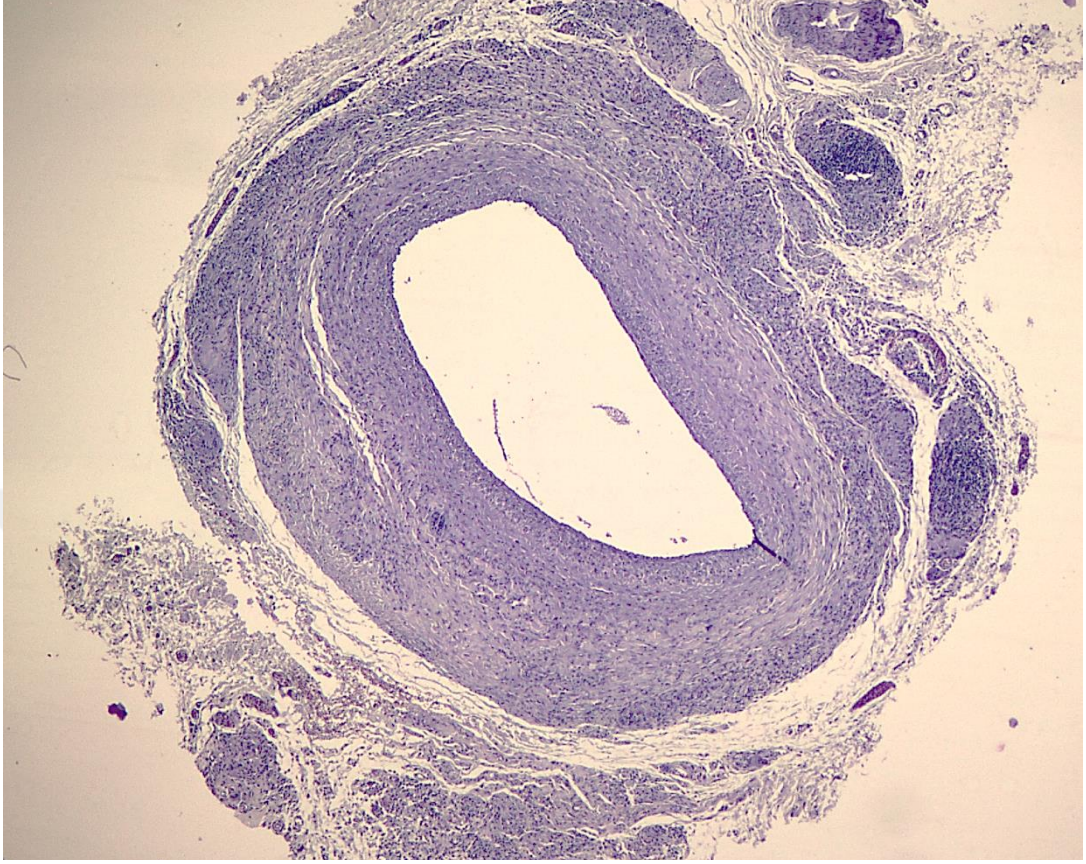
Resim 3: Grup 1'e ait örneklerdeki skar dokusu ve lenfosit yoğunluğunun artışı 40x



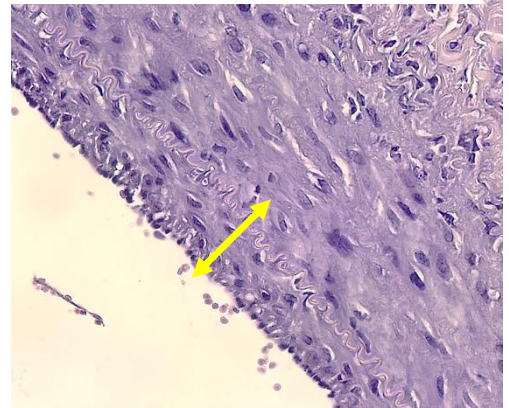
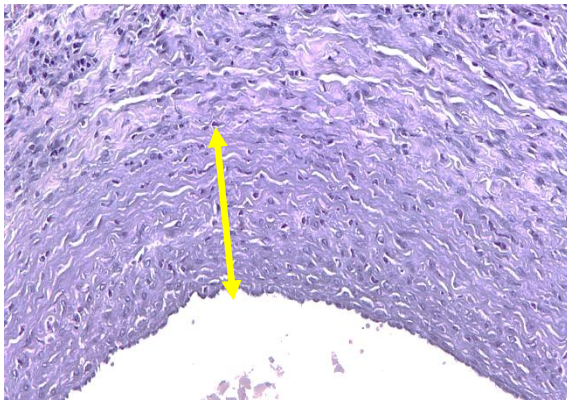
Resim 4: Grup 1’de izlenen intimal hiperplazi artışı ve lümen alanın daralması 4x



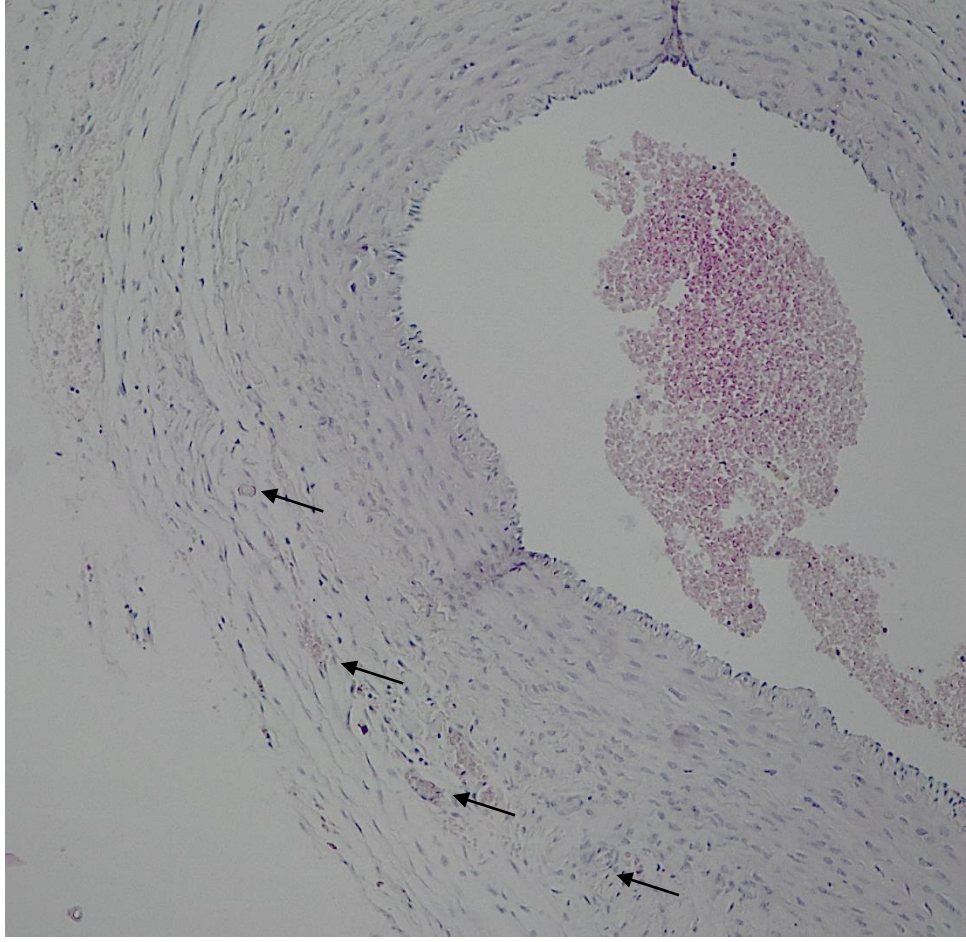
Resim 5: Grup 1’de izlenen intimal hiperplazi artışı 10x



Resim 6: Grup 1'e ait örneklerde izlenen adventisya etrafında vazo vasorum artışı 4x

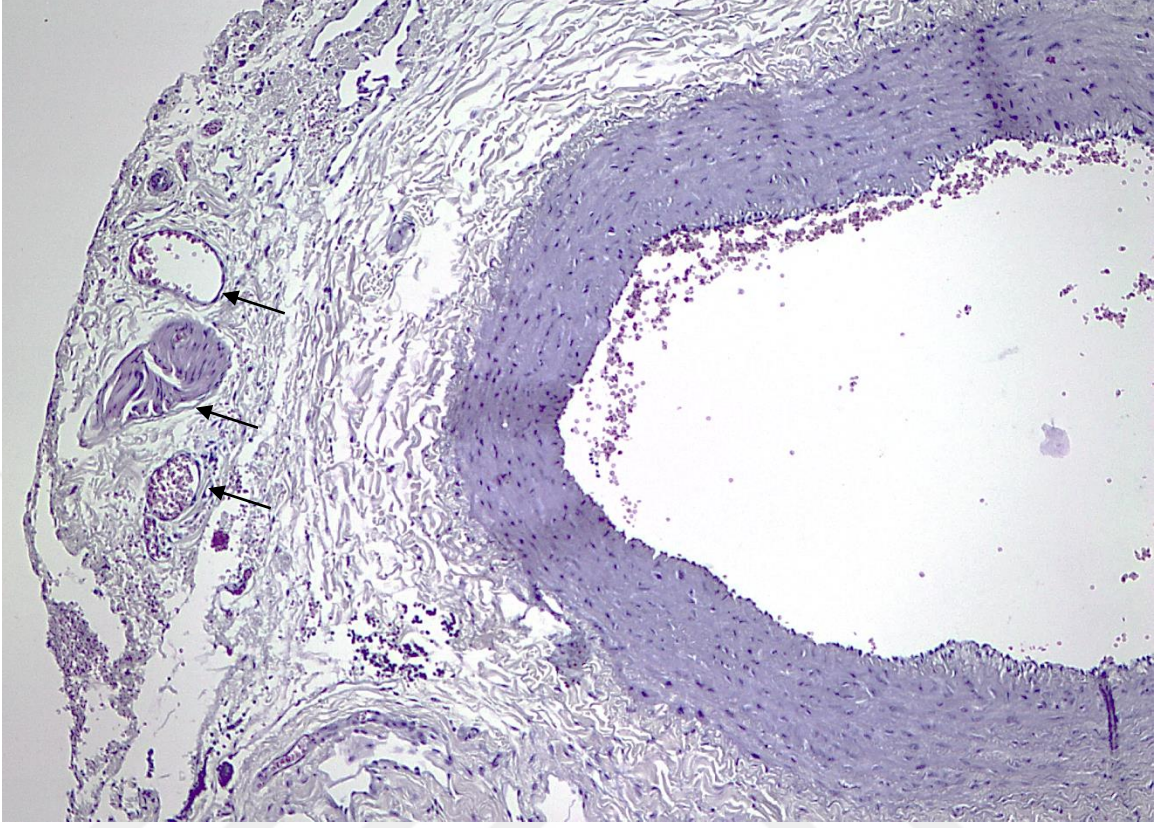


Resim 7: Grup 1'de gelişen intimal hiperplazik alan

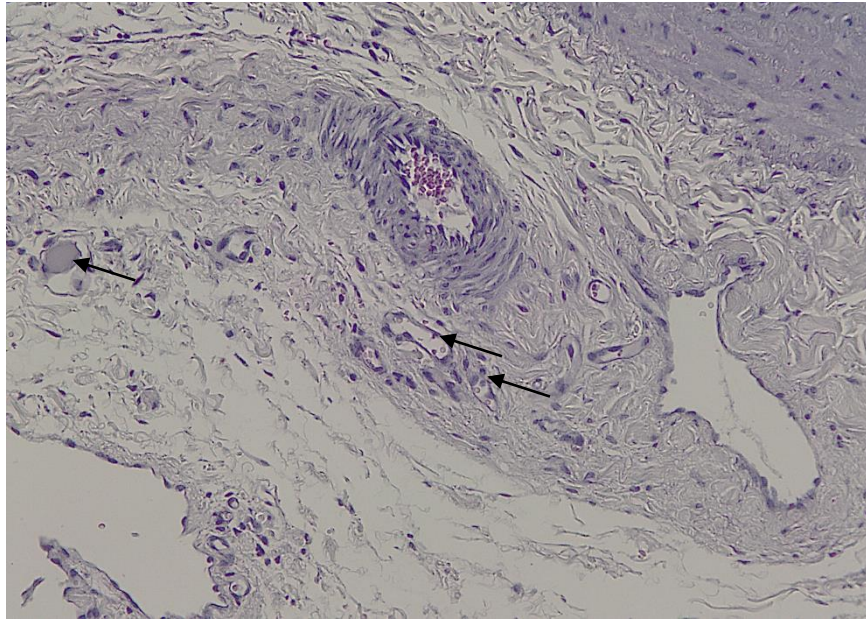


Resim 8: Grup 1 karotid arter adventisyasında gözlenen vazo vasorumlar 10x

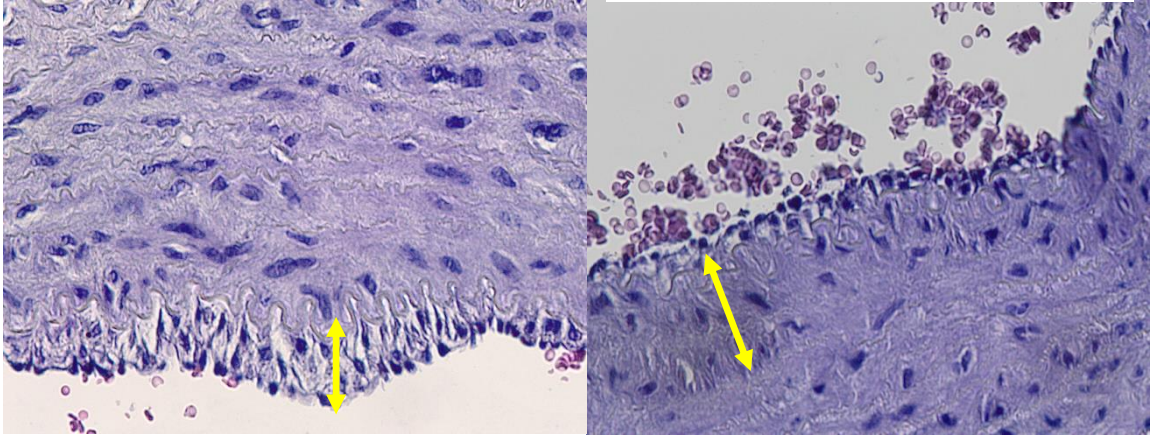
4.2.2. Grup 2 H&E boyama sonuçları



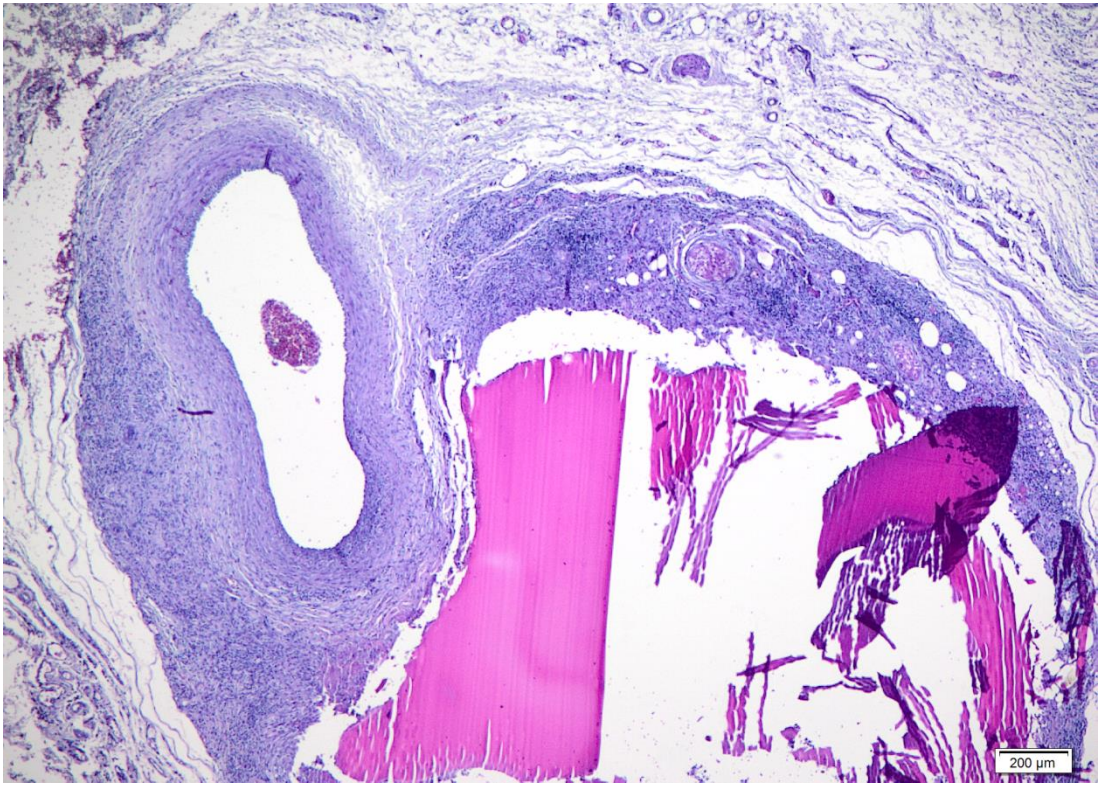
Resim 9: Grup 2'den alınan örneklerdeki tunika adventisya etrafında yağ doku artışı ve gözlenen vaso vasorumlar 10x



Resim 10: Grup 2'den alınan örneklerdeki tunika adventisya etrafında yağ doku artışı 40x



Resim 11: Grup 2'den alınan örneklerde izlenen ince intimal hiperplazi 40x

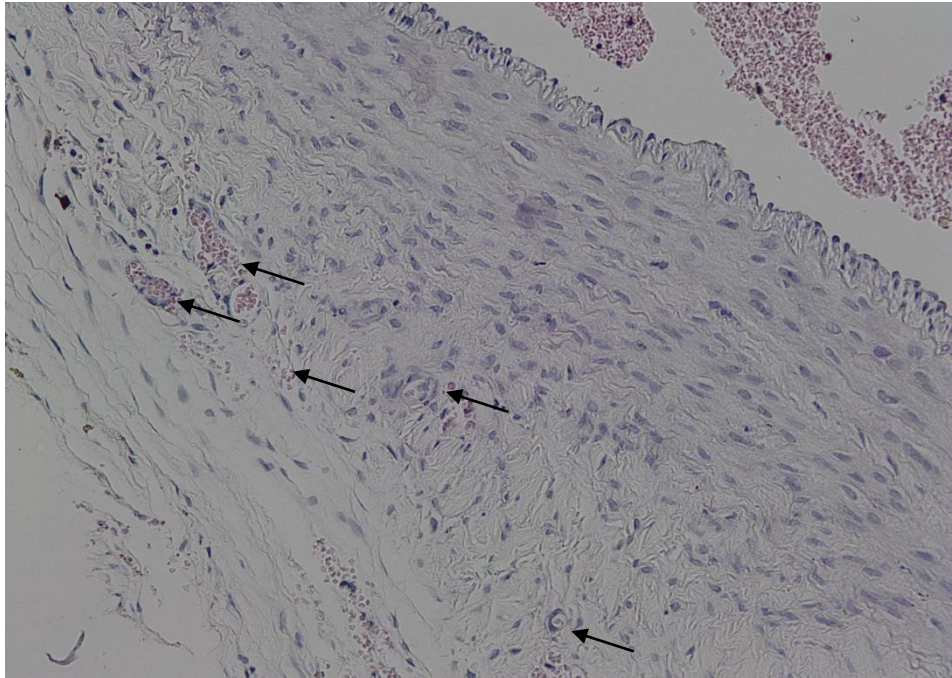


Resim 12: Grup 2'den alınan örneklerde izlenen adventisya etrafında çözünmeden kalan SSA-glutaraldehite ait tutkal parçaları (açık pembe renk) ve etrafında oluşan skar dokusu 4x

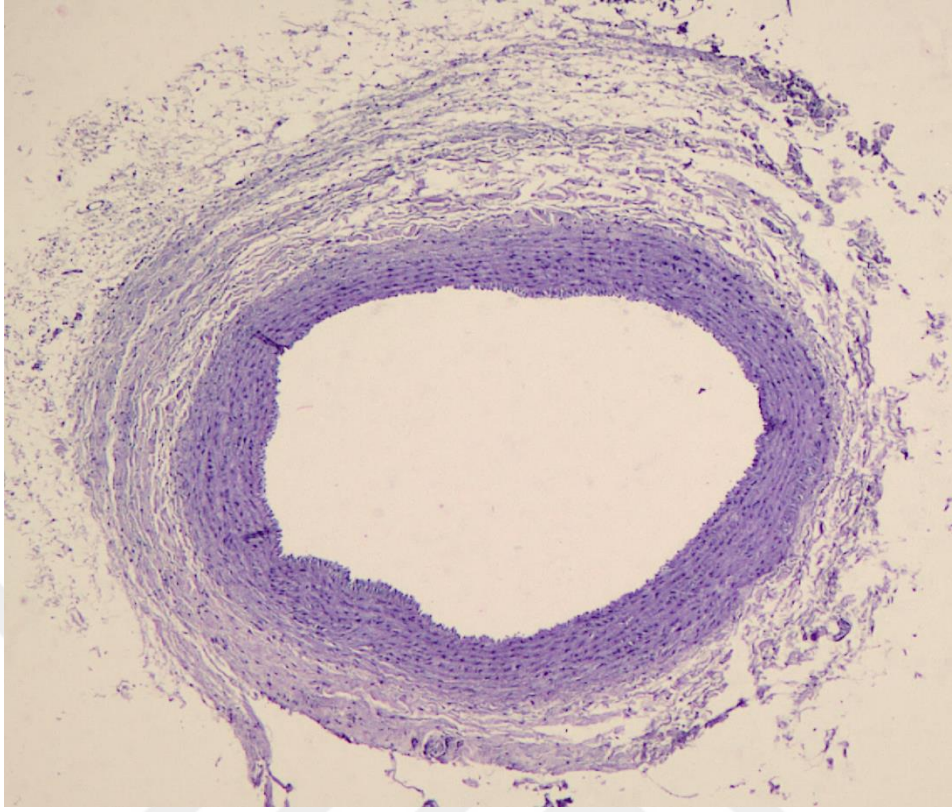
4.2.3. Grup 3 H&E boyama sonuçları



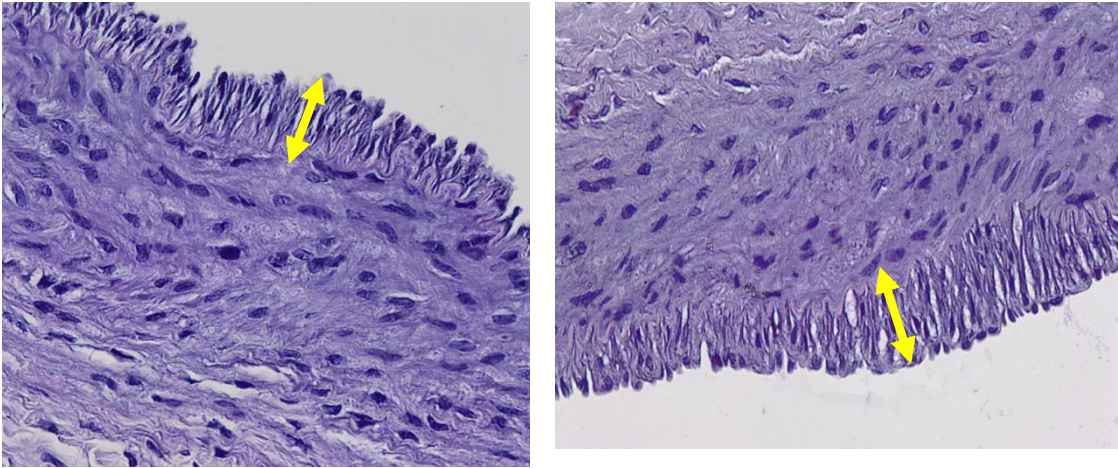
Resim 13: Grup 3 karotid arter adventisyasında gözlenen oldukça fazla yağ doku artışı ve gözlenen vaso vasorumlar 10x



Resim 14: Grup 3 karotid arter adventisyasında gözlenen oldukça fazla sayıdaki yağ doku artışı 10x



Resim 15: Grup 3 karotid arterindeki korunmuş lümen alanı ve lümen çapı 4x



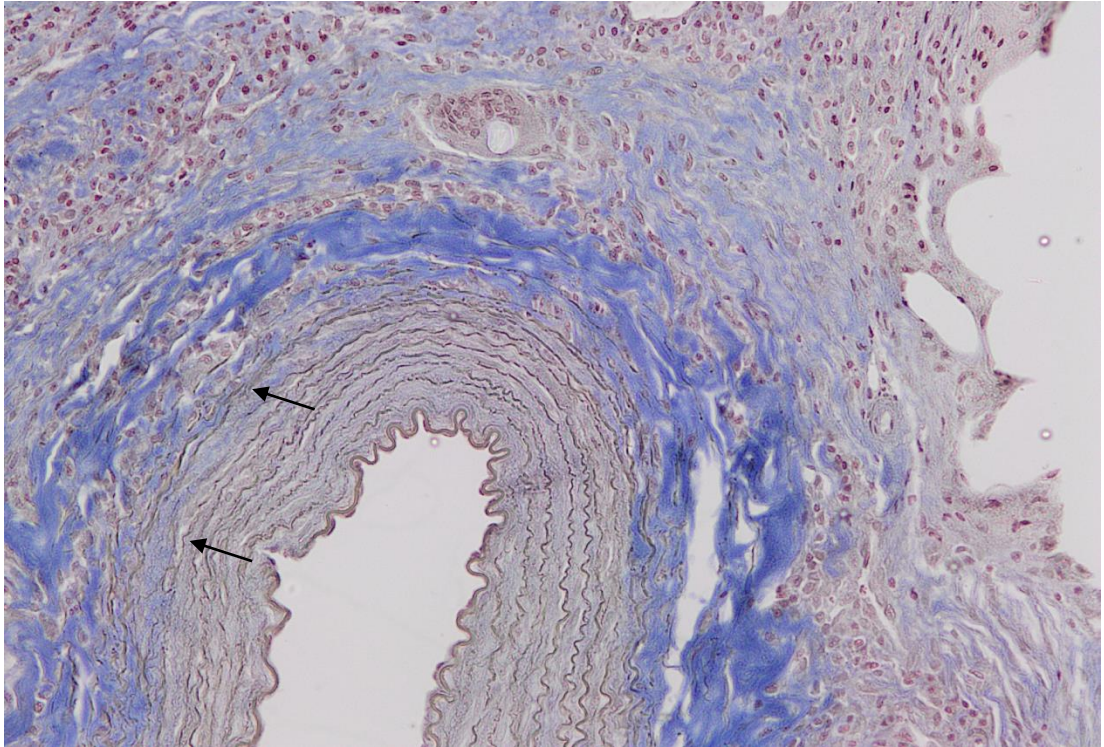
Resim 16: Grup 3'deki örneklerin incelemesinde görülen ince intimal hiperplazik alan 40x

Grupların kendi içinde tunika adventisya tabakaları incelendiğinde; Grup 1'e göre Grup 2 ve Grup 3'te daha fazla sayıda yağ doku gözlemlendi. Grup 2 ve Grup 3 arasında ise; yağ doku artışında net bir fark gözlenmedi. Her üç grupta da benzer adventisyal vaso vasorum varlığı görüldü.

4.3. MASSON TRIKROM BOYAMA SONUÇLARI

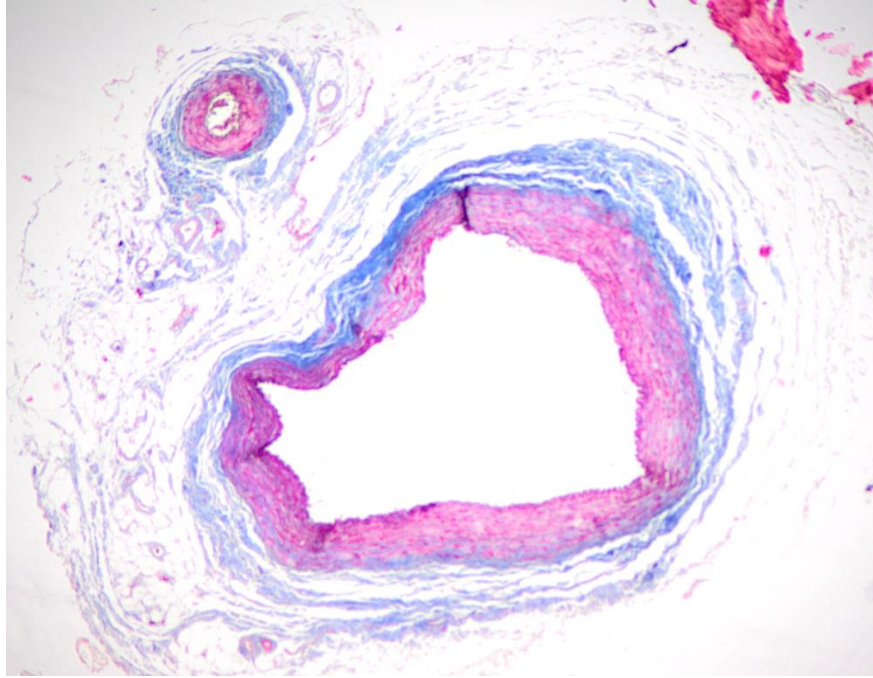
Masson trikrom boyasında kas, eritrositler, fibrin ve bazı sitoplazmik granüller kırmızı; kollajen, bazı retiküler fibriller mavi boyanır. Dokudaki hasar arttıkça, onarım alanı ve bu alanı dolduran bağ doku miktarı artar. Bu artışın tespiti ve yorumlanması için mavi boyanmanın hakim olduğu Masson trikrom boya kullanılmaktadır.

4.3.1. Grup 1 Masson trikrom boyama sonuçları

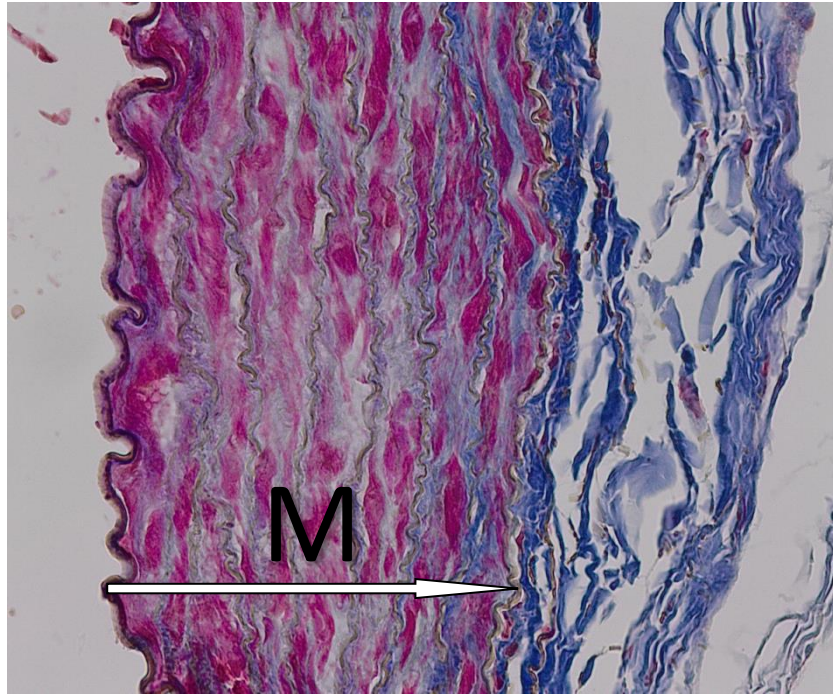


Resim 17: Grup 1 tunika mediasında artan bağ doku miktarını takiben yoğun mavi boyanmanın olduğu gözlemlenmiştir (siyah oklar) 4x

4.3.2. Grup 2 Masson trikrom boyama sonuçları

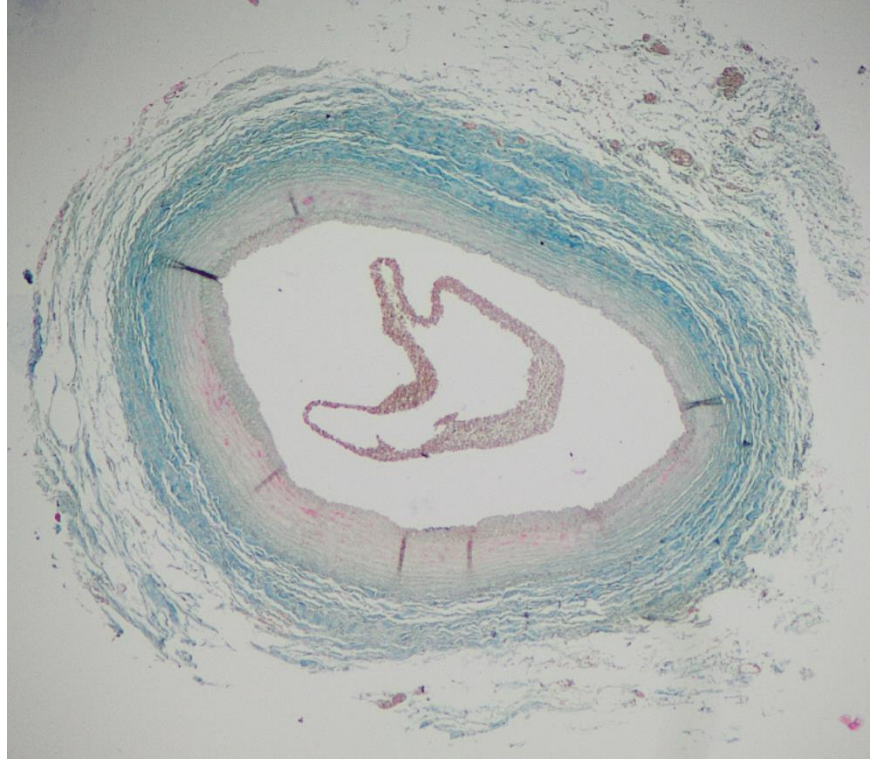


Resim 18: Grup 2 karotid arter örneklerindeki Masson trikrom boyama 4x

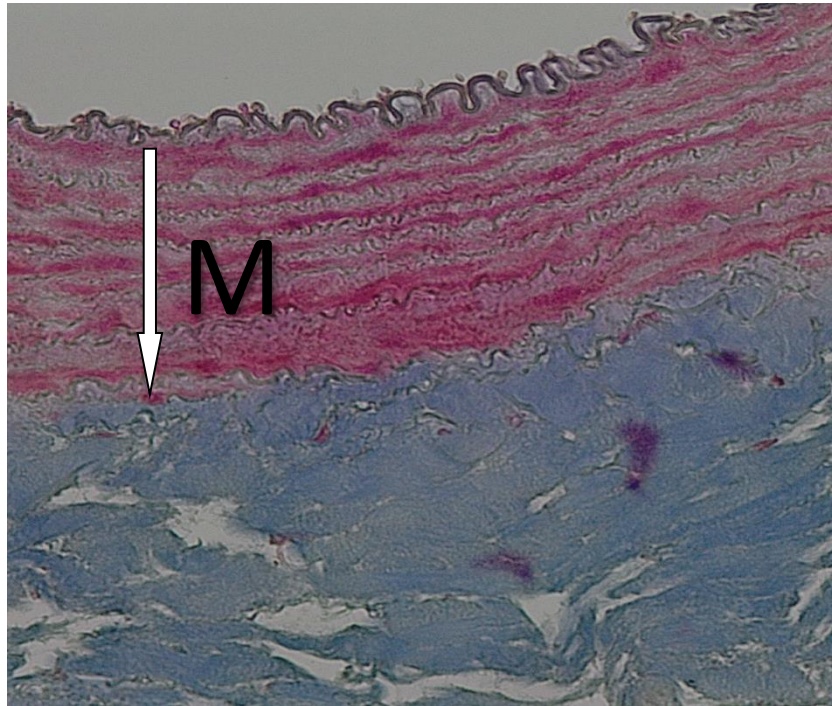


Resim 19: Grup 2 karotid arter örneklerinde, tunika mediadaki (M) yoğun kırmızı/pembe boyanmanın yanısıra az miktarda mavi boyanma ile izlenen bağ doku miktarındaki artış 40x

4.3.3. Grup 3 Masson trikrom boyama sonuçları



Resim 20: Grup 3 karotid arter örneklerinin Masson trikrom boyaması 4x



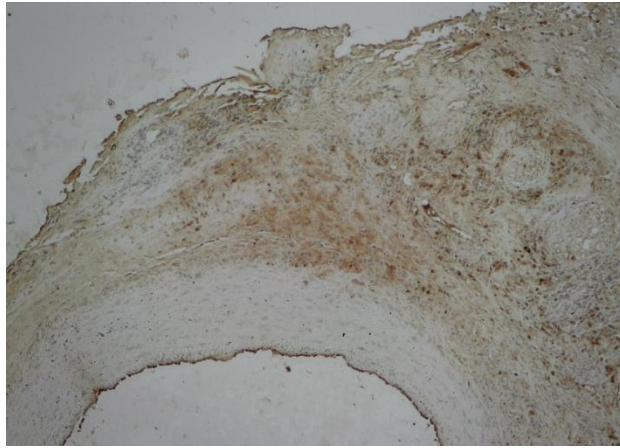
Resim 21: Grup 3 karotid arter örneklerinde, tunika mediadaki (M) düzgün seyirli yoğun kırmızı/pembe boyanma ve tunika adventisyada sınırlı mayi boyanma 40x

4.4. İMMÜNOİSTOKİMYASAL SONUÇLAR

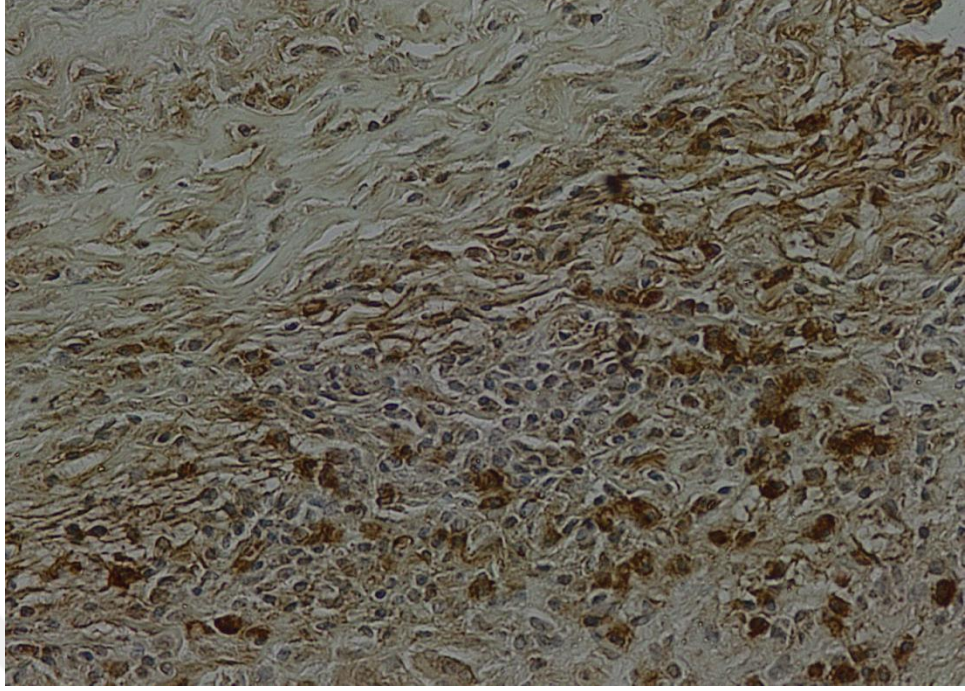
Aynı zamanda vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) adıyla da bilinmekte olan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalarla anjiyogeneze katılan çok işlevli bir sitokindir. VEGF, mikrovasküler endotelyal hücreleri çoğalmaları, göçmeleri ve gen ekspresyon modellerini değiştirmeleri için uyarır. Diğer yandan VEGF, bu mikrovasküler endotelyal hücreleri aşırı geçirgen hale getirir, bu durum endotelyal hücrelerin plazma proteinlerini ekstrasvasküler boşluğa sekresyonuna neden olur ve fibrinojenin pıhtılaşmasına ve bir fibrin jeli biriktirmesine yol açar. Ekstrasvasküler alanda biriken fibrin; yeni kan damarlarının ve olgun, vaskülerize stroma üreten diğer mezenkimal hücrelerin büyümesini destekleyen geçici bir matris görevi görür.

Dokulardaki VEGF artışı ve buna bağlı gelişen anjiyogenez, dengesiz aterosklerotik lezyonların ve neointimal hiperplazinin oluşumunda önemli bir faktördür. İmmünohistokimyasal örneklerin skorlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntem; boyanma-sinyal yoğunluğunun 0 ile 3 arasında skorlandırılmasıdır. 0-1 arası zayıf/negatif boyanma, 2 orta/soluk dereceli boyanma, 3 yoğun/koyu boyanma olarak değerlendirilir.

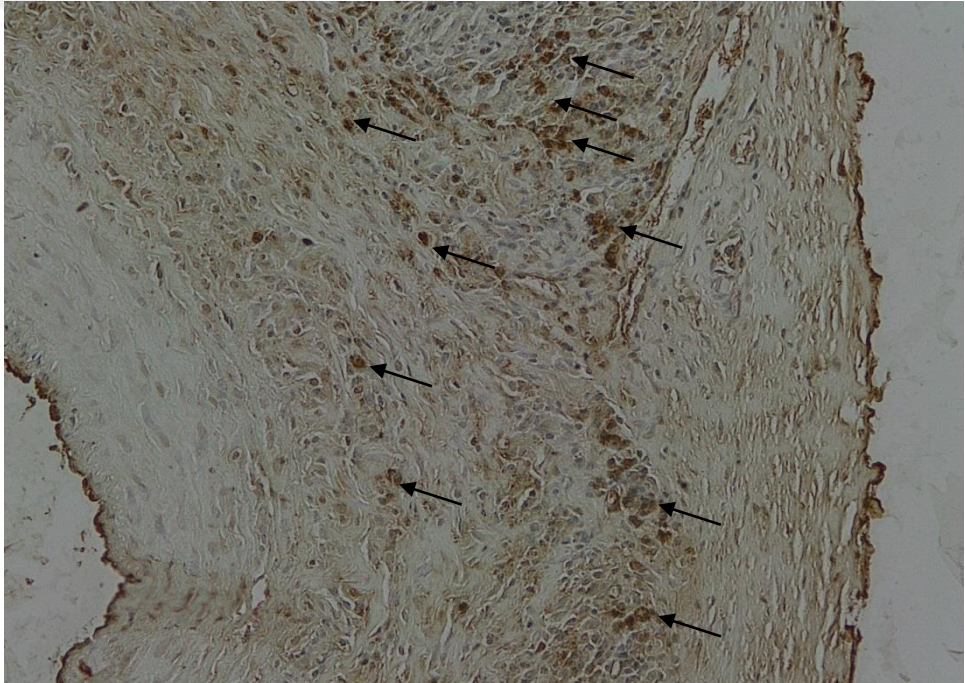
4.4.1. Grup 1 VEGF tutulumu



Resim 22: Grup 1 deneklerin adventisyasındaki güçlü VEGF sinyali görülmekte +++; 10x

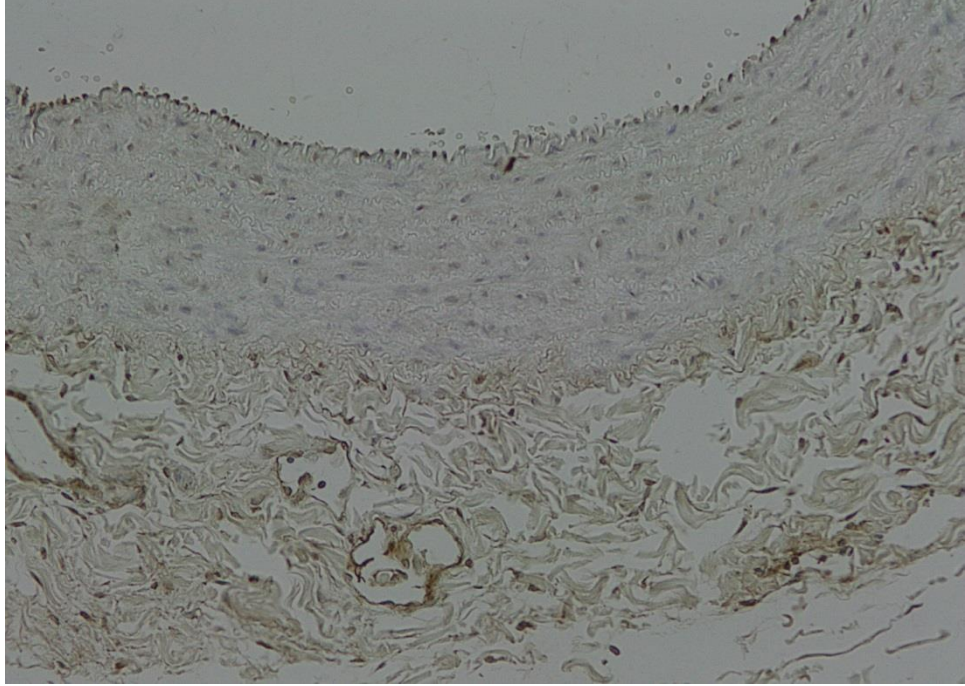


Resim 23: Grup 1 deneklerin adventisyasındaki güçlü VEGF sinyali görülmekte +++; 40x

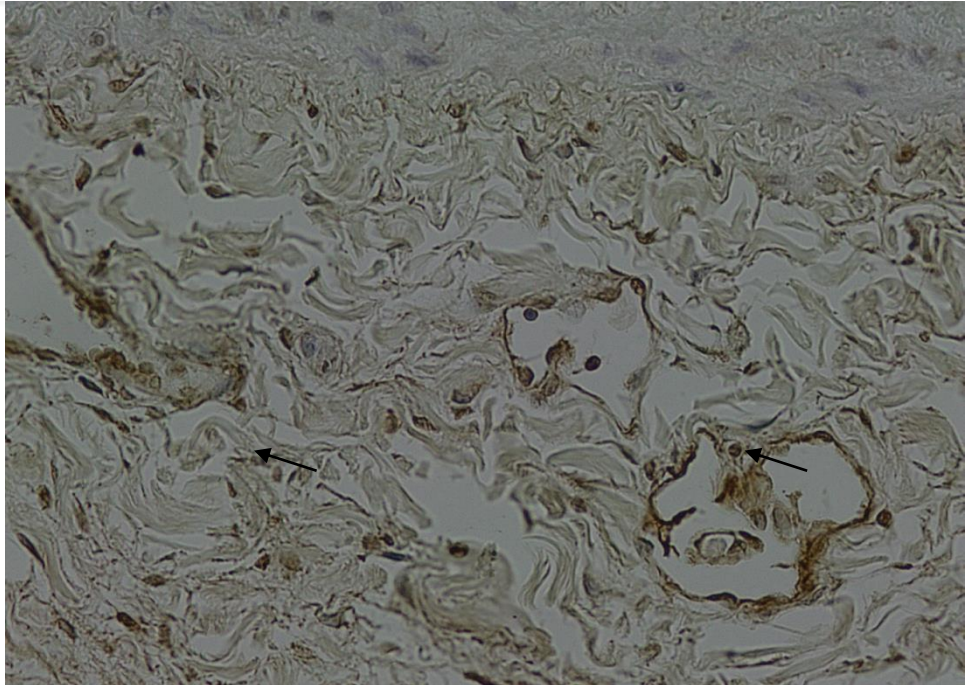


Resim 24: Grup 1 deneklerin adventisyasındaki güçlü VEGF sinyali görülmekte +++; 10x

4.4.2. Grup 2 VEGF tutulumu

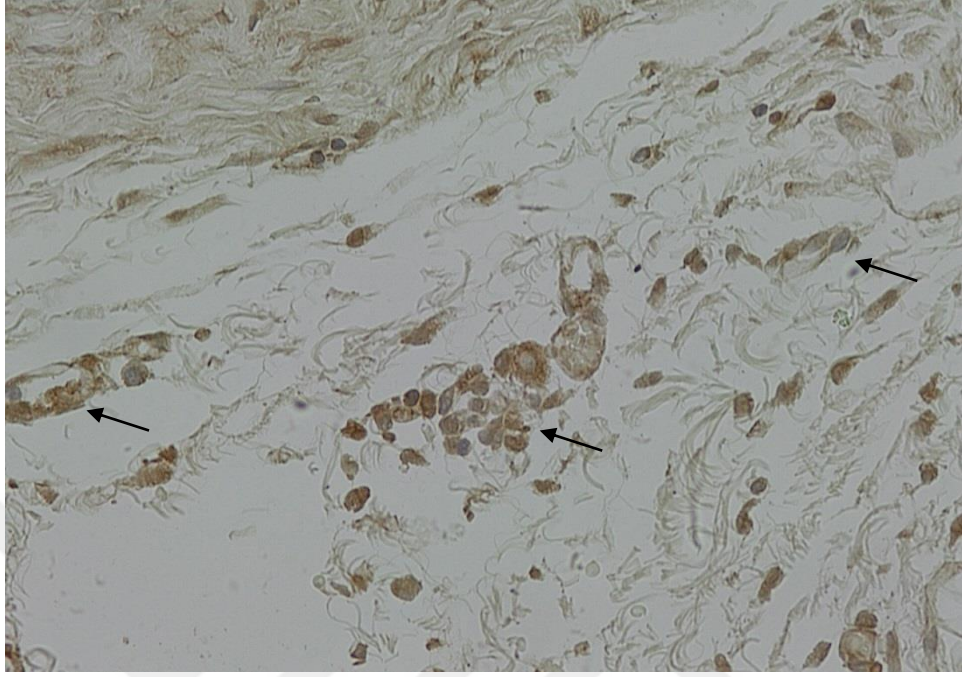


Resim 25: Grup 2 deneklerin adventisyasındaki zayıf/orta VEGF sinyali görülmekte +, ++; 10x

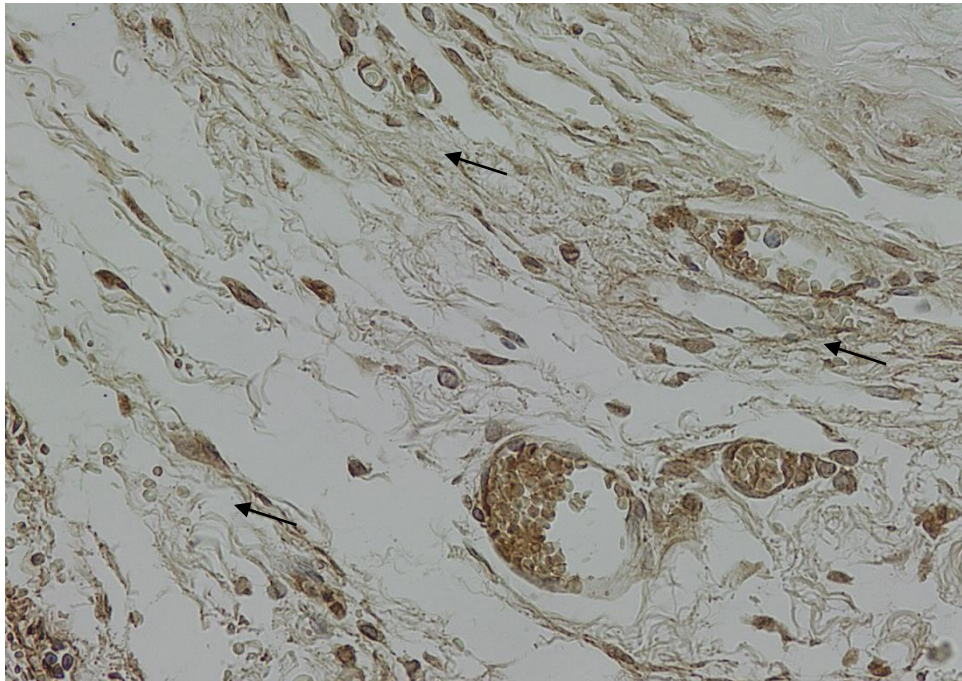


Resim 26: Grup 2 deneklerin tunika adventisyasındaki zayıf/orta VEGF sinyali görülmekte +, ++; 40x

4.4.3. Grup 3 VEGF tutulumu



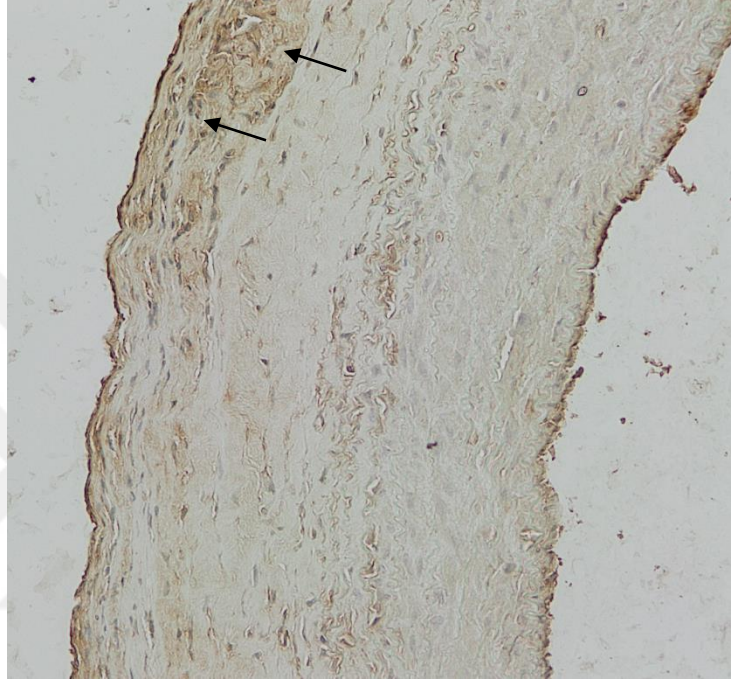
Resim 27: Grup 3 deneklerin tunika adventisya ve mediasındaki orta VEGF sinyali görülmekte ++; 40x



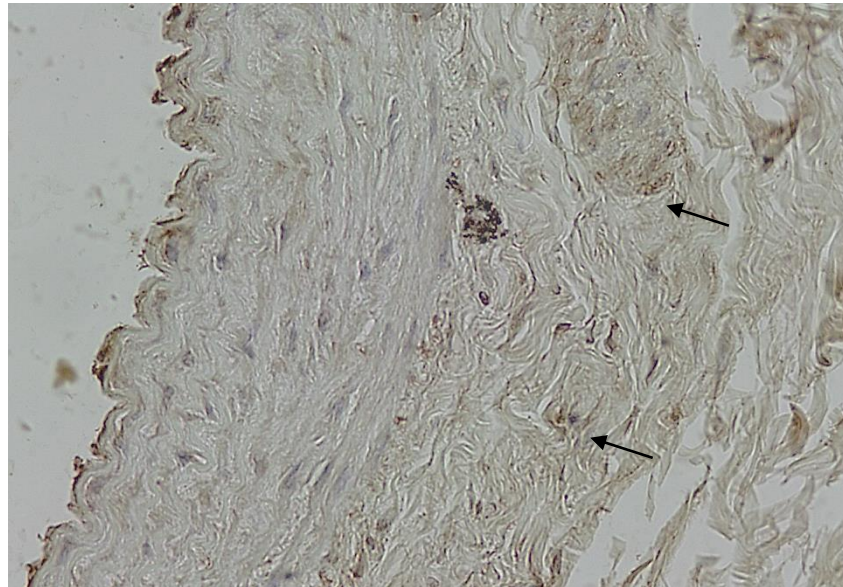
Resim 28: Grup 3 deneklerin tunika adventisya ve mediasındaki orta VEGF sinyali görülmekte ++; 40x

A-smooth muscle actin (a-SMA), yetişkin düz kas hücrelerinin proliferatif olmayan ve kontraktıl fenotipi için bir belirteçtir. Vasküler rekonstrüksiyon sonrasında; a-SMA ve diğer yapısal proteinlerin ekspresyonu azalır. Bu sayede düz kas hücreleri promigratif ve proliferatif bir fenotip kazanır.

4.4.4. Grup 1 a-SMA tutulumu

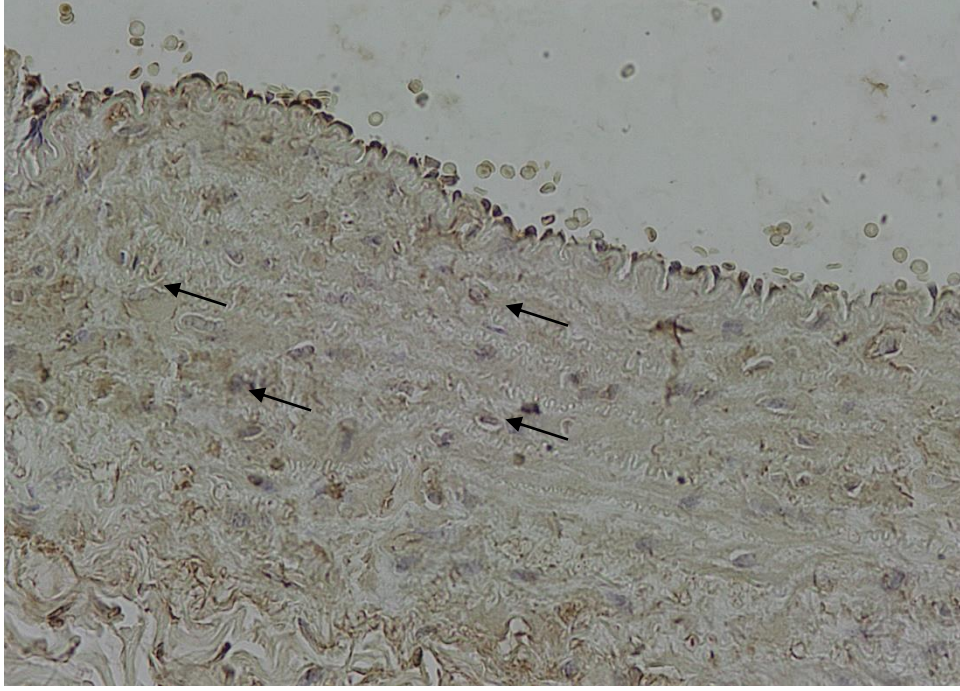


Resim 29: Grup 1 deneklerin tunika adventisyasındaki zayıf a-SMA sinyali görülmekte +; 10x

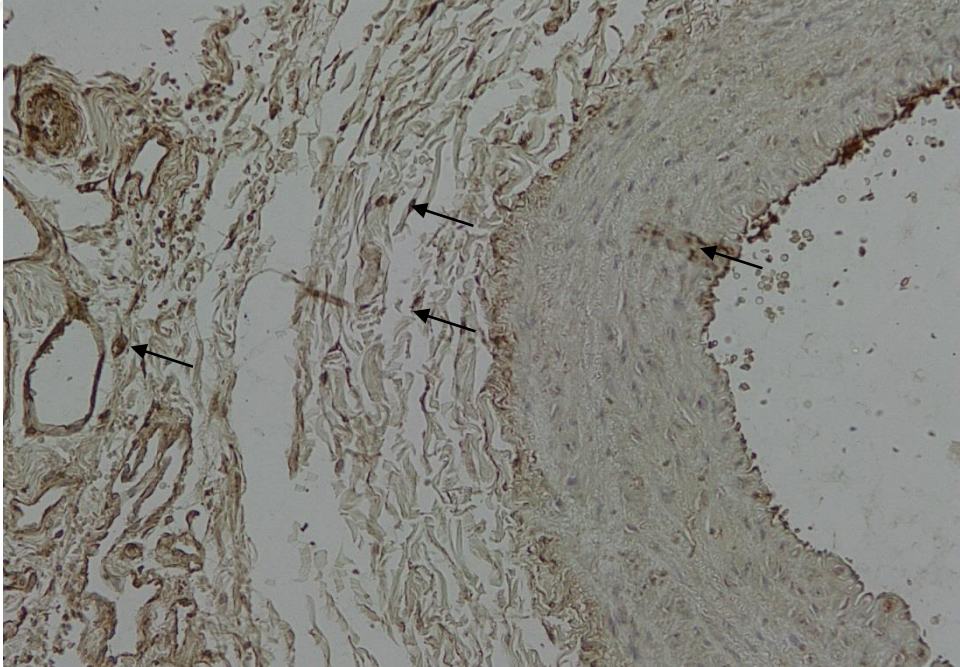


Resim 30: Grup 1 deneklerin tunika adventisyasındaki zayıf a-SMA sinyali görülmekte +; 20x

4.4.5. Grup 2 a-SMA tutulumu

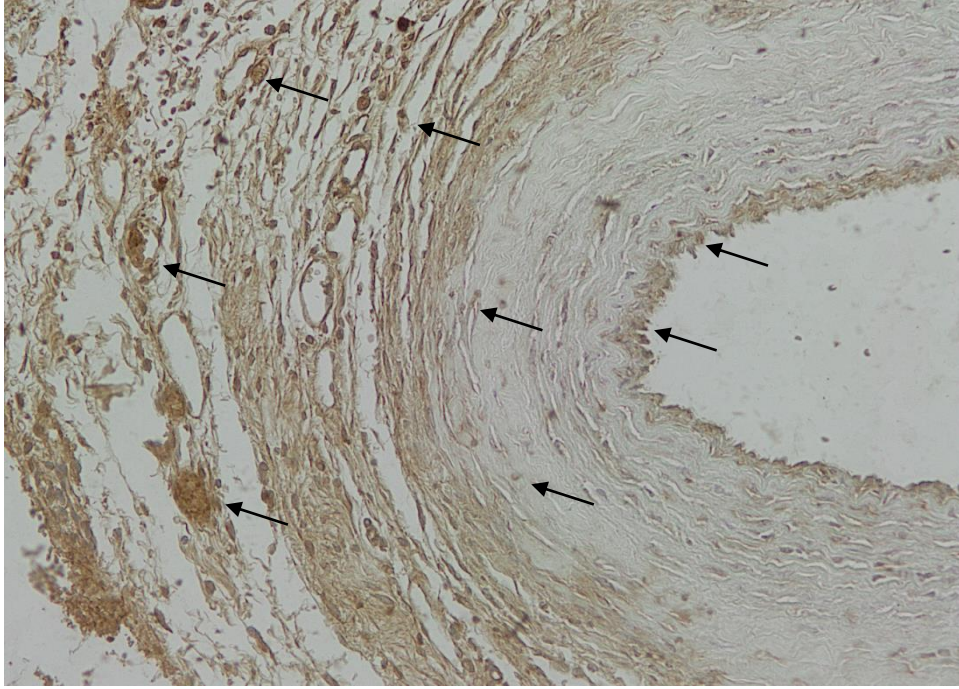


Resim 31: Grup 2 deneklerin tunika mediasındaki zayıf/orta a-SMA sinyali görülmekte +,++; 20x

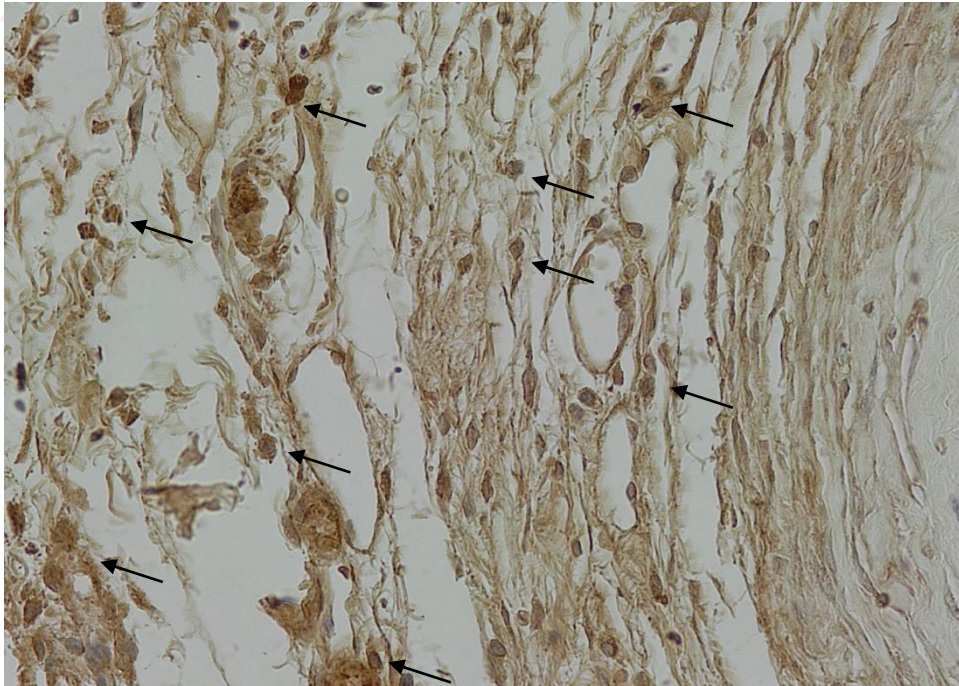


Resim 32: Grup 2 deneklerin tunika media ve adventisyasındaki zayıf/orta a-SMA sinyali görülmekte +,++; 20x

4.4.6. Grup 3 a-SMA tutulumu



Resim 33: Grup 3 deneklerin tunika intima, media ve adventisyasındaki orta a-SMA sinyali görülmekte ++; 20x



Resim 34: Grup 3 deneklerin tunika media ve adventisyasındaki orta a-SMA sinyali görülmekte ++; 10x

V. TARTIŞMA

Tıkayıcı arter hastalıklarının tedavisinde vasküler cerrahi girişimler oldukça sık kullanılan girişimlerden biridir. Günümüzde bu tarz işlemlerin uzun dönem başarısını, neointimal hiperplazi nedeniyle gelişen restenoz olumsuz etkilemektedir (1, 2). Vasküler sisteme yapılan cerrahi müdahalelerin neredeyse tamamı, damar duvarında hasara ve buna bağlı olarak düz kas hücre proliferasyonu ve neointimal hiperplaziye neden olur ve endotel bütünlüğünün bozulması restenozda önemli bir rol oynamaktadır. Endotel hücre hasarı, NO ve protoglandinler gibi mediatörlerin salgılanmasının azalmasına yol açar, bu da daha belirgin bir enflamatuvar yanıtla sonuçlanır. Vasküler endotel hasarından sonra, bu bölgede trombosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Trombosit, makrofaj ve aktive endotel hücreleri tarafından salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkisi ile medial düz kas hücreleri proliferolurlar. Prolifere olan düz kas hücreleri intimaya göç ederler. İntimal bölgede düz kas hücre proliferasyonu, kollojen sentezi ve depolanması sonucunda neointimal hiperplazi meydana gelir. Kısacası intimal hiperplazinin birinci basamağı düz kas hücre proliferasyonu, ikinci basamağı ise proliferoluran düz kas hücrelerinin intimaya göçüdür (3, 22, 23, 59). Ayrıca zayıf cerrahi teknik nedeniyle ortaya çıkan adventisyal hasar, intimal hiperplazinin ilerlemesine katkıda bulunur. Çalışmamızda bu durumun dezavantajını, uygun cerrahi teknik ve ekipte standartizasyon sağlayarak ortadan kaldırdık.

İntimal hiperplazi ile ilgili deneysel çalışmalarda vasküler hasar oluşturmak için en sık kullanılan iki yöntem; daha çok intima hasarı oluşturan balon kateterizasyonu ve tüm damar duvarında hasara neden olan vasküler anastomoz modelidir (23, 59, 60). Balon kateter modelinde intimal hasar oluşturulurken, balon el ile şişirildiği için tüm deneklerde eşit olarak basınç uygulanamamakta ve balonun şişirildiği damar segmenti net olarak bilinmemektedir. Bu da histolojik inceleme için çıkartılan damar segmentinde hasar oluşmama riskini doğurabilmektedir (61). Deneysel çalışmamızda kullandığımız anastomoz modelinin balon kateter modeline göre avantajı da, bu teknikte tüm damar duvarı hasarlanacağı için intimal hasarın daha fazla olmasıdır. Biz de bu nedenlerle çalışmamızda balon kateter ile hasar oluşturmanın standartizasyon problemi taşıdığını düşündüğümüz için; tüm

deneklerde yaklaşık olarak aynı miktarda hasar oluşturulduğundan emin olduğumuz anastomoz modelini tercih ettik. Ayrıca östrojenin neointimal hiperplaziyi azalttığı bilindiği için tüm deneklerin erkek olmasına dikkat ettik (62).

More ve ark. yaptıkları bir çalışmada; tavşanlarda endotel hasarından 3 gün sonra reendotelizasyonun başladığını ve ekstrasellüler matriks birikimine bağlı olarak 1 ayda neointimal hiperplazinin maksimum seviyeye ulaştığını ve üç ay içinde ise azalma olduğunu tespit etmişlerdir (60). Biz de çalışmamızda bu süreye sadık kalarak 28 günde tavşanların yaşamına son verdik ve neointimal hiperplazinin en üst seviyede oluşmasını sağladık.

Literatürde görüldüğü üzere neointimal hiperplazi oluşumunun histolojik değerlendirilmesinde; intima kalınlığı, media kalınlığı, intima/media kalınlık oranı, intima alanı, media alanı, intima/media alan oranı, lümen çapı ve lümen alanı karşılaştırılmıştır (21, 63-66). Biz de deneysel çalışmamızda daha önceki bu çalışmalara benzer şekilde histolojik ölçümler yaptık ve istatistiksel olarak karşılaştırdık. Ek olarak neointimal hiperplazi ile ilişkilendirilen VEGF ve α -SMA tutulumunu (67-70) immünohistokimyasal olarak değerlendirdik, H&E ve Masson trikrom histolojik boyamaları ile damar duvarında neointimal hiperplazi ile ilişkilendirilen bağ doku, vaso vasorum ve adipoz doku varlığını değerlendirip karşılaştırdık.

Vasküler anastomozdan sonra kritik iyileşme evresi ameliyattan sonraki ilk 2 hafta içindedir. Herhangi bir vasküler cerrahide hızlı ve tam hemostazın sağlanması, çok büyük öneme sahiptir. Vasküler cerrahide kullanılan hemostatik ajanların topikal uygulanması, dikişler arasındaki boşlukları kapatarak hemostazı etkin bir şekilde sağlar, vasküler anastomoz için gerekli olan dikiş sayısını azaltır ve bu nedenle vasküler ameliyat süresini güvenli ve etkili bir şekilde basitleştirir ve kısaltır (71). Günümüzde vasküler rekonstrüksiyon sonrası hemostatik ajan olarak sıkça kullanılan PEGP ve SSA-glutaraldehit'in enflamasyon üzerine etkisi ve hemostatik etkinliği açısından kapsamlı çalışmalar mevcut olsa da; neointimal hiperplazi üzerine etkisi hakkında yeterli veri yoktur. Bu nedenle, vasküler anastomozda hemostaz sağlamak amacıyla kullanılmak üzere etkinliği kanıtlanmış ve ticari kullanıma sunulan sentetik ve biyolojik temelli iki hemostatik ajanın neointimal hiperplazi üzerine etkisini inceledik.

Wippermann ve ark. tarafından yapılan deney modelinde, domuz koroner arteri distal anastomozunda hemostatik ajan olarak kullanılan siyanoakrilat, SSA-glutaraldehit ve jelatin-resorsinol'ün 3 ay sonraki histolojik etkileri karşılaştırılmış ve SSA-glutaraldehit'in kullanılan diğer ajanlara kıyasla şiddetli enflamatuar yanıt ve yaygın fibroblastik proliferasyona neden olduğu, jelatin-resorsinol'ün ise minimal doku reaksiyonu gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple SSR-glutaraldehit'in anastomoz hattına en fazla 2cc uygulanmasını önermişlerdir. Ek olarak tüm yapıştırıcılarda benzer oranda yapışıklığa neden olan tutkal parçaları gözlenmiştir (72). Bizim çalışmamızda da H&E boyama ile incelenen preparatlarda, Grup 2'de SSA-glutaraldehite ait tutkal parçaları izlenmektedir. SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2'de, lümen alanı ve lümen çapının anlamlı olarak Grup 1 ve Grup 3'e kıyasla daha az olduğu görülmektedir (p:0,003 p:0,000). Bu etkiye, damar duvarına dışarıdan mekanik basıya sebep olan SSA-glutaraldehite ait tutkal parçalarının neden olduğu düşünmekteyiz. SSA-glutaraldehit'in çözünme süresi 3-6 ay arası olarak belirtilmektedir. Neointimal hiperplazinin 4 hafta sonunda maksimum seviyeye ulaştığı düşünülürse, çalışmamız sonucunda ortaya çıktığı üzere, geç çözünme süresi sebebiyle SSA-glutaraldehit'in neointimal hiperplaziyi azaltmasına rağmen damar lümenini daraltması nedeniyle anastomoz açıklığını etkileyeceği görüşündeyiz.

Gundry, Black ve Izutani tarafından keçiler üzerinde yapılan hayvan çalışmalarında, SSA-glutaraldehit'in 3 ay sonundaki değerlendirmede minimal enflamatuar yanıt oluşturduğu saptanmıştır (57).

Lulzim Vokri ve ark. tarafından tavşan abdominal aortasında SSA-glutaraldehit kullanılarak yapılan bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla anastomoz bölgesinde düşük dereceli enflamatuar yanıt gözlemlendiği bildirilmiştir (73).

Charles W. ve ark. tarafından koyunlarda torasik aort tamirinde hemostatik ajan olarak kullanılan SSA-glutaraldehit'in anastomoz sonrası üçüncü ayda yapılan histolojik değerlendirmesinde minimal enflamasyona sebep olduğu görülmüştür (74). Çalışmamızda enflamasyon ölçeklendirmesi yapılmamasına ve 28 günlük sonuçlar olmasına rağmen; damar duvarındaki hasarlanmayı, fibrozisi ve dolaylı olarak enflamasyon artışını gösteren (75, 76) Masson trikrom boyama sonuçlarında, SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2'deki bağ doku artışı Grup 1'den daha az çıkmıştır. Ayrıca immünohistokimyasal incelemede enflamasyon ile ilişkilendirilen VEGF

tutulumu (77-81) yine Grup 2’de daha az olarak sonuçlanmış, bu da Grup 1’e kıyasla daha az enflamatuar yanıtın oluştuğunu göstermektedir.

Longsheng Daia ve ark. tarafından yapılan ve tavşan karotid arterinde venöz greft ile bypass sonrası siyanoakrilat uygulamasının neointimal hiperplazi üzerine etkisini araştıran bir çalışmayla siyanoakrilat uygulanan venöz greftlerde, siyanoakrilatın PAI-1 m-RNA’nın aşırı ekspresyonunu bloke ederek intimal hiperplaziyi azaltabileceğini göstermişlerdir (82). Çalışmamız sonucunda hemostatik ajan olarak kullanılan biyolojik yapıdaki SSA-glutaraldehit ve sentetik bileşen PEGP’nin Grup 1’e kıyasla neointimal hiperplaziyi azalttığı saptanmıştır (p:0,003). Ancak moleküler düzeyde bir inceleme yapılmadığı için bu etkinin moleküler düzeydeki nedeni tam olarak gösterilememiştir. Bu iki bileşenin neointimal hiperplaziyi azaltmadaki rolünün, Longsheng Daia ve ark. tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi, moleküler düzeyde yapılacak ileri araştırmalarla ortaya konması gerekmektedir.

Walter Fürst ve ark. tarafından yapılan insan embriyonik fibroblast ve fare miyoblastı üzerinde in vivo SSA-glutaraldehit’in toksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, SSA-glutaraldehit’in hücre nekrozuna sebep olan sitotoksik etkileri saptanmıştır (83). Bizim çalışmamızda ise; SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2’de enflamasyon izlenmesine rağmen hücre nekrozuna rastlanmamıştır.

W. Schiller ve ark. tarafından tavşan karotid arterinde SSA-glutaraldehit kullanılarak yapılan dikişsiz anastomoz ile dikiş kullanılarak yapılan anastomoz karşılaştırılmış ve lümen içi tromboz açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Ancak SSA-glutaraldehit kullanılan dikişsiz anastomozda, daha fazla sayıda enflamatuar hücre tespit edilmiş, iki anastomozda da erken dönem kalsifikasyonlara rastlanmıştır. SSA-glutaraldehit’in enflamatuar yanıtını ölçeklendirerek (84) araştıran bu deneysel çalışmayla, insan koroner arter bypass ameliyatında kullanılmasının şu anda güvenli olmadığı ve uzun vadede diğer damar ameliyatlarında da dezavantajlı olabileceği sonucuna varılmıştır (85). Çalışmamız neticesinde lümen alanı ve lümen çapının SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2’de, Grup 1’e kıyasla anlamlı olarak daha az olması sebebiyle (p:0,002 p:0,005) biz de koroner arter bypass operasyonları gibi sentetik greftin olmadığı anastomozlarda, yeterli klinik çalışmanın olmaması ve uzun dönem sonuçlarının ortaya konmaması sebebiyle SSA-glutaraldehit’in

hemostatik ajan olarak kullanılmasından kaçınılması gerektiği kanaatindeyiz. Ancak PEGP kullanılan Grup 3'te, Grup 1'e kıyasla lümen alanı ve lümen çapında 28 gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış izlemiştir. Ayrıca Grup 1'e kıyasla intima kalınlığı istatistiksel olarak daha azdır (p:0,001). Bu sebeple erken dönem sonuçları açısından, PEGP'nin vasküler anastomozda kullanımı mümkün olmakla birlikte ileri klinik çalışmalara ve uzun dönem sonuçlara ihtiyaç vardır.

W. Stoker ve ark. tarafından yapılan ve ex vivo kardiyopulmoner bypass altında insan safen veni üzerinde PEGP'nin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada; PEGP'nin biyouyumlu, biyoçözünebilir, elastik, şeffaf, tamamen sentetik yapısı nedeniyle ve viral bulaş riskinin olmaması sebebiyle koroner arter bypass operasyonlarında kullanılabileceği öngörülmüş, kontrol grubuna kıyasla düz kas hücre hasarının daha az olduğu sonucuna varılmıştır. Polietilen glikol'ün farmakolojik olarak ilaç taşıyıcısı olarak kullanılması sebebiyle de, periadventisyal lokal uygulamalarda hücre proliferasyonunu engelleyecek ilaçlar ile kombine edilerek kullanımının mümkün olabileceği ve böylelikle neointimal hiperplaziyi azaltacak etkinliğe sahip olabileceği; ancak uzun dönem çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (86). Bizim deneysel çalışmamızda PEGP uygulanan Grup 3'de, neointimal hiperplazinin anlamlı olarak Grup 1'e kıyasla daha az olduğu görülmüştür (p:0,001). Ayrıca Grup 1'e kıyasla a-SMA tutulumu daha fazla, VEGF tutulumu ise daha az olarak saptanmış ve Masson trikrom boyamada media tabakasındaki bağ doku artışı daha az olarak bulunmuştur. Bu durum PEGP kullanılan Grup 3'te doku hasarının daha az olduğu anlamını taşımaktadır. Ancak vasküler anastomozda hemostat olarak kullanılması için uzun dönem çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Paul Slezak ve ark. tarafından Yeni Zelanda tipi tavşanlarda abdominal aort anastomozunda hemostaz amacıyla kullanılan SSA-Glutaraldehit ve PEGP'nin iki hafta sonraki doku reaksiyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada, SSA-Glutaraldehit grubunda PEGP'ye kıyasla daha fazla enflamasyon görüldüğü ve biyoçözünmenin daha az olduğu saptanmış. Her iki grupta da granülatöz reaksiyon izlenmiş; ancak SSA-Glutaraldehit grubunda eozonofilik infiltrasyon anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Bu çalışmada neointimal hiperplaziye yönelik bir veri elde edilmemiştir (87). Bizim çalışmamızda eozonofilik infiltrasyona ait veri bulunmamasına rağmen; SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2'de Grup 3'e kıyasla

Masson trikrom boyamada daha fazla bağ doku artışı saptanmıştır. İki hemostatik ajanın a-SMA tutulumları da karşılaştırıldığında Grup 3'de daha fazla a-SMA tutulumu olduğu görülmektedir. Böylelikle PEGP kullanılan Grup 3'te, SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2'ye kıyasla daha az enflamasyon olduğu düşünülebilir.

Tunika adventisya, damar duvarının en dış tabakasıdır ve dinamik yapısı sayesinde ise; media ve intima tabakalarındaki hücrelerle iletişim halindedir. Ek olarak tunika adventisya; dentritik hücreler, makrofajlar lenfositler, ganglionik hücreler, mast hücreleri, kök hücre benzeri vasküler ve hematopoetik progenitörler ve çevreleyen bir adipoz doku tabakası dahil olmak üzere çeşitli hücrelerden oluşur (88). Bu tabakadaki hücreler damar duvarının onarımında ve yeniden yapılanmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Vasküler yaralanma, damar duvarının bütünlüğünün bozulmasının ardından mekanik stres ve iskemiye cevaben; miyofibroblastlara farklılaşan ve kemokin, sitokinlerin salgılanması yoluyla enflamasyona neden olan adventif fibroblastlar aktive edilir. Salgılanan bu faktörler daha sonra lökositlerin media ve intima tabakalarına göçünü uyarır, anjiyojenik faktörlerin artmasına neden olur. Tunika adventisya ve adventisyal vaso vasorum reaktif oksijen ürünleri ve büyüme faktörlerini üreterek hücre proliferasyonu ve göçüne böylelikle de intimal kalınlaşmaya neden olur. Ayrıca vasküler yaralanma sonrası vasa vasorumun hasarlanması adventisyal iskemiye neden olur. Endotel bütünlüğü ve fonksiyonu için sağlam bir adventisyanın gerekli olması sebebiyle bu durum endotelyal ve intimal nekroza yol açar (89). Adventisyal vasa vasorum iskemiye cevap olarak neovaskülerizasyona uğrayarak enflamatuar hücreler, yerleşik kök hücreler için intimaya açılan bir giriş noktası görevi görür ve böylece vasküler yapının yeniden şekillenmesini sağlar, neointimal hiperplazi gelişimini kolaylaştırır (90, 91). Deneysel çalışmamızdaki SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2'de ve PEGP kullanılan Grup 3'de histolojik inceleme sonucunda, Grup 1'e kıyasla tunika adventisyadaki vaso vasorum oranında belirgin farka rastlanmamıştır. Ancak istatistiksel olarak hemostatik ajan kullanılan diğer iki grupta neointimal hiperplazinin Grup1'e kıyasla daha az çıkmasının nedenlerinden birinin, Grup 1'deki adventisyal vaso vasorum oluşumu ile ilişkili VEGF tutulumundaki artış olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamız 28 gün süre ile sınırlı

olduğu için, sürenin yeterli olmaması sebebiyle artmış VEGF sinyaline rağmen; belirgin vaso vasorum artışının histolojik olarak ortaya konamadığını düşünmekteyiz.

Periadventisyel adipositler; adiponektin, hidrojen peroksit, hidrojen sülfid ve adiposit türevi gevşetici faktörleri (ADRF) serbest bırakarak vazo motor tonusun düzenlenmesine katılır (92). ADRF'ler nitrik oksiti serbest bırakır, endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesini yükseltir, Potasyum kanallarını aktive eder ve miyofibroblast göçünü inhibe eder (90, 93). Periadventisyel adipoz dokusu tarafından üretilen anti-enflamatuar adiponektin, neointimal büyüme üzerinde inhibe edici bir rol oynarken; leptin gibi pro-enflamatuar adipokinler artmış neointimal hiperplazi ile ilişkilidir (89). Ek olarak adiponektin, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltarak ve damar duvarında nitrik oksit biyoyararlanımını arttırarak vazoprotektif özellikler gösterir (89, 92). Deneysel çalışmamızda SSA-glutaraldehit kullanılan Grup 2'de ve PEGP kullanılan Grup 3'de histolojik inceleme sonucunda Grup 1'e kıyasla tunika adventisyada daha fazla sayıda adipoz doku görülmüştür. İstatistiksel olarak neointimal hiperplazinin Grup 1'e kıyasla daha az çıkmasının nedenlerinden birinin adventisyel yağ doku artışı olduğunu düşünmekteyiz.

Xiao-Dong Li ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, adventisyel VEGF sinyalindeki artışın neointimal hiperplazi gelişimi ile ilişkili olduğu saptanmış, sağlıklı iyileşme gösteren dokularda daha az tutulduğu gösterilmiştir (67). Çalışmamız sonucunda neointimal hiperplazinin daha az saptandığı hemostatik ajan kullanılan Grup 2 ve Grup 3'te, VEGF tutulumu Grup 1'e kıyasla daha azdır. Bu veriler neticesinde çalışmamız VEGF tutulumu ve neointimal hiperplazi arasındaki ilişki açısından, Xiao-Dong Li ve ark. tarafından yapılan çalışma ile benzer şekilde sonuçlanmıştır.

J Zhou ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Tongxinluo'nun adventisyel anjiyogenezi inhibe ederek VEGF seviyesini düşürdüğünü ve bu sayede neointimal hiperplaziyi azalttığını saptanmışlar (70). Adventisyel VEGF tutulumundaki azalma ile neointimal hiperplazinin azalması arasındaki bu ilişki, bizim çalışmamızın da Grup 2 ve Grup 3'te daha az VEGF tutulumu göstermesiyle benzer şekilde sonuçlanmıştır.

H. Jan ve ark. tarafından intimal hiperplaziyi azaltmak için, Astragalus–Angelica kombinasyonu kullanılmış; çalışmanın kontrol grubunda a-SMA yüksek boyanma gösterirken, deney gruplarında boyanma yoğunluğunun azaldığı bulunmuştur. İyileşme gruplarında ise; deney gruplarına göre boyanmanın fazla olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma neticesinde a-SMA tutulumundaki azalmanın neointimal hiperplazi artışı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (69). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, neointimal hiperplazinin daha az olduğu Grup 2 ve Grup 3'te a-SMA tutulumu daha fazla olmuştur. Biz de bu sonuçlarla a-SMA tutulumundaki azalma ile neointimal hiperplazi artışı arasında bir ilişki olduğunu düşünmekteyiz.

Schachner ve ark.'nın lokal rapamisin uygulamasının neointimal hiperplaziyi inhibe ettiğini gösterdikleri bir çalışmada, kontrol grubuna göre lokal rapamisin uygulanan grupta a-SMA tutulumunun daha fazla olduğu gösterilmiştir (68). Çalışmamıza benzer şekilde, bu çalışmada periadventisyal uygulamalar ile neointimal hiperplazi arasındaki ilişki ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucu da deneysel verilerimiz ile benzer nitelikte olup, a-SMA tutulumun fazla olduğu gruplarda, neointimal hiperplazinin daha az olduğu görüşümüzü desteklemektedir.

VI. SONUÇ

Vasküler cerrahi girişimlerin uzun dönem başarısını etkileyen en önemli durumun, neointimal hiperplaziye bağlı gelişen restenoz olduğu bilinmektedir.

Vasküler anastomozda kanama kontrolünü sağlamak amacıyla lokal olarak kullanılan ajanların neointimal hiperplaziye etkisini göstermek için yaptığımız bu çalışmanın sonucunda; biyolojik yapılı hemostatik ajan SSA-glutaraldehit ve sentetik yapılı hemostatik ajan PEGP'nin neointimal hiperplazi gelişimini engelledikleri gösterilmekle birlikte, SSA-glutaraldehit'in mekanik basıya bağlı lümen alanı ve lümen çapında azalmaya neden olduğu, PEGP'nin ise lümen alanı ve lümen çapı üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Lokal olarak uygulanan bu iki hemostatik ajanın, özellikle damar duvarındaki VEGF ve α -SMA salınımı, adventisyal vazo vasorum ve adipoz doku üzerindeki etkileri sebebiyle neointimal hiperplazi gelişimini azalttığını düşünmekteyiz. Tunika adventisyanın bu rolü sebebiyle, periadventisyal lokal ilaç uygulamalarının neointimal hiperplazi ve restenoz üzerinde olumlu veya olumsuz etkileri olabileceği kanaatindeyiz. Bu nedenle vasküler rekonstrüksiyon sonrası lokal olarak uygulanan periadventisyal maddelerin kullanılmadan önce; sitotoksite, neointimal hiperplazi ve restenoz üzerindeki etkilerinin araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma neticesinde PEGP'nin; lümen alanı, lümen çapı, intima kalınlığı, intima/media kalınlık oranı, tunika mediadaki bağ doku oluşumu, damar duvarındaki VEGF ve α -SMA tutulumu, adventisyal yağ doku miktarı gibi neointimal hiperplazi ile ilişkili belirteçlerde iyi sonuçlarının olması yanında, SSA-glutaraldehit gibi tutkal parçalarına bağlı mekanik bası oluşturmaması sebebiyle lümen alanı ve lümen çapı üzerinde olumsuz etkisi yoktur. Bu avantajları dolayısıyla PEGP'nin vasküler anastomozda güvenle kullanılabileceğini öngörmekteyiz.

Çalışmamız sonucunda elde edilen standart koşullardaki karşılaştırmalı verilerin yardımı, kullanılan hemostatik ajanların ticari formu olması ve cerrahi operasyonlarda kullanılması sebebiyle klinik pratikte durum odaklı karar vermeye yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

ÖZET:

Tavşan Karotid Arter Anastomozunda Sığır Serum Albümin-Glutaraldehit ve Polietilen Glikol Polimer'in Neointimal Hiperplazi Üzerine Etkisi

Ertürk Karaağaç, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir

AMAÇ: Koroner ve periferik arter hastalıkları, günümüzde yaşam kalitesi ve ortalama yaşam süresini belirleyen en önemli kronik hastalıklardandır ve bu hastalıkların tedavisinde vasküler cerrahi girişimler oldukça sık kullanılan girişimlerden biridir. Vasküler girişimler sonrası gelişebilen restenoz üzerinde, intimal hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonunun büyük etkisi vardır. Neointimal hiperplazi nedeniyle gelişen restenoz, günümüzde bu tarz işlemlerin uzun dönem başarısını olumsuz etkilemektedir (1). Kalp damar cerrahisi uzmanlığı son 50 yıl içinde hızlı bir şekilde gelişim göstermiştir (7). Artan operasyon sayıları ve kompleks cerrahi girişimler sebebiyle, hemostaz sağlayarak kanamanın etkili tedavisi cerrahi operasyonlar sonrası olumlu sonuçlar alabilmek için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle cerrahi operasyonlarda hemostaz sağlamak için çok çeşitli ajanlar geliştirilmiştir. Hemostatik ajanlar arasındaki; polimerizasyon ve etki süreleri, sitouyumluluk, biyoçözünabilirlik, patlama basıncı dayanımı, elastikiyet, çözülme süreleri, ıslak veya kuru dokuya yapışmaları gibi farklar kalp ve damar cerrahisinde kullanılan hemostatik ajanları sınırlamaktadır. Günümüzde vasküler rekonstrüksiyon sonrası hemostatik ajan olarak sıkça kullanılan polietilen glikol polimer (PEGP) ve sığır serum albümin-glutaraldehit (SSA-glutaraldehit)'in neointimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyon üzerine etkisi hakkında yeterli veri yoktur. Bu iki ajanın vasküler rekonstrüksiyonda güvenli kullanımının değerlendirilmesi ve diğer hemostatik ajanların da kullanılmadan önce neointimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyona etkilerinin incelenmesi gerektiği kanaatindeyiz. Bu yüzden biz de, tavşan karotid arter anastomozunda PEGP ve SSA-glutaraldehit'in neointimal hiperplazi ve endotelyal proliferasyon üzerine etkisini araştırmayı hedefledik.

MATERYAL-METOD: Çalışmamızda randomize olarak seçilen, ortalama 2-3 kg ağırlığında 21 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanıldı ve tavşanlar 3 gruba ayrıldı. Ketamin ve ksilazin anestezisi sonrası sterilizasyon sağlanarak tavşanlara uygun pozisyon verildi ve profilaktik antibiyotik olarak sefazolin uygulandıktan sonra, tüm grup tavşanlara vertikal orta hat boyun insizyonu yapıldı ve sağ ana karotid arter eksplere edildi. Sağ ana karotid arter heparinizasyon sonrası transekte edildi. 8/0 polipropilen dikiş kullanılarak tek tek sütur tekniğiyle aynı cerrah tarafından uç uca anastomoz edildi. Anastomoz sonrası lümen açıklıkları duplex ultrasonografi ile doğrulandı. Grup 1 (7 adet) tavşanların sağ ana karotid arter anastomoz sahasına lokal olarak herhangi bir hemostatik ajan uygulanmadı. Grup 2 (7 adet) tavşanların sağ ana karotid arter anastomoz sahasına lokal olarak 0,5cc SSA-glutaraldehit anastomoz hattını tam olarak kapatacak şekilde uygulandı. Grup 3 (7 adet) tavşanların sağ ana karotid arter anastomoz sahasına lokal olarak 0,5cc PEGP anastomoz hattını tam olarak kapatacak şekilde uygulandı. Tüm gruptaki tavşanların 28 günün sonunda anastomoz yapılan sağ ana karotid arter segmenti çıkarılarak histolojik inceleme amacıyla tespit edildi, incelenmek üzere histoloji laboratuvarına gönderildi. Daha sonra yüksek doz sodyum pentotal ile hayvanların yaşamına son verildi. Uygun protokolle hazırlanan preparatlara H&E boyama ve Masson trikrom boyama yapıldı. Ayrıca alınan karotid arter segmentleri VEGF ve a-SMA tutulumu açısından immünohistokimyasal incelemeye alındı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda görüntülenerek fotoğraflandı ve fotoğraf analiz programı ile incelenerek ve lümen çapı, lümen alanı, intima kalınlığı, media kalınlığı, intima-media kalınlık oranı, intima alanı, media alanı, intima-media alanları oranı hesaplandı. Alınan örneklerdeki VEGF ve a-SMA tutulumları da incelenerek tüm sonuçlar değerlendirildi.

BULGULAR: İncelenen seri kesitler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; Grup 1 intima kalınlığı Grup 2 ve Grup 3'den anlamlı ($p:0,003$) olarak daha yüksekti. Grup 2 ve Grup 3 intima kalınlığı anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1'de media kalınlığı Grup 2'den anlamlı ($p:0,022$) olarak daha düşüktü. Grup 1 ve Grup 3 media kalınlığı anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 2 ve Grup 3 media kalınlığı anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1'de İ/M kalınlık oranı

Grup 2 ve Grup 3'den anlamlı ($p:0,000$) olarak daha yüksekti. Grup 2 ve Grup 3 İ/M kalınlık oranı anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1, Grup 2, Grup 3 intima alanı anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1'de media alanı Grup 2'den anlamlı ($p:0,008$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 media alanı anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir. Grup 3'de media alanı Grup 2'den anlamlı ($p:0,001$) olarak daha yüksekti. Grup 1, Grup 2, Grup 3 İ/M alan oranı anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir. Grup 1'de lümen çapı Grup 2'den anlamlı ($p:0,005$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 lümen çapı anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir. Grup 3'de lümen çapı Grup 2'den anlamlı ($p:0,000$) olarak daha yüksekti. Grup 1'de lümen alanı Grup 2'den anlamlı ($p:0,002$) olarak daha yüksekti. Grup 1 ve Grup 3 lümen alanı anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir. Grup 3'de lümen alanı Grup 2'den anlamlı ($p:0,003$) olarak daha yüksekti. H&E boyama sonrası grupların kendi içinde tunika adventisya tabakaları incelendiğinde; Grup 1'e göre Grup 2 ve Grup 3'te daha fazla sayıda yağ doku gözlemlendi. Grup 2 ve Grup 3 arasında ise; yağ doku artışında net bir fark gözlemlenmedi. Her üç grupta da adventisyal vaso vasorum varlığı görüldü. Ek olarak Grup 2'deki kesitlerde lümene mekanik basıya neden olan tutkal parçalarına rastlandı. Masson trikrom boyama sonrası yapılan incelemelerde, Grup 1'de tunika mediada mavi boyanma ile yaygın bağ doku artışı izlenirken Grup 2'de az miktarda mavi boyanma ile bağ dokuya rastlandı. Grup 3'te ise; tunika media tabakası tamamen düzgün seyirli ve kırmızı boyanırken bağ doku oluşumu izlenmedi. İmmünohistokimyasal incelemede VEGF tutulumu değerlendirildiğinde; Grup 1'de güçlü tutulum, Grup 2'de zayıf/orta tutulum, Grup 3'te ise orta tutulum mevcuttu. A-SMA tutulumu değerlendirildiğinde ise; Grup 1'de zayıf tutulum, Grup 2'de zayıf/orta tutulum, Grup 3'te ise tüm tabakalarda olmak üzere orta tutulum mevcuttu.

SONUÇ: Vasküler cerrahi girişimlerin uzun dönem başarısını etkileyen en önemli durumun, neointimal hiperplaziye bağlı gelişen restenoz olduğu bilinmektedir. Vasküler anastomozda kanama kontrolünü sağlamak amacıyla lokal olarak kullanılan ajanların neointimal hiperplaziye etkisini göstermek için yaptığımız bu çalışmanın sonucunda; biyolojik yapıli hemostatik ajan SSA-glutaraldehit ve sentetik yapıli hemostatik ajan PEGP'nin her ikisinin de neointimal hiperplazi gelişimini

engelledikleri gösterilmekle birlikte, SSA-glutaraldehit'in mekanik basıya bağlı lümen alanı ve lümen çapında azalmaya neden olduğu, PEGP'nin ise lümen alanı ve lümen çapı üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Lokal olarak uygulanan bu iki hemostatik ajanın, özellikle damar duvarındaki VEGF ve a-SMA salınımı, adventisyal vaso vasorum ve adipoz doku üzerindeki etkileri sebebiyle neointimal hiperplazi gelişimini azalttığını düşünmekteyiz. Tunika adventisyanın bu rolü sebebiyle, periadventisyal lokal ilaç uygulamalarının neointimal hiperplazi ve restenoz üzerinde olumlu veya olumsuz etkileri olabileceği kanaatindeyiz. Bu nedenle vasküler rekonstrüksiyon sonrası lokal olarak uygulanan periadventisyal maddelerin kullanılmadan önce; sitotoksite, neointimal hiperplazi ve restenoz üzerindeki etkilerinin araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Bu çalışma neticesinde PEGP'nin; lümen alanı, lümen çapı, intima kalınlığı, intima/media kalınlık oranı, tunika mediadaki bağ doku oluşumu, damar duvarındaki VEGF ve a-SMA tutulumu, adventisyal yağ doku miktarı gibi neointimal hiperplazi ile ilişkili belirteçlerde iyi sonuçlarının olması yanında, SSA-glutaraldehit gibi tutkal parçalarına bağlı mekanik bası oluşturmaması sebebiyle lümen alanı ve lümen çapı üzerinde olumsuz etkisi yoktur. Bu avantajları dolayısıyla PEGP'nin vasküler anastomozda güvenle kullanılabileceğini öngörmekteyiz. Çalışmamız sonucunda elde edilen standart koşullardaki karşılaştırmalı verilerin yardımı, kullanılan hemostatik ajanların ticari formu olması ve cerrahi operasyonlarda kullanılması sebebiyle klinik pratikte durum odaklı karar vermeye yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: tavşan, karotis, neointimal hiperplazi, polietilen glikol polimer, sığır serum albümin-glutaraldehit

SUMMARY:

Effect of Bovine Serum Albumin-Glutaraldehyde and Polyethylene Glycol Polymer on Neointimal Hyperplasia in Rabbit Carotid Artery Anastomosis

Erturk Karaagac, İzmir Katip Çelebi University, Faculty of Medicine, Department of Cardiovascular Surgery, İzmir

OBJECTIVE: Coronary and peripheral arterial diseases are the most important chronic diseases that determine the quality of life and life expectancy and vascular surgery is one of the most frequently used procedures in the treatment of these diseases. Intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation have a major effect on restenosis that may develop after vascular interventions. Restenosis due to neointimal hyperplasia has a negative impact on the long-term success of these procedures (1). Cardiovascular surgery expertise has developed rapidly in the last 50 years (7). Due to the increasing number of operations and complex surgical interventions, effective treatment of bleeding by providing hemostasis is critical for achieving positive results after surgical operations. Therefore, a variety of agents have been developed to provide hemostasis in surgical operations. Hemostatic agents include; differences in polymerization and effect times, cytocompatibility, biodegradability, bursting pressure resistance, elasticity, dissolution times, adhesion to wet or dry tissue limit the hemostatic agents used in cardiovascular surgery. Currently, there is insufficient data on the effect of polyethylene glycol polymer (PEGP) and bovine serum albumin-glutaraldehyde (SSA-glutaraldehyde), commonly used as hemostatic agent after vascular reconstruction, on neointimal hyperplasia and endothelial proliferation. We believe that the safe use of these two agents in vascular reconstruction should be evaluated and the effects of other hemostatic agents on neointimal hyperplasia and endothelial proliferation should be examined. Therefore, we aimed to investigate the effect of PEGP and SSA-glutaraldehyde on neointimal hyperplasia and endothelial proliferation in rabbit carotid artery anastomosis.

MATERIALS AND METHOD: In this study, 21 New Zealand male rabbits, randomly selected and weighing 2-3 kg on average, were used and were divided into

3 groups. After ketamine and xylazine anesthesia, the rabbits were placed in the appropriate position and after prophylactic antibiotic cefazolin was applied, vertical midline neck incision was made to all rabbits and right main carotid artery was explored. The right main carotid artery was transected after heparinization. It was end-to-end anastomosed by the same surgeon using a single suture technique using 8/0 polypropylene stitches. Lumen clearance after anastomosis was confirmed by duplex ultrasonography. Group 1 (7 rabbits) did not receive any local hemostatic agent at the right main carotid artery anastomosis line. Group 2 (7) rabbits were applied to the right main carotid artery anastomosis line to close the 0.5cc SSA-glutaraldehyde anastomosis line completely. Group 3 (7) rabbits were applied to the right main carotid artery anastomosis site to close the 0.5cc PEGP anastomosis line completely. At the end of 28 days, in the rabbits in the whole group, the right main carotid artery segment was removed for histological examination and sent to the histology laboratory for examination. Then, the animals were sacrificed with high dose sodium pentotal. The samples were subjected to H&E staining and Masson trichrome staining. In addition, carotid artery segments were taken into immunohistochemical examination for VEGF and α -SMA signal. The samples were photographed by visualization under light microscope and examined with photo analysis program and the lumen diameter, lumen area, intima thickness, media thickness, intima-media thickness ratio, intima area, media area, intima-media areas ratio were calculated. VEGF and α -SMA uptake were also examined and all results were evaluated.

FINDINGS: When the serial sections examined were evaluated statistically; Intima thickness of Group 1 was significantly higher than Group 2 and Group 3 (p: 0.003). In Group 2 and Group 3, intima thickness did not differ significantly (p>0.05). Media thickness was significantly lower in Group 1 than Group 2 (p: 0.022). Group 1 and 3 did not differ significantly (p>0.05). Media thickness of Group 2 and 3 did not differ significantly (p>0.05). The I / M thickness ratio was significantly higher in Group 1 than Group 2 and Group 3 (p: 0.000). The I / M thickness ratio of Group 2 and Group 3 did not differ significantly (p>0.05). The intima area of Group 1, Group 2, and Group 3 did not differ significantly (p>0.05). Media area was significantly higher in Group 1 than Group 2 (p: 0.008). Media area of Group 1 and Group 3 did

not differ significantly ($p>0.05$). Media area was significantly higher in Group 3 than Group 2 ($p: 0.001$). I / M area ratio of Group 1, Group 2, Group 3 did not differ significantly ($p>0.05$). Lumen diameter was significantly higher in Group 1 than Group 2 ($p: 0.005$). The lumen diameter of Group 1 and Group 3 did not differ significantly ($p>0.05$). Lumen diameter was significantly higher in Group 3 than Group 2 ($p: 0.000$). Lumen area was significantly higher in Group 1 than Group 2 ($p: 0.002$). The lumen area of Group 1 and Group 3 did not differ significantly ($p>0.05$). Lumen area was significantly higher in Group 3 than Group 2 ($p: 0.003$). After the H&E staining, when the tunica adventitia layers were examined; A greater number of adipose tissues were observed in Group 2 and Group 3 than Group 1. Between Group 2 and Group 3; there was no clear difference in adipose tissue increase. Adventitial vaso vasorum was observed in all three groups. In addition, glue fragments causing mechanical compression to the lumen were observed in the sections in Group 2. Masson trichrome staining showed widespread connective tissue increase with blue staining in the tunica media in Group 1, whereas connective tissue with small amount of blue staining was observed in Group 2. In Group 3; While the tunica media layer was completely smooth and stained red, no connective tissue formation was observed. When VEGF signal was evaluated in immunohistochemical examination; Group 1 had strong signal, Group 2 had weak / moderate signal, and Group 3 had moderate signal. When α -SMA signal was evaluated; Group 1 had weak signal, Group 2 had weak / moderate signal, and Group 3 had moderate signal in its all layers.

CONCLUSION: It is known that the most important condition affecting the long-term success of vascular surgery is restenosis due to neointimal hyperplasia. As a result of this study to show the effect of locally used agents on neointimal hyperplasia to control bleeding in vascular anastomosis; although biological hemostatic agent SSA-glutaraldehyde and synthetic hemostatic agent PEGP have been shown to inhibit the development of neointimal hyperplasia, SSA-glutaraldehyde causes a decrease in the lumen area and lumen diameter due to mechanical compression. PEGP has no negative effect on the lumen diameter and lumen diameter. We think that these two locally applied hemostatic agents reduce the development of neointimal hyperplasia due to their effects on VEGF and α -SMA

secretion, adventitious vaso vasorum and adipose tissue. Because of this role of tunica adventitia, we think that periadventitial local drug administration may have positive or negative effects on neointimal hyperplasia and restenosis. Therefore, prior to the use of locally applied periadventitial agents after vascular reconstruction, we think that effect of these agents on cytotoxicity, neointimal hyperplasia and restenosis should be investigated. As a result of this study, PEGP has good results neointimal hyperplasia associated markers such as luminal area, lumen diameter, intima thickness, intima / media thickness ratio, connective tissue formation in the tunica medias, VEGF and α -SMA signal in the vessel wall and periadventitial fat tissue. It does not have a negative effect on the lumen area and lumen diameter due to no mechanical compression cause of glue fragments such as SSA-glutaraldehyde. Therefore, we think that PEGP can be used safely in vascular anastomosis. As a result of the comparative data obtained in the standard conditions obtained from our study, the commercial form of the hemostatic agents used and used in surgical operations, we think that it will help in case-oriented decision making in clinical practice.

Key Words: rabbit, carotid, neointimal hyperplasia, polyethylene glycol polymer, bovine serum albumin-glutaraldehyde

VI. KAYNAKLAR

1. Clowes A. Pathologic intimal hyperplasia as a response to vascular injury and reconstruction. *Vascular surgery*. 1995;285-95.
2. Galt SW, Zwolak RM, Wagner RJ, Gilbertson JJ. Differential response of arteries and vein grafts to blood flow reduction. *Journal of vascular surgery*. 1993;17(3):563-70.
3. Zarins CK, Bassiouny HS, Glagov S. *Intimal hyperplasia*: Blackwell Science; 1996.
4. Schwartz LB, O'Donohoe MK, Purut CM, Mikat EM, Hagen P-O, McCann RL. Myointimal thickening in experimental vein grafts is dependent on wall tension. *Journal of vascular surgery*. 1992;15(1):176-86.
5. Faxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Progress in cardiovascular diseases*. 1997;40(2):129-40.
6. SAUVAGE L. Biologic behavior of grafts in arterial system *Vascular Surgery. Principles and techniques*.136-60.
7. Cooley DA, Frazier O. The past 50 years of cardiovascular surgery. *Circulation*. 2000;102(suppl_4):lv-87-lv-93.
8. Minato N, Katayama Y, Yunoki J, Kawasaki H, Satou H. Hemostatic effectiveness of a new application method for fibrin glue, the "rub-and-spray method", in emergency aortic surgery for acute aortic dissection. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;15(4):265-71.
9. Spotnitz WD. Hemostats, sealants, and adhesives: a practical guide for the surgeon. *The American Surgeon*. 2012;78(12):1305-21.
10. Vyas KS, Saha SP. Comparison of hemostatic agents used in vascular surgery. *Expert opinion on biological therapy*. 2013;13(12):1663-72.
11. CryoLife I. IFU for BioGlue Surgical Adhesive 2019 [Available from: https://www.cryolife.com/wp-content/uploads/2019/08/L6312.010_IFU_BioGlue_Syringe.pdf].
12. Sealant CS. Instructions for use. Baxter Healthcare Revision. 2009;3.
13. Gartner L, Hiatt James L. *Circulatory system*. *Color Textbook of Histology*. 2001:251-70.
14. Paker Ş. Dolaşım sistemi, In; Paker Ş. *Histoloji*, Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi. 1990:516-25.
15. Ross M. *Circulatory system* In; Ross MH. *Histology A Text and Atlas*. Third edition. Williams& Wilkins Maryland 1995:302- 14.
16. Cones M. *Connective Tissue and stains*. In; Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*; 2002.
17. Verrier ED, Morgan EN. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery. *The Annals of thoracic surgery*. 1998;66(5):S17-S9.
18. Zoghi M, Nalbantgil İ. Hipertansiyon ve Endotel Fonksiyon Bozukluğu Anadolu Kardiyoloji Dergisi. *Ana Kar Der*. 2002;2:142-7.
19. Torun E, Bayram F. Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2004;26(3):126-31.
20. Zubilewicz T, Wronski J, Bourriez A, Terlecki P, Guinault AM, Muscatelli-Groux B, et al. Injury in vascular surgery-the intimal hyperplastic response. *Medical science monitor*. 2001;7(2):316-24.
21. Kavala AA. Tavşan karotid arterlerinde yapılan anastomozlarda pentoksifilin maddesinin intimal hiperplazi ve endotelial proliferasyon üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2009.

22. Peyot M-L, Gadeau A-P, Dandré Fdr, Belloc I, Dupuch F, Desgranges C. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A2b-purinoceptor. *Circulation research*. 2000;86(1):76-85.
23. 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. *European journal of pharmacology*. 1995;281(2):205-7.
24. Dubey RK, Gillespie DG, Osaka K, Suzuki F, Jackson EK. Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells: possible role of A2b receptor. *Hypertension*. 1996;27(3):786-93.
25. Fogelstrand P, Risberg B, Mattsson E. External collar inhibits balloon-induced intimal hyperplasia in rabbits. *Journal of vascular research*. 2002;39(4):361-7.
26. Li X, Hong M, Lu Y, Ye M, Zhu D, Gao P. A7900 Adventitial Fibroblast-derived VEGF Promotes Vasa Vasorum-associated Neointima Formation by Macrophage Recruitment. *Journal of Hypertension*. 2018;36:e39.
27. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation*. 1998;97(9):916-31.
28. Nikkari ST, Järveläinen H, Wight TN, Ferguson M, Clowes AW. Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *The American journal of pathology*. 1994;144(6):1348.
29. Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *The American journal of pathology*. 1998;153(4):1301-10.
30. Lidman D, Daniel RK. The normal healing process of microvascular anastomoses. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*. 1981;15(2):103-10.
31. Esclamado RM, Carroll WR. The pathogenesis of vascular thrombosis and its impact in microvascular surgery. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*. 1999;21(4):355-62.
32. Thornton P DJ. Coagulation in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2010;24:339–52.
33. Achneck HE, Sileshi B, Parikh A, Milano CA, Welsby IJ, Lawson JH. Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient: from vascular endothelium to circulatory assist device surface. *Circulation*. 2010;122(20):2068-77.
34. Morgan G, Mikhail M, Murray M. *Klinik Anesteziyoloji*. IV. Basım. Ankara. Öncü Basımevi. 2008:783-8.
35. Rubin BG, Santoro SA, Sicard GA. Platelet interactions with the vessel wall and prosthetic grafts. *Annals of vascular surgery*. 1993;7(2):200-7.
36. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. *Robbins Temel Patoloji*. 8. baskı. Bursa: Nobel Tıp Kitapevleri. 2007:739-50.
37. Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade. *Current opinion in hematology*. 2004;11(4):272-7.
38. Bennett J. Disorders of platelet function: Evaluation and treatment. *Cleveland Clin J Med* 1991;58:413-420. .
39. Szántó T, Joutsu-Korhonen L, Deckmyn H, Lassila R, editors. *New insights into von Willebrand disease and platelet function*. *Seminars in thrombosis and hemostasis*; 2012: Thieme Medical Publishers.
40. Wu K. Endothelial cells in hemostasis, thrombosis, and inflammation. *Hospital practice (Office ed)*. 1992;27(4):145-50, 52, 63-6.
41. Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current Concepts of Hemostasis Implications for Therapy. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2004;100(3):722-30.

42. Colman R, Clowes A, George J, Hirsh J, Marder V. Overview of hemostasis. *Hemostasis and Thrombosis*. :: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p. 3-20.
43. Linden MD. Platelet physiology. *Haemostasis*: Springer; 2013. p. 13-30.
44. Adams GL, Manson RJ, Turner I, Sindram D, Lawson JH. The balance of thrombosis and hemorrhage in surgery. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2007;21(1):13-24.
45. Gürdöl F, Biyokimya AE. 2. baskı. Nobel yayınevi İstanbul. 2010:511-9.
46. Chan AK, Paredes N. The coagulation system in humans. *Haemostasis*: Springer; 2013. p. 3-12.
47. Diethorn ML, Weld LM. Physiologic mechanisms of hemostasis and fibrinolysis. *The Journal of cardiovascular nursing*. 1989;4(1):1-10.
48. Owens AP, Mackman N. Role of tissue factor in atherothrombosis. *Current atherosclerosis reports*. 2012;14(5):394-401.
49. Ruf W, Mueller BM. Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Current opinion in hematology*. 1996;3(5):379-84.
50. Halamkova J, Kiss I, Tomasek J, Pavlovský Z, Cech Z, Tutek S, et al. Plasminogen activator system and its clinical significance in patients with a malignant disease. *Klinicka onkologie: casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*. 2011;24(6):418-23.
51. Annabi N, Tamayol A, Shin SR, Ghaemmaghami AM, Peppas NA, Khademhosseini A. Surgical materials: Current challenges and nano-enabled solutions. *Nano today*. 2014;9(5):574-89.
52. Hagberg RC, Safi HJ, Sabik J, Conte J, Block JE. Improved intraoperative management of anastomotic bleeding during aortic reconstruction: results of a randomized controlled trial. *American Surgeon*. 2004;70(4):307-11.
53. Hill A, Estridge TD, Maroney M, Monnet E, Egbert B, Cruise G, et al. Treatment of suture line bleeding with a novel synthetic surgical sealant in a canine iliac PTFE graft model. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2001;58(3):308-12.
54. Wallace D, Cruise G, Rhee W, Schroeder J, Prior J, Ju J, et al. A tissue sealant based on reactive multifunctional polyethylene glycol. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2001;58(5):545-55.
55. Glickman M, Gheissari A, Money S, Martin J, Ballard JL. A polymeric sealant inhibits anastomotic suture hole bleeding more rapidly than gelfoam/thrombin: results of a randomized controlled trial. *Archives of Surgery*. 2002;137(3):326-31.
56. Eddy A, Choo S, McNally R, editors. Creation and repair of acute descending aortic dissection in sheep. *Aortic Surgery Symposium VI*, New York, NY; 1998.
57. Gundry SR, Black K, Izutani H. Sutureless coronary artery bypass with biologic glued anastomoses: preliminary in vivo and in vitro results. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2000;120(3):473-7.
58. Coselli JS, Bavaria JE, Fehrenbacher J, Stowe CL, Macheers SK, Gundry SR. Prospective randomized study of a protein-based tissue adhesive used as a hemostatic and structural adjunct in cardiac and vascular anastomotic repair procedures. *Journal of the American College of Surgeons*. 2003;197(2):243-52.
59. Miyake T, Aoki M, Morishita R. Inhibition of anastomotic intimal hyperplasia using a chimeric decoy strategy against NFκB and E2F in a rabbit model. *Cardiovascular research*. 2008;79(4):706-14.

60. More RS, Ruddy G, Underwood MJ, Brack MJ, Gershlick AH. A time sequence of vessel wall changes in an experimental model of angioplasty. *The Journal of pathology*. 1994;172(3):287-92.
61. Asada Y, Kisanuki A, Tsuneyoshi A, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. *Atherosclerosis*. 1996;121(1):45-53.
62. Sullivan TR, Karas RH, Aronovitz M, Faller GT, Ziar JP, Smith JJ, et al. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(5):2482-8.
63. Güzeloğlu M, Gül M, Reel B, Yürekli İ, Aykut K, Hazan E. The effects of zoledronic acid on neointimal hyperplasia: a rabbit carotid anastomosis model. *Anatolian Journal of Cardiology/Anadolu Kardiyoloji Dergisi*. 2011;11(2).
64. KARAGÖZ U. Tavşan karotid arterlerinde yapılan anastomozlarda silostazol maddesinin intimal hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.
65. KUSERLİ Y. Tavşan karotid arterlerinde yapılan anastomozlarda n-asetilsistein'in intimal hiperplazi ve endotelial proliferasyon üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2011.
66. Şahin MA, Güler A, Ertuğrul Özal D, Arslan M. Tavşan karotid arterlerinde yapılan anastomozlarda bosentan'ın intima hiperplazisi üzerine olan etkisi. 2014.
67. Li X-D, Hong M-N, Chen J, Lu Y-Y, Ye M-Q, Ma Y, et al. Adventitial fibroblast-derived vascular endothelial growth factor promotes vasa vasorum-associated neointima formation and macrophage recruitment. *Cardiovascular research*. 2019.
68. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, Tzankov A, Mairinger T, Laufer G, et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *The Annals of thoracic surgery*. 2004;77(5):1580-5.
69. Yan H, Peng X, Xu H, Zhu J, Deng C. Inhibition of Aortic Intimal Hyperplasia and Vascular Smooth Muscle Proliferation and Extracellular Matrix Protein Expressions by Astragalus–Angelica Combination. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018.
70. Zhou J, Cao B, Ju W, Liu S, Song J, Liu L. Effects of tongxinluo on angiogenesis in the carotid adventitia of hyperlipidemic rabbits. *Molecular medicine reports*. 2016;14(4):3832-40.
71. Kheirabadi BS, Field-Ridley A, Pearson R, MacPhee M, Drohan W, Tuthill D. Comparative study of the efficacy of the common topical hemostatic agents with fibrin sealant in a rabbit aortic anastomosis model. *Journal of Surgical Research*. 2002;106(1):99-107.
72. Wippermann J, Konstas C, Breuer M, Kosmehl H, Wahlers T, Albes JM. Long-term effects in distal coronary anastomoses using different adhesives in a porcine off-pump model. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2006;132(2):325-31.
73. Vokri L, Qavdarbasha A, Rudari H, Ahmetaj H, Manxhuka-Kërliu S, Hyseni N, et al. Experimental study of sutureless vascular anastomosis with use of glued prosthesis in rabbits. *Vascular health and risk management*. 2015;11:211.
74. Hewitt CW, Marra SW, Kann BR, Tran HS, Puc MM, Chrzanowski Jr FA, et al. BioGlue surgical adhesive for thoracic aortic repair during coagulopathy: efficacy and histopathology. *The Annals of thoracic surgery*. 2001;71(5):1609-12.
75. Hwang JM, Wu CH, Kuo WW, Jong GP, Lai CH, Tsai CH, et al. Pro-inflammation and pro-fibrosis factors were highly induction in heart tissues of carotid arteries balloon-injured animal model. *Cell biochemistry and function*. 2012;30(5):390-4.

76. Mitrofanova LB, Orshanskaya V, Ho SY, Platonov PG. Histological evidence of inflammatory reaction associated with fibrosis in the atrial and ventricular walls in a case-control study of patients with history of atrial fibrillation. *EP Europace*. 2016;18(suppl_4):iv156-iv62.
77. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(10):2825-30.
78. Mathews MK, Merges C, McLeod DS, Luty GA. Vascular endothelial growth factor and vascular permeability changes in human diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1997;38(13):2729-41.
79. Shaik-Dasthagirisahab Y, Varvara G, Murmura G, Saggini A, Potalivo G, Caraffa A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. SAGE Publications Sage UK: London, England; 2013.
80. Shibuya M. VEGF-VEGFR system as a target for suppressing inflammation and other diseases. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*. 2015;15(2):135-44.
81. Zhang Q, Fang W, Ma L, Wang Z-D, Yang Y-M, Lu Y-Q. VEGF levels in plasma in relation to metabolic control, inflammation, and microvascular complications in type-2 diabetes: a cohort study. *Medicine*. 2018;97(15).
82. Dai L, Gao M, Gu C, Zhang F, Yu Y. Perivenous application of cyanoacrylate tissue sealants reduces intimal and medial thickening of the vein graft and inflammatory responses in a rabbit model of carotid artery bypass grafting. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2015;49(2):675-81.
83. Fürst W, Banerjee A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *The Annals of thoracic surgery*. 2005;79(5):1522-8.
84. Zilla P, Weissenstein C, Human P, Dower T, von Oppell UO. High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model. *The Annals of thoracic surgery*. 2000;70(6):2091-5.
85. Schiller W, Rudolf H, Kiderlen M, Welzel C, Schmitz C, Probst C, et al. Short-Term Tissue Response of Lapine Carotid Artery Microanastomoses to BioGlue®. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*. 2007;55(05):298-303.
86. Stooker W, Niessen H, Jansen E, Fritz J, Wildevuur W, Van Hinsbergh V, et al. Surgical sealant in the prevention of early vein graft injury in an ex vivo model. *Cardiovascular Pathology*. 2003;12(4):202-6.
87. Slezak P, Klang A, Ferguson JC, Schmidt P, Bauder B, Url A, et al. Tissue Reaction to a Polyethylene Glycol-Based and Glutaraldehyde-Based Surgical Sealant in a Rabbit Aortic Anastomosis Model. *Journal of the American College of Surgeons*. 2019;229(4):e211-e2.
88. Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(9):1258-65.
89. Bahnsen ES, Havelka GE, Koo NC, Jiang Q, Kibbe MR. Periadventitial adipose tissue modulates the effect of PROLI/NO on neointimal hyperplasia. *Journal of Surgical Research*. 2016;205(2):440-5.
90. Chen Y, Wong MM, Campagnolo P, Simpson R, Winkler B, Margariti A, et al. Adventitial stem cells in vein grafts display multilineage potential that contributes to neointimal formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(8):1844-51.
91. Tigerstedt N-M, Savolainen-Peltonen H, Lehti S, Hayry P. Vascular cell kinetics in response to intimal injury ex vivo. *Journal of vascular research*. 2010;47(1):35-44.

92. Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *British journal of pharmacology*. 2017;174(20):3496-513.
93. Dashwood MR, Dooley A, Shi-Wen X, Abraham DJ, Souza DS. Does periadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery? *Journal of vascular research*. 2007;44(3):175-81.

